



**T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**İMATİNİB TEDAVİSİ ALAN KRONİK MYELOSİTER LÖSEMİ
HASTALARINDA T315I, F317L, E255K ve Y253H BCR-ABL
GEN MUTASYONLARININ ÖNEMİ**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Cem KİS
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Mustafa PEHLİVAN
EYLÜL – 2008**

**T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**İMATİNİB TEDAVİSİ ALAN KRONİK MYELOSİTER LÖSEMİ
HASTALARINDA T315I, F317L, E255K ve Y253H BCR-ABL
GEN MUTASYONLARININ ÖNEMİ**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Cem Kis
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Mustafa Pehlivan**

**Bu tez, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından TF.08.01
proje numarası ile desteklenmiştir.**

TEZ ONAY SAYFASI

T.C.
GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

İMATİNİB TEDAVİSİ ALAN KRONİK MYELOSİTER LÖSEMİ HASTALARINDA T315I, F317L, E255K, ve Y253H BCR-ABL GEN MUTASYONLARININ ÖNEMİ

Dr. Cem Kis

05.09.2008

Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı

(İmza).....
Tıp Fakültesi Dekanı

Bu tez çalışmasının "Tıpta Uzmanlık" derecesine uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

(İmza)
Prof.Dr.Celalettin USALAN
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile "Tıpta Uzmanlık" tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

(İmza)
Doç. Dr. Mustafa PEHLİVAN
Tez Danışmanı

TEZ JÜRİSİ:

- 1. Prof. Dr. Celalettin Usalan**
- 2. Doç. Dr. Mustafa Pehlivan**
- 3. Doç. Dr. Mehmet Koruk**
- 4. Doç. Dr. Mustafa Namıduru**
- 5. Doç. Dr. Serdar Soyduñ**

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleşmesi için gerekli ortamı hazırlayan ve araştırmanın planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarda bana danışmanlık yaparak yardımlarını esirgemeyen tez hocam Doç.Dr.Mustafa Pehlivan'a, İç Hastalıkları A.D. Başkanı Prof. Dr. Celalettin USALAN'a, Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D. öğretim üyesi Doç. Dr. Sacide Pehlivan, Araştırma görevlisi Tuğçe Sever'e çalışma arkadaşlarıma, eşime ve beni büyütüp bu aşamaya getiren aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Dr. Cem Kis
Gaziantep-2008

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
KISALTMALAR	VII
TABLO LİSTESİ	VIII
ŞEKİL LİSTESİ	IX
RESİM LİSTESİ	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. TANIM	3
2.2. ETYOLOJİ VE EPİDEMİYOLOJİ	3
2.3. PATOGENEZ	3
2.4. BCR VE ABL GENİNİN YAPISI	5
2.5. BCR VE ABL TRANSLOKASYONUNUN MOLEKÜLER ANATOMİSİ	6
2.6. BCR-ABL GENİNİN KONTROL ETTİĞİ MALİGN TRANSFORMASYON MEKANİZMALARI	7
2.6.1. BCR-ABL Proteini	7
2.6.2. ABL Tirozin Kinaz Aktivitesinin Kontrolü	8
2.6.2.1. BCR/ABL Pozitif Hücrelerin Aktif Sinyal İleti Yolları	8
2.6.3. Adhezyon Özelliklerinin Değişmesi	9
2.6.4. Mitoz Sinyal İleti Yollarının Aktivasyonu	9
2.6.4.1. RAS ve MAP Kinaz Yolları	9
2.6.4.2. JAK ve STAT Yolu	10
2.6.4.3. PI-3 Kinaz Yolu	10

	Sayfa
2.6.4.4. MYC Yolu	10
2.6.4.5. Apoptozisin Önlenmesi	10
2.7. KML'DE KLİNİK ÖZELLİKLER	11
2.8. LABORATUVAR BULGULARI	12
2.9. TANI	12
2.9.1. Kronik Faz	13
2.9.1.1. Periferik Kan Bulguları	13
2.9.1.2. Kemik İliği Bulguları	13
2.9.1.3. Sitogenetik İnceleme Bulguları	13
2.9.1.4. Moleküler İnceleme	14
2.9.1.5. Ekstramedüller Hastalık	14
2.9.2. Akselere Faz	14
2.9.3. Blastik Faz	14
2.10. AYIRICI TANI	15
2.10.1. Lökomoid reaksiyon	15
2.10.2. Lökoeitroblastik reaksiyon	15
2.10.3. Atipik (Ph-negatif) KML	15
2.10.4. Kronik miyelomonositer lösemi	15
2.10.5. Akut Lösemiler	15
2.11. KML-TEDAVİ	16
2.11.1. Konvansiyonel Kemoterapi	16
2.11.2. İnterferonlar (IFN)	16
2.11.3. Allogenik Kök Hücre Transplantasyonu	17
2.11.4. İmatinib	17
2.11.4.1. İmatinib Direnci	20
2.11.4.2. BCR-ABL Nokta Mutasyonları	21
2.11.5. İkinci Kuşak Tirozin Kinaz İnhibitörleri	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25

	Sayfa
3.1. Hasta ve Kontrol Grubu	25
3.2. Yöntem	25
3.2.1. DNA İzalasyonu	25
3.2.2. ASO-PCR	27
3.3. İstatistiksel Analiz	33
4. BULGULAR	34
5. TARTIŞMA	44
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	48
7. KAYNAKLAR	49

ÖZET
İMATİNİB TEDAVİSİ ALAN KRONİK MYELOSİTER LÖSEMİ HASTALARDA
T315I, F317L, E255K ve Y253H BCR-ABL GEN MUTASYONLARININ ÖNEMİ

Dr.Cem Kis
Uzmanlık Tezi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mustafa Pehlivan
Eylül 2008, 56 sayfa

Kronik Myelositer Lösemi (KML); Philadelphia translokasyonunun t (9;22) (q34;q11) varlığı ile karakterize BCR ve ABL genlerinin füzyonu ile sonuçlanan malign hemotopoetik bir kök hücre hastalığıdır. KML’de İmatinib tedavisi etkin bir tedavi olmasına karşın, hastalarda gözlenen en önemli sorun birincil ve zamanla kazanılmış dirençtir.

Bu çalışmada 2 merkezde 2000-2008 tarihleri arasında izlenen 54 kronik faz KML hastasında; literatürde ABL geninde en sık gözlenen (imatinib bağlanma bölgesinde bulunan) T315I, F317L ve Y253H ve genin P-loop fosfat bağlanma bölgesinde bulunan E255K mutasyonları Allel Spesifik Oligonükleotit-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (ASO-PCR) ile taranmış ve mutasyon doğrulamaları SSCP yöntemi ile yapılmıştır. Belirlenen mutasyonlar klinik verilerle değerlendirilmiştir.

Hastaların 12’si erkek, 42’si kadın olup medyan yaş 44.5 (19–78)’dur. Tanıda Sokol risk sınıflamasına göre; hastaların 12’si (%22.2) düşük riskli, 26’sı (% 48.1) orta riskli ve 16’sı (%29.6) yüksek riskli gruptadır. Medyan imatinib kullanım süresi 1.8 (0.3–7) yıldır. İmatinib tedavi yanıtı değerlendirildiğinde; hastaların 24’ü (%44.4) optimal yanıtı, 10’u (%18.5) suboptimal yanıtı 20’si (%37) ise yanıtız olarak değerlendirilmiştir. Medyan total ve progresyonsuz yaşam sürelerine henüz ulaşılmamış olup, 7 yılda beklenen total sağkalım %96, progresyonsuz sağkalım %80 bulunmuştur. Taranan mutasyonlar hastaların 18’inde (%33.3) belirlenmiş olup sırası ile T315I 11 (20.3) ve F317L 9 (%16.6) hastada saptanırken, Y253H ve E255K mutasyonları bulunmamıştır. Mutasyon belirlenen hastaların 2 (%3.7)’sinde T315I ve F317L mutasyonu birlikteliği saptanmıştır. Yanıtız hastaların %60’ın da mutasyon saptanmıştır (p=0.004). Mutasyon saptanan hastalarda 7 yıllık PFS %62 mutasyon saptanmayanlarda ise % 90 olarak bulunmuştur (p=0.041). T315I mutasyonu saptanan hastalar AKİT’e yönlendirilirken F317L mutasyonu olanlar da nilotinib veya dasatinib tedavisine geçilmiştir.

Optimal tedavi şeklinin belirlenmesi açısından; KML hastalarında direnç erken dönemde tanımlanmalı, mutasyon tipi belirlenerek mutasyona göre rasyonel tedavi şekli planlanmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Kronik Myeloid Lösemi, BCR-ABL Nokta Mutasyonu, İmatinib

Bu çalışma Gaziantep Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.
 Proje no TF 08.01

ABSTRACT
THE IMPORTANCE OF T315I, F317L, E255K AND Y253H BCR-ABL GENE
MUTATIONS IN THE PATIENTS OF CHRONIC MYELOID LEUKEMIA WHO
TREATED BY IMATINIB.

Dr.Cem Kis

Residency Thesis, Department of Internal Medicine

Supervisor. Assoc. Prof. MD. Mustafa Pehlivan

September 2008, 56 pages

Chronic Myeloid Leukemia (CML); is a Malign Hemotopoetic stem cell disease which concluded by the fusions of BCR and ABL genes. It is characterized by the existence of the Philedelphia translocations t (9;22) (q34;q11). In spite of Imatinib is an effective treatment for CML, the important problem that is seen by at the patients is primary and secondary resistance.

In this study, the 54 chronic phase CML patients observed in two centre between 2000-2008, mostly observed (in the place of imatinib connection) T315I, F317L, Y253H mutations in ABL gene and E255K mutation observed in the gene's connection place of P-loop phosphate are scanned by the method of allele specific oligonükleotit-polimeraz chain reaction (ASO-PCR) and proved by the SSCP method.

12 of patients are men and 42 of patients are women and the median age of the patients are 44.5 (19-78). According to the Sokol classification in diagnosis; 12 of patients (22.2%) are low risky, 26 of them (48.1%) are middle risky and 16 of them (29.6%) are in high risky group. Median imatinib usage time is 1.8 (0.3-7) year. When imatinib treatment response is evaluated; the 24 (%44.4) of the patients are optimal response, 10 (18.5%) of the patients are suboptimal response and 20 (37%) of them have resistance.

Median overall survival (OS) and progression free survival (PFS) can not be obtained yet. Expected values in 7 years are found as 96% for OS and 80% for PFS. Scanned mutations are observed in 18 (33.3%) of the patients. Despite T315I is observed in 11 (20.3%) and F317L is in 9 (16.6%) patients, Y253H and E255K mutations did not observe. In 2 (3.7%) of the mutation determined patients, T315I and F317L mutations are observed together. Mutations are determined in 60% of the resistance patients (p=0.004). 7 years PFS is found as 62% in mutation determined patients and 90% in mutation undetermined patients (p=0.041). While T315I mutation observed patients guided to AKIT, F317L mutation observed patients are started to nilotinib and dasatinib treatment.

To determine the optimal treatment type; resistance should be identified in early stages in CML patients, rational treatment type should be planned according to the determined mutation type.

Keywords: Chronic Myeloid Leukemia, BCR-ABL Nokta Mutasyonu, Imatinib

This study is supported by the Gaziantep University Research Fund (TF 08.01).

KISALTMALAR

Abl	Abelson
Akt	Serin-tirozin kinaz
ATP	Adenozin trifosfat
ASO-PCR	Allel spesifik oligonükleotit-polimeraz zincir reaksiyonu
BCR	Breakpoint cluster region
CCR	Complek sitogenetik yanıt
DD-ARAC	Düşük doz sitozin arabinozid
DNA	Deoksi ribonükleik asit
Dntp	Deoksi ribonükleotit trifosfat
FISH	Floresan insutu hibridizasyon
GDP	Guanidin difosfat
GTP	Guanidin trifosfat
Grb-2	Growth faktör reseptör bağlanma proteini
Hgb	Hemoglobin
IFN	İnterferon
KML	Kronik myeloid lösemi
Myc	Myelositomatozis onkogeni
MSY	Majör sitogenetik yanıt
NF-κb	Nükleer faktör kapa beta
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
Ph	Philadelphia kromozomu
PI-3	Fosfotidilinositol-3
Plt	Trombosit
STAT	Sinyal transducer and activator of transcription
THY	Tam hematolojik yanıt
TSY	Tam sitogenetik yanıt
JAK	Janus ailesi kinazlar

TABLO LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1: KML ile lökomoid reaksiyonun ayrımı	15
Tablo 2: KML'de yanıt değerlendirilmesi	19
Tablo 3: KML'de prognozu belirlemede kullanılan risk skoru	19
Tablo 4: İmatinibe yanıtın değerlendirilmesi	20
Tablo 5: ABL kinaz bölgesi mutasyonları	23
Tablo 6: ASO-PCR'da kullanılan primerlerin dizileri	29
Tablo 7: T315I mutasyonu için PCR koşulları	29
Tablo 8: T315I mutasyonu için PCR şartları	30
Tablo 9: E255K ve Y253H mutasyonları için PCR koşulları	30
Tablo10: E255K ve Y253H mutasyonları için PCR şartları	31
Tablo11: F317L mutasyonu için PCR koşulları	31
Tablo12: F317L mutasyonu için PCR şartları	32
Tablo13: ABL kinaz bölgesinde ki nokta mutasyonlarının tayin teknolojileri	32
Tablo14: Kronik Faz Kronik myelositer lösemili hastaların tanıda klinik özellikleri	35
Tablo15: İmatinib tedavisi alan kronik faz kronik myeloid lösemili hastaların klinik özellikleri	36
Tablo16: KF- KML'de klinik parametrelerin sağkalım üzerine etkisi (Logrank test)	38
Tablo17: T315I BCR-ABL nokta mutasyonu ile klinik parametrelerin karşılaştırılması	41
Tablo18: F317L BCR-ABL nokta mutasyonu ile klinik parametrelerin karşılaştırılması	42
Tablo19: Mutasyonlar ile diğer klinik parametrelerin karşılaştırılması	43

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1: Philadelphia kromozomu; t (9;22) (q34;q11)	4
Şekil 2: BCR-ABL otofosforilasyonla hücre proliferasyonu, matürasyonu, apoptoz ve adezyonunda yer alan sinyal odaklarını aktive ederek malign hücre proliferasyonuna yol açar.	4
Şekil 3: ABL protein yapısı	6
Şekil 4: BCR protein yapısı	6
Şekil 5: KML'de t(9;22)(q34;q11) translokasyonu	7
Şekil 6: DNA izolasyonunun aşamaları	26
Şekil 7: Allel spesifik oligonükleotit PCR işleyiş mekanizması	28
Şekil 8: İmatinib kullanan hastalarda 7 yıllık sağkalım olasılığı ilişkisi	36
Şekil 9: T315I mutasyonunun progresyonsuz sağkalım üzerine etkisi	39

RESİM LİSTESİ

	Sayfa
Resim 1: BCR-ABL'nin tetiklediği sinyal iletim yolları	8
Resim 2: GeneXpert DX System ph negatif sonuç. ABL: İnternal PCR kontrolü BCR-ABL: Transkript PCR ürünü	12
Resim 3: GeneXpert DX System ph pozitif sonuç. ABL: İnternal PCR kontrolü BCR-ABL: Transkript PCR ürünü	13
Resim 4: ABL'nin İmatinib bağlanma bölgesinin kristal yapısı	20
Resim 5: T315I BCR-ABL nokta mutasyonuna ait jel görüntüsü. M: Marker N: Normal M: mutant,1,3,4 nolu örneklerde normal primerlerle amplifikasyon var, mutant primerleri yok. 2 nolu örnekte hem mutant hem normal bölgede amplifikasyon var.	39
Resim 6: F317L BCR-ABL nokta mutasyonuna ait jel görüntüsü. M: Marker N: Normal M:mutant,1,2,3,4 nolu örneklerde normal primerlerle amplifikasyon var, mutant primerleri yok.	40
Resim 7: E255K ve Y253H BCR-ABL nokta mutasyonuna ait jel görüntüsü. M: Marker N: Normal M:mutant,1,2,3,4 nolu örneklerde normal primerlerle amplifikasyon var, mutant primerleri yok.	40

