

T.C

ONDOKUZMAYIS ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRLERİNE (TKİ) DİRENÇLİ KRONİK
MYELOİD LÖSEMİ (KML) HASTALARINDA BCR-ABL KİNAZ BÖLGE
MUTASYONLARININ SIKLIĞI, DAĞILIMI VE PROGNOZA ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ömer Salih AKAR

SAMSUN

2017

T.C

ONDOKUZMAYIS ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRLERİNE (TKİ) DİRENÇLİ KRONİK
MYELOİD LÖSEMİ (KML) HASTALARINDA BCR-ABL KİNAZ BÖLGE
MUTASYONLARININ SIKLIĞI, DAĞILIMI VE PROGNOZA ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ömer Salih AKAR

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Gönül OĞUR

SAMSUN

2017

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimin her aŐamasında bilgi ve deneyimi ile bana yol gÖsteren, bilimsel çalışmalarda yardımını esirgemeyen ve yetiŐmemde bÜyÜk emeği olan saygıdeğer hocam ve tez danıŐmanım Prof. Dr. GÖnÜl Oğur'a, asistanlığım boyunca beraber çalıŐtıęım değerli arkadaŐlarım Dr. Ümmet Abur, Dr. Engin Altundağ, Dr. Huri Sema Aymelek, Dr. ağrı Doğan, Dr. AyŐegÜl Yılmaz, Dr. Hatice Mutlu Albayrak'a, Dr Aslıhan Sanrı'ya, Dr. Hatice Yelda Yalçın'a ve Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp FakÜltesi Hematoloji BD'na, Özellikle Prof. Dr. Mehmet Turgut'a, bu tezi hazırlarken yaptığımız çalışmalarda bÜtÜn desteğini veren Őukran Koç Alaçam ve bÖlÜmÜmÜzÜn tÜm sağlık personeline teşekkür ederim.

BugÜnlere gelmemde bÜyÜk emeği olan anne ve babama, hayatıma ayrıca bir anlam katan ve sÜrekli desteklerini yanımda hissettiğim çok sevdiğim eŐim ve "Ben de varım ben de" diyerek erkenden aramıza katılan ve tez sunumuma yetiŐen çok sevgili kızım Defne'ye sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Ömer Salih AKAR

ÖZET

Tirozin Kinaz İnhibitörlerine (TKİ) Dirençli Kronik Myeloid Lösemi (KML) Hastalarında BCR-ABL Kinaz Bölge Mutasyonlarının Sıklığı, Dağılımı Ve Prognoza Etkisi

AMAÇ: Bu çalışmada KML hastalarında TKİ'ne direnç sıklığını, ABL kinaz bölge mutasyonlarının ve BCR-ABL FISH paternlerinin dağılımı ve direnç üzerine etkileri değerlendirildi. Özellikle dirençli KML hastalarında genetik çalışmaların etkisi ve bulguların klinik ve hematolojik parametrelerle korelasyonu çalışıldı.

MATERYAL VE METOD: Hastaların karaciğer ve dalak büyüklüğü, hemogram değerleri, LDH ve β_2 -mikroglobulin düzeyleri ile sitogenetik, FISH BCR-ABL füzyon paternleri, RT-PCR BCR-ABL sonuçları ve TKİ'ne dirençli hastalarda ABL kinaz bölge mutasyonları değerlendirildi. Bilgiler hasta dosyaları ve bölümümüzün arşiv kayıtlarından elde edildi.

BULGULAR: 144 erkek, 143 kadın 287 KML hastası mevcuttu. Tanı yaşları ortalaması 52.5 ± 17.3 yılı. Tüm hastaların *excitus* oranı %17.2 idi. Verilerine ulaşılabilen 261 hastanın 110 (%42.2)'u dirençliydi. Dirençli hastalar yanıtli hastalarla kıyaslandığında *excitus* oranı anlamlı biçimde yüksek (%28.1 vs %9.3), sağkalım süresi anlamlı biçimde düşüktü (139.5 ay vs 206.6). FISH ile BCR-ABL analizleri yapılan 224 hastanın 178 (%79.5)'inde klasik füzyon (KF), 46 (%20.5)'sında ise atipik füzyon (AF) paterni saptandı. AF'lu hastaların ilk tanı yaşları KF'lu hastalarinkinden daha erkendi (48.2 vs 54.3) ($p=0,03$). KF'lu hastalarla AF'lu hastaların sağkalım süresi (154.3 ay vs 117.4 ay) ve *excitus* oranları (%17.1 vs %15.9) arasında istatistiksel olarak fark yoktu. Takipli 163 KF'lu hastanın 73 (%44.8)'ü dirençli iken 44 AF'li hastanın 24 (%54.5)'ü dirençli idi. Arada istatistiksel fark bulunmasa da AF'lu hastalarda daha çok direnç gelişmişti.

110 yanıtli hastanın 7 (%6.3)'si akselere fazda, 16 (%14.5)'sı ise blastik fazda idi. ABL kinaz bölge mutasyon analizi yapılmış olan 93 yanıtli hastamızın 13 (%14.4)'ünde mutasyon saptandı. (8 T315I, 2 Y253H, 1 E255K, 1 V299L ve 1 F317L). Akselere-blastik fazdaki hastalarla kronik fazdaki hastalar mutasyon oranlarına göre incelendiğinde akselere-blastik fazdaki hastalarda anlamlı biçimde yüksek mutasyon saptandı (%36.8 vs %8.4). Mutasyon saptanan grupta sağkalım

süresi bariz şekilde kısa (96.8 ay vs 150.1 ay), *excitus* oranı ise yüksekti (%38.5 vs %23.4). (p>0.05)

Dirençli hastalarda, yanıtli hastalarla kıyaslandığında dalak daha büyük (181.8 mm vs 153 mm), beyaz küre daha yüksek ($153.2 \times 10^9/L$ vs $104.3 \times 10^9/L$), hemoglobin (10.7 g/dL vs 11.5 g/dL) ve hematokrit düzeyleri (%32.3 vs %35.4) daha düşük ve β_2 -mikroglobulin ($3,040.1 \text{ ng/mL}$ vs $2,581.5 \text{ ng/mL}$) seviyeleri daha yüksekti (p<0.05). Dikkat çekici şekilde trombosit sayısı düşük ($430,153/dL$ vs $497,983/dL$), LDH seviyesi yüksekti (987.6 U/L vs 903.8 U/L) (p>0.05).

KF'lu hastalarla AF'lu hastalar karşılaştırıldığında bakılan parametreler açısından anlamlı bir farklılık saptanmadı. KF'lu dirençli hastalarla AF'lu dirençli hastalar arasında da bu parametreler açısından farklılık saptanmadı. Dirençli hasta grubu içinde ABL kinaz bölge mutasyonu saptananlarla saptanmayanlar karşılaştırıldığında bakılan parametreler açısından arada istatistiksel bir fark saptanmadı.

SONUÇ: 261 KML hastasının takibini içeren çalışmamız "Tirozin Kinaz İnhibitörlerine (TKİ) Dirençli Kronik Myeloid Lösemi (KML) Hastalarında BCR-ABL Kinaz Bölge Mutasyonlarının Sıklığı, Dağılımı Ve Prognoza Etkisi" konusundaki Türkiye'deki en geniş çalışmadır. Dirençli hastalardaki ABL kinaz bölge mutasyon oranları (%14.4) literatürle benzerdi. T315I en sık görülen mutasyondur. Çalışmamızda literatürde halen tartışmalı bir konu olan AF ile kötü prognoz ilişkisi araştırılmış olup bir ilişki bulunamamıştır. Ancak yeni çalışmalar ve farklı mutasyon panellerinin geliştirilmesi bu konuda yeni katkılar yapabilir. Klinik ve hematolojik parametrelerin dirençli hastaları tanımlamada yeterince güçlü olduğu gösterildi. Tanı anındaki dalak büyüklüğü, beyaz küre sayısı, hemoglobin düzeyleri ve β_2 -mikroglobulin düzeyleri TKİ'ne yanıt tahmin etmekte kullanılabileceğini gösterdik.

ABSTRACT

Frequency, Distribution and Impact On Prognosis of BCR-ABL Kinase Domain Mutations In Tyrosine Kinase Inhibitor (TKI) Resistant Chronic Myelogenous Leukemia (CML) Patients

AIM: In this study, we evaluated the frequency of TKI resistance, the distribution of ABL kinase mutations and the distribution of BCR-ABL FISH patterns and their effects on resistance in CML patients. In particular, the effect of genetic studies in patients with resistant CML and the correlation of findings with clinical and hematological parameters were studied.

MATERIAL-METHOD: Cytogenetics, FISH BCR-ABL fusion patterns, RT-PCR BCR-ABL results, and ABL kinase domain mutations in TKI-resistant patients were evaluated in patients with liver and spleen size, hemograms, LDH and β_2 -microglobulin levels. Data was obtained from patient files and archive records of our department.

RESULTS: There were 144 male and 143 female patients diagnosed with CML. Mean age at diagnosis was 52.5 ± 17.3 years. The *excitus* rate of all patients was 17.2%. Of the 261 patients whose data were available, 110 (42.2 %) were resistant to TKI. *Excitus* rate was significantly higher (28.1% vs 9.3%) and survival time was significantly lower (139.5 months vs 206.6 months) when compared to imatinib-resistant patients with sensitive patients. Of the 224 patients whose data were available, 178 patients (79.5%) have classical fusion (CF) patterns and 46 (20.5%) patients have atypical fusion (AF) patterns by FISH. Mean age at diagnosis in patients with AF pattern is earlier than in patients with CF (48.2 years vs 54.3 years) ($p=0,03$). There was no statistically significant difference between patients with CF and patients with AF between the survival time (154.3 months vs. 117.4 months) and *excitus* rates (17.1% vs. 15.9%). While 73 (44.8%) of 163 CF patients were resistant, 24 (54.5%) of 44 AF patients were resistant. Although there was no statistical difference, more resistance developed in patients with AF.

Of the 110 resistant patients, 7 (6.3%) were in the accelerated phase and 16 (14.5%) were in the blastic phase. Of the 93 resistant patients with ABL kinase domain mutation analysis, 13 (14.4%) had mutations (8 T315I, 2 Y253H, 1 E255K, 1 V299L

and 1 F317L). Significantly higher mutation rates were detected in patients with accelerated-blastic phase compared to patients with chronic phase (36.8% vs. 8.4%). The overall survival was obviously short (96.8 months vs. 150.1 months) and *excitus* rate was high (38.5% vs 23.4%) in the patients with mutation ($p > 0.05$).

In resistant patients, spleen sizes were larger (181.8 mm vs 153 mm), White Blood Cell Counts ($153.2 \times 10^9/L$ vs $104.3 \times 10^9/L$) and blood levels of β_2 -microglobulin (3,040.1 ng/mL vs 2,581.5 ng/mL) were higher and levels of hemoglobin (10.7 g/dL vs 11.5 g/dL) and hematocrit (32.3% vs 35.4%) were lower than in sensitive patients. Remarkably, the platelet counts were lower (430,153 / dL vs 497,983 / dL) and the LDH levels were higher (987.6 U/L vs. 903.8 U/L) in resistant patients as well ($p > 0.05$).

There were no significant differences in terms of the parameters examined (spleen size, hemogram, LDH, β_2 -microglobulin) when patients with CF and patients with AF were compared as well imatinib resistant patients with CF and imatinib resistant patients with AF were compared. There was no statistically significant difference between the patients with and without ABL kinase mutations in the resistant group in terms of the parameters examined.

CONCLUSION: In brief this report which includes 261 follow-up patients signifies the most extended study on “Frequency, Distribution and Impact On Prognosis of BCR-ABL Kinase Domain Mutations In Tyrosine Kinase Inhibitor (TKI) Resistant Chronic Myelogenous Leukemia (CML) Patients” from Turkey. Rate of resistance (14.4%) with regard to ABL kinase domain mutations was similar to that found in the literature. T315I was the most common mutation. Impact of atypical fusion patterns to detection of high risk(resistance) in CML patients which is still a debatable issue in the literature yielded no impact to the relevance situation. However we believe that new mutation detection panels would change this consensus. However it was clearly shown that clinical and hematological parameters were strong enough to define resistant CML patient. Finally the study shows that the size of spleen, white blood cell count, hemoglobin and β_2 -microglobulin levels at diagnosis in CML patients can be used to predict the response.

KISALTMALAR

KML	Kronik Myeloid Lösemi
TKİ	Tirozin Kinaz İnhibitörü
BCR	Breakpoint Cluster Region
ABL1	Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog1
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
M-bcr	Majör Breakpoint Cluster Region
m-bcr	Minör Breakpoint Cluster Region
μ-bcr	Mikro Breakpoint Cluster Region
Ser/Thr Kinaz	Serin/treonin spesifik protein kinaz
Rho/GEF	Rho guanine nucleotide exchange factor
SH	Src Homology
DBL	Diffuse B-Cell Lymphoma
GTPaz	Guanin Trifosfataz
<i>Ph</i>	Philadelphia kromozomu
ETV6	ETS variant 6
RAS	Retrovirus-Associated DNA Sequences
GRB2	Growth Factor Receptor-Bound Protein 2
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase

AKT	AKR Mouse Thymoma
JNK	c-Jun N-Terminal Kinaz
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
MYC	Myelocytomatosis Oncogene
G-CSF	Granulocyte Colony-Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
MEK	MAPK/ERK Kinase
JAK	Janus Kinaz
FOXO	Forkhead Box
GAB2	GRB2 Associated Binding Protein 2
CBL	Casitas B-Lineage Lymphoma Proto-Oncogene
CCND1	Siklin D1
ATM	Ataxia-Telangiectasia Mutated
CDKN1C	Cyclin-Dependent Kinase İnhibitor 1C
BCL6	B-Cell Lymphoma 6
TGF-β	Transforming Growth Factor β
NF-κB	Nükleer faktör κB
Hck	Hemopoietic Cell Kinase
Lyn	Lck/Yes-Related Novel Protein Tyrosine Kinase
SAK	Src Ailesi Kinaz

Crkl	CRK Like Proto-Oncogene
BCL-X_L	B-Cell Lymphoma-Extra Large
Bad	BCL2 Associated Agonist of Cell Death
CD	Cluster of Differentiation
TP53	Tumor Protein P53
RB	Retinoblastom
CDKN2A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
EVI1	Ecotropic Viral Integration Site 1
ETO	Eight Twenty-One
NUP98	Nükleoporin 98
HOXA	Homeobox A Cluster
CBFβ	Core-Binding Factor Beta Subunit
SMMHC	Smooth Muscle Myosin Heavy Chain
LDH	Laktat Dehidrogenaz
IFN-α	İnterferon alfa
FDA	Food and Drug Administration
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Receptor
IRIS	International Randomized Study of Interferon and STI571
THY	Tam Hematolojik Yanıt

TSY	Tam Sitogenetik Tanıt
ATP	Adenozin Trifosfat
MMY	Majör Moleküler Yanıt
DASISION	Dasatinib Versus Imatinib Study in Treatment-Naïve Chronic Myeloid Leukemia Patients
ENESTnd	Evaluating Nilotinib Efficacy and Safety in Clinical Trials-Newly Diagnosed Patients
EFS	Event-Free Survival
OS	Overall Survival
KSY	Kısmi Sitogenetik Yanıt
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
RT-PCR	Real Time Polimerase Chain Reaction
IS	International Scala
PLT	Platelet
WBC	White Blood Cell
COSMIC	Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer
DHPLC	Denaturing High Performance Liquid Chromatography
ASO-PCR	Allel Spesifik Oligonükleotid PCR

