



T. C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

KRONİK MİYELOSİTER LÖSEMİLERDE FÜZYON GEN KALİTATİF VE
KANTİTATİF DEĞERLERİNİN FISH VE MOLEKÜLER GENETİK
YÖNTEMLER İLE KARŞILAŞTIRILMASI

Dr. Şebnem ÖZEMRİ SAĞ

UZMANLIK TEZİ

Bursa-2010



T. C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

KRONİK MİYELOSİTER LÖSEMİLERDE FÜZYON GEN KALİTATİF VE
KANTİTATİF DEĞERLERİNİN FISH VE MOLEKÜLER GENETİK
YÖNTEMLER İLE KARŞILAŞTIRILMASI

Dr. Şebnem ÖZEMRİ SAĞ

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Doç. Dr. Tahsin YAKUT

Bursa -2010

İÇİNDEKİLER

Özet	ii
İngilizce Özet	iii
Giriş	1
Gereç ve Yöntem	54
Bulgular	60
Tartışma ve Sonuç	75
Kaynaklar	86
Teşekkür	102
Özgeçmiş	103

ÖZET

BCR-ABL pozitif hücrelerin tespitinde, Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) ve Kantitatif Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonunu (QRT-PCR) içeren moleküler tanısal yöntemler, klasik konvansiyonel sitogenetik analize göre daha sensitiftir. QRT-PCR, üstün sensitivitesinden dolayı, imatinib ile tedavi edilen Kronik Miyelositer Lösemilerin (KML) takibinde altın standart olarak düşünülmektedir. Bizim çalışmamızın amacı, KML hastalarında farklı zamanlarda FISH ve QRT-PCR'in diagnostik ve klinik faydalılığının karşılaştırılmasıdır.

Bu çalışmada, retrospektif olarak analiz edilen 78 KML hastasının 135 sonucu Philadelphia (Ph) translokasyonu için hem FISH hem de QRT-PCR çalışmaları ile test ettik ve bu iki farklı tekniğin avantaj ve dezavantajlarını değerlendirdik.

Bizim çalışmamız, yeni tanı konmuş vakaların tümünün her iki metotla pozitif olduğunu gösterdi. Bir vakada, FISH pozitif, QRT-PCR negatif; 61 vakada QRT-PCR pozitifken FISH negatifti. FISH ve QRT-PCR'in tam uyumu (her iki testte negatif veya pozitif olma) 73 vakada bulundu (%54,1) ve 62 vakada (%45,9) farklılık tanımlandı. Aynı zamanda QRT-PCR değerleri ile sitogenetik yanıt kategorileri arasında iyi bir uyum vardı.

QRT-PCR'in düşük seviyelerdeki BCR-ABL transkriptlerini tam olarak ölçmeye izin verdiğini ve minimal rezidüel hastalığın (MRH) hassas bir göstergesi olarak hizmet verdiğini doğruladık. Ek olarak, yeni tanı konmuş KML hastaları arasında BCR-ABL füzyon genini tespit etmede FISH ile QRT-PCR 'in %100 korele olduğunu gösterdik. Aynı zamanda FISH'in minimal rezidüel hastalığın takibinde uygun olmadığı sonucuna vardık.

Anahtar kelimeler: Kronik miyelositer lösemi (KML), philadelphia (Ph) translokasyonu, floresan in situ hibridizasyon (FISH), kantitatif revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (QRT-PCR), minimal rezidüel hastalık (MRH).

SUMMARY

Comparison of Qualitative and Quantitative Values of Fusion Gene by FISH and Molecular Genetic Methods in Chronic Myelogenous Leukemia

The molecular diagnostic methods including fluorescence in situ hybridization (FISH) and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (QRT-PCR) are more sensitive than classical conventional cytogenetic analysis for the detection of *BCR-ABL* positive cells. QRT-PCR, due to its superior sensitivity, is considered the gold standard for the follow-up of chronic myelogenous leukemia (CML) treated with imatinib. The objective of our study was to compare the diagnostic and clinical usefulness of FISH and QRT-PCR at different time points for CML patients.

In this study, we retrospectively analyzed 135 results of 78 patients with CML tested by both FISH and QRT-PCR studies for Philadelphia (Ph) translocation and evaluated the advantages and disadvantages of these two different techniques.

Our study demonstrated that all newly diagnosed cases were positive with both methods. In one case, FISH was positive and QRT-PCR was negative; in 61 cases, FISH was negative while QRT-PCR was positive. An overall concordance of FISH and QRT-PCR (being either negative or positive in both tests) was found in 73 cases (54.1%) and a discrepancy identified in 62 cases (45.9%). Also, there was a good concordance between QRT-PCR values and cytogenetic response categories.

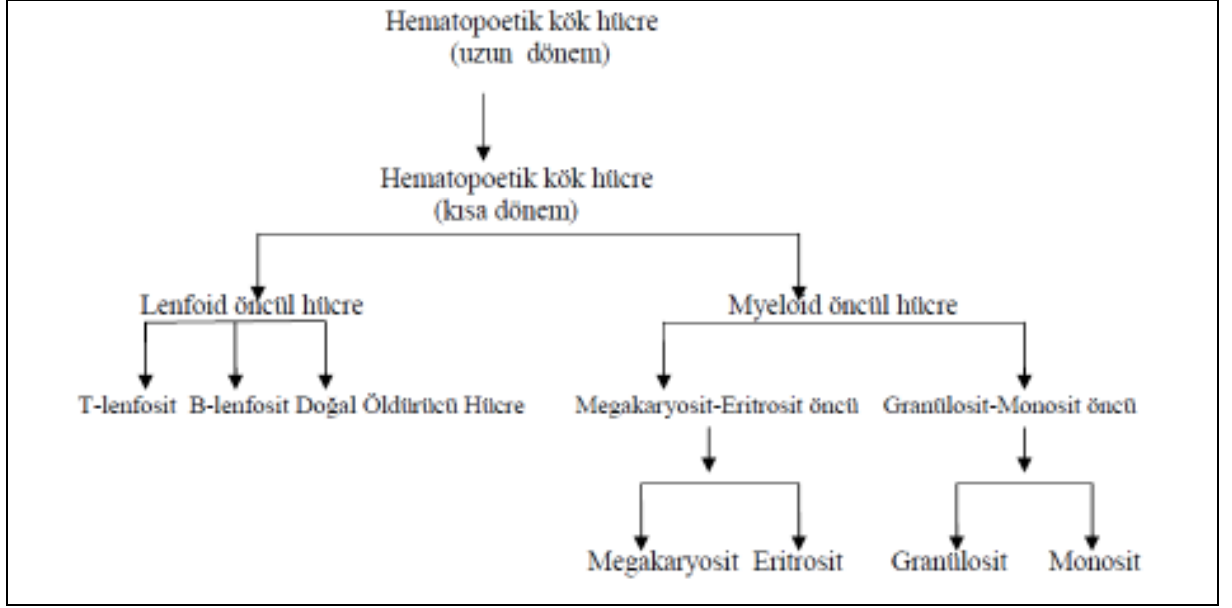
We confirm that QRT-PCR allows precise measurement of low levels of *BCR-ABL* transcripts and can serve as a sensitive indicator for minimal residual disease. In addition, we demonstrate a 100% correlation of QRT-PCR with FISH in detecting the *BCR-ABL* fusion gene among patients with newly diagnosed CML. We also conclude that FISH is not suitable for monitoring minimal residual disease.

Key words: Chronic myelogenous leukemia (CML), philadelphia (Ph) translocation, fluorescence in situ hybridization (FISH), quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (QRT-PCR), minimal residual disease (MRD).

GİRİŞ

Lösemi terimi, 1845 yılında ilk kez Virchow tarafından kullanıldı (1). Lösemi, hematopoezin herhangi bir aşamasında hücre farklılaşmasının durması ve hücrelerin klonal olarak çoğalarak kemik iliğini ve/veya kemik iliği dışı dokuları sarmasıdır (2, 3). Lösemi hücreleri birincil olarak kemik iliğinde ve lenfoid dokularda çoğalır, sonra periferik kana geçerek diğer dokulara yayılır (4, 5).

Hematopoetik kök hücreler, kendi kendini yenileme ve matür kan hücrelerine farklılaşabilme yeteneğine sahiptirler. İlk hücreler, lenfoid ve myeloid projenitör olarak adlandırılan seriyi meydana getirir. Lenfoid öncüller tekrar bölünürler ve T, B lenfosit ve doğal öldürücü hücrelere farklılaşırlar. Myeloid öncül hücreler, granülosit-monosit prekürsörler ve megakaryosit-eritrosit prekürsörlerini ortaya çıkarır. İlk hücre soyundan granülositler ve monositler gelişirken, diğerinden trombosit ve eritrositler gelişir. Hematopoetik kök hücreden olgun kan hücrelerinin oluşumu aşağıda gösterilmiştir (Şekil-1) (6). Lösemilerde ise kemik iliği hücrelerinin gelişim aşamaları sırasında bir nesilde hücrelerin çoğalma hızının arttığı görülür, neoplastik klon kemik iliğinde çoğalır ve diğer kemik iliği hücrelerinin yerini almaya başlar. Hücre hatlarının sayısında periferik kandaki kan hücrelerinin yerini tutacak ölçüde bir artış görülür (7).



Şekil-1: Hematopoetik hiyerarşi.

Morfolojik yönden hastalığa tutulan hücre dizisinin tipine göre (myeloid ya da lenfoid) ve prolifere olan kan hücresinin genç ya da olgunlaşmış olmasına göre (akut ya da kronik) sınıflandırması yapılmaktadır (8).

Akut lösemiler, olgunlaşmamış kan yapıcı veya öncül hücrelerin artışı sonucu oluşmaktadır. Akut lösemilerde kontrolsüz çoğalan hücreler lenfoid öncül hücreler ise “akut lenfoblastik (lenfoid) lösemi”, myeloid öncül hücreler ise “akut myelositik (myeloid) lösemi” olarak tanımlanmaktadır.

Kronik lösemiler ise olgunlaşmış kemik iliği elemanlarının artışı sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır. Kronik lösemilerde kontrolsüz çoğalan hücreler lenfoid öncül hücreler ise “kronik lenfositik (lenfoid) lösemi”, myeloid öncül hücreler ise “kronik myelositik (myeloid) lösemi” olarak tanımlanmaktadır (8).

Kronik Miyelositer Lösemi (KML)

Tanımı

Kronik miyelositer lösemi (KML), kronik granülositik lösemi olarak da adlandırılır. KML, primitif pluripotent kök hücrenin myeloid projenitör hücrelerde artmış proliferasyon ve azalmış apoptozu ile karakterize klonal bir hastalıktır (9-12). Kemik iliğinde aşırı myeloid hiperplazi, periferik kanda

olgun miyeloid hücrelerden oluşan yüksek lökosit sayısı (bazofili ile birlikte) ve splenomegali ile karakterizedir. Akut lösemide varolan patolojik tablonun aksine, KML'de lösemi hücreleri farklılaşma yeteneklerini kaybetmemişlerdir (13). Kronik, akselere ve blastik olmak üzere üç farklı klinik evre ile karakterizedir: Kronik faz olarak adlandırılan ilk fazda olgunlaşma gösteren miyeloid hücrelerin artışı mevcut iken ardından gelen ikinci ve üçüncü fazlarda zamanla miyeloid olgunlaşma azalır ve akselere faz ve / veya blastik faza geçiş gözlenir (9).

KML, spesifik karyotipik anomalinin saptandığı ilk hastalıktır. Moleküler düzeyde en iyi karakterize edilmiş lösemi tipidir (14). Aynı zamanda biyolojik ajan olan interferon kullanılarak lösemik klonun baskılandığı ve sağkalımın uzatıldığı ilk neoplastik hastalık olma özelliğini de taşımaktadır (15).

KML, kronik miyeloproliferatif hastalıklardan (KMPH) bir tanesidir (Tablo-1). Miyeloproliferatif hastalıkların hepsinde neoplastik kök hücrelerin proliferatif kapasitesi kontrolsüzdür ve aşırı hemotopoesis meydana gelir. Neoplastik kök hücreler tam farklılaşma geçirme yeteneklerini korurlar ve sonuç olarak kanda kemik iliğinde matür ve immatür hücre sayısında belirgin bir artma görülür.

KMPH, neoplastik kök hücrelerinin geçirdiği predominant farklılaşma türü ile birbirlerinden ayırt edilirler. Ayrıca KMPH ilerleyicidir ve iyi şekillenmiş ve işlevli hücrelerin aşırı üretildiği bir hastalıktan, kemik iliği yetmezliği veya akut lösemiye geçişin eşlik ettiği bir hastalığa dönüşme olasılığı taşırlar. Benzer hücre ve kaynak dokuya rağmen bütün miyeloproliferatif hastalıklar bir hastalık olarak gruplandırmak ve tedavi etmek mümkün değildir. En sık görülen KMPH'lar KML, esansiyel trombositemi, idiyopatik miyelofibrozis ve polisitemia vera'dır (16).

Tablo-1: Kronik miyeloproliferatif hastalıkların sınıflandırılması (17).

• Tipik Kronik Miyeloid Lösemi
Morfolojik varyantları:
Kronik eozinofilik lösemi
Kronik bazofilik lösemi
Kronik nötrofilik lösemi
• Esansiyel trombositemi
• Polisitemia vera
• İdiyopatik miyelofibrozis
• Kronik miyelomonositik lösemi, proliferatif tip
• Atipik kronik miyeloid lösemi

Tarihçe

İlk bildirilen KML olgularının 1848 yılına rastlamasına rağmen bugünkü anlamda ilk klinik tanım 1924'te yapılmıştır (18). 1960 yılında Nowell ve Hungerford tarafından Kronik Miyelositer Lösemili hastalarda anormal bir kromozom saptanmıştır. İnsan kanserleri ile ilişkisi tespit edilen ilk kromozomal bozukluk olan ve daha sonra keşfedildiği şehrin ismiyle Philadelphia (Ph) kromozomu olarak anılan 9. ve 22. kromozomlar arasındaki bu translokasyon, kromozomal bantlama tekniğindeki ilerlemeler sayesinde 1973'te Rowley tarafından gösterilmiştir. 1980'li yıllarda yapılan araştırmalar, karşılıklı translokasyona bağlı olarak, 9. kromozom üzerindeki "ABL" proto-onkogeni ile 22. kromozom üzerindeki "BCR" geninin birleşmesi sonucu oluşan "BCR-ABL" füzyon geninin, KML hastalarında kök hücre çoğalmasını arttıran ve programlanmış hücre ölümünü inhibe eden tirozin kinaz aktivitesine sahip bir protein kodladığını ortaya koymuştur. Hastalığın moleküler temeline ışık tutan bu bilgiye dayanılarak 1990'lı yılların ortalarından itibaren tirozin kinaz inhibisyonuna yönelik geliştirilmeye başlanan ilaçlarla günümüzde KML, potansiyel tedavi edilebilir bir hastalık olarak karşımızdadır (19).

Epidemiyoloji

Kronik Miyelositer Löseminin yıllık görülme sıklığı, karakteristik sitogenetik anormalliğin tanımlandığı 1973 yılından günümüze doğru gelindiğinde hafifçe azalmaktadır. 1973 yılında 100.000 kişide 1,9 iken 1999'da 100.000'de 1,5 (19). Batılı ülkelerde görülme oranı 1/100.000'dir ve erişkin lösemi olgularının %15-20'sini oluşturmaktadır. Türkiye'de sıklığı bilinmemektedir. Genellikle orta-yaş hastalığı olup, erkeklerde kadınlara göre daha sıktır (1,5:1) (17). Ortalama görülme yaşı 45-55 olarak saptanmıştır. İnsidansı yaşla artış gösterir, hastaların %30'u 60 yaş üstündedir, %3'ü ise çocukluk çağında görülür (20-22).

Etiyoloji

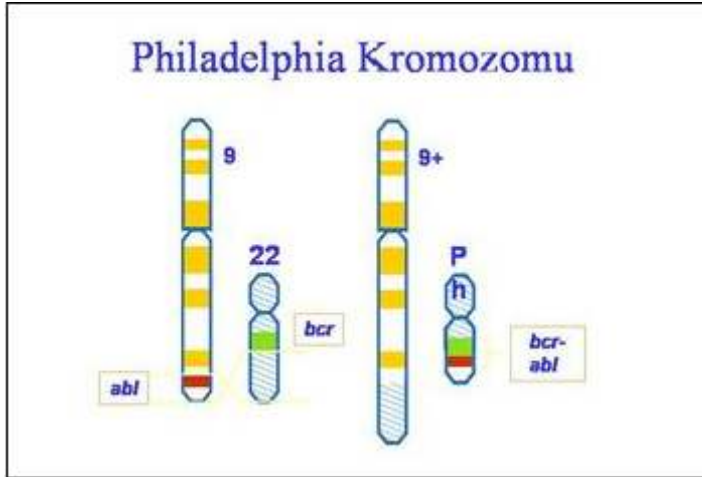
Vakaların çoğu sporadik olup, etiyojide suçlanan izole tek bir ajan bulunmamaktadır. KML riskinin iyonize radyasyon maruziyetinden sonra artabileceği bildirilmiştir. Ankilozan spondilit nedeniyle radyoterapi alanlarda artmış KML insidansı saptanmıştır. Japonya'da 1945'teki atom bombası patlamasından sonra radyasyona maruz kalanlarda artmış KML insidansı saptanmış ve maruziyetten 5 – 12 yıl sonra bu riskin pik yaptığı ve doza bağımlı olduğu görülmüştür. Bununla birlikte nükleer endüstrilerde çalışanlarda artmış bir KML riski gösterilmemiştir. 1940 öncesinde yeterli korunma sağlanmadan çalışan radyologlarda miyelositer lösemi gelişme ihtimali varken son zamanlarda yapılan çalışmalarda böyle bir birliktelik gösterilememiştir. Benzen maruziyeti akut miyelositer lösemi riskinde artışa neden olurken böyle bir risk artışı KML için bulunmamaktadır. KML alkilleyici ajanların kullanımı veya radyoterapi sonrası sekonder bir lösemi olarak karşımıza çıkmamaktadır (14, 15, 23, 24).

Patogenezi

KML, insanlarda bir spesifik kromozom anomalisi ile ilişkisi tespit edilen ilk hastalıktır (13). KML'nin pluripotent hematopoetik bir kök hücrenin BCR-ABL füzyon genini taşıyan Ph kromozomu edinmesi sonrasında proliferasyon avantajını kullanarak zaman içerisinde normal hematopoezi baskılayacak şekilde çoğalması ile oluştuğu düşünülmektedir. Bu hipotezin delili; elde edilen moleküler anomalinin hastaların hemen hepsinde aynı

şekilde bulunmasıdır. Fakat bu oluşum mekanizmasının hangi sitogenetik veya moleküler değişiklikler sonrası olduğu bilinmemektedir. Benzer şekilde kök hücre tarafından elde edilen proliferatif avantajın moleküler temelleri de henüz tamamen aydınlatılmamış olmakla birlikte lösemik progenitör hücrelerin interlökin – 3 (IL - 3) ve granülosit koloni - stimulan faktör (G - CSF) gibi büyüme faktörleri ile sürekli uyarılması ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (9).

Ph kromozomu, 9. ve 22. kromozomların uzun kolları arasındaki resiprokal translokasyon $t(9;22)(q34;q11)$ sonucu oluşan kısalmış kromozom 22 dir (Şekil-2). KML'nin en belirleyici özelliğidir ve hastaların %90 - 95'inde bulunur. Aynı zamanda erişkin akut lenfoblastik lösemilerin (ALL) %15 - 30'unda ve çocukluk çağı ALL'lerin %5'inde, yeni tanı almış akut miyeloblastik lösemilerin %2'sinde saptanır. Ph translokasyonu kromozom 9q34'teki 3' ABL gen segmentini, kromozom 22q11'deki 5'BCR gen segmentine ekler. Bu translokasyon sonucunda messenger ribonükleik asid (mRNA) transkripsiyonu olan hibrid BCR-ABL geni oluşur (25).



Şekil-2: Kronik miyelositer lösemide Philadelphia kromozomu. Kromozom 9 ve 22'nin uzun kolları arasında genetik materyalin resiprokal dengeli translokasyon $t(9;22)(q34;q11)$.

Translokasyon sonucu ortaya çıkan BCR-ABL füzyon geninin ürünü, molekül ağırlığı 210.000 dalton olan p210 proteindir. Bu yeni protein, c-ABL proto-onkogeninin ürünü olan p145 proteinine göre belirgin olarak daha güçlü

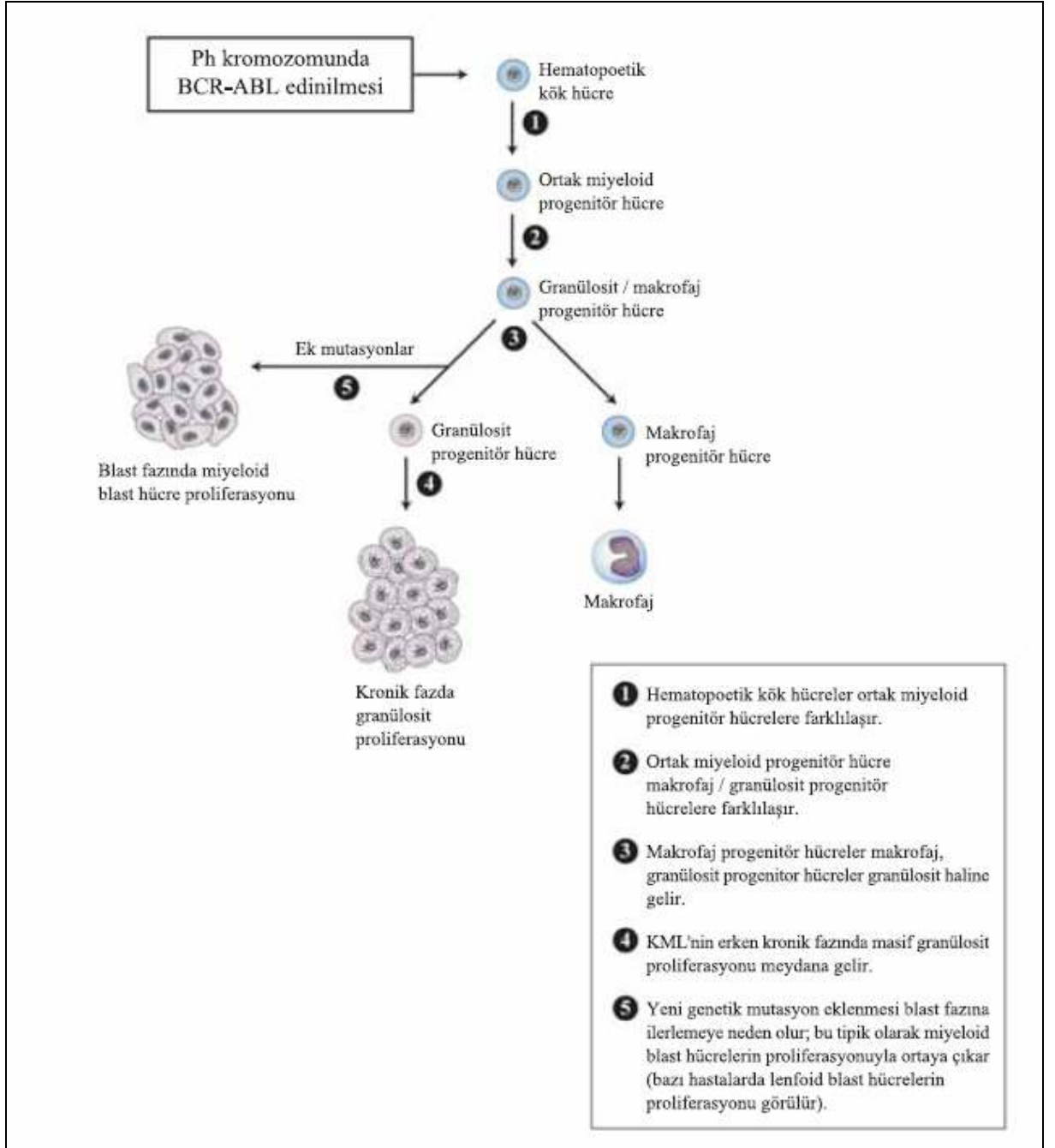
tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. Hastalığın patogeneğinde anahtar rol oynadığı kabul edilen BCR-ABL füzyon proteinlerinin, normal proteinlerle karşılaştırıldığında artmış fosforilasyon kapasitesine sahip olduğu ve hematopoetik kök hücrelerin KML fenotipine dönüşmesini sağladığını kanıtlayan çalışmalar vardır. Lösemik dönüşüme yol açan moleküler olaylar tam anlaşılmamış olmakla birlikte, BCR-ABL füzyonuyla oluşan p210 proteininin, güçlü tirozin kinaz aktivitesiyle, immatur hematopoetik hücrelerde dönüşümü ve çoğalmayı indüklediği ve apoptozu suprese ettiği in vitro olarak gösterilmiştir (26).

Hastalığın gelişimi için BCR-ABL füzyon geni varlığının yeterli olup olmadığı belirsizdir. Son zamanlarda, lösemi geliştirmeksizin kanlarında düşük seviyelerde BCR-ABL füzyon geni bulunduran normal kişiler gösterilmiştir (27).

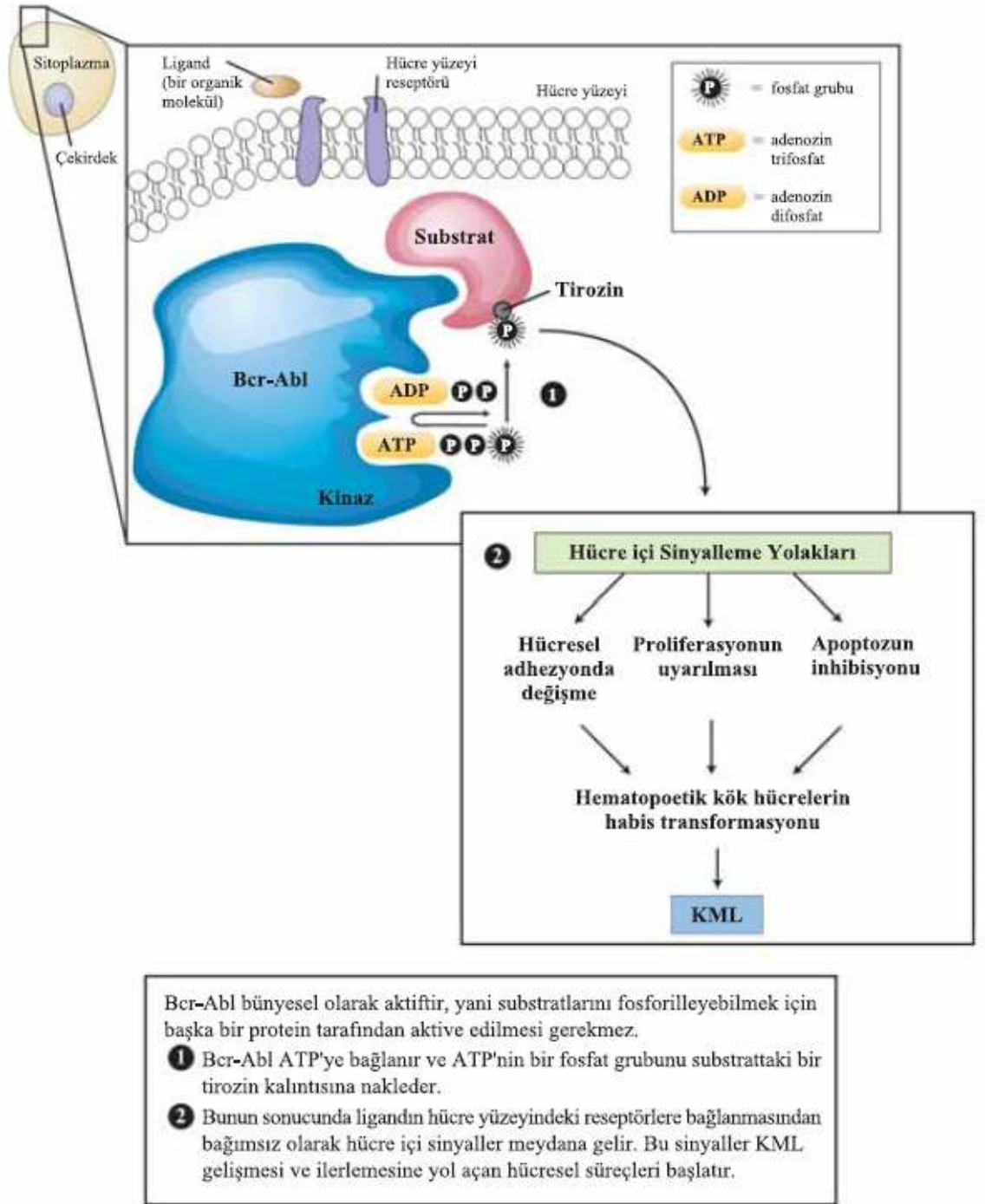
KML'li hastaların fibroblast kültürlerinde Ph kromozomunun bulunmaması ve tek yumurta ikizlerinde sadece KML'li kardeşte bu kromozomun görülmesi, bozukluğun edinsel olduğunun kanıtlarıdır. Ph kromozomu yalnız miyeloid seri hücrelerinde değil, megakaryositik ve eritroid seri elemanlarında, ayrıca olguların bir kısmında B lenfositlerde de bulunur. Hatta bazı olgularda T lenfositlerin küçük bir bölümünde Ph pozitifliği tespit edilmiştir. Bu bulgular KML'deki neoplastik dönüşümün pluripotent hematopoetik kök hücre düzeyinde olduğunu gösterir. Hastalığın pluripotent orijinine rağmen, kemik iliğinde sadece myeloid, monositik ve megakaryositik seri elemanlarının artmasına yol açan selektif ekspansiyonun nedeni bilinmemektedir (28).

KML'de sitogenetik anormalliğin başlangıcı ile tanı arasında 6–8 yıllık sessiz bir dönem bulunur (preklinik dönem). Bu süre içinde Ph pozitif kök hücreden gelişen neoplastik klonun yanı sıra normal kök hücre klonları da hematopoezde rol oynar. Bu dönemde bazı düzenleyici mekanizmalar tarafından kontrol edilebilen pluripotent neoplastik kök hücrelerin zaman içinde nasıl otonomi kazandığı ve klonal üstünlük sağladığı halen bilinmemektedir. Ancak BCR-ABL füzyon geninin ürünü olan ve güçlü tirozin kinaz aktivitesine sahip p210 proteininin, neoplastik kök hücrelerde

proliferasyonu arttırarak ve apoptozu inhibe ederek Ph pozitif klona çoğalma önceliği kazandırdığı düşünülmektedir. p210 proteini farklılaşmayı engellemeden miyeloid seri elemanlarının çoğalmasını indükler ve yaşam sürelerini uzatır. Neoplastik klona ait hücre sayısındaki artışa yol açan bu durumun yanı sıra lösemik kök hücrelerin kemik iliği stroması ile etkileşimleri de anormaldir. Hücrelerin adezyon yeteneklerinin kaybolmasının, olgunlaşma ve proliferasyon bozukluğuna yol açtığı ve immatür hücrelerin kemik iliğinden çevre kanına geçmesiyle karakterize anormal bir miyeloid hücre trafiğine sebep olduğu ileri sürülmektedir. İmmatür miyeloid hücrelerin periferik kana geçtiği bir başka hastalık olan Akut Miyeloblastik Lösemi (AML)'den farklı olarak KML'de lösemik kök hücreler farklılaşma ve olgunlaşma yeteneklerini tamamen kaybetmemişlerdir. Bu nedenle KML'de, hem kemik iliğinde hem de periferik kanda sayıca artmış halde farklılaşma ve olgunlaşma sürecindeki tüm myeloid seri elemanları görülebilir (28-31).



Şekil- 3: KML'de miyeloid hücre proliferasyonu.



Şekil- 4: BCR-ABL'nin onkojenik aktivitesi.

Klinik

Hastalık, hemen daima birbirini izleyen üç klinik evreye sahiptir: Kronik faz, Akselere (hızlanmış) faz ve Blastik faz. Hastaların %80'i ilk evre olan kronik evrede tanınır. Hastaların yaklaşık %10'u akselere fazda ve diğer %10'u blastik fazda bulunur (28). Bazı olgularda akselere faz görülmeksizin kronik fazdan blastik faza geçiş olabilir.

Kronik evrede miyeloid hiperplazi sonucu granülosit sayısı artmış olmakla beraber lösemik hücrelerin olgunlaşmaları ve yaşam süreleri normale yakındır. Myeloid ve eritroid seriye ait elemanların fonksiyonlarının genellikle normal olmasına karşın bazı olgularda trombosit fonksiyonları bozulmuştur. Hastalığın doğal seyirinde kronik evre ortalama 3–4 yıl sürer. Kronik evredeki hastaların %5'i tanıdan sonraki ilk yıl içinde blastik evreye dönüşür. Sonraki her yıl için bu oran yaklaşık %20–25 civarındadır (32).

Akselere faz, hastalığın hızlanarak kronik evreden çıktığı ve blastik dönüşüme doğru seyrettiği ara dönemdir. Bu dönemde periferik kanda ve kemik iliğinde miyeloblastların oranı artmaya başlar. Sebebi açıklanamayan ateş, kilo kaybı, gece terlemesi gibi sistemik semptomlar ortaya çıkar ve lökosit sayısını kontrol altında tutabilmek için artan dozlarda ilaç kullanımı gerekir. Akselere faz genellikle kısa sürer ve hastalar birkaç ay içinde blastik dönüşüm gösterir.

Blastik faz hastalığın terminal dönemidir. Bu dönemde hastalık akut lösemi tablosuna benzer. Blastik dönüşüm genellikle miyeloid fenotipte gerçekleşir ancak bazen lenfoid fenotipte de görülebilir. Her iki durumda da prognoz kötüdür ve yoğun tedavilere rağmen hastalığın kronik faza geri dönüşü nadiren gerçekleşir. Remisyon sağlanamayan olgularda sağ kalım 3–6 ay civarındadır.

Hastalığın kronik fazdan akselere ve blastik faza ilerlemesinin mekanizması tam olarak anlaşılmamakla birlikte trizomi 8, izokromozom 17 ve ikinci bir t (9;22) gibi ek sitogenetik anormallikler genellikle kronik fazdan akselere ya da blastik faza geçildiği zaman ortaya çıkmaktadır. Miyeloid tip blastik dönüşüm esnasında daha yaygın olarak görülen ve hastalığın progresyonu ile ilişkilendirilen bu sekonder sitogenetik anormalliklerin, farklı

bir kök hücre grubunda gelişmediği ve Ph pozitif hücrelerde olduğu gösterilmiştir.

Hastalığın gelişimi ve evreleri göz önüne alındığında KML, çok basamaklı neoplastik oluşum kuramı için tipik bir örnektir (28).

Yapılan gözlemler başlangıç kromozom translokasyonundan hastaların semptomatik oldukları aşamaya kadar geçen sürenin üzerinden yaklaşık olarak 6 yıl geçtiğini göstermekte ve beyaz küre sayısının 100.000'e ulaşması yaklaşık olarak 19 ay sürmektedir. KML hastalarının tanıdan sonra ortalama yaşam süreleri yaklaşık 4,5 yıldır. Bu nedenle tipik bir vakada, KML nin total sürecinin başlangıcından itibaren 10 yıl kadar olduğu görülür (33).

KML'de başlangıç semptomları genellikle sinsidir. Hastaların %40'ı asemptomatiktir ve tanı başka bir nedenle kan sayımı yapıldığı esnada konur. KML'de klinik bulgular aşırı çoğalmış miyelositer hücre kitlesi ve hipermetabolizma ile ilişkilidir (19). Görülebilen KML semptomları; anemi semptomları (halsizlik, çabuk yorulma, efor intoleransı, fonksiyonel kapasitede azalma gibi), splenomegaliye bağlı semptomlar (karında şişlik ve ağrı, dalağın mideye basısı sonucu çabuk doyma, hipermetabolik duruma bağlı semptomlar (ateş, iştahsızlık, kilo kaybı, gut), trombosit disfonksiyonuna bağlı semptomlar (hemoraji, ekimoz, hematoma, tromboembolik olaylar, retinal hemoraji), hiperlökositoz ve hiperviskositeye bağlı bulgular (tinnitus, stupor, görme bozukluğu, nefes darlığı, priapizm ve serebrovasküler olaylar) şeklinde kendini gösterebilmektedir.