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik myelositer lösemi (KML) tek bir pluripotent kök hücrenin malign transformasyonu ile meydana gelen klonal bir hastalıktır. İmatinib 1998'den itibaren çeşitli faz I ve faz II çalışmaya konu olmuş, İnterferon (INF) dirençli kronik faz KML olguları yanında akselere veya blastik fazdaki olgularda da etkisi ve güvenilirliği gösterilmiş ve ilk tedavi aracı olarak kullanılmaya girmiştir. İmatinib Abelson (Abl)-özgü tirozin kinazı inhibe eden ve signal transduction inhibitör olarak da bilinen bir 2-phenyl-aminopyrimidine türevidir. Ayrıca trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü ve kök hücre faktörünü de inhibe eder (1). İmatinib kullanımında gözlenen en önemli sorun birincil veya akkiz dirençtir. Birincil direnç 3. ayda tam hematolojik yanıt (THY) ve 6. ayda majör sitogenetik yanıt (MSY) veya 12. ayda tam sitogenetik yanıt (TSY) elde edilememesi olarak tanımlanır (2). Kazanılmış direnç ise elde edilen hematolojik, sitogenetik veya moleküler yanıtın kaybolmasıdır (3). İmatinib esas olarak Adenozin Trifosfat (cABL-ATP) bağlanma bölgesinin bir inhibitörüdür. Bu nedenle Breakpoint Cluster Region (BCR)-ABL kinaz bölgesinde mutasyonlar imatinib bağlanmasını engeller. BCR-ABL'de kinaz bölgesi mutasyonları kazanılmış imatinib direnci olan hastaların %30-90'ında görülür (4). İmatinib dirençli KML vakalarında ABL nokta mutasyonlarının gelişmesi yeni tirozin kinaz inhibitörlerinin geliştirilmesine yol açmıştır. İmatinib direnci olan KML hastalarında BCL nokta mutasyonlarının sıklığı sırasıyla: T315I %15, Y253H %5, E255K %15, F317L %3 olarak bildirilmektedir. T315I mutasyonunda yeni tirozin kinaz inhibitörleri tedavide etkili değildir. Bu mutasyonda allogenik kök hücre transplantı önerilmektedir. Y253H, E255K mutasyonlarında dasatinib'in nilotinib'den daha etkili, F317L/V mutasyonunda nilotinib'in dasatinib'den daha etkili olduğu bildirilmektedir (5). Türkiye'de ilk defa yapılacak olan bu çalışmada imatinib tedavisi gören KML hastalarında literatürde en sık gözlenen imatinib bağlanma bölgesinde bulunan T315I, F317L ve Y253H, P-loop fosfat bağlanma bölgesinde bulunan E255K mutasyonları allel spesifik oligonükleotit-polimeraz zincir

reaksiyonu (ASO-PCR) ile taranması amaçlanmıştır (6). Direnç sıklığı KML'nin evresine bağlıdır ve imatinib direncinin hematolojik-sitogenetik-moleküler dirençin olması tedavi planını etkilemektedir. Bunun için direnç erken dönemde de tanımlanmalı ve hastalarda elde edilecek sonuçlar ile akılcı tedaviyi planlanmalıdır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. TANIM

KML anormal hemopoetik kök hücreden kaynaklanıp miyeloid, eritroid, monositer, megakaryositer serileri etkileyen klonal myeloproliferatif bir hastalıktır (7). Kemik iliğinde myeloid serinin aşırı proliferasyonu, periferik kanda olgun myeloid serinin artışına bağlı lökositoz ve splenomegali ile karakterizedir. Karakteristik olarak KML bifazik veya trifazik olup çoğu hasta kronik fazda başvurmaktadır. Bu faz 3-6 yıl sürmekte ve hastalık doğal seyri sonucunda daha ilerlemiş fazlar olan akselere veya blastik faza ilerlemektedir. KML, myeloproliferatif hastalıklar grubu içinde sınıflandırılır. Diğer myeloproliferatif hastalıklar polisitemia vera, myelofibrozis ve esansiyel trombositemi'dir (8).

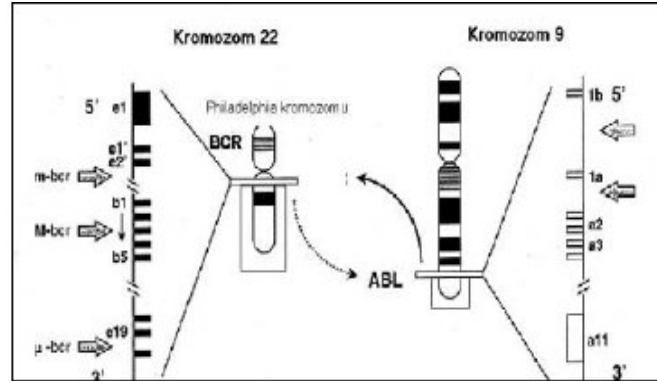
2.2. ETYOLOJİ VE EPİDEMIYOLOJİ

KML tüm lösemilerin %20'sini oluşturur. Yıllık insidansı 1/100.000'dir.Hastalık erkeklerde kadınlara oranla biraz daha sıktır. En sık yaşamın 5.ve 6. dekatlarında görülür. Küçük çocuklarda KML hızlı seyreder ve Philadelphia kromozomu (Ph) negatiftir (Juvenil KML). etyolojisi bilinmemektedir. Vakaların çoğunda predispozan bir neden saptanmaz (9).

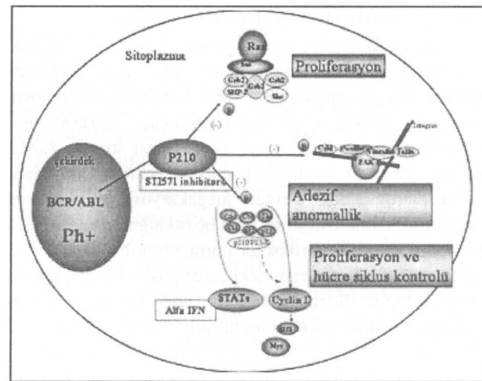
2.3. PATOGENEZ

Nowell ve Hungerford, 1960 yılında, KML hastalarında G-grubu kromozom anormalliğini tanımlamışlardır (10). Bu yeni belirleyici keşfedildiği şehrin onuruna Ph olarak adlandırılmıştır. Sonraki yıllarda kromozom bandlama yöntemi ile Ph kromozomunun 9. ve 22. kromozom arasında translokasyon ve 1980 yılında kromozom 9'da Abl protoonkogenin 22.kromozomdaki BCR geni yakınına resiprokal translokasyonu gösterilmiştir (Şekil 1). Bu genetik değişiklik 210-kd moleküler ağırlıkta (p210 denen) Bcr-Abl füzyon proteini tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. Son zamanlarda ek Bcr-Abl kırılma noktaları tanımlanmıştır (11). Bu protein otofosforilasyon ile hücrenin proliferasyonu, maturasyonu, apoptoz ve adezyon sinyal yollarını aktive ederek malign hücre transformasyonuna yol açar (Şekil 2). 22q11'de lokalize BCR geni ile normalde 9q34 üzerinde bulunan ABL geninin füzyonu moleküler PCR teknikleri ve floresan in situ hybridising (FISH) ile

sitogenetik analizden daha hassas bir şekilde tesbit edilir. Bu metodların geliştirilmesi düşük tümör yükü ya da sitogenetik olarak Ph negatif vakaların da teşhisine olanak sağlamıştır (8). Ph kromozomu yalnız, myeloid hücrelerde değil, megakaryositik ve eritroid seri hücrelerinde, ayrıca vakaların bir kısmında B lenfositlerinde de bulunur. Hatta bazı vakalarda T lenfositlerinin küçük bir bölümünde Ph pozitiftir. Bu bulgular KML'deki neoplastik transformasyonun pluripotent hemotopietik kök hücre düzeyinde olduğunu gösterir. KML'nin pluripotent orjinine rağmen, kemik iliğinde yalnızca miyeloid, monositik ve megakaryositik dizilerde artış olup bu selektif ekspansiyonun nedeni bilinmemektedir (9).



Şekil 1: Philadelphia kromozomu; t (9;22) (q34;q11) (17).



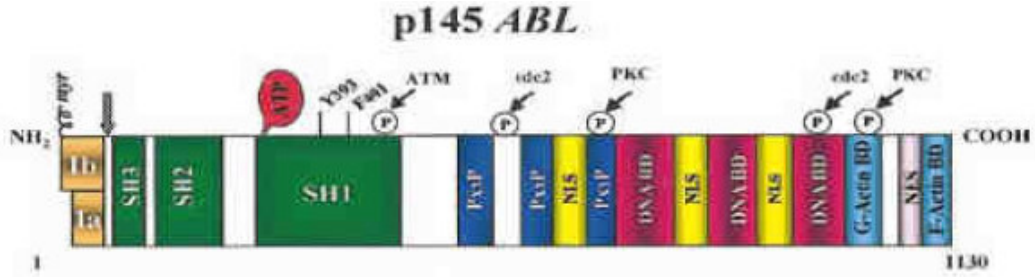
Şekil 2: BCR-ABL otofosforilasyonla hücre proliferasyonu, matürasyonu, apoptoz ve adezyonunda yer alan sinyal odaklarını aktive ederek malign hücre proliferasyonuna yol açar (8).

2.4. BCR VE ABL GENİNİN YAPISI

ABL geni Abelson murine lösemi virusunda bulunan viral ABL geni ile benzer bir yapı gösterir. 9. kromozom üzerinde bulunan ABL geni, 145 kD ağırlığında bir proteini üretir (Şekil 3) (12). ABL proteinleri nonreseptör tirozin kinazlar olup sinyal iletimi ve hücre büyümesinin düzenlenmesinde önemli role sahiptirler. ABL'nin N-terminal segmenti üç SRC homoloji bölgelerini (SH1,SH2 ve SH3) içerir ki, bu bölgeler ABL'nin tirozin kinaz fonksiyonunu düzenler. SH1 bölgesi oldukça önemli olup tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. SH2 fonksiyonunun tamamının eksikliğinde fosfotirozin bağlanmasında azalma ve ABL'nin transforme kapasitesinde düşüş görülür. SH3, tirozin kinaz fonksiyonu üzerinde negatif düzenleyici etkiye sahiptir (13). Myr dizileri ABL proteinin, plazma zarı proteinleri ile etkileşimini sağlar (14). Normal ABL proteini hücre siklusunun düzenlenmesine, genotoksik strese karşı hücre sel cevaba ve integrin sinyalizasyonu aracılığıyla hücre sel çevre hakkında bilgi iletilmesine katkı sağlar. ABL proteini hücre sel ölçü birimi gibi kompleks rol sağlayarak çeşitli hücre dışı ve hücre içi kaynaklardan sinyalleri bir bütün olarak toplar, hücre siklusu ve apoptozise gelince kararları etkiler (13).

22. kromozom üzerinde bulunan BCR geni, sürekli eksprese edilerek 160 kD ağırlığında bir protein üretir (Şekil 4). BCR proteinin NH₂ ucundaki ilk ekzon, 14-3-3 protein ailesinin bir üyesi olan Bap-1 proteini ve BCR proteinin kendisini hedefleyen serin treonin kinazı kodlar (14). BCR'ın N-terminal bölgesinde 'coiled-coil' in vivo ortamda dimerizasyona olanak sağlar. Molekülün merkezi db1 benzeri ve pleckstrin-homoloji bölgelerini içerir. PH bölgesi, Rho guanidin exchange faktörleri üzerindeki guanidin trifosfat'ın (GTP) guanidin difosfat'a (GDP) dönüşümünü uyarır. Rho guanidin exchange faktörleri, nükleer faktör kappa beta (NF-κB) gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu sağlayabilir. PH bölgesinden sonra kalsiyum bağımlı lipid bağlanma bölgesi (CaLB) yer alır. C-terminal bölgesi Ras için GTP'az aktivitesine sahiptir ve Ras guanozin trifosfat-aktivatör protein (RAC-GAP) bölgesi olarak geçer. Ras süper ailesinin küçük GTP'azı aktin polimerizasyonunu ve fagositik hücrelerde NADPH oksidase aktivitesinin düzenleyicisidir. BCR birkaç tirozin rezidüsü üzerinden özellikle tirozin 177 (Y177)

üzerinden fosforlanabilir. Y177, Ras yolağının aktivasyonuna karışan önemli adaptör molekül olan growth factor receptor-bound protein 2'ye (Grb- 2) bağlanır. İlginç olarak ABL'nin COS1 hücrelerinde BCR'ı fosforile ettiği bunun sonucunda BCR kinaz aktivitesinin düştüğü gösterilmiştir. Buna rağmen BCR'nin sinyal iletimindeki rolü tartışmalıdır. BCR *-/-* farelerin yaşayabildiği ve normal kan üretimine sahip oldukları ancak nötrofil süperoksit üretiminde artış olduğu gözlemlenmiştir (13).



Şekil 3: ABL Protein yapısı (13)



Şekil 4: BCR Protein yapısı (13)

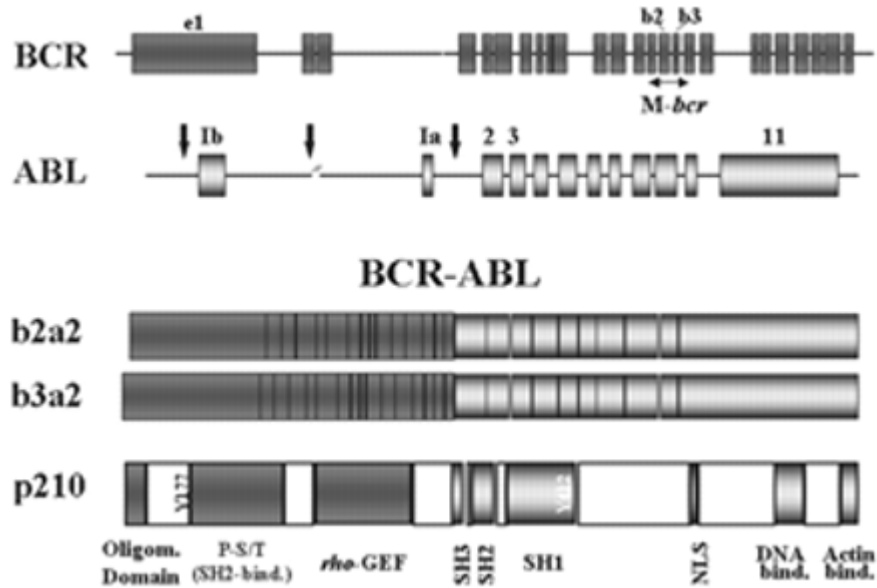
2.5. BCR VE ABL TRANSLOKASYONUNUN MOLEKÜLER ANATOMİSİ

ABL geninde kırılma noktası, 9q34 kromozomunda 300 kD'lık bir bölgenin 5' ucundaki herhangi bir yerde meydana gelebilir. Kırılma noktası la veya lb, veya daha sıklıkla 2 ekzonun arasındaki bir noktada oluşabilir. Kırılmanın ayrı noktalarda

olması ABL geninin BCR geni ile translokasyonunda herhangi bir sorun yaratmaz. ABL geninin aksine, BCR geni üzerindeki kırılmalar farklı noktalarda oluşabilir (14).

Çoğu KML hastasında ve akut lenfoblastik lösemi hastalarının yaklaşık 1/3'ünde kırılma noktası 5.8 kb uzunluğunda olan 12. ve 16. ekzonlar arasında oluşmaktadır. Kırılmanın bu bölgede meydana gelmesi ile, 210 kD moleküler ağırlığında BCR/ABL füzyon proteinini kodlayan, b2a2 veya b3a2 genleri oluşur. Son dönemlerde başka bir kırılma noktası, e19 ekzonu üzerinde tespit edilmiş ve 230 kD ağırlığında BCR/ABL proteinini kodladığı belirlenmiştir (Şekil 5) (14).

Kırılma noktalarının ABL'de sabit BCR'de değişken olması, ABL genin sağlıklı hücreleri transformasyona uğratıp kanser hücrelerine dönüşmesini sağlarken, BCR geni hastalığın fenotipini etkilediği ortaya çıkmıştır (14).