LOB	Limit of Blank
LOD	Limit of Detection
SPSS	Statistical Package For Science Studies
FISH	Florasın İn-Situ Hibridizasyon
DCDF	Dual Color Dual Fusion
B2M	Beta 2 mikroglobulin
KF	Klasik Füzyon
AF	Atipik Füzyon
ALL	Akut Lenfoblastik Lösemi
GIMEMA	Gruppo Italiano Malattie EMatologiche dell'Adulto
dk	Dakika
sn	Saniye

TABLULAR

Tablo-1	Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin Yanıt Oranları
Tablo-2	KML'de Yanıt Değerlendirmesi Tanımları
Tablo-3	KML'de Yanıt Değerlendirme Kriterleri
Tablo-4	KML'de Moleküler Yanıt Değerlendirme Kriterleri ve Tedavi Takibi
Tablo-5	Mutasyonlara Göre İlaç Seçimi
Tablo-6	Mutasyon Saptamada Kullanılan Yöntemlerin Duyarlılıkları
Tablo-7	DCDF FISH Problemleri ile Saptanan BCR/ABL Füzyon Paternleri
Tablo-8	Roche LightCycler-t(9;22) Quantification Kit ile cDNA Eldesi İçin Malzemeler
Tablo-9	Roche LightCycler PCR Programı
Tablo-10	Roche LC Mix Bileşimi
Tablo-11	Roche t(9;22) RT-PCR Programı
Tablo-12	İpsogen BCR-ABL RT Miks Bileşenleri(cDNA eldesi)
Tablo-13	İpsogen BCR-ABL RT PCR Koşulları(cDNA eldesi)
Tablo-14	Rotor Gene Q'ya Yüklenilecek PCR Bileşenleri
Tablo-15	İpsogen qPCR Programı
Tablo-16	Pyrosekanslama PCR Aşama-1 Bileşimi
Tablo-17	Pyrosekanslama PCR Aşama-1 PCR Programı
Tablo-18a	Pyrosekanslama PCR Aşama-2 Bileşenleri (253, 315, 359 Primerleri İçin)

Tablo-18b	Pyrosekanslama PCR Aşama-2 Bileşenleri (299 primeri için)
Tablo-19	Pyrosekanslama Aşama-2 PCR Programı
Tablo-20	Streptavidin Sefaroz Bilyelere Yükleme Bileşenleri
Tablo-21	ABL Kinaz Bölge Pyrosekans Analizi İçin Diziler ve Dispensasyon Sıraları
Tablo-22	ABL Kinaz Bölgesindeki Wild Type ve Mutasyonlu Diziler
Tablo-23	ABL Kinaz Bölge Mutasyonlarının LOB ve LOD Değerleri
Tablo-24	Hastaların İlaça Yanıt Durumuna Göre Dağılımı
Tablo-25	Hastaların Yanıt ve FISH Füzyon Durumuna Göre Dağılımı
Tablo-26	Yanıt Durumu ile Füzyon Tipinin Karşılaştırılması
Tablo-27	Yanıt ve Füzyon Tipine Göre <i>Excitus</i> Oranları
Tablo-28	Hastaların Direnç Açısından Karşılaştırılması
Tablo-29	Hastaların <i>Excitus</i> Oranları Açısından Karşılaştırması
Tablo-30	Hastaların ABL Kinaz Bölge Mutasyon Sonuçları
Tablo-31	Hastaların Fazlarına Göre Mutasyon Durumu
Tablo-32	Hastaların Mutasyon Durumuna Göre <i>Excitus</i> Oranları
Tablo-33	ABL Kinaz Bölge Mutasyonu Olan Hastaların Klinik-Laboratuvar Özellikleri
Tablo-34	Dirençli ve Yanıtlı Hastaların Klinik-Laboratuvar Bulguları Karşılaştırılması
Tablo-35	KF ve AF Hastaların Klinik-Laboratuvar Bulguları Karşılaştırma

Tablo-36 Dirençli KF'lu Hastalar ile Dirençli AF'lu Hastaların Sağlık Durumlarının Karşılaştırılması

Tablo-37 Dirençli KF'lu Hastalarla Dirençli AF'lu Hastaların Klinik-Laboratuvar Bulguları Karşılaştırması

Tablo-38 Yanıtlı KF'lu Grup ile Dirençli Hastalar ve Yanıtlı AF'lu Hastaların Oluşturduğu Grubun Excitus Oranlarının Karşılaştırması

Tablo-39 Yanıtlı KF'lu Hasta Grubu ile Dirençli Hastalar ve Yanıtlı AF'lu Hastaların Oluşturduğu Grubun Klinik-Laboratuvar Bulgularının Karşılaştırması

Tablo-40 Dirençli Hastalar ile AF'lu Hastaların Oluşturduğu Grupla Geri Kalan Hastaların Excitus Oranlarının Karşılaştırılması

Tablo-41 Dirençli Hastalar ile AF'lu Hastaların Oluşturduğu Grupla Geri Kalan Hastaların Klinik-Laboratuvar Bulgularının Karşılaştırması

Tablo-42 Dirençli Hastalardan Mutasyon Saptananlar ile Saptanmayanların Klinik-Laboratuvar Bulgularının Karşılaştırılması

Tablo-43 Çalışmamızdaki Atipik Füzyon Sıklıklarının Literatür ile Karşılaştırılması

Tablo-44 Çalışmamızdaki ABL Kinaz Bölge Mutasyonları Sıklığının Literatürle Karşılaştırılması

Tablo-45 ABL Kinaz Bölge Mutasyonu Analiz Çalışmalarındaki Mutasyon Saptama Oranının Hasta Seçimi ve Kullanılan Yönteme Göre Analizi

ŞEKİLLER

- Şekil-1** t(9;22)(q34;q11) Oluşumu
- Şekil-2** Bcr, Abl Ve Bcr-Abl Proteinleri Üzerindeki Bölgeler
- Şekil-3** Farklı BCR Kırık Noktaları İle Oluşan Farklı BCR-ABL Transkriptleri
- Şekil-4** BCR-ABL Füzyonu İle Aktive Olan Yolaklar
- Şekil-5** İmatinib Mezilat'ın Etki Mekanizması
- Şekil-6** TKİ'leri ve Dirence Neden Olan Mutasyonlar
- Şekil-7** ABL Kinaz Bölgesinin Alt Bölgeleri
- Şekil-8** TKİ'ne Direnç Gelişimine Yol Açan Mutasyonlar
- Şekil-9** Roche LightCycler t(9;22) Kiti Primerlerinin Yerleşimi
- Şekil-10** KML Hastalarının Cinsiyete Göre Dağılımı
- Şekil-11** KML Hastalarının İlk Tanı Yaşları Dağılımı
- Şekil-12** Hastaların FISH Analiz Sonuçlarına Göre Dağılımı
- Şekil-13** Atipik FISH Paternlerinin Dağılımı
- Şekil-14** Hastaların Füzyon Türüne Göre Sağkalım Eğrisi
- Şekil-15** T315I Taşıyan Hastaların İlaç Kullanım Durumları
- Şekil-16** T315I Taşıyan Hastaların Pyrosekans Görüntüleri
- Şekil-17** Y253H Taşıyan Hastaların Pyrosekans Görüntüleri
- Şekil-18** E255K Taşıyan Hastanın Pyrosekans Görüntüsü

- Şekil-19** V299L Taşıyan Hastanın Pyrosekans Görüntüsü
- Şekil-20** F317L Mutasyonu Taşıyan Hastanın Pyrosekans Görüntüsü
- Şekil-21** Hastaların Yanıt Durumuna Göre Sağkalım Eğrisi
- Şekil-22** FISH Füzyon Tipine Göre Sağkalım Eğrisi
- Şekil-23** Dirençli KF Hastalarla Dirençli AF Hastaların Sağkalım Eğrileri
- Şekil-24** Yanıtlı KF'lu Hasta Grubu ile Dirençli Hastalar ve Yanıtlı AF'lu Hastaların Oluşturduğu Grubun Sağkalım Eğrisi
- Şekil-25** Hastaların Mutasyon Durumuna Göre Sağkalım Eğrisi



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
ÖZET.....	II
ABSTRACT.....	IV
KISALTMALAR.....	VI
TABLolar.....	XI
ŞEKİLLER.....	XIV
İÇİNDEKİLER.....	XVI
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. KRONİK MYELOİD LÖSEMİ	
2.2. EPİDEMİYOLOJİ	
2.3. ETİYOLOJİ	
2.4. PATOGENEZ	
2.4.1. KML'nin Moleküler Biyolojisi	
2.4.2. Kök Hücre	
2.4.3. Akselere Ve Blastik Faza Dönüşüm	
2.5. KLİNİK BULGULAR	
2.6. PROGNOStİK FAKTÖRLER	
2.7. TEDAVİ	
2.7.1. Tirozin Kinaz İnhibitörleri	
2.7.1.1. İmatinib Mesilate	

2.7.1.2. Nilotinib

2.7.1.3. Dasatinib

2.7.1.4. Bosutinib

2.7.1.5. Ponatinib

2.7.2. Tirozin Kinaz İnhibitörü Olmayan Tedaviler

2.7.2.1. Omacetaxine mepesüksinat

2.7.2.2. Allogeneik Hematopoetik Kök Hücre Nakli

2.7.2.3. Diğer Tedaviler

2.8. TEDAVİ YANITI İZLEMİ

2.8.1. Tam Hematolojik Yanıt

2.8.2. Sitogenetik Yanıt

2.8.2.1. Tam Sitogenetik Yanıt

2.8.2.2. Kısmi Sitogenetik Yanıt

2.8.2.3. Majör Sitogenetik Yanıt

2.8.2.4. Minör Sitogenetik Yanıt

2.8.3. Moleküler Yanıt

2.8.3.1. Erken Moleküler Yanıt

2.8.3.2. Majör Moleküler Yanıt

2.8.3.3. Tam Moleküler Yanıt

2.8.4. Relaps

2.9. TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRLERİNE DİRENÇ GELİŞİMİ

2.9.1. Primer (İntrinsik) Direnç

2.9.2. Sekonder (Kazanılmış) Direnç

2.9.3. Direnç Mekanizmaları

2.9.3.1. BCR-ABL Bağımsız Direnç Mekanizmaları

2.9.3.2. BCR-ABL Bağımlı Direnç Mekanizmaları

2.10 BCR-ABL KİNAZ BÖLGE MUTASYONLARI

2.10.1. İmatinib Bağlayıcı Bölge Mutasyonları

2.10.2. P-loop Mutasyonları

2.10.3 Katalitik Bölge Mutasyonları

2.10.4 A-loopu (Aktivasyon loopu) Mutasyonları

3. MATERYAL VE METOD27

3.1 Hastalar

3.2. Sitogenetik Analiz

3.3. Floresan In-Situ Hibridizasyon (FISH) Analizi

3.4. RT-PCR İle BCR-ABL Füzyon Analizleri

3.4.1. Roche LigtCycler

3.4.2. İpsogen BCR-ABL

3.5. Pyrosekanslama İle BCR-ABL Kinaz Bölge Mutasyon Analizi

3.6 Etik Onay

3.7 İstatistiksel Değerlendirme

4. BULGULAR.....40

4.1. Hastaların Cinsiyet ve Yaşa Göre Dağılımı

4.2. Hastaların İlaç Yanıtı Durumuna Göre Dağılımı

4.3. Hastaların Sağkalım Durumu

4.4. Hastaların FISH Analiz Sonuçlarına Göre Dağılımı

4.5. Hastaların Sağkalım Açısından Değerlendirilmesi

4.5. ABL Kinaz Bölgesi Mutasyonlarının Dağılımı

4.6. Hastaların Excitus Durumuna Göre Dağılımı

4.7. Yanıtsız Hastaların Fazlarına Göre Dağılımı

4.8. ABL Kinaz Bölgesi Mutasyonlarının Dağılımı

4.9. ABL Kinaz Bölgesi Mutasyonu Saptanan Hastaların Klinik Özellikleri

4.10. Hastaların Klinik Ve Laboratuvar Bulguları

4.10.1 Dirençli ve Yanıtlı Hastaların Karşılaştırılması

4.10.2. Klasik Füzyonlu ve Atipik Füzyonlu Hastaların Karşılaştırılması

4.10.3. Dirençli Hasta Grubundaki Klasik Füzyonlu Hastalar İle Dirençli Hasta Grubundaki Atipik Füzyonlu Hastaların Karşılaştırılması

4.10.4. Dirençli Hasta Grubunda ABL Kinaz Bölge Mutasyonu Saptanan Hastalarla Saptanmayan Hastaların Karşılaştırılması

5. TARTIŞMA.....61

6. SONUÇLAR.....71

7. KAYNAKLAR..... 73

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik myeloid lösemi (KML) granüositik hücre hatlarının farklılaşma kapasitelerini kaybetmeksizin artmış proliferasyonu ile karakterize bir myeloproliferatif hastalıktır (1). KML ABD’de erkeklerde 100,000’de 2.2, kadınlarda 100,000’de 1.4 oranında görülür ve bütün lösemilerin yaklaşık %15-20’sini oluşturur (3). İnsidansı ülkeler arasında oldukça değişkendir. Hastalık genellikle 50’li yaşlarda başlar. Tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte etyolojide radyasyon, sitotoksik ilaçlar ve viral ajanlar suçlanmıştır (4-6).

Hastalığa t(9;22)(q34;q13) translokasyonu sonucunda oluşan ve aktif bir tirozin kinaz üreten BCR-ABL füzyonu sebep olur. BCR-ABL1 proteini, hücre sinyal yolağının anormal aktivasyonuna yol açar ve hücrel çevreyi lösemi yönüne çevirir (13). Klinikte anemi, granülositoz, granüositik immaturite, bazofili, trombositoz ve splenomegali görülür (5). Hastaların çoğunluğu kronik fazda başvururlar. Tedavisiz durumda hastalık kronik fazdan akselere ve blastik faza ilerleyerek ortalama 4 yıl içinde ölümlerle sonuçlanır (2). 2000’li yıllara kadar tedavide İNF, busulfan ve kemik iliği nakli kullanılmıştır. Ancak başarı sınırlı kalmıştır. 2001’de tirozin kinaz inhibitörlerinin tedaviye girmesiyle hastalığın tedavisinde çok büyük çığır açılmıştır. Ancak hastaların bir kısmının ya tedavinin başından beri yanıtı olmadığı ya da önce yanıtı olup zamanla direnç geliştiği gözlenmiştir. Bu direnci yenmek için de ikinci ve üçüncü kuşak tirozin kinaz inhibitörleri geliştirilmiştir (33).

