

# Kronik Lenfositik Lösemide CD38, CD16, CD56 ve ZAP70 Hücre Yüzey Antijen Düzeylerinin Klinik Önemi

## *The Clinical Significance of CD38, CD16, CD56 and ZAP70 Cell Surface-Antigen Expression in Chronic Lymphocytic Leukaemia*

<sup>1</sup>Aynur Uğur Bilgin, <sup>1</sup>Sevilay Tuncez, <sup>2</sup>İsmail Reisli

<sup>1</sup>Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi İç Hastalıkları A.D., Konya  
<sup>2</sup>Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi Çocuk Hastalıkları A.D., Konya

### Özet

Kronik Lenfositik Lösemi(KLL) kan, kemik iliği, lenf nodu ve dalakta proliferasyon özelliği olmayan olgun B lenfositlerin artışı ile ortaya çıkan; farklı klinik seyirler gösterebilen bir hastalıktır. Rai ve Binet tarafından oluşturulan sınıflamalar KLL'de en sık kullanılan güncel evreleme sistemleridir. Ancak prognozu belirlemede erken evre vakalarla sınırlı kalmaları en önemli eksiklikleridir. Bu çalışmada amaç yeni tanı almış ve tedavi almayan KLL hastalarında ZAP70, CD38, CD16 ve CD56 ekspresyon düzeylerinin evre ve prognoza etkilerinin incelenmesidir. ZAP70 ekspresyonu, çalışmaya alınan 35 hastanın 5'inde pozitif olarak saptandı. Düşük ZAP70 ekspresyonu gösteren hastaların erken evre vakalar olduğu ve bu hastaların progresyonsuz sağ kalımlarının uzun olduğu tespit edildi. CD38 ekspresyonu, 3 hastada pozitif olarak saptandı. CD38 ekspresyonu düşük hastaların da daha çok erken evre oldukları ve progresyonsuz sağ kalım sürelerinin diğerlerinden daha uzun olduğu saptandı. Olgularda ZAP70 ekspresyonu ile CD38 ekspresyon düzeyi karşılaştırıldığında sadece bir olguda aynı anda her ikisinde pozitiflik vardı. CD38 ile ZAP70 pozitifliği arasında anlamlı ilişki saptanmadı. CD56, CD16 tüm hastalarda düşük düzeyde ekspresyon edildi. Bu çalışmadaki hastaların büyük çoğunluğunda ZAP70, CD38, CD16 ve CD56 antijen düzeyleri düşük bulunmuştur. Hastaların %74'nün erken evre ve/veya tedavisiz izlemde olduğu göz önüne alındığında sonuçlarımızın son derece anlamlı olduğu izlenmektedir. Ancak, KLL'de hücre yüzey antijenlerinin evre ve prognoza etkilerini daha iyi anlayabilmek için, kontrol grubu içerden daha fazla hasta sayılı ve uzun takipli çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar kelimeler:** KLL, hücre yüzey antijenleri, prognoz

### Abstract

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is a disease characterized by increased number of mature B lymphocytes in blood stream, bone marrow, lymph node and spleen with different clinical course. In CLL patients, Rai and Binet classification systems are established for determination of the necessity of treatment and prediction of survival. However, the prognostic value of these classifications is limited in early staged patients. The aim of this study was to investigate the effects of surface antigens (ZAP70, CD38, CD16 and CD56) in staging and prognosis of newly diagnosed and untreated patients with CLL. ZAP70 expression was positive in 5 of 35 investigated patients. The majority of patients with low expression levels of ZAP70 was early stage of disease and progression-free survival of these patients was longer than others. CD38 expression was positive in 3 of 35 investigated patients. The majority of patients with low expression levels of CD38 was early stage of disease and progression-free survival of these patients was longer than others. In only one patient, both ZAP70 and CD38 expressions were positive. There was no significant correlation in patients between the expression of ZAP70 and CD38 CD56, CD16 was expressed at low levels in all patients. The majority of patients in this study, expressions of surface antigens such as ZAP70, CD38, CD16 were found as low. Our results are highly significant when 74 % of them are considered to be a early-stage and/or follow-up without treatment. However, Long-term clinical observational studies with control groups should be made for understanding the effects of surface antigens in staging and prognosis of CLL.