Sternal hassasiyet, lökostataz varlığında olabilir. Blastik fazda kilo kaybı, terleme ve kemik ağrısı vardır. KML hastalarının fizik muayenesinde %50-90 splenomegali, %10-20 hepatomegali vardır. Hastalığın seyrinde ekstramedüller hematopoez odakları, cilt altı lezyonlar, lenfadenopati (LAP) gelişimi nadirdir. Ancak ileri evrelerde veya lenfoblastik dönüşümde LAP görülebilir (34-36).

Tablo-2: KML kronik faz başlangıç semptom ve bulguları (17).

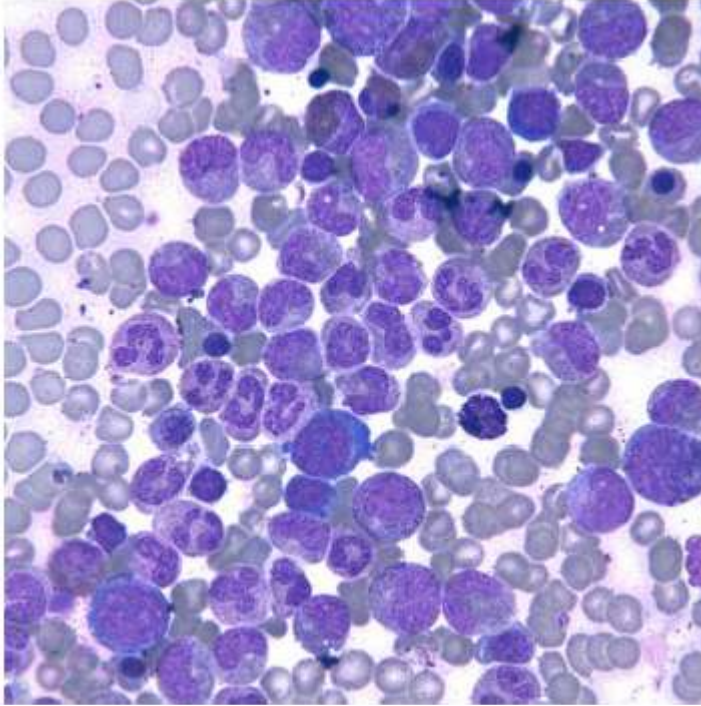
Semptomlar	(%)
Yorgunluk	83
Karında şişkinlik hissi ve iştahsızlık	38
Kilo kaybı	61
Kolay berelenme veya kanama	35
Ateş	11
Bulgular	
Splenomegali	95
Sternumda hassasiyet	78
Lenfadenopati	64
Hepatomegali	48
Purpura	27
Retinal Kanama	21

Fizik muayenedeki hemen hemen tek ve değişmez bulgu splenomegalidir. Tanı esnasında hastaların yaklaşık %50'sinde kostal kenarın altına 10 cm'den fazla uzanan splenomegali vardır (28). Olguların %90'dan fazlasında palpe edilebilen dalak bazen tüm karnı dolduracak kadar büyük olabilir. Ekstramedüller hematopoezin bir işareti olan splenomegali, lökosit sayısı ile doğru orantılıdır ve splenik infarktüs gelişmediği sürece genellikle ağrısızdır. Splenik infarktüs olduğunda dalak üzerinde oskültasyonla frotman duyulabilir (19). Bazen büyümüş dalakta oluşan infarktüsler sol üst kadranda ani ve şiddetli bir ağrıya kendini belli edebilir. Hastalığın ileri evrelerinde, bazofiliye bağlı olarak histamin üretimi artmıştır, bu durum hastaların bir kısmında kaşıntı, diyare ve flushinge yol açabilir (28).

Ateş, gece terlemesi, halsizlik, kilo kaybı, refrakter splenomegali ve kemik ağrıları akselere ve blastik fazda en sık görülen semptomlar arasındadırlar. Bu semptom ve bulgulara ilave olarak lenfadenopati ve ekstramedüler blastik kloromalar blastik fazda daha sık görülürler (37).

KML'deki patoloji; miyelooid, monositik, eritroid, megakaryositik, B-lenfoid ve nadiren de T-lenfoid serilerinin tümünü içerir. KML'de en belirgin laboratuvar bulgusu lökositozdur (38, 39). Birçok çalışmada ortalama $134.000/mm^3$ ile $225.000/mm^3$ arasında istatistiksel dağılım göstermekle birlikte lökositoz, $20.000/mm^3$ 'den $500.000/mm^3$ 'den daha fazlaya kadar

değişir (28). Tedavi edilmeyen hastalarda lökosit sayısı genellikle progresif olarak artış gösterir. Bazen lökosit sayısında periyodik olarak azalma ve artma olur (40). Hastalarda semptomların ortaya çıkışı lökosit sayısının $30 \times 10^9/L$ üzerindeki değerlerde gözlenir (39). Normal veya yükselmiş hemoglobin seviyeleri bildirilmesine rağmen tanı esnasında çoğu hastanın normokromik/normositik bir anemisi vardır (41). Başlangıçta hafif-orta derecede olan anemi, hastalığın ilerlemesiyle birlikte derinleşir. Tanı konduğunda hastaların hemen tamamında yükselmiş olan trombosit sayısı bazı hastalarda $1.000.000/mm^3$ 'ü aşabilir. Diğer Kronik Myeloproliferatif Hastalıklarda olduğu gibi KML'de de trombosit fonksiyonları sıklıkla bozulmuştur. Hastalığın daha sonraki evrelerinde trombositopeni ortaya çıkabilir (42). Bazofil sayısı belirgin şekilde artmıştır ve prognostik öneme sahiptir. Eozinofillerde de artış vardır. Periferik yaymada miyeloid serinin tüm hücreleri görülür (Şekil-5). Özellikle miyelosit, metamiyelosit, çomak ve parçalı sayısı artmıştır. Kronik fazda blast ve promyelosit %10'u geçmez.



Şekil-5: Kronik faz kronik miyelositer lösemide kemik iliğinde belirgin miyeloid hiperplazi.

Kemik iliği hipersellülerdir ve miyeloblasttan nötrofile kadar miyeloid seriye ait tüm seri elemanları artmıştır. Matürasyon ve morfoloji normaldir

(34). Kemik iliğinde yağ oranı azalmıştır. Myeloid/eritroid (M/E) oranı normal kemik iliğinde 3:1 iken bu oran KML'de 15:1 – 20:1 olacak kadar artmıştır. Megakaryositler sayıca artmıştır (43).

Tanı anında ve kronik faz süresince fagositik fonksiyonlar normaldir. Kemik iliği biopsilerinde ılımlı bir fibrozis izlenebilir ve tanı anındaki hastaların yaklaşık %10-15'inde mevcuttur (19).

Artan nötrofil sayısı ile birlikte nötrofiller tarafından üretilen transkobalamin I, III ve kobalamin bağlayan glikoproteinlerin serum düzeyleri artar, bu da yüksek serum kobalamin düzeylerine neden olur (24).

Biyokimyasal incelemede serum laktik dehidrogenaz (LDH) ve ürik asit seviyeleri genellikle yüksek bulunur. Tedavi esnasında hücre yıkımına bağlı olarak LDH seviyesi daha da artar, hiperürisemi ve hiperürükozüri belirginleşir. Özellikle hastalığın ileri dönemlerinde, bazofilinin bir sonucu olarak serum histamin düzeyi artmıştır. Lökositozla doğru orantılı olmak üzere, vitamin B12 bağlayıcı protein ve bununla birlikte serum vitamin B12 düzeyleri yüksektir. Granülositler tarafından vitamin B12 bağlayıcı protein üretiminin artmasının yol açtığı bu durum, hastalığın tedavi edilmesiyle normale döner.

Lökosit alkalin fosfat (LAP) skoru (diğer adıyla nötrofil alkalin fosfat skoru) ayırıcı tanıda yardımcı bir testtir. LAP skoru, periferik yayma üzerinde uygulanan bir kimyasal reaksiyon ile alkalin fosfat enzimi içeren hücrelerin granüler bir boyanma göstermesi ve bu boyanmanın semikantitatif yöntemlerle değerlendirilmesi esasına dayanır. Periferik yaymaya kimyasal hazırlık sonrası mikroskopla bakılarak granüler boyanmanın derecesi skorlanır. Olgun nötrofiller ve çomaklardaki granülasyon 0'dan (hiç boyanmamış) 4+'e (yoğun granüler boyanma) kadar derecelendirilir. Sayılan 100 hücrenin derecelerinin toplamı LAP skorunu verir. LAP skorunun normal sınırları 20–100 arasındadır. LAP skorunu düşürdüğü bilinen iki ana klinik durum KML ve Paroksizmal Noktürnal Hemoglobinüridir (PNH). Granülositler morfolojik olarak normal görülmeyle birlikte farklılaşmaları patolojik olduğu için KML'de LAP skoru karakteristik olarak düşüktür. Lökositoz yapan diğer durumlarda normal ya da artmış olabilir. Ancak KML'li hastalarda da

infeksiyon varlığında, tedavi sonrasında ve akselere/blastik evre esnasında LAP skoru yüksek bulunabilir (44).

3–5 yıl süren benign kronik ve stabil fazı takiben hızlı bir biçimde ölümcül olabilen blastik fazın gelişimi KML'nin doğal hikayesidir. Blastik kriz genellikle nötrofil sayısını düşürebilmek için artmış hidroksiüre ve busulfan kullanımının gerekli olduğu akselere fazı takiben ortaya çıkmaktadır (45, 35).

Akselere veya blastik faza gidiş riski ilk 2 yıl için %10 daha sonraki yıllarda ise her yıl için %15 - 20 arasındadır (24). KML'nin blastik fazı kemik iliği veya periferik kanda %20 ve üzeri blastın bulunması ile veya ekstramedüller blastik hastalık varlığında teşhis edilmektedir. Çoğu hastada blastik kriz öncesi akselere faz bulguları ortaya çıkmaktadır (46). Fakat %20 kadar hasta hiçbir semptom ve bulgu vermeden direkt olarak blastik faza ilerleyebilir. Blastik fazdaki ekstramedüller blastik infiltrasyonlar dalak, lenf nodları, cilt, meninksler, kemik ve diğer dokularda görülebilir. KML'nin blastik fazında 5 ay gibi düşük bir yaşam beklentisi vardır. Bu hastaların %25 kadarı lenfoid blastik faza girerken 2/3 kadarı ise akut miyeloblastik lösemiye benzer fenotip gösterirler (24, 35).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) KML Evre Tanımları (47)

Akselere Evre (DSÖ 2008 kriterleri)

- Periferik kan lökositlerinin ve/veya çekirdekli kemik iliği hücrelerinin %10-19'unun blast olması
- Periferik kandaki bazofillerin \geq %20
- Tedavi ile ilişkisiz kalıcı trombositopeni $< 100.000/mm^3$ veya tedaviye yanıtız kalıcı trombositoz $> 1 \times 10^6/mm^3$
- Tedaviye yanıtız ve giderek artan dalak boyutu ve lökosit sayısı
- Sitogenetik olarak klonal dönüşüm olması

Blastik Evre (DSÖ 2008 kriterleri)

- Periferik kan lökositlerinin veya kemik iliğindeki çekirdekli hücrelerinin \geq %20'sinin blast olması
- Ekstramedüller blastik proliferasyon
- Kemik iliği biyopsisinde gruplar halinde blastların olması

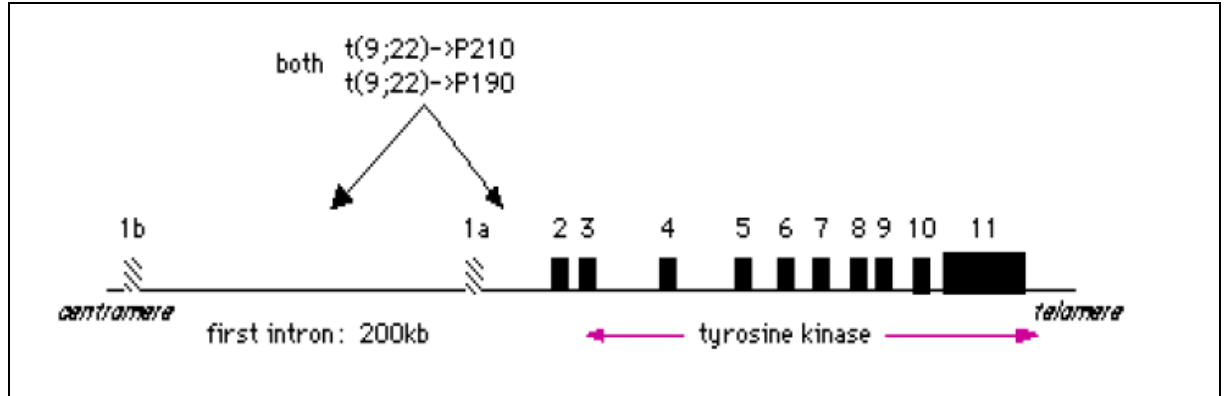
Kronik Miyelositer Lösemi Genetiği

KML'de moleküler düzeyde birincil olarak etiklenen genler ABL ve BCR'dir. Ph translokasyonu şimerik bir füzyon geni olan BCR-ABL oluşumu ile sonuçlanır. Bu gen; hücre proliferasyonunu hızlandıran, apoptotik uyarılara direnç gösteren ve hücre adezyonunda değişikliklere neden olan yapısal bir kinaz aktivitesi sağlar. Protein tirozin kinazlar çeşitli protein substratların tirozin kalıntılarını fosforilleyerek bu enzimlerin aktivitelerini düzenlerler. Fosforilasyonun hedefi kinaz enziminin kendisi (otofosforilasyon) veya diğer çeşitli sinyal yollarındaki proteinler olabilir. Tirozin kinazlar intraselüler sinyal - ileti yollarını düzenlerler ve bu nedenle hücre proliferasyonu ve diferansiasyonu üzerinde önemli role sahiptirler (48, 49). Onkogenik tirozin kinazlar, translokasyon veya delesyon gibi kromozomal rearanjman sonucu oluşan şimerik füzyon gen ürünleri olabilecekleri gibi gen mutasyonu veya gen amplifikasyonu sonucu da ortaya çıkabilirler. Tirozin kinazlar; stem cell factor reseptörü C-KIT (CD117) gibi transmembranik veya ABL gibi sitoplazmik olmak üzere iki grupta incelenebilirler (50).

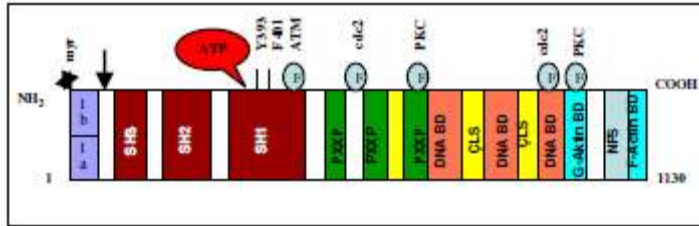
BCR ve ABL Genlerinin Hücresel Fonksiyonları

ABL geni Abelson Murine Lösemi Virusunun taşıdığı v-ABL (viral ABL) geni ile homolog bir yapı gösterir. 9. kromozom üzerine yerleşik olan ABL geni, 145 kD ağırlığında bir proteini üretir. Bu protein ilk ekzonda oluşan farklı alternatif splicing sonucu oluşur (16). ABL proteininin yapısında farklı domainler bulunur (Şekil-7). 3 SRC homoloji domaini (SH1-SH3), proteinin NH2 ucunda yerleşmiştir. SH1 domaini, tirozin kinaz fonksiyonuna sahip iken SH2 ve SH3 domainleri ABL proteinin diğer proteinlerle olan etkileşimini sağlar (51). Myr dizileri ABL proteinin, plazma zarı proteinleri ile etkileşimini sağlar (Şekil-7). Molekülün merkezinde bulunan prolince zengin bölgeler diğer proteinlerin SH3 domainleri ile etkileşimini sağlarlar (52). ABL proteinin 3' ucunda çekirdek lokalizasyon sinyali (ÇLS), DNA bağlanma (DBM) ve aktin bağlanma motifleri (ABM) bulunmaktadır (Şekil-7) (53). Normal ABL proteini, hücre döngüsünü, programlı hücre ölümlerini, hücrenin büyüme ve çoğalmasını ve hücrelerin stres ortamına verdiği yanıtı kontrol eder (54).

Bu gen 230 kb'lık bir alan kaplamakta ve 11 ekzon içermektedir. Ekzonlar 5'tan sentromere doğru uzanmakta olup 1a ve 1b olarak adlandırılan 5' alternatif ekzon bulunmaktadır. İki adet 6 kb ile 7 kb'lık mRNA transkribe olmaktadır ve 145 kd'luk 2 adet nükleer ve sitoplazmik c-ABL proteini oluşmaktadır (Şekil-6) (55).



Şekil- 6: ABL1 geninin şematik yapısı.

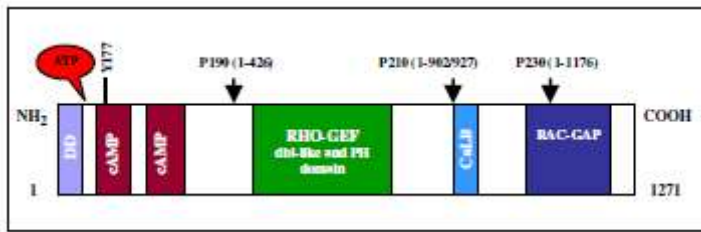


Şekil-7: Abl proteininin yapısı. Ia tip izoformu, plazma zarına bağlanmayı sağlayan myristilasyon (myr) bölgesini içeren Ib izoformundan biraz daha kısadır. NH2 ucuna yerleşik 3 adet SRC homoloji (SH) domaini vardır. 393. Tirozin (Y393) amino asidi, kinaz domaini içerisinde otofosforilasyonun en fazla olduğu noktadır. 401. noktadaki fenilalanin (F401), SH3 domaini içeren protein tirozin kinazlar (PTK) içerisinde en fazla korunmuş bölgedir. Abl proteininin orta bölgesinde SH3 domainlerine bağlanabilme özelliği olan proline zengin bölgeler içermekte (PXXP) ve bu bölgeler çekirdeğe yerleşme sinyallerini ayırmaktadır. Abl proteininin COOH ucunda DNA'nın yanı sıra, G- ve F-aktin bağlanma domainleri yerleşmiştir. Atm, cdc2, ve PKC tarafından fosforlanabilen bölgeler gösterilmiştir. Abl proteininin kırılma noktası büyük ok ile gösterilmiştir.

“Breakpoint Cluster Region” olarak tanımlanan BCR geni 22q11.2'e lokalizedir (56). Yüzotuz kb'lık bir bölgeyi kaplayan BCR geni 23 ekzon içermektedir. Transkripsiyon 5' yönünden 3' yönüne doğru olmaktadır. İki adet 4.5 kb ve 7 kb'lık mRNA transkribe olmaktadır. Translasyon ürünü olarak genellikle 160 kDa'lık (1271 aminoasitlik), 130 kDa'lık ve 190 kDa'lık

proteinler oluşmaktadır. Bölünme dışında olan hücrelerde sitoplazmada lokalize olan bu proteinler, mitoz evresinde iken kromozom çevresinde lokalize olmaktadır. Diğer dokularda da eksprese olmakla beraber, en çok beyin ve hemotopoietik dokularda eksprese olmaktadır (55, 57).

22. kromozom üzerine yerleşik olan BCR geni, sürekli eksprese edilerek 160 kD ağırlığında bir protein üretir (Şekil-8) (16). BCR proteininin NH₂ ucundaki ilk ekzon, 14-3-3 protein ailesinin bir üyesi olan Bap-1 proteinini ve BCR proteinin kendisini hedefleyen serin treonin kinazı kodlar (54). BCR proteininin merkezindeki Rho Guanidin değişim (exchange) faktörleri üzerinde, guanidin trifosfatı (GTP) guanidin difosfata (GDP) çeviren dbl-like ve plekstrin homology (PH) domainleri bulunur (Şekil-8). Rho Guanidin değişim faktörleri, NFkB gibi transkripsiyon faktörlerini aktif hale getirir (53). BCR proteininin COOH ucu RAC-GTPaz aktivitesine sahiptir. BCR proteini, 177. noktada yerleşik olan tirozin amino asidi başta olmak üzere birçok tirozinden fosforlanabilmekte ve bu durum BCR'nin RAS yolağının aktivitesini etkileyen GRB-2 proteinine bağlanmasını kolaylaştırmaktadır (Şekil-8) (58, 59).



Şekil-8: BCR Proteinin Yapısı. Proteinin NH₂ ucunda dimerizasyon domaini (DD) ve iki adet siklik adenosin mono fosfat (cAMP) bulunur. 177. pozisyonda bulunan tirozin (Y177) amino asidi, proteinin Grb-2 adaptör proteinine bağlanabilmesi için otofosforilasyonun gerçekleştiği noktadır. Proteinin merkezinde Rho guanidin nükleotidi değişim faktörleri (RHO-GEF), dbl-like ve plekstrin homoloji (PH) domainleri bulunur. COOH ucunda ise kalsiyuma bağımlı lipid bağlanma (CaLB) bölgesi ve Rac-GTPazı aktif kılma fonksiyonu bulunan Rac-GAP domaini yerleşiktir. BCR geninin kırılma noktaları ok işaretleri ile gösterilmiştir.

BCR ve ABL Translokasyonunun Moleküler Anatomisi

ABL geni üzerindeki kırılma noktası, 9q34 kromozomunda 300 kb'lık bir bölgenin 5' ucundaki herhangi bir bölgede meydana gelebilir. Kırılma noktası Ia veya Ib, veya daha sıklıkla 2 ekzonun arasındaki bir noktada

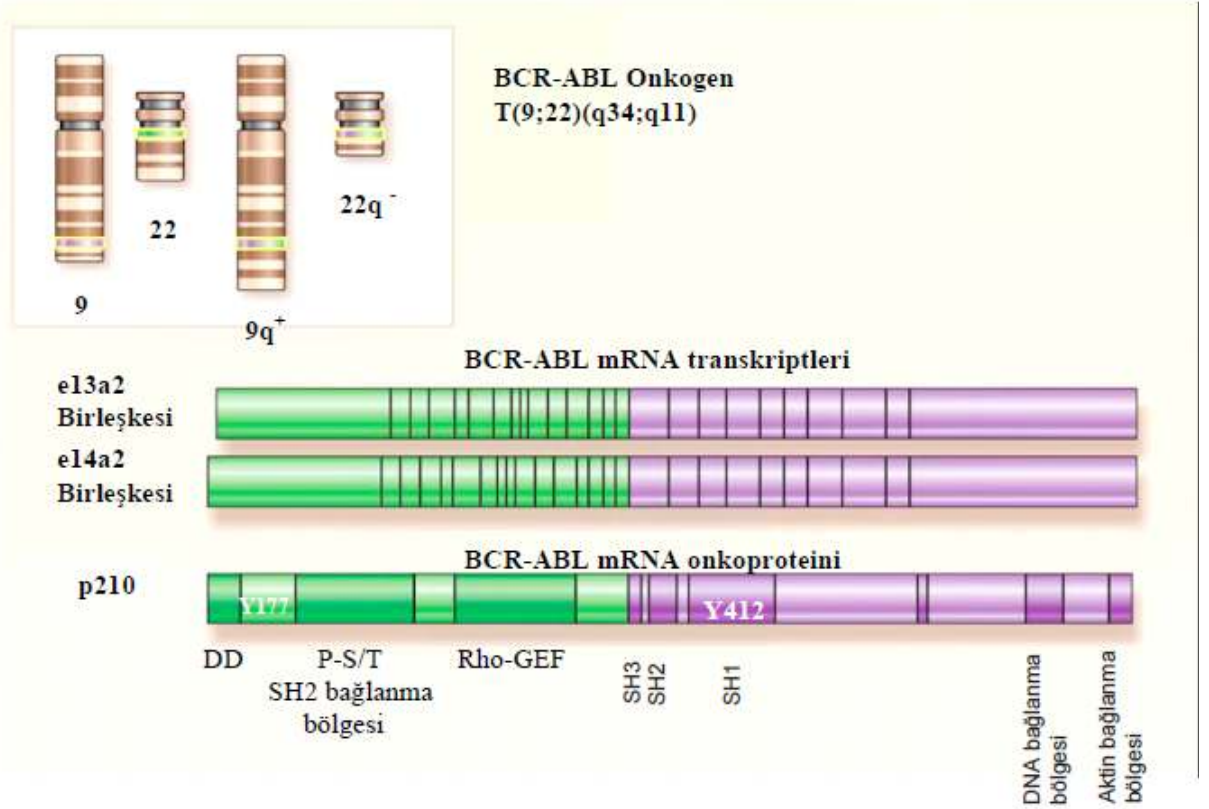
oluşabilir (60). Kırılmanın farklı noktalarda oluşması ABL geninin BCR geni ile translokasyonunda herhangi bir probleme neden olmaz. ABL geninin aksine, BCR geni üzerindeki kırılmalar farklı noktalarda oluşabilir.

ABL'nin tersine, BCR'deki kırılma noktaları 3 tanımlanmış bölgede bulunur. KML hastalarının büyük kısmında, BCR geni, 'major breakpoint cluster region' olarak bilinen 5.8-kb büyüklüğündeki bir bölgededir. Bu bölge, gendeki gerçek pozisyonlarına göre e12-e16 (eski isimleri ile ekzon b1-b5) olarak adlandırılmış 5 adet ekzondan oluşmaktadır. Çoğu kırılma noktası ekzon 13 ve ekzon 14'e doğru kayar. BCR-ABL mRNA işlemi, BCR ekzonlarının ABL ekzon 2a'ya katılması ile sonuçlandığından; hibrit transkriptler e13a2 (b2a2) veya e14a2 (b3a2) birleşkelerinden üretilir. Her iki durumda da mRNA, 8.5 kb'lık bir sekanstan oluşan ve 210-kd'luk bir füzyon proteini olan p210 BCR-ABL'yi kodlayan sekanlardan oluşur (31,61). Şekil-9'da izlendiği üzere klasik KML konfigürasyonunda, BCR-ABL, e13a2 veya e14a2 birleşkeleri ile mRNA moleküllerine kopyalanır ve p210 BCR-ABL onkoproteinine çevrilir. Şekilde bu hibrit proteinin içerdiği BCR'nin amino terminalinden (dimerizasyon [DD], SH2 bağlanma bölgesi ve Rho GTP-GDP exchange factor [rho-GEF] domainleri) ve Abl'nin karboksi terminalinden (sadece Src-homolog bölgeler SH3, SH2, SH1 ve DNA ve aktin bağlanma bölgeleri) fonksiyonel parçalar gösterilmiştir. Bcr'deki tirozin 177 ve Abl'deki tirozin 412 parçaları ise sırasıyla adaptör proteinlerin bağlanmasında ve Bcr-Abl otofosforilasyonunda önemli role sahiptir (9).

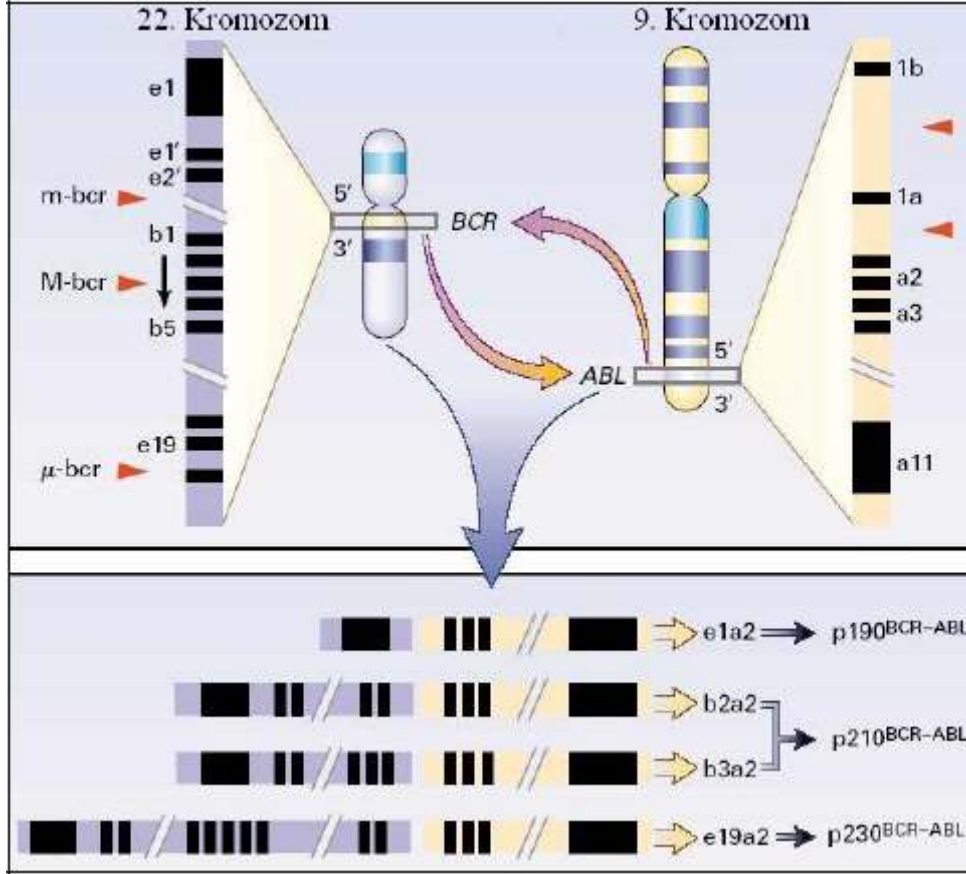
Bazı yetişkin Ph pozitif akut lenfoblastik lösemi (ALL) hastalarının lösemi hücrelerinde, BCR-ABL füzyon geni bulunur. Ph-pozitif ALL hastalarının üçte birinde, BCR-ABL geninin moleküler özellikleri KML ile aynıdır, diğer üçte ikisinde ise genomik kırılma noktası BCR geninin ilk ekzonunda yer alır. Bu bölge minor kırılma nokta kümesi m-BCR olarak adlandırılır. BCR-ABL geni BCR geninin ilk ekzonunun (e1), ABL geninin ikinci ekzonu (a2) ile birleşmesinden meydana gelir. Bu genin mRNAsı e1a2 olarak adlandırılır ve 190 kDa ağırlığında p190 BCR-ABL proteinini kodlar (62). KML hastalarında çok nadiren p210 yerine p190 proteini görülür. Kronik nötrofilik lösemili hastalarında Ph kromozomunun bulunması da nadirdir, bu

hastalarda daha çok, e19a2 füzyon genine bağlı p230 bcr-abl onkoproteini oluşur (Şekil-10).

Kırılma noktasının ABL'de sabit BCR'de ise değişken olması, ABL geninin sağlıklı hücreleri transformasyona uğratarak kanser hücresine dönüşmesini sağlarken BCR geninin hastalığın fenotipini etkilediğini ortaya koymuştur. Nitekim bazı ALL hastalarında BCR/ABL füzyon proteininden farklı olarak oluşan TEL/ABL füzyon geninin de lösemiye neden olduğu gösterilmiştir (63-65).



Şekil-9: t(9;22) translokasyonu ve ürünleri.



Şekil-10: KML'de t(9;22)(q34;q11) translokasyonu. BCR ve ABL genleri ve füzyon sonucu oluşan transkriptler ABL ve BCR genlerinin üzerindeki kırılma noktaları ve bu farklı kırılma noktalarından ortaya çıkan transkriptler. p190 Bcr/Abl proteini ALL'de, p210 Bcr/Abl KML'de, p230 Bcr/Abl ise KNL'de daha çok rastlanmaktadır.

BCR/ABL Geni Tarafından Kontrol Edilen Malign Transformasyon Mekanizmaları

1- ABL Tirozin Kinaz Aktivitesinin Kontrolü

ABL tirozin kinaz aktivitesi normal şartlarda çok iyi bir şekilde kontrol edilir. SH3 domaini ABL proteininin aktivitesinin engellenmesinde önemli bir rol oynar. SH3 domaininin delesyonu veya değişimi tirozin kinazı aktif hale getirir (53). Abi-1 ve Abi-2 proteinleri SH3 domainine bağlanarak, SH3'ün inhibitor fonksiyonunu aktif hale getirir. Öte yandan aktif hale gelmiş ABL proteininin, Abi-1 proteinlerinin yıkımını sağlayan proteazomların aktivasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (66). Alternatif olarak, SH3 domaini ABL proteininin proline zengin bölgesine bağlanarak ABL kinazın substratları ile olan etkileşimini engelleyecek yapısal değişikliklere yol açabilmektedir (67).

2- BCR/ABL Pozitif Hücrelerin Biyolojik Özellikleri ve Aktif Sinyal İleti Yolları

BCR/ABL füzyon proteini tarafından gerçekleştirilen malign transformasyonun 4 temel mekanizması vardır. Bu mekanizmalar, hücrelerin adhezyon özelliklerini kaybetmesi, mitotik bölünmeyi sağlayan sinyal ileti yollarının sürekli aktif tutulması, apoptozun engellenmesi ve proteazomlarca ABL gen aktivitesini engelleyen proteinlerin parçalanmasıdır (Şekil-11) (53).

3- Bozulmuş Adhezyon Özellikleri

KML projenitör hücreleri kemik iliği stroma hücrelerine ve ekstrasellüler matrikse düşük adhezyon gösterirler. β -integrinlerin stroma ve progenitör hücreler arasındaki etkileşimde önemli rolleri vardır (68). KML hücreleri normal progenitör hücrelerde bulunmayan ve adhezyonu engelleyebilen farklı bir $\beta 1$ integrin eksprese ederler. Öte yandan BCR/ABL tarafından transforme edilen hücrelerde bulunan Crkl proteini, hücrelerin hareketliliğini ve integrin tarafından kontrol edilen hücre adhezyonunu, paksilin, Fak, P130Cas ve Hef1 gibi adhezyon molekülleri ile etkileşerek kontrol altında tutar (53).

4- Mitoz Sinyal İleti Yollarının Aktivasyonu

Ras ve MAP Kinaz Yolakları. BCR/ABL ve Ras genleri arasında farklı bağlantılar tanımlanır. 177. Pozisyonda bulunan prolin amino asidinin otofosforilasyonu Grb-2 adaptör molekülü için bir bağlanma bölgesi oluşturur (69). Sos proteinine bağlanan Grb-2 proteini, Ras proteinini GTP bağlı hali ile stabilize eder. BCR/ABL proteinin substratları olan ve SH2 ve SH3 domainlerinden füzyon proteinine bağlanan Shc ve Crkl adaptör proteinleri Ras'ın aktivasyonunu sağlarlar (70). IL-3 gibi sitokin reseptörlerinin stimülasyonu, Ras'ın ve dolayısıyla serin treonin Raf'ın aktivasyonunu sağlar. Raf, Mek1/Mek2 ve Erk serintreonin kinazlar ile aktif hale getirdiği sinyal ileti yolları gen transkripsiyonlarını aktif kılar (71). Öte yandan, BCR/ABL proteini tarafından aktif kılınan Jnk/Sapk yolağı, malign transformasyona yol açar (72).

JAK/STAT Yolağı. Jak/Stat yolağının BCR/ABL proteini tarafından aktif hale getirilmesi ilk olarak 1995 yılında v-ABL ile transforme edilen B hücrelerinde Danial ve ark.'ı (73) tarafından gösterilmiştir. BCR/ABL, STAT1

ve STAT5 transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu direk ve sürekli olarak sağlar (74). BCR/ABL transforme hücrelerde, STAT5 Bcl-XL geninin transkripsiyonunu sağlayarak anti-apoptotik bir fonksiyon gösterir (53).