Şekil 5: KML'de t(9;22)(q34;q11) translokasyonu (13)

2.6. BCR-ABL GENİNİN KONTROL ETTİĞİ MALİGN TRANSFORMASYON MEKANİZMALARI

2.6.1. BCR-ABL proteini

BCR-ABL füzyon geni sitoplazmik protein olan ve sürekli olarak aktif kinaz üreterek etkilenen hücre klonunun proliferasyonunu sağlayan 210 kd ağırlığında

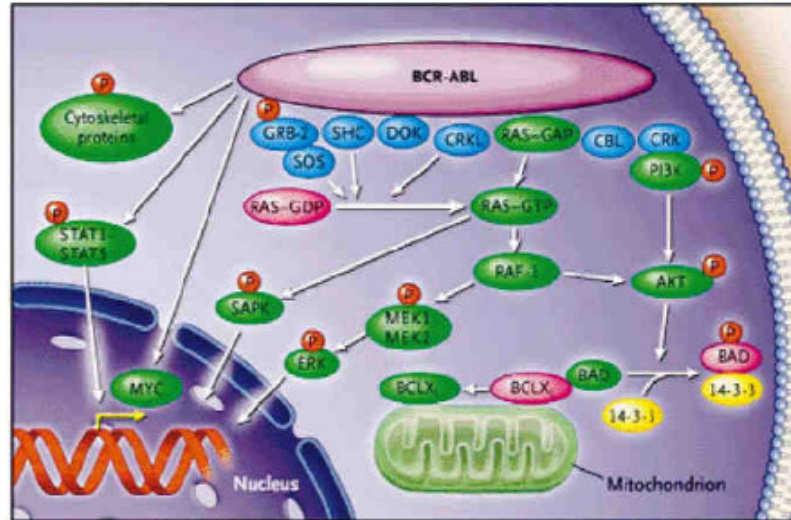
BCR-ABL onkoproteinini kodlar. BCR-ABL, gen transkripsiyonun aktivasyonu ya da represyonu için önemli olan onkogenik sinyallerin iletiminde görevli çeşitli proteinlerle etkileşmesinde, apoptotik yanıtın mitokondrial işlenmesinde, hücre iskeleti organizasyonunda, inhibitör proteinlerin degradasyonunda etkilidir (13).

2.6.2. ABL tirozin kinaz aktivitesinin kontrolü

ABL tirozin kinaz aktivitesi çok iyi bir şekilde kontrol edilir. SH3 bölgesi ABL proteinin inhibe edilmesinde önemli rol oynar. SH3 bölgesinde delesyon veya değişiklik tirozin kinazı aktif hale getirir (15). Abi-1 ve Abi-2 proteinleri SH3 domoinine bağlanarak, SH3'ün inhibitör fonksiyonunu aktif hale getirir (14).

2.6.2.1. BCR/ABL pozitif hücrelerin aktif sinyal ileti yolları

BCR/ABL füzyon proteini malign transformasyonunu 4 temel mekanizma ile gerçekleştirir. Bu mekanizmalar hücrelerin adhezyon özelliklerini kaybetmesi, mitotik çoğalmayı sağlayan sinyallerin sürekli aktif olması, apoptozun engellenmesi ve proteazomların ABL gen aktivitesini engelleyen proteinleri parçalamasıdır (Resim 1) (15).



Resim 1: BCR-ABL'nin tetiklediği sinyal iletim yolları (13).

2.6.3. Adhezyon özelliklerinin değişmesi

KML öncül hücreleri kemik iliği stroma hücrelerine ve ekstraselüler matrikse adezyonu azalır. Stromaya adhezyon hücre proliferasyonunu negatif olarak düzenler ve KML hücreleri değişen adhezyon özellikleri ile bu düzenden kaçış gösterirler. Son çalışmalar stroma ile öncül hücreler arasında ki etkileşimde β -integrinlerin önemli rolü olduğunu göstermiştir. KML hücreleri normal öncül hücrelerde bulunmayan β 1-integrinin adhezyon inhibitör varyantını ekprese ederler. İntegrinler dış ortamdan iç ortama normal sinyal iletimini başlatma yeteneğine sahiptirler. BCR-ABL transforme hücreler içinde tirozin fosforlanmış proteinlerin en önemlilerinden biri olan Crkl, hücresel motifin düzenlenmesine ve paxillin, fokal adezyon kinaz, p130Cas ve Hef1 gibi diğer fokal adhezyon proteinleri ile ilişkiye girerek integrin aracılı hücre adezyonuna karışır. Diğer bir görüş ise BCR-ABL tirozin kinazın α 6 integrin mRNA'sının ekspresyonunu arttıracak şekilde düzenlediği ve α 6 integrinin transkripsiyonel aktivasyonu sonucunda integrin fonksiyonunun bozulabileceği şeklindedir (16).

2.6.4. Mitoz sinyal ileti yollarının aktivasyonu

2.6.4.1. RAS ve MAP kinaz yolları: Tirozin 177'nin otofosforilasyonu adaptör molekül growth faktör reseptör bağlanma proteini (Grb-2) için bağlanma bölgesi oluşturur. Grb-2'nin SOS proteinine bağlanmasından sonra Ras, inaktif GDP bağlı durumdan aktif GTP bağlı duruma geçer. BCR/ABL'nin substratları olan diğer iki adaptör molekül Shc ve Crkl de Ras'ı aktive edebilir. Bu substratlar SH2 (Shc) ve SH3 (Crkl) bölgeleri ile BCR-ABL'ye bağlanırlar. Ras'ın aktivasyonu Ph kromozomu pozitif lösemilerin patogeneğinde önemlidir. İnterlökin-3 gibi sitokin reseptörlerinin uyarılması Ras'ın aktivasyonuna neden olur ve aktif Ras proteini serin-threonin kinaz Raf'a bağlanır ve Raf proteini hücre membranında toplanır. Burada serin-threonin aminoasitlerinden fosforillenen Raf proteini aktif hale geçer. Raf, gen transkripsiyonunun aktivasyonuna neden olan Mek1/Mek2 ve Erk üzerinden sinyal yolağını başlatır. Bundan başka Jnk/Sapk yolağının BCR-ABL tarafından aktivasyonu üzerinde çalışılmış ve malign transformasyon için gerekli olduğu görülmüştür. Böylece Ras üzerinden gelen sinyal GTP-GDP değişim

faktörü Ras tarafından Gckr'e (germinal center kinase related) iletilir ve buradan da Jnk/Sapk yolağı aktive edilir. MAP kinaz yolağının üçüncü kolu p38'in BCR-ABL transforme hücreler ve diğer mitojenik potansiyeli olan yolaklarda aktif olduğuna dair kanıtlar vardır (13).

2.6.4.2. JAK ve STAT yolu: Normal hücre sinyalizasyonunda sitokinlerin non reseptör tirozin kinaza bağlanması ile reseptör aktive olur ve hücre içi bölgesi ile ilişki kuran Janus ailesi kinazları (JAKs) tirozin fosforilasyonu ile aktifleşir. JAK'ın fosforile olmuş bölgelerine sinyal transducer and activator of transcription (STAT) proteini bağlanır ve fosforillenir. Fosforillenmiş stat proteinleri dimer oluşturur, nükleusa geçer DNA'ya bağlanarak transkripsiyonu başlatır (13). BCR-ABL proteinin Jak ve Stat yolunu aktif hale getirilmesi ilk olarak 1995 yılında ABL ile transforme edilen B hücrelerinde Danial ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. BCR-ABL, STAT1 ve STAT5 transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu direk sağlar. BCR-ABL pozitif hücrelerde, STAT5 Bcl-XL geninin transkripsiyonunu sağlayarak anti-apoptotik bir fonksiyon gösterir (14).

2.6.4.3. PI-3 kinaz yolu: Fosfotidilinositol-3 (PI-3) kinaz enzim aktivitesi Ph pozitif hücrelerin çoğalması için gereklidir. BCR-ABL füzyon proteini, Cbl, Crk ve Crkl gibi aktivatör moleküllerle birleşerek PI-3 kinazın aktivasyonuna neden olur. Bu yolda bir sonraki hedef molekül, serin-tirozin kinaz'dır (Akt). Akt, IL-3 reseptörünün hedef molekülü olup, pro-apoptotik Bad proteinini hedeflemektedir. Fosfat bağlanan Bad proteini, sitoplazmik 14-3-3 proteinleri ile birleşerek BCL-XL gibi anti-apoptotik proteinlere bağlanamadığı için inaktif hale gelir (14).

2.6.4.4. MYC yolu: Birçok insan malignitesinde Myelositomatozis onkogeni'nin (Myc) onkoproteininin aşırı ekspresyonu olduğu gösterilmiştir. Myc aktivasyonu BCR-ABL'in SH2 bölgesine bağlanması ile sağlanır. ABL transforme hücrelerde gösterilmiş ki sinyal ras/raf, siklin bağımlı kinazlar (cdck) ve E2F transkripsiyon faktörü üzerinden Myc promotörü aktive etmektedir (16).

2.6.4.5. Apoptozisin önlenmesi: Apoptozisin önlenmesinde altta yatan mekanizma tam olarak bilinmemektedir. Bir görüşe göre BCR-ABL'in kaspazları aktive ederek mitokondrilerden sitokrom c salınımını önlemesidir. BCR-ABL'in ras

yolu üzerinden bcl-2 üretimini arttırdığı, PI3 kinaz yolu üzerinden bcl-2 üretiminin arttırıldığı belirlenmiştir. Kaskad şeklinde gerçekleşen kaspaz aktivasyonuna bcl-2 ailesi üyelerinin aracılık ettiği düşünülmektedir. Ayrıca BCR-ABL pozitif hücrelerde stat5'in aktivasyonu ile anti apoptotik bir protein olan bclxL'in transkripsiyonel olarak aktif hale geçtiği belirlenmiştir. Diğer bir görüş proapoptotik bir protein olan bad'ın fosforilasyonudur. Bad'ın iki serin aminoasidinden Akt, Raf ve Ras proteinleri tarafından fosforile edildiği, ayrıca " Interferon consensus sequence binding protein'in" (ICSBP) regülasyonunu değiştirerek apoptozisi inhibe ettiği düşünülmektedir (16).

2.7. KML'DE KLİNİK ÖZELLİKLER

Başlangıç genellikle sessizdir. Tanı sırasında vakaların %30'u asemptomatik olabilir. KML hastalarının %80'nı kronik fazda, %10'u akselere fazda, %10'u da blastik fazda tanı almaktadır (8). Bazı vakalarda tanı bir rastlantı sonucu lökositoz ya da splenomegalinin saptanması ile konur. Hastayı hekime götüren başlıca yakınmalar, splenomegalinin yarattığı bulgular (sol hipokondriumda ağırlık hissi ya da ağrı, yemeklerden sonra şişlik) ve anemi ile ilgili belirtilerdir. Kilo kaybı ve terleme gibi metabolizma artışına bağlı yakınmalar, kadınlarda mensturasyon bozuklukları, erkeklerde priapizm, purpura ve kemik-eklem ağrıları da başlangıç belirtileri olabilir. Seyrek olarak gut nöbetleri ve ürik asit taşları görülebilir. Bazen, büyümüş dalakda oluşan infarktüsler sol hipokondriumda ani ve şiddetli bir ağrıya yol açabilir. Bu sırada oskültasyonda dalak üzerinde üfürüm olabilir (9).

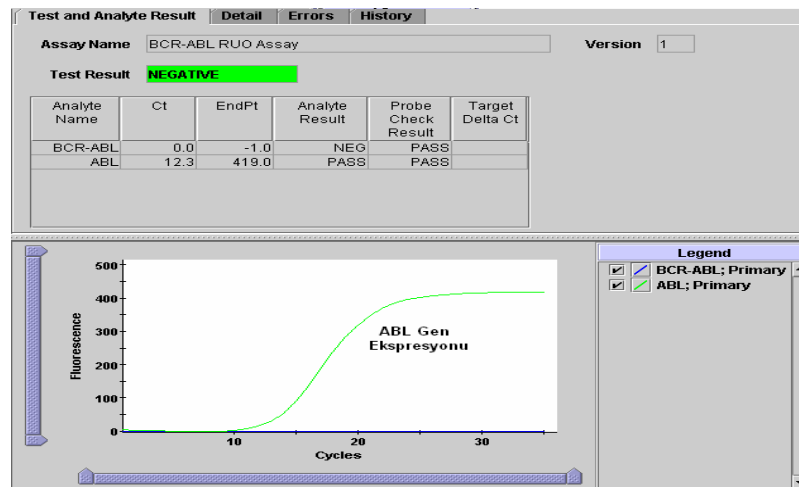
KML hastalarının fizik muayenesinde %50-90 splenomegali, %10-20 hepatomegali vardır (8). Fizik muayenede tek önemli bulgu splenomegalidir. Genellikle göbek hizasını aşar, bazen sol iliak çukura kadar iner. Dalak infarktüsleri oluşmadıkça ağrısızdır. Birlikte hepatomegalide bulunabilir. Hastalığın ileri evrelerinde lenf düğümleri büyüyebilir (9).

2.8. LABORATUVAR BULGULARI

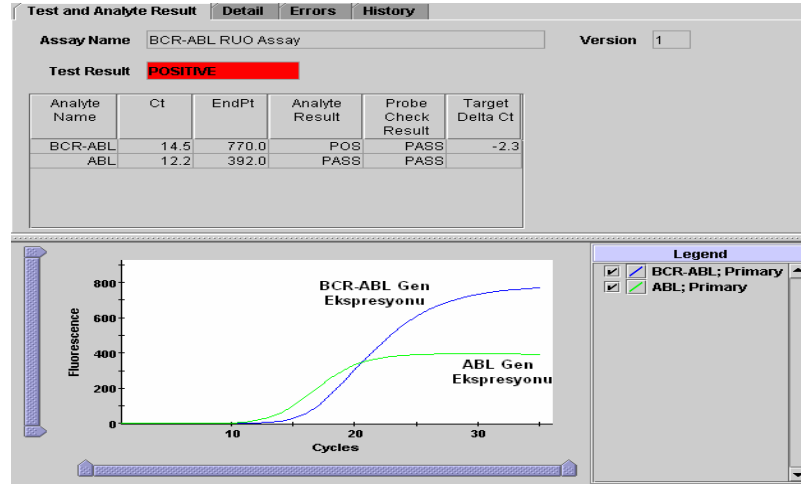
KML hastalarının laboratuvar incelemelerinde; beyaz küre değerleri yükselmiştir. Beyaz küre sayısı ortalama $100 \times 10^3 / \mu\text{L}$ üzerindedir. Trombosit sayısı ise vakaların yarısında artmıştır. $100 \times 10^3 / \mu\text{L}$ altında trombosit sayısına rastlanması kronik fazda nadirdir. Periferik yaymada trombosit şekil bozuklukları ve hastaların dörtte birinde megakaryosit parçacıkları görülebilir ve trombosit fonksiyon bozukluğu da izlenebilir. Hastaların çoğunda normokrom normositer anemi vardır. Bazofil ve eozinofil sayısı artmış olup prognostik önemi vardır. Eozinofillerde de artış vardır. Periferik yaymada myeloid serinin tüm hücreleri görülür (8). Özellikle myelosit, metamyelosit, çomak ve parçalı sayısı artmıştır. Kronik fazda blast ve promyelosit %10'u geçmez. Kemik iliği hipersellüler ve myeloblastdan nötrofile kadar myeloid seriye ait tüm seri elemanları artmıştır. Farklılaşma ve morfoloji normaldir. Lökosit alkelen fosfataz düzeyi düşük; laktat dehidrogenaz, ürik asit, histamin ve vitamin B12 düzeyleri yüksektir. Karyotip analizinde Ph kromozomu, FISH ve PCR ile BCR-ABL kimerik geni tespit edilir (8).

2.9. TANI

KML tanısı periferik kan yayması veya kemik iliği incelemesi ile birlikte karyotip analizde Ph varlığının FISH ya da PCR (Resim 2,3) yöntemi ile saptanması sonucu konur (17).



Resim 2. GeneXpert DX System ph negatif sonuç.
 ABL: İnternal PCR kontrolü
 BCR-ABL: Transkript PCR ürünü (56)



Resim 3. GeneXpert DX System ph pozitif sonuç.
 ABL: İnternal PCR kontrolü
 BCR-ABL: Transkript PCR ürünü (56)

2.9.1. Kronik faz:

2.9.1.1. Periferik kan bulguları: Lökositoz, $20 \times 10^3/\mu\text{L}$ ile $500 \times 10^3/\text{mm}^3$ arasında değişmek üzere, genellikle $130 \times 10^3/\mu\text{L}$ ile $225 \times 10^3/\mu\text{L}$ arasındadır. Nötrofil seri elemanları ağırlıkta olup, özellikle parçalı, band, metamyelosit ve miyelosit egemenliği vardır. Pelger-Huet anomalisi geç dönemde görülebilir. Myeloblast oranı $< 3\%$ mutlak bazofili genellikle vardır ve eozinofilide eşlik edebilir. Mutlak monositoz olmasına karşın nötrofiller çok yüksek olduğundan relatif monositopeni olarak görülür. Trombositoz genellikle vardır, bazı olgularda $> 1000 \times 10^3/\mu\text{L}$ Normokrom normositer anemi genellikle tabloya eşlik eder, normoblastlar gözlenebilir. Lökosit alkalin fosfataz skoru düşüktür (< 20) (17).