**Key words:** CLL, cell surface-antigen expression, prognosis

### GİRİŞ

Kronik lenfositik lösemi (KLL) CD5+ B lenfositlerin periferik kanda, kemik iliğinde, sekonder lenfoid organlarda ve dalakta anormal birikimi ile karakterize erişkinlerde en sık görülen lösemi tipidir. Erkeklerde kadınlara göre daha sık gözlenir ve Erkek/Kadın oranı yaklaşık olarak 1,5-2,1:1'dir. Hastalık ileri yaşlarda ortaya çıkmakla birlikte KLL hastalarının % 20-30'u 55 yaş altındadır. Hastalığın klinik seyri son derece değişkendir. Bazı hastalarda yavaş seyirli bir klinik gidiş görülürken, kimi hastalarda ise tanıdan kısa bir süre sonra tedavi gereksinimi doğar. Toplam sağkalım süresi hastanın başvuru sırasındaki klinik evresine bağlı olarak aylar ile sınırlı olabileceği gibi on yıllarla ifade edilebilecek kadar uzun olabilir (1,2). Kronik lenfositik lösemi tanılı bazı hastalarda klinik evreden ve

günümüz koşullarında bilinen birtakım belirteçlerden bağımsız olarak çok hızlı bir gidiş ve tedavilere yanıtızlık gözlenebilmektedir. Konuyla ilgili olarak ilk kez 1975 yılında Rai ve daha sonra Binet tarafından bir sınıflama sistemi geliştirilmiştir (3-5). Bu sınıflama sistemlerinin en önemli eksikliği özellikle erken evre vakalarda sınırlı kalmasıdır. Oysa erken evre olarak başvuran olguların yaklaşık %30-40'ı ileri evrelere geçmekte ve hastalık nedeniyle yaşamlarını yitirebilmektedir. Özellikle genç yaşta tanı alan hastalarda hastalığın nasıl gideceğine dair ipuçlarına şiddetle ihtiyaç vardır. Konuyla ilgili olarak yapılan birçok çalışmada bir takım klinik ve laboratuvar belirteçlerin erken dönemde prognozu belirlemeye yardımcı olabileceği gösterilmiştir (6). Bu çalışmasının amacı, yeni tanı almış veya önceden tanı almış ancak halen tedavisiz izlemde olan KLL

hastalarının, kemik iliği aspirasyonlarından alınan kan örneklerinde yeni prognostik belirteçler olarak kabul edilen ZAP70 ve CD38, CD16, CD56 gibi hücre yüzey antijen düzeylerinin evre ve hastalık seyri arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada ucuz ve kolay uygulanabilir bir metot olan flow sitometri yöntemi ile KLL hastaların Kİ aspirasyonlarından elde edilen kan örneklerinde ZAP70, CD38, CD16, CD56 antijen ekspresyon düzeyleri çalışılmıştır. Çalışmada ZAP70, CD38, CD16, CD56 antijen düzeyleri için pozitiflik %20 ve üzeri olarak kabul edilmiştir.

## İstatiksel analiz

Bu çalışmada elde edilen verilerin değerlendirilmesinde SPSS 16.0 paket programı kullanıldı. ZAP70, CD38, CD16, CD56 ile diğer değişkenler arasındaki karşılaştırmalar, Mann-whitney U ve Crosstabs ki-kare testi ile değerlendirildi. Korelasyon analizleri, Pearson testi kullanılarak yapıldı. P değerinin <0,05 olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