Büyüme faktörlerine gösterilen hücre sel tepkideki Ras ve Jak/STAT yollarının rolleri, BCR/ABL füzyon proteininin hücrelerin büyüme faktör bağımlılığını nasıl bağımsızlaştırdığını ortaya koyar (75). İlginç bir şekilde, BCR/ABL proteininin sitokinlerin yanısıra büyüme faktör reseptörlerinin ekspresyonunu da tetiklediği bilinmektedir (76).

PI-3 Kinaz Yolağı. PI-3 kinaz enzim aktivitesi BCR/ABL pozitif hücrelerin çoğalması için gereklidir (77). BCR/ABL füzyon proteini, Cbl, Crk ve Crkl gibi adaptör moleküllerle kompleks moleküller oluşturarak PI-3 kinazı aktif kılar. Bu yolda bir sonraki hedef molekül, serin-treonin kinaz, Akt'dir (77). Akt, IL-3 reseptörün hedef molekülü olup, pro-apoptotik Bad proteinini hedeflemektedir. Fosfat bağlanan Bad proteini, sitoplazmik 14-3-3 proteinleri ile kompleks oluşturduğu ve Bcl-XL gibi anti-apoptotik proteinlere bağlanamadığı için inaktif hale gelir (53).

Myc-Yolağı. Etkili bir transkripsiyon faktörü olarak bilinen Myc geninin farklı malign kanserlerde aşırı eksprese edildiği bilinir. Myc geninin aktivasyonu, BCR/ABL geninin SH2 domaini tarafından sağlanıp kontrol edilmektedir (53). SH2 domaininin myc geninin aktivitesini hangi yolağ/ lar ile kontrol ettiği hala bilinmemektedir. Ancak v-Abl ile transforme edilen hücrelerde, BCR/ABL tarafından üretilen sinyalin Ras/Raf, cyclin bağımlı kinazlar (cdks) ve E2F transkripsiyon faktörleri yolu ile Myc geninin promotorunu aktif hale getirdiği gösterilmiştir (78). Bunun yanısıra, Myc geninin BCR/ABL pozitif hücrelerdeki aktivitesi, diğer tümör hücrelerinden de farklı olmayıp hücre sel büyüme, çoğalmayı ve apoptozu etkileyebilmektedir.

5- Apoptozun Engellenmesi

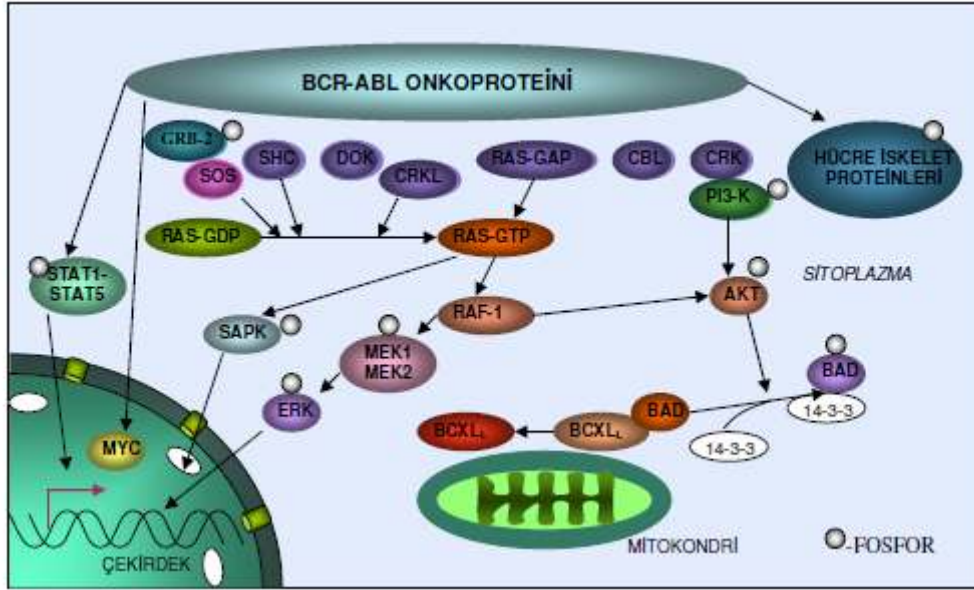
İnsan model hücre hatlarında BCR/ABL ekspresyonunun tirozin kinaz aktivitesi ve Ras onkogeninin aktif hale getirilmesi ile büyüme faktörleri eksikliğinden kaynaklanan apoptozu engellediği gösterilmiştir (79). Bunun yanısıra, BCR/ABL pozitif hücre hatlarında DNA'da oluşan zararlardan

kaynaklanan apoptoza karşı bir direnç geliştirildiği gösterilmiştir (80). BCR/ABL füzyon proteini, mitokondriden sitokrom-c'nin salınımını engelleyip kaspazların aktivasyonunu engeller. Kazpazların aktivasyonu mitokondri membran potansiyeli ve dolayısıyla Bcl-2 protein ailesi tarafından kontrol edilir. BCR/ABL füzyon proteini, Bcl-2 geninin ekspresyonunu Ras ve/veya PI-3 kinaz yolu ile kontrol eder. Bunun yanısıra, BCR/ABL pozitif hücrelerde, Bcl-XL gen ekspresyonu STAT-5 yolu ile kontrol edilir.

BCR/ABL pro-apoptotik Bad proteinini fosforile ederekte apoptozu engeller. Akt'nin yanısıra Raf-1 proteini de Bad proteinini serin amino asidinden fosforile eder (81). BCR/ABL'in başlattığı ve hücrelerin çoğalmasını tetiklerken apoptozu engelleyen kompleks sinyalleri tam anlamı ile birbirinden ayırmak güçtür. BCR/ABL, hücre içi dengeyi hücrenin büyümesi yönüne çevirirken apoptozuda engeller (53). Bu durum hücrenin çoğalmasını indükleyen bir sinyal aksi dengelenmedikçe apoptozuda engeller kuramını desteklemektedir. Öte yandan, BCR/ABL ile transfekte edilen hücrelerde BCR/ABL proteinin Fas reseptörü/Fas ligand sistemi ile apoptozu engellediği gösterilmiştir (82, 83).

6- ABL Gen Aktivitesini Engelleyen Proteinlerin Parçalanması

BCR/ABL proteininin Abi-1 ve Abi-2 proteinlerinin proteazom tarafından parçalanmasını kontrol ettiği gösterilmiştir (66). Abi-1 ve Abi-2 proteinlerinin parçalanması, BCR/ABL pozitif akut lösemilerde gözlenirken BCR/ABL negatif hücrelerde gözlenmemiştir (53). Her ne kadar bu veriler şimdilik sadece akut lösemiler için geçerli olsa da yıkımları protezom tarafından gerçekleştirilen diğer proteinlerinde BCR/ABL tarafından kontrol edilebileceğini ortaya koymuştur.



Şekil-11: Sinyal iletim yolları. BCR-ABL onkoproteininin hüresel etkileri çeşitli proteinlerle olan etkileşim sonucunda meydana gelir. Etkilenen proteinler transkripsiyonun aktivasyonu veya baskılanması, apoptoz sinyallerinin mitokondri tarafından işlenmesi, hücre iskelet proteinlerinin organizasyonu ve inhibitör proteinlerin degradasyonunda rol oynamaktadırlar.

Hastalığın Transformasyonunda Moleküler ve Hüresel Değişimler

KML'nin akselere fazdan blast fazına geçişlerde hastaların %50-80'inde sitogenetik ve moleküler değişiklikler gözlenir. Minor değişimler 7, 17. kromozomlarda gözlenen monozomiler ve Y kromozomu kaybı, 17 ve 21. kromozomlarda gözlenen trizomiler, ve t(3;21)(q26;q22) translokasyonudur (84). Major değişimler ise 8 ve 19. kromozomlarda trizomi, 17. kromozomda izokromozom i(17q) ve ekstra Ph kromozomudur (Double Ph) (84).

Moleküler anormallikler sitogenetik değişikliklere denktir. P53, RB1, c-MYC, p16INK4A ve RAS genlerindeki ve t(3;21) (q26;q22) translokasyonu ile oluşan AML-EVI-1 füzyon proteininde anormallikler bunlardan bazılarıdır. P53'ün yapısında meydana gelen delesyon, translokasyon ve nükleotid mutasyonu gibi bozukluklar miyeloid transformasyon ile doğrudan ilgili olup blast fazındaki KML hastalarının %20-30'unda gözlenir (85). RB1 geninin yapısında meydana gelen bozukluklar ise lenfoid transformasyonda etkilidir. P53'ün yapısında meydana gelen mutasyonların KML hücrelerinin

transformasyonun KML hücrelerinin anormal metilasyonu ile ilgilidir. KML hücrelerinin kronik fazdan blast faza geçişlerinde, metil grubu uygulaması ile kalsitonin geni ekspresyonunun engellenmesi olduğu bulunmuştur (86).

KML Tanı ve Takibinde Genetik Analizler

Klinik ve laboratuvar bulguları ile KML'den şüphelenildiği durumlarda tanı, periferik kan yayması ve kemik iliğinin incelenmesine dayanır. Splenomegali, periferik kanda granülositik lökositoz, kemik iliğinde miyeloid hiperplazi ve LAP skorunda düşüklük gibi bulgular KML lehine olmakla birlikte kesin tanı için yeterli değildir. Karyotip analizi yoluyla Ph kromozomunun ya da moleküler yöntemlerle BCR-ABL translokasyonunun gösterilmesi tanı koydurucudur (87).

Konvensiyonel Sitogenetik Yöntem

Kalıtsal bilgiyi taşıyan DNA molekülü ökaryotlar da nükleusta bulunmaktadır. Hücre interfaz aşamasında iken bu materyal, histon ve histon olmayan proteinlerle kromatin yapıyı oluşturur. Hücre bölünürken kromatin yapı kısalıp kalınlaşarak kromozomları meydana getirir. Kromozomlar metafaz safhasında incelemeye uygun hale gelirler (88, 89).

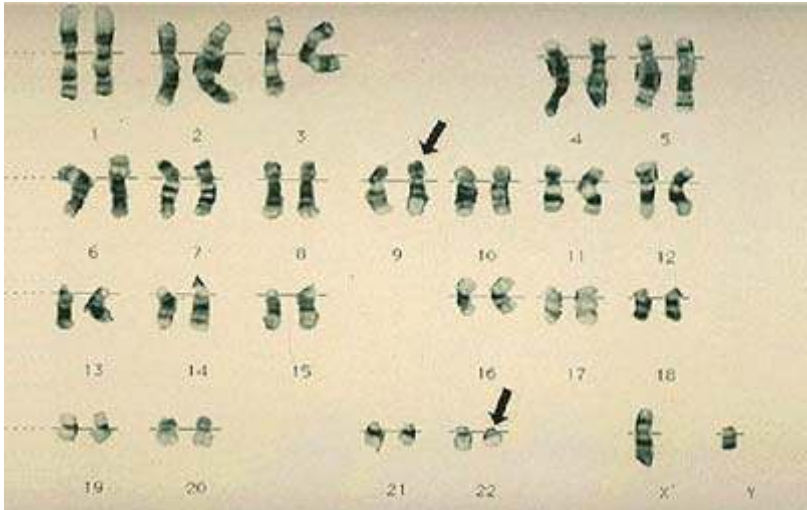
Karyotipleme, kromozomların yapısal olarak incelenmesi, anomalilerinin belirlenebilmesi için yapılan işlemdir. Kromozomların yapısını fonksiyonlarını, davranışlarını ve patolojilerini inceleyen bilim dalı sitogenetikdir. Geniş bir uygulama alanı bulunsa da sitogenetik analizinin gerektiren koşullar olmalıdır. Karyotipleme, tanı ve takibinde belirleyici kromozom anomalilerinin görüldüğü kanserler, özellikle hematolojik kanserlerin belirlenmesi için uygulanmaktadır (89-91).

Kromozomlarda meydana gelen yapısal ve sayısal anomalileri tespit etmek ve / veya her kromozomu tanımlamak amacıyla çeşitli kromozom bantlama yöntemleri geliştirilmiştir. Rutin incelemelerde genelde 450-550 band düzeyindeki metafazlar kullanılmaktadır. Band rezolüsyonu, X kromozomunu içeren bir haploid sette görülen açık ve koyu renk bölgelerin toplam sayısını ifade etmektedir. Band düzeyleri, küçük kromozom parçalarının kayıp ve artışlarının saptanmasında yeterli olmayabilir. Bu durumda daha yüksek band seviyelerinde (550-850) inceleme yapılması

gerekmektedir. Genel olarak G bantlama yöntemiyle inceleme yapılır, amaca yönelik olarak Q, R, C, HRB gibi yöntemler de kullanılmaktadır.

KML tanısı Ph kromozomu ve/veya BCR-ABL füzyon transkriptinin varlığının gösterilmesi ile doğrulanmaktadır. Ph kromozomunun varlığı genellikle konvansiyonel sitogenetik yöntem olan G-bantlama metodu ile kemik iliği materyalinde gösterilmektedir. Bu teknikte hücreler siklisun metafaz evresinde incelenir. Genellikle 20 mitotik hücrenin genetik analizi yapılmaktadır bu nedenle sensitivitesi düşüktür. Sitogenetik anomali hücrelerin en az 2 - 5'inde yoksa saptanamaz (89, 92, 93).

KML'deki tipik translokasyonda 9. kromozomun uzun kolu üzerindeki 34.1 bölgesi ile 22. kromozomun uzun kolundaki 11.21 bölgesi yer değiştirdiği için klasik Ph kromozomu t (9;22) (q 34.1;q 11.21) olarak ifade edilir (Şekil-12). Bazı hastalarda, genellikle 9. ve 22. kromozomların da katıldığı, üç ya da daha fazla kromozomu içeren ve varyant translokasyon olarak isimlendirilen sitogenetik anomaliler bulunabilir. Varyant translokasyonlar sonucunda BCR-ABL füzyon geni ortaya çıksa da bazen 22. kromozomda kısalma olmaz ve bu olgular karyotip analizinde yanlışlıkla Ph negatif olarak değerlendirilebilir. Hastalığın klinik seyri yönünden bakıldığında klasik ve varyant translokasyonlu hastalar arasında fark görülmemekle birlikte, moleküler özellikler bakımından aynı olup olmadıkları tartışmalıdır.



Şekil-12: Karyotip analizinde Ph kromozomunun gösterilmesi.

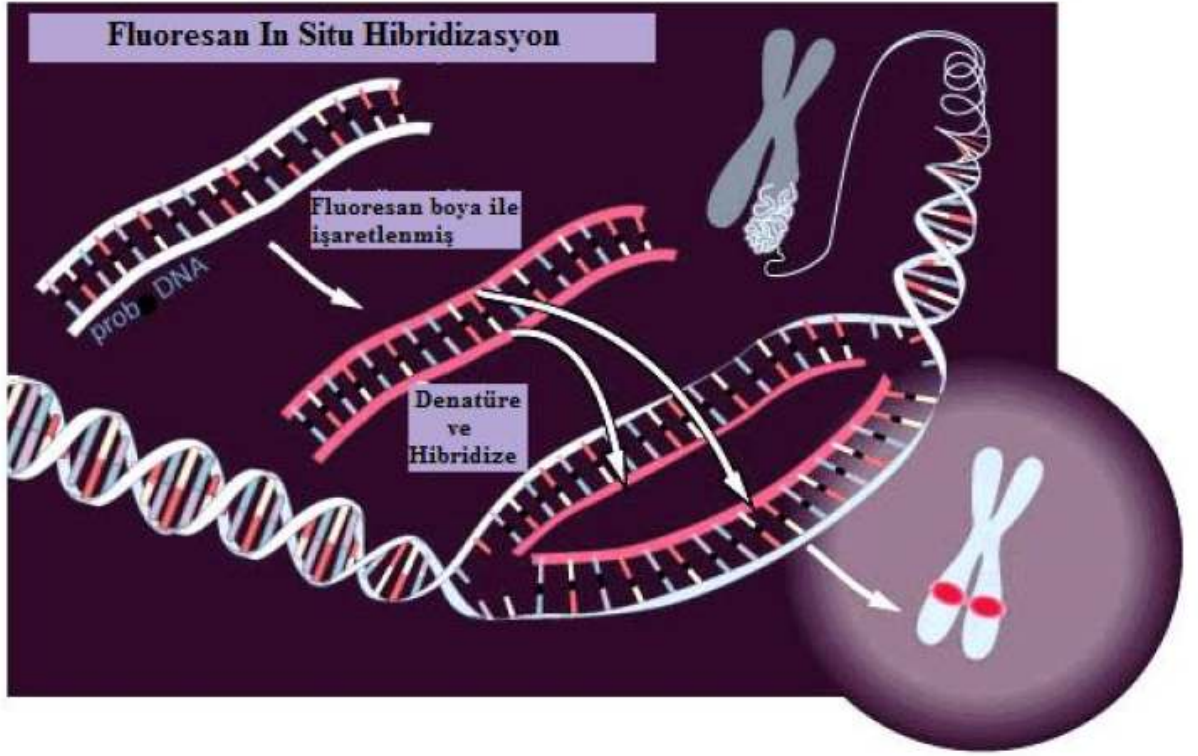
KML akselere ve blastik fazlarında ek sitogenetik anormallikler ortaya çıkabilir. Hastalık blastik faza ilerlediğinde vakaların yaklaşık %85'inde ek kromozomal anormallikler geliştiği bilinmektedir. Bunlar arasında en önemli olanları; ikinci bir t (9;22), 17. kromozomun iki uzun kolunun sentromerde birleşmesi ile oluşan izokromozom 17q ve trizomi 8'dir. Ekstra Ph kromozomu, KML'de blastik fazın gelişimiyle ortaya çıkan en yaygın sekonder değişikliktir (94).

Moleküler Sitogenetik Yöntemler-FISH (Floresan In Situ Hibridizasyon) Uygulamaları

Fluoresan In Situ Hibridizasyon (FISH), nükleik asit problemlerinin hücresel veya kromozom preparatlarındaki denatüre edilmiş DNA ya da RNA ile hibridizasyonuna dayanan bir tekniktir. İlk olarak 1991 yılında tanımlanan bu teknik, prob adı verilen hedef DNA veya RNA molekülüne komplementer, radyoaktif ya da nonradyoaktif olarak işaretlenmiş olan nükleik asidin, sitolojik preparatlar üzerinde hedef dizi ile olan hibridizasyonudur(Şekil-13) (95-97).

DNA'nın çift sarmal yapısı normal koşullar altında stabildir. Bu yapı, DNA'nın ısı veya formamid gibi kimyasal maddelerle etkileşimi sonucu bozulmakta ve bazlar arasındaki hidrojen bağları koparak DNA tek iplikli hale gelmektedir. Bu etkileşim ortadan kalktığında DNA eski halini alır (98).

Belirli bir kromozomal bölgenin veya DNA kesiminin FISH yöntemi ile görünür hale gelebilmesi için o bölgeye spesifik bir probun kullanılması gerekir. FISH yönteminde hedef DNA/RNA molekülüne komplementer işaretli nükleik asit dizisine "prob" denir. Problar haptenler, florokromlar, enzimler veya kolloidal altın ile işaretli olabilirler. Ancak bugün pratik olmaları ve ticari olarak bulunabilmeleri nedeniyle direkt ve florokromlarla işaretli problemler kullanılmaktadır (99).



Şekil-13: FISH (Fluoresan In Situ Hibridizasyon).

Aranan anomalinin doğru bir şekilde tespit edilebilmesi için amaca uygun prob seçimi çok önemlidir. Problar; hedef bölgelerine ve sinyal paternlerine göre gruplara ayrılmıştır. Hedef bölgelerine göre 4 sınıfta toplanır (Şekil-14) (99, 100).

1- Lokusa özgü problemler: Yaklaşık 15-500kb uzunluğundaki problemlerdir. Araştırılan genin bulunduğu lokusa ait DNA dizisini içerir. İnterfaz nükleusuna ve metafaz kromozomlarına uygulanabilir. Bilinen mikrodelsiyon ve duplikasyon sendromlarının tanısında ayrıca translokasyon ve inversiyon gibi kromozom anomilerindeki kırık noktalarının tespitinde kullanılır.

2- Tekrarlayan dizilerden oluşan problemler (sentromerik veya telomerik problemler): Alfa satelitler; kromozomların sentromerlerine özgün tekrarlayan dizilerdir. Bu dizileri taşıyan problemler sentromerlerin tespitinde kullanılır.

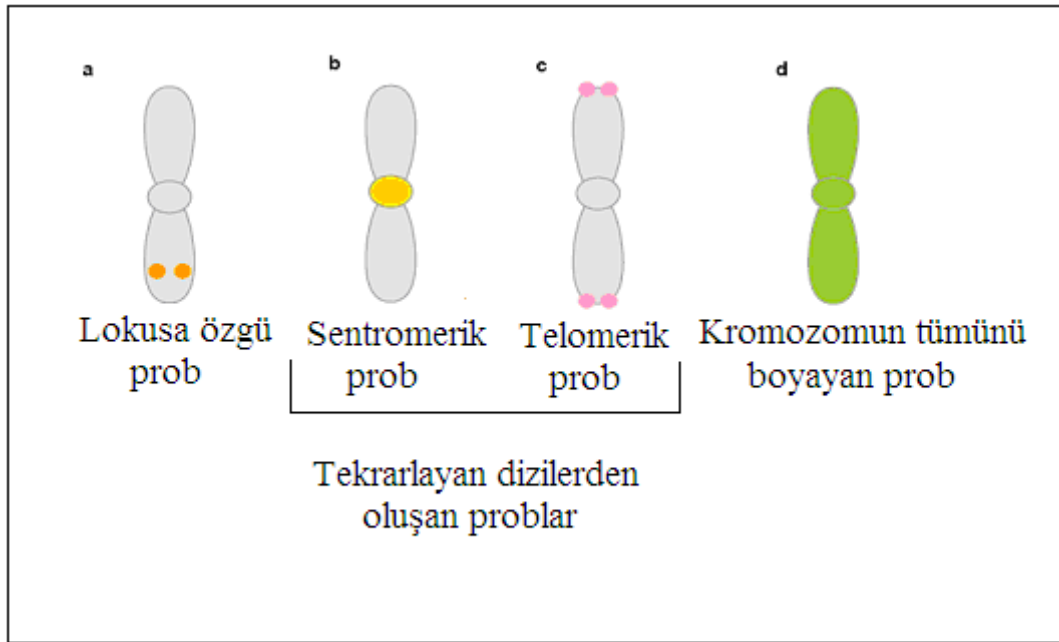
Beta satelit problemler; perisentrik heterokromatin bölgelere, akrosentrik kromozomlara ve 9. kromozoma özgüdür. Klasik satelit problemler ise AATGG tekrar dizileri ile bağlantılı olarak 1, 9, 15 ve 16. kromozomların

perisentrik heterokromatin bölgelerine ve Y kromozomunun uzun koluna özgün dizilerdir.

3- Telomerik problar: Toplam 2-15 kb uzunluğunda 5'-TTAGGG-3' tekrarlarından oluşan telomer dizilerine özgü problardır.

4- Kromozomun tümünü veya belirli bir bölgesini boyayan problar (painting veya whole chromosome painting): Belirli bir kromozomda bulunan çeşitli DNA dizilerine homolog olan prob karışımından oluşmuş problardır. Ayrıca kromozomun p ve q kolunu ayrı renklerde görünmesini sağlayan problarda bu gruba dahildir (92, 99, 100).

Sinyal paternine göre tasarlanmış problar ise lokusa özgü (tek spot), translokasyon ve kırık noktası yeniden düzenlenme (break apart rearrangement) probları olarak sıralanabilir. Bu problar kullanım şekilleri ve özelliklerine göre tek ve/veya çift renkli, prob setlerinde ise üç ve/veya beş farklı renkle işaretli olabilirler (100). FISH yönteminin rezolusyonu konvansiyonel sitogenetiğe göre daha yüksektir.



Şekil-14: FISH yönteminde kullanılan prob çeşitleri: a) Özel nükleotid dizilerine bağlanan lokusa özgü prob, b) Sentromerlerdeki tekrarlayan dizilere bağlanan sentromerik prob, c) Telomerdeki TTAGG tekrar dizilerine bağlanan telomerik prob, d) Kromozomun tümüne komplementer olan kromozomun tümünü boyayan prob.

FISH yöntemi lösemilerde başlıca şu amaçlarla kullanılmaktadır:

- Lösemi tipine ait spesifik karyotip değişikliklerini tespit etmek.
- Tedaviye paralel olarak karyotip değişikliklerini izlemek.
- Klinik remisyon ile karyotip remisyonunun takibini karşılaştırmak.
- Hastalığın relapsındaki karyotip değişikliğini belirlemek.
- Kemik iliği nakli sonrası, kemik iliğinde oluşan hücre populasyonunun orjinini belirlemek.
- Hücre tiplerini belirleyerek lösemi tipine ait karyotip yapısını saptamak (95, 101).

Fluoresan in situ hibridizasyon, konvansiyonel sitogenetik analizde mitotik indeksin düşük olduğu ya da metafaz eldesinin olmadığı durumlarda yapılabildiği gibi, endike olgularda tanı amacıyla tek başına uygulanır (102-105). FISH, metafaz ya da interfaz kromozomları üzerinde uygulanır. FISH yöntemi ile daha fazla sayıda hücrede (200 kadar) Ph pozitifliği saptamak gerekir ve yanlış pozitiflik yüksektir (%5-10) (102-104). FISH, BCR-ABL füzyon geninin varlığını ve lokalizasyonunu tespit ederken Ph negatif BCR-ABL pozitif vakaları da tespit eder. FISH probu kullanılarak yapılan diğer bir sitogenetik yöntem ise hipermetafaz FISH tekniğidir. Bu teknikte 400-500 metafaz incelenerek yalancı pozitiflik oranı minimize edilir (103). Derivatif kromozom 9 delesyonu [der(9q)] tespiti ancak FISH ile yapılabilmektedir ve negatif etkili prognostik risk faktörü olarak değerlendirilir. Bu derivatif kromozomu taşıyan hastalarda blastik faza geçiş hızlanır, tedaviye kötü yanıt verirler ve sağkalım süreleri kısalır (106).

Moleküler Genetik Yöntemler

Tanıda kullanılan moleküler genetik analizler BCR-ABL füzyon transkriptinin gösterilmesine odaklanmaktadır (107). Moleküler genetik yöntemler arasında bulunan PCR (Polimerase Chain Reaction\Polimeraz Zincir Reaksiyonu) tekniği, çok küçük miktardaki DNA'nın kullanımına imkan verdiği ve oldukça hassas olduğu için fazlaca tercih edilmektedir. PCR tekniği, bir DNA karışımında bulunan belirli bir DNA dizisinin in vitro koşullarda hızlı ve etkin bir şekilde çoğaltılmasına olanak sağlamaktadır. Böylece çalışmalar için uygun sayıda kopya elde edilmektedir (101).

PCR'ın çeşitli uygulama tipleri de vardır. Bunlardan biri olan RT (revers transkriptaz) PCR özellikle mutasyon taramaları için kullanılmaktadır. Çalışılacak dokudan mRNA izole edilmekte ve bu mRNA'dan revers transkriptaz yardımıyla cDNA elde edilmektedir. Elde edilen cDNA, RT-PCR için kalıp görevi görmektedir. RT-PCR füzyon genlerinin eksprese ettiği transkriptlerin saptanmasında; gerek konvansiyonel sitogenetik, gerekse moleküler sitogenetik yöntemlere göre üstün yönleri vardır. Bu üstünlüğün nedeni; 1 milyon hücreden bir tanesindeki değişimi bile saptama olanağına sahip olmasıdır (95, 101, 108).

Son zamanlarda, real time kantitatif PCR'ın geliştirilmesi ile RT-PCR'da kantitatif ölçümlerin yapılabilmesi ve mikroarray yöntemleri ile gen ekspresyonlarının aynı anda yüzlerce gen üzerinde bakılabilmesi bakımından önemli gelişmeler olmuştur. Bu durum; yeni tanı, takip ve tedavi süreçlerini olumlu yönde etkilemektedir (95, 101).

“Real-time PCR”

Real-time PCR, DNA'nın çoğaltımını ve ürünlerini tek bir tüpte belirlemeyi mümkün kılan çok yakın bir zamanda uygulamaya konulan popüler bir metottur (109). Gen ekspresyonunun analizini değiştiren bu metot ile geleneksel PCR yöntemi ve gen analizi birleştirilmiştir. PCR çoğaltımını görünür hale getiren ve monitorize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir. Birçok isimlendirilme yapılan bu teknoloji yabancı yayınlarda “kinetik PCR”, “homojen PCR”, “kantitatif Real-time PCR” gibi çeşitli adlarla da isimlendirilmektedir (110).

Biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme ve mRNA'nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilme en çok kullanılan alanlarını oluşturmaktadır. Bu amaçlarla kullanımının yanı sıra tek nokta mutasyonlarını belirleme, patojen belirleme, DNA hasarı belirleme, metilasyon tespiti, SNP analizi, kromozom bozukluklarının tespiti gibi çalışmalarda da kullanım alanları mevcuttur (111).

Bugün birçok araştırma ve tanı laboratuvarlarında kullanılan real-time PCR cihazları mevcuttur. Bu cihazlar birbirlerinden reaksiyon sayısı

kapasiteleri, eksitasyon-emisyon dalga boylarındaki farklılıkları, hızları ve kanal sayıları ile ayrılırlar. Ticari olarak satılanlar; “Stratagene M x 3000p, M x 3005p ve M x 4000”, “Applied Biosystems 7300 ve 7500”, “Chromo4”, “Smart Cyclers”, “Rotor-Gene”, “LightCycler” en fazla kullanılanlardır (112).

Çift zincirli DNA'ya bağlanan “SYBR-Green I” floresan boya en basit metottur. “SYBR-Green I” boya ile belirleme çok iyi işleyen bir metottur fakat reaksiyon ortamında herhangi bir çift zincirli DNA bulunduğunda floresan ışımaya yapabilir. Bu primer-dimer oluşumu da olabilir. Bunda başka güvenilir bir şekilde kullanılan üç adet floresan ışımaya yapabilen işaretli prob vardır. Bunlar “TaqMan ® probe” veya hidroliz prob, moleküler boncuk yöntemi ve hibridizasyon problemlerini içeren problemlerdir.

Özgül Olmayan Belirleme Sistemi

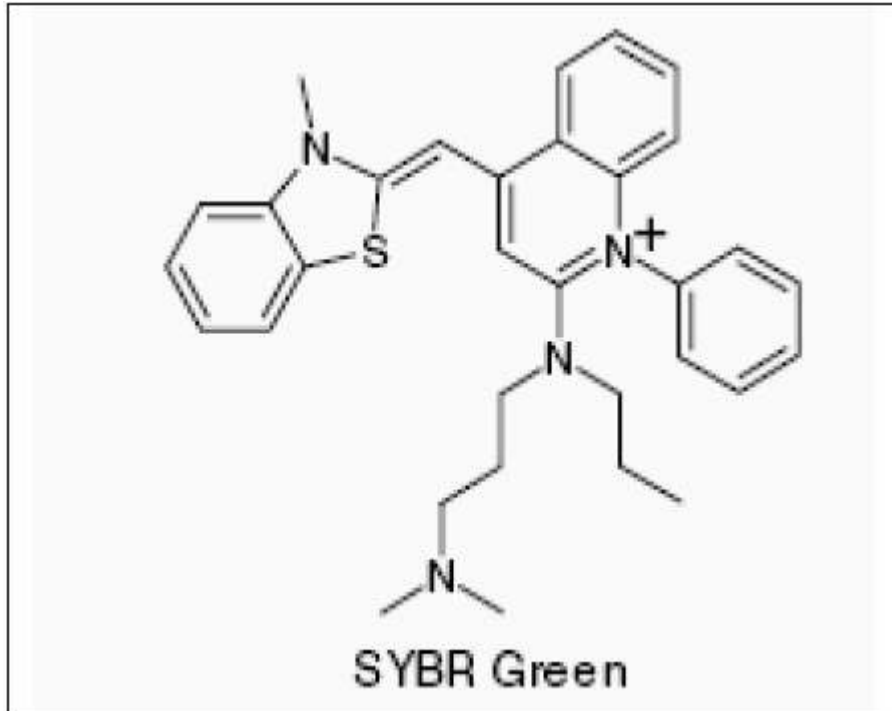
SYBR Green I

Spesifik olmayan çift zincirli DNA'nın çoğaltımında “SYBR Green I” yöntemi kullanılır. Bu yöntemde kullanılan floresan boya sadece çift zincirli DNA'ya bağlandığından çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel olarak “real-time” PCR cihazında okunan floresanın miktarı da eş zamanlı olarak artar. “SYBR Green I” en fazla kullanılan boya çeşitidir ve 497 nm dalga boyunda yükseltgenir ve 520 nm dalga boyunda indirgenir (Şekil-15). Çift sarmal DNA'nın küçük oluşuna bağlanan boya 30 amplifikasyon döngüsü sonrası yalnızca aktivitesinin %6'sını kaybeder (111).

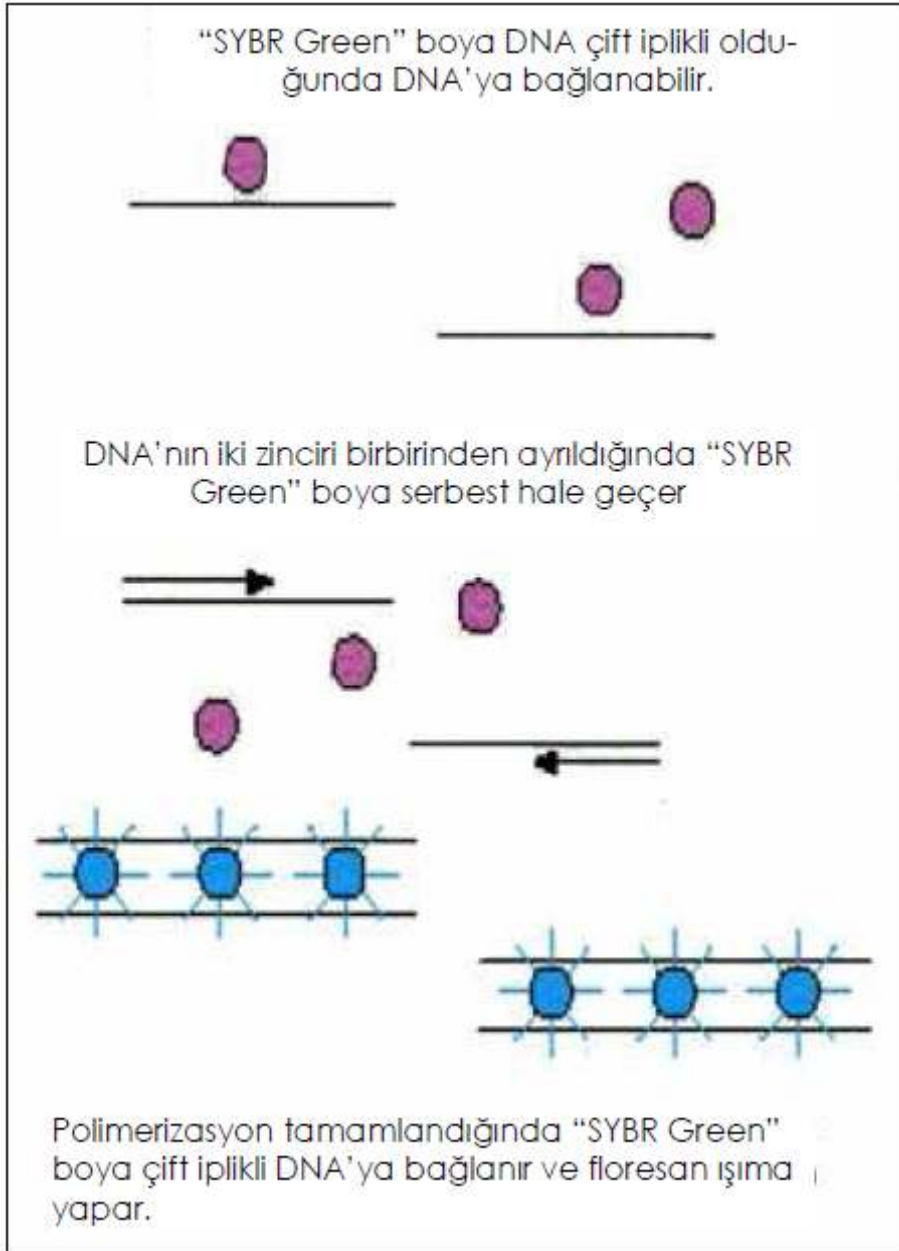
Çoğaltımın basında reaksiyon karışımında çift zincirli DNA molekülü, primerler ve “SYBR Green I” boyası bulunmaktadır. Bağlı olmayan serbest DNA molekülü çok az bir floresan ışımaya yapar. Primerler bağlanıp uzama başladığında boya molekülü çift zincirli DNA'nın arasına girer ve floresan yayılımı baslar. Başlangıçtaki döngü boyunca sinyal zayıftır; ürün miktarı arttıkça floresan miktarı hızla artar ve bu artış “real-time” cihazının monitöründen izlenebilir (111).