2.9.1.2. Kemik iliği bulguları: Hipersellüler olup. myeloid seri elemanlarının egemenliği vardır. Megakaryositler artmış ve normalden hafifçe küçük, küme yapmış olarak görülürler. PAS + granüller içeren makrofajlar (psödo-Gaucher hücresi) 1/3 olguda görülebilir. Eritroid seri elemanları normal veya azalmıştır (17).

2.9.1.3. Sitogenetik inceleme bulguları: 9. kromozom ile 22. kromozom arasındaki basit veya kompleks translokasyonun, Ph kromozomu, genellikle $t(9;22)(q34;q11)$ varlığı tanıyı doğrular (17).

Hastaların %5-10'unda Bcr geninin yeniden düzenlenmesini içeren varyant translokasyonlar saptanır (17).

Nadiren konvansiyonel sitogenetik inceleme ile Ph kromozomu ortaya konulamaz (<%10), bu olgularda moleküler incelemeler ile translokasyonun ürünü olan BCR-ABL kimerik proteini ortaya konabilir (% 95) (17).

Hastaların %1'inden azında Ph kromozomu yoktur. Bu Ph(-) KML veya atipik KML olarak adlandırılır, daha agresif seyreder (17).

2.9.1.4. Moleküler inceleme: KML'nin teşhisinde sitogenetik inceleme ile Ph(-) sonuç alınan örneklerde moleküler inceleme yapıldığında pozitif sonuç alınması moleküler yöntemin daha iyi sonuç vereceği fikrini güçlendirmiştir. PCR yöntemi Ph kromozomunun tespitinin yanı sıra kırılma noktalarının nerede olduğunu belirleyebilir (14).

2.9.1.5. Ekstramedüller hastalık: Dalak ve karaciğer miyeloid hücreler tarafından infiltre edilir. Sinüoidlerde ikincil olarak hematopoez odakları görülür.

Akselere ve Blastik Faz: Kronik faz genellikle 2-4 sene sonra akselere veya blastik faza geçer. Blastik faza geçiş ani veya yavaş olabilir. Kronik fazın blastik faza ilerlemesi ilk yıl %5 ve sonraki yıllarda %20-25'dir. Blastik faza ilerleyen hastalar morfolojik olarak 2/3'ü akut miyeloblastik lösemi ve 1/3'ü akut lenfoblastik lösemidir (17).

2.9.2. Akselere faz

Kemik iliğinde blast oranı %5-20'dir. %20'nin üzerinde bazofili olabilir. Sıklıkla hemoglobin düzeyi 7,0 gr/dL'nin altındadır.(17).İnatçı ateş ve kemik ağrısı kemik iliğinde retikülin artışı ile karakterizedir. Tedaviye rağmen lökosit sayısının azalmaması olabilir (17).

2.9.3. Blastik faz

Kemik iliğinde blast oranı %20'nin üzerindedir. Anemi ve trombositopeni derinleşir, ilerleyici splenomegali gözlenir. Ekstramedüller hastalık ve miyelofibrozis sıktır. Hastaların %70-80'nında ikinci Ph, trizomi 8, iso (17q), +19 ve Y kaybı gibi ek kromozomal anomaliler ortaya çıkar. Bazı hastalarda ani bir fibrotik faz görülebilir, agnojenik miyeloid metaplazinin son dönemini andırır. Bu

durum ya blast fazına geçişte kısa bir dönemi içerebilir ya da hastalar akut lösemiye dönüşmeksizin kaybedilebilir (17).

2.10. AYIRICI TANI

2.10.1. Lökomoid reaksiyon: Lösemi olmadığı halde lösemiye taklit eden tablodur, genellikle infeksiyonlardan sonra görülür. Daha çok olgun hücreler (band ve segment) görülür, bazofiller artmaz, LAP skoru artmıştır ve sitogenetik analiz normaldir (Tablo 1) (17).

2.10.2. Lökoeitroblastik reaksiyon: Miyelofibroziste görülen bu tablo periferik dolaşımda genellikle çekirdekli veya göz yaşı damlası eritrositler ile karakterize olup, beraberinde miyeloid öncüller vardır (17).

2.10.3. Atipik (Ph-negatif) KML: Dolaşımda segmente nötrofiller hakimdir. Bazofili genellikle yoktur, displazik değişiklikler gözlenir (17).

2.10.4. Kronik miyelomonositer lösemi: $>1000\text{mm}^3$ monositoz vardır, kemik iliğinde displazik değişiklikler görülür, Ph kromozomu negatiftir (17).

2.10.5. Akut lösemiler: Ph+ akut lösemilerin KML-blastik krizden ayrılması zordur (17).

Tablo-1 KML ile lökomoid reaksiyonun ayrımı (17).

Özellikleri	KML	Lökomid reaksiyon
Lökomid reaksiyon için bilinen neden	Yok	Var
Lökosit sayısı	Sıklıkla $> 70 \times 10^9/L$	Genellikle $< 70 \times 10^9/L$
Lökosit diferansiyonu	Granülosit öncülleri Bazofili	Genellikle olgun nötrofil, Nadir immatur granülositler
LAP skoru	Azalmış	Normal veya artmış
Splenomegali	Var	Yok

2.11. KML-TEDAVİ

2.11.1. Konvansiyonel kemoterapi

KML tedavisinde başlangıçta hastalığın biyolojik seyrini değiştirmeyen hücre azaltıcı hidroksiüre ve busulfan kullanılmıştır (8). Busulfan yavaş etkili alkilleştirici bir ajandır. Başlangıç dozu 4-8 mg/gün olup lökosit sayısı 20.000/mm³ dolaylarına indiğinde kesilmelidir. Çünkü ilacın birikici etkisinden dolayı tedaviye son verildikten sonra 2-3 hafta daha lökosit sayısı düşmeye devam eder. Busulfanın en önemli toksik etkisi kemik iliği depresyonudur. Bir çok merkezde KML'nin başlangıçta kontrolünde hidroksiüre tercih edilmektedir. Çünkü busulfan uzun süreli kemik iliği hipoplazisi gelişme riski olup hidroksiürenin busulfana göre üstün olduğu gösterilmiştir (9).

2.11.2. İnterferonlar (IFN)

Malign hastalıklar ve viral enfeksiyonlar gibi antijenik uyarılara cevap olarak ökaryotik hücreler tarafından üretilen glikoproteinlerdir. Antiviral, immünomodilatör, antiproliferatif, antianjiyogenik aktiviteye sahiptir (18). IFN tedavisi ile hastaların yaklaşık %80'ninde hematolojik, %50'sinde de sitogenetik yanıt elde edilebilmektedir. Sağkalımda anlamlı bir uzama yalnız sitogenetik cevabı olan hastalarda görülmüştür (8). Kronik evre KML hastalarında IFN-a kullanımı ile konvansiyonel kemoterapinin karşılaştırıldığı randomize çalışmaların çoğunda IFN-a'nın kemoterapi alanlardan daha uzun sağkalım sağladığı gösterilmiştir. Bunlardan İtalyan çalışma grubunun sonuçlarına göre IFN-a grubundaki vakalarda sitogenetik yanıtın konvansiyonel kemoterapi grubundan belirgin yüksek olduğu (%30 ve %5) ve IFN-a grubunun %8'inde tam ve %11'inde parsiyel sitogenetik yanıt alındığı saptanmıştır. IFN-a alanlarda blastik krize kadar geçen süre median >72 ay, kemoterapi grubunda 45 ay; ve median yaşam süresinin IFN-a alanlarda kemoterapi alanlara göre daha uzun olduğu görülmüştür (9).

IFN'a düşük doz sitozin arabinozid (DD-ARAC) eklenmesi ile sitogenetik yanıtlarda artışla birlikte, total sağkalımı uzattığı bildirilmiştir (19,20). Daha sonra bildirilen çalışmada bu olumlu etki gösterilememiştir (21) (Tablo 5). Ülkemizde 1994-1997 yılları arasında HLA uygun kardeş vericisi olmayan erken ve geç kronik

faz KML hastalarında, IFN- α +DD-ARAC kullanımı çok merkezli prospektif çalışma (n=63) ile değerlendirilmiş, ilk 3 ayda hematolojik yanıt oranı %77.7, %36.8'inde MSY ve %15.7'sinde minör sitogenetik yanıt bildirilmiştir (17).

2.11.3. Allogenik kök hücre transplantasyonu

Allogenik kök hücre transplantasyonu genellikle 45 yaş altı için uygundur. Bu hastalarda hastalıktan bağımsız yaşam süresi %60-70, transplantasyonla ilgili ölüm %10, relaps oluşumu %20'dir. Yaşlı hastalarda ise tedavi ile ilişkili ölüm oranının artmasından dolayı durum daha kötü olup 5 yıllık hastalıksız yaşam olasılığı %30'dur. Ayrıca hastalığın fazı tedavinin başarısında önemlidir (13). Transplant olacak KML hastalarında evre, yaş, risk skoru, donör tipi prognozu etkilemektedir. Yapılan bir çalışmada kök hücre nakli olan KML hastalarında 2 yıllık sağkalım oranı %50, 5 yıllık sağkalım oranı %44 bulunmuştur. 2 yıllık relaps oranı %14 'dür. Hastalığın fazı ilerledikçe transplant olanlarda sağkalım oranlarının azaldığı görülmüştür (22).

2.11.4. İmatinib

Abl-özü tirozin kinazı inhibe eden (signal transduction inhibitor) bir 2-phenyl-aminopyrimidine türevidir. Ayrıca trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörünü ve kök hücre faktörünü de inhibe eder (1). İmatinib, p210 onkoproteininin Adenozin Trifosfat (ATP) bağlanan bölgesine, spesifik bağlanan bir fenilaminopirimidin türevidir (Resim 2). Kronik fazda hematolojik, sitogenetik ve moleküler remisyon sağlayabilmek için optimal ilaç dozu 400 mg'dır. Tedavi, mevcut veriler ışığında hayat boyu verilmesi önerilmektedir. İlaç oral olarak iyi tolere edilmektedir (8). İmatinib tedavisi alan hastaların %5'inden daha azında yan etkiler görülmektedir. En sık görülen yan etkiler kas-iskelet şikayetleri ile ödemdir. Bulantı, kusma, diyare, halsizlik, baş ağrısı, makülopapüler döküntüler diğer sık görülen yan etkilerdir. Yan etkiler sıklıkla tedaviye başladıktan 2-4 hafta sonra ortaya çıkmaktadır. Doza bağımlı olarak karaciğer fonksiyon testlerinde bozukluk ve myelosüpresyon görülebilir. Kronik fazdaki hastalarda düşük kan değerleri tedaviye birkaç gün ara verdikten sonra düzelebilmektedir (23,24).

IFN'a dirençli KML hastalarında imatinib ile yapılan faz II çalışmalarında %95 tam hematolojik remisyon, %65 MSY, %48 TSY sağlanmıştır (Tablo 2) (25). İmatinib uygulanan hastalarda 5-7 yıllık sağkalım olasılığı %90-95 oranında bildirilmektedir. IRIS çalışmasında 60 aylık izlem sonunda imatinib alan hastalarda %98 tam hematolojik yanıt, %92 MSY, %87 TSY saptanmıştır (26).

Sokal skorlama sistemine (Tablo 3) göre hastalar düşük, orta ve yüksek risk olarak gruplandırıldığında sitogenetik yanıtlarda anlamlı fark bulunmuştur. Düşük risk grubunda tam sitogenetik yanıt oranı %91, orta risk grubunda %84 ve yüksek risk grubunda %69 ($p < 0.001$) olarak bildirilmiştir (8).

IRIS çalışmasında yeni KML tanısı konulmuş, 1106 hastaya günde 400 mg imatinib ya da IFN- α ile ARA-C verilmiş, imatinib kolunda tam sitogenetik yanıt (TSY) oranı %76 iken IFN-a ve ARA-C kolunda bu rakam %15'de kalmıştır. IFN-a tedavisi ile elde edilen TSY durumunda olduğu gibi imatinib ile elde edilen TSY uzun süreli sağ kalım sağlayacaksa çalışma sonucu imatinibin daha iyi sonuç sağladığını gösterecektir. Ancak bu son durum kanıtlanmamıştır (27).

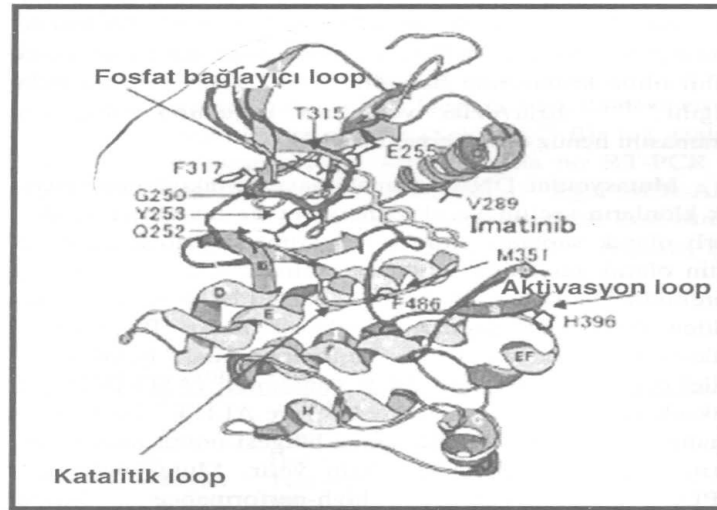
Yapılan bu klinik çalışmalarda yeni tanı almış KML hastalarında standart tedavi imatinib olmuştur (28). IRIS çalışmasında imatinib tedavisi alan hastaların 60 aylık izlemi sonucunda hastaların %92'sinde MSY, %87'sinde TSY, %98'sinde THY elde edilmiştir (26) .

Tablo 2: KML'de yanıt deęerlendirmesi (30).

<u>Yanıt düzeyi</u>	<u>Tanım</u>
Tam hemaiolojik yanıt	Normal tam kan sayımı ve lökosit differansiyasyonu
Minimal sitogenetik yanıt	Ph-kromozom pozitif metafaz %66- %95*
Minör sitogenetik yanıt	Ph-kromozom pozitif metafaz %36- %65*
Kısmi sitogenetik yanıt	Ph-kromozom pozitif metafaz %1- %35*
Majör sitogenetik yanıt	Ph-kromozom pozitif metafaz %0- %35*
Tam sitogenetik yanıt	Ph-kromozom pozitif metafaz %0*
Major moleküler yanıt	BCR-ABL mRNA'da ~ 3 log azalma
<u>Tam moleküler yanıt RT-PCR'da negatiflik</u>	
*En az 20 metafaz analiz edilmelidir.	

Tablo 3: KML'de prognozu belirlemede kullanılan risk skoru (17).

Sokol indeksi: $SI = EXP [0.0116 (\text{yaş} - 43.4) + 0.0345 (\text{dalak büyüklüğü}^* - 7.51) + 0.188 (\text{trombosit sayısı}/700) - 0.563 + 0.0887 (\text{periferik blast yüzdesi} - 2.10)]$ *kot altı uzunluk (cm) Yeni skortlama sistemi (Hasford)(14): Yeni skor: $(0.6666 \times \text{yaş} [\text{eğer yaş} < 50, 0; \text{aksi halde } 1] + 0.420 \times \text{dalak büyüklüğü} [\text{cm kot altı}] + 0.0584 \times \text{blast} [\%] + 0.0413 \times \text{eozinofil} [\%] + 0.2039 \times \text{bazofil eğer bazofil} < 3\%, 0; \text{aksi halde } 1] + 1.0956 \times \text{trombosit sayısı} [\text{eğer trombositler} < 1500 \times 10^9/L, 0; \text{aksi halde } 1]) \times 1000$ Düşük risk <780; Orta risk 781 – 1479; Yüksek risk ≥1480



Resim 4: ABL'nin İmatinib bağlanma bölgesinin kristal yapısı (30)

2.11.4.1. İmatinib direnci

İmatinib kullanımında gözlenen en önemli sorun birincil veya edinilmiş dirençtir (11). Birincil direnç 3. ayda THY ve 6. ayda MSY veya 12. ayda TSY elde edilememesi olarak tanımlanır. Birincil direnç doz ilişkili görünmektedir. Birincil dirençte sorun ilaç dozunu artırılması ile büyük oranda giderilmiş görünmektedir (2). Kazanılmış direnç ise elde edilen hematolojik, sitogenetik veya moleküler yanıtın kaybolmasıdır (Tablo 4) (3).

Tablo 4: İmatinibe yanıtın değerlendirilmesi (30).

	3ay	6ay	12ay	18ay
Başarısızlık	Hematolojik yanıt yok	Ph+>%95	Ph+ %35-94	Ph+>%1-34
Optimal olmayan	Tam hematolojik yanıt yok	Ph+ %35-%95	Ph+ %1-%35	Ph+ %0 BCR-ABL translokasyonunda <3 log azalma
Optimal	Tam hematolojik yanıt	Ph+< % 35-95	Ph+ %0	Ph+ %0 BCR-ABL translokasyo nunda >3 lognunda azalma

İmatinib direncinin gelişmesinde iki farklı mekanizma rol oynamaktadır. Bunlar BCR-ABL'den bağımsız ve BCR-ABL'e bağımlı direnç mekanizmalarıdır. BCR-ABL'den bağımsız dirençte farklı sitogenetik anomalilerin oluşması ile lösemik hücreler çoğalırlar. Sonuçta imatinibe bağlı BCR-ABL baskılanması yararlı olmamaktadır (2,29).

BCR-ABL bağımlı direnç için, konakçı karaciğerde P450 enzimi veya alfa-1 asit glikoprotein (AGP) gibi ilacı nötralize eden bir proteinin aşırı üretimi sonucu imatinibin enzimatik modifikasyonu örnek verilebilir (30,31). BCL-ABL bağımlı direnç gelişim mekanizmaları BCR-ABL gen amplifikasyonu, BCR-ABL mutasyonları, alfa-1 asit protein, MDR-1'dir (çoklu ilaç direnci 1) (29).

İmatinibe karşı birincil ve edinilmiş direnç oranları hastalığın ilerlemesi ile artmaktadır. İmatinib direncinin ensık nedeni BCR-ABL mutasyonları ve klonal evolüsyondur (32). Sekonder direnç mekanizmalarından ensık görülen Bcr-abl nokta mutasyonları vakaların %50-90'nını oluşturmaktadır (33).

2.11.4.2. BCR-ABL nokta mutasyonları

İmatinib esas olarak cABL-ATP bağlanma bölgesinin bir inhibitörüdür. Bu nedenle BCR-ABL kinaz bölgesinde mutasyonlar imatinib bağlanmasını engeller. BCR-ABL'de kinaz bölgesi mutasyonları, kazanılmış imatinib direnci olan hastaların %50-60'ını oluşturur (4). Kazanılmış imatinib direncinde BCR-ABL bölgesinde tanımlanmış 40 farklı nokta mutasyonu vardır (Tablo 5) (33). Mutasyonlar 4 bölgede toplanır. İlk bölge imatinib bağlanma bölgesidir. ABL 1a proteinin 315. pozisyonunda, 1b proteinin 314. pozisyonundaki treonin aminoasidinin izolösine dönüşmesi sonucu saptanan ilk mutasyondur (34). Bu mutasyon (T351I) ilacın bağlanma yatkınlığını azaltmaktadır. İmatinib bağlanma bölgesindeki diğer mutasyonlar valin289alanin (V289A), fenilalanin317lösün (F317L)'dir. İkinci bölge p-loop, fosfat bağlanma bölgesidir valin289 (V289), glisin250glutamikasit (G250E), glutamikasit255lizin (E255K) ve histidin252arjinin (Q252H) (27). Üçüncü bölge imatinib bağlanma bölgesinden uzakta aminoasit içeren metiyonin351 (M351), glutamikasit355 (E355) ve fenilalanin486sistein (F486S) mutasyonlarıdır. Dördüncü bölge aktivasyon bölgesi olup esnek sekansın bağlanma bölgesine yakındır (4,35).

İmatinib direnci ile kinaz bölgesindeki mutasyonları arasında pozitif ilişki bulunmaktadır. P loop mutasyonlarında sagkalım düşüktür. F359V mutasyonlarında sitogenetik ve hemotolojik yanıt bulunmamaktadır (5).

İmatinib kullanan 241 KML hastasında p-loop mutasyonu %10, p-loop dışı diğer mutasyonlar %29, çoklu mutasyon %7 oranında saptanmıştır (36).

T315I mutasyonunda yeni tirozin kinaz inhibitörleri tedavide etkili değildir. Bu mutasyonda allogenik kök hücre transplantasyonu önerilmektedir. Y253H, E255K mutasyonlarında ise dasatinib nilotinib'den daha etkili, F317L mutasyonunda ise nilotinib dasatinib'den daha etkili olduğu bildirilmektedir (5). P-loop bölgesi mutasyonları ile non-P-loop bölgesi mutasyonları arasında yaşam süresi açısından anlamlı bir farklılık bulunmaktadır. P loop bölgesi mutasyonlarında yaşam süresi daha kısadır (37).

İmatinib tedavisi gören KML hastalarında literatürde en sık gözlenen imatinib bağlanma bölgesinde bulunan T315I, F317L ve Y253H, P-loop fosfat bağlanma bölgesinde bulunan E255K mutasyonlarıdır (6).

Tablo 5: ABL kinaz bölgesi mutasyonları (30).

Abl tip 1a	Abl tip 1b	Bcr-Abl'de yerleşim
M244V	M263V	p-loop
L248V	L267R	p-loop
G250E	G269E	p-loop
Q252H	Q271H	p-loop
Q252R	Q271R	p-loop
Y253H	Y272H	p-loop
Y253F	Y272F	p-loop
E255K	E274K	p-loop
E255V	E274V	p-loop
S417Y	S4436Y	c-terminal lob
E459K	E478K	c-terminal lob
F486S	F505S	c-terminal lob
V289A	V308A	aktif bölge
F311T	F330T	aktif bölge
T315I	T334I	aktif bölge
F317L	F336L	aktif bölge
M351T	M370T	SH2 temas
F359V	F378V	aktif bölge
F382L	V398I	aktivasyon loop
L387M	L406M	aktivasyon loop

2.11.5. İkinci kuşak tirozin kinaz inhibitörleri

İkinci kuşak tirozin kinaz inhibitörleri imatinib kullanan KML hastalarında imatinib tedavisinin etkili olmadığı durumlarda (6 ay sonra MSY, 12 ay sonra TSY, 18 ay sonra 3-log altında yük azalmaması) düşünülür (38). Yeni tirozin kinaz inhibitörlerinden nilotinib imatinibten 30 kat daha fazla etkin bir aminoprimidindir. Dasatinib ise imatinibe göre 300 kat daha güçlü bir çift kinaz (Scr/Abl) inhibitörüdür (39).

Ph + KML'li imatinib direnci olan hastalarda 70 mg nilotinib verilerek yapılan çalışmada %90 THY, %51 MSY, %40 TSY elde edilmiştir (40). Dasatinib imatinib dirençli ya da intoleran 387 kronik faz KML hastasına uygulanmış ve hastaların %91'inde THY, %59'unda MSY, %49'unda TSY elde edilmiştir. Yan etki olarak 3.ve

4. derece trombositopeni ve nütropeni hastalarda sırasıyla %48 ve %49'unda bildirilmiştir. Hastalarda non hematolojik toksisitelerinden diyare %37'sinde, baş ağrısı %32'sinde, yorgunluk %31'sinde ve plevral effüzyon %27'sinde oluşmaktadır (41). 400-600 mg imatinib'e dirençli hastalarda yapılan randomize çalışmalarda 70 mg günde 2 kez dasatinib ile allogenik kök hücre nakli yapılan hastalar karşılaştırıldığında 2 yıllık sağkalım dasatinib alanlarda %100, allogenik kök hücre nakli yapılanlarda ise %72'dir (42).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta ve Kontrol Grubu

Bu çalışmada Ph pozitif KML tanısı almış hastalarda İmatinib direncine neden olan ve en sık görülen BCR-ABL gen mutasyonlarının saptanması amaçlanmıştır. Çalışma Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Hematoloji polikliniğinde ve Erciyes Üniversitesi Hematoloji polikliniğinde izlenen Ph (+) KML tanısı almış 54 hasta yer almaktadır. Tüm hastalardan yazılı bilgilendirilmiş hasta onayı alınmıştır. Hastalardan alınan periferik kan örnekleri TF.07.10'nolu proje ile kurulan Deoksiribonükleik asit (DNA) Bankasında, izole edildikten sonra BCR-ABL gen mutasyonları ASO-PCR yöntemi ile analiz edilip diğer klinik parametrelerle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Etik kurul onayı, 02.07.2007 tarihinde Gaziantep Üniversitesi Tıbbi Etik Kurulundan 07-2007/40 nolu kararı ile alınmıştır.

3.2. Yöntem

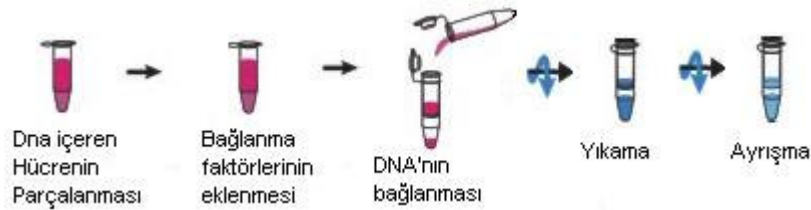
3.2.1. DNA izolasyonu

KML tanısı konan bireylerden EDTA'lı tüplere kan örnekleri alındı. Alınan kanlardan Invitek Invisorb Spin Blood kiti (LN: CA050036) ile, DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen DNA materyali, birey bilgileri kaydedildikten sonra -20°C'de saklandı.

Bu işlemde uygulanan izolasyon aşamaları (Şekil 6);

1. Kandan 200 µl alınır ve 1.5 ml'lik tüpe aktarılıp, üzerine 200 µl Lysis (eritme) Tamponu ve 20 µl Proteinaz K eklenir. Vortex sonrasında 56°C'de 10 dakikalık inkübasyona bırakılır. 200 µl'den az kan materyali 200 µl'ye tamamlanır.
2. 400 µl Binding (bağlama) Tamponu pipetlenerek ilave edilir.
3. Hazırlanan karışım, filtrelere sahip 2.0 ml'lik tüplere alınır. 1 dakikalık inkübasyon sonrasında da 2 dakika santrifüj edilir (12.000 rpm).

4. Filtreden geçen ve tüpte biriken karışımın artıkları dökülür ve filtreler üzerine 500 µl Yıkama Tamponu I ilave edilir. 1 dakika santrifüj edilip filtreden geçen tampon dökülür.
5. 800 µl Yıkama Tamponu II filtre üzerine ilave edilip, tekrar 1 dakika santrifüj edilir. Tüpler santrifüj sonrasında tampondan arındırılır ve filtreler takılarak 4 dakika 15.000 rpm 'de santrifüj edilir.
6. Sonrasında filtreler yeni tüplere yerleştirilip 200 µl Elution (ayırıştırma) Tamponu eklenir.



Şekil 6: DNA izolasyonunun aşamaları.

Kandan DNA izolasyonu işleminde kullanılan araç ve kimyasallar aşağıda verilmektedir;

1. NucleoSpin DNA izolasyon kiti (Macherey-Nagel, 07/2003/Rev02)
 - Filtreli tüpler
 - Proteinaz K
 - B3 buffer
 - BW buffer
 - BE buffer
2. Etanol
3. Mikropipetler (1-10 µl ve 10-100 µl, Scorex, Rainin)
4. Steril sarı ve beyaz pipet uçları (Eppendorf)
5. 1.5 ml'lik Eppendorf tüpleri (Axygen)
6. Eppendorf tüp taşıyıcıları

7. Vorteks (Heidolph Reaks Top)
8. Santrifüj Aleti (Sigma 1-15)
9. Su banyosu (Nüve BM 302)
10. Steril lateks eldiven

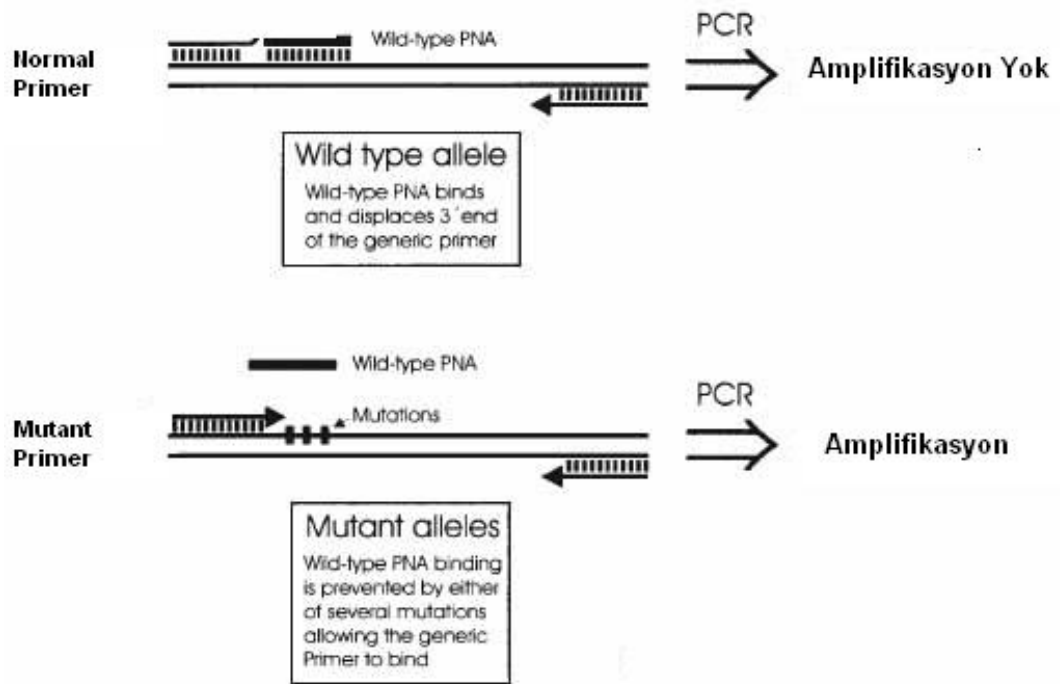
3.2.2. ASO-PCR

ABL kinaz geninde yer alan 4 farklı mutasyonun yer bulunduğu Y253H, E255K, T315I ve F317L (Tablo-6,7,8,9,10,11,12) bölgeleri ASO-PCR ile çoğaltıldıktan sonra %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek mutasyonu olan ve olmayan bireyler saptandı. Mutasyon saptanan örnekler DNA dizi analizi yapılarak mutasyonun doğrulanması sağlandı. Elde edilen sonuçlar başta t (9;22) pozitifliği olmak üzere diğer klinik parametrelerle karşılaştırılarak anlamlı bir ilişkinin bulunup bulunmadığı belirlendi (43).

PCR ürünleri, yatay elektroforezde (Thermo Midicell) %2.0 agaroz jel kullanılarak görüntülendi (Şekil 7). Agaroz jel hazırlanırken kullanılan araç ve kimyasallar aşağıda verilmiştir;

1. 100 ml 0.5x TBE tamponu (Tris Borat Tampon)
 - Tris baz
 - Borik asit
 - Na-EDTA
 - Distile Su (H₂O)
2. 2 gr Agaroz
3. 14 µl Etidyum Bromür
 - Etidyum bromid
 - Distile Su (H₂O)

4. 1 adet Erlen
5. 1 adet Mezür
6. 1 adet Mikrodalga Fırın
7. 1 adet Jel Küveti.



Şekil 7: Allel spesifik oligonükleotit PCR işleyiş mekanizması (57).

Tablo 6: ASO-PCR'da kullanılan primerlerin dizileri (43).

T315I Mutasyonu	
Reverse	315r: 5'_ gga tga agt ttt tct tct cca g_ 3' *
Forward Normal	F315C: 5'_ gcc ccc gtt cta tat cat cac _ 3'
Forward Mutant	F315T: 5'_ ccc gtt cta tat cat cat _ 3'
E255K Mutasyonu	
Reverse	244r : 5'_ gcc aat gaa gcc ctc gga c_ 3**
Forward Mutant	Y253H : 5'_ gct ggg cgg ggg cca gc _ 3'
Forward Normal	E255K : 5'_ gcg ggg gcc agt acg gga _ 3'
F317L Mutasyonu	
Reverse	315r: 5'_ gga tga agt ttt tct tct cca g_ 3' *
Forward Mutant	T315I: 5'_ gcc ccc gtt cta tat cat cat _ 3'
Forward Normal	F317L: 5'_ ccg ttc tat atc atc act gag ttg_ 3'

Tablo 7: T315I mutasyonu için PCR koşulları

PCR reaksiyonu karışımı	Normal Allel için	Mutant Allel için
DdH ₂ O	7 µL	7 µL
10XPCR buffer (-MgCl ₂)	2.5 µL	2.5 µL
MgCl ₂ (25 nM)	2 µL	2 µL
dNTP (25 mM)	2 µL	2 µL
Reverse Primer (25 pM)	3 µL	3 µL
Forward Mutant Primer (25 pM)	-	3 µL
Forward Mutant Primer (25 pM)	3 µL	-
Tag DNA Polimeraz (5 u/µL)	0.1 µL	0.1 µL
Genomik DNA (50ng)	5 µL	5 µL

Tablo 8:T315I mutasyonu için PCR şartları

Denatürasyon	95 C / 5 dakika	
Annealing	95 C / 45 saniye 64.2 C / 45 saniye 72 C / 1 dakika	40 döngü
Exstancion	72 C / 7 dakika	

Tablo 9: E255K ve Y253H mutasyonları için PCR koşulları

PCR reaksiyonu karışımı	Normal Allel için	Mutant Allel için
DdH ₂ O	7 µL	7 µL
10XPCR buffer (-MgCl ₂)	2.5 µL	2.5 µL
MgCl ₂ (25 nM)	2 µL	2 µL
dNTP (25 mM)	2 µL	2 µL
Reverse Primer (25 pM)	3 µL	3 µL
Forward Mutant Primer (25 pM)	-	3 µL
Forward Mutant Primer (25 pM)	3 µL	-
Tag DNA Polimeraz (5 u/µL)	0.1 µL	0.1 µL
Genomik DNA (50ng)	5 µL	5 µL

Tablo 10: E255K ve Y253H mutasyonları için PCR şartları

Denatürasyon	95 C / 5 dakika
Annealing	95 C / 45 saniye 59.7 C / 45 saniye 40 döngü
Extancion	72 C / 1 dakika 72 C / 7 dakika

Tablo 11: F317L mutasyonu için PCR koşulları

PCR reaksiyonu karışımı	Normal Allel için	Mutant Allel için
DdH2O	7 µL	7 µL
10XPCR buffer (-MgCl2)	2.5 µL	2.5 µL
MgCl2 (25 nM)	2 µL	2 µL
dNTP (25 mM)	2 µL	2 µL
Reverse Primer (25 pM)	3 µL	3 µL
Forward Mutant Primer (25 pM)	-	3 µL
Forward Mutant Primer (25 pM)	3 µL	-
Tag DNA Polimeraz (5 u/µL)	0.1 µL	0.1 µL
Genomik DNA (50ng)	5 µL	5 µL

Tablo 12: F317L mutasyonu için PCR şartları

Denatürasyon	95 C / 5 dakika
Annealing	95 C / 45 saniye 55.9 C / 45 saniye 40 döngü
Extancion	72 C / 1 dakika 72 C / 7 dakika

ABL kinaz bölgesinde ki nokta mutasyonlarının belirlenmesinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler içinde hassasiyeti en yüksek olan ASO-PCR'dır (Tablo 13). Bu yöntemde kullanılan primerlere bağlı olarak hassasiyet değişmektedir. Ayrıca ASO-PCR yöntemi hem ucuz hem hızlı hem de birçok laboratuvarda uygulanabilecek basit bir işleve sahiptir (43).

Tablo 13: ABL kinaz bölgesinde ki nokta mutasyonlarının tayin teknolojileri (6).

<u>Teknoloji</u>	<u>Duyarlılık (%)</u>	<u>Özgüllük %</u>
Direkt Sekanslama	15-25	++
Subklonlama ve Sekanslama	9	+++
Denatürleme-HPLC	0.1-10	++
Pirosekanslama	5	++
Çift-Gradient Denatür ELP	5	++
Floresan PCR ve PNA klemp	0.2	++
ASO-PCR	0.01	++

3.3. İstatistiksel Analiz:

Çalışmadaki bulguların analizi için SPSS 11.5 paket programı içinde, total sağkalım ve progresyonsuz sağkalım ile klinik parametrelerin karşılaştırılmasında Log Rank Test, T315I, F317L ve mutasyonların klinik parametreler ile karşılaştırılmasında pearson Ki-Kare testi kullanılmıştır. $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

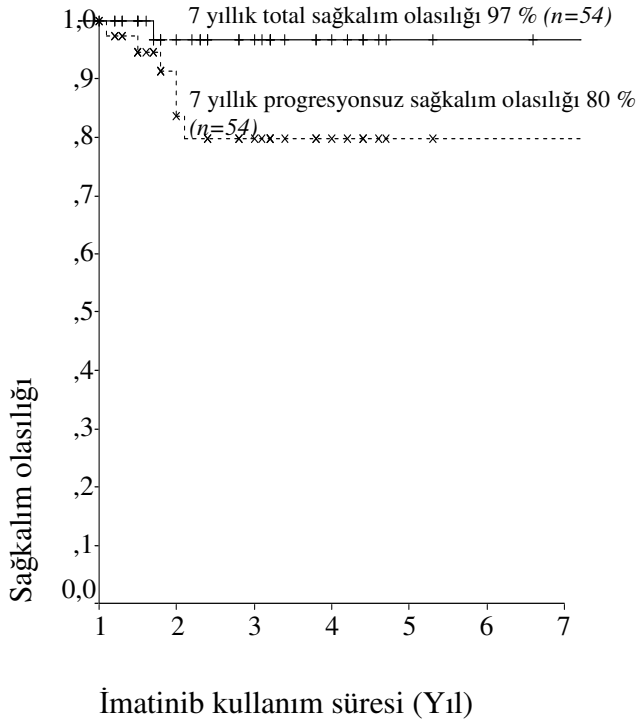
Bu çalışmaya 2000-2008 yılları arasında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Hematoloji polikliniğinde ve Erciyes Üniversitesinde izlenen 54 Ph (+) KML hastası alındı. Hastaların 12'si kadın 42'si erkek olup medyan yaş 44.5'dur (19-78). Tanıda 35 (%64.8) hastada splenomegali olup medyan splenomegali 4 cm'dir (0-18). Medyan hemoglobin (Hg) değeri 10.7 gr/dL (6.7-15.2) olup, Hgb değeri 11 gr/dL'nin altında olan hasta sayısı 28'dir (%51.8). Medyan lökosit değeri 73210 / μ L (4290-335000) olup, lökosit değeri 10000/ μ L'nin üzerinde olan hasta sayısı 53 (%98.1) ve lökosit değeri 100000/ μ L'nin üzerinde olan hasta sayısı 13'dür (%24.1). Medyan trombosit (Plt) değeri $451 \times 10^3 / \mu$ L (58-1400) olup, Plt değeri $450 \times 10^3 / \mu$ L'nin üzerinde olan hasta sayısı 28 (%51.9) ve plt değeri $100 \times 10^3 / \mu$ L'nin altında olan hasta sayısı 13'dür (%24.1). Sokol risk sınıflamasına göre; hastaların 12'si (%22.2) düşük riskli, 26'sı (% 48.1) orta riskli ve 16'sı (%29.6) yüksek riskli gruptadır. Hastaların %16.6'sında periferik eozinofil sayısı $> \%3$ 'ün üstündedir. Periferik promyelosit sayısı medyan %5 (1-30) olup, periferik blast sayısı medyan %2.5'dur (0-5). Kemik iliği blast sayısı medyan %2.5'dur (0-5). Retikülin lif derecesine göre hasta sayısı sırası ile; 1 olan 12 (%60), 2 olan 6 (%30), 3 olan 2 (%10)'dir. İmatinib öncesi hidroksiüre tedavisi alan hasta sayısı 26 (%48.1), hidroksiüre ve interferon alan hasta sayısı 8'dir (%14.8). Tanıdan sonra ilk imatinib tedavisi alan hasta sayısı 20'dir (%37.1). Hastaların imatinib tedavisine yanıt değerlendirmesinde hedef (optimal) yanıt sağlanan hasta sayısı 24 (%44.5), yetersiz (suboptimal) yanıt sağlanan hasta sayısı 10 (%18.5) ve yanıtız hasta sayısı 20'dir (%37.1). Taranan mutasyonlar hastaların 18'inde (% 33.3) belirlenmiş olup sırası ile T315I 11 (%20.3) (Resim 3) ve F317L 9 (%16.6) (Resim 4) hastada saptanırken, Y253H ve E255K (Resim 5) mutasyonları saptanmamıştır. Mutasyon belirlenen hastaların 2'sinde (%3.7) T315I ve F317L mutasyonu birlikteliği gözlenmiştir (Tablo 14).

Tablo 14: Kronik faz kronik myelositer lösemili hastaların tanıda klinik özellikleri			
		N	
Hasta sayısı		54	
Yaş (medyan)			44.5 (19-78)
Cinsiyet Erkek/Kadın		12 /42	
Splenomegali	cm*	35 (% 64.8)	4 (0-18)
Hemoglobin	gr/dL*		10.7 (6.7-15.2)
Lökosit	<11 gr/dL µL*	28 (%51.8)	
			73210 (4290-335000)
	>10000/µL	53 (%98.1)	
	>100000/µL	13 (%24.1)	
Trombosit	10 ³ /µL*		451 (58-1400)
	>450x10 ³ /µL	28 (%51.9)	
	<100x10 ³ /µL	2 (%3.7)	
Sokol Risk Sınıflandırması	0 (Düşük risk)	12 (%22.2)	
	1 (Orta risk)	26 (%48.1)	
	2 (Yüksek risk)	16 (%29.6)	
	3	3 (%16.6)	
Periferik Eosinofil	>3% n=18		5 (1-30)
Periferik Promeosit	%* n=24		2.5 (0-5)
Periferik blast	%* n=24		2.5 (0-5)
Kemik iliği blast	%* n=54		
Kemik iliği retikülin lif derecesi	n=20		
	1	12 (%60)	
	2	6 (%30)	
	3	2 (%10)	
İmatinib öncesi tedavi	Hidroksiüre	26 (%48.1)	
	Hidroksiüre+interferon	8 (%14.8)	
	Yok	20 (%37.1)	
İmatinib tedavisine yanıt (hematolojik, sitogenetik ve moleküler yanıt birlikte)	Hedef (optimal)	24 (%44.5)	
	Yetersiz (suboptimal)	10 (%18.5)	
	Yanıtız	20 (%37)	
BCR-ABL nokta mutasyonları	T315I	11 (%20.3)	
	F317L	9 (%16.6)	
	E255K	0	
	Y253H	0	

* =medyan

Hastaların 54'ü kronik fazdadır. İmatinib tedavisi alan hastalarda medyan izlem süresi 1.8 yıldır (0.3-7.2). İmatinib tedavisi sonrası 7 yıllık total sağkalım olasılığı %97'dir. İmatinib sonrası 7 yıllık progresyonsuz sağkalım olasılığı %80'dir (Şekil 8). Toplam mortalite 1 hastada görüldü. İmatinib tedavisi altında 6 hastada progresyon görülürken, imatinib tedavisi altında tam ve yetersiz yanıtla izlenen hasta sayısı 35, yanıtız izlenen hasta sayısı 19'dur (Tablo 15).

Tablo15: İmatinib tedavisi alan kronik myeloid lösemili hastaların klinik özellikleri		
		%
İmatinib öncesi Hastalık Durumu		
Kronik faz	54	100
7 Yıllık Total Sağkalım Olasılığı	%97	
İmatinib alanlarda İzlem Süresi (yıl)	1.8 (0.3-7.2)	
İmatinib sonrası 7 Yıllık Total Sağkalım Olasılığı	%97	
İmatinib sonrası 7 Yıllık İlerlesiz Sağkalım Olasılığı	%80	
Toplam Mortalite (İmatinibden 1.7 yıl sonra beyin ödeminden)	1	
Progresyon	6	
Optimal suboptimal yanıtla izlenen	35	
Yanıtsız yaşayan	19	



Şekil 8: İmatinib kullanan hastalarda 7 yıllık sağkalım olasılığı ilişkisi

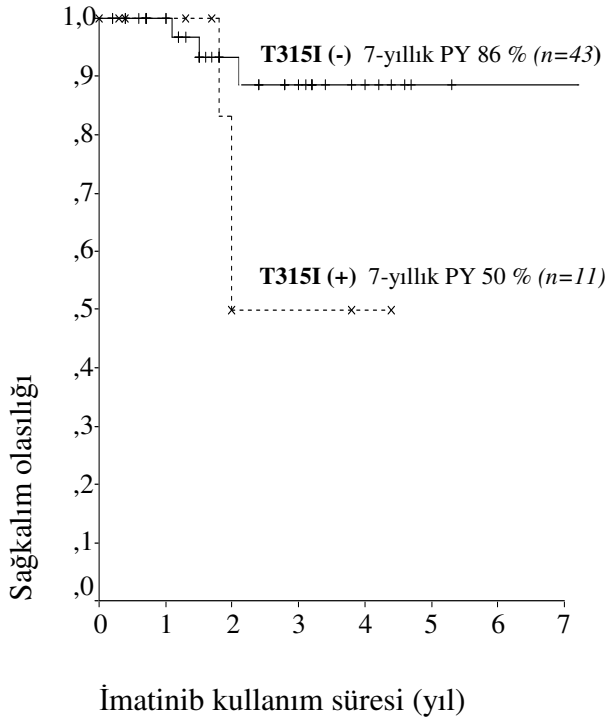
54 hastada 7 yıllık total sağkalım %97, 7 yıllık progresyonsuz sağkalım %80'dir. Sokol risk sınıflamasına göre düşük ve orta riskli 38 hastada 7 yıllık progresyonsuz sağkalım %100 olup, yüksek riskli hastalarda ise %83'dür (p=0.1245). Erkek grubunda 7 yıllık toplam sağkalım %100, kadın grubunda ise

%96'dir. (p=0.3384). Periferik eosinofil sayısı \leq %3 altında ve $>$ %3 üstünde olan gruplarda 7 yıllık total sağkalım %100'dür. Kemik iliğinde retiküler lif derecesi 1 ve $>$ 1 olan gruplarda 7 yıllık total sağkalım %100'dür. İmatinib tedavisi altında optimal ve yetersiz yanıt elde edilen gruplarda 7 yıllık total sağkalım %100, yanıtız grupta ise %92'dir. (p=0.5004) İmatinib tedavisi öncesi hidroksiüre tedavisi alan grupta 7 yıllık total sağkalım %94 olup imatinib tedavisi öncesinde hidroksiüre ve interferon tedavisi alan grupta 7 yıllık total sağkalım %100'dür. (p=0.6969). T315I nokta mutasyonu olan grupta 7 yıllık total sağkalım %100 olup, T315I mutasyonu olmayan grupta ise %96'dir. (p=0.6610). F317L nokta mutasyonu olan grupta 7 yıllık total sağkalım %100 olup, F317L mutasyonu olmayan grupta ise %96'dir. (p=0.6610). T315I ve F317L mutasyonu olan gruplarda 7 yıllık total sağkalım %100 olup, nokta mutasyonu olmayan grupta ise %95'dir. (p=0.4902).

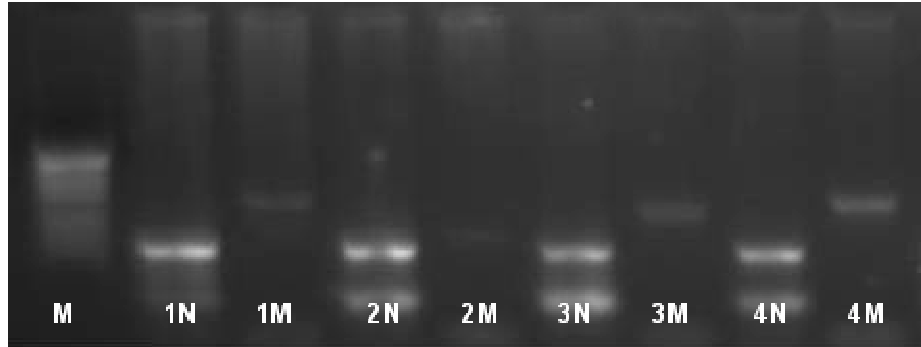
Sokol risk sınıflamasına göre düşük riskli grupta 7 yıllık progresyonsuz sağkalım %80'dir. Orta riskli grupta %85'dir. Yüksek riskli grupta ise %66'dir. (p=0.6070). Erkek hastalarda 7 yıllık progresyonsuz sağkalım % 88, kadın hastalarda ise %77'dir. (p=0.5106). Periferik eosinofil sayısı \leq %3 altında olan grupta 7 yıllık progresyonsuz sağkalım %72 olup, \geq %3 üstünde olan grupta %100'dür. (p=0.7518). Kemik iliğinde retiküler lif derecesi 1 olan grupta 7 yıllık progresyonsuz sağkalım %67 olup, $>$ 1 olan grupta ise 7 yıllık progresyonsuz sağkalım %100'dür. (p=0.8055). İmatinib tedavisi altında optimal yanıt ve yetersiz yanıt elde edilen gruplarda 7 yıllık progresyonsuz sağkalım %100 ve yanıtız grupta ise %54'dür. (p=0.009). İmatinib tedavisi öncesi hidroksiüre tedavisi alan grupta 7 yıllık progresyonsuz sağkalım %75 olup imatinib tedavisi öncesinde hidroksiüre ve interferon tedavisi alan grupta 7 yıllık progresyonsuz sağkalım %83'dür. (p=0.7946). T315I nokta mutasyonu olan grupta 7 yıllık progresyonsuz sağkalım %50 olup, T315I mutasyonu olmayan grupta ise %86'dir. (p=0.0470) (Şekil 9). F317L nokta mutasyonu olan grupta 7 yıllık progresyonsuz sağkalım %66 olup, F317L mutasyonu olmayan grupta ise %83'dür. (p=0.208). T315I ve F317L mutasyonu olan grupta 7 yıllık progresyonsuz sağkalım %62 olup, nokta mutasyonu olmayan grupta ise %90'dir (p=0.0610) (Tablo 16).

Tablo 16: KF-KML'de klinik parametrelerin sağkalım üzerine etkisi (Logrank test)

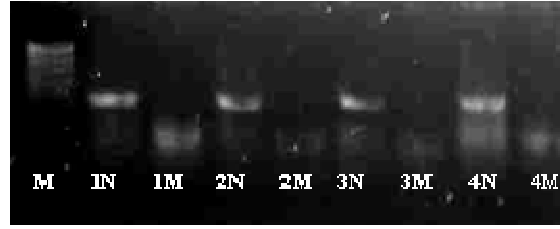
	N	7-y TY (%)	Log Rank P	7-y PY (%)	Log Rank p
Hasta Sayısı	54	97		80	
Sokol					
0 (Düşük risk)	12	100	0.1245	80	0.6070
1 (Orta risk)	26	100		85	
2 (Yüksek risk)	16	83		66	
Cinsiyet					
Kadın	42	96	0.3384	77	0.5106
Erkek	12	100		88	
Periferik eosinofil					
≤%3	15	100		72	0.7518
>%3	3	100		100	
Kemik iliğinde retiküler lif derecesi					
1	12	100		67	0.8055
>1	8	100		67	
İmatinib tedavisine yanıt					
Hedef (optimal)	24	100	0.5004	100	0.0095
Yetersiz (suboptimal)	10	100		100	
Yanıtız	20	92		54	
İmatinib öncesi tedavi					
Hidroksiüre	26	94	0.6969	75	0.7946
Hidroksiüre+interferon	8	100		83	
Yok	20	100		86	
BCR-ABL nokta mutasyonları T315I					
Yes	11	100	0.5892	50 (2 y)*	0.0470
No	43	96		86	
BCR-ABL nokta mutasyonları F317L					
Yes	9	100	0.6610	66	0.2088
No	45	96		83	
BCR-ABL nokta mutasyonları T315I ± F317L					
Yes	18	100	0.4902	62	0.0610
No	36	95		90	
Sokol: hasta yaş, dalak büyüklüğü, periferik kanda blast yüzdesi ve trombosit sayısı *() median yıl, Y:yıl TY: total yaşam; PY: progresyonsuz yaşam					



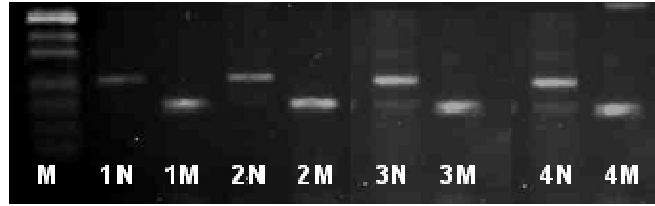
Şekil 9: T315I mutasyonunun progresyonsuz sağkalım üzerine etkisi.



Resim 5: T315I BCR-ABL nokta mutasyonuna ait jel görüntüsü. M: Marker N: Normal M: mutant, 1,3,4 nolu örneklerde normal primerlerle amplifikasyon var, mutant primerlerle yok. 2 nolu örnekte hem mutant hem normal bölgede amplifikasyon var.



Resim 6: F317L BCR-ABL nokta mutasyonuna ait jel görüntüsü. M: Marker N: Normal M: mutant,1,2,3,4 nolu örneklerde normal primerlerle amplifikasyon var, mutant primerlerlr yok.



Resim 7: E255K ve Y253H BCR-ABL nokta mutasyonuna ait jel görüntüsü. M: Marker N: Normal M: mutant,1,2,3,4 nolu örneklerde normal primerlerle amplifikasyon var, mutant primerlerlr yok.

T315I BCR-ABL nokta mutasyonu ile sokol risk derecelendirmesi, cinsiyet, kemik iliği retiküler lif derecesi, hemoglobin, lökosit ve trombosit sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. T315I BCR-ABL nokta mutasyonu ile periferik eozinofil yüzdesi arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p=0.011$). Periferik eozinofil $>3\%$ 'ün üzerinde olanlarda T315I nokta mutasyonu görülme riski 28 kat artmıştır. Beklendiği gibi T315I BCR-ABL nokta mutasyonu ile imatinib tedavisine yanıt arasında bizim hasta grubumuzda anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p=0.002$) (Tablo 17).

Tablo 17: T315I BCR-ABL nokta mutasyonu ile klinik parametrelerin karşılaştırılması

	n	T315I negatif	T315I pozitif	Risk	95% Interval	Ki-Kare Testi P
Hasta Sayısı	54					
Sokal						0.885
0 (Düşük risk)	12	10	2			
1 (Orta risk)	26	20	6			
2 (Yüksek risk)	16	13	3			
Gender						0.206
Kadın	42	35	7	0.400	0.94-1.703	
Erkek	12	8	4			
Periferik eosinofil						0.011
≤%3	15	14	1	28.000	1.208-648.809	
>%3	3	1	2			
Kemik iliğinde retiküler lif derecesi						0.110
1	12	11	1	6.600	0.543-80.235	
>1	8	5	3			
İmatinib tedavisine yanıt						0.002
Hedef (optimal)	24	23	1			
Yetersiz (suboptimal)	10	9	1			
Yanıtız	20	11	9			
Hemogloblin						0.249
<11 gr/dL	28	24	4	0.452	0.115-1.777	
>11 gr/dL	26	19	7			
Lökosit						0.193
<100x10 ³ /μL	41	31	10	0.258	0.030-2.242	
>100x10 ³ /μL	13	12	1			
Trombosit						0.381
>450x10 ³ /μL	25	21	4	1.833	0.468-7.188	
<450x10 ³ /μL	29	22	7			

F317L BCR-ABL nokta mutasyonu ile sokol risk derecelendirmesi, cinsiyet, periferik eozinofil yüzdesi, kemik iliği retiküler lif derecesi, imatinib tedavisine yanıt, hemogloblin, lökosit, trombosit sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Tablo 18).

Tablo 18: F317L BCR-ABL nokta mutasyonu ile klinik parametrelerin karşılaştırılması

	n	F317L negatif	F317L pozitif	Risk	95% Interval	Ki-Kare Testi P
Hasta Sayısı	54					
Sokal						0.960
0 (Düşük risk)	12	10	2			
1 (Orta risk)	26	22	4			
2 (Yüksek risk)	16	13	3			
Cinsiyet						0.084
Kadın	42	33	0	1.273	1.087-1.490	
Erkek	12	12	9			
Periferik eosinofil						0.396
≤%3	15	12	3	0.800	0.621-1.030	
>%3	3	3	0			
Kemik iliğinde retiküler lif derecesi						0.292
1	12	10	2	0.229	0.372-24.171	
>1	8	5	3			
İmatinib tedavisine yanıt						0.320
Hedef (optimal)	24	22	2			
Yetersiz (suboptimal)	10	8	2			
Yanıtız	20	15	5			
Hemoglobin						0.626
<11 gr/dL	28	21	5	0.066	0.166-2.952	
>11 gr/dL	26	24	4			
Lökosit						0.477
<100x10 ³ /μL	41	35	6	0.096	0.370-8.270	
>100x10 ³ /μL	13	10	3			
Trombosit						0.330
>450x10 ³ /μL	25	22	6	0.130	0.465-9.409	
<450x10 ³ /μL	29	23	3			

Mutasyonlar ile sokol risk derecelendirmesi, cinsiyet, periferik eozinofil yüzdesi, kemik iliği retiküler lif derecesi, hemoglobin, lökosit, trombosit sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Mutasyonlar ile imatinib tedavisine yanıt arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur (p=0.004) (Tablo 19).

Tablo 19: Mutasyonlar ile klinik parametrelerin karşılaştırılması

	n	Mutasyon yok	Mutasyon var	Risk	95% Interval	Ki-Kare testi P
Hasta Sayısı	54					
Sokal						0.975
0 (Düşük risk)	12	8	4			
1 (Orta risk)	26	17	9			
2 (Yüksek risk)	16	11	5			
Cinsiyet						
Kadın	42	28	14	0.000	0.256-3.960	1.000
Erkek	12	8	4			
Periferik eosinofil						
≤%3	15	11	4	0.302	0.385-78.573	0.180
>%3	3	1	2			
Kemik iliğinde retiküler lif derecesi						
1	12	9	3	0.351	0.720-34.726	0.094
>1	8	3	5			
İmatinib tedavisine yanıt						
Hedef (optimal)	24	21	3			0.004
Yetersiz (suboptimal)	10	7	3			
Yanıtız	20	8	12			
Hemoglobin						
<11 gr/dL	28	21	7	0.180	0.143-1.445	0.178
>11 gr/dL	26	15	11			
Lökosit						
<100x10 ³ /μL	41	26	15	0.112	0.123-2.191	0.368
>100x10 ³ /μL	13	10	3			
Trombosit						
>450x10 ³ /μL	28	17	11	0.130	0.555-5.556	0.336
<450x10 ³ /μL	26	19	7			

5. TARTIŞMA

İmatinib esas olarak cABL-ATP bağlanma bölgesinin bir inhibitörüdür. Bu nedenle BCR-ABL kinaz bölgesinde ki mutasyonlar imatinib bağlanmasını engeller. BCR-ABL'de kinaz bölgesi mutasyonları, kazanılmış imatinib dirençi olan hastaların %50-60'ını oluşturur (4).

Bu çalışmada tanıda Sokol risk sınıflamasına göre; hastaların 12'si (%22.2) düşük riskli, 26'sı (% 48.1) orta riskli ve 16'sı (%29.6) yüksek riskli gruptadır. Bu çalışmada sokol risk sınıflaması ile mutasyon sıklığı arasında ilişki gösterilememiştir (p=0.975).

İmatinib tedavi yanıtı değerlendirildiğinde; hastaların 24'ü (%44.4) optimal yanıtı, 10'u (%18.5) suboptimal yanıtı 20'si (%37) ise yanıtı olarak değerlendirilmiştir. Hess G ve arkadaşlarının çalışmasında Ph + kronik faz 59 KML hastasında sitogenetik, moleküler ve hemotolojik olarak yanıtı olan hasta sayısı 28 (%51) bulunmuştur (44). Lehaye T ve arkadaşlarının çalışmasında Ph + 300 KML hastasında kronik faz hastaların %29 yanıtı olarak değerlendirilmiştir (45).

BCR-ABL mutasyonları medyan 1.8 yıllık izlemde hastaların 18'inde (% 33.3) belirlenmiştir. Lehaye T ve arkadaşlarının çalışmasında Ph+ 300 KML hastasının imatinib tedavisi altında 4.5 yıllık izlem sonucunda hastaların %45'inde mutasyon saptanmıştır (45). Yapılan diğer çalışmalarda %13.4-48 arasında mutasyon sıklığı gösterilmiştir (37,46). Litartürler ile sonucumuz benzerlik göstermektedir.

KF KML hasta grubumuzda T315I nokta mutasyonu gösterilen hasta %20.3'dür (11). Yanıtı 20 hastanın 9'unda (%45) T315I mutasyonu gösterilmiştir. Litaratürlerde T315I nokta mutasyonu oranı %16.6-26 arasındadır (32,47,48). Sonucumuz litaratürlerle uyumludur. T315I mutasyonunda yeni tirozin kinaz inhibitörleri tedavide etkili değildir. Bu mutasyonda allogenik kök hücre transplantasyonu önerilmektedir (5).

F317L nokta mutasyonu %16.6 hastada gösterilmiştir. Litaratürlerde F317L mutasyon sıklığı %4-8'dir (46,47,49). Bizim grupta F317L mutasyonunun sıklığı yüksektir.

E255K ve Y253H nokta mutasyonuna sahip hastalar saptanmamıştır. Branford S ve arkadaşlarının çalışmasında 18 KML hastasının 4'ünde (%22.2) E255K mutasyonu ve 1'inde (%5) Y253H mutasyonu saptanmıştır (47). Ouyang Z ve arkadaşlarının çalışmasında 23 KML hastasının 1'inde (%4) E255K mutasyonu ve 1'inde (%5) Y253H mutasyonu saptanmıştır (49).

Mutasyon belirlenen hastaların 2'sinde (%3.7) T315I ve F317L mutasyonu birlikteliği saptanmıştır. Litaratürlerde T315I ve F317L mutasyonu birlikteliği bulunmamaktadır

İmatinib tedavisine yanıtız hastaların %60'ın da mutasyon saptanmıştır (p=0.004). Lehay T ve arkadaşlarının çalışmasında Ph + 300 KML hastasının kronik faz hastalarının 35'inde kazanılmış direnç geliştiği bildirilmektedir. Kazanılmış direnç gelişen 35 kronik faz hastanın %50'sinde mutasyon saptanmıştır (45). Ernst T ve arkadaşlarının çalışmasında imatinib tedavisine yetersiz yanıtı olan ve yanıtız olan 911 KML hastanın %50'sinde mutasyon saptamışlardır (50). Soverini S ve arkadaşlarının çalışmasında imatinib tedavisine yanıtız 297 KML hastasının %43'ünde mutasyon saptanmıştır (51). Blastik faz hastaların %75'inde mutasyon saptanmıştır (51). Sonucumuz litaratürlerle uyumluluk göstermektedir.

Medyan total ve progresyonsuz yaşam sürelerine henüz ulaşılmamış olup, 7 yılda beklenen total sağkalım %97, progresyonsuz sağkalım %80 bulunmuştur. Lehay T ve arkadaşlarının çalışmasında 300 KML hastasında kronik faz hastaların beklenen total sağkalımı %88 bulunmuş, blastik faz hastalarında ise 2 yıllık total sağkalım %17'dir (45). IRIS çalışmasında akselere ve blastik faz hastalarında 5 yıllık total sağkalım %83, progresyonsuz sağkalım %93 bulunmuştur. 5 yıllık total sağkalım KML hastalarında %89'dur (27). Rosti G ve arkadaşlarının çalışmasında 158 KML hastasında akselere (hızlanmış) ve blastik fazda 5 yıllık total sağkalım %91, progresyonsuz sağkalım %95 bulunmuştur (52). Yaşam olasılıkları litaratürlerle benzer bulunmuştur.(5).

T315I mutasyonu saptanan hastalarda 2 yıllık PFS %50, saptanmayan hastalarda ise %86'dır (p=0.0470). Nicolini FE ve arkadaşların çalışmasında İmatinib'e dirençli 89 KML hastasında T315I mutasyonunda yaşam süreleri kısa

bulunmuştur (48). Sonucumuz literatürle benzerdir. T315I mutasyonunda yeni tirozin kinaz inhibitörleri tedavide etkili değildir. Bu mutasyonda allogeneik kök hücre transplantasyonu önerilmektedir (5). P-loop bölgesi mutasyonları ile non-P-loop bölgesi mutasyonları arasında yaşam süresi açısından anlamlı bir farklılık bulunmaktadır (37). P loop bölgesi mutasyonlarında yaşam süresi daha kısadır (37). T315I mutasyonu KML hastalarında kötü prognostik faktördür (53).

Sokol risk sınıflamasına göre düşük riskli 12 hastada 7 yıllık toplam sağkalım %100'dür. Orta riskli 26 hastada %100'dür. Yüksek riskli 16 hastada ise %83 ($p=0,1245$). Baccarani M ve arkadaşlarının çalışmasında sokol risk sınıflamasına göre düşük, orta ve yüksek riskli grupta 54 aylık toplam sağkalım sırası ile; %94, %88, %81'dir ($p<0.001$) (54). Lehay T ve arkadaşlarının çalışmasında 124 kronik faz KML hastasında sokol risk sınıflamasına göre düşük, orta ve yüksek grupta 2 yıllık toplam sağkalım sırası ile; %98, %91 ve %100'dür (45). Sonucumuz literatürlerle benzerdir.

İmatinib tedavisi altında hastaların ortalama izlem süresi 1.8 yıldır. Bu imatinib kullanım süresinde hastaların 18'inde (%33.3) mutasyon saptanmıştır. Literatürlerde 4 yıldan az imatinib kullanan hastaların %18'inde mutasyon gelişmiştir 4 yıldan fazla imatinib kullanan hastaların %41'inde mutasyon gelişimi olmuştur ($p<0.001$) (46). İmatinib kullanım süresi arttıkça mutasyon görülme sıklığıda artmaktadır.

Hastaların %37'si imatinib tedavisine yanıtızsızlık olarak değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmalarda hastalık evresi ilerledikçe direnç gelişimi artmaktadır. Lehay T ve arkadaşlarının çalışmasında hastalığın evresine göre direnç gelişimine bakıldığında Kronik faz ($n=139$) hastaların %29'u, akselere faz ($n=80$) hastaların %45'i ve blastik faz hastaların ($n=76$) %92'sinde direnç gelişimi saptanmıştır (45). Stone MR ve arkadaşların çalışmasında 387 KML hastasının 127'sinde (%32) yanıtızsızlık gelişmiştir (41). Çalışmamızla literatürler arasında uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.

Yanıtızsız 20 hastadan 1'i (%5) imatinib kullanımına bağlı beyin ödemi gelişmesi sonucu kaybedilmiştir. 300 KML hastası ile yapılan bir çalışmada kronik fazda

yanıtsız olan 41 hastadan 4'ü (%10) imatinib kullanımı sırasında kaybedildiği bildirilmektedir (45). Aynı çalışmada akselere fazda yanıtsız hastalarda mortalite %28, blastik faz hastalarda mortalite %32 olarak bildirilmektedir (45). Hastalık fazı ilerledikçe ölüm oranları artmaktadır. Kaybedilen 1 hasta tedaviye yanıtsız olup hastada incelenen 4 mutasyonda tespit edilememiştir. Hastada yanıtsızlığa neden olan durum diğer bölge mutasyonları ya da ikincil direnç gelişimine neden olan BCR-ABL gen amplifikasyonu, alfa-1 asit protein, MDR-1 olabilir (29).

19 hastada sitogenetik inceleme yapıldı ve 1'inde (%5) trizomi 8 saptandı. İmatinib tedavisine yanıtsız 66 KML hastası ile yapılan bir çalışmada hastaların 6'sında (%9) trizomi 8 bildirilmiştir (29). 342 Ph + KML hastasında 30 aylık izlem sonucunda 25 hastada çeşitli kromozomal anomali belirlenmiş olup trizomi 8 bulunan hasta sayısı 8'dir (55).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın sonucunda BCR-ABL nokta mutasyonlarından en sık T315I nokta mutasyonu görülmüştür. T315I mutasyon sıklığı literatürlerle uyumludur. T315I mutasyonlarında yeni trozin kinaz inhibitörleri etkili değildir. Bu mutasyonda hastalar allogenik kök hücre transplantasyonuna yönlendirilmelidir. Y253H, E255K mutasyonlarında dasatinib nilotinib'den daha etkili, F317L mutasyonunda ise nilotinib dasatinib'den daha etkili olduğu bildirilmektedir. F317L nokta mutasyonu olan hastalarda nilotinib'e geçilmesi planlanmıştır. T315I mutasyonu görülenlerde progresyonsuz sağkalım düşüktür ($p=0.0470$). Hastaların imatinib kullanma süresi ortalama 1.8 yıl olup imatinib kullanma süresi arttıkça direnç gelişiminin arttığı unutulmamalıdır. Bu çalışmada imatinib tedavisine yanıtız hastaların %60'ında mutasyon saptanmıştır. Yanıtız hastalarda progresyonsuz sağkalım oranı düşüktür ($p=0.004$). KML'de sokol prognostik bir faktör ve KML'de hastalık evresi ilerledikçe mutasyon sıklığı artmaktadır. Çalışmamızda sokol risk sınıflaması ile mutasyon sıklığı arasında ilişki bulunmamıştır. Bu nedenle BCR-ABL nokta mutasyonları KML'de sokol'a göre daha önemli bir prognoz belirleyicisidir. Optimal tedavi şeklinin belirlenmesi açısından; KML hastalarında direnç erken dönemde tanımlanmalı, mutasyon tipi belirlenerek mutasyona göre rasyonel tedavi şekli planlanmalıdır. Bu çalışma ile Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesinde 4 mutasyona rutin olarak bakılmaya başlanmıştır. Bu durum KML hastalarının tedavisinin planlanmasında önemli olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1- Baccarani M, Rosti G, de Vivo A, Bonifazi F, Russo D, Martinelli G. Italian Cooperative Study Group on Myeloid Leukemia. A randomized study of interferon-alpha and low-dose arabinosyl cytosine in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2002; 99: 1527-1535.

2- Wei Y, Hardling M, Olsson B, Hezaveh R, Ricksten A, Stockelberg D, Y et al. Not all imatinib resistance in CML are BCR-ABL kinaz domain mutations. *Ann Hematol*. 2006;85(12):841-847.

3- Litzow MR. Imatinib Resistance Obstacles and Oppurtunities. *Arch Pathol Lab Med*. 2006;130:669-679.

4- Cools J, Maertens C, Peter Marynen. Resistance to tyrosine kinase inhibitors: Calling on extra forces. *Drug Resist Updat*. 2005;8:119-129.

5- Shah N. Not Abl mutations are 'equal' . Third ESH International Confarence on Chronic Myeloid Leukemia in the 21st Centruy 11-13 November, 2005, Genova, Italy.

6- Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, Branford S, Radich J, Kaeda J. et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting *BCR-ABL* transcripts and kinase domain mutations and for expressing results *Blood*. 2006; 108(1):28-37.

7- Mughal TI, Goldman JM. Chronic myeloid leukemia: STI 571 magnifies the therapeutic dilemma. *Eur J Cancer*. 2001;37(5):561-568.

8- Haznedaroğlu İC. Kronik myeloid lösemi. Türkiye Klinikleri J Int Med Sci. 2007; 3(2):56-61.

9- Dinçkol G. Nobel Tıp Kitapevleri. Klinik Hematoloji Kitabı. 2003;199-214.

10- Nowell PC and Hungerford DA. A minutes chromosome in human granulocyte leukemia. Science. 1960;132:1497.

11- Melo JV, Hughes TP, Apperley JF. Chronic myeloid leukemia. ASH education book, Washington, 2003; 132-152.

12- Laneuville P. Abl tyrosine kinase. Semin Immunol. 1995;7:255-266.

13- Akçora D. İmatinib Tedavisi Alan Kronik Myeloid Lösemi Hastalarında T315I, E255K ve M351T Mutasyonlarının Saptanması. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2007.

14- Baran Y. Kronik myeloid lösemi genetiği. Türkiye Klinikleri J Int Med Sci. 2007; 3(2):50-55.

15- Michael WND, John MG, Junia VM. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood. 2000; 96(10):3343-3356.

16- Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. Blood. 2005;105(7):2640-2653.

- 17- Osman İlhan. Kronik Myelositer Lösemi. 2006. www.osmanilhan.com
- 18- Hoffman R, ED, Hematology, Basic Principles and Practice, 3rd Edition, Pennsylvania, Churchill Livingstone, 2000.
- 19- Faderl S, Talpaz M, Estrow Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian H. Et al. The biology of chronic myeloid leukemia. *New Engl J Med.* 1999;341(3):164-172.
- 20- Kantarjian HM, O'Brien S, Smith TL, Mary BR, Jorge Cortes, Miloslav Beran. et al. Treatment of Philadelphia chromosome positive early chronic phase chronic myelogenous leukemia with daily doses of interferon alpha and low dose cytarabine. *J Clin Oncol* 1999;17:284-292.
- 21- Guilhot F, Chastang C, Michallet M, Guerci A, Maloysel F, Guyotat D, et al. IFNa 2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia. French Chronic Leukemia Study Group. *N Engl J Med* 1997;337(4):223-229.
- 22- Gratwohl A, Brand R, Apperlel J, Crawley C, Rulutu T, Corradini T, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia in Europe 2006: transplant activity, long-term data and current results. An analysis by the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow. *Transplantation (EBMT) Haematologica.* 2006;91(4):513-521.
- 23- Baker DE. İmatinib meyslate. *Rev Gastroenterol Disord* 2002;2(2):75-86.
- 24- Duruker BJ. İmatinib and chronic myeloid leukemia: validating the promise of molecularly targeted therapy. *Eur J Cancer* 2002;38(5):70-76.

25- Kantarjian HM, Talpaz M, O'Brien S, Smith TL, Giles FJ, Faderl S, et al. Imatinib mesylate for Philadelphia chromosome-positive, chronic-phase myeloid leukemia after failure of interferon-alpha: follow-up results. *Clin Cancer Res* 2002; 8(7):2177-2187.

26- Druker BJ, Guilhot F, O'Brien S. Long-term benefits of imatinib (IM) for patients newly diagnosed with chronic myelogenous leukemia in chronic phase (CML-CP): the 5-year update from the IRIS study [abstract]. *J Clin Oncol*. 2006;24:338s.

27- Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Kantarjian H, Gatterman H, Michael WN, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2006;355:2408-2417.

28- Kantarjian HM, Sawyers C, Hochhaus A. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia, *N Engl J Med*. 2002;346:645-652.

29- O'Brien SG, Deininger MW. Imatinib in patients with newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia. *Semin Hematol*. 2003;40:26-30.

30- Topçuoğlu P. Kronik myeloid lösemide imatinib direnci ve tedavi seçenekleri. *Turkiye Klinikleri J Int Med Sci*. 2007;2(3):62-73.

31- Gambocorti-Passerini C, Le Coutre P, Zucchetti M, D'Incalci M. Binding of imatinib to α -acid glycoprotein. *Blood*. 2002;100:367-368.

32- Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, La Rosée P, Müller MC, Lahaye T, et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia*. 2002;16(11):2190-2196.

33- Shah NP. Loss of Response to Imatinib: Mechanisms and Management Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2005;183-187.

34- Melo J.V, Chuach C. Resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. Cancer Letters. 2007;249(2):121-132.

35- Tauchi T, Ohyashiki K. Molecular mechanisms of resistance of leukemia to imatinib mesylate. Leukemia Research 2004;S39-S45.

36- Rosti G. Imatinib in CML The Clinicians Perspective in 2007. Conference Cyprus: September 15, 2007.

37- Soverini S, Martinelli G, Rosti G, Bassi S, Amabile M, Poerio A, et al. ABL mutations in late chronic phase chronic myeloid leukemia patients with up-front cytogenetic resistance to imatinib are associated with a greater likelihood of progression to blast crisis and shorter survival: a study by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. J Clin Oncol. 2005;23(18):4100-4109.

38- Marin D. Granulocyte colony-stimulating factor reverses cytopenic responses in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate. Hematologica 2003;88:277-279.

39- O'Hare T, Walters DK, Stoffregen EP, Jia T, Manley PW, Mestan J, et al. In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. Cancer Res 2005;65:4500-4505.

40- Hochhaus A, Kantarjian H, Baccarani HM. Dasatinib in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia (CP-CML) who are resistant or intolerant to

imatinib: Results of the CA180013 'START-C' Study. *Journal of Clinical Oncology*, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. 2006;24(18):6508.

41- Stone MR, Kantarjian HM, Baccarani M, Lipton JH, Hughes T, Ezzeddine R, et al. Efficacy of Dasatinib in Patients with Chronic-Phase Chronic Myelogenous Leukemia with Resistance or Intolerance to Imatinib: 2-Year Follow-Up Data from START-C (CA180-013). www.cmlsociety.org. Dasatinib-ASH December 11, 2007.

42- Kantarjian H, O'Brien S, Talpaz M, Borthakur G, Ravandi F, Faderl S, et al. Outcome of pts with ph+ CML post IM failure. *Cancer*. 2007;109:1556-1560.

43- Kang HY, Hwank JU, Kim SH, Goh HG, Kim M, Kim DW. Comparison of allele specific oligonucleotide-polymerase chain reaction and direct sequencing for high throughput screening of ABL kinase domain mutations in chronic myeloid leukemia resistance to imatinib. *Haematologica*. 2006;91(5):659-662.

44- Hess G, Meyer RG, Schuch B, Bechthold K, El-Kholy I, Huber C. Sustained remissions and low rate of BCR-ABL resistance mutations with imatinib treatment chronic myelogenous leukemia in patients treated in late chronic phase: A 5 year follow up. *Am J Hematology*. 2008;83(3):178-184.

45- Lehay T, Reihem B, Berger U, Paschka P, Müller MC, Kreil S, et al. Response and Resistance in 300 patients with BCL-ABL –Positive Leukemias Treated with Imatinib in Single Center. *American Cancer Society*. 2005;103(8):1659-69.

46- Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Parkinson I, Grigg A, Szer J, et al. Detection of *BCR-ABL* mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood*. 2003;102(1):276-283.

47- Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Grigg A, Arthur C, Taylor K, et al. High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance. *Blood*. 2002; 99(9):3472-3475.

48- Nicolini FE, Corm S, Lê QH, Sorel N, Hayette S, Bories D, et al. Mutation status and clinical outcome of 89 imatinib mesylate-resistant chronic myelogenous leukemia patients: a retrospective analysis from the French intergroup of CML (Fi(phi)-LMC GROUP). *Leukemia*. 2006;20(6):1061-1066.

49- Ouyang Z, DU QF, Liu XL, Zhang S, Zhu HQ, Gong JM, et al. Detection of ABL kinase domain point mutations in chronic myeloid leukemia patients receiving imatinib treatment. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2008;28(5):704-706.

50- Ernst T, Hoffmann J, Erben P, Hanfstein B, Leitner A, Hehlmann R, et al. ABL single nucleotide polymorphisms may masquerade as BCR-ABL mutations associated with resistance to tyrosine kinase inhibitors in CML patients. *Haematologica*. 2008 Jul 4.

51- Soverini S, Colarossi S, Gnani A, Rosti G, Castagnetti F, Poerio A, et al. Contribution of ABL Kinase Domain Mutations to Imatinib Resistance in Different Subsets of Philadelphia-Positive Patients: By the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *Clinical Cancer Res*. 2006;12:7374-7379.

52- Rosti G. Five-year follow-up results of imatinib 400 mg in late chronic phase chronic myeloid leukemia (CML) patients. *ASCO*. 2007;25(1):7041.

53- Nicolini FE, Hayette S, Corm S, Bachy E, Bories D, Tulliez M, et al. Clinical outcome of 27 imatinib mesylate-resistant chronic myelogenous leukemia patients harboring a T315I BCR-ABL mutation. *Haematologica*. 2007;92(9):1238-1241.

54- Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum F, et al. Leukemia Net recommendations from an expert panel on behalf of the European Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: Blood. 2006;108:1809-1820.

55- Medina J, Kantarjian H, Talpaz H, O'Brien S, Giles F, Rios MB, et al. Chromosomal abnormalities in Philadelphia chromosome-negative metaphases appearing during imatinib mesylate therapy in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase. Cancer. 2003;98(9):1905-1911

56- Xpert BCR-ABL Monitör TM. [www. Cepheid.com](http://www.Cepheid.com).

57- Allel Specific Oligonukleotit PCR İşleyiş Mekanizması [www. Google.com](http://www.Google.com).