Çalışmamıza 25'i erkek, 10'u kadın toplam 35 KLL hastası katılmıştır. Kadınların medyan yaşı: 72 (47-81), erkeklerin medyan yaşı: 65 (45-85) idi. Yeni tanı: 8 hasta, tedavisiz takipte olan: 27 hasta (tedavisiz geçen medyan süre: 35 ay (9-61)) vardı. 12 hasta Evre 0, 9 hasta Evre I, 5 hasta Evre II, 5 hasta Evre III, 4 hasta Evre IV'dü. Çalışmaya katılan hastaların hepsi B hücre kökenliydi. Evre 0 olan 12 hastanın 2 si yeni tanı idi. Tedavisiz takipte olan hastaların medyan takip süresi: 32 ay (21-47). Yeni tanı 2 hastada ZAP70 ekspresyonu düşüktü. Tedavisiz takipte olan 10 hastanın 8'inde ZAP70 düşük, 2'sinde yüksekti. Hastaların hepsinde CD38, CD16, CD56 ekspresyon düzeyleri düşük tespit edildi. Evre I olan 9 hastanın 3'ü yeni tanı, 6'sı medyan 37.5ay (9-60) takipli olan hastalardı. Bir hastada CD38 antijen ekspresyonu yüksekti. 9 hastada ZAP70 ve çalışılan diğer parametrelerin düşük olduğu görüldü. Evre II olan 5 hastanın hepsinde medyan 46 ay (13-61ay) takip edilen hastalardı. Bu hastalardan birinde ZAP70 ekspresyonu yüksekti. Evre III olan 5 hastanın 2'si yeni tanı 3'ü medyan 31ay (18-51 ay) takipliydi. Tüm hastalarda ZAP70 ve çalışılan hücre yüzey antijenlerinin düzeyleri düşük olarak bulundu. Evre IV olarak tespit edilen 4 hastadan biri yeni tanı 3'ü medyan 41ay (48-14ay) takipli hastalardı. Takipte olan bu 3 hastanın ortalama progresyonsuz yaşam süresi 12ay (10-36ay) dı. Evre IV olarak tespit edilen bu hastalardan 2 sinde hem ZAP70 hemde CD38 ekspresyon düzeyleri yüksek bulundu.

Tanı sırasında evre III olan ve çalışmaya dahil edilen 2 hastaya, tedavisiz takipte iken evre 0'dan evre III' ilerleyen ve semptomatik hale gelen 3 hastaya [tedavisiz sağkalım süreleri medyan: 19 ay (15-26)] tedavi başlandı. Bu 3 hastanın 2'sinin dosya verileri incelendiğinde tanı anındaki CD38 ekspresyonlarının yüksek olduğu izlendi. ZAP70 ekspresyonu pozitif ve negatif olan gruplar arasında yaş ve cinsiyet farkı yoktu. Çalışmaya alınan 35 hastadan, 26 hasta (%74,3) Rai Evresi 0-I veya II, 9 hasta (%25,7) Evre III- Evre IV idi. Evre III ve Evre IV olan 9 hastanın 2'sinde ZAP70 antijenik ekspresyonu pozitif (%22,2), 7'sinde ZAP70 ekspresyonu negatif (%77,8). CD16, CD56 çalışmaya katılan 35 hastanın 6' sında % 5 'in üzerinde (3'ünde % 10) bulundu. Hastaların yine 3'ünde eş zamanlı ZAP70 antijenik ekspresyonu pozitif. Bu 6 hastanın 5'inde CD38 negatif 1'inde CD38 pozitif. Olgu sayısının az olması nedeni ile aralarında istatistiksel ilişki kurulamadı.

## TARTIŞMA

Kronik lenfosit lösemi batı toplumlarında en sık görülen lösemi tipidir ve tüm lösemilerin %20-30'unu oluşturur(2). Erkeklerde kadınlardan iki kat fazla görülmektedir. Hastalığın fenotipi çoğunlukla (%95) B hücreli-KLL şeklindedir. Kronik lenfosit lösemi tanı hastaların en önemli özelliği hastalığın seyrinin son derece değişken olmasıdır. Güncel skorlama sistemlerinin prognozu belirlemedeki yetersizliği yüzünden çalışmalar yeni prognostik belirteçler üzerinde yoğunlaşmıştır. Son yıllarda erken dönem hastalığın gidişini belirlemede kullanılan en önemli belirteçlerden biri İmmüoglobulin ağır zincir değişken bölgesindeki (IgVH) somatik mutasyon olup olmamasıdır. KLL vakalarında IgVH mutasyonu gösterenler iyi bir klinik gidiş göstermesine karşılık mutasyona uğramayanlar mevcut kemoterapotik ajanlara cevap vermeyerek kötü bir gidiş göstermektedir. Bununla birlikte IgVH gen dizisinin belirlenmesi ve mutasyon varlığının araştırılması özel ekipman gerektirdiği ve pahalı bir yöntem olduğundan rutin inceleme ve takip yöntemi olarak kullanılmamaktadır (7).