Bu yöntem optimize edilmiş PCR şartlarında ve dizaynı iyi yapılmış primerler ile çok fazla sayıda hedef genin çoğaltılmasına olanak verir. Floresan işaretli problemlere ihtiyaç göstermediği için maliyeti ucuzdur. Bunun yanı sıra yöntemin dezavantajları da vardır. İstenmeyen PCR ürünlerin

çoğalması ile yine floresan açığa çıkacağından her zaman istediğimiz DNA'nın çoğaldığını işaret etmez yanlış pozitif sonuç almak mümkündür. Ortamda hedef DNA dizisi olmadığında primerlerin birbiri ile bağlanmaları sonucunda "primer dimer"leri olarak adlandırılan ve çift zincirli DNA bölgelerinin oluşumu ile floresan ışımaya gözlenebilir. Çoğaltılan DNA'nın istenilen hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek için DNA'ların erime eğrisi analizleri ("melting curve", "dissociation") yapılması gerekmektedir. Erime eğrisi analizi yapılmak istendiğinde cihaz PCR tüplerini yavaşça ısıtmaya başlar. Çift zincirli DNA birbirinden ayrılmaya başladığında (melting temperature= Tm) floresan boya serbest kalır ve okunan floresan miktarı da düşer. Her bir DNA'nın belirli bir erime sıcaklığı (Tm) derecesi vardır. Bu erime sıcaklığı çoğalan DNA parçalarının uzunluğuna ve içerdiği GC/AT oranına bağlıdır. Spesifik olmayan ürünlerin çoğalmasında (primer dimer'lerinde) aradığımız DNA parçasının Tm derecesi arasında farklılık olacaktır. Tm derecesinin farklı olması her ürünün kendine özgü uzunluğu ve gen dizisi içermesindedir. Bu yüzden Tm sıcaklığı her ürün için özeldir. Çoğunlukla bu yöntemle bilinmeyen iki DNA dizisi karşılaştırılmak istendiğinde yöntem güvenilir bir şekilde kullanılabilir (Şekil -16) (113).



Şekil-15: Asimetrik siyanin boya SYBR Green I'in kimyasal yapısı.



Şekil-16: “SYBR Green I” yöntemi.

Özgül Belirleme Sistemi

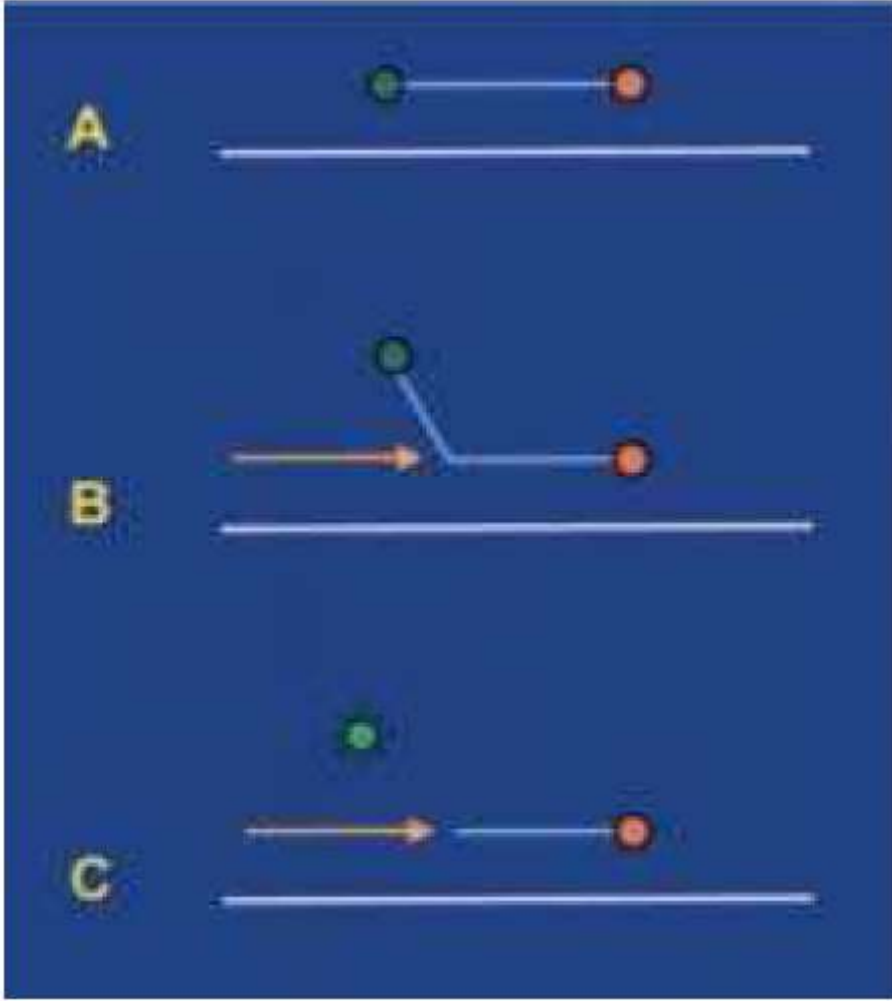
DNA parçasının çoğaltılmak istenilen bölgesi özel bir bölge ise bu bölgenin saptanmasında floresan işaretli probler kullanılır. Bu tekniklerin basında “TaqMan” prob, “Molecular beacon”, “Light-up” prob, hibridizasyon

prob ve “Scorpion” primer gibi floresan işaretli problar kullanılarak yapılanlardır.

“TaqMan® Probe” Yöntemi

“TagMan® probe” yöntemi “Double-Dye Oligonucleotide”, “dual labeled probe” veya “5' nuclease probe” olarak da adlandırılmaktadır. “TagMan® probe” yöntemi çoğaltılmak istenilen DNA'ya komplementer olan ve floresan işaretlenmiş tek zincirli bir prob içerir. Floresan işaretli probun 5' ucunda “fluorophore” (6-karboksifloresin= 6-FAM) ve 3' ucunda “quencher” (6- karboksitetrametil-rodamin= TAMRA) bulunur. 3' uçtaki baskılayıcı TAMRA boyası 5' uçtaki FAM boyasının sinyal oluşturmasını engellemektedir. Prob hedef DNA'ya bağlanma durumunda bile floresan sinyal ölçümü düşüktür. Çoğaltılma sırasında hedef nükleik asit dizisi üzerinde primerler bağlanma bölgeleri arasında “Taq Man” problar bağlanırlar. Primerlerin bağlanmasının ardından yeni zincir oluşmaya başlar. Probun bağlı olduğu bölgeye gelindiğinde Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesi ile FAM'ı probdan ayırır. Serbest hale geçen FAM sinyal oluşturur. DNA zincir sentezi uzamaya devam eder. Her bir döngüde ürün çoğalımı arttıkça floresan da ona bağlı olarak artmaya devam eder (Şekil-17) (114).

“TagMan® probe” yönteminde mutasyon tespiti ile birlikte sayısal değerlere de ulaşılabilirdiğinden araştırmacılar için avantaj sağlar. Bu yöntem standart bir protokolü ve kolay bir dizaynı ve çok az bir optimizasyonla gerçekleştiği için hem allelik diskriminasyon hem de ekspresyon profilinin çıkartılmasında kolaylıkla kullanılır (115).

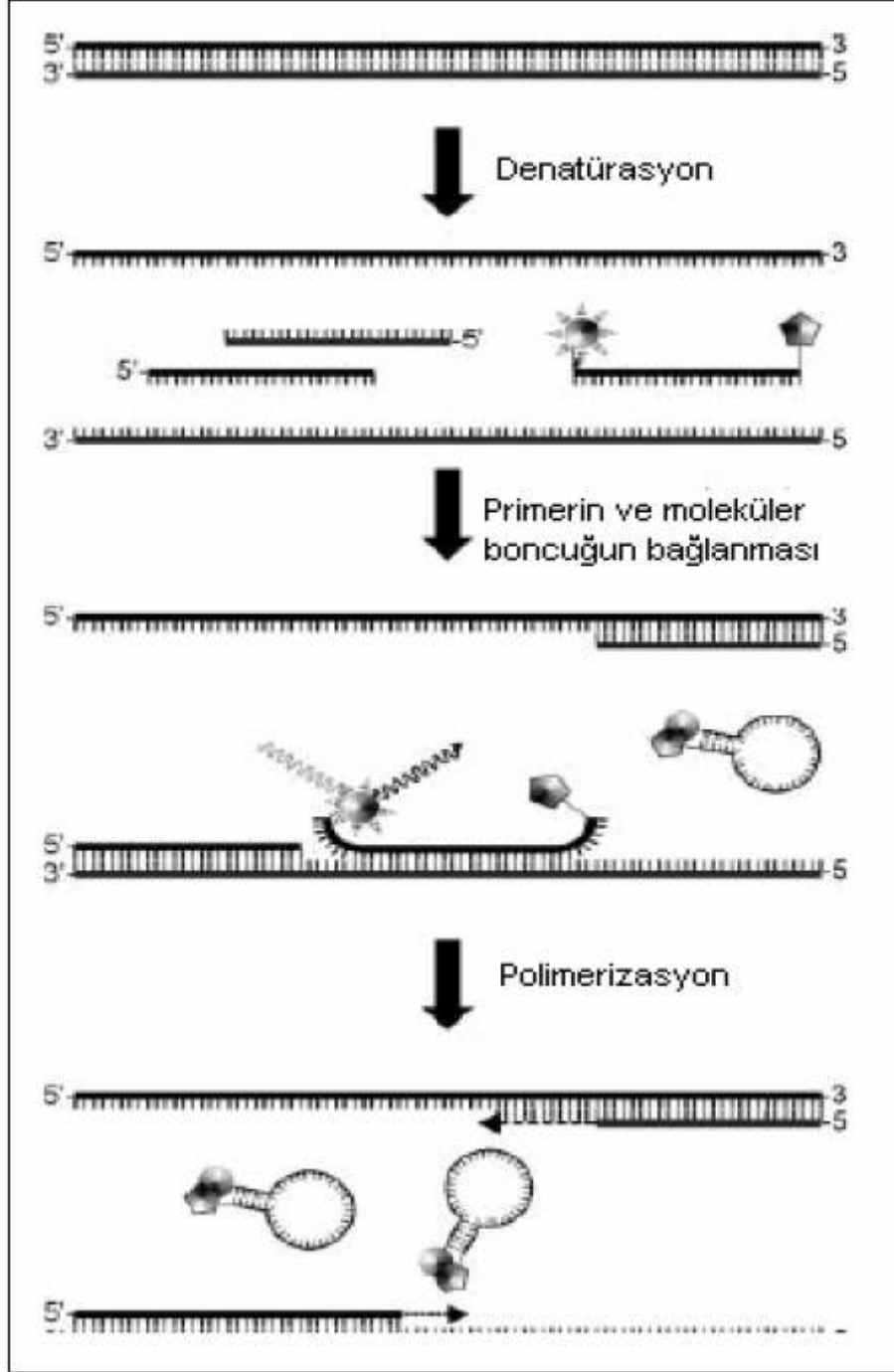


Şekil-17: TaqMan prob yöntemi.

Moleküler Boncuk Yöntemi

Moleküler boncuk yöntemi hem yapısı hem de çalışma prensibi ile “TagMan® probe” ve “SYBR Green I” yönteminden çok farklıdır. Saç tokası şeklindeki yapının yuvarlak uç kısmı çoğaltılacak DNA ile komplementer tek zincirli DNA dizisini içerir. Bu yapının düz olan uç kısımlarında 2 adet florokrom boya içermektedir. Bunlardan baskılayıcı florofor diğer boyanın floresansını engeller. Moleküler boncuk probu solüsyon içerisinde serbest halde iken ışımaya yapmaz. Çoğaltılmak istenilen DNA bölgesi PCR ile çoğalmaya başladığında prob hedef DNA dizisine göre dizayn edildiğinden birbirleri ile karşılaştıklarında konformasyonu değişir ve düz, çift zincirli hale geçer. Çünkü bu yapı termodinamik olarak saç tokası şeklinden daha karardır. Moleküler boncuk hedef nükleik asit dizisi ile hibridize olur olmaz

boncuk molekülünün yapısı değiştiğinden ve boyalarda birbirlerinden uzaklaştığından floresan miktarı artar. Bu teknikte oluşan floresanın ölçümüne dayanmaktadır (Şekil-18) (116).



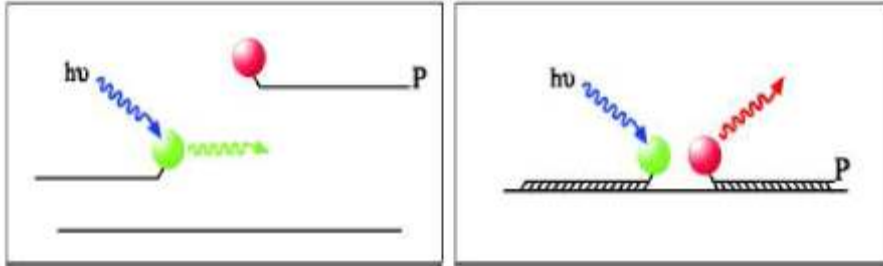
Şekil-18: Moleküler boncuk yöntemi.

Moleküler boncuk yönteminin en fazla kullanıldığı alanlar; genetik tarama, SNP çalışmaları, farmakogenetik çalışmalarıdır. Bu yöntemde prob

dizaynı çok önemlidir ve optimal şartlar sağlanmadığında özellikle uygun sıcaklık bulunamamışsa probun saç tokası şeklindeki yapısı değişmeyeceğinden ortamda hedef DNA dizisi bulunsa bile floresan ışımada elde edilemeyebilir (110, 116).

Hibridizasyon Prob Yöntemi

Bu yöntem Roche tarafından "LightCycler®" PCR cihazında kullanılmak üzere geliştirilmiştir. İki farklı prob dizayn edilmiştir. 3' ucunda floresans işaretli boya (donor), 5' ucunda alıcı boya (acceptor) bulunmaktadır. PCR reaksiyonu sırasında bu iki prob hedef nükleik asit dizisine bağlanıp birbirine yaklaştığında bir enerji yayılımı olur (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer). Enerji "donor" boyadan "acceptor" boyaya transfer olur. Bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı PCR süresince oluşan ürün miktarı ile doğru olarak artar (Şekil -19) (117, 118).



Şekil- 19: Hibridizasyon prob yöntemi.

"Real Time PCR" Hematolojide Kullanımı

A. İşaretli Problar ve "Melting Curve Analizi" Kullanılarak Yapılan Çalışmalar

Venöz tromboza yatkınlıkta en sık karşılaşılan koagülasyon anomalisi aktive protein C (APC) direncidir. Faktör IV Leiden mutasyonu da APC direncine neden olur. Genetik çalışmalar popülasyonda %85-95 bireyin APC direnci taşıdığını göstermiştir. APC direnci ya da Faktör V mutasyonu taşıyan bireylerin diğer yaygın trombofili ile örtüşen fenotiplerine de bakılmalıdır. Faktör II (G20210A) popülasyonda %1-2 sıklıkta bulunur. MTHFR C677T polimorfik varyantı ailesel tromboemboli ve hiperhomosisteinemiye yatkınlık enlerinden biridir. "Real time PCR" ile işaretli problemler kullanarak ve

“melting curve” analizi ile çok kısa bir süre içinde Faktör V, Faktör II ve MTHFR C677T mutasyonlarının tespiti mümkündür.

Hemoglobinopatilerde gözlenen yaygın B-globin mutasyonlarının (HbS, Hb G (kodon 6) ve Hb E (kodon 26)) farklı problar kullanılarak, tek reaksiyon tüpü içinde (multipleks) tespiti mümkündür. “Real time PCR” rutinde kullanılan HPLC ve izoelektrik fokus yöntemlerine alternatif bir uygulamadır. Aynı şekilde hemokromatoz mutasyonlarının (C282Y ve H63D) tespitinde en sık kullanılan PCR-restriksiyon enzim analizine alternatif bir teknolojidir.

ALL ve AML tedavisinde karşılaşılan toksisite, ilaca direnç ve duyarlılık kavramlarına açıklık getirmek amacıyla, bu ilaçları metabolize eden enzimlerdeki polimorfizmlerin, dolayısı ile enzim aktivitelerinin araştırılması için “real time PCR” hızlı bir tarama yöntemidir. TPMT ve CYP2D6 enzim varyantlarının bu teknikle araştırılması mümkündür.

B. Gen Ekspresyon Çalışmaları

Kantitatif “real time PCR” yardımıyla minimal rezidüel hastalıklarla bağlantılı özgün gen düzeylerinin saptanması kliniklere büyük katkı sağlayacak potansiyelindedir. Bu amaçla ekspresyon düzeyleri saptanan BCR/ABL, AML1/MTG8, PML/RARalpha, CBFbeta/MYH11, TEL/AML1, E2A/PBX1, MLL/AF4, MLL/AF9 gibi bir çok gen mevcuttur. Kantitatif “real time PCR” ile ilgili karşılaştırmalı çalışmalar gerek klasik RT-PCR gerek FISH yöntemine göre minimal rezidüel hastalık takibinde bu teknolojinin üstünlüğünü kanıtlamaktadır. Özellikle Kronik Miyelositer Lösemilerde minimal rezidüel hastalık takibinde p210 ve p190 proteinlerini kodlayan mRNA BCR/ABL düzeylerinin bu yöntemle kantifikasyonu %100 spesifiklik ve %0.0001 düzeylerine varan duyarlılık alanı içinde mümkün olabilmektedir. Allojenik kemik iliği transplantasyonu hastalarda da remisyon izlemede rutin kemik iliği takip işlemlerinde tercih edilmesi gereken bir teknolojidir. Akut promyelositik lösemi (APL)’nin tanısında da t(15;17) füzyon genine ait mRNA’nın saptanması ATRA ve arsenik gibi tedavi edici ajanlara olan yanıtın ölçülmesinde, minimal rezidüel hastalık takibinde ve relapsların belirlenmesinde güvenli ve hızlı bir yardımcıdır.

AML 'de WT1 gen ekspresyon anlatımı bir panlösemik belirteç olarak anılmaktadır ve KML'de terapiye yanıt ölçümünde de kantifiye edilmektedir. Çalışmalar sonucunda bu genin anlatımının AML'de çok düşük düzeylerde izlenmesinin iyi prognoz belirtisi olduğu anlaşılmaktadır. MDS'ye ait risk ölçümünde de güvenli bir belirteç olarak anılmaktadır.

Kantitatif "real time PCR" yardımıyla apoptozis kantifikasyonu da apoptozisin şu ana dek proteinden saptanıyor olmasına karşı getirilen önemli bir gelişmedir. *bcl2*, *bax*, *dapk1*, *myc*, *bad*, *wt1*, *mcl1* gibi genlere ait ekspresyon analizleri ve RNA Y1 (hY1) gen kantifikasyonu bu amaçla uygulanan başarılı çalışmalardandır. Rutine yönelik uygulamalar içinde özellikle ALL takibinde klona spesifik immunoglobulin (Ig) ve T-cell receptor (TCR) genine ait uygulamalar dikkati çekmektedir. Özellikle konvansiyonel PCR işlemlerine göre PCR sonrası basamakların olmaması ve tanısal duyarlılık nedeniyle kantitatif PCR bir tercih sebebidir. Benzer şekilde immunoglobulin ağır CDRII ve CDRIII bölgelerini kantifikasyonu ile B hücreli-KLL takibinde de kullanılabilir. Bu ölçümlerin 5×10^5 normal hücre arasında tek bir tümör hücrelerini bile saptayabilmek relaplarda çok erken tanı olanağı verdiği söylenmektedir (119).

Tablo-3: Konvansiyonel sitogenetik, FISH ve moleküler yöntemlerin karşılaştırılması (120).

Parametre	Konvansiyonel sitogenetik	FISH	QR-PCR
Hassasiyet, % tümör	%5-10	%1-10	0,001-0,01
Ölçümün doğruluğu	\pm %15	\pm %2-5	\pm %2-5 kat
Metafaz	Gerekli	Gerekmiyor	Gerekmiyor
Kemik iliği(Kİ)	Gerekli	Gerekmiyor	Gerekmiyor
Kan/Kİ örneklerinin sonuçlarının karşılaştırılması	Bildirilmemiş	Var	Var
Yanlış negatiflik	Var	Var	Var
Yanlış pozitiflik	Nadir	Var, \leq %10	Var, \leq 0.1
Diğer krz. anomalilerin tespiti	Var	Yok	Yok
Derivatif 9.krz tespiti	Yok	Var	Yok

FISH: floresan in situ hibridizasyon, **QR-PCR:** kantitatif PCR.

Tedavi

KML tedavisinde başlangıçta hastalığın biyolojik seyrini değiştirmeyen hücre azaltıcı sitotoksik tedaviler (başlıca hidroksiüre (HU) ve busulfan) kullanılmıştır. Sonraki dönemde biyolojik yanıt düzenleyici ilaçlar (interferon (IFN) ve IFN/ARA-C kombinasyonu) sitogenetik remisyon sağlama amaçlı olarak kullanılmıştır (34). Lökosit sayısı çok yüksek KML hastalarında hiperviskozite sendromu bulguları varsa lökoferez uygulanabilir. Günümüzde HU lökostatik komplikasyonları engellemek amacıyla miyeloid hiperplaziyi azaltmak için ya da allojeneik kök hücre nakli (KHN) öncesi kullanılmaktadır.

İmatinib öncesi dönemde IFN temelli rejimler 10 yıldan uzun bir süre ilk tedavi seçeneği olmuştur. Randomize kontrollü çalışmalar IFN'un konvansiyonel tedavi ile karşılaştırıldığında sağkalımı uzattığını göstermiştir. IFN hastaların yaklaşık %80'inde hematolojik, %50'sinde de sitogenetik cevabı indüklemiştir. Sağkalımda anlamlı bir uzama yalnızca sitogenetik cevabı olan hastalarda görülmüştür (121,122). İmatinib öncesi dönemde uygulanabilen hastalar için allojenik KHN uzun süreli moleküler remisyon sağlaması ve %50'ye varan kür oranı ile önemli bir tedavi seçeneği olmuştur.

1998 yılında spesifik bcr/abl tirozin kinaz inhibitörü imatinib mesilat (STI571, Glivec) bir ilaç olarak klinik uygulamaya girdikten sonra KML tedavisinde "İmatinib Dönemi" başlamıştır. İmatinib, p210 onkoproteinin ATP bağlanan bölgesine spesifik olarak bağlanan bir fenilaminopirimidin türevidir. 400 mg/gün dozunda özellikle kronik fazda hematolojik, sitogenetik hatta moleküler remisyon (BCR-ABL füzyon transkriptinin kaybolması) sağlayabilmektedir. İmatinib, oral olarak çok iyi tolere edilir. Tedavi, mevcut verilere göre yaşam boyu verilmelidir. Ödem, cilt döküntüleri, sitopeniler gibi yan etkileri vardır. Ancak diğer KML tedavilerine göre bu yan etkiler çok daha iyi tolere edilir. Bununla birlikte tedavi maliyeti oldukça yüksektir. İlaça bağlı yan etkiler nedeniyle tedavinin sonlandırılması hastaların %5'inden daha azında görülmüştür. En sık gözlenen yan etkiler kas-iskelet şikayetleri ile ödemdir. Bulantı, kusma, ishal, makulopapüler cilt döküntüsü, halsizlik, baş ağrısı diğer sık gözlenen yan etkileridir. Doza bağımlı hepatotoksisite ve miyelosüpresyon izlenebilir. Bu yan etkiler sıklıkla tedavinin ilk 2-4 haftası

içinde ortaya çıkarlar. Sıvı retansiyonu tüm çalışmaların ortak bir bulgusu olmuştur. Periorbital ya da pretibial gibi vücudun herhangi bir bölgesinde subkutan ödem olarak kendini gösterebilir. Bazı hastalarda plevral efüzyon, asit, kilo alımı görülebilir. Yaygın eritematöz, makulopapüler, pruritik deri döküntüleri de bildirilmiştir. Nadiren bu sebeple ilacı bırakmak zorunda kalan hastalar olmuştur. Karaciğer fonksiyon testlerindeki bozukluk genellikle transaminazlarda hafif yükseklik şeklinde görülür. Tedaviye bir ya da iki hafta ara verildikten sonra düzeldikleri görülür. Miyelosüpresyon kemik iliği toksisitesini gösterebilir ya da imatinibin antilösemik etkisine bağlı olabilir. Kronik fazdaki hastalarda düşük kan değerleri tedaviye birkaç gün ara verildikten sonra sıklıkla düzelir. İleri evre hastalarda düzelme ise daha uzun sürede olur (123-132).

İmatinib tedavisi altında relaps olan hastalar araştırıldığında akkiz imatinib direncine neden olan mekanizmanın esas olarak BCR-ABL'nin kinaz domainindeki mutasyonlar olduğu görülmüştür (133). Dasatinib (Sprycel, BMS- 354825) ve Nilotinib (AMN107) imatinib direncinin daha net anlaşılmasıyla geliştirilmiş daha potent yeni tirozin kinaz inhibitörü moleküllerdir. Her iki ilaçla yapılmış faz I çalışmalar eş zamanlı olarak yakın dönemde yayınlanmıştır (134,135). İmatinibe rezistan kronik faz KML'si olan hastalarda her iki ilaçla da %92 oranında hematolojik remisyon sağlanmış, %35 oranında da tam sitogenetik yanıtı ulaşılmıştır. Ancak bu ilaçlar T315I mutasyonuna etki gösterememektedir. Dasatinib, yapılan faz II çalışmaların yayınlanmasıyla onay almıştır. Bu iki yeni ilaçla çalışmalar devam etmektedir, üçüncü jenerasyon tirozin kinaz inhibitörleri de geliştirme sürecindedirler.

Tirozin kinaz inhibitörleri öncesi kronik faz KML allojeneik KHN için en sık endikasyonu oluşturuyordu. 1999 yılından sonra bu grup hastalarda transplantasyon sayısında çok belirgin bir düşüş olmuştur (136). IRIS çalışmasının 5 yıllık sonuçlarının açıklanmasıyla imatinib ilk basamak tedavi olarak yerini pekiştirmiş ve KHN tedavide ikinci ve hatta yeni tirozin kinaz inhibitörlerinin de kullanıma girmesiyle belki de üçüncü basamağa yer değiştirmiştir. Hematopoietik KHN graft-versus-host hastalığı (GVHH) ve infeksiyöz komplikasyonlar nedeniyle tedaviye bağlı yüksek mortalite riski

taşımaktadır (137). Akraba dışı HLA tam uyumlu olmayan donörlerden yapılan nakiller daha yüksek oranda tedaviye bağlı mortalite ve GVHH'na neden olmaktadır. Non-miyeloablative allojeneik KHN de vericisi bulunan hastalarda uygulanabilir. Allojeneik nakil sonrası KML nükseden hastalarda donör lenfosit infüzyonu ile tekrar remisyon sağlanabilmektedir (138-140). Allojenik KHN imatinibe yanıtı iyi olmayan hastalarda etkin bir tedavi yöntemidir.

Son yıllarda yapılan randomize klinik çalışmalara dayanarak günümüzde yeni tanı almış bir KML hastasının standart tedavisi imatinib olmuştur (141-147). Tedavi 400 mg/gün dozunda başlanmaktadır ve sürekli. 300 mg/gün'ün altındaki dozlar yeterli hücre içi konsantrasyona ulaşmadığından verilmemelidir. Daha yüksek dozların (600 mg veya 800 mg) yüksek riskli kronik faz KML'de, ilerlemiş hastalıkta, başlangıçta imatinibe yanıtı olmayan hastalarda, imatinibe yanıtı kaybolan hastalarda veya imatinib altında hastalıkta ilerleme olması halinde daha yüksek tedavi yanıtı sağlayıp sağlamayacağı sorularının cevabı halen yürütülmekte olan prospektif çalışmalarda gizlidir (148,149). Kontrolsüz, ortanca izlem süresi görece kısa olan çalışmalar seçilmiş yüksek riskli hasta gruplarında daha yüksek dozların daha etkili olduğu yönündedir (150-155).

İmatinib mesilat, bir protein tirozin kinaz inhibitörü olup, diğer tedavi stratejilerinden farklı olarak hastalığın patofizyolojisine, bir diğer ifade ile hedefe yönelik olarak geliştirilmiş bir ajandır. İmatinib mesilat, yapılan klinik çalışmalar sonucunda, yeni tanı almış Ph+ kronik faz KML hastalarının ilk sıra tedavisinde tercih edilen ajan haline gelmiştir (156,157).

İmatinib'in temel farmakodinamik özellikleri:

1-) Ph+ KML hücrelerinde, proliferasyonun inhibisyonu, apoptozis indüksiyonu ve in vitro yeni lösemik hücrelerin potansiyel inhibisyonu (158, 159)

2-) Hayvan modellerinde, Ph+ tümör hücrelerine karşı gösterilmiş anti-tümör aktivite (160,161)

3-) Kök hücre faktör ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) için tirozin kinazların inhibisyonu

4-) Telomeraz aktivitesinin azalması ve bu sayede telomeraz ifade eden hücre serilerinde proliferasyonun inhibisyonu (162)

5-) Glikolitik aktivitenin inhibisyonu ve mitokondriyal glukoz metabolizmasının uyarılması (163)

6-) Vasküler endotelial büyüme faktör (VEGF) inhibisyonu (164)

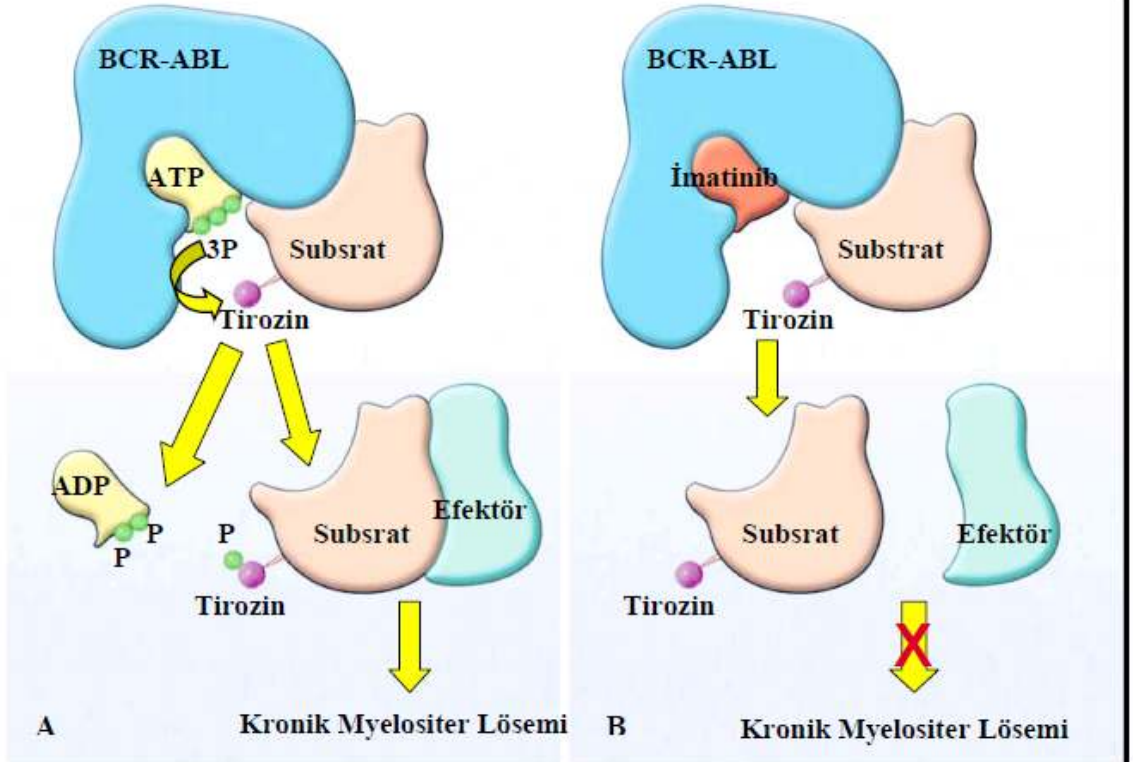
7-) KML hastalarında kemik iliği vaskülaritesinin normalizasyonu (165,166)

8-) KML hastalarında miyelofibroziste azalma (167)

İmatinib, özgün olmayan bir ABL inhibitörüdür. BCR-ABL'de bulunan SH1 kısmı onkojenik dönüşümde başlıca rolü oynamasından dolayı moleküler bir hedefdir. ATP, burada bulunan tirozin kinaz kısmına bağlanır. Araştırmalar izoflavinoid, genistein, ve bir antibiyotik olan herbimisin-A'nın bu katalitik etkiyi antagonize eden doğal ürünler olduğunu ortaya koymuştur. Daha sonraki çabalar adenozin trifosfat (ATP) ile ya da kinaz kısmına bağlanan substrat ile yarışacak kimyasal yapıda sentetik bileşik elde edilmesine yönelik olmuştur. Bu aşamada geliştirilen en başarılı sentetik inhibitör, ATP'ye bağlanarak etki gösteren imatinib (İsviçre, Novartis firması ürünü STI571; Glivec ya da Gleevec) olmuştur (168,169).

İmatinib ABL'nin inaktif ve non-fosforile şekline bağlanır. Abl kinaz parçasının inaktif şekli, imatinib selektivitesi için önemlidir. Her ne kadar aktif protein kinazların katalitik parçaları yapısal olarak çok benzerse de, inaktif kinazların kristal yapılarının dikkate değer ölçüde plastisite gösterdiği bilinmektedir (170,171). Sterik sınırlamalar yüzünden, ABL'nin inaktif şekli, ATP bağlanması için uygun değildir. İmatinib'in BCR-ABL formlarına karşı etkisi, muhtemelen kinaz moleküllerinin dinamik doğasından kaynaklanır. Bu moleküller geçici olarak inaktif ve aktif formları arasında geçiş yaparlar, bu da imatinib'in moleküle bağlanabilmesi için bir olanak oluşturur (172). Protein kinazlar, substrat proteinler üzerinde yerleşik spesifik aa'lere, adenozin trifosfattan (ATP) bir fosfat transfer eden enzimlerdir. Bu proteinlerin fosforilasyonu sonucu çeşitli sinyal iletim yolları aktive olmakta ve hücre büyümesi, farklılaşması, hücre ölümü gibi biyolojik süreçler tetiklenmektedir. BCR-ABL aktivasyon mekanizmasında, mevcut tirozin kinaz aktivitesi

sayesinde, substrat tirozin rezidülerinden birinin fosforilasyonu ile aktive olur ve ardından gelen diğer efektör molekülleri aktive ederek KML oluşumuna yol açan bir dizi basamağın ilerlemesine neden olmaktadır. Diğer yandan ortamda imatinib mevcut olduğunda, imatinib kinaz paketini işgal etmekte, BCR-ABL aktivasyonunu inhibe ederek substratın fosforillenmesini önlemektedir. Bu sayede KML oluşum basamakları bloke edilmiş olur. Şekil 20'de BCR-ABL aktivasyon mekanizması ve bunun imatinib ile inhibisyonu görülmektedir (173).