Literatürde KML hastalarında prognostik etkisi olan faktörler ve tirozin kinaz inhibitörlerine karşı yanıtızlığa neden olabilecek mekanizmalar çalışılmıştır. Tanı anındaki yaş, dalak büyüklüğü, trombosit sayısı, blast sayısı, kan eozinofil ve bazofil yüzdeleri kullanılarak prognoz belirlenmeye çalışılmıştır. Yine LDH ve β 2 mikroglobulin ile prognoz arasında ilişki olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda ilk tanıdaki FISH ile saptanan BCR-ABL füzyon tiplerinin de prognoz üzerinde etkisi olduğuna dair çalışmalar yapılmış ve birbiriyle çelişen sonuçlar elde edilmiştir.

Tirozin kinaz inhibitörlerinin tedaviye girmesiyle hastaların bir kısmında ya hiç yanıt alınamamış ya da önce yanıt elde edilmiş zamanla yanıtızlık gelişmiştir. Bu yanıtızlığa neden olabilecek pek çok mekanizma tanımlanmıştır. Bunlardan en

önemlisi ve tedaviyi de yönlendirme potansiyeli olan mekanizma ABL kinaz bölge mutasyonlarıdır (42). Bu mutasyonların tespiti için farklı yöntemler kullanılmış ve farklı mutasyon sıklıkları ve dağılımları saptanmıştır (46,80-95). Biz de dirençli hastalarımızı pyrosekanslama ile ABL kinaz bölge mutasyonları açısından değerlendirdik ve mutasyon saptanan hastaların bilgilerini derledik. Ülkemizde bu konuda sınırlı sayıda çalışma vardı ve pyrosekanslama kullanılan başka çalışma yoktu.

Bu çalışmada tirozin kinaz inhibitörlerine karşı gelişen yanıtızsızlık durumu, FISH BCR-ABL füzyon tipleri dağılımı, ABL kinaz bölge mutasyonlarının sıklığı ve dağılımı, ilk tanı anındaki klinik ve laboratuvar bulgular derlenmiştir. ABL kinaz bölge mutasyonları ve FISH analizindeki BCR-ABL füzyon tiplerinin prognostik değerinin değerlendirilmesini amaçladık.

Bu nedenle 01.01.2008 ile 31.03.2017 tarihleri arasında KML tanısı ile genetik analiz için bölümümüzün laboratuvarlarına kemik iliği ve/veya periferik kan materyali girişi olan 287 hasta değerlendirmeye alındı. Bu hastaların tanı anındaki yaş, dalak ve karaciğer büyüklüğü, beyaz küre ve trombosit sayısı, hemoglobin, hematokrit değerleri, β 2 mikroglobulin ve LDH düzeyleri ile FISH füzyon paternleri ve yanıtızsızlık durumu arasındaki ilişki değerlendirildi. Aynı zamanda yanıtızsız hastalarda ABL kinaz bölge mutasyonlarının sıklığı, dağılımı ve prognoz üzerindeki etkileri araştırıldı.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. KRONİK MYELOİD LÖSEMİ

Kronik myeloid lösemi (KML) granüositik hücre hatlarının farklılaşma kapasitelerini kaybetmeksizin artmış proliferasyonu ile karakterize bir myeloproliferatif hastalıktır. Anemi, kanda ileri düzeyde granülositoz, granüositik immaturite, bazofili, trombositoz ve splenomegali görülür.

İlk defa 1840'lı yıllarda Bennett ve Virchow dalak büyüklüğü, ciddi anemi ve lökositlerin arttığı bir hasta tanımlamışlar ve "lösemi" ifadesini ilk kez kullanmışlardır. 1878'de Neumann lösemnin kemik iliği kökenli oluşunu düşünmüş ve "myelojen (myeloid) lösemi" terimini kullanmıştır. 1960 yılında ise Nowell and Hungerford isimli araştırmacılar büyük bir keşfe imza atarak bu hastalarda 21. veya 22. kromozom olduğunu düşündükleri kromozomun uzun kolunda bariz bir kayıp görmüşler ve buna "Philadelphia kromozomu" ismini vermişlerdir. İleri sitogenetik çalışmalar bu kromozomun 22. kromozom olduğunu göstermiştir. Rowley ise 22. kromozomun uzun kolunun kaybolmadığını, 9. kromozoma transloke oluşunu göstermiştir (1). Translokasyon bölgesinde yer alan genler 1980'lerde klonlanmış ve bu genlerin 22. kromozom uzun kolundaki **breakpoint cluster region (BCR)** geni ile 9. kromozom üzerindeki **Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1 (ABL1)** genleri olduğu belirlenmiştir. Translokasyon sonucunda BCR-ABL1 füzyon onkogeni oluşur ve bu gen yapısal olarak aktif bir tirozin kinaz kodlar (2).

2.2. EPİDEMİYOLOJİ

KML bütün lösemilerin yaklaşık %15-20'sini oluşturur. ABD'de erkeklerde 100,000'de 2.2, kadınlarda 100,000'de 1.4 oranında görülür (3). İnsidansı ülkeler arasında değişkenlik gösterir. Ortaya çıkış yaşı farklı bölgelerde farklı olarak bulunmuştur. Afrika ve Latin Amerika'da, ABD, Avrupa ve Avustralya'ya göre en az 15 yaş daha erken ortaya çıkmaktadır. Avusturalya'da median yaş 55, ABD'de ise 65'tir. 1-20 yaşları arasındaki KML olguları, tüm KML olgularının %10'undan azdır. KML, çocukluk çağı lösemilerinin %3'ünü oluşturur. Ailelerde çoklu KML olgusu

nadirdir. İkizler arası konkordans bulunmamaktadır (1). Ülkemizde insidansla ilgili yeterli bilgi bulunmamaktadır.

2.3. ETİYOLOJİ

KML etyolojisi tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte pek çok faktör suçlanmıştır. Örneğin KML, çok yüksek doz radyasyon maruziyeti ile ilişkilendirilmiştir. Nagazaki ve Hiroşima bombardımanı sonrası diğer lösemi türleri yanında KML insidansında da artış saptanmıştır (4). Ancak Çernobil patlaması sonrasında hayatta kalanlarda artmış bir KML insidansı bulunamamıştır. Bu da çok yüksek dozların KML insidansını arttırdığını düşündürmüştür (5). Sitotoksik ilaçlar ve viral etyoloji ile ilişkili bir korelasyon bulunamamıştır. Benzin ve alkilleyici ajanlar gibi kimyasal lökomojenlerin KML'yi indüklediği tespit edilememiştir (6).

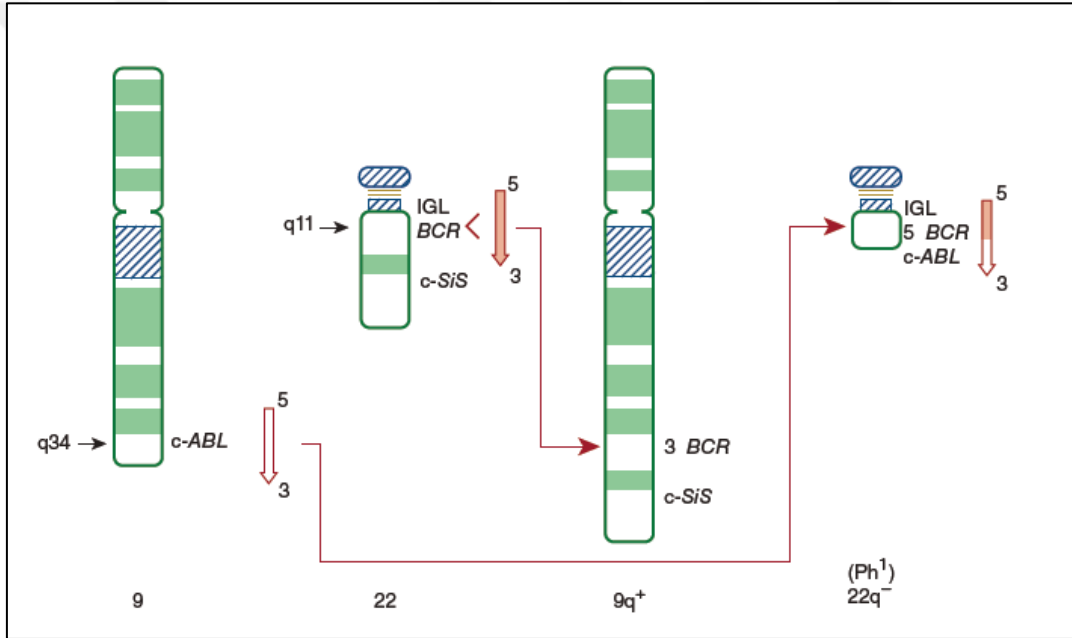
2.4. PATOGENEZ

2.4.1 KML'nin Moleküler Biyolojisi

Philadelphia kromozomu t(9;22)(q34;q11) resiprokal translokasyonu sonucu 9q34 bölgesindeki ABL1 geni ile 22q11.2 bölgesindeki BCR geni füzyonu sonucu oluşur. BCR-ABL1 füzyon geni BCR geni 5' ucu ile ABL1 geni 3' ucunun birleşimi ile oluşur (7). (Şekil-1) ABL1 geni bir gamaretrovirüste tanımlanmış ve farelerde lenfoid neoplaziler oluşturan bir protoonkogen olan *v-abl*'nin insan analogudur. İnsanda hücre bölünmesi, adezyonu, farklılaşması ve strese cevap gibi süreçlerde rol alan bir tirozin kinaz kodlar (8). BCR ise 160 kDa ağırlığında pek çok fonksiyonel domaini olan ve sürekli eksprese edilen sitoplazmik bir proteindir. N-terminali BCR-ABL füzyon proteininde ABL1 kinaz aktivasyonu için gerekli olan dimerizasyona izin veren coiled-coil (sargı bobini) motifi taşır (9).

BCR ve ABL1 genomik kırık noktalarının yerleri oldukça değişkendir. 9. kromozomdaki kırık noktası (ABL) geniş bir bölgede oluşabilirken 22. kromozomdaki kırık noktası (BCR) ise dar bir bölgede oluşur. Rekombinasyon genellikle BCR'nin intron 13 veya 14'ünden birisi ile ABL1 geni ekzon 1b ile 2 arasındaki 140 kilobazlık bir bölge arasında gerçekleşir (10).

ABL1 genindeki kırık noktadan bağımsız olarak BCR üzerindeki kırık noktaları ile oluşan farklı BCR-ABL1 transkriptleri tanımlanmıştır. Majör (M-bcr), minör (m-bcr) ve mikro (μ -bcr). Bu kırık noktalardan sırasıyla p210, p190 ve p230 füzyon proteinleri oluşur. KML hastalarının çoğunluğu 210 kDa füzyon proteini taşırlar. e14a2 (BCR ekzon 14 ile ABL1 ekzon 2) ve e13a2 (BCR ekzon 13 ile ABL1 ekzon 2) füzyonu en sık görülenidir ve her ikisi de 210-kDa BCR-ABL proteinini üretir. Bu füzyonlar daha önce sırasıyla b2a2 ve b3a2 olarak adlandırılmıştır. “e” translokasyondaki BCR ekzonunu, “a” translokasyondaki ABL1 ekzonunu temsil eder (7). Nerdeyse tüm KML hastaları tanı anında p210 ekspresyonu gösterirken, bazıları aynı zamanda p190 da eksprese eder. Bunun sebebi çok iyi anlaşılamamıştır (11).

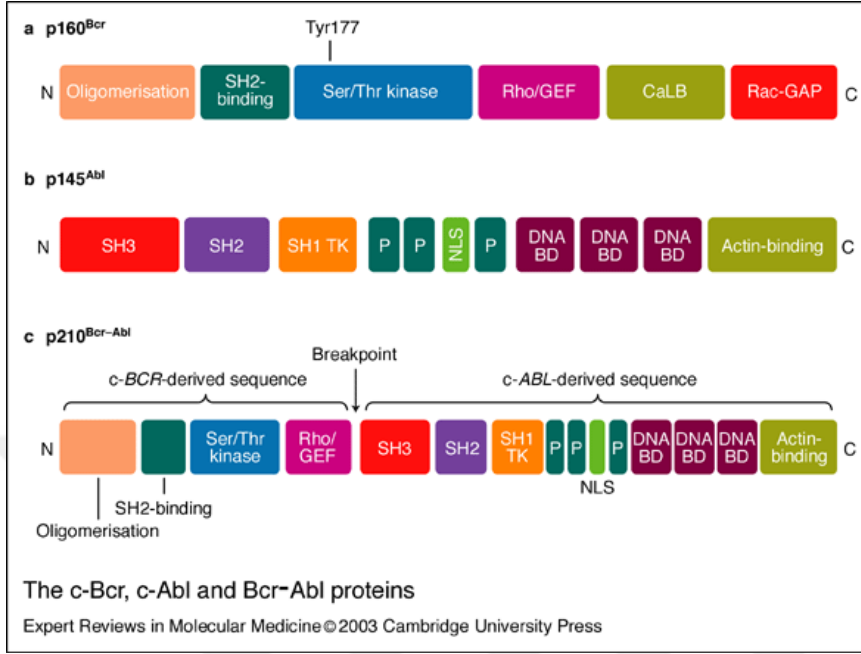


Şekil-1 t(9;22)(q34;q11) Oluşumu (Williams Hematology)

201-kDa'luk BCR-ABL1 proteini 10'dan fazla protein domaini taşır. BCR-ABL1 füzyon proteini; BCR üzerindeki Ser/Thr kinaz, Rho/GEF ve dimerizasyon (coiled-coil) domainleri ile ABL1 üzerindeki SH, prolin-zengin, DNA bağlayıcı ve aktin bağlayıcı domainleri ile nükleer lokalizasyon ve giriş sinyalleri bölgelerini içerir. (Şekil-2)

Füzyon oluşunca BCR geni 1. ekzon dizisi, ABL'in tirozin kinaz aktivitesini artırır. 22. kromozomda oluşan BCR-ABL füzyonu yanında, 9. kromozomda bulunan ABL-BCR füzyonu da hastaların üçte birinde aktif olarak eksprese olur. BCR geni santral

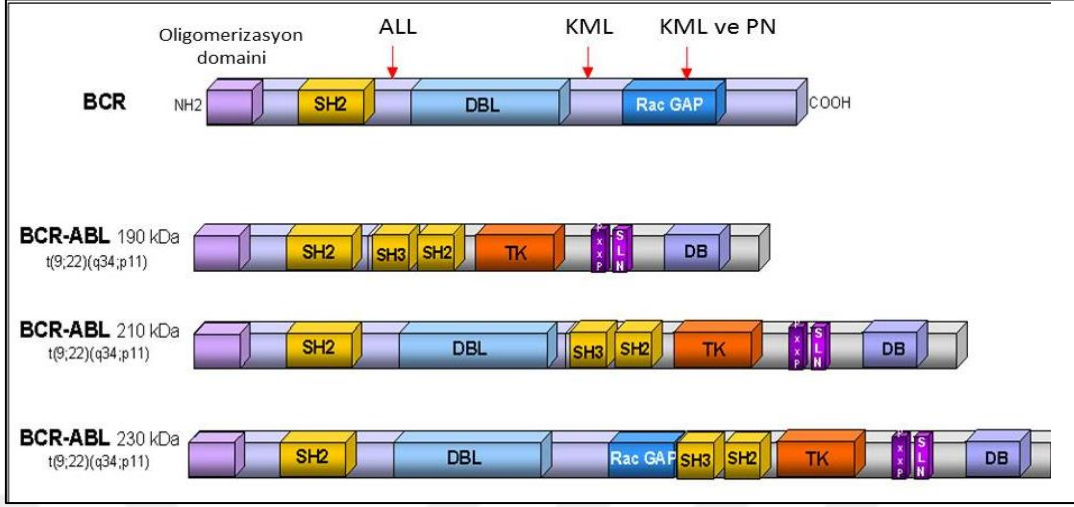
bölgesi, S fazı sonrası hücre bölünmesi kontrolünde görev alan DBL geni ile homoloji gösterirken, C terminali p21rac için GTPaz aktive edici protein içerir (12).