Kronik lenfosit lösemi'de zeta ilişkili protein (ZAP70) ekspresyonu prognozu belirlemede kullanılan bir diğer belirteçtir. ZAP70, T hücrede sinyal iletiminin başlamasında önemli rol oynayan T hücre reseptör (THR) sinyal ileti sisteminde görevli bir protein tirozin kinazdır. Çeşitli klinik çalışmalarda ZAP70 ekspresyonu pozitif hastalarda hastalığın hızlı bir seyir izlediği ve bu hastalarda tedavisiz geçen sürecin kısa, tedavi ihtiyacının yüksek, sağkalımın düşük olduğu bildirilmiştir. Son dönemde yapılan araştırmalar KLL hücrelerinde saptanan ZAP70 ekspresyonu ile IgVH mutasyonu arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir (8,9). Bu durum her iki belirteçinde hastalığın prognozunu belirlemede kullanabileceğimize dair ipucu vermektedir. Orchard ve arkadaşlarının 167 KLL hastası ile yaptıkları çalışmada akım sitometrik yöntemle ölçülen ZAP70 ekspresyonunun KLL' de güvenilir bir belirteç olabileceği gösterilmiştir (10). Yine Crespo ve arkadaşları tarafından 56 KLL hastasında akım sitometri yöntemiyle saptadıkları ZAP70 ekspresyonu, IgVH mutasyon durumuyla karşılaştırdıkları çalışmada; ZAP70'in yüksek oranları ile IgVH geninde mutasyon olmaması arasında pozitif bir ilişki olduğu gösterilmiştir(11). Bizim çalışmamızda sadece 5 hastada ZAP 70 ekspresyonu pozitif olarak bulunmuş olup sayı yetersiz olduğu için istatistik yapılamamıştır. Ancak bu çalışmada yer alan hastaların çoğunluğunun [26 hastanın (%73)] erken evre olduğu göz önüne alındığında elde edilen sonucun gerçekte çok anlamlı olduğu düşünülmekte ve literatürle paralel olduğu görülmektedir. Yine çalışmadaki erken evre olarak belirlenen 26 hastanın 23'ünde ZAP70 ekspresyonu düşük ve tedavisiz geçen sürelerinin uzun olarak bulunması bir çok çalışma sonucunu destekler niteliktedir.

Durig ve ark. yüksek CD38 ekspresyonu ve hastalık seyri arasında ters bir ilişki olduğunu tespit etmiştir. Özellikle çok yüksek CD 38 ekspresyonu olan hastalarda hastalığın son derece kötü seyrettiği gösterilen bu çalışmada CD38 ekspresyonu KLL'li hastalarda bir belirteç olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür (12). Damle ve ark. ise IgVH mutasyonuna uğramış hücrelerde CD38 ekspresyonunun düşük olduğunu saptamışlar ve bunun sonucunda IgVH mutasyonunu göstermede CD38'in kullanılabileceği öne sürmüşlerdir (13). Ancak bu durum diğer çalışmalarda gösterilememiş, IgVH mutasyonu ve CD38 ekspresyonu birbirinden bağımsız prognostik faktörler olarak kabul edilmiştir (14,15). Bizim çalışmamızda sadece 35 hastanın 3'ünde CD38 yüksek olarak bulunmuştur. CD38 ekspresyonu göstermeyen 32 hastanın 24 'ü (%75) erken evreydi. Çalışmaya alınan tüm erken evre 26 hastadan ise sadece birinde CD38 ekspresyon düzeyi %20' nin üzerindeydi. Sayılarımız istatistik yapmak için uygun olmamakla birlikte

gerçekte sonucumuz literatürdeki bilgilere uygun olarak görünmektedir. Ancak bu çalışmada, hastaların uzun süreli takipleri yapılamaması nedeni ile CD38 ekspresyonu ile hastalığın seyri ilişkilendirilememiştir.