Şekil-20: BCR-ABL aktivasyon mekanizması ve bunun imatinib ile inhibisyonu. Panel A'da kinaz paketi içerisindeki ATP molekülü ve BCR-ABL onkoproteini izlenmektedir. Substrat tirozin rezidülerinden birini fosforilasyonu ile aktive olur ve ardından gelen diğer efektör molekülleri aktive eder. Ancak imatinib kinaz paketini işgal ettiğinde (Panel B) BCR-ABL aktivasyonu inhibe olur ve substratın fosforillenmesi engellenir.

İmatinib Direnci

KML hastalarının büyük bir bölümü imatinib tedavisine mükemmel yanıt vermekte iken bir miktar hastada optimal veya yeterli cevap elde edilemeyip bir kısım hastada da elde edilmiş olan cevap kaybedilmektedir. Bu durum sırasıyla tedaviye primer ve sekonder direnç olarak yorumlanmaktadır.

Primer direnç, imatinib ile tedavi başlandıktan sonra üç ay içinde tam hematolojik yanıt (THY) sağlanamaması, altı ay içinde sitogenetik yanıtın gözlemlenmemesi ve oniki ay içinde parsiyel sitogenetik yanıtın olmaması şeklinde ifade edilmektedir. Hematolojik yanıtın ve parsiyel sitogenetik yanıtın kaybedilmesi ya da tam sitogenetik yanıtın (TSY) kaybedilmesi ile BCR-ABL'in on kat artması durumunda sekonder dirençten bahsedilir (174,175). İmatinib direncinde başlıca dört mekanizma tanımlanmıştır (174,176 -180).

ABL kinaz bölgesindeki nokta mutasyonlar primer dirençten ziyade özellikle kazanılmış dirençte görülmekte ve KML'nin tüm fazlarında bulunmasına rağmen daha sıklıkla hastalığın geç kronik veya akselere fazında gözlenmektedir. Bunlardan en çok araştırılmış olan ikisi T315I ve F317L mutasyonlarıdır (181 -183).

İmatinibe karşı gelişen direnç mekanizmaları şunlardır;

1) Azalmış intraselüler ilaç düzeyleri

a. Plazmada alfa-1 asid glikoprotein tarafından bağlanması

b. P-glikoprotein (MDR-1) over ekspresyonu nedeniyle ilacın hücreden atılması

2) Genomik amplifikasyon nedeniyle BCR-ABL'nin artmış ekspresyonu

3) Klonal evrimleşme (BCR-ABL bağımsız mekanizmalar)

4) BCR-ABL'nin ABL kinazında mutasyonlar nedeniyle ilaç veya kinaz aktivitesinin etkilenmesi (örn;T315I, F317L, F359V)

Tedaviye Yanıt Tanımları

İmatinib döneminde yapılan KML tedavisinde hastanın hematolojik, sitogenetik, ve moleküler olarak izlenmesinin önemi çok fazladır.

Tam hematolojik yanıt

- Lökosit sayısı < 10.000/μL
- Periferik kanda bazofil < %5
- Periferik kanda miyeloblast, promiyelosit, miyelosit görülmemesi
- Trombosit sayısı < 450.000/μL
- Dalağın ele gelmemesi

Sitogenetik Yanıt

- **Tam sitogenetik yanıt** : Ph + metafazın olmaması
- **Parsiyel sitogenetik yanıt** : Ph + metafaz %1- %35
- **Minör sitogenetik yanıt**: Ph + metafaz %36 - %65
- **Minimal sitogenetik yanıt**: Ph + metafaz %66 - %95
- **Sitogenetik yanıtızsızlık**: > %95 Ph + metafaz

Konvansiyonel sitogenetik incelemede en az 20 metafaz değerlendirilmelidir. Sitogenetik yanıt, konvansiyonel olarak, metafazdaki kemik iliği hücrelerinde kromozom bantlama yöntemleri ile tespit edilebilmektedir. Avrupa Lösemi Ağı protokollerine göre 24 ve 48 saatlik en az iki farklı kültürde, bir örneğe ait kemik iliği hücrelerinde en az 20 Ph pozitif hücre tanımlamak gerekmektedir. Kemik iliğinde metafaz elde edilemediğinde tam sitogenetik yanıt tanımı en az 200 çekirdek skorlaması ile yapılmış interfaz FISH çalışmasına dayanabilir. Majör sitogenetik yanıt tam ve parsiyel sitogenetik yanıtı içerir (Ph + metafaz %0 - %35). Konvansiyonel sitogenetik inceleme ; Ph' dısındaki kromozom anomalilerini de saptar. Sitogenetik yanıt FISH ile değerlendirildiğinde laboratuvarın raporunda belirtilen yanlış pozitiflik oranı dikkate alınmalıdır.

Moleküler Yanıt

Tam moleküler yanıt: RT- PCR veya nested PCR yöntemi kullanıldığında ardışık iki ölçüm ile BCR-ABL kimerik mRNA'sının saptanmaması (10^{-4} duyarlılığında)

Majör moleküler yanıt (MMY): BCR-ABL/ABL oranının uluslararası skalaya göre \leq %0.1 olması*

* “National Comprehensive Cancer Network”‘un (NCCN) V.2 2010 KML kılavuzunda BCR-ABL kimerik mRNA’da başlangıç değerinden 3 log veya daha fazla azalma olması majör moleküler yanıt olarak tanımlanmaktadır (184, 185).

Tedavi Yanıtının İzlenmesi

Hematolojik değerlendirme: Tanı sonrasında tam hematolojik yanıt sağlanana kadar 15 günde bir, daha sonra en az 3 ayda bir veya gerek olduğunda yapılmalıdır.

Sitogenetik değerlendirme: Tanıda, 3. ve 6. ayda, tam sitogenetik yanıt elde edilmesine kadar 6 ayda bir, daha sonra 12 ayda bir (düzenli moleküler takip yapılamıyorsa)

- Tedaviye yanıtsızlık (primer veya sekonder direnç) durumunda her zaman

- Açıklanamayan anemi, lökopeni, trombositopeni gelişiminde her zaman yapılmalıdır.

QRT-PCR ile Moleküler takip: MMY elde edilmesi ve doğrulanmasına kadar 3 ayda bir, daha sonra en az 6 ayda bir yapılmalıdır.

Tablo-4: Erken kronik evredeki hastalarda imatinibe yanıtın değerlendirilmesi (184).

YANIT				
Değerlendirme zamanı(ay)	Optimal	Suboptimal	Yanıtsız	Uyarı
Başlangıç	-	-	-	yüksek risk;KKA/Ph+
3	THY ve minör SY (Ph+ ≤%65)	SY yok (Ph+ > %95)	THY’dan az	-
6	en az PSY(Ph+≤%35)	PSY’dan az (Ph+>%35)	SY yok (Ph+ > %95)	-
12	TSY	PSY (Ph+%1-35)	PSY’dan az (Ph+ > %35)	MMY’dan az
18	MMY	MMY’dan az	TSY’dan az	-
Tedavi sırasında	stabil/MMY↓	MMY kaybı/mutasyonlar€	THY kaybı; TSY kaybı; mutasyonlar€, KKA/Ph+	bcr/abl kopya sayısı ↑; KKA/Ph-

KKA: klonal kromozomal anomali, **KKA/Ph+:** Ph+ hücrelerde ek KKA, **KKA/Ph-:** Ph- hücrelerde KKA **THY:** tam hematolojik yanıt, **PSgY:** parsiyel sitogenetik yanıt, **TSgY:** Tam sitogenetik yanıt, **MMY:** majör moleküler yanıt, **MMY:** BCR/ABL 1/ABL1 ≤ %0.1, **mutasyonlar€:** imatinibe duyarlı BCR-ABL1 kinaz domain mutasyonları, **mutasyonlar%:** imatinibe duyarlılığı düşük BCR-ABL1 kinaz domain mutasyonları

Moleküler mutasyon analizi: Suboptimal yanıt veya yanıtızlık durumunda (Tablo-4) ve diğer tirozin kinaz inhibitörleri veya başka tedavilere geçmeden önce daima bakılmalıdır. Akselere ve blastik evrede başvuran hastalarda mutasyon analizi çalışılması önerilir (Çalışma grubunun ortak görüşü) (184).

KML'de tedavi ve moleküler yanıtın düzenlenmesi, dikkatli planlama stratejileri gerektiren bir süreçtir. Avrupa Lösemi Ağı tarafından tarif edilen suboptimal yanıt tanımı; tanıdan itibaren 6 ay içinde majör sitogenetik yanıtı ulaşmamak (MSY: \leq %35 Ph pozitif hücre) ya da 12.ayda halen tam sitogenetik (%0 Ph pozitif hücre) yanıtı ulaşmamaktır. Bir hasta tam sitogenetik yanıtı ulaştıktan sonra, MRH takibi için sitogenetik değerlendirme yetersiz kalmaktadır. Periferik kandaki BCR-ABL mRNA düzeyleri, ancak PCR ya da kantitatif PCR yöntemleri ile saptanabilecek miktardadır. KML hastalarında, moleküler takip 3 ayda bir yapılmalıdır. Stabil tam sitogenetik yanıtta bulunan bir hasta, daha seyrek olarak (6 ayda bir) izlenebilir (105).

Majör moleküler yanıt kavramı, BCR-ABL transkript düzeyleri standart bir "baseline " ile karşılaştırıldığında (örneğin tanı zamanı BCR-ABL düzeyi) \leq 0.1 (ya da 3 log azalma) olarak tanımlanmaktadır. 18. ayda majör moleküler yanıtı ulaşılammış ise suboptimal yanıtıtan bahsetmek mümkündür. Hasta örneklerinde, BCR-ABL transkriptlerinin tespit edilemediği zaman, tam moleküler yanıtı ulaşılmış olarak kabul edilir. Moleküler ve sitogenetik izlemler arasında korelasyon bulunmaktadır. Şöyle ki BCR-ABL/ABL düzeyindeki %10 (1-log) azalma, majör sitogenetik yanıtı ve %1 (2-log) azalma ise tam sitogenetik yanıtı karşılık gelmektedir (186, 187).

Ph pozitif KML hastalarının, imatinib ile tedavisi sonucu tam sitogenetik yanıtı ulaşma başarısı %65-85 ve majör moleküler yanıtı ulaşma başarısı %40-70 ve remisyonda kalma oranıda %10-40 olarak bildirilmektedir (120, 187-189). Moleküler tanı sadece BCR-ABL transkript düzeylerinin belirlenmesi olarak algılanmamalıdır. İmatinibe yanıtızlık, suboptimal yanıt ve BCR-ABL transkript düzeylerinin artması durumunda ABL genindeki kinaz bölgesi mutasyonlarında değerlendirmeye alınması gerekir (190).

Minimal Rezidüel Hastalık (MRH) lösemi hücrelerine spesifik DNA, RNA ya da antijenlerin taranması ile morfolojik olarak saptanamayan blastların belirleniş i ile minimal rezidüel hastalık (MRH) kavramı doğmuştur. MRD için en sık kullanılan iki metoddan ilki anormal immünofenotiplerin akım sitometrisi ile tespiti, diğeri ise lösemi ile ilişkili moleküler hedefler taranmasıdır (191). Bu iki metodun duyarlılıkları farklıdır: flow sitometri ile %0.01 lösemi hücresi saptanabilirken PCR bazlı analizlerde ise lösemi hücresi saptama duyarlılığı 10^{-4} ile 10^{-6} oranındadır. Bundan dolayı uygulanması daha zor ve daha pahalı olmasına rağmen araştırmacıların büyük çoğunluğu PCR bazlı metodları kullanmaktadır (192, 193). Özellikle kantitatif MRH analizleri ile risk sınıflaması yapılabilmektedir. Tedavi süresince MRH düzeylerinde düzenli düşüş iyi prognozla ilişkili olduğu gibi yüksek seyreden MRH düzeyleri de klinik nüksün habercisidir (194).

Remisyon indüksiyon tedavisinden sonra tam remisyon sağlanan hastalarda rezidüel hastalık %0.01'den daha düşük ise prognozun çok iyi olacağı öngörülebilir. Ancak remisyon indüksiyon sonunda %1'den daha yüksek veya tedavinin sonraki her hangi bir döneminde %0,1'den daha yüksek MRH'da relaps riski oldukça yüksektir. Pui ve ark.'nın (191) remisyon indüksiyon tedavisinden 6 hafta sonraki herhangi bir dönemde blast oranı %0.01'den yüksek ise yoğun kemoterapi önermekte ve bu tedavi değışiminin tedavi başarısını artırdığını bildirmektedir (194).

Sitogenetik ve moleküler analizlerin karşılaştırmalı olarak kullanıldığı, kronik fazdaki KML hastalarında yapılan çalışmalarda, majör moleküler yanıt ulaşılmış hastaların ancak %50'sinde sitogenetik analizlerin, MRH değerlendirmede kullanılabildiği görölmektedir. Sadece kemik iliği aspirasyon örnekleri ve rutin sitogenetik yöntemler ile takip edilen hastaların, majör moleküler yanıt ulaşamadıkları ya da majör moleküler yanıtı yitirdikleri görölmektedir (195). Moleküler analizler, hasta KML tanısı aldığı andan itibaren uygulanabilir. Tanı anında hastaların büyük bir çoğunluğu yüksek p210 BCR-ABL transkript düzeylerine sahiptir. Eğer p210 transkripti tespit edilemezse diğer transkriptler (p190 ve p230) aranmalıdır. İmatinib ile tedavi edilen KML hastalarında majör moleküler yanıt ulaşmak tedavinin başarısı

açısından önemlidir. Moleküler takip sonucu BCR-ABL düzeylerinin düşük bulunması iyi prognostik göstergedir. Major moleküler yanıtı ulaşmak, hastaların %50'den fazlasında tam sitogenetik yanıtı ve hastalıksız sağkalıma işaret etmektedir (106, 187). Rutin moleküler izlem ile allogeneik kök hücre nakli sonrasında gelişebilecek erken nüks de saptanabilir. Allogeneik kök hücre nakli sonrası moleküler takip, tam sitogenetik yanıtı sahip hastalarda, erken relapsı tespit için önemlidir. BCR-ABL/ABL düzeyleri belirli bir seviyenin altında kalan, Ph pozitif değerlere sahip hastalar, moleküler nüks geliştirmemektedirler. Buna rağmen ısrarlı ve devamlı olarak, düşük seviyede BCR-ABL transkripti saptanan hastalar, nüks riski en fazla olan hastalardır ve yakın takip gerektirirler (195).

Bu retrospektif çalışmada amacımız, tanı ve takip KML hastalarında, FISH ve QRT-PCR analiz sonuçlarının "sensitivite" ve klinik yararlılık açısından olası korelasyonları ve hastalığın seyri karşılaştırılarak literatürlere katkı sunulması amaçlanmaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalında 2007 -2008 yılları arasında KML tanısı alan ve/veya KML tanısı ile takip edilen 78 hastaya ait toplam 135 kemik iliği ve/veya periferik kan materyallerine ait FISH ve QRT-PCR analiz sonuçları retrospektif olarak değerlendirildi. Aynı zamanda hastalara yapılan genetik analizlerin uygulama ve analiz çalışmalarına katıldı. Çalışma protokolü Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (Onay Tarihi: 04 Kasım 2008, Karar No: 2008-18/18, Değişiklik Tarihi: 20 Temmuz 2010, Karar No: 2010-5/18). Hastalardan kemik iliği ve periferik kan örnekleri moleküler sitogenetik ve moleküler analizler için eş zamanlı elde edildi. Hastalar çalışmaya dahil edildikleri zaman FISH ve QRT-PCR analiz yöntemlerinden en az biri ile Ph kromozomu ve BCR-ABL kopyası pozitif idi. Takip hastalarının tümü imatinib mesilat tedavisi almaktaydı. Yapılan retrospektif incelemede, hastaların yaşı, cinsiyeti, beyaz küre sayısı, tanı ya da takip hastası olması, hastalığın klinik fazı, materyal tipi, FISH yöntemi rapor sonucu ve QRT-PCR yöntemi rapor sonucu bilgileri değerlendirildi.

Hastaların tedaviye yanıtları “National Comprehensive Cancer Network” un klinik pratik klavuzuna göre değerlendirildi. Sitogenetik yanıt Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Moleküler Sitogenetik laboratuvarında Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) yöntemi kullanılarak belirlendi. Bu yöntem için Abbott Vysis LSI BCR/ABL translokasyon tespit probu (Translocation® Illinois USA prob) kullanıldı. Sitogenetik yanıt “Break point cluster region/ Abelson murine leukemia” (BCR/ABL) pozitif interfazların yüzdesine göre hesaplandı.

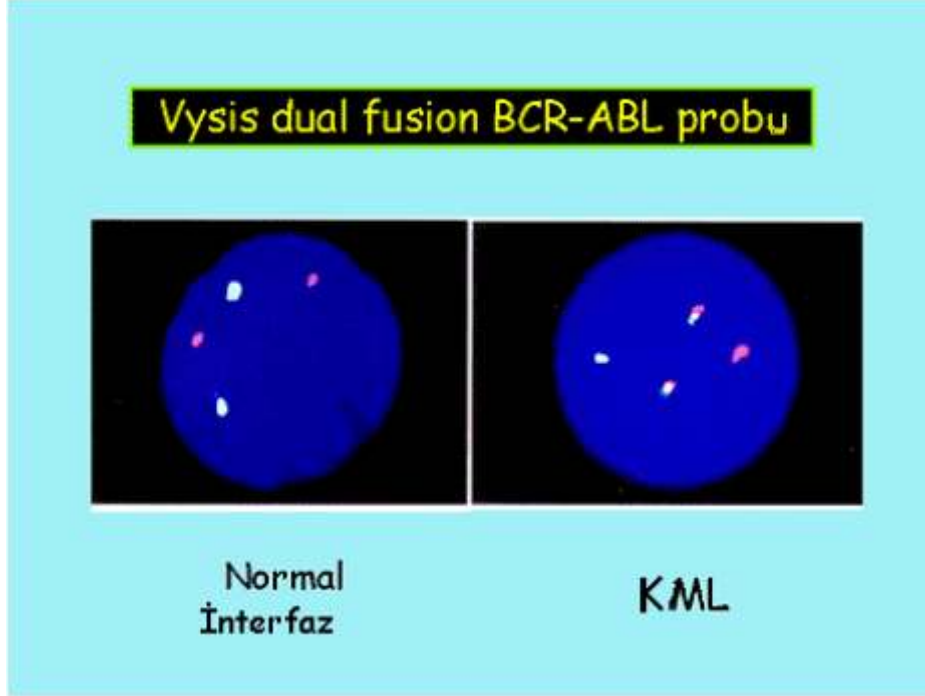
FISH protokolü

Bu teknikte; 9. ve 22. kromozomlardan sırasıyla floresan filtrelerinden alınan yeşil ve kırmızı (orange) renkli sinyaller ve derivatif kromozom 9 ve

derivatif kromozom 22'den (Philadelphia kromozom) gelen yeşil ve kırmızı renkli sinyallerin kaynaşmasıyla sarı (S) renkte bir füzyon sinyal oluşmaktadır. Birleşmiş kırmızı ve yeşil sinyaller bir veya iki sarı füzyon şeklinde görüldüğünde BCR/ABL yeni düzenlemeleri için pozitif olarak değerlendirilmektedir.

Heparinle yıkanmış enjektöre alınan hasta materyalinden (periferik kan veya kemik iliği) 1-2 cc alınarak "Cell Star" marka 12 ml'lik hücre kültür tüpüne konur. Üzerine 0.075 Molarlık 5 cc KCL solüsyonu eklenir. "Nüve EN 200" marka inkübatörde 20 dk 37°C'de bekletilir. "Hettich" marka santrifüjde 2000 devirde 10 dk çevrildikten sonra süpernatant kısmı atılır. Üzerine 1/3 oranındaki asetik asit/metanol solüsyonu eklenerek santrifüj edilir ve süpernatant kısmı atılır. Bu fiksasyon işlemi en az 2 kez daha tekrar edilir. Böylelikle interfaz aşamasında hücre elde edilmiş olunur. Hücreler önceden yıkanıp kurulanmış olan temiz lamlara yayılır. Hasta materyali yayılmış olan lamlar kuruduktan sonra 5 dk oda ısısındaki PBS Solüsyonunda bekletilir. Ardından sıcaklığı 37°C'ye ayarlanmış "Nüve ST 402" marka su banyosunun içine önceden koymuş olduğumuz 2XSSC solüsyonunun içerisine alınarak 30 dk bekletilir. 30 dk dolduktan sonra 37°C'deki pepsin çalışma solüsyonuna alınarak 10 dk bekletilir. Ardından oda ısısındaki PBS Solüsyonuna alınarak 5 dk bekletilir. Sonrasında formaldehit eklenmiş PBS Solüsyonuna konarak 7 dk bekletilir. Süre dolduktan sonra tekrar PBS solüsyonuna alınan lamlar 5 dk daha burada bekletildikten sonra sırasıyla %70, %80 ve %100'lük alkol serilerinden geçirilerek kurumaya bırakılır. Kuruyan lamların üzerine ilgili prob (BCR/ABL Loküs spesifik) konduktan sonra lamel ile kapatılıp kenarları yapıştırılır. Lamlar 'Vysis' marka Hybrite üzerine konarak 73°C'de 8 dk denatürasyon ve sonrasında 1 gece boyunca 39°C'de hibridizasyona bırakılır. 1 gece beklendikten sonra lamların üzerindeki lameller kaldırılır ve 73°C'deki Solüsyon-1'de 10 dk bekletilir. Süre bitiminde oda sıcaklığındaki Solüsyon-2'ye alınarak 2 dk bekletilir ve sırasıyla %70, %80 ve %100'lük alkol serilerinden geçirilerek kurumaya bırakılır. Kuruyan lamların üzerlerine DAPI solüsyonu konularak büyük boy lamel ile kapatılır ve Olympus BX 51 marka floresan mikroskopta incelenir. Her bir hastadan 200 interfaz hücresi

incelenerek elde edilen sonuçlar % olarak verildi. FISH analizinde cut-off değeri %5 olarak kabul edildi (Şekil-21).



Şekil-21: FISH yöntemi ile hazırlanmış normal ve KML interfaz görüntüleri.

Moleküler İnceleme Prosedürü

Vakalarda BCR/ABL füzyon geninin p210 transkriptinin varlığı ve transkript oranının belirlenmesi amacıyla gönderilen kemik iliği veya periferik kan materyallerinden RNA izolasyonu yapılmakta ve daha sonra cDNA'ya çevrilmektedir. QRT-PCR ile karşılaştırmalı analiz sonucu elde edilmektedir. Moleküler incelemeler Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Moleküler Laboratuvarında yapıldı.

RNA İzolasyonu

Messenger RNA (mRNA) veya total RNA izolasyonu EDTA'lı tüplere alınan kan ve kemik iliği hücrelerinden RNA izolasyonu özelliğine sahip kit (QIAamp RNA Blood Mini Kit) kullanılarak gerçekleştirildi.

1. Bir hacim kan (maks. 1,5 ml) üzerine 5 hacim buffer EL eklenir.

2. Buz üzerinde 10-15 dk bekletilir, arada 2 kez hafifçe vortekslenir. Kan geçirgen görünmüyorsa 20 dakikaya uzatılabilir.
3. 400 g'de 10 dk 4°C'de santrifüj edilir, süpernatant tamamen alınır. Pellet beyaz küreleri içerir, hafif pembe renkliyse bir sonraki yıkamada geçecektir.
4. 2 hacim Buffer EL eklenir, hafifçe vortekslenir. Pellet kırmızı görünüyorsa 5-10 dk buzda bekletilir.
5. 400 g'de 10 dk 4°C'de santrifüj edilir, süpernatant tamamen alınır. Kalan sıvı cam pipetle toplanır.
6. Aşağıdaki oranlara göre Buffer RLT eklenir. Lizat tamamen homojen olmalıdır, parçacıklar varsa karıştırılır.

Buffer RLT (µl)	Kan Miktarı (ml)	Lökosit sayısı
350	≤ 0,5	≤ 2x10 ⁶
600	0,5-1,5	2x10 ⁶ -1x10 ⁷

7. QIAshredder (lila) kolona lizat tek seferde yüklenir, 2 dk 13.000 rpm'de santrifüj edilir, kolon atılıp lizat saklanır. Lizat çok yoğunsa ikiye ayrılır ve Buffer RLT ile hacimleri 600 µl'ye tamamlanır, yeni QIAshredder kolonlardan geçirilir.
8. Santrifüj sonrası alt tüpte kalan lizat üzerine buffer RLT miktarı kadar (350/600 µl) %70 EtOH eklenir ve pipetle karıştırılır. Presipitat oluşabilir bu da kolona yüklenir.
9. QIAamp (beyaz) spin kolonun ortasına dikkatlice yüklenir, 15 sn 10.000 rpm'de santrifüj edilir. Hacim 700 µl'yi geçerse aynı kolona tekrar yüklenir.
10. Kolon yeni bir 2 ml tüpe alınır, 700 µl Buffer RWI, 15sn 10.000 rpm'de santrifüj edilir.
11. Kolon yeni bir 2 ml tüpe alınır, 500 µl Buffer RPE, 15 sn 10.000 rpm'de santrifüj edilir. Santrifüjden çıkartılırken dikkatli olunur.
12. Buffer RPE, 500 µl eklenir, 13.000 rpm'de 3 dk santrifüj edilir.

13. Yeni bir 2 ml tüpe alınır, 13000 de 1 dk santrifüj edilir.
14. QIAamp spin kolon eppendorf tüpe aktarılır, 40 µl RNase free-water ortaya gelecek şekilde eklenir, 1 dk 10.000 rpm'de santrifüj edilir.
15. Başlangıçta 0,5 ml'den fazla kan kullanıldıysa işlem tekrarlanır.

cDNA Eldesi (IPSOGEN RT-Dx Yapımı)

Kit içeriği (RNase inhibitör ve MMLV dışında) buz üzerinde çözülür. Hafifçe vortekslenip kısaca santrifüj (HERMLE 2300 K) edilir. RNase inhibitör ve MMLV kullanılacağı zaman buz üzerine çıkartılır. RNA örnekleri (1-8 µl) 65°C'de 5 dk inkübasyondan sonra buz üzerine alınır, mix hazırlanıp RNA örneklerinin üzerine dağıtılır.

Miks Hazırlanışı

- 5x Revers Transkriptaz Buffer (5 µl)x örnek sayısı
- dNTP (2,5 µl)x örnek sayısı
- Random Nonamer (5,25 µl)x örnek sayısı
- RNase İnhibitör (0,5 µl)x örnek sayısı,
- Revers transkriptaz (0,5µl) x örnek sayısı
- H2O (3,25µl)x örnek sayısı olacak şekilde miks hazırlanır ve RNA örneklerinin üzerine dağıtılır. 42°C 60 dk, 85°C 5dk, 8°C sonsuz olacak şekilde PCR (GeneAmp® PCR System 9700) reaksiyonu gerçekleştirilir ve -20°C'de kullanıma kadar saklanabilir.

QRT-PCR Yapılışı

İpsogen PCR kiti kullanılarak miks hazırlanır. 2Xmiks (12,5µl) x örnek sayısı, Primer-probe miks(1µl)xörnek sayısı, H2O (6,5µl)x örnek sayısı olacak şekilde miks hazırlanır ve PCR tüplerine dağıtılır. Hasta örnekleri, H2O(NTC), standart kontrol genler ve standart füzyon genler 5 µl olmak üzere hazırlanan PCR tüplerine dağıtılır. 50°C 2 dk, 95°C 10 dk, 95°C 15 sn, 60°C 1dk (50 siklus) olacak şekilde QRT-PCR yapılır (Corbett marka RG 6000RO40739).

QRT-PCR Analizi

Elde edilen, BCR-ABL füzyon gen transkriptleri, ABL kontrol gen transkriptleri miktarına oranlanmakta ve transkriptin ekspresyon oranı

belirlenmektedir. Bu oran belirlenirken kontrol gen kopya sayısı 10^{-3} 'ün altında olan hastaların analizi yapılmamakta ve PCR testi tekrar edilmektedir.

İstatistiksel Analiz

Çalışmanın analizleri SPSS 13.0 (Chicago, IL.) programında yapılmıştır. QRT-PCR yüzdesi, FISH yüzdesi ve beyaz küre sayısı ortalama, standart sapma, medyan, minimum ve maksimum değerleri ile birlikte verilmiştir. Yeni tanı hastalarının FISH ve QRT-PCR yöntemi analiz sonuçları ile takip hastalarının FISH ve QRT-PCR yöntemi analiz sonuçları arasında, FISH değerlerine göre yapılan sitogenetik yanıt gruplarına ait QRT-PCR değerleri arasında, yeni tanı ve takip hastalarında kemik iliği kullanılarak elde edilen FISH ve QRT-PCR yöntemi analiz sonuçları ile periferik kan kullanılarak elde edilen FISH ve QRT-PCR yöntemi analiz sonuçları arasında, FISH değerlerine göre yapılan sitogenetik yanıt gruplarına ait beyaz küre sayıları arasında istatistiksel analiz yapılmıştır. İlgili değişkenlerin, FISH grupları arasında yapılan karşılaştırmalarında Kruskal Wallis, tanı grupları ve materyal tipi grupları arasında yapılan karşılaştırmalarda ve yine FISH gruplarına ait alt grup analizlerde grupların ikili karşılaştırmalarında Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Çalışmada $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Çalışmaya Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalında Kronik Miyelositer Lösemi (KML) tanısı almış ve/veya takip edilmekte olan toplam 78 hasta dahil edilmiştir. FISH yöntemi veya QRT-PCR yöntemi ile elde edilen test sonuçlarından en az biri t(9;22)(q34;q11) pozitif olan takip hastaları çalışmaya alınmıştır. Yetmiş sekiz hastaya ait 135 materyal sonucu değerlendirilmiştir. Değerlendirilen 135 materyalin 118'i (%87,4) kemik iliği, 17'si (%12,6) periferik kan idi. Yüz otuz beş materyalden 21'i (%15,6) yeni tanı, 114'ü (%84,4) takip hastalarına ait test sonuçları idi. İncelenen 135 materyalin 131'i (%97) kronik fazdaki , 2'si (%1,5) akselere fazdaki , 2'si (%1,5) blastik fazdaki hasta örneklerine aitti. Çalışmada değerlendirmeye alınan toplam 21 yeni tanı hastasının 11'i erkek (%52,4), 10'u (%47,6) kadındı. Çalışmada değerlendirmeye alınan toplam 21 yeni tanı hastasının yaşları 13-81 arasında değişmekte olup ortalama yaş $49,33 \pm 18,82$ SS (standart sapma) idi. Yirmi bir yeni tanı hastasından 1 hastaya ait beyaz küre sayısı yoktu. Yirmi yeni tanı hastasına ait beyaz küre sayısı 19800-518000 /mm³ arasında değişmekte olup ortalama beyaz küre sayısı 145115 ± 130794 SS/mm³ 'tü.

Hastaların FISH yöntemi ve RT-PCR yöntemi ile elde edilen sonuçları Tablo-5'de belirtilmektedir.

Tablo-5: Hastaların yaş, cinsiyet, beyaz küre sayısı, materyal tipi, hastalık klinik seyri, hastalık fazı, FISH ve QRT-PCR yöntemlerinin sonuçları.