Şekil-2 Bcr, Abl Ve Bcr-Abl Proteinleri Üzerindeki Bölgeler (Smith, D., Burthem, J., & Whetton, A. (2003)).

KML hastalarında ABL1 geni yeniden düzenlenmiş ve amplifiye olmuştur. KML hücreleri 22. kromozomdaki BCR geninin kırık noktasında kalan 5' bölümü ile 9. kromozomdan transloke olup gelen ABL1 geninin 3' bölümünün füzyonu sonucunda oluşan füzyon geninden eksprese edilen anormal ve uzamış bir 8-kb'lık RNA transkripti içerirler. BCR-ABL1 füzyon proteini BCR'nin N terminal domainini ve ABL'in C terminal domainini içerir. Füzyon mRNA, 210 kDa büyüğünde (p210BCR-ABL) özgün bir tirozin fosfoprotein kinaza çevrilir (Şekil-3). Bu da tirozin rezidülerini fosforile eder. ABL1 lokusu, birinde 500-bç delesyon olan en azından iki farklı allele sahiptir. Normal hücrelerde ABL1 protoonkogeni 145,000 moleküler ağırlıklı eser miktarda üretilen ve in vitro kinaz aktivitesi göstermeyen bir nonreseptör tirozin kinaz kodlar. BCR-ABL1 füzyon proteininin (kimerik tirozin kinazın) enzimatik aktivitesinin anormal düzenlenişi nedeniyle malign transformasyona yol açtığı düşünülmüştür. BCR-ABL1 proteini, hücre sinyal yolağının anormal aktivasyonuna yol açar ve hücrel çevreyi lösemi yönüne çevirir. Sonuçta büyüme

faktörüne bağımlılık, apoptozis, proliferasyon ve hücre adezyonu değişikliklerine yol açar. Bu da granüositlerin hiperproliferasyonuna yol açar (13).



Şekil-3 Farklı BCR Kırık Noktaları İle Oluşan Farklı BCR-ABL Transkriptleri

9. kromozomda daha küçük bölgeleri ilgilendiren kırık noktalarında varyasyonlar ve 22. kromozomdaki M-bcr bölgesi dışında da yeniden düzenlenimler görülebilir. Bir kısım hastada 9. kromozomda uzama saptanmasa da, moleküler problr ABL1'in 22. kromozoma transloke olduğunu gösterebilir. Nadir Ph kromozom–pozitif KML olgusunda, 22. kromozomdaki kırık M-bcr bölgesi dışındadır ve her zamanki RNA füzyon transkripti oluşmaz ve klasik cDNA problrı ile hibridize olmaz.

Ph kromozomu saptanamayan olgularda BCR-ABL1 hala 9. kromozomda bulunabilir (maskelenmiş Ph kromozomu). BCR geni kompleks translokasyonlarla 11q13'teki farklı bir bölge ile de rekombine olabilir. BCR/ABL1 negatif KML'de ETV6/ABL1 füzyonu da görülebilir.

m-bcr kırık noktalı KML'lerde splenomegali ve bazofilisiz monositöz blastik kriz gelişebilir. μ -bcr ise nötrofilik KML veya trombositözda gözlenir. Başka farklı bcr kırık noktaları da tanımlanmıştır.

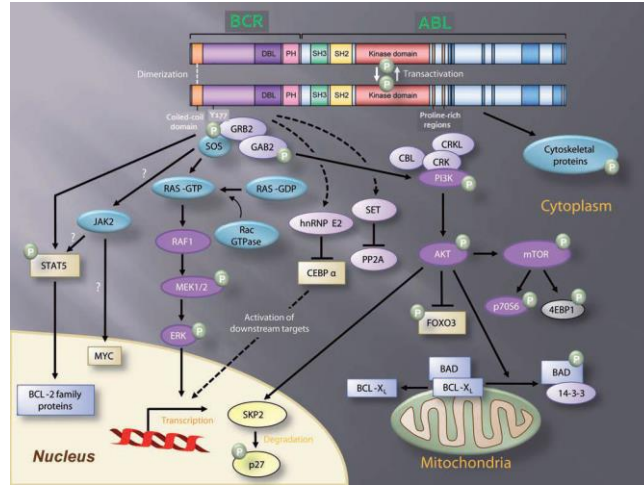
ABL tirozin kinaz, onkogenik dönüşüm için olmazsa olmazdır. BCR-ABL'deki diğer önemli domainler aynı zamanda ABL'nin kinaz aktivitesini düzenler veya başka sinyal yolları ile birleştirebilir. BCR'nin N-terminal coiled-coil oligomerizasyon domaini ABL kinaz aktivitesi için önemli bir aktivatördür ve aynı zamanda F-actin

iplikçiklerine BCR-ABL'nin bağlanması sağlar. BCR'nin 177. pozisyonundaki tirozinden fosforlanması RAS aktivasyonu için önemli olan GRB2 bağlayıcı bir bölge oluşturur. ABL kinaz domaininin aktivasyon loopundaki tirozin fosforilasyon bölgesi ile ABL'in SH2 domaini de RAS aktivasyonuna katkıda bulunur. BCR-ABL ekspresyon eden hücrelerde pek çok sinyal proteini fosforillenir ve bu proteinler pek çok farklı fonksiyonel domainleriyle BCR-ABL ile etkileşir. Bu etkileşimler RAS, PI3K, AKT, JNK, SRC ailesi kinazları, protein fosfotazlar, STATlar, nükleer faktör-B ve MYC yollarını aktive eder. BCR-ABL aynı zamanda interleukin-3 (IL-3), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) ve (GM-CSF) gibi sitokinlerin de ekspresyonunu indükler.

BCR-ABL füzyonu sonucu oluşan fenotip anlaşıldıktan sonra çalışmalar etkilenen yollar üzerine yoğunlaşmıştır. Bunun sonucunda Jak/STAT, PI3K/Akt ve Ras/MEK yollarının etkilendiği saptanmıştır (14). (Şekil-4)

JAK/STAT

Janus Kinaz ailesi intraselüler nonreseptör kinazlardan biridir ve JAK/STAT yolağı üzerinden sitokin aracılı sinyal iletiminin düzenlenmesinde önemli roller oynar. STAT proteinleri JAK hücre reseptörleri tarafından aktive edilen transkripsiyon faktörleridir. STAT5 aktivasyonu primer KML'de gösterilmiştir ve fosforilasyon ve transkripsiyonu düzenlediği nükleusa translokasyonunda görev alır. Sonraki kanıtlar fare modellerinde STAT5a izoformundaki tek null mutasyonların KML benzeri hastalık yaptığını göstermiştir. BCR-ABL1 kinaz aktivitesi direkt olarak JAK2/STAT aktivasyonu yapar ve proliferasyona yol açar. JAK2 ayrıca BCR-ABL1 fonksiyonu için çok önemli olan tirozin 177'den fosforilasyon da yapar. Ayrıca BCR-ABL1, STAT5'i direkt aktive edebilir ve JAK2'nin endojen regülasyonunu bypass edebilir. JAK inhibitörlerinin TKİ dirençli hücreler dahil primer KML hücrelerine karşı etkinlik gösterebileceği öne sürülmüştür (7).



Şekil-4 BCR-ABL Füzyonu İle Aktive Olan Yolaklar (John P. Greer)

PI3K/AKT

PI3K proteinleri hücre büyümesi ve idamesini arttıran, hücre ölümünü inhibe eden transkripsiyon faktörlerini düzenlemek üzere hücre dışı sinyaller ile iletişime geçer. AKT, PI3K'nın downstream efektörüdür ve sinyal iletiminde önemli bir rol oynar (15). BCR-ABL1, Grb2/Gab2(16) ve CBL(17) adaptör proteinleri aracılığıyla PI3K sinyallerini uyarabilir. BCR-ABL1'in fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/AKT sinyalini yukarı regüle ettiği gösterilmiş ve AKT aracılı FOXO transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonu, aktif olmadıkları sitoplazmik yerleşimi ile sonuçlanır. BCR-ABL1 inhibisyonu ile PI3K/AKT sinyalleri azalır. FOXO1 ve FOXO3a sitoplazmadan nükleusa geçer ve burada CCND1, ATM, CDKN1C ve BCL6'nın ekspresyonunu modüle ederek G1 arrestine ve antiapoptotik fenotipe yol açar. Başka çalışmalar PI3K sinyal ekseninin *transforming growth factor β* (TGF-β) sinyalizasyonunun kontrolü altında olduğunu ve bu yolun bloke edilmesinin FOXO nükleer translokasyonunun etkilerini tersine çevirdiğini göstermiştir (18). PI3K aktivasyonunun bir başka sonucu protein sentezi, hücre büyümesi/büyüklüğü ve otofajiden sorumlu mTOR yolağının stimülasyonudur (19).

Ras/MEK yolağı

Ras GTPazlar/MEK kinazların aktivasyonu, membran reseptör bağlayıcı yolak aracılığıyla bazı büyüme faktör genlerinin transkripsiyonu aktive ederek hücre büyümesini stimüle eder. BCR-ABL1, hücre büyümesini arttırmak için Grb2/Gab2

fosforilasyonu aracılığıyla Ras'ı aktive eder. Ras sinyallerinin bozulması farelerde BCR-ABL1 ile ilişkilenmiş KML benzeri hastalık oluşturur. Ancak bu konudaki bilgiler kısıtlı olsa da NF- κ B'nin KML'de önemli olduğu gösterilmiştir (20).

Src kinazlar

Src ailesi kinazlar(SAK) BCR-ABL1 yolağının iyi çalışılmış hedeflerinden birisidir. Rollerini hücre dışı sinyallere cevap olarak hücre büyümesini, farklılaşmasını ve motiliteyi koordine etmektir. Çalışmalar Hck, Lyn ve Fyn alttipi Src ailesi kinazların BCR-ABL1 üzerindeki pek çok tirozini fosforilleyerek malign transformasyona yol açtığını göstermişlerdir. SAK'ların hastalığa katkı yapma mekanizmalarından biri STAT5 ve AKT'nin aktivasyonu konusunda BCR-ABL1'e yardım etmesidir (21). Lyn'in knockdownu blastik kriz hücrelerinin etkin yok edilmesine yol açar. Blastik krizdeki KML hastalarındaki upregülasyonu, hastalığın ilerlemesinde potansiyel bir rolü olduğunu düşündürmüştür. Ancak KML'deki önemleri halen çok açık değildir. SAK'ların KML başlangıcı için gerekli olmadığı ve akut lenfoblastik lösemi oluşumunda görevli olduğu gösterilmiştir (22).

Crkl

Adaptör protein Crkl, BCR-ABL1 tarafından aktive edilir. Cbl, STAT, PI3K, Paxillin ve Ras'ı içeren bir protein ağının üyesidir. BCR-ABL1 tarafından Crkl potent fosforile olur. Fosfo-Crkl'nin ölçümü, tespiti zor olan BCR-ABL1 fosforilasyon seviyesini tahmin ederek hastanın TKİ'ne cevabını ve klinik gidişini öngörmek için kullanılabilir (23).

Apoptosis deregülasyonu

BCR-ABL1, hücre proliferasyonunu arttırmasına ek olarak hücre ölümünü de bozabilir. BCR-ABL1 ekspresyonu antiapoptotik proteinler BCL2 ve BCL-X_L ekspresyonunu arttırır. Proapoptotik protein Bad'ın PI3K/Akt ile fosforilasyonu şaperon protein 14-3-3 ile Bad arasındaki etkileşimi kolaylaştırır ve Bad sitoplazmada tutulur. Bu da Bad'ın mitokondriye geçerek BCL2 ve BCL-X_L'nin antiapoptotik etkilerini bloke etmesini önler ve apoptoz oluşmaz (24).

2.4.2 Kök Hücre

KML, tek bir hematopoetik kök hücrenin kazanılmış mutasyonu sonucunda malign transformasyon ile oluşur. Kronik KML'deki eritrosit, nötrofil, eozinofil, bazofil, monosit ve trombosit serilerinin öncül hücrelerinin hepsinde *Philadelphia* kromozomu saptanması ve mozaik cinsiyet kromozom anomalileri (örneğin Turner sendromu (45,X/46,XX) ve Klinefelter sendromu (46,XY/47,XXY) taşıyıcısı hastalarda Ph kromozomunun sadece bir hücre serisinde varlığı, hastalar arasında farklı kırık noktaları olmasına rağmen hastanın tüm hücrelerinde aynı kırık noktalarının varlığı gibi pek çok bilgi bu durumu kanıtlar niteliktedir (1).

Primitif multipotansiyelli tek bir hematopoetik hücrede t(9;22)(q34;q11.2) translokasyonu sonucu kazanılmış BCR-ABL1 füzyon geni KML kök hücre oluşumu ile sonuçlanır (25). Bu da kronik fazın başlangıcı ve devamlılığı için gereklidir. KML kök hücreleri CD34+CD33-Lin-Thy1+ KIT-tir. KML kök hücrelerinin bir bölümü G₀ fazında kalır ve *BCR-ABL1* inhibitörlerine dirençlidir. Bunlar pek çok hastada tedaviye ara verilirse tekrar tümör oluşumu açısından bir havuz gibi görev yaparlar (25). Derivatif *BCR-ABL1*-pozitif hücrelerdeki genetik ve epigenetik olayların birikimi hastalığın akselere ve blastik faza dönüşümüne yol açar (26).

Yapılan pek çok çalışmada bazı KML hastalarında sadece myeloid hücrelerin değil lenfoid hücrelerin de etkilendiği saptanmıştır. T, B ve NK lenfositlerin öncüllerinin *Ph* kromozomu taşıdığı ancak lösemik klonal kökenli B hücrelerinin çoğunluğunun ve T hücrelerinin tümünün apoptozise uğradığı ve kanda etkilenmemiş hücrelerin kaldığı gösterilmiştir (1).

En erken öncül hücreler; eritroid, granülositik ve megakaryositik ve B-lenfoid hücre popülasyonlarını arttırma kapasitesine sahiptir ve düzenlenime azalmış sensitivite gösterirler. Kronik faz KML hastalarında hematopoetik artış, prekürsör ve projenitör hücrelerde de görülmekle birlikte özellikle myeloid kökenli matür hücrelerde görülmektedir (27). Ayrıca eritroid projenitörler artmıştır ve eritroid prekürsör matürasyonu bazofilik eritroblast evresinde bloke olmuştur. Kronik fazda lösemik hücreler minimal invaziftir ve kan, kemik iliği, dalak, ve karaciğer gibi hematopoetik dokularda yerleşiktir. Malign klonun proliferatif avantajı hematopoetik büyüme

faktörlerine artmış ve inhibitör faktörlere azalmış yanıt ile ilişkili olabilir. KML projenitörleri kemik iliği stroma hücrelerine ve ekstraselüler matrikse defektif adezyon gösterirler. Bozulmuş mikroçevresel etkileşimler dolaşımında artmış projenitör hücre ve ekstramedüller hematopoeze yol açar. Pek çok çalışmada *Ph*-pozitif klon normal hematopoezi etkilese de geride kalan normal kök hücrelere zarar vermediği görülmüştür. Bu da tedaviler sonrası *Ph*-negatif hematopoezin geri kazanılabilmesini açıklamaktadır (1).