Doğal immünitinin elamanı olan doğal öldürücü (Natural Killer-NK) hücreler kemik iliği kökenli, büyük granüllü lenfositlerdir. B-KLL hastalarında, NK hücreleri fenotipik ve fonksiyonel değişikliklere uğramıştır. Bundan dolayı B-KLL hastalarının bir kısmında periferik kan örneklerinden yapılan çalışmalarda NK aktivitesi düşük ve bozulmuş olarak bulunmaktadır (16,17). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda KLL hastalarının periferik kanlarında CD3+/CD16+CD56+ olan Natural killer benzeri(NK like T) hücreler tespit edilmiştir. Özellikle hastalığın progresyonu ile birlikte CD3+/CD16+CD56+ ekspresyonunda azalma tespit edilmiştir. CD3+/CD16+CD56+ ekspresyonu takibi prognozu belirlemede kullanılabileceği ileri sürülmüştür (18). Çalışmamıza katılan hastaların hepsinin B hücreli KLL olması, NK hücreli KLL hastamızın hiç olmamasından dolayı Kİ aspirasyonu örneklerimizin hepsinde CD56 ve CD16 ekspresyonu %20'nin altında tespit edilmiştir. Çalışmalarda NK hücrelerinin periferik kanda çalışılması, bu çalışmada ise Kİ aspirasyon örneklerinin kullanılması ve düşük CD56 ve CD16 düzeylerinin bulunmasını görece açıklamaktadır. Çalışmamızda CD56-CD16 ekspresyonlarının düşük tespit edilmesinin bir sebebi de, B-KLL hastalarında NK hücre sayı ve fonksiyonundaki azalma olabilir.

Sonuç olarak, KLL hastalarında hastalığın seyrini belirlemede ZAP70, CD38, CD56, CD16 antijenik ekspresyonlarının kullanılabileceğine dair bir çok çalışma bulunmaktadır. Özellikle yüksek orandaki düzeylerin ileri evre hastalık, erken dönemde tedavi ihtiyacının belirlenmesi ve tedaviye yanıtızlık ile birlikteliğinin bildirilmesi bu belirteçleri giderek ilgi odağı haline getirmiştir. Bizim çalışmamızdaki hastaların yüksek çoğunluğunun erken evre ve/veya tedavisiz izlemde olması ve çalışılan prognostik belirteçlerin çoğunluğunda düşük bulunması değerlerin gerçekte anlamlı olduğunu ve literatür bilgileri ile uyduğunu göstermektedir. Ancak sonuçların net bir anlamlılık kazanması için daha fazla hasta katılımına ve daha uzun takip sürelerine ihtiyaç vardır.

#### KAYNAKLAR

1. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; 352:804-15.
2. Ghia P, Ferreri AM, Galigaris-Cappio F. Chronic Lymphocytic Leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 63: 234-46.
3. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical Staging of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* 1975; 46: 219-34.

4. Rai KR, Han T. Prognostic factors and clinical staging in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 1990; 4: 447-56.
5. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981; 48: 198-206.
6. Montillo M, Hamblin T, Hallek M, Montserrat E, Morra E. Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies *Haematologica* 2005; 90: 391-9.
7. Hamblin TJ, Davis Z, Gardnier A, Oscier D, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94:1848-54.
8. Cruse JM, Lewis RE, Webb RN et al. Zap-70 and CD38 as predictors of IgVH mutation in CLL. *Exp Mol Pathol* 2007; 83:459-61
9. Wiestner A, Posenwald A, Barry TS, et al. ZAP70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 2003; 101: 4944-51.
10. Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Lancet* 2004; 363: 105-11.
11. Crespo M, Bosch F, Villamor N et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulinvariable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003; 348: 1764-75.
12. Durig J, Naschar M, Schmucker U, et al. CD38 Expression is an Important Prognostic Factor in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Leukemia* 2002; 16: 30-5.
13. Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. Ig V Gene Mutation Status and CD38 Expression As Novel Prognostic Indicators in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* 1999; 94: 1840-7
14. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, et al. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood* 2002; 99 : 1023-9.
15. Ibrahim S, Keating M, Do KA, et al. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; 98 (1): 181-6.
16. Guven H, Gilljam M, Chambers BJ, et al. Expansion of natural killer (NK) and natural killer-like T (NKT)-cell populations derived from patients with B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL): a potential source for cellular immunotherapy. *Leukemia* 2003; 17:1973-80.
17. Günnür D. NK ve NKT Hücreler. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2007;3:18-25.
18. Agnieszka BJ, Iwona H, Malgorzata S, et al. Natural killer-like T CD3+/CD16+CD56+ cells in chronic lymphocytic leukemia: Intracellular cytokine expression and relationship with clinical outcome 2010; 24: 803-10.