HASTA NO	MATERYAL TİPİ	YAŞ	CİNSİYET	KLİNİK DURUMU	BEYAZ KÜRE SAYISI /mm ³	FISH (%)	QRT-PCR (%)	HASTALIK FAZI
1	Kİ	43	E	TAKİP	5680	0	0,8	KRONİK FAZ
1	PK	43	E	TAKİP	6690	0	0,23	KRONİK FAZ
2	Kİ	46	E	TAKİP	6210	0	6,8	KRONİK FAZ
2	Kİ	46	E	TAKİP	6770	0	1,18	KRONİK FAZ
3	Kİ	66	E	TAKİP	4400	0	2,7	KRONİK FAZ
4	PK	48	E	YENİ TANI	25700	96	0,19	KRONİK FAZ
5	Kİ	39	E	YENİ TANI	244000	98	218	KRONİK FAZ
6	Kİ	48	K	TAKİP	4830	0	5,4	KRONİK FAZ
7	Kİ	32	K	YENİ TANI	42800	98	1817	KRONİK FAZ
8	Kİ	62	K	TAKİP	4500	0	1	KRONİK FAZ
9	Kİ	69	K	YENİ TANI	19800	96	201	KRONİK FAZ
10	Kİ	65	K	TAKİP	10800	97	1178	KRONİK FAZ
10	Kİ	65	K	TAKİP	8240	7	288	KRONİK FAZ
11	Kİ	60	E	TAKİP	7000	3	35	KRONİK FAZ
11	Kİ	60	E	TAKİP		0	29	KRONİK FAZ
11	Kİ	61	E	TAKİP	7920	0	1,5	KRONİK FAZ
12	Kİ	49	K	TAKİP	5770	0	1,6	KRONİK FAZ
13	Kİ	42	K	TAKİP	7700	87	140	KRONİK FAZ
14	Kİ	35	E	YENİ TANI	47000	100	1414	KRONİK FAZ
15	Kİ	46	K	YENİ TANI	205000	96	457	KRONİK FAZ
15	Kİ	47	K	TAKİP	5700	0	2,7	KRONİK FAZ
16	Kİ	59	E	TAKİP		0	256	AKSELERE FAZ
17	Kİ	34	K	TAKİP	6000	0	2,61	KRONİK FAZ
17	Kİ	35	K	TAKİP	7100	0	0,7	KRONİK FAZ
17	Kİ	35	K	TAKİP	4600	0	0,24	KRONİK FAZ
18	Kİ	13	E	YENİ TANI	386000	98	275	KRONİK FAZ
18	PK	14	E	TAKİP	7000	0	7	KRONİK FAZ

19	PK	53	K	TAKİP	23900	97	731	AKSELER E FAZ
20	Kİ	64	K	TAKİP	6910	0	13,7	KRONİK FAZ
21	Kİ	57	K	YENİ TANI	93400	100	1372	KRONİK FAZ
22	Kİ	29	K	YENİ TANI		100	358	KRONİK FAZ
22	Kİ	29	K	TAKİP		49	131	KRONİK FAZ
22	Kİ	30	K	TAKİP		0	2	KRONİK FAZ
22	Kİ	30	K	TAKİP		0	2	KRONİK FAZ
23	Kİ	62	K	TAKİP	7290	4	0	KRONİK FAZ
23	Kİ	63	K	TAKİP	6110	0	0,34	KRONİK FAZ
23	Kİ	63	K	TAKİP	7090	0	0	KRONİK FAZ
24	PK	29	E	TAKİP	20570	84	231	KRONİK FAZ
24	PK	29	E	TAKİP		38	72	KRONİK FAZ
24	PK	29	E	TAKİP	4000	10	202	KRONİK FAZ
25	Kİ	56	E	TAKİP	5160	0	1,13	KRONİK FAZ
25	Kİ	56	E	TAKİP	4760	0	0,07	KRONİK FAZ
26	Kİ	58	E	TAKİP	4750	0	1,22	KRONİK FAZ
27	Kİ	28	K	TAKİP	4000	24	478	KRONİK FAZ
27	Kİ	28	K	TAKİP		4	10,2	KRONİK FAZ
27	Kİ	28	K	TAKİP	6040	0	6,76	KRONİK FAZ
28	PK	72	K	YENİ TANI	33900	92	382	KRONİK FAZ
29	Kİ	70	K	TAKİP	4000	0	0,9	KRONİK FAZ
30	Kİ	43	E	TAKİP	9790	92	239	KRONİK FAZ
30	Kİ	44	E	TAKİP	6570	76	198	KRONİK FAZ
30	Kİ	44	E	TAKİP	7340	82	22	KRONİK FAZ
31	PK	52	E	YENİ TANI	518000	100	206	KRONİK FAZ
31	Kİ	53	E	TAKİP	6210	74	107	KRONİK FAZ
31	Kİ	53	E	TAKİP	25200	0	10,9	KRONİK FAZ
32	Kİ	63	E	YENİ TANI	136400	96	1325	KRONİK FAZ
33	Kİ	73	K	TAKİP	6290	90	341	KRONİK FAZ
34	Kİ	38	E	TAKİP	4570	0	0,13	KRONİK FAZ
35	Kİ	82	E	TAKİP	112000	94	271	KRONİK FAZ

36	PK	64	E	YENİ TANI	31200	98	1197	KRONİK FAZ
36	Kİ	65	E	TAKİP	6400	8	9	KRONİK FAZ
36	Kİ	65	E	TAKİP	3590	0	0,3	KRONİK FAZ
36	Kİ	65	E	TAKİP	54300	0	2	KRONİK FAZ
37	Kİ	60	E	TAKİP	6450	0	0,39	KRONİK FAZ
38	Kİ	30	E	TAKİP	5000	0	8,8	KRONİK FAZ
39	Kİ	51	K	TAKİP	8430	0	0,18	KRONİK FAZ
40	Kİ	46	K	TAKİP	7590	0	0,03	KRONİK FAZ
41	Kİ	45	K	TAKİP		0	0,5	KRONİK FAZ
41	Kİ	46	K	TAKİP	3900	0	0,36	KRONİK FAZ
42	Kİ	53	E	YENİ TANI	145000	100	1683	KRONİK FAZ
42	Kİ	54	E	TAKİP	10400	94	4322	KRONİK FAZ
43	Kİ	56	E	TAKİP	8940	43	114	KRONİK FAZ
43	Kİ	56	E	TAKİP	6450	0	11	KRONİK FAZ
44	Kİ	67	E	TAKİP	5020	0	36,1	KRONİK FAZ
44	Kİ	67	E	TAKİP	4040	0	0,37	KRONİK FAZ
45	Kİ	73	E	TAKİP	14800	0	0,386	KRONİK FAZ
45	Kİ	74	E	TAKİP	41600	0	0	KRONİK FAZ
46	Kİ	61	E	TAKİP	5100	0	0,68	KRONİK FAZ
47	Kİ	28	K	TAKİP	4000	46	449	KRONİK FAZ
47	Kİ	28	K	TAKİP	10000	16	211	KRONİK FAZ
48	Kİ	46	E	TAKİP	5640	46	363	KRONİK FAZ
48	Kİ	47	E	TAKİP		36	372	KRONİK FAZ
48	Kİ	47	E	TAKİP	5400	68	270	KRONİK FAZ
48	Kİ	47	E	TAKİP		60	111	KRONİK FAZ
49	Kİ	52	K	TAKİP	7090	0	0,0122	KRONİK FAZ
50	Kİ	74	E	TAKİP	9800	52	132	KRONİK FAZ
50	Kİ	75	E	TAKİP	4980	0	5,1	KRONİK FAZ
50	Kİ	75	E	TAKİP	7960	0	1,35	KRONİK FAZ
51	Kİ	81	K	YENİ TANI	131000	100	1590	KRONİK FAZ
51	PK	81	K	TAKİP	3100	41	1377	KRONİK FAZ

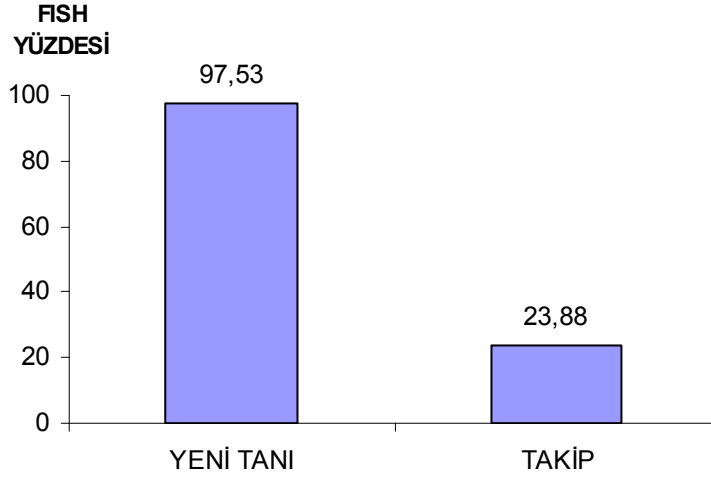
52	Kİ	32	K	TAKİP	7600	0	0,3	KRONİK FAZ
53	Kİ	63	K	TAKİP	233000	100	142	KRONİK FAZ
53	Kİ	64	K	TAKİP	5650	92	204	KRONİK FAZ
53	Kİ	64	K	TAKİP	7300	90	578,3	KRONİK FAZ
54	Kİ	75	E	TAKİP	3600	0	40	KRONİK FAZ
55	Kİ	54	E	TAKİP	4000	0	1,36	KRONİK FAZ
56	Kİ	55	K	TAKİP	4300	0	0	KRONİK FAZ
56	Kİ	56	K	TAKİP	3360	0	1,8	KRONİK FAZ
57	Kİ	63	E	TAKİP	5000	32	209	KRONİK FAZ
57	Kİ	63	E	TAKİP	6300	22	119	KRONİK FAZ
57	Kİ	63	E	TAKİP	4270	0	4,3	KRONİK FAZ
58	Kİ	48	K	TAKİP	3700	30	118	KRONİK FAZ
58	Kİ	48	K	TAKİP	5800	18	102	KRONİK FAZ
59	Kİ	62	K	TAKİP	5080	96	697	KRONİK FAZ
60	Kİ	65	K	TAKİP	2520	86	76	KRONİK FAZ
60	Kİ	65	K	TAKİP		70	50	KRONİK FAZ
61	Kİ	27	K	TAKİP		0	0,0048	KRONİK FAZ
61	Kİ	28	K	TAKİP	7700	0	0,07	KRONİK FAZ
62	Kİ	32	E	YENİ TANI	104000	100	233	KRONİK FAZ
62	Kİ	33	E	TAKİP	69600	88	442	BLASTİK FAZ
63	PK	53	K	YENİ TANI	121.00	95	670	KRONİK FAZ
64	Kİ	28	E	TAKİP	7600	0	5,8	KRONİK FAZ
65	Kİ	37	K	TAKİP	3080	23	854	KRONİK FAZ
65	Kİ	37	K	TAKİP		8	116	KRONİK FAZ
65	Kİ	37	K	TAKİP	4000	0	137	KRONİK FAZ
66	Kİ	33	K	TAKİP	5320	27	11	KRONİK FAZ
66	Kİ	34	K	TAKİP	5020	0	0,42	KRONİK FAZ
66	Kİ	34	K	TAKİP		0	0,5	KRONİK FAZ
67	Kİ	67	K	TAKİP	800	58	81	KRONİK FAZ
68	PK	47	K	TAKİP	3920	0	30,9	KRONİK FAZ
69	Kİ	26	E	TAKİP	112000	92	607	BLASTİK FAZ

70	PK	17	K	YENİ TANI	225000	88	576	KRONİK FAZ
70	PK	17	K	TAKİP	4960	68	68	KRONİK FAZ
70	PK	17	K	TAKİP	4510	0	1	KRONİK FAZ
71	Kİ	55	E	YENİ TANI	264000	100	1108	KRONİK FAZ
71	Kİ	55	E	TAKİP	5440	68	775	KRONİK FAZ
71	Kİ	55	E	TAKİP	6200	0	41,6	KRONİK FAZ
72	Kİ	61	E	TAKİP	80000	92	265	KRONİK FAZ
73	Kİ	65	K	TAKİP	7490	0	0,7	KRONİK FAZ
74	Kİ	42	K	TAKİP		0	0,1	KRONİK FAZ
75	Kİ	47	E	TAKİP	8260	0	1,16	KRONİK FAZ
76	Kİ	80	E	YENİ TANI	80100	97	848	KRONİK FAZ
77	PK	46	K	YENİ TANI	49000	100	252	KRONİK FAZ
77	Kİ	46	K	TAKİP	5820	0	5,5	KRONİK FAZ
77	Kİ	46	K	TAKİP	4000	0	0	KRONİK FAZ
78	Kİ	52	K	TAKİP	7260	40	432	KRONİK FAZ

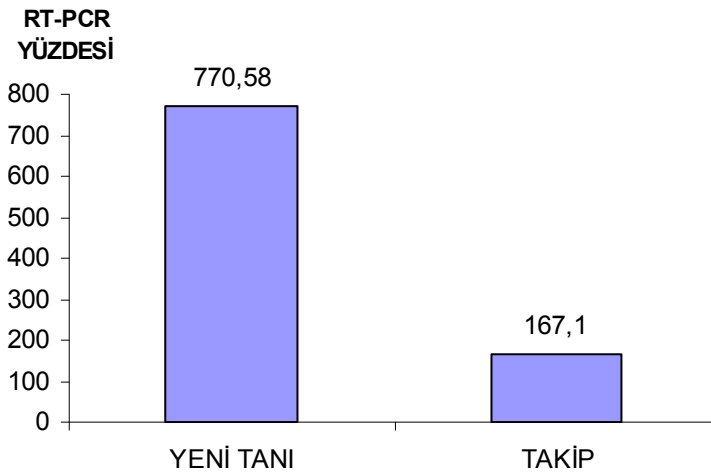
PK: Periferik Kan, **Kİ:** Kemik İliği, **K:** Kadın, **E:** Erkek, **0:** Negatif

Yirmi bir yeni tanı hastasının FISH yöntemi ile elde edilen t(9;22)(q34;q11) pozitiflik yüzdesi 88-100 arasında değişmekte olup ortalama yüzde 97,524±3,108 SS'dır. Yirmi bir yeni tanı hastasının QRT-PCR yöntemi ile elde edilen t(9;22)(q34;q11) pozitiflik yüzdesi 0,19-1817 arasında değişmekte olup ortalama yüzdesi 770,581±582,957 SS'dır. Takip hastalarına ait 114 materyalin FISH yöntemi ile elde edilen t(9;22)(q34;q11) pozitiflik yüzdesi 0-100 arasında değişmekte olup ortalama yüzde 23,877±34,768 SS dır. Takip hastalarına ait 114 materyalin QRT-PCR yöntemi ile elde edilen t(9;22)(q34;q11) pozitiflik yüzdesi 0-4322 arasında değişmekte olup ortalama yüzde 167,098±460,214 SS dır. Yeni tanı hastalarının FISH ve QRT-PCR yöntemleri ile elde edilen t(9;22)(q34;q11) pozitiflik yüzdeleri ile takip hastalarının FISH ve QRT-PCR yöntemleri ile elde edilen t(9;22)(q34;q11) pozitiflik yüzdeleri arasında anlamlı farklılık bulunmuştur. (p<0,001).

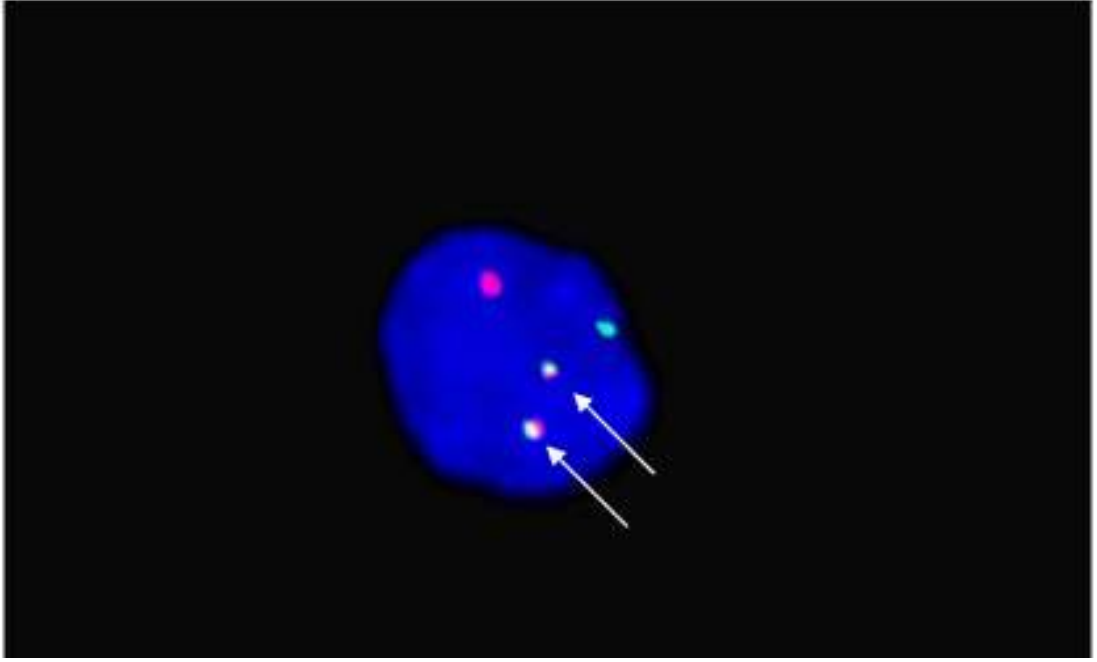
Yüz otuz beş materyalin yeni tanı ve takip değerlerine göre FISH ve QRT-PCR yöntemi ile elde edilen t(9;22)(q34;q11) pozitiflik yüzdesi dağılımı aşağıda görülmektedir (Şekil-22,23).



Şekil-22: Yeni tanı ve takip hastalarının FISH yöntemi ile elde edilen t(9;22)(q34;q11) pozitiflik yüzde ortalamaları.



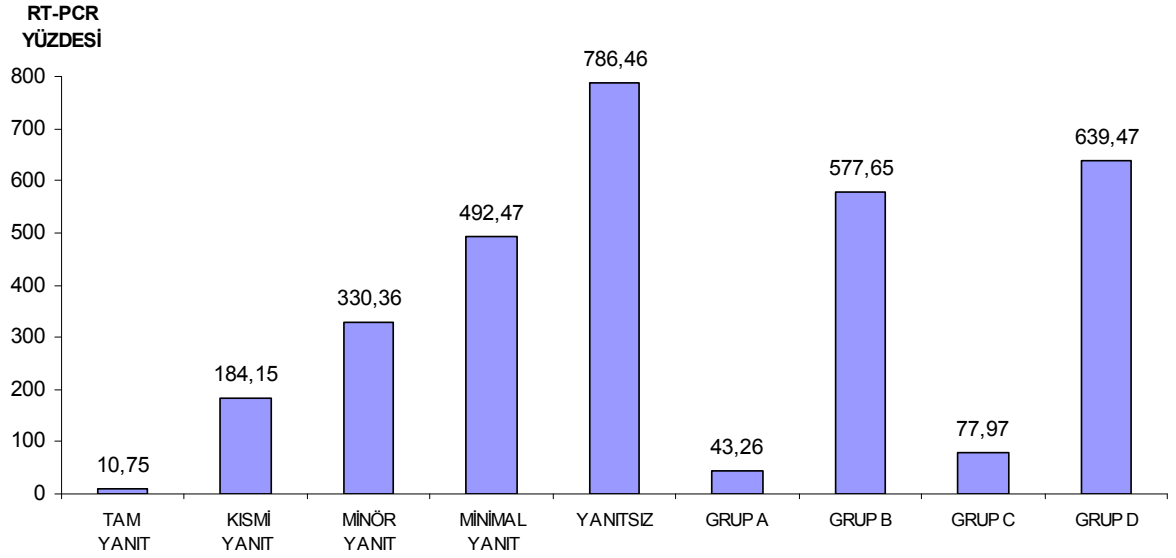
Şekil-23: Yeni tanı ve takip hastalarının QRT-PCR yöntemi ile elde edilen t(9;22)(q34;q11) pozitiflik yüzde ortalamaları.



Şekil-24: KML tanılı bir olguya ilişkin Ph pozitif interfaz FISH görüntüsü.

135 materyalin FISH yöntemi ile elde edilen t(9;22)(q34;q11) pozitiflik yüzde değerine göre %48,1'i tam yanıt, %11,1'i kısmi yanıt, %8,1'i minör yanıt, %16,3'ü minimal yanıt, %16,3'ü yanıtız grubtadır. FISH yöntemine göre tam yanıt grubunda yer alan hasta sonuçlarının QRT-PCR yöntemi ile elde edilen pozitiflik yüzdesi 0-256 arasında olup ortalama yüzdesi $10,749 \pm 36,242$ SS dir. FISH yöntemine göre kısmi yanıt grubunda yer alan hasta sonuçlarının QRT-PCR yöntemi ile elde edilen pozitiflik yüzdesi 0-854 arasında olup ortalama yüzdesi $184,147 \pm 225,922$ SS dir. FISH yöntemine göre minör yanıt grubunda yer alan hasta sonuçlarının QRT-PCR yöntemi ile elde edilen pozitiflik yüzdesi 72-1377 arasında olup ortalama yüzdesi $330,363 \pm 377,573$ SS dir. FISH yöntemine göre minimal yanıt grubunda yer alan hasta sonuçlarının QRT-PCR yöntemi ile elde edilen pozitiflik yüzdesi 22- 4322 arasında olup ortalama yüzdesi $492,468 \pm 882,048$ SS dir. FISH yöntemine göre yanıtız grubunda yer alan hasta sonuçlarının QRT-PCR yöntemi ile elde edilen pozitiflik yüzdesi 0,19-1817 arasında olup ortalama yüzdesi $786,463 \pm 583,925$ SS dir. Bu 5 grup (tam yanıt, kısmi yanıt, minör yanıt, minimal yanıt, yanıtız) arasında da QRT-PCR yüzdeleri açısından anlamlı farklılık bulunmuştur ($p < 0,001$). 5 gruba kendi arasında ikili

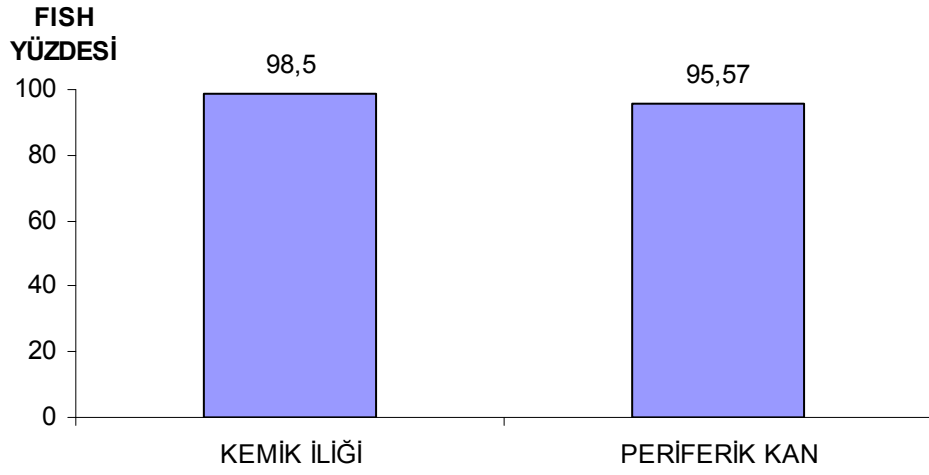
karşılaştırma yapıldığında QRT-PCR yöntemi ile elde edilen pozitiflik yüzdeleri açısından tam yanıt grubu ile kısmi yanıt grubu arasında, tam yanıt grubu ile minör yanıt grubu arasında, tam yanıt grubu ile minimal yanıt grubu arasında, tam yanıt grubu ile yanıtız grubu arasında, kısmi yanıt grubu ile yanıtız grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır ($p < 0,01$). QRT-PCR yöntemi ile elde edilen pozitiflik yüzdeleri açısından kısmi yanıt grubu ile minimal yanıt grubu arasında anlamlı farklılık bulunmuştur ($p = 0,026$). QRT-PCR yöntemi ile elde edilen pozitiflik yüzdeleri açısından minör yanıt grubu ile yanıtız grubu arasında anlamlı farklılık bulunmuştur ($p = 0,019$). QRT-PCR yöntemi ile elde edilen pozitiflik yüzdeleri açısından minimal yanıt grubu ile yanıtız grubu arasında anlamlı farklılık bulunmuştur ($p = 0,002$). QRT-PCR yöntemi ile elde edilen pozitiflik yüzdeleri açısından kısmi yanıt grubu ile minör yanıt grubu arasında, minimal yanıt grubu ile minör grubu arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. QRT-PCR yöntemi ile elde edilen pozitiflik yüzdeleri açısından majör yanıt grubu (tam yanıt+kısmi yanıt) ile majör grup haricindeki (minör yanıt+minimal yanıt+yanıtız) arasında, majör yanıt grubu (tam yanıt+kısmi yanıt) ile minör yanıt grubu arasında, majör yanıt grubu ile minimal yanıt ve yanıtız grubu arasında, majör yanıt ve minör yanıt grubu ile minimal yanıt ve yanıtız grupları arasında, anlamlı farklılık bulunmuştur ($p < 0,001$) (Şekil-25).



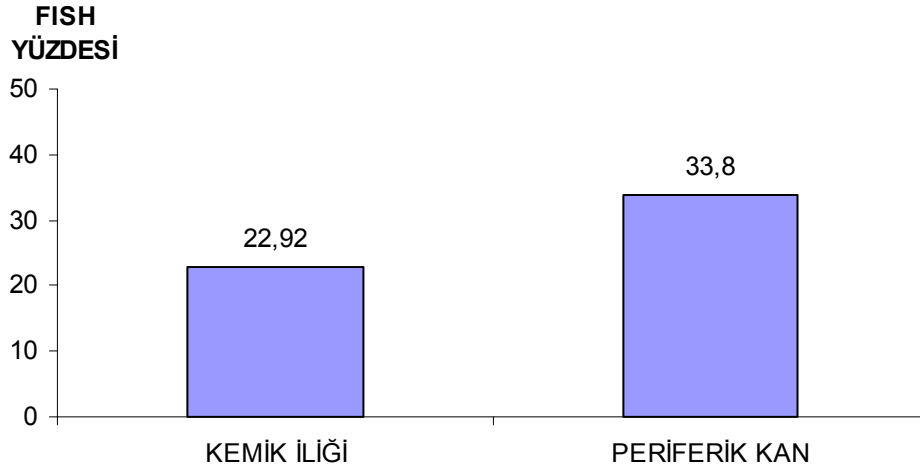
Şekil-25: FISH yöntemi ile elde edilen sitogenetik yanıt gruplarına göre QRT-PCR yüzdesi ortalamaları (Grup A: tam yanıt+kısmi yanıt, Grup B: minör yanıt+minimal yanıt+yanıtsız, Grup C: tam yanıt+kısmi yanıt+minör yanıt, Grup D: minimal yanıt+yanıtsız)

Yeni tanı hastalarına ait 21 materyalin 14'ü kemik iliği, 7'si periferik kandır. Yeni tanı hastalarına ait kemik iliği materyallerinin FISH yöntemi ile elde edilen t(9;22)(q34;q11) pozitiflik yüzdesi 96-100 arasında değişmekte olup ortalama yüzde $98,5 \pm 1,699$ SS dir. Yeni tanı hastalarına ait periferik kan materyallerinin FISH yöntemi ile elde edilen t(9;22)(q34;q11) pozitiflik yüzdesi 88-100 arasında değişmekte olup ortalama yüzde $95,571 \pm 4,391$ SS dir. Yeni tanı hastalarında kemik iliği kullanılarak elde edilen FISH yöntemi analiz sonuçları ile periferik kan kullanılarak elde edilen FISH yöntemi analiz sonuçları arasında anlamlı farklılık yoktur. Yeni tanı hastalarına ait kemik iliği materyallerinin QRT-PCR yöntemi ile elde edilen t(9;22)(q34;q11) pozitiflik yüzdesi 201-1817 arasında değişmekte olup ortalama yüzde $921,357 \pm 614,975$ SS dir. Yeni tanı hastalarına ait periferik kan materyallerinin QRT-PCR yöntemi ile elde edilen t(9;22)(q34;q11) pozitiflik yüzdesi 0,19-1197 arasında değişmekte olup ortalama yüzde $469,027 \pm 392,735$ SS dir. Yeni tanı hastalarında kemik iliği kullanılarak elde edilen QRT-PCR yöntemi analiz sonuçları ile periferik kan kullanılarak elde edilen QRT-PCR yöntemi analiz sonuçları arasında anlamlı farklılık yoktur.

Takip hastalarına ait 114 materyalin 104'ü kemik iliği, 10'u periferik kandır. Takip hastalarına ait kemik iliği materyallerinin FISH yöntemi ile elde edilen t(9;22)(q34;q11) pozitiflik yüzdesi 0-100 arasında değişmekte olup ortalama yüzde $22,923 \pm 34,504$ SS dir. Takip hastalarına ait periferik kan materyallerinin FISH yöntemi ile elde edilen t(9;22)(q34;q11) pozitiflik yüzdesi 0-97 arasında değişmekte olup ortalama yüzde $33,8 \pm 37,844$ SS dir. Takip hastalarında kemik iliği kullanılarak elde edilen FISH yöntemi analiz sonuçları ile periferik kan kullanılarak elde edilen FISH yöntemi analiz sonuçları arasında anlamlı farklılık yoktur. Takip hastalarına ait kemik iliği materyallerinin QRT-PCR yöntemi ile elde edilen t(9;22)(q34;q11) pozitiflik yüzdesi 0-4322 arasında değişmekte olup ortalama yüzde $157,01 \pm 462,337$ SS dir. Takip hastalarına ait periferik kan materyallerinin QRT-PCR yöntemi ile elde edilen t(9;22)(q34;q11) pozitiflik yüzdesi 0,23- 1377 arasında değişmekte olup ortalama yüzde $272,013 \pm 446,661$ SS dir. Takip hastalarında kemik iliği kullanılarak elde edilen QRT-PCR yöntemi analiz sonuçları ile periferik kan kullanılarak elde edilen QRT-PCR yöntemi analiz sonuçları arasında anlamlı farklılık yoktur (Şekil-26,27).

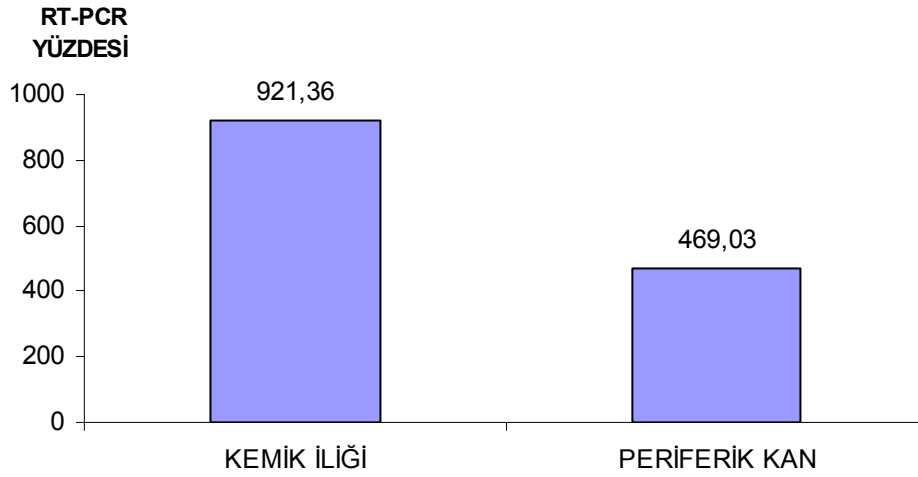


A

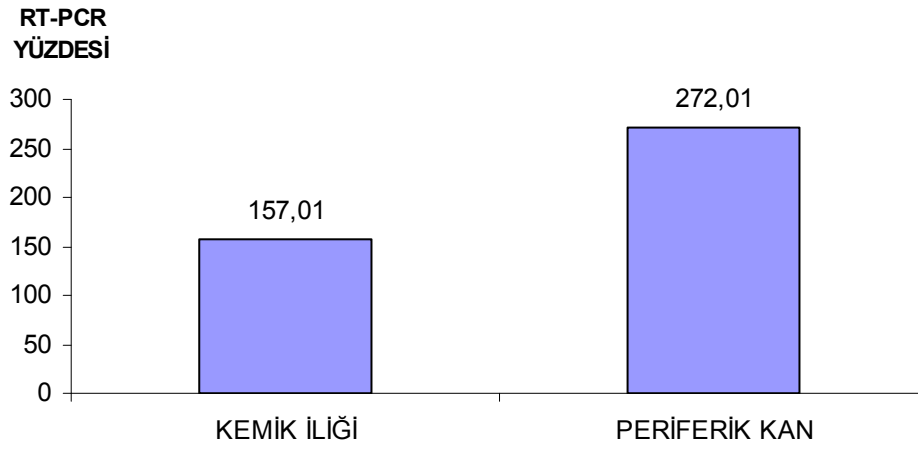


B

Şekil-26: Yeni tanı (A) ve takip hastalarına (B) ait kemik iliği ve periferik kan materyallerinden FISH yöntemi ile elde edilen t(9;22)(q34;q11) pozitiflik yüzde ortalamaları.



A



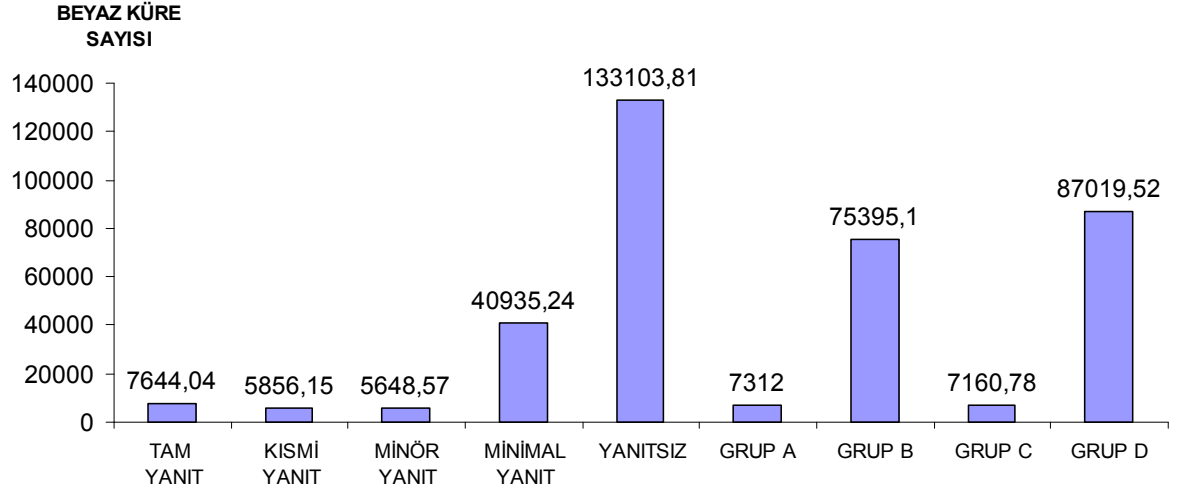
B

Şekil-27: Yeni tanı (A) ve takip hastalarına (B) ait kemik iliği ve periferik kan materyallerinden QRT-PCR yöntemi ile elde edilen t(9;22)(q34;q11) pozitiflik yüzde ortalamaları

FISH yöntemi ile elde edilen t(9;22)(q34;q11) analiz sonucu %0 (negatif) olan 65 hastasının 4'ünün (%6,2) QRT-PCR sonucu %0 (negatif), 61'inin (%93,8) QRT-PCR sonucu >%0 (pozitif)'dir. FISH yöntemi ile elde edilen t(9;22)(q34;q11) analiz sonucu >%0 (pozitif) olan 70 hastasının 1'inin (%1,4) QRT-PCR sonucu %0 (negatif), 69'unun (%98,6) QRT-PCR sonucu >%0 (pozitif)'dir. FISH ve QRT-PCR'ın tam uyumu (her iki testte negatif veya pozitif olma) 73 vakada bulundu (%54,1) ve 62 vakada (%45,9) farklılık tanımlandı.

FISH yöntemine göre tam yanıt grubunda yer alan hastaların beyaz küre sayıları 3360-54300/mm³ (n=57) arasında olup ortalama beyaz küre

sayısı $7644,035 \pm 8456,622$ SS/mm³ dir. FISH yöntemine göre kısmi yanıt grubunda yer alan hastaların beyaz küre sayıları 3080-10000/mm³ (n=13) arasında olup ortalama beyaz küre sayısı $5856,154 \pm 1978,668$ SS/mm³ dir. FISH yöntemine göre minör yanıt grubunda yer alan hastaların beyaz küre sayıları 800-9800/mm³ (n=7) arasında olup ortalama beyaz küre sayısı $5648,571 \pm 3250,289$ SS/mm³'dir. FISH yöntemine göre minimal yanıt grubunda yer alan hastaların beyaz küre sayıları 2520-225000/mm³ (n=21) arasında olup ortalama beyaz küre sayısı $40935,238 \pm 58563,771$ SS/mm³ dir. FISH yöntemine göre yanıtız grubunda yer alan hastaların beyaz küre sayıları 5080-518000/mm³ (n=21) arasında olup ortalama beyaz küre sayısı $133103,81 \pm 134674,587$ SS/mm³ dir. Bu 5 grup (tam yanıt, kısmi yanıt, minör yanıt, minimal yanıt, yanıtız) arasında beyaz küre sayıları açısından anlamlı farklılık bulunmuştur (p<0,001). Beş gruba kendi arasında ikili karşılaştırma yapıldığında beyaz küre sayıları açısından tam yanıt grubu ile kısmi yanıt grubu arasında, tam yanıt grubu ile minör yanıt grubu arasında, kısmi yanıt grubu ile minör yanıt grubu arasında, minör yanıt grubu ile minimal yanıt grubu arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. Beyaz küre sayıları açısından tam yanıt grubu ile minimal yanıt grubu arasında, minimal yanıt grubu ile yanıtız grubu arasında anlamlı farklılık bulunmuştur (p=0,001). Beyaz küre sayıları açısından tam yanıt grubu ile yanıtız grup arasında, kısmi yanıt grubu ile yanıtız grubu arasında, minör yanıt grubu ile yanıtız grubu arasında anlamlı farklılık bulunmuştur (p<0,001). Beyaz küre sayıları açısından kısmi yanıt grubu ile minimal yanıt grubu arasında anlamlı farklılık bulunmuştur (p=0,012). Hastalara ait beyaz küre sayıları açısından majör yanıt grubu (tam yanıt+kısmi yanıt) ile majör yanıt grubu haricindeki (minör yanıt+minimal yanıt+yanıtız) arasında, majör yanıt grubu ile minimal yanıt ve yanıtız grubu arasında, majör yanıt ve minör yanıt grubu ile minimal yanıt ve yanıtız grupları arasında, anlamlı farklılık bulunmuştur (p<0,001). Hastalara ait beyaz küre sayıları açısından majör yanıt grubu (tam yanıt+kısmi yanıt) ile minör yanıt grubu arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır (Şekil-28).



Şekil-28: FISH yöntemi ile elde edilen sitogenetik yanıt gruplarına göre elde edilen beyaz küre sayı ortalamaları (Grup A: tam yanıt+kısmi yanıt, Grup B: minör yanıt+minimal yanıt+yanıtsız, Grup C: tam yanıt+kısmi yanıt+minör yanıt, Grup D: minimal yanıt+yanıtsız).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Kronik Miyelositer Lösemi kromozomal bir aberasyonun tanımlandığı ilk malign hastalıktır. Dokuzuncu kromozomdaki ABL geni ile 22. kromozomdaki BCR genlerinin translokasyonu sonucu oluşan “Philadelphia” (Ph) kromozomu, KML'nin karakteristik sitogenetik bulgusudur. t(9;22) neticesinde, artmış ABL tirozin kinaz aktivitesine sahip bir protein kodlayan, BCR-ABL füzyon geni oluşur. KML'nin moleküler patolojisi çok iyi tanımlanmıştır. BCR-ABL füzyon proteini, ilişkide olduğu çok sayıdaki yolak ve proteinler aracılığı ile hücre adhesyonu, mitojen sinyal aktivasyonu, apoptoz ile ilgili genlerin aktivasyonlarını etkileyerek, hematopoetik kök hücrelerde malin transformasyona yol açar. BCR-ABL sinyallerinin, DNA onarım bozuklukları, ilave kromozomal değişikliklerin oluşumu ve mutasyonlarla ilişkisi de gösterilmiştir (186, 196).