2.4.3. Akselere Ve Blastik Faza Dönüşüm

Akselere faz veya blastik krize ilerleme immatür blast hücrelerinin artışı ile ilişkilidir. Blast hücreleri hematopoetik dokular yanında lenf nodları, cilt, yumuşak doku ve merkezi sinir sistemi gibi ekstramedüller dokularda yerleşir. Matürasyon arrestinin, artmış proliferasyon ve survivalın ve doku invazifliğinin sebebinin tek bir gen defektinden ziyade bir grup moleküler mekanizma olduğu düşünülmektedir. Hastalığın ilerlemesi BCR-ABL eksprese eden klonlarda ek moleküler değişiklikler ile oluşur. KML'deki genetik instabilitenin artmış oksidatif stres, azalmış DNA tamiri ve azalmış DNA hasar kontrol sinyal cevabı ile arttığı düşünülmektedir. Blastik faz KML hastalarında sitogenetik düzeyde +8, +*Ph*, +19 ve i(17q) görülürken, TP53, RB ve CDKN2A (p16^{INK4A})'da nokta mutasyonlar ve EVI1 ve MYC'te overekspresyon görülebilir. t(3;21)(q26;q22) AML1-EVI1, t(8;21)(q22;q22) AML1-ETO, NUP98-HOXA9 t(7;11)(p15;p15) ve CBFβ-SMMHC inv(16)(p13;q22) diğer KML ilişkili genetik değişimlerdir.

2.5. KLİNİK BULGULAR

Kronik faz KML'nin klinik başlangıcı genellikle sinsidir. Bazı hastalar asemptomatikken başka amaçlarla yapılmış testlerde tesadüfen saptanırken, hastaların çoğu yorgunluk, halsizlik, kilo kaybı ve dalak büyümesi nedeniyle görülen erken doyma, sol üst kadranda ağrısı ve sol üst kadranda kitle ile başvururlar. Daha nadir olarak granülosit ve platelet disfonksiyonu nedeniyle görülen enfeksiyonlar, trombozlar veya kanama ile başvururlar. Çok daha nadir olarak da ciddi lökositoz veya tromboz nedeniyle oluşan vazooklüzif hastalıklar, serebrovasküler hastalıklar,

myokardiyal infarktlar, venöz tromboz, priapizm, görme problemleri ve pulmoner yetmezlik ilk başvuru şikayetleridir (5).

KML'nin ilerlemesi semptomların kötüleşmesi ile sonuçlanır. Açıklanamayan ateşler, ciddi kilo kayıpları, hastalığı kontrol altına almak için gerekli ilaç dozunun artması, kemik ve eklem ağrıları, kanama, tromboz ve enfeksiyonlar akselere ve blastik faza transformasyonu düşündürür. Yeni tanı almış olguların %10-15'inden daha azı akselere faz veya de novo blastik faz KML ile başvurur (5).

Hafif veya orta derece splenomegali en sık fizik muayene bulgusu iken hepatomegali nadirdir. Tedaviye rağmen splenomegalinin devam etmesi hastalığın ilerlemesi için bir işarettir. Lenfadenopati ve myeloid sarkomlar hastalığın ileri evrelerinde görülür ve kötü prognozla ilişkilidir (5).

Tanı anındaki laboratuvar bulguları genellikle lökositoz, trombositoz ve anemidir. Total lökosit sayısı genellikle $25 \times 10^9/L$ (25,000/ml)'den hastaların yarısında 100,000/ml'den fazladır. Eğer tedavi edilmezse lökosit sayısı giderek artar. Periferik kanda her farklılaşma evresinden lökositler vardır. Dolaşımdaki granüositler genellikle normal görünümündedir. Kandaki blast oranı %0.5 ila %10 arasında değişir. Nötrofil alkalın fosfataz aktivitesi hastaların %90'ında düşüktür veya hiç yoktur. Bununla birlikte aktivite inflamasyon ve enfeksiyon nedeniyle artabilir ve tedavi edilince düşer. Eozinofillerin oranı artmamış olmasına rağmen absolü eozinofil sayısı artmıştır. Absolü bazofil sayısı nerdeyse tüm hastalarda artmıştır. Bazofillerin oranı kronik faz KML hastalarında %15'ten daha azdır. Absolü lenfosit sayısı T hücrelerinin artışı nedeniyle artmıştır. Trombosit düzeyi tanı anında hastaların %50'sinde artmıştır. Kronik faz boyunca trombosit sayısı artabilir. Trombosit disfonksiyonu görülebilir ancak tromboz veya kanama nadirdir. Trombositopeni tanıda genellikle bulunmaz, akselere faza ilerlemenin bir işaretidir. Hematokrit tanı anında hastaların çoğunda düşüktür. Eritrositler büyüklük ve şekil bakımından orta derece varyasyon gösterir. Az oranda çekirdekli eritrositler ve hafif retikülositoz görülebilir.

Kanın viskozitesi artmıştır. Tedavisiz KML'de hiperürisemi ve hiperürikozüri görülür. Ürat taşı oluşumu yaygındır. Akut gut artriti veya ürat nefropatisi gelişebilir. Hastalar artmış vitamin B12 bağlama kapasitesine sahiptir. Çünkü matür nötrofiller transkobalamin I ve II üretirler. Serum B12 düzeyi KML'de normale göre ortalama 10 kat artmıştır. Kan LDH düzeyleri artmıştır. Pıhtılaşma esnasında lökositlerden potasyum salındığı için psödohiperkalemi görülür (2).

Kemik iliği incelemesi hiperselüler bir ilik ortaya koyar. Granülosit/Eritrosit oranı 10:1 ile 30:1 arasındadır. Eozinofil ve bazofiller artmış olabilir. Blast oranının %10'un üstüne çıkması akselere faza dönüşümü düşündürür. Megakaryositler tipik olarak normalden küçüktür ve hipolobüle çekirdekler görülebilir. Megakaryosit sayısı normal olabilir veya hafifçe düşüktür (2).

KML'nin ortanca sağkalımı tanıdan itibaren yaklaşık 4 yıldır ancak tedavi ile ortanca sağkalım uzamıştır. Tedavisiz KML, kronik fazdan akselere faza en sonunda da blastik faza dönüşerek ilerler. Olguların %25'inde arada akselere faz gözlenmez. Batı ülkelerinde hastalar genellikle kronik fazda başvururken, gelişmekte olan ülkelere daha ileri evrelerde başvurur.

Akselere faz periferik kanda veya kemik iliğinde %10-19 myeloblast varlığı, periferik kan bazofillerinin %20'den fazla olması, trombositlerin persistan şekilde 100,000/ml'den düşük olması veya tedaviyle ilişkisiz 1,000,000/ml'den fazla trombosit olması, artmış lökositoz, dalak büyüklüğü ve klonal evölüsyon ile tanımlanır. En sık sitogenetik değişiklik ek Ph kromozomu, +8, i(17q) ve +19'dur.

KML'nin blastik fazı akut lösemiye benzer. Blast krizi kemik iliği veya periferik kanda %20'den fazla blast olması ve kemik iliği biyopsisinde büyük blast agregat ve kümeleri ve ekstramedüller blastik infiltratların gelişimi ile tanımlanır. Hastaların üçte ikisinde blastlar myeloid veya farklılaşmamış benzeri fenotipte iken üçte birinde lenfoid benzeridir. Blastların karakteri için immünfenotipleme önerilir. Blast krizi cilt, lenf nodu, dalak, kemik veya santral sinir sistemini etkileyebilirse de herhangi bir yerde görülebilir ve myeloid veya lenfoid karakterde olabilir (2).

2.6. PROGNOSTİK FAKTÖRLER

KML olgularının klinik gidişi değişkendir. İmatinib mezilat'tan önce hastaların 2 yıl içinde %10'unda, her yıl ise %20 oranında ölüm beklenmekte idi ve ortanca sağkalım yaklaşık 4 yıldır. KML'de farklı risk gruplarını tanımlamak için pek çok farklı prognostik model vardır. Sokal indeksi yaş, dalak büyüklüğü, trombosit sayısı, myeloblast oranlarını ve sitogenetik klonal değerlendirmeler göz önüne alınarak hesaplanır. Hasford sistemi IFN- α ile tedavi edilmiş hastalar üzerinde geliştirilmiştir. Dolaşımdaki blastlar, dalak boyutu, trombosit sayısı, yaş ve eozinofil ve bazofil yüzdeleri en önemli prognostik belirteçler olarak tanımlanmıştır. Hasford sistemi Sokal'e göre sağkalımı belirlemede daha başarılıdır (5).

2.7. TEDAVİ

KML tedavisi son yıllarda hızla değişmektedir. Tirozin kinaz inhibitörleri gelişimi ise KML'de çığır açan bir gelişme olmuştur. KML tedavisinin ana amacı BCR-ABL1 transkripti içeren rezidüel hücreleri ortadan kaldırarak nonneoplastik nonklonal hematopoezi uzun süre sürdürebilmektedir.

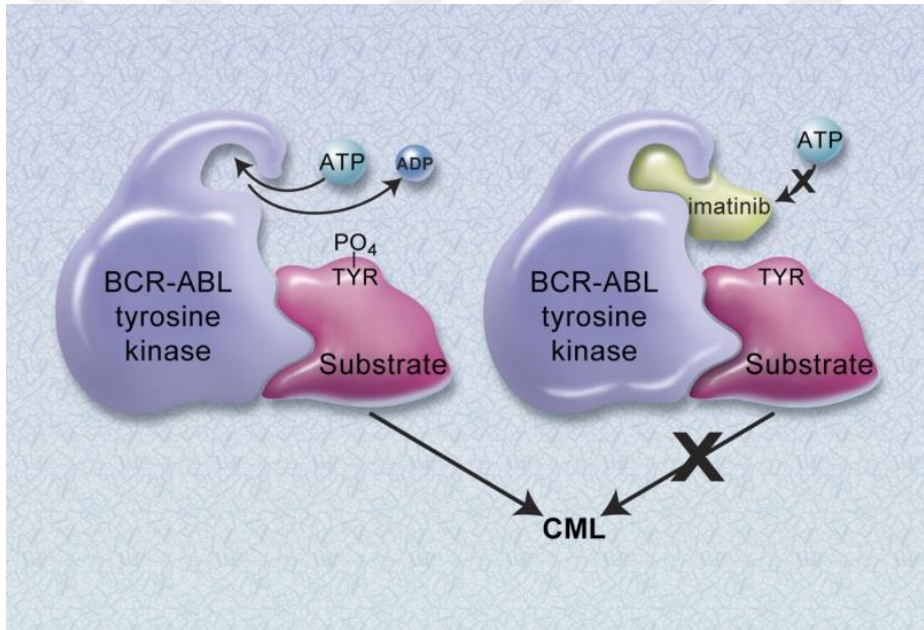
Busulfan, hematopoetik kök hücrelere ciddi şekilde toksik etki gösteren alkilleyici bir ajandır ve KML'de yüksek beyaz küre ve trombosit sayısını etkili bir biçimde düşürmek için kullanılmış ilk ilaçtır. Ancak yan etkileri nedeniyle günümüzde allogeneik kök hücre nakli rejimleri dışında terkedilmiştir (28). Günümüzde ise KML tanısı konfirme edilene kadar beyaz küre sayısını düşürmek için kullanılan en etkili ilaç bir ribonükleotid redüktaz inhibitörü olan hidroksiüredir. Konvansiyonel dozlarda hidroksiüre daha olgun projenitör hücrelere etki eder ve sitopeniler daha kısa sürer ve tedavi hemogram ile kolay yönlendirilebilir. IFN uzun süreli sitogenetik yanıt alınan ilk ilaçtır ancak çok küçük bir hasta grubunda işe yarar. Sitarabinle birlikte IFN 90'lı yıllarda standart tedavi yöntemiydi (29).

Tirozin kinaz inhibitörlerinin bulunması KML tedavisinde bir çığır açmış ve altın standart tedaviler haline almıştır. İmatinib mesilat, geliştirilen ilk tirozin kinaz inhibitörüdür (TKİ) ve 2002 yılında FDA'den onay almıştır. Ardından 2010 yılında ikinci nesil TKİ'leri nilotinib ve dasatinib onaylanmıştır ve imatinibe göre daha az

akselere ve blastik faz geliştirmiştir. 3. kuşak TKİ olan bosutinib ve ponatinib üzerindeki çalışmalar devam etmektedir.

2.7.1 Tirozin Kinaz İnhibitörleri

2.7.1.1 İmatinib Mesilate: İM, BCR-ABL kinaz bölgesini hedef alan bir dihidorfenilaminopirimidin türevidir. Potent bir BCR-ABL inhibitörü olduğu gibi c-KIT ve platelet derived growth factor reseptörlerinin(PDGFR) katalitik aktivitesini de baskılar. BCR-ABL aktivitesinin inhibisyonu *Ph* pozitif hücrelerde apoptozise yol açar ancak BCR-ABL aktivitesinin inhibisyonuna rağmen KML kök hücreleri çok az oranda apoptotik etkilenme gösterir (31). (şekil-5)



şekil-5 İmatinib Mezilat'ın Etki Mekanizması

İmatinib mezilat, geliştirilen ilk tirozin kinaz inhibitörüdür ve 2002 yılında FDA'den onay almıştır. KML tedavisinde çığır açan bir gelişmedir. International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS) alışmasında yeni tanı kronik faz KML olgularında tedavinin 12. ayda tam hematolojik yanıt oranı %95,3, tam sitogenetik yanıt oranı %73,8 olarak bulunmuştur. Bunlar, hastalığın daha önceki tedavi protokolü olan "interferon-+sitarabin" protokolüne göre oldukça iyi sonuçlardır. (THY %55,5; TSY %8,5) (32). Öte yandan hastaların 12. ayda %4,7'si THY, %26,2'si ise TSY elde edememişlerdir. Bunlar imatinibe primer dirençli hastalar

olabilir. IRIS çalışmasında 8 yıllık takibin sonunda imatinib kullanan hastaların %16'sı tedaviyi yetersiz hale geldiği için bırakmıştır. Bu da zamanla bu hastalarda sekonder (kazanılmış) direnç geliştiğini düşündürmüştür (33).

İmatinibin etkinliği üç ölçütle değerlendirilir: hematolojik yanıt, sitogenetik yanıt ve moleküler yanıt. Bu ölçütler maksimal terapötik etkiyi tanımlamak için kullanılır. Sitogenetik ve PCR ile lösemik klonun büyüklüğü azalmaya devam ettikçe ve yanıt ölçütleri karşılandıkça imatinib günde 400 mg olarak kullanılır. Tam sitogenetik yanıt veya moleküler yanıtta önce hasta yanıtı hale gelirse doz günde 600 veya 800 mg'a çıkarılabilir veya başka bir TKI'ne geçilebilir. Ciddi hematolojik yanıt olmayan veya relaps olan hastaların 2/3'ünde daha yüksek dozlarda komplet veya parsiyel hematolojik yanıt alınabilir.

Varyant translokasyon olan hastalar klasik Ph kromozomlu hastalarla benzer imatinib yanıtı gösterirler. e13a2 p210 BCR-ABL, e14a2 p210 BCR-ABL transkriptine göre biraz daha iyi yanıtla olabilir. Aynı hastadaki farklı klonlar farklı imatinib sensitivitesi gösterebilir. Derivatif 9. kromozomun delesyonları kronik faz KML'de imatinib cevabını ve prognozu etkilememektedir (34).

2.7.1.2 Nilotinib

ATP-yarışmalı BCR-ABL1 inhibitörüdür. İmatinibe göre 20-50 kat daha potenttir ve aynı zamanda daha selektiftir. İmatinib gibi ABL1 kinazın inaktif formuna bağlanır. İmatinib'den farklı olarak nilotinib bir metilimidazol halka taşır. Bu da daha derin hidrofobik ceplere girip ABL1 kinazı inaktif konformasyonda daha iyi tutmaya yardımcı olur. İn vitro olarak A-loop, P-loop, ve ATP-bağlayıcı bölgedeki T315 rezidülerini etkileyen mutasyonlar nilotinibe karşı dirençlidir (35).

İmatinibe göre TSY oranları %15 daha fazladır. Akselere ve blastik faza dönüşüm imatinibde 1. yılda %4 iken nilotinibde %1'in altındadır. Nilotinib kullananlarda imatinib kullananlara göre daha az BCR-ABL1 mutasyonu gelişir (1).

2.7.1.3 Dasatinib

Dasatinib, ABL1 ve SRC kinazlar üzerine ikili inhibisyon yapar. ABL1 kinaz domainine hem aktif hem de inaktif konformasyonda iken bağlanabilir. Bu nedenle bu bölge mutasyonları dirence yol açabilir. İmatinibe göre 325 kat daha potenttir, daha hızlı ve derin cevap alınır. 5 yıl içinde imatinible %64 hasta MMY elde ederken, dasatinible %76 hasta MMY elde eder. Daha az hasta akselere ve blastik faza ilerler. Dasatinibe direnç ABL1'deki ATP-bağlayıcı bölge ve P-loop'undaki mutasyonlarda özellikle de 315 ve 317. rezidülerin mutasyonlarında görülür.

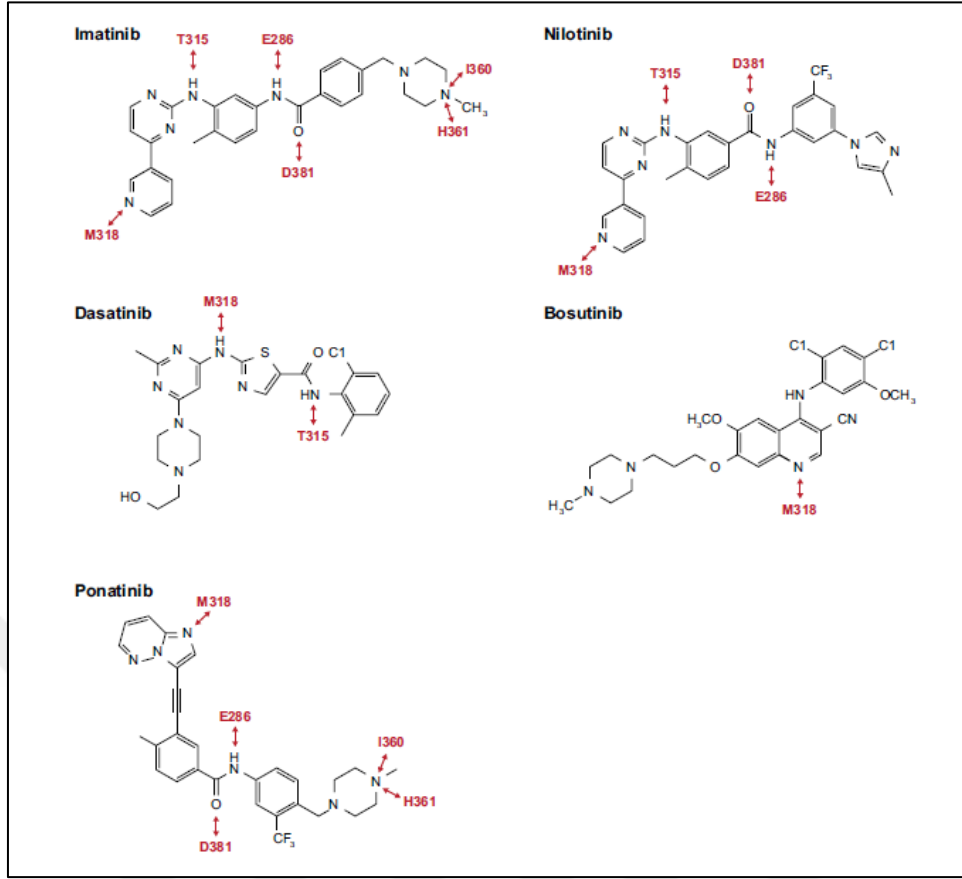
2.7.1.4 Bosutinib

Dasatinib gibi hem ABL hem SRC kinazlar üzerine inhibisyon yapar. Hem aktif hem inaktif konformasyonda bağlanabilir. 12. ayda TSY %70, MMY %41 olarak saptanmıştır. Bu oranlar imatinib için %68 ve %27'dir (36). Bu nedenle başlangıç tedavisi olarak önerilmez. T315I'ya karşı etkili değildir. F317L, Y253H ve F359C/I/V mutasyonlarına karşı etkilidir.

2.7.1.5 Ponatinib

ABL1 kinaz domainine inaktif konformasyonda bağlanır. T315 rezidüsü ile bağ oluşturacak hidrojen bağına sahip olmaması en önemli özelliğidir ve diğer tüm ilaçlara karşı dirençli olan hastalarda yanıt alınabilir. Özellikle tüm ilaçlara dirençli T315I mutant hastalarda etkili olması büyük bir avantajdır.

3. kuşak TKİ (bosutinib ve ponatinib) diğer TKİ'ne direnç gelişmiş hastalarda düşünülmelidir. Ancak yanıt alınamaması olasıdır ve genellikle yanıt uzun süreli değildir. Hematopoetik kök hücre nakli ve diğer tedaviler düşünülmelidir.



Şekil-6 TKİ'leri ve Dirence Neden Olan Mutasyonlar

2.7.2 Tirozin Kinaz İnhibitörü Olmayan Tedaviler

2.7.2.1 Omacetaxine mepesüksinat

Protein sentezi inhibisyonu ve apoptozisi indükleyerek ciddi antineoplastik etki gösteren bir doğal alkaloiddir. BCR-ABL1 pozitif lösemik kök hücrelere (Lin-c-Kit+Sca-1+) karşı aktiftir. TKİ'lerinden farklı olarak BCR-ABL1 ATP bağlayıcı cebe bağlanarak çalışmadığı için BCR-ABL1 mutasyonlarının varlığından etkilenmez. Sadece T315I mutant hastalar değil mutasyon saptanamayan dirençli olgularda da kullanılabilir. Halen üzerindeki çalışmalar devam etmekte olup en büyük handikapı oral uygulanan formu olmamasıdır (37).

2.7.2.2 Allogeneik Hematopoetik Kök Hücre Nakli

TKİ'nin tedaviye girmesinden önce 65 yaş öncesi yeni tanı hastaların çok büyük kısmına allogeneik nakil yapılmaktaydı. TKİ'nin keşfinin ardından bu sayı oldukça azaldı. Kök hücre nakli, TKİ'lerine karşı dirençli veya intoleran hastalarda ve akselere faza ve blastik krize ilerlemiş hastalarda optimal tedavi seçeneğidir (38). Kronik faz KML'de 8 yıllık sağkalım oranı %100 iken ileri evre hastalarda bu oran %48'e düşmektedir. TKİ'leri almış olan ve BCR-ABL mutasyonları gelişen hastaların hematopoetik kök hücre nakli başarısının mutasyon gelişmeyen hastalara göre daha kötü olduğu gösterilmiştir (2 yıllık OS %44 vs %76) (39).

2.7.2.3. Diğer Tedaviler

Ayrıca radyoterapi ve splenektomi de gerekli görüldüğü nadir durumlarda kullanılabilir.

2.8. TEDAVİ YANITI İZLEMİ

KML'de tedavi yanıtının değerlendirilmesi için kılavuzlarda çeşitli kavramlar kullanılmaktadır. Bunlar hematolojik yanıt, sitogenetik yanıt, moleküler yanıt ve relaps kavramlarıdır.

2.8.1 Tam Hematolojik Yanıt: Lökosit sayısı 10,000/ml'den düşük olup periferik kan sayımı tamamen normale dönmüştür. Trombosit sayısı 450,000/ml'den düşüktür. Periferde myelositler, promyelositler ve blastlar gibi immatür hücreler bulunmaz. Dalak büyüklüğünün kaybı ile beraber hastalığın diğer semptom ve bulguları kaybolmuştur.

2.8.2 Sitogenetik Yanıt:

2.8.2.1 Tam sitogenetik yanıt (TSY): Ph+ metafazın olmaması

2.8.2.2 Kısmi sitogenetik yanıt (KSY): %1-35 arasında Ph+ metafaz olması

2.8.2.3 Majör sitogenetik yanıt: %0-35 Ph+ metafaz olması (Tam+Kısmi)

2.8.2.4 Minör sitogenetik yanıt: %35'in üzerinde Ph+ metafaz olması

2.8.3 Moleküler yanıt:

2.8.3.1 Erken moleküler yanıt: 3. ve 6. ayda *BCR-ABL1*'in IS'a göre %10 ve altında olmasıdır.

2.8.3.2 Majör moleküler yanıt: *BCR-ABL1*'in IS'a göre %0.1'in altında olması veya IS sistemi yoksa standardize bir eşik değeri alındığında *BCR-ABL1* mRNA'sının 3 logaritma veya üzerinde düşmesidir.

2.8.3.3 Tam moleküler yanıt: Standardize alt sınırın en az 4.5 logaritma altı sensitivitede *BCR-ABL1* mRNA'sı saptanamamasıdır. TMY, değişken biçimde tanımlanır. Ancak en iyi 4.5 sensitivite analizleri ile tanımlanabilir.

2.8.4 Relaps:

- Tedaviye yanıt kaybının bulgularının saptanmasıdır. (Hematolojik veya sitogenetik relaps)
- *BCR-ABL1* transkript düzeyinde 1 logaritmik artış ve majör moleküler yanıtın kaybı durumunda tam sitogenetik yanıtın kaybı açısından kemik iliği analizi yapılmalıdır.

NCCN 2017 kılavuzu önerilerinde kemik iliğinin sitogenetik analizi ve kantitatif RT-PCR ile takip ve *BCR-ABL* kinaz domain mutasyon analizleri bulunmaktadır. Kemik iliği sitogenetik analizi; tanı anında, tedaviye yanıt kriterlerine erişilemediğinde ve yanıt elde edildikten sonra herhangi bir şekilde yanıtın kaybolduğunun saptandığı durumlarda (hematolojik veya sitogenetik relaps) önerilmektedir. Kantitatif RT-PCR ise tanı anında ve tedavi başlangıcından sonraki her üç ayda bir önerilmektedir.

International Scala'ya (IS) göre *BCR-ABL1* değeri %0.1-1 elde edildiğinde 2 yıl boyunca her 3 ayda bir ve sonrasında 3-6 ayda bir PCR ile takip önerilir. Eğer MMY'lı bir hastada *BCR-ABL1* transkripti seviyesinde 1 logaritmik artış saptanırsa, PCR 1-3 ayda bir tekrarlanmalıdır. *BCR-ABL* kinaz domain mutasyon analizi ise kronik faz hastalarda yanıt kriterlerine erişilemediğinde, yanıtın kaybolduğunun bulguları ortaya çıktığında (hematolojik veya sitogenetik relaps) ve *BCR-ABL1* transkript düzeyinde 1-logaritmik artış ve MMR'ın kaybı durumunda ayrıca akselere veya blastik faza ilerleme durumunda yapılması önerilmiştir (40).

Tablo-4 KML'de Yanıt Değerlendirmesi Tanımları

TAM HEMATOLOJİK YANIT	SİTOGENETİK YANIT	MOLEKÜLER YANIT
<ul style="list-style-type: none"> • PLT<450,000/ml • WBC<10,000/ml • İmmatür granülosit olmaması ve bazofil<%5 • Dalak büyüklüğünün olmaması 	<ul style="list-style-type: none"> • Tam: Ph+ %0 • Kısmi: Ph+ %1-35 • Minör: Ph+ %36-65 • Minimal: Ph+%66-95 • Yanıtsız: Ph>%95 	<ul style="list-style-type: none"> • MY4,5:≤ %0,0003 • MY4,0:≤ %0,01 • Major 3.0: ≤%0,1 • Relaps: %0,5-1

Tablo-5 KML'de Yanıt Değerlendirme Kriterleri

	Optimal	Uyarı	Başarısızlık
Tanı Anı	-	Ph+ hücrelerde KSA*, Yüksek Sokal ve Hashford Skoru	-
3 Ay	Ph+<%35 ve/veya BCR-ABL ≤%10	Ph+ %36-95 ve/veya BCR-ABL>%10	Ph+>%95 ve/veya THY alınamaması
6 Ay	Ph+%0 ve/veya BCR-ABL <%1	Ph+ %1-35 ve/veya BCR-ABL %1-10	Ph+>%35 ve/veya BCR-ABL>%10
12 Ay	BCR-ABL ≤%0,1	BCR-ABL %0.1 – 1	BCR-ABL>%1 ve/veya Ph1>%0
Herhangi bir zaman	BCR-ABL≤%0,1	Ph- hücrelerde KSA (-7 veya 7q-)	THY'in veya TSY'in kaybı, MMY'in kaybı Ph+ hücrelerde KSA

*KSA: Kompleks Sitogenetik Anomaliler

Tablo-6 KML'de Moleküler Yanıt Değerlendirme Kriterleri ve Tedavi Takibi

BCR-ABL1 (IS)	3. ay	6. ay	12. ay	12. ay sonrası
>%10	SARI	KIRMIZI		
%1-10	YEŞİL		SARI	KIRMIZI
%0,1-1	YEŞİL			SARI
<%0,1	YEŞİL			

KIRMIZI	<ul style="list-style-type: none"> Hasta uyumu ve ilaç etkileşimlerini değerlendir. Mutasyon analizi yap 	<ul style="list-style-type: none"> Alternatif TKİ'ne geç Hematopoetik kök hücre nakli
SARI	<ul style="list-style-type: none"> Hasta uyumu ve ilaç etkileşimlerini değerlendir. Mutasyon analizi yap. 	<ul style="list-style-type: none"> Alternatif TKİ'ne geç veya aynı ilaca devam et veya imatinib dozunu arttır. Hematopoetik kök hücre nakli
YEŞİL	Yanıtı ve yan etkileri değerlendir.	Aynı TKİ'ne devam et

2.9. TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRLERİNE DİRENÇ GELİŞİMİ

TKİ'lerinin klinik kullanıma girmesiyle tedaviye yanıt vermeyen olgular gözlenmiştir. Bir kısım hastada ise önce beklenen yanıt alınmış bir süre sonra ilacı kullanmasına rağmen hastalığın tekrar ortaya çıktığı ve yanıtın kaybolduğu gözlenmiştir. Bu durumu tanımlamak için primer (intrinsik) ve sekonder (kazanılmış) direnç kavramları ortaya çıkmıştır.

2.9.1 Primer (İntrinsik) Direnç: Tedavinin 3. ayında THY'ın elde edilememesi veya sitogenetik düzeyde Ph+ metafazların %95'in üzerinde olması; 6. ayında Ph+ metafazların %35'in üzerinde olması veya RT-PCR ile BCR-ABL transkripti düzeyinin tanı anındaki değerinin %10'unun üzerinde olması, 12. ayında halen Ph+

metafazların olması veya RT-PCR ile BCR-ABL transkripti düzeyinin tanı anındaki değerin %1'inin üzerinde olması olarak tanımlanır. Hastaların %15-25'inde görülür (40).

2.9.2 Sekonder (Kazanılmış) Direnç: TKİ'ne yanıt alındıktan bir süre sonra bu yanıtın kaybolmasıdır. THY'ın kaybı, tam veya kısmi sitogenetik yanıtın kaybı veya MMY'ın kaybı (2 ardışık çalışmada en az bir çalışmanın ilk tanı değerine göre %1 ve üzerinde olması) olarak tanımlanabilir (41). KML hastalarında ilaç kullanımı ile TSY elde edilse bile, KML kök hücreleri varlığını devam ettirir. Kronik faz KML kök hücreleri imatinibe dirençlidir ve genetik olarak stabil değildir.

2.9.3 Direnç Mekanizmaları: Pek çok potansiyel direnç mekanizması tanımlanmıştır. Başlıca iki ana gruba ayrılabilir.

2.9.3.1 BCR-ABL Bağımsız Direnç Mekanizmaları: Farmakokinetik etkileşimler, yetersiz intraselüler konsantrasyona yol açan mekanizmalar, alternatif sinyal yollarının aktivasyonu, klonal evolüsyon, epigenetik modülasyon ve kök hücre devamlılığı BCR-ABL bağımsız direnç mekanizmaları olarak tanımlanmıştır.

2.9.3.2 BCR-ABL Bağımlı Direnç Mekanizmaları: BCR-ABL1 duplikasyonu ve amplifikasyonu ile BCR-ABL mutasyonları ise BCR-ABL bağımlı direnç mekanizmalarıdır(42). Bu mekanizmalardan en sık görüleni ve kliniğe katkısı en iyi tanımlanmış olanı BCR-ABL mutasyonlarıdır.

2.10 BCR-ABL KİNAZ BÖLGE MUTASYONLARI

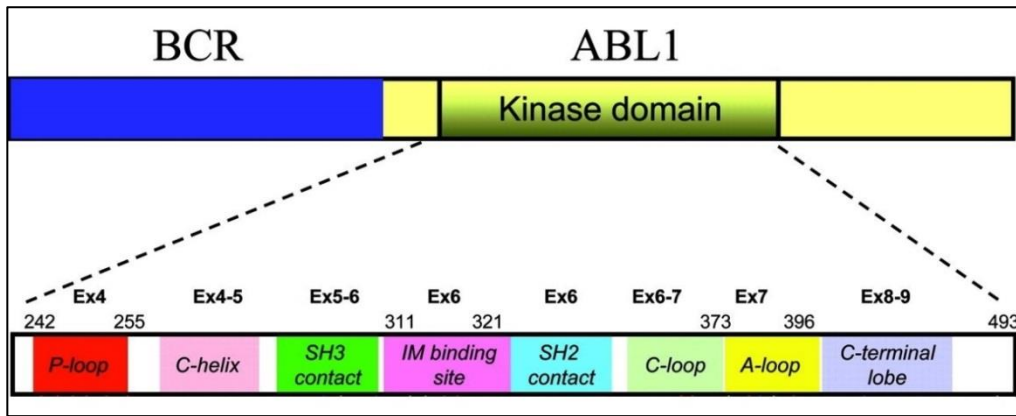
BCR-ABL kinazın aktivasyon loopu, kinaz bölgesinin ana düzenleyici elemanıdır ve açık/aktif ve kapalı/inaktif yapıda olabilir. Antitümör etkinlik için imatinib'in bu bölgeye kapalı/inaktif konformasyonda iken bağlanması gerekmektedir. BCR-ABL kinaz bölgesindeki aminoasit rezidülerini bozan mutasyonlar İmatinib'in bu bölgeye bağlanmasını önler ve antitümör etkinlik gösterilemez (43). Gorre ve arkadaşlarının 2001 yılında (34) ABL kinaz bölgesinde yer alan bir mutasyon olan T315I'yı ilk kez rapor etmesinin ardından bu konuda çalışmalar yoğunlaşmış ve günümüzde bu bölgede 100'den fazla mutasyon tanımlanmıştır.

BCR-ABL kinaz bölge mutasyon analizi aşağıdaki durumlarda endikedir(45).

- Tanı anında akselere veya blastik fazda olan hastalar
- İlk aşama imatinib tedavisi sırasında başarısızlık oluşan hastalar
- MMY'nin kaybına yol açacak şekilde BCR-ABL transkript seviyelerinde artış olan hastalar
- Suboptimal cevabı olan hastalar
- İkinci aşama dasatinib veya nilotinib tedavisi alan hastalarda hematolojik veya sitogenetik yanıtızsızlık olan hastalar

İmatinib dirençli olgulardaki BCR-ABL1 mutasyonu insidansı; direnç tanımına, kullanılan yöntem ve hastalığın fazına göre %40 ila %70 oranında değişmektedir (42). Mutasyonların çoğu çok az oranda gözlenir. 7 rezidüdeki aminoasit değişimleri dirençle ilişkili mutasyonların %85'inden sorumludur. Soverini ve ark. en sık görülen mutasyonlar olarak M244V, G250E, Y253F/H, E255K/V, T315I, M351T ve F359V'yi tanımlamışlardır (46).

Mutasyonlar, BCR-ABL kinaz bölgesindeki (SH1) 4 önemli alt bölgeye dağılmışlardır. P-loopu, İmatinib Bağlanma Bölgesi, Katalitik Bölge/SH2 Bölgesi ve Aktivasyon loopu (A-loopu). (Şekil-7)



Şekil-7 ABL Kinaz Bölgesinin Alt Bölgeleri

P-loopunda M244V, K247E, L248V, G250E, Q252H/R, Y253F/H, E255K/V İmatinib bağlayıcı bölgede F311L/I, T315I/A ve F317I/L/V, Katalitik bölgede M351T/V, E355G/D, F359V/I Aktivasyon loopunda F382L, L387M, H396R/P, V379I SH3-SH2 bölgesinde ise K84E, Y167H görülen başlıca mutasyonlardır.

Mutasyonların en sık görüldüğü bölge P-loopudur. Ancak mutasyonlardan en sık gözlenen T315I'dir.

2.10.1 İmatinib Bağlayıcı Bölge Mutasyonları: T315I ilk tanımlanan ve dirençli hastalarda en sık gözlenen mutasyondur. Gatekeeper da denilen imatinib bağlayıcı bölgede yer alan treoninin izolösine dönüşümüne yol açar. COSMIC verilerine göre BCR-ABL mutasyonu olan hastalar arasında %20.2 sıklıkta gözlenir. Ponatinib dışında diğer TKI'lerine dirençlidir. Bu bölgedeki diğer mutasyon ise T315A olup çok daha seyrek görülmektedir İmatinib ve dasatinibe direnç gösterir ancak nilotinibe karşı duyarlıdır. İmatinib bağlayıcı bölgede yer alan başka bir grup mutasyon da F317L/V'dir. COSMIC verilerine göre BCR-ABL mutasyonu olan hastalar arasında %5,7 oranında görülür. İmatinib ve dasatinibe dirençli, nilotinibe duyarlıdır.

2.10.2 P-loop Mutasyonları: E255K %7,4 oranında görülür. Bu rezidünün diğer mutasyonu ise E255V'dir ve %2,9 sıklıkta görülür. İmatinib ve nilotinibe direnç gösterirler ancak dasatinibe karşı duyarlıdırlar. P-loopta yer alan diğer mutasyon ise Y253H'dir. %6,4 oranında görülür. İmatinib ve nilotinibe direnç gösterirler ancak dasatinibe karşı duyarlıdırlar. P-loop mutasyonları ileri fazdaki hastalarda daha sık görülür ve mutasyon saptanan kronik fazdaki hastalar daha sık ileri fazlara geçer. (Branford et al., 2003(80); Simona et al., 2005; Soverini et al., 2006).

2.10.3 Katalitik Bölge Mutasyonları: F359V %5,2 oranında görülür. İmatinib ve nilotinibe direnç gösterirler ancak dasatinibe karşı duyarlıdırlar. F359C ise %1 oranında görülür. İmatinib ve nilotinibe direnç gösterirler ancak dasatinibe karşı duyarlıdırlar.

2.10.4 A-loopu (Aktivasyon loopu) Mutasyonları: H396R/P, F382L, V379I gibi mutasyonlar tanımlanmıştır. %2,5 oranında görülür.

Mutasyonlar çeşitli mekanizmalarla dirence sebep olabilir.

- i. İlacın kinaza bağlanmasında görev alan aminoasiti değiştiren mutasyonlar oluşturarak direkt inhibisyon. Örneğin T315I, F317L ve F359C/V.
- ii. BCR-ABL konformasyonunda değişiklik yaparak indirekt inhibisyon yapanlar. Örneğin G250E, Q252H, Y253H ve E255K/V.
- iii. BCR-ABL'nin aktif konfigürasyonunun sürdürülmesine neden olan mutasyonlar. M351T ve H369R/P (47). (Şekil-8)(Tablo-5)

imatinib					nilotinib dasatinib bosutinib ponatinib				
M237V	L273M	F311L	E355D/G	V379I	A397P	Y253F/H	V299L	E255K	?
M244V	E275K/Q	T315I	F359V/I/C	A380T	S417F/Y	E255K/V	T315I	V299L	
L248R	D276G	F317L/V/I/C	D363Y	F382L	I418S/V	T315I	T315A	T315I	
G250E/R	T277A	F359V/I/C	L364I	L384M	S438C	F359V/I/C	F317L/V/I/C	?	
Q252R/H	E279K	Y342H	A365V	L387M/F	E453G/K				
Y253F/H	V280A/I	M343T	L370P	M388L	E459K/V				
E255K/V	V289A	A344V	V371A	Y393C	P480L				
E258D	V299L	M351T	E373K	H396R/P	F486S				

Şekil-8 TKİ'ne Direnç Gelişimine Yol Açan Mutasyonlar (Soverini S, 2015)

Tablo-7 Mutasyonlara Göre İlaç Seçimi

Mutasyon	Sonraki Seçilecek TKİ
Y253H	Dasatinib, Bosutinib
E255K/V	Dasatinib, Bosutinib
F359V/C/I	Dasatinib, Bosutinib
F317L/V/I/C	Nilotinib, Bosutinib
V299L	Nilotinib
T315A	Nilotinib, Bosutinib
T315I	Ponatinib

Erken faz KML hastalarında imatinib tedavisi öncesinde mutasyon bakmak mutasyon insidansları çok düşük olduğu için cost-efektif değildir. Ancak imatinib tedavisi alırken KML hücreleri artışı görüldüğünde mutasyon analizi yapma endikasyonu

vardır. ABL1 mutasyonları hem intrinsik hem kazanılmış dirençli hastalarda gösterilmiştir.

BCR-ABL kinaz bölgesi mutasyon analizi için kullanılan Sanger dizileme yöntemi ile hastaların *Ph+* hücrelerinin %20 ve üzerinde mutasyon varsa tespit edebilir (48). Daha düşük orandaki mutasyonların saptanabilmesi için farklı metodlar geliştirilmiştir. Altklonlama ve dizileme ile %9, pyrodizileme ile %5, denature edici yüksek performanslı likit kromatografi (DHPLC) ile %0,1-10, çift gradient denature edici elektoroforez ile %5, allele özgü oligonükleotid PCR (ASO-PCR) ile %0.01 hassasiyetle mutasyon saptanabilir (Tablo-6).

Tablo-8 Mutasyon Saptamada Kullanılan Yöntemlerin Duyarlılıkları

TEKNOLOJİ	DUYARLILIK %
Sanger dizileme	15-25
Altklonlama ve dizileme	9
Pyrodizileme	5
Çift gradiyent denatüre edici elektroforez	5
D-HPLC	0.1-10
Florasan PCR ve peptit nükleik asit (PNA) bağlama	0.2
ASO-PCR	0,01

(Hughes T et al, Blood. 2006 Jul 1; 108(1): 28–37.)

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada, kliniğimizde genetik tanı testleri açısından takipli Kronik Myeloid Lösemili hastaları incelenmiştir. Bu hastaların klinik ve hematolojik parametreleri ve FISH sonuçları ve moleküler (RT-PCR BCR-ABL füzyon transkripti oranı ve BCR-ABL kinaz bölge mutasyonu) analiz sonuçları değerlendirmeye alınmıştır. Özellikle KML'de, dirençle ilgili, BCR-ABL kinaz bölge mutasyonlarından 12'sinin sıklığı, dağılımı ve hastalığın prognozu üzerine etkileri değerlendirilmiştir.

3.1 Hastalar

01.01.2008 ile 31 Mart 2017 tarihleri arasında KML tanısı ile genetik analiz için bölümümüzün laboratuvarlarına kemik iliği ve/veya periferik kan materyali girişi olan 287 hasta değerlendirmeye alındı. Bu hastaların FISH, RT-PCR ve pyrosekanslama sonuçları kaydedildi. Eş zamanlı 'Hasta formu' oluşturularak, hastaların yaşı, cinsiyeti, tanı anındaki kan sayımı, LDH ve β_2 mikroglobulin düzeyleri, kullandığı ilaçlar, sağlık durumu, sağkalım süresi kaydedildi. Hastaların bilgilerine, nükleus hasta bilgi sistemi, Tıbbi Genetik dosyaları ve hastane arşiv dosyaları kullanılarak ulaşıldı.

Hastalar aşağıdaki kriterlere göre ilaca yanıtı ve dirençli olarak gruplandırıldı. Dirençli olduğu tespit edilen hastaların pyrosekanslama ile saptanan ABL Kinaz bölge mutasyonları değerlendirildi. Direnç primer (intrinsik) ve sekonder olarak tanımlandı. Ayrıca akselere ve blastik fazda olan hastalar ayrı bir grup olarak değerlendirildi.

Direnç kriterleri

- **Primer direnç tanımı:**

- Tedavinin 3. ayında tam hematolojik yanıt alınamaması veya sitogenetik düzeyde Ph kromozomunun %95 ve üzeri pozitifliği
- Tedavinin 6. ayında sitogenetik düzeyde Ph kromozomunun %35'in üzerinde olması veya moleküler düzeyde BCR-ABL değerinde ilk tanı değerine göre logaritmik düşme olmaması (IS'a göre %10'un üzeri olması)

- Tedavinin 12. ayında sitogenetik düzeyde Ph kromozomunun saptanması veya BCR-ABL değerinde ilk tanı değerine göre 2 logaritmik düzeyden fazla düşme görülmemesi (IS'e göre %1'in üzerinde olması)
- Tedavinin 12. ayından sonra herhangi bir zamanda tam hematolojik yanıtın kaybı, tam sitogenetik yanıtın kaybı veya major moleküler yanıtın kaybı

- **Sekonder direnç tanımı**

- TKI'ne yanıt alındıktan bir süre sonra bu yanıtın kaybolmasıdır. THY'nin kaybı, tam veya kısmi sitogenetik yanıtın kaybı veya MMY'nin kaybı (2 ardışık çalışmada en az bir çalışmanın ilk tanı değerine göre %1 ve üzerinde olması) olarak tanımlanmıştır.

- KML tanılı **akselere veya blastik fazda** gelen hastalar

- **Akselere faz** periferik kanda veya kemik iliğinde %10-19 myeloblast varlığı, periferik kan bazofillerinin %20'den fazla olması, trombositlerin persistan şekilde 100,000/ml'den düşük olması veya tedaviyle ilişkisiz 1,000,000/ml'den fazla trombosit olması, artmış lökositoz, dalak büyüklüğü ve klonal evölüsyon ile tanımlanır.
- **Blast krizi** kemik iliği veya periferik kanda %20'den fazla blast olması ile tanımlanır.

- FISH analizinde **BCR-ABL atipik füzyonu** olan hastalar

3.2 Sitogenetik Analiz: Bölümümüze gelen kemik iliği aspirasyon/biyopsi materyalleri sitogenetik analiz açısından modifiye Rooney yöntemleri kullanılarak yapılmıştır. Kısaca RPMI1640 ile yıkanıp zenginleştirilmiş besiyerine ekildikten sonra kültür üzerine 30µl 10µg/ml konsantrasyonda Colcemid eklendi. Bir gece bekledikten sonra kemik iliği önce KCl ile hipotonik şoka maruz bırakıldı. Ardından da Carney fiksatif ile fikse edildi. Elde edilen pellet, lamalar üzerine yayılarak GTG bantlama yapıldı. CytoVision (version 3.93) sistemleri ile karyotip elde edildi. Optimal koşullardaki preparatlarda her hastada 20 metafaz incelemesi yapıldı. Minimum metafaz sayısı 8 olarak kabul edildi.

3.3 Floresan İn-situ Hibridizasyon (FISH) Analizi: Bölümümüze gelen materyal kültüre edildikten sonra lamalar üzerine yayıldı. Protokole göre denatürasyon ve hibridizasyon aşamalarından geçildi. FISH analizi için prob olarak Vysis LSI BCR/ABL Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe (Vysis/Abott Co, Downers Grove, IL, USA) ve BCR/ABL (ABL1) Translocation, Dual Fusion (Cytocell, UK) ticari problemleri kullanıldı. FISH sinyali görüntüleri CCD Progressive Scan Video Camera (Tokyo, Japonya) eklenmiş Olympus BX-51 Floresan mikroskobu kullanılarak elde edildi ve sinyal analizleri CytoVysion programı (version 3.93) ile yapıldı.

Prob Tanımı: FISH analizi için Vysis LSI BCR/ABL Dual Color, Dual Fusion Translocation Probu kullanılmıştır. Probda 9q34 bölgesinde bulunan ABL1 probu *spectrum orange(R)* ile işaretlenmiştir. 22q11.2 bölgesindeki BCR ise *spectrum green(G)* ile işaretlenmiştir. Normal hastalarda hücrede 2 yeşil 2 kırmızı sinyal alınacaktır. *Ph1* kromozomu saptanan hastalarda 2 füzyon 1 yeşil 1 kırmızı sinyal alınır (FFGR).

Klasik Füzyon Tanımı FFGR sinyallerinin görülmesi

Atipik Füzyon Tanımı FGR, FGGR, FGRR, FGRR sinyalleri görülmesi

Tablo-7 DCDF FISH Problemleri ile Saptanan BCR/ABL Füzyon Paternleri

	FISH paterni	Sinyallerin yerleşimi			Yorum
		Füzyon (F)	Red (R)	Green (G)	
Klasik Füzyon	FFGR	2F (Ph,der9)	1R(9)	1G(22)	t(9;22)
Atipik Füzyon	FGR	1F (Ph)	1R (9)	1G(22)	t(9;22), proksimal 9q ve distal 22q delesyonu
	FGGR	1F (Ph)	1R (9)	1G(22) 1G(der9)	t(9;22), 9q delesyonu
	FGRR	1F (Ph)	1R (9) 1R (der9)	1G(22)	t(9;22), distal der(22) delesyonu
	FFFGR	3F (Ph,Ph,der9)	1R (9)	1G(22)	t(9;22), +Ph
	FGGRR	1F (Ph)	1R (9) 1R	1G(22) 1G(der9)	Başka partnerlerle kompleks translokasyon

3.4 RT-PCR ile BCR-ABL Füzyon Analizleri: Real time PCR ile BCR-ABL füzyon quantifikasyonu LightCycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) ve İpsogen BCR-ABL1 Mbc IS-MMR ve İpsogen BCR-ABL1 mbc IS-MMR kitleri (Qiagen GmbH, Hilden Germany) ile yapıldı.

3.4.1 Roche LightCycler: EDTA'lı tüpte gelen 5 ml periferik kan veya kemik iliği materyalinden Roche Molecular Biochemicals'in ürettiği "mRNA Isolation Kit for White Blood Cells" kiti ile mRNA izole edildi. LightCycler-t(9;22) Quantification Kit ile mRNA'dan random primerlerle aşağıdaki bileşimle c-DNA elde edildi (Tablo-8).

Tablo-8 Roche LightCycler-t(9;22) Quantification Kit ile cDNA Eldesi İçin Malzemeler

RT-Buffer	4 µL
Random primerler	0,2 µL
Deoksinükleotid Mixi	0,4 µL
AMV Reverse Transkriptaz	0,4 µL
RNAse inhibitörü	0,6 µL
H ₂ O	4,4 µL
Toplam hacim	10 µL

Ardından tüplerdeki 10µL miks içerisine 10µL hasta mRNA'sı eklendi. 65⁰C'ta 10 dakika olacak biçimde PCR cihazına kondu.

37 ⁰ C	60 dk
65 ⁰ C	10 dk
+4 ⁰ C	∞

Tablo-9 Roche LightCycler PCR Programı

Elde edilen miksler üzerine 10µL reaksiyon mixi (Taq DNA polimeraz, reaksiyon bufferı ve dNTP mixi (dTTP yerine dUTP)) konuldu. Ardından her hasta için BCR-ABL füzyon transkripti ve iç kontrol için olmak üzere LC mix hazırlandı.

Tablo-10 Roche LC Mix Bileşimi

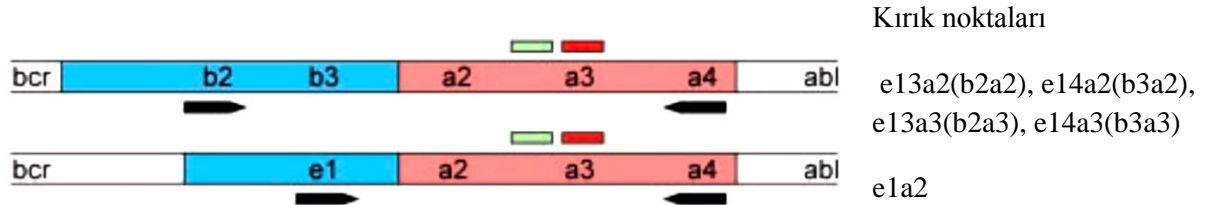
	BCR-ABL mix	G6PDH mix
H ₂ O	6.8 µL	9.2µL
Reaksiyon mixi (Taq DNA polimeraz, reaksiyon bufferı ve dNTP mixi (dTTP yerine dUTP))	2 µL	2µL
t(9;22) saptama mixi (t(9;22) füzyon genine özgün primer ve hibridizasyon probe mixi)	6.2µL	
G6PDH saptama mixi: G6PDH genine özgün primer ve hibridizasyon probe mixi)		3.8 µL
Toplam	15µL	15 µL

Hazırlanan 15µL'lik miksler içerisine 5 µL c-DNA eklendi. RT-PCR cihazına kondu.

Tablo-11 Roche t(9;22) RT-PCR Programı

Aktivasyon basamağı	95 ⁰ C	30 saniye
3 aşamalı döngü:		
Denatürasyon	95 ⁰ C	1 saniye
Bağlanma(Annealing)	64 ⁰ C	10 saniye
Uzama	72 ⁰ C	26 saniye
Döngü Sayısı: 45		
Son uzama	72 ⁰ C	10 dakika

Sonuçlar LightCycler Software ile analiz edildi ve BCR-ABL/G6PDH oranları hesaplandı. Bu kitle BCR ekson e1 için bir forward primer, BCR ekson b2(ekzon 13) için bir forward primer vardır. Her ikisi de ABL ekson a4 için bir reverse primer ile kombine edilmiştir.



Şekil-9 Roche LightCycler t(9;22) Kiti Primerlerinin Yerleşimi

3.4.2 İpsogen BCR-ABL: EDTA'lı tüpte gelen 5 ml periferik kan veya kemik iliği materyalinden **RNA izole edildi.** RNA örnekleri 0.1 µg/µl konsantrasyonuna sulandırıldı. 10 µl hasta RNA'sı, yüksek pozitif RNA kontrolü, IS-MMR kalibratörü, nükleaz free su ayrı ayrı tüplere kondu. Hepsi 5 dk boyunca 65⁰C'ta inkübe edildi ve hemen buza kondu 5 dk beklendi. Ardından RT miks hazırlandı (Tablo-12).

Elde edilen RT miksten her PCR tübüne 15 µl kondu. Ardından ilgili tüplere hasta RNA'larından, kontrol ve kalibratörden 10 µl eklendi. Ardından termal cyclere yerleştirildi ve cDNA elde edildi.

Tablo-12 İpsogen BCR-ABL RT Miks Bileşenleri(cDNA eldesi)

First-Strand Buffer	5 µl
dNTPler	2 µl
Random nonamer	5,25 µl
RNaseOUT	0,5 µl
Superscript III Reverse Transcriptase	1 µl
DTT	1,25 µl
Heated RNA sample, control, or IS-MMR Calibrator	10 µl
Final hacim	25 µl

Tablo-13 İpsogen BCR-ABL RT PCR Koşulları(cDNA eldesi)

Reverse transkripsiyon 1	25 ⁰ C	10 dk
Reverse transkripsiyon 2	50 ⁰ C	60 dk
İnaktivasyon	85 ⁰ C	5 dk
Soğutma	4 ⁰ C	5 dk

Elde edilen cDNA'lar ile Rotor Gene Q cihazında qPCR yapılmak üzere hazırlandı. Elde edilen qPCR mixi Rotor Gene Q cihazına qPCR yapılmak üzere Termal Cyclera yüklendi (Tablo-14 ve Tablo-15). Ardından elde edilen sonuçlar analiz edildi.

Tablo-14 Rotor Gene Q'ya Yüklenecek PCR Bileşenleri

Premix Ex, Taq 2x	12,5 µl
Primerler ve Probe Mix	1 µl
Nükleaz free H ₂ O	6,5 µl
cDNA	5 µl
Toplam Hacim	25 µl

Tablo-15 İpsogen qPCR Programı

Analiz modu	Quantitasyon	
Hold 1	95 ⁰ C	10 sn
Döngü:		
	95 ⁰ C	5 sn
	60 ⁰ C	30 sn
Döngü Sayısı: 50		
Hold 2	36 ⁰ C	60 sn

3.5 Pyrosekanslama ile BCR-ABL Kinaz Bölge Mutasyon Analizi

BCR-ABL kinaz bölge mutasyonlarını tespit etmek için hastalardan EDTA'lı tüpte kemik iliği veya periferik kan alındı. "PerfectPure RNA Blood Kit" ile kemik iliği veya periferik kandan RNA elde edildi. İkinci aşamada "İpsogen RT Kit" protokolüne göre cDNA elde edildi (Tablo-11 ve Tablo-12). Elde edilen cDNA'lardan 1. aşama PCR ile BCR geni 13. ekzonu ile ABL geni 10. ekzonu arasındaki bölge çoğaltıldı. Böylece normal ABL geni değil BCR-ABL füzyon ürünündeki ilgili bölge spesifik olarak çoğaltılmış oldu. Tablo-15 ve tablo-16'da tarif edildiği biçimiyle PCR için hazırlık yapıldı ve PCR gerçekleştirildi.

Tablo-16 Pyrosekanslama PCR Aşama-1 Bileşimi

Bileşen	Hacim/Reaksiyon
Mastermix, 2x	12,5µl
BCR-ABL PCR1 primer	1µl
H ₂ O	6,5µl
cDNA	5µl
Toplam	25µl

Tablo-17 Pyrosekanslama PCR Aşama-1 PCR Programı

Aktivasyon basamağı	95 ⁰ C	15 dakika
3 aşamalı döngü:		
Denatürasyon	94 ⁰ C	30 saniye
Bağlanma	60 ⁰ C	60 saniye
Uzama	72 ⁰ C	45 saniye
Döngü Sayısı: 45		
Son uzama	72 ⁰ C	10 dakika

Elde edilen BCR-ABL aşama-1 PCR ürünleri 1/4 oranında dilue edildi. Ardından bu PCR ürünleri kullanılarak 4 ayrı sekans primeriyle (253, 299, 315, 359 primerleri) PCR aşama-2 kuruldu(Nested PCR). (Tablo-18a-b,19). Elde edilen PCR-2 ürünleri pürifikasyon için Streptavidin Sefaroz bilyelere bağlandı (Tablo-20).

Tablo-18a Pyrosekanslama PCR Aşama-2 Bileşenleri (253, 315, 359 Primerleri İçin)

Bileşen	Hacim/ Reaksiyon
Mastermix, 2X	12,5µl
253, 315, 359 PCR primer	1µl
H ₂ O	6,5µl
1:4 dilüe PCR aşama 1 ürünü	5µl
Toplam	25µl

Tablo-18b Pyrosekanslama PCR Aşama-2 Bileşenleri (299 primeri için)

Bileşen	Hacim/ Reaksiyon
Mastermix, 2X	12,5µl
299 PCR primer	1µl
H ₂ O	1,5µl
1:4 dilüe PCR aşama 1 ürünü	10µl
Toplam	25µl

Tablo-19 Pyrosekanslama Aşama-2 PCR Programı

Aktivasyon basamağı	95 ⁰ C	15 dakika
3 aşamalı döngü:		
Denatürasyon	94 ⁰ C	30 saniye
Bağlanma	60 ⁰ C	30 saniye
Uzama	72 ⁰ C	30 saniye
Döngü Sayısı: 45		
Son uzama	72 ⁰ C	10 dakika

Tablo-20 Streptavidin Sefaroz Bilyelere Yükleme Bileşenleri

Streptavidin Sefaroz Bilyeler	2 µl
Binding Buffer	40 µl
Ultrapure H ₂