KML genellikle orta-yaş hastalığı olup, erkeklerde kadınlara göre daha sıktır (1,5:1) (17). Bizim çalışmamızda değerlendirmeye alınan toplam 21 yeni tanı hastasının 11'i erkek (%52,4), 10'u (%47,6) kadın olup erkek/kadın oranı 1,1 dir. KML'nin ortalama görülme yaşı 45-55 olarak saptanmıştır. Bizim çalışmamızda yeni tanı hastalarının yaşları 13-81 yaş arasında değişmektedir ve ortalama yaş $49,33 \pm 18,82$ SS (standart sapma) olup, literatürlerde verilen bilgiler ile uyumludur.

KML'de en belirgin laboratuvar bulgusu lökositozdur (38). Birçok çalışmada ortalama $134.000/\text{mm}^3$ ile $225.000/\text{mm}^3$ arasında istatistiksel dağılım göstermekle birlikte lökositoz, $20.000/\text{mm}^3$ 'den $500.000/\text{mm}^3$ 'den daha fazlaya kadar değişir (28). Bizim çalışmamızda, 20 yeni tanı hastasına ait beyaz küre sayısı $19800-518000 /\text{mm}^3$ arasında değişmekte olup ortalama beyaz küre sayısı 145115 ± 130794 SS/ mm^3 tü ve literatürlerde belirtilen yeni tanı konan KML hastalarının beyaz küre sayıları ile uyumlu bulunmuştur.

Rutin sitogenetik analizler KML hastalarının yanıtlarının değerlendirilmesinde halen altın standart olarak görülmektedir. (106, 120,

197) Sitogenetik alışmalar, KML'de ekstra kromozomal anormalliklerin belirlenmesi için ideal yöntemlerdir. Ancak, sitogenetik çalışmaların uzun zaman alması ve test edilen her örnekte hücrelerin sadece %20-25'inin metafazda olması bu tekniğın olumsuz yönleridir. (198) Yeni tedavi alternatifleri ile birlikte, hastaların pek oğu tam sitogenetik yanıtı ulaştığı için, minimal rezidüel hastalığı (MRH) tespit etmek için, daha hassas ve doğru tekniklere ihtiyaç vardır (106, 120, 197). Hem interfaz hem de metafaz hücrelerinde analize olanak sağlayan FISH tekniği, son yıllarda kromozomal aberasyonların analizinde uygulanan konvansiyonel sitogenetik yöntemlere ek olarak gl bir tamamlayıcı tetkik olarak gösterilmeye başlanmıştır (199). Gerçek zamanlı kantitatif PCR (QR-PCR) yöntemi, son yıllarda BCR-ABL transkriptlerinin izleminde tercih edilen ve hassasiyeti yüksek bir yöntem haline gelmiştir (102, 200-202).

2008 yılında Lundan ve ark.'nın (203) 96 KML hastasından elde edilen 222 kemik iliği ve 123 periferik kan örneğinden yaptığı çalışmada tanı anında konvansiyonel G-bantlama ile sitogenetik çalışmalar ve metafaz FISH analizleri yapılmış, Ph+ veya BCR-ABL füzyon pozitif olan hücrelerin %90-100 arasında bulunmuştur. Bizim alışmamızda, 21 yeni tanı hastasının FISH yöntemi ile elde edilen t(9;22)(q34;q11) pozitiflik yüzdesi 88-100 arasında değişmekte olup ortalama yüzde 97,524±3,108 SS dır. Bu da literatürde verilen bilgiler ile uyumludur.

2008 yılında Lundan ve ark.'nın (203) yapmış olduğu çalışmada, 32 hastadan tanı anında kemik iliği rneği alınmış ve bu örneklere BCR-ABL/GUS (β -glukuronidaz) oranı %34 (%11-106) olarak bulunmuştur. Tanı anındaki periferik kan örnek sayısı 27 olup ortanca BCR-ABL/GUS oranı %35 (%8-80) dir. Bizim alışmamızda, 21 yeni tanı hastasının QRT-PCR yöntemi ile elde edilen t(9;22)(q34;q11) pozitiflik yüzdesi 0,19-1817 arasında değişmekte olup ortalama yüzdesi 770,581±582,957 SS dır. Bu bize yeni tanı değeri olmayan eski takip hastalarının takip değeri logaritmik azalmalarını hesaplamada ilk tanı değeri belirleme açısından bir kolaylık sağlayacaktır. Bunun yani ilk tanı değeri bilmediğimiz vakaların böylece QRT-PCR yöntemi ile elde edilen t(9;22)(q34;q11) pozitiflik ortalama

yüzdelerini $770,581 \pm 582,957$ SS olarak kabul etmemize olanak sağlayacaktır. Bu da, yeni tanı anındaki değerleri bilinmeyen ya da farklı tekniklerle analizleri yapılmış olan vakaların QRT-PCR sonuçlarının standart şekilde değerlendirilebilmesi açısından oldukça yararlı bir mihenk noktası olacaktır.

Bizim çalışmamızda elde edilen yeni tanı QRT-PCR yüzdeleri 2008 yılında Lundan ve ark.'nın (203) yapmış olduğu çalışmada buldukları yeni tanı QRT-PCR yüzdelerine göre daha yüksektir. Bunun nedeni Lundan ve ark. (203) yapmış olduğu çalışmada kontrol gen olarak son zamanlarda tavsiye edilen GUS kullanmalarına ve farklı nedenlere bağlı olabilir. BCR-ABL/kontrol gen oranları mutlak değildir ve BCR-ABL transkript seviyelerini karşılaştırmak için kullanılan "house-keeping" genlere göre değişkenlik gösterebilmektedir. Bao ve ark.'nın (204) yaptığı çalışmada G6PDH kullanılırken, diğer çalışmalarda normal ABL, normal BCR, β 2-mikroglobulin, β -glukuronidaz kullanılabildiği için genel anlaşma sağlanamamıştır. Bu nedenle yeni karşılaştırmalı çalışmalar yapılmalıdır (204).

Gerçek zamanlı kantitatif PCR (QR-PCR) yönteminde, hasta materyalleri arasında, PCR reaksiyonunun verimini etkileyen değişkenler (RNA ve cDNA kalitesi vb), bir kontrol gen (ABL, BCR, G6PDH) aracılığı ile normalize edilmektedir. Kantitatif PCR birçok akademik ve ticari laboratuvarlarda yapılmakla beraber standardize değildir ve merkezler arası kalite değişkendir. Hasta materyallerinin kalite ve miktarına dayalı olarak yapılan bu testlerde, çalışılan bir örneğin test hassasiyetini gösterecek, standart çalışma materyalleri bulunmamaktadır. Örneğin hastaya ait materyalin laboratuvara nakli sırasında geçen uzun süre ve uygun olmayan taşıma koşulları, degradasyon problemlerine ve buna bağlı olarak da yanlış negatif sonuçlara neden olacaktır. Bir başka problem de halen sonuçların laboratuvarlar arasında karşılaştırılabilir olmamasıdır (102, 200-202).

FISH ve QRT-PCR teknikleri moleküler hematoloji laboratuvarlarında sıklıkla kullanılmaktadır. Fakat çok az sayıdaki çalışma gerçek anlamda bu iki yöntemin Ph+ lösemi hastalarında tanı koymada ve minimal rezidüel hastalık tespitindeki sensitivitesini karşılaştırmıştır (205).

FISH ve QRT-PCR yöntemlerini karşılaştıran ilk çalışma interferon ile tedavi edilen 24 KML hastasında yapılmıştır. Bu çalışmada her iki yöntemde güvenilir bulunmuş ve iyi korelasyon göstermiştir. Fakat bizim çalışmamızdan farklı olarak QRT-PCR ile moleküler düzeyde negatifliğe ulaşamamıştır (205).

Bao ve ark.'nın (204) 2007 yılında Ph+ KML veya Ph+ ALL tanısı olan 23 hastadan elde edilen toplam 77 materyalden yaptığı çalışmada BCR-ABL füzyon genini tespit etmede FISH ve QRT-PCR yöntemleri arasında vakaların çoğunda uyumluluk bulunmuştur. Bao ve ark. (204) yaptıkları çalışmada FISH yönteminde yanlış negatifliği azaltmak amacıyla pozitiflik cut-off sınırını %10 olarak kullanmıştır.

FISH yöntemi yeni tanı konmuş lösemilerin taramasında güvenilirdir. Bao ve ark.'nın (204) yaptıkları çalışmada yeni tanı konmuş BCR-ABL pozitif lösemilerin %100 'ünde FISH ve QRT-PCR yöntemiyle elde edilen sonuçlar pozitifdir. Bizim çalışmamızda da yeni tanı konmuş BCR-ABL pozitif KML hastalarının %100 'ünde FISH ve QRT-PCR yöntemiyle elde edilen sonuçlar pozitifdir. Yeni tanı hastalarında FISH yöntemi ile yapılan analizler güvenilir olup, takip hastalarında minimal rezidüel hastalığın takibinde QRT-PCR yönteminin sensitivitesi daha yüksek olarak saptanmıştır.

Raanani ve ark.'nın (206) imatinib ile tedavi edilen 24 KML hastasında moleküler takip yapmış ve hastaların imatinibe olan cevabını FISH, multipleks PCR ve QRT-PCR metotları arasında karşılaştırmış. %83 hastada FISH ve QRT-PCR sonuçlarını uyumlu bulmuştur. BCR-ABL/ABL oranı %2'nin altında olan tüm örneklerde FISH sonucu negatif olarak saptanmıştır. Bu da QRT-PCR ve FISH testi arasında harika bir uyum olduğunu göstermiştir. Bizim çalışmamızda BCR-ABL/ABL QRT-PCR yüzdesi %10,75'in altında olan tüm örneklerde FISH sonucu negatif olarak saptanmıştır. Bu da önceki takiplerinde BCR-ABL/ABL QRT-PCR yüzdesi %10,75'in üstünde olan hastalardan FISH analizi istenebileceği şeklinde yorumlanabilir.

Kim ve ark.'nın (207) yapmış olduğu çalışmada FISH sonucunun pozitif QRT-PCR sonucunun negatif olduğu örnekler bulunması nedeni ile bu konuyla ilgili yeni araştırmalar yapılması gerekmektedir.

Lundan ve ark.'nın (203), 132 örnekte kemik iliği metafaz FISH ve periferik kan QRT-PCR analiz sonuçlarını karşılaştırdıkları çalışmada, her iki analizle 62 tanesinde pozitif sonuç bulunmuş ve sonuçlar birbiri ile iyi korele olarak saptanmış. Metafaz FISH analiz sonucu negatif olan 30 vakada QRT-PCR yöntemi ile BCR-ABL translokasyonu tespit edilebilmiştir. FISH sonucu pozitif QRT-PCR sonucu negative olan örnek saptanmamıştır. 40 örnekte hem metafaz FISH hem QRT-PCR sonucu negatif saptanmıştır. Aynı çalışmada 181 kemik iliği örneğinden elde edilen materyalin metafaz FISH analizi ve QRT-PCR sonuçları karşılaştırılmış, kemik iliği metafaz FISH ve QRT-PCR metafaz sonuçları 62 vakada pozitif, FISH ile tam sitogenetik yanıtın alındığı 44 vakada QRT-PCR ile BCR-ABL transkripti saptanmıştır. 69 vakada hem tam sitogenetik yanıt hem de moleküler yanıt gözlenmiştir.

Durak ve ark.'nın (208) 2008 yılında yaptığı çalışmada, Ph translokasyonunun belirlenmesinde klasik sitogenetik, FISH ve RT-PCR kullanılan akut lenfoblastik lösemili (ALL) ve kronik myeloid lösemili (KML) 63 olgunun sonuçları retrospektif olarak analiz edilmiş ve üç farklı yöntemin avantaj ve dezavantajları değerlendirilmiştir. ALL ve KML hasta grubunda sitogenetik ve FISH sonuçları uyumlu bulunmuştur. Ancak FISH ve RT-PCR sonuçları arasında uyumsuzluk olan ALL ve KML'li olgular saptanmıştır. ALL olgularında FISH ile Ph pozitif bulunan 2 (%15.4) olgu klasik sitogenetik ve RT-PCR ile negatif bulunmuştur. KML grubunda ise FISH ile Ph pozitif bulunan 4 (%8) olgu RT-PCR ile negatif, RT-PCR ile Ph pozitif bulunan 3 (%6) olgu ise FISH ile negatif bulunmuştur. Bizim çalışmamızda, FISH değeri negatif olan 65 hastanın 4'ünde QRT-PCR sonucu negatif, 61'inde QRT-PCR sonucu pozitif olarak saptandı. Bu sonuç RT-PCR yönteminin sensitivitesi nedeniyle beklenen bir durum olarak değerlendirilmiştir. Ph negatif, BCR-ABL pozitif sonuçlardan, normal görünen metafazlardaki submikroskopik BCR-ABL yeniden düzenlemeleri sorumlu olabilir. Minimal rezidüel hastalığın değerlendirilmesi açısından klasik sitogenetik, FISH ve QRT-PCR yöntemleri

karşılaştırıldığında, RT-PCR rezidüel KML hücrelerinin saptanmasında 1000-10000 kat daha sensitiftir (40-22). RT-PCR'ın duyarlılığı tedavi sonrası takip aşamasında oldukça önemli olduğu belirtilmekte (209), özellikle komplet sitogenetik yanıtı sahip olan hastalarda minimal rezidüel hastalığın değerlendirilmesini kolaylaştırmıştır (210). Bu sonuç, QRT-PCR'ın, imatinib ile tedavi edilen KML hastalarının özellikle de MRH takibinde artık altın standart olarak düşünülmesi gerektiğini desteklemektedir.

Cox ve ark.'nın (211) 1998 yılında yaptıkları çalışmada, BCR-ABL pozitif lösemili 75 hastanın 4'ünde RT-PCR ile BCR-ABL pozitif iken FISH ile Ph negatif; bir hasta da ise FISH ile Ph pozitif iken PCR negatif olarak rapor etmişlerdir. Ph pozitif, BCR-ABL negatif sonuçlar; teknik hata veya BCR-ABL translokasyonunun nadir formlarına bağlı olabilmektedir. RT-PCR 'a ait yanlış negatif sonuçlar lösemik hücrelerin periferik kanda kemik iliğine göre daha düşük düzeyde bulunmasına da bağlanmaktadır (211,212).

Yukarıda bahsedilen dört çalışmada olduğu gibi FISH ve QRT-PCR yöntemleri tam olarak uyumluluk göstermez. Bizim çalışmamızda da, FISH değeri pozitif olan 70 hastadan birinde QRT-PCR değeri negatif olarak saptandı. FISH ve QRT-PCR değerleri arasında 73 vakada (%54,1) uyum, 62 vakada (%45,9) uyumsuzluk vardı. QRT-PCR değeri negatif olan bir hastadaki FISH yüzdesi %4 gibi düşük bir değer olup cut-off sınırları içerisindedir. FISH'de elde edilen %4'lük pozitiflik normal hücrelerde BCR ve ABL sinyallerinin üst üste gelmesi ile de açıklanabilir. QRT-PCR değeri negatif olan örneklerde FISH yüzdeleri pozitif hücrelerin bulunmasının anlamı uzun süreli yaşayıp dolaşan monositlerin FISH yöntemi ile tespit edilebilir olmasına bağlı da olabilir. FISH ile QRT-PCR yöntemleri arasındaki farklılıklar şunlardan dolayı da olabilir; biyolojik farklılıklar, örneğin işleme tarzı, target genlerin farklı amplifikasyonu veya FISH'de seçilmiş hücrelerin kaybı ya da kazanılmasıdır. FISH yöntemi aynı zamanda QRT-PCR ile amplifiye olmayan seyrek minör kırılma noktalarını tespit edebilmektedir. Bu ve diğer nedenlerden dolayı QRT-PCR standardizasyonu önerilmektedir (213). FISH'in sensitivitesi yanlış pozitif sonuçla sınırlanabilir. Çünkü normal hücrelerde BCR ve ABL sinyalleri üst üste gelebilir. KML hücrelerini saptama

limiti pratikte %1-5 olup kullanılan proba, çekirdek boyutuna, ABL geni içerisindeki kırılma noktasının tam oranına, sinyallerin üst üste binmesine bağlıdır (214-216).

Minimal rezidüel hastalık (MRH) tespitinde QRT-PCR'nin en hassas yöntem olduğu iddia edilmektedir. Fakat tam sitogenetik yanıtın elde edildiği 21 hastada yapılan çalışmada, FISH yöntemi ile hastaların tümünde FISH yöntemiyle BCR-ABL tespit edilme oranı %1-2 iken, QRT-PCR ile füzyon m-RNA transkriptleri sadece 6 hastada tespit edilmiştir. Bu da transkripsiyonel olarak sessiz BCR-ABL hücrelerinin varlığını desteklemektedir (217, 218).

QRT-PCR, sitogenetik ve FISH yöntemleri ile karşılaştırıldığında daha düşük spesiviteye sahiptir. Bunun nedeni negatif örneklerin pozitif örnekler ile kontaminasyonudur. Bu da MRH takibinde QRT-PCR'nin tek başına diagnostik test olmasını sınırlamaktadır (219).

QRT-PCR kalitatif RT-PCR'ye göre yakın zamanda olabilecek sitogenetik veya hematolojik relapsı daha iyi tahmin eder. Artmış lösemik yükü tespit etmek tam sitogenetik remisyonda olan hastalarda bile erken teropatik müdahaleye olanak sağlayabilir (218-222) İmatinib tedavisi boyunca %70'den fazla hasta konvansiyonel karyotipe göre tam sitogenetik yanıtı ulaşmakta fakat çoğu hasta FISH veya RT-PCR analizine göre Ph kromozomu pozitif olarak kalmaktadır (223). Kantarjian ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptıkları bir çalışmada sitogenetik ve QRT-PCR çalışmaları arasında iyi bir korelasyon bulmuştur. Aynı zamanda QRT-PCR değerleri ve sitogenetik cevap kategorileri arasında iyi bir uyum bulmuştur (224). Bu çalışmada interferon alfa tedavisi başarısız olup, imatinible tedavi edilen 180 Ph+ KML hastasında tedavi boyunca farklı zamanlarda elde edilen 543 sitogenetik ve QRT-PCR sonuçları değerlendirilmiş. Ortanca QRT-PCR değeri sitogenetik cevap kategorilerine yanıtı olmayan grupta (Ph, >%90) QRT-PCR değeri %36, minor cevap grubunda (Ph, %35-90) %22, kısmi cevap grubunda (Ph, %1-34) %7.3, tam yanıt grubunda (Ph, %0) %0,89 dur. Sitogenetik cevap kategorileri (yanıtı olmayan, minor, kısmi, tam cevap) ve QRT-PCR değerleri (>%10, %2-10, <%2) arasında %66 uyumluluk, %10 majör uyumsuzluk bulunmuştur. Tam sitogenetik yanıtı ulaşmış 170 örnekten

%21'inde QRT-PCR değeri >%10, %53'ünde QRT-PCR değeri <%1 bulunmuştur. Kantarjian ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptıkları bu çalışmada QRT-PCR değeri >%10 olanların %30'u yanıtız veya minor sitogenetik yanıt grubunda, %14'ü parsiyel sitogenetik yanıt grubundadır. QRT-PCR değeri %2-10 arasında olanların %1'i yanıtız veya minor sitogenetik yanıt grubunda, %7'si kısmi sitogenetik yanıt grubunda, %8'i tam sitogenetik yanıt grubunda olduğu bulunmuştur. QRT-PCR değeri <%2 olanların %1'i yanıtız veya minor sitogenetik yanıt grubunda, %1'i kısmi sitogenetik yanıt grubunda, %9'u tam sitogenetik yanıt grubunda bulunmuştur (224).

Lundan ve ark.'nın (203) yaptığı çalışmada 132 örnekte kemik iliği metafaz FISH ve periferik kan QRT-PCR analiz sonuçları karşılaştırıldığında ortanca BCR-ABL/GUS oranı tam sitogenetik remisyonda olan hastalarda (%0), %0,037, tama yakın cevapta (<%1) %0,201, kısmi cevapta (%1-34.9) %0,487, minor cevapta (%35-95) %5,741, yanıtız grupta (>%95) %18, totalde %0,067 olarak bulunmuştur. 181 kemik iliği örneğinden elde edilen materyalin metafaz FISH analizi ve QRT-PCR sonuçları karşılaştırılmış, ortanca BCR-ABL/GUS oranı tam sitogenetik remisyonda olan hastalarda (%0), %0,026, tama yakın cevapta (<%1) %0,294, kısmi cevapta (%1-34.9) %2,217, minor cevapta (%35-95) %11,836, yanıtız grupta (>%95) %33,086, totalde %0,018 olarak bulunmuştur.

Yukarıda bahsedilen iki çalışmada olduğu gibi bizim çalışmamızda da, FISH değerlerine göre yapılan sitogenetik yanıt gruplarına ait QRT-PCR değerleri arasında uyumluluk bulunmuştur. Azalan FISH değerleri ile beraber QRT-PCR değerlerinde de azalma görülmüştür. FISH değerlerine göre yapılan sitogenetik yanıt grupları arasında QRT-PCR yüzdeleri açısından anlamlı farklılık bulunmuştur ($p < 0,001$). Bu da FISH değerini bilip QRT-PCR değerini bilmediğimiz KML takip hastalarında QRT-PCR değerleri hakkında fikir sahibi olmamızı ve sonraki takiplerinde tedaviye yanıt açısından logaritmik değışiklikleri tespit etmede faydalı olacaktır.

KML tedavisinin amacı uzun süreli sağkalım ve moleküler remisyonun sağlanmasıdır. Bu amaca allojenik kök hücre nakli ile ulaşılabilir. Aynı

zamanda daha az komplikasyona sahip tirozin kinaz inhibitörleri kullanılarak da ulaşılabilir. Bcr-Abl tirozin kinaz aktivitesinin baskılanması, Ph pozitif hücrelerde proliferasyonu inhibe ederken, apoptozu indüklemektedir. KML hastalarında, bu amaçla uygulanan imatinib (Gleevec, Novartis Pharma), dasatinib (Sprycel, Bristol-Myers Squibb) ve nilotinib (Nilotinib, Tasgina, Novartis Pharma) gibi ilaçlar, Bcr-Abl aktivitesini inhibe edip, Bcr-Abl pozitif hücre sayısını azaltmak ve hastalığı kontrol altına alabilmeyi hedeflemektedir. KML hastalarında, hastalıklı hücre düzeylerinin izlenmesi, hasta ya spesifik tedavilerin etkinliğinin saptanması ve tedavi stratejileri (şekli, süresi vb) ile ilgili doğru kararlar alınması, tedavinin başarısı için kritik öneme sahiptir. Belirlenen zaman aralıklarında, tedaviye yanıt düzeylerinin tespiti, hem prognozda ve hem de hastaliksız sağkalım süresinin uzatılmasında önem taşır (186). Shah ve ark.'nın (225) yapmış olduğu çalışmada tam sitogenetik yanıtı ulaşılmış 23 hastadan 9'unun en az bir kez QRT-PCR değeri negatif bulunmuş bu da imatinib tedavisi ile moleküler remisyona ulaşabileceği doğrulanmaktadır. Bizim çalışmamızda, yeni tanı hastalarının FISH ve QRT-PCR yöntemleri ile elde edilen t(9;22)(q34;q11) pozitiflik yüzdeleri ile takip hastalarının FISH ve QRT-PCR yöntemleri ile elde edilen t(9;22)(q34;q11) pozitiflik yüzdeleri arasında anlamlı farklılık bulunmuştur. ($p < 0,001$). Bu da İmatinib tedavisi alan KML hastalarının, tedaviye sitogenetik ve moleküler yanıtlar veriyor olması ile ilişkilendirilebilir.

Bölünen metafaz hücreleri ile yapılan sitogenetik yöntemlerden farklı olarak periferik kandan elde edilen interfaz FISH sonuçları kemik iliğinden elde edilen interfaz FISH sonuçları ile aynı sensitivitededir. (219,226-228) Çoğu araştırmacı periferik kandan yapılan FISH sonuçları ile kemik iliğinden yapılan FISH sonuçlarını karşılaştırmış, bazı araştırmacılar korelasyon bulurken bazıları korelasyon bulmamıştır (226, 228-231). Dolaşan lenfositlerin oranı kemik iliği ile periferik kan FISH sonuçları arasındaki farklılığı açıklayabilir. Bizim çalışmamızda yeni tanı ve takip hastalarında kemik iliği kullanılarak elde edilen FISH yöntemi analiz sonuçları ile periferik kan kullanılarak elde edilen FISH yöntemi analiz sonuçları arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır.

FISH gibi QRT-PCR da da bölünen hücrelere ihtiyaç duyulmaz. Bu yüzden periferik kandan faydalanılabilir. Periferik kandan alınan kalitatif sonuçlar kemik iliğinden alınan kalitatif sonuçlar ile iyi korelasyon göstermektedir. (214, 232, 233) Kantarjian ve ark.'nın (224) 2003 yılında yaptıkları bir çalışmada kan ve kemik iliği QRT-PCR değerleri arasında %83 uyumluluk bulunmuştur. 2008 yılında Lundan ve ark.'nın (203) yaptığı çalışmada, tanı anındaki kemik iliği ve periferik kandan elde edilen BCR-ABL/GUS oranları arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Ancak Stock ve ark.'nın (234) 2006 yılında yaptıkları çalışmada 41 KML hastasında periferik kan ve kemik iliği örneklerinden elde edilen QRT-PCR sonuçlarını karşılaştırmıştır. QRT-PCR analizi ile yapılan BCR-ABL ölçümlerini kemik iliği ve periferik kan örneklerinde farklı bulmuş, kemik iliğine ait değerlerin periferik kana göre daha yüksek çıkması sonucunda MRH takibinde kemik iliği örneklerinin kullanılmasının daha doğru olacağını belirtmiştir. Bizim çalışmamızda, yeni tanı ve takip hastalarında kemik iliği kullanılarak elde edilen QRT-PCR yöntemi analiz sonuçları ile periferik kan kullanılarak elde edilen QRT-PCR yöntemi analiz sonuçları arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. Hastaların tanı ve takibinde FISH ve QRT-PCR analizi için periferik kan kullanılabilmesi sonucuna varılmıştır. Bu özellik, imatinib kullanmakta olan hastalarda rezidüel KML klonunun periferik kan örneğinden PCR ile monitorizasyonunu sağlayarak invazif kemik iliği aspirasyon işlem sıklığını azaltmaktadır. Fakat hastalığın ilerlemesindeki diğer morfolojik özelliklerin ve sitogenetik klonal gelişimin takibi için periodik kemik iliği çalışmalarının (örneğin 6-12 ay) yapılması önerilmiştir (224).

Son zamanlarda çeşitli gruplar İmatinib tedavisi alıp sitogenetik remisyonda olan KML hastalarındaki klonal sitogenetik anomalilerin ortaya çıkması ile ilgili çalışmalar yapmışlardır. Bu anomalilerin anlamı halen tartışmalıdır ve hastalığın ilerlemesini tahmin etmede veya İmatinib tedavisine sekonder gelişen myelodisplastik değişikliği göstermede veya herhangi bir klinik sonucunun olup olmadığını bildirmedeki anlamı henüz bilinmemektedir. (235-239)

Bao ve ark.nın (204) 2007 yılında Ph+ KML veya Ph+ ALL tanısı olan 23 hastadan elde edilen toplam 77 materyalden yaptığı çalışmada FISH yöntemi ve beyaz küre sayısı arasında olduğu gibi QRT-PCR ve beyaz küre sayısı arasında da daha az ilişki bulmuştur. Bizim çalışmamızda, FISH değerlerine göre yapılan sitogenetik yanıt gruplarına ait beyaz küre sayıları arasında anlamlı farklılık bulunmuştur. Hastalar tedavi edildikçe beyaz küre sayılarının düşmesi nedeni ile bu beklenen bir durumdur.

Sonuç olarak, 78 hastada yapılan FISH ve QRT-PCR sonuçlarının karşılaştırmaları ve takipleri sonucunda QRT-PCR'ın düşük seviyedeki BCR-ABL transkript seviyelerini tam olarak ölçmeyi sağladığı ve MRH için hassas bir gösterge olduğu doğrulanmıştır. QRT-PCR'ın, Ph+ KML hastalarına tanı koymada ve takipte güvenilir bir yöntem olduğu gösterilmiştir. Yeni tanı konmuş KML vakalarında BCR-ABL füzyon geninin saptanmasında QRT-PCR ve FISH iyi korele olarak bulunmuştur. FISH yönteminin yeni tanı konan hastalara hızlı tanı koymada faydalı olduğu fakat MRH takibinde yeteri kadar sensitif olmadığı görülmekle birlikte QRT-PCR yönteminin sensitivitesinin mutlak gerekliliği KML hastalarının tanı ve takibinde her iki yöntemde korele kullanılmasının, herhangi bir yöntemin tek başına kullanımından çok daha fazla etkili olduğu görülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Devita V, Hellman Jr, Rosenberg S (eds). Cancer principles & practice of oncology. 5th Edition. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. 2285-96.
2. Lanzkowsky P (ed). Manual of pediatric hematology and oncology. 4th edition. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005. 415-52
3. Behm FG, Campana D. Immunophenotyping. In: Pui C-H (ed). Childhood leukemias. 2nd edition. New York: Cambridge University Pres; 2006.150-209.
4. Wujcik D. Molecular biology of leukemia. Semin Oncol Nurs 2003;19:83-9.
5. Devine H, DeMeyer E. Hematopoietic cell transplantation in the treatment of leukemia. Semin Oncol Nurs 2003;19:118-32.
6. Berg LS, Steuber CP, Poplack DG. Stem cell model of hematopoiesis. In: Hofmann R, Benz E Jr, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, McGlave Philip (eds). Hematology: basic principles and practice. 4th edition. Philadelphia: Elsevier press; 2005. 200-11.
7. Finn WG, Peterson LC (eds). Hematopathology in oncology. 1st edition. New York, Boston, Cluwer Academic ; 2004. 13-44.
8. Pekçelen Y. Klinik hematoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2003.
9. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia-advances in biology and new approaches to treatment. N Engl J Med 2003;349:1451-64.
10. Melo JV, Hughes TP, Apperley JF. Chronic myeloid leukemia. Hematology (Am Soc Hematol Educ Program) 2003;132-52.
11. Sillaber C, Mayerhofer M, Agis H, et al. Chronic myeloid leukemia: pathophysiology, diagnostic parameters, and current treatment concepts. Wien Klin Wochenschr 2003;115:485-504.
12. Silver RT. Chronic myeloid leukemia. Hematol Oncol Clin North Am 2003;17:1159.
13. Hughes T, Branford S. Molecular monitoring of chronic myeloid leukemia. Semin Hematol 2003;40:62-8.
14. Fardel S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brein S, Kurzrock R, Kantajian HM. The biology of the chronic leukemias. N Eng J Med 1999; 341:164-72.
15. Talpaz M, Kantarjian HM, Mc Credie KB. Clinical investigation of human alpha interferon in chronic myelogenous leukemia. Blood 1987; 69: 1280-8.
16. Laneuville P. Abl tyrosine protein kinase. Semin Immunol 1995;7:255-66.
17. Greer JP, Rodgers GM, Foerster J, Paraskevas F, Lukens JN, Glader B (eds). Wintrobe's Clinical Hematology. 11th edition. Philadelphia: Lipincott Williams&Wilkins; 2004.
18. A.Ü. Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı. Klinik Hematoloji. Ankara: Antip A.Ş. Tıp Kitapları ve Bilimsel Yayınları;1997.
19. Wetzler M, Byrd JC, Bloomfield CD. Acute and chronic Myeloid Leukemia. In: Kasper DL, Braunwauld E, Fauci AS, Hauser SL,

- Jameson JL (eds). Harrison's Principles of Internal Medicine. 16th edition. Newyork: McGraw-Hill; 2005. 631-41.
20. Mughal TI, Goldman JM. Chronic myeloid leukemia: current status and controversies. *Oncology (Williston Park)*. 2004;18:837-44, 847.
 21. Stark G, O'Brien SG. An update on chronic myeloid leukaemia. *Clin Med* 2001;1:354-7.
 22. Brunstein CG, McGlave PB. The biology and treatment of chronic myelogenous leukemia. *Oncology (Williston Park)* 2001;15:23-31.
 23. Meir W, John CB, Clara DB. Acute and chronic myeloid leukemia. In: Anthony SF, Eugene B, Dennis LK, Stephen LH, Dang LL, Lary M, Joseph L (eds). Harrison's principles of internal medicine. New York: McGraw Hill;2008.677-86.
 24. Kantarjian H, O'Brain S. The chronic leukemias. In: Goldman L, Ausiello D (eds). Cecil textbook of medicine. 23rd edition. Philadelphia: Saunders;2008. 1397-402.
 25. Kuzrock R, Gutterman JU, Talpaz M. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* 1988; 319:990-8.
 26. İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Temel ve Klinik Bilimler Ders Kitapları. Klinik Hematoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri;2003.
 27. Lister TA, Gallagher CJ. Malignant disease. In P. Kumar, M. Clark (eds). *Clinical Medicine*. United States of America: Elsevier Limited;2005.501.
 28. Larson RS, Wolff SN. Chronic myeloid leukemia. In: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM (eds). *Wintrobe's Clinical Hematology*. Egypt: Middle East Edition;1999.2345-49.
 29. Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2005 ;5:172-83.
 30. Kurzrock R, Kantarjian HM, Druker BJ, Talpaz M. Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Ann Intern Med* 2003;138:819-30.
 31. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000;96:3343-56.
 32. Ferhanoğlu B (çeviri editörü). *PDQ Hematoloji*. İstanbul: İstanbul medikal yayıncılık;2005.
 33. Stirling ML, Parker AC, Keller AJ, Urbaniak SJ. Leukapheresis for papilloedema in chronic granulocytic leukaemia. *Br Med J* 1977;2:676-7.
 34. Kantarjian H, Melo JV, Tura S, Giralt S, Talpaz M. Chronic myelogenous leukemia: disease biology and current and future therapeutic strategies. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2000;90-109.
 35. Kantarjian H, Dixon D, Keating MJ. Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 1988;61:1441-6.
 36. Hagop MK, Moshe T, Francis G, Susan O, Jorge C. New Insights into the pathophysiology of chronic myeloid leukemia and Imatinib resistance. *Ann Intern Med* 2006;145:913-23.

37. Kaddu S, Zenahlik P, Schmid BC, Kerl H, Cerroni L. Specific cutaneous infiltrates in patients with myelogenous leukemia: A clinicopathologic study of 26 patients with assessment of diagnostic criteria. *J Am Acad Dermatol*. 1999;40:966–78.
38. Adamson, JW. The myeloproliferative diseases. In: Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Martin JB, Fauci AS, Root RK (eds). *Harrison's principles of internal medicine United States of America: The McGraw-Hill Companies*;1991.
39. İlhan O. Kronik myelositer lösemi. III. Ulusal İç Hastalıkları kongre kitabı 2001:40–3.
40. Müftüoğlu, E. Klinik hematoloji. 4. baskı. Diyarbakır: Şahin Yayıncılık;1995.
41. Hyun BH, Gulati GL, Ashton JK. Myeloproliferative disorders: classification and diagnostic features with special emphasis on chronic myelogenous leukemia and agnogenic myeloid metaplasia. *Clin Lab Med* 1990;10:825–38.
42. Raszeja-Specht A, Skibowska A, Kabata J, et al. Platelet defects in chronic myeloproliferative disorders. *Acta Haematol Pol* 1994;25:253–60.
43. John DA, Dan LL. Anemia and polycythemia. In: Goldman L, Ausiello D (eds). *Cecil textbook of medicine*. 23rd edition. Philadelphia: Saunders; 2008.355-63.
44. Silver RT. Chronic myeloid leukemia. In: Kufe WD, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al (eds). *Holland-Frei cancer medicine*, 5th edition. Türkiye: AND medical consulting & publishing Ltd;2002. 1972
45. Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. *N Eng J Med* 1999; 340:1330-40.
46. Geary CG. The story of chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2000;110:2-11.
47. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al (eds). *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: IARC; 2008.
48. Chase A, Huntly BJP, Cross NCP. Cytogenetics of chronic myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001;14:553–71.
49. Macdonald D, Cross NC. Chronic myeloproliferative disorders: The role of tyrosine kinases in pathogenesis, diagnosis and therapy. *pathobiology* 2007;74:81–8.
50. Krause DS, Van Etten RA. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med* 2005; 353:172–87.
51. Cohen GB, Ren R, Baltimore D. Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell* 1995;80:237-48.
52. Feller SM, Knudsen B, Hanafusa H. c-Abl kinase regulates the protein binding activity of c-Crk. *EMBO J* 1994;13:2341-51.
53. Michael WND, John MG, Junia VM. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000;96:3343-56.
54. Reuther GW, Fu H, Cripe LD, Collier RJ, Pendergast AM. Association of the protein kinases c-Bcr and Bcr-Abl with proteins of the 14-3-3 family. *Science* 1994;266:129-33.
55. <http://www.AtlasGeneticsOncology.org>. Erişim: 24.04.07

56. Laurent E , Talpaz M, Kantarjian H, Kurzrock R. The BCR Gene and Philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. *Cancer Research* 2001;61:2343-55.
57. Stam K, Heisterkamp N, Reynolds TFH, Groffent J. Evidence that the *phl* gene encodes a 160,000-dalton phosphoprotein with associated kinase activity. *Mol Cell Biol* 1987;7:1955-60.
58. Wu Y, Liu J, Arlinghaus RB. Requirement of two specific tyrosine residues for the catalytic activity of Bcr serine/threonine kinase. *Oncogene* 1998;16:141-6.
59. Ma G, Lu D, Wu Y, Liu J, Arlinghaus RB. Bcr phosphorylated on tyrosine 177 binds Grb2. *Oncogene* 1997;14:2367-72.
60. Melo JV. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* 1996;88:2375-84.
61. Melo JV, Deininger MWN. Biology of chronic myelogenous leukemia-signaling pathways of initiation and transformation. *Hematol Oncol Clin N* 2004;18;545-68.
62. Melo JV, Myint H, Galton DA, Goldman JM. P190BCR-ABL chronic myeloid leukaemia: the missing link with chronic myelomonocytic leukaemia. *Leukemia* 1994;8:208-11.
63. Pane F, Frigeri F, Sindona M, et al. Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood* 1996;88:2410-14. Erratum: *Blood* 1997;89:4244.
64. Golub TR, Goga A, Barker GF, et al. Oligomerization of the ABL tyrosine kinase by the Ets protein TEL in human leukemia. *Mol Cell Biol* 1996;16:4107-16.
65. Inokuchi K. Chronic myelogenous leukemia: from molecular biology to clinical aspects and novel targeted therapies. *J Nippon Med Sch* 2006;73:178-92.
66. Dai Z, Quackenbush RC, Courtney KD, et al. Oncogenic Abl and Src tyrosine kinases elicit the ubiquitin-dependent degradation of target proteins through a Ras-independent pathway. *Genes Dev* 1998;12:1415-24.
67. Goga A, McLaughlin J, Pendergast AM, et al. Oncogenic activation of c-ABL by mutation within its last exon. *Mol Cell Biol* 1993;13:4967-75.
68. Gordon MY, Dowding CR, Riley GP, Goldman JM, Greaves MF. Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature* 1987;328:342-4.
69. Pendergast AM, Quilliam LA, Cripe LD, et al. BCR-ABL induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell* 1993;75:175-85.
70. Oda T, Heaney C, Hagopian JR, Okuda K, Griffin JD, Druker BJ. Crkl is the major tyrosine-phosphorylated protein in neutrophils from patients with chronic myelogenous leukemia. *J Biol Chem* 1994;269:22925-8.
71. Cahill MA, Janknecht R, Nordheim A. Signalling pathways: jack of all cascades. *Curr Biol* 1996;6:16-9.

72. Raitano AB, Halpern JR, Hambuch TM, Sawyers CL. The Bcr- Abl leukemia oncogene activates Jun kinase and requires Jun for transformation. *Proc Natl Acad Sci* 1995;92:11746-50.
73. Danial NN, Pernis A, Rothman PB. Jak-STAT signaling induced by the v-abl oncogene. *Science* 1995;269:1875-7.
74. Ilaria RL Jr, Van Etten RA. P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *J Biol Chem* 1996;271:31704-10.
75. Daley GQ, Baltimore D. Transformation of an interleukin 3- dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210bcr/abl protein. *Proc Natl Acad Sci* 1988;85:9312-6.
76. Deininger MW, Vieira S, Mendiola R, Schultheis B, Goldman JM, Melo JV. BCR-ABL tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia. *Cancer Res* 2000;60:2049-55.
77. Skorski T, Bellacosa A, Nieborowska-Skorska M, et al. Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *EMBO J* 1997;16:6151-61.
78. Zou X, Rudchenko S, Wong K, Calame K. Induction of c-myc transcription by the v-Abl tyrosine kinase requires Ras, Raf1, and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 1997;11:654-62.
79. Puil L, Liu J, Gish G, et al. Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *EMBO J* 1994;13:764-73.
80. Bedi A, Zehnbaauer BA, Barber JP, Sharkis SJ, Jones RJ. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. *Blood* 1994;83:2038-44.
81. Wang HG, Rapp UR, Reed JC. Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell* 1996;87:629-38.
82. McGahon AJ, Nishioka WK, Martin SJ, Mahboubi A, Cotter TG, Green DR. Regulation of the Fas apoptotic cell death pathway by Abl. *J Biol Chem* 1995;270:22625-31.
83. Goldman JM, Mughal TI. Chronic myeloid leukemia. In: Hoffbrand AV, Catovsky D, Tuddenham E (eds). *Postgraduate hematology*. 5th edition. Ljubljana:Blackwell;2005. 603-18.
84. Mitelman F. The cytogenetic scenario of chronic myeloid leukemia *Leuk Lymphoma* 1993;11:11-5.
85. Stuppia L, Calabrese G, Peila R, Guanciali FP, Morizio E, Spadano A, Palka G. P53 Loss and point mutations are associated with suppression of apoptosis and progression of CML into myeloid blast crisis. *Cancer Genet Cytogenet* 1997;98:28-35.
86. Malinen T, Palotie A, Pakkala S, Peltonen L, Ruutu T, Jansson SE. Acceleration of chronic myeloid leukemia correlates with calcitonin gene hypermethylation. *Blood* 1991;77:2435-40.
87. Haznedar R. Kronik myelositik lösemi. İliçin G, Biberoğlu K, Süleymanlar G, Ünal S (editörler). *İç Hastalıkları*. Ankara: Güneş Kitabevi; 2003.1892-94.
88. Deviren A. Genel genetik. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları; 2002.

89. Marilyn L, Daniel P. Clinical cytogenetics and molecular cytogenetics. *J Zhejiang Univ Science B* 2006;7:162-3.
90. Branch MJ, Knutsen T, Spurbeck JL (eds). The AGT cytogenetics laboratory manual. 3rd edition. USA: Lippincott-Raven; 1997.
91. Kearney L, Horsley SW. Molecular cytogenetics in haematological malignancy: current technology and future prospects. *Chromosoma* 2005;114:286-94.
92. Başaran N. Tıbbi genetik ders kitabı. Ankara: Güneş ve Nobel Tıp Kitabevi; 1999.
93. Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparations of leukocytes cultured from peripheral blood. *Exp Cell Res* 1960;20:613-16.
94. Huntly BJ, Bench A, Gren AR. Double jeopardy from a single translocation: deletions of the derivative chromosome 9 in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2003;102:1160-68.
95. Yakut T, Gülten T. Çocukluk dönemi lösemilerindeki genetik değişiklikler ve klinik önemi. *Uludağ Ünv. Tıp Fak. Derg.* 2005;31:57-62.
96. Başaran N. Teorik ve pratik Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH). Eskişehir: Kurs kitapçığı; 1996.
97. <http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Stonestret/howitworks.htm> Erişim Tarihi:18.04.09
98. Koo SH, Kwon GC, Chun HJ, Park JW. Cytogenetic and fluorescence in situ hybridization analyses of hematologic malignancies in Korea. *Cancer Genet and Cytogenet* 1998;101:1-6.
99. Bayani J, Squire JA. Fluorescence in situ hybridization (FISH). *Curr Protoc Cell Biol* 2004;23:22.4.1-22.4.51.
100. McNeil N, Ried T. Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: technology and applications in molecular medicine. *Expert Rev Mol Med* 2000;2:1-14.
101. Ma SK, Wan TSK, Chan LC. Cytogenetics and molecular genetics of childhood leukemia. *Hematological Oncology* 1999;17:91-105.
102. Hughes T. ABL kinase inhibitor therapy for CML: base line assessments and response monitoring. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006:211-8.
103. Landstrom AP, Tefferi A. Fluorescent in situ hybridization in the diagnosis, prognosis, and treatment monitoring of chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2006;47:397-402.
104. Faderl S, Hochhaus A, Hughes T. Monitoring of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2004;18:657-70, ix-x.
105. Iacobucci I, Saglio G, Rosti G, Testoni N, Pane F, Amabile M, et al. Achieving a major molecular response at the time of a complete cytogenetic response (CCgR) predicts a better duration of CCgR in imatinib-treated chronic myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res* 2006;12:3037-42.

106. Ou J, Vergilio JA, Bagg A. Molecular diagnosis and monitoring in the clinical management of patients with chronic myelogenous leukemia a treated with tyrosine kinase inhibitors. *Am J Hematol* 2008;83:296-302.
107. Kaeda J, Chase A, Goldman JM. Cytogenetik and molecular monitoring of residual disease in chronic myeloid leukemia. *Acta Hematologica* 2002; 107:64-75.
108. Temizkan G, Arda N. Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler. 2. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2004.
109. Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 1996;6:995-1001.
110. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000;25:169-93.
111. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, et al. The real-time polymerase chain reaction *Mol Aspects Med* 2006;27:95-125.
112. Kubista M, A Stalberg A, Bar T. Light-up probe based real-time Q-PCR. In: Raghavachari R, Tan W (eds). *Genomics and proteomics technologies*. 1st edition. Proceedings of SPIE; Bellingham, WA: International society of optical engineering; 2001.53-8.
113. van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: Principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003;17:1013-34.
114. Cacherill FR, Uhl JR. Applications and challenges of Real-Time PCR for the clinical microbiology laboratory. In: Reischl U, Wittwer C, Cockerill FR (eds). *Rapid Cycle Real-Time PCR. Methods and Applications*. 1st edition. Heidelberg: Springer Verlag; 2001.11.
115. Gut M, Leutenegger CM, Huder JB, Pedersen NC, Lutz H. One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses. *J Virol Methods* 1999;77:37-46.
116. Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol* 1996;14:303-8.
117. Chaplin BE, Rasmussen RP, Bernard PS, Wittwer CT. LightCycler™ hybridization probes the most direct way to monitor PCR amplification and mutation detection. *Biochemica* 1999;1:5-8.
118. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997;22:130-1, 134-8.
119. http://www.thd.org.tr/doc/kurs_pdf/mugeaydinsayitoglu.pdf
120. Kantarjian H, Schiffer C, Jones D, Cortes J. Monitoring the response and course of chronic myeloid leukemia in the modern era of BCRABL tyrosine kinase inhibitors: practical advice on the use and interpretation of monitoring methods. *Blood* 2008;111:1774-80.
121. Baccarani M, Rosti G, de Vivo A, et al. A randomized study of interferon-alpha versus interferon-alpha and low-dose ara-binosyl cytosine in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2002;99:1527-35.

122. Guilhot F, Chastang C, Michallet M, et al. Interferon alfa-2B combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 1997;337:223-9.
123. Baker DE. Imatinib mesylate. *Rev Gastroenterol Disord* 2002;2:75-86.
124. Druker BJ. Imatinib and chronic myeloid leukemia: validating the promise of molecularly targeted therapy. *Eur J Cancer* 2002;38:70-76.
125. Deshmukh C, Saikia T, Bakshi A, Amare-Kadam P, Baisane C, Parikh P. Imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia: a prospective, single arm, non-randomized study. *J Assoc Physicians India* 2005;53:291-5.
126. Latagliata R, Breccia M, Carmosino I, et al. Elderly patients with Ph+ chronic myelogenous leukemia (CML): results of imatinib mesylate treatment. *Leuk Res* 2005;29:287-91.
127. Thiesing JT, Ohno-Jones S, Kolibaba KS, Druker BJ. Efficacy of STI571, an abl tyrosine kinase inhibitor, in conjunction with other antileukemic agents against bcr-abl-positive cells. *Blood* 2000;96:3195-9.
128. Liu D, Seiter K, Mathews T, Madahar CJ, Ahmed T. Sweet's syndrome with CML cell infiltration of the skin in a patient with chronic-phase CML while taking Imatinib Mesylate. *Leuk Res* 2004;28:61-3.
129. Brouard M, Saurat JH. Cutaneous reactions to STI571. *N Engl J Med* 2001;345:618-9.
130. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001;344:1031-7.
131. Elliott MA, Mesa RA, Tefferi A. Adverse events after imatinib mesylate therapy. *N Engl J Med* 2002;346:712-3.
132. Esmaeli B, Prieto VG, Butler CE, Kim, et al. Severe periorbital edema secondary to STI571 (Gleevec). *Cancer* 2002;95:881-7.
133. Druker BJ. Circumventing resistance to kinase-inhibitor therapy. *N Engl J Med* 2006;354:2594-6.
134. Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, et al. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* 2006;354:2531-41.
135. Kantarjian H, Giles F, Wunderle L, et al. Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. *N Engl J Med* 2006;354:2542-51.
136. Apperley JF. Managing the patient with chronic myeloid leukemia through and after allogeneic stem cell transplantation. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006;226-32.
137. Goker H, Haznedaroglu IC, Chao NJ. Acute graft-vs-host disease: pathobiology and management. *Exp Hematol* 2001;29:259-77.
138. Gratwohl A, Hermans J, Goldman JM, et al. Risk assessment for patients with chronic myeloid leukaemia before allogeneic blood or marrow transplantation: Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Lancet* 1998;352:1087-92.
139. Passweg JR, Walker I, Sobocinski KA, et al. Validation and extension of the EBMT Risk Score for patients with chronic myeloid leukaemia

- receiving allogeneic haematopoietic stem cell transplants. *Br J Haematol* 2004;125:613-20.
140. De Souza CA, Vigorito AC, Ruiz MA, et al. Validation of the EBMT risk score in chronic myeloid leukemia in Brazil and allogeneic transplant outcome. *Haematologica* 2005;90:232-7.
 141. O'Brien SG, Deininger MW. Imatinib in patients with newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia. *Semin Hematol* 2003;40:26-30.
 142. Peggs K, Mackinnon S. Imatinib mesylate--the new gold Standard for treatment of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003;348:1048-50.
 143. Kantarjian H, Talpaz M, O'Brien S, et al. High-dose Imatinib Mesylate Therapy in Newly Diagnosed Philadelphia Chromosome-Positive Chronic Phase Chronic Myeloid Leukemia. *Blood* 2004;103:2873-8.
 144. Kantarjian H, Talpaz M, O'Brien S, et al. Prediction of initial cytogenetic response for subsequent major and complete cytogenetic response to imatinib mesylate therapy in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 2003;97:2225-8.
 145. Kantarjian HM, O'Brien S, Cortes J, et al. Imatinib mesylate therapy improves survival in patients with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in the chronic phase: comparison with historic data. *Cancer* 2003;98:2636-42.
 146. Kantarjian HM, Cortes JE, O'Brien S, et al. Imatinib mesylate therapy in newly diagnosed patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia: high incidence of early complete and major cytogenetic responses. *Blood* 2003;101:97-100.
 147. Kantarjian HM, Talpaz M, O'Brien S, et al. Dose escalation of imatinib mesylate can overcome resistance to standard-dose therapy in patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood* 2003;101:473-5.
 148. Rosti G, Martinelli G, Castagnetti F, et al. Imatinib 800 mg: preliminary results of a phase II trial of the GIMEMA CMLworking party in intermediate Sokal risk patients and status-of-the-art of an ongoing multinational, prospective randomized trial of Imatinib standard dose (400 mg daily) vs high dose (800 mg daily) in high Sokal risk patients [abstract]. *Blood* 2005;106:320a. Abstract no. 1098.
 149. Guerci A, Nicolini F, Maloisel F, et al. Randomized comparison of Imatinib with Imatinib combination therapies in newly diagnosed chronic myelogenous leukemia patients in chronic phase: design and first interim analysis of a phase II trial from the French CML group [abstract]. *Blood* 2005; 106:53a. Abstract no. 168.
 150. Zonder JA, Pemberton P, Brandt H, et al. The effect of dose increase of imatinib mesylate in patients with chronic or accelerated phase chronic myelogenous leukemia with inadequate hematologic or cytogenetic response to initial treatment. *Clin Cancer Res* 2003;9:2092-7.

151. Kantarjian H, Talpaz M, O'Brien S, et al. Dose escalation of imatinib mesylate can overcome resistance to standard-dose therapy in patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood* 2003;101:473-5.
152. Cortes J, Giles F, O'Brien S, et al. Result of highdose imatinib mesylate in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia after failure of interferon-alpha. *Blood* 2003; 102:83-6.
153. Kantarjian H, Talpaz M, O'Brien S, et al. High-dose imatinib mesylate therapy in newly diagnosed Philadelphia chromosomepositive chronic phase chronic myeloid leukemia. *Blood* 2004;103:2873-8.
154. Hughes T, Branford S, Reynolds J, et al. Higherdose Imatinib (600 mg/day) with selective intensification in newly diagnosed CML patients in chronic phase: cytogenetic response rates at 12 months are superior to IRIS [abstract]. *Blood*. 2004;104:286a. Abstract no. 1001.
155. Hughes TP, Branford S, Reynolds J, et al. Maintenance of Imatinib dose intensity in the first six months of therapy for newly diagnosed patients with CML is predictive of molecular response, independent of the ability to increase dose at a later point [abstract]. *Blood* 2005;106:51a. Abstract no. 164.
156. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003;348:994-1004.
157. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2006 ;355:2408-17.
158. Park J, Kim S, Oh C, Yoon SS, Lee D, Kim Y. Differential tyrosine phosphorylation of leukemic cells during apoptosis as a result of treatment with imatinib mesylate. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;336:942-51.
159. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 1996;25:561-6.
160. Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Muller M, Druker BJ, Lydon NB. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res* 1996;56:100-4.
161. le Coutre P, Mologni L, Cleris L, Marchesi E, Buchdunger E, Giardini R, Formelli F, Gambacorti-Passerini C. In vivo eradication of human BCR/ABL-positive leukemia cells with an ABL kinase inhibitor. *J Natl Cancer Inst* 1999;912:163-8.
162. Uziel O, Fenig E, Nordenberg J, Beery E, Reshef H, Sandbank J, Birenbaum M, Bakhanashvili M, Yerushalmi R, Luria D, Lahav M. Imatinib mesylate (Gleevec) downregulates telomerase activity and inhibits proliferation in telomerase-expressing cell lines. *Br J Cancer* 2005;9210:1881-91.

163. Gottschalk S, Anderson N, Hainz C, Eckhardt SG, Serkova NJ. Imatinib (STI571)-mediated changes in glucose metabolism in human leukemia BCR ABL-positive cells. *Clin Cancer Res* 2004;10:6661-8.
164. Legros L, Bourcier C, Jacquel A, Mahon FX, Cassuto JP, Auburger P, Pages G. Imatinib mesylate (STI571) decreases the vascular endothelial growth factor plasma concentration in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 2004;104:495-501.
165. Thiele J, Kvasnicka HM, Schmitt-Graeff A, et al. Bone marrow changes in chronic myelogenous leukaemia after long-term treatment with the tyrosine kinase inhibitor STI571:an immunohistochemical study on 75 patients. *Histopathology* 2005;46:540-50.
166. Kvasnicka HM, Thiele J, Staib P, Schmitt-Graeff A, Griesshammer M, Klose J, Engels K, Kriener S. Reversal of bone marrow angiogenesis in chronic myeloid leukemia following imatinib mesylate (STI571) therapy. *Blood* 2004;103:3549-51.
167. Bueso-Ramos CE, Cortes J, Talpaz M, O'Brien S, Giles F, Rios MB, Medeiros LJ, Kantarjian H. Imatinib mesylate therapy reduces bone marrow fibrosis in patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 2004;101:332-6.
168. Kalayoglu S. Tirozin kinaz inhibitörleri ve tedavide kullanımları. *ANKEM* 2005;19:117-22.
169. Koca E, Haznedaroglu IC. Kronik Miyelositer Lösemi. *Türkiye Klinikleri Dahili Tıp Bilimleri* 2007;3:56-61.
170. Huse M, Kuriyan J. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* 2002;109:275-82.
171. Nagar B, Bornmann WG, Pellicena P, et al. Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res* 2002;62:4236-43.
172. Lydon NB, Druker BJ. Lessons learned from the development of imatinib. *Leuk Res* 2004;28 Suppl 1:S29-38.
173. Savage DG, Antman KH. Imatinib mesylate-a new oral targeted therapy. *N Engl J Med* 2002;346:683-93.
174. Litzow MR. Imatinib resistance obstacles and opportunities. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130:669-79.
175. Wei Y, Hardling M, Olsson B, et al. Not all imatinib resistance in CML are BCR-ABL kinase domain mutations. *Ann Hematol* 2006; 85: 841-7.
176. Mahon FX, Deininger MW, Schultheis B, et al. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood* 2000;96:1070-9.
177. Larghero J, Leguay T, Mourah S, et al. Relationship between elevated levels of the alpha 1 acid glycoprotein in chronic myelogenous leukemia in blast crisis and pharmacological resistance to imatinib (Gleevec) in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol* 2003;66:1907-13.
178. Hochhaus A, La Rosee P. Imatinib therapy in chronic myelogenous leukemia: strategies to avoid and overcome resistance. *Leukemia* 2004;18:1321-31.

179. Hochhaus E, Ernst M. Resistance to targeted therapy in Chronic Myelogenous Leukemia. *Semin Hematol* 2007;44:15–24.
180. Apperley JF. Part I. Mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol* 2007;8:1018–29.
181. Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2005; 105:2640–53.
182. Nardi V, Azam M, Daley GV. Mechanisms and implications of imatinib resistance mutations in BCR-ABL. *Current Opinion in Hematology* 2004;11:35–43.
183. Melo JV, Chuah C. Resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. *Cancer Letters* 2006;249:121–32.
184. Michele Baccarani, Jorge Cortes, Fabrizio Pane, et al. Chronic Myeloid Leukemia: An Update of Concepts and Management Recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol* 2009 ;27:6041-51.
185. O'Brien S. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Chronic Myelogenous Leukemia. Version 2.2010. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/cml.pdf . 22.05.2010.
186. Jabbour E, Cortes JE, Kantarjian HM. Molecular monitoring in chronic myeloid leukemia: response to tyrosine kinase inhibitors and prognostic implications. *Cancer* 2008;112:2112-8.
187. Jabbour E, Cortes JE, Kantarjian HM. Suboptimal response to or failure of imatinib treatment for chronic myeloid leukemia: what is the optimal strategy? *Mayo Clin Proc* 2009;84:161-9.
188. Ishikawa I, Kato C, Harigae H, Sugawara T, Tomiya Y, Yamada M, et al. Dose modification of imatinib by monitoring the level of BCRABL transcript in chronic myelogenous leukemia. *Tohoku J Exp Med* 2006;210:355-63.
189. Martinelli G, Iacobucci S, Soverini S, Cilloni D, Saglio G, Pane F, et al. Monitoring minimal residual disease and controlling drug resistance in chronic myeloid leukaemia patients in treatment with imatinib as a guide to clinical management. *Hematol Oncol* 2006;24:196-204.
190. Linke R, Dempke W. Management of imatinib-resistant CML patients. *Onkologie* 2007;30:574-80.
191. Pui C-H, Campana E. New definition of remission in 1 childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia* 2000;14:1483–5.
192. Szczepanski T, Orfao A, van der Velden V, et al. Minimal residual disease in leukaemia patients. *Lancet Oncol* 2001;2:409–17.
193. Moppett J, Burke GA, Steward CG. The clinical relevance of detection of MRD in childhood ALL. *J Clin Pathol* 2003;56:249–53.
194. Smith OP, Han IM. Clinical features and therapy of lymphoblastic leukemia.. In: Arceci RJ, Hann IM, Smith OP (eds). *Pediatric hematology*. 3rd edition. Oxford: Blackwell Publishing; 2006, 450-82.
195. Branford S. Chronic myeloid leukemia: molecular monitoring in clinical practice. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007;2007:376-83.

196. Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet* 2007;370:342-50.
197. Cazzaniga G, Gaipa G, Rossi V, Biondi A. Monitoring of minimal residual disease in leukemia, advantages and pit falls. *Ann Med* 2006;38:512-21.
198. Baran Y, Gündüz U. Kronik Miyelositer lösemi genetiği. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2007;3:50-5.
199. McNeil, N., Ried, T. Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangement: technology and applications in molecular medicine. *Expert Rev Mol Med* 2000;2:1-14.
200. Zhang T, Grenier S, Nwachukwu B, Wei C, Lipton JH, Kamel-Reid S. Inter-laboratory comparison of chronic myeloid leukemia minimal residual disease monitoring: summary and recommendations. *J Mol Diagn* 2007;9: 421-30.
201. Muller MC, Erben P, Saglio G, et al. Harmonization of BCR-ABL mRNA quantification using a uniform multi functional control plasmid in 37 international laboratories. *Leukemia* 2008;22:96-102.
202. Wang YL, Lee JW, Cesarman E, Jin DK, Csernus B. Molecular monitoring of chronic myelogenous leukemia: identification of the most suitable internal control gene for real-time quantification of BCR-ABL transcripts. *J Mol Diagn* 2006;8:231-9.
203. Lundán T, Juvonen V, Mueller MC, Mustjoki S, Lakkala T, Kairisto V, Hochhaus A, Knuutila S, Porkka K. Comparison of bone marrow high mitotic index metaphase fluorescence in situ hybridization to peripheral blood and bone marrow real time quantitative polymerase chain reaction on the International Scale for detecting residual disease in chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 2008;93:178-85.
204. Bao F, Munker R, Lowery C, Martin S, Shi R, Veillon DM, Cotelingam JD, Nordberg ML. Comparison of FISH and quantitative RT-PCR for the diagnosis and follow-up of BCR-ABL-positive leukemias. *Mol Diagn Ther* 2007;11:239-45.
205. Tchirkov A, Giollant M, Tavernier F, et al. Interphase cytogenetics and competitive RT-PCR for residual disease monitoring with chronic myeloid leukaemia during interferon- α therapy. *Brit J Haematol* 1998; 101: 552-7.
206. Raanani P, Ben-Bassat I, Gan S, et al. Assessment of the response to imatinib in chronic myeloid leukemia patients— comparison between the FISH, multiplex and RT-PCR methods. *Eur J Haematol* 2004;73: 243–50.
207. Kim YJ, Kim DW, Lee S, et al. Comprehensive comparison of FISH, RT-PCR, and RQ-PCR for monitoring the BCR-ABL gene after hematopoietic stem cell transplantation in CML. *Eur J Haematol* 2002; 68: 272-80.
208. Beyhan D, Olga MA, Şule Y, Muhsin Ö, Zafer G, Sevilhan A. Bcr-Abl Pozitif Lösemilerde Klasik Sitogenetik, Fish ve Rt-pcr Analizlerinin Karşılaştırılması. *Osmangazi Tıp Dergisi* 2008;30:1-9.
209. Cross NC. Minimal residual disease in chronic myeloid leukemia. *Hematol Cell Ther* 1998;40:224-8.

210. Larson RS, Wolff SN. Chronic Myeloid Leukemia. In: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM (eds). *Wintrobe's Clinical Hematology Egypt: Middle East Edition*;1999. 2342
211. Cox MC, Maffei L, Buffolino S, et al. A competitive analysis of FISH, RT-PCR and cytogenetics for the diagnosis of bcr-abl-positive leukemias. *Am J Clin Pathol* 1998;109:24-31.
212. Campbell LJ, Martinow A, Michael PM, et al. Correlation of cytogenetics, BCR-ABL PCR studies and fluorescence in situ hybridisation (FISH) in adult lymphoblastic leukemia. *Aust NZ J Med* 1999; 29: 707-12.
213. Hughes T. ABL kinase inhibitor therapy for CML: baseline assessments and response monitoring. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006, 211-8.
214. Cross NC. Assessing residual leukaemia. *Baillieres Clin Haematol* 1997;10:389-403.
215. Duba HC, Peter S, Hilbe W, Fluckinger T, Fridrik M, Erdel M, Thaler J, Utermann G. Monitoring of remission status by fluorescence in situ hybridisation in chronic myeloid leukaemia patients treated with interferon-alpha. *Int J Oncol* 1999;14:145-50.
216. Chase A, Grand F, Zhang JG, Blackett N, Goldman J, Gordon M. Factors influencing the false positive and negative rates of BCR-ABL fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;18:246-53.
217. Brizard F, Chomel JC, Veinstein A, Rivet J, Giraud C, Kitzis A, Guilhot F, Brizard A. Does BCR-ABL genomic rearrangement persist in CML patients in complete remission after interferon alpha therapy? *Leukemia* 1998;12:1076-80.
218. Chomel JC, Brizard F, Veinstein A, Rivet J, Sadoun A, Kitzis A, Guilhot F, Brizard A. Persistence of BCR-ABL genomic rearrangement in chronic myeloid leukemia patients in complete and sustained cytogenetic remission after interferon-alpha therapy or allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2000;95:404-8.
219. Wang YL, Bagg A, Pear W, Nowell PC, Hess JL. Chronic myeloid leukemia: laboratory diagnosis and monitoring. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;32:97-111.
220. Hochhaus A. Minimal residual disease in chronic myeloid leukaemia patients. *Best Pract Res Clin Haematol* 2002;15:159-78.
221. Kaeda J, Chase A, Goldman JM. Cytogenetic and molecular monitoring of residual disease in chronic myeloid leukaemia. *Acta Haematol* 2002;107:64-75.
222. Mensink E, van de Locht A, Schattenberg A, et al. Quantitation of minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukaemia patients using real-time quantitative RT-PCR. *Br J Haematol* 1998; 102:768-74.
223. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003 348:994-1004.

224. Kantarjian HM, Talpaz M, Cortes J, et al. Quantitative polymerase chain reaction monitoring of BCR–ABL during therapy with imatinib mesylate (STI571; Gleevec) in chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2003;9:160–6.
225. Shah NP, Nicoll JM, Wang JQ, et al. Quantitative RT-PCR using minor groove binder (MGB) probes demonstrates that Gleevec can induce minimal residual disease states and molecular remissions in a subset of patients with chronic myelogenous leukemia (CML). *Blood* 2001;98:613a
226. Buno I, Wyatt WA, Zinsmeister AR, Dietz-Band J, Silver RT, Dewald GW. A special fluorescent in situ hybridization technique to study peripheral blood and assess the effectiveness of interferon therapy in chronic myeloid leukemia. *Blood* 1998;92:2315–21.
227. Duba HC, Peter S, Hilbe W, Fluckinger T, Fridrik M, Erdel M, Thaler J, Utermann G. Monitoring of remission status by fluorescence in situ hybridisation in chronic myeloid leukaemia patients treated with interferon-alpha. *Int J Oncol* 1999;14:145–50.
228. Reinhold U, Hennig E, Leiblein S, Niederwieser D, Deininger MW. FISH for BCR–ABL on interphases of peripheral blood neutrophils but not of unselected white cells correlates with bone marrow cytogenetics in CML patients treated with imatinib. *Leukemia* 2003;17:1925–29.
229. Le Gouill S, Talmant P, Milpied N, et al. Fluorescence in situ hybridization on peripheral blood specimens is a reliable method to evaluate cytogenetic response in chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2000;18:1533–38.
230. Yanagi M, Shinjo K, Takeshita A, et al. Simple and reliably sensitive diagnosis and monitoring of Philadelphia chromosome-positive cells in chronic myeloid leukemia by interphase fluorescence in situ hybridization of peripheral blood cells. *Leukemia* 1999;13:542–52.
231. Lesser ML, Dewald GW, Sison CP, Silver RT. Correlation of three methods of measuring cytogenetic response in chronic myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;137:79–84.
232. Radich JP, Gehly G, Gooley T, et al. Polymerase chain reaction detection of the BCR–ABL fusion transcript after allogeneic marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: results and implications in 346 patients. *Blood* 1995;85:2632–38.
233. Verschraegen CF, Talpaz M, Hirsch-Ginsberg CF, et al. Quantification of the breakpoint cluster region rearrangement for clinical monitoring in Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia. *Blood* 1995;85:2705–10.
234. Stock W, Yu D, Karrison T, et al. Quantitative real-time RT-PCR monitoring of BCR–ABL in chronic myelogenous leukemia shows lack of agreement in blood and bone marrow samples. *Int J Oncol* 2006;28:1099–103.
235. Markt S, Marin D, Foot N, et al. Chronic myeloid leukemia in chronic phase responding to imatinib: the occurrence of additional cytogenetic abnormalities predicts disease progression. *Blood* 2002;100:785a (Abstract 3104).

236. Bumm T, Muller C, Al-Ali HK et al. Emergence of clonal cytogenetic abnormalities in Ph- cells in some CML patients in cytogenetic remission to imatinib but restoration of polyclonal hematopoiesis in the majority. *Blood* 2003;101:1941–49.
237. O'Dwyer ME, Gatter KM, Loriaux M, et al. Demonstration of Philadelphia chromosome negative abnormal clones in patients with chronic myelogenous leukemia during major cytogenetic responses induced by imatinib mesylate. *Leukemia* 2003;17:481–7.
238. Medina J, Kantarjian H, Talpaz M, et al. Chromosomal abnormalities in Philadelphia chromosomenegative metaphases appearing during imatinib mesylate therapy in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Cancer* 2003;98:1905–11.
239. Feldman E, Najfeld V, Schuster M, Roboz G, Chadburn A, Silver RT. The emergence of Ph-, trisomy-8+ cells in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate. *Exp Hematol* 2003;31:702–7.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının hazırlanmasında destek ve katkılarından dolayı tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Tahsin Yakut'a ve uzmanlık eğitimim boyunca yetişmemde emeklerini esirgemeyen değerli hocalarım; başta Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Tahsin Yakut olmak üzere, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nın saygıdeğer öğretim üyeleri Sayın Yrd. Doç. Dr. Tuna Gülten ve Yrd. Doç. Dr. Hakan Cangül'e; birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma; tez çalışmasının yürütülmesinde desteklerinden dolayı tez sorumlu araştırmacısı Hematoloji Bilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Rıdvan Ali başta olmak üzere Hematoloji Bilim Dalındaki tüm hocalarıma; eğitimim süresince benden yardımlarını esirgemeyen ve birçok paylaşımda bulunduğum Tıbbi Genetik Anabilim Dalı personel ve çalışma arkadaşlarıma, eğitim hayatım boyunca benden desteklerini esirgemeyen ve hep yanımda olan annem, babam ve ablama; desteğini her zaman hissettiğim değerli eşim Dr. Saim Sağ'a ve biricik kızım Ayşe Melis Sağ'a teşekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

AD,SOYAD: Şebnem ÖZEMRİ SAĞ
ADRES: Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim
Dalı, Görükle, Bursa
DOĞUM TARİHİ: 29 Temmuz 1977
DOĞUM YERİ: Bursa
MEDENİ HALİ: Evli
TELEFON : +90224 2954398
E-mail: ozemri@uludag.edu.tr
DİPLOMA NO: 01392064
YABANCI DİLİ: İngilizce

ÖĞRENİM DURUMU:

1983-1988 Atatürk İlkokulu, Bursa.
1988-1994 Bursa Kız Lisesi, Bursa
1994-2001 Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi(İngilizce), Ankara
2002-2003 Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı
2003-2004 Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve
Hastalıkları Anabilim Dalı
2004-2005 Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı
Ağustos 2005- Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim
Dalı'nda uzmanlık eğitime başladım. Halen araştırma
görevlisi olarak çalışmaktayım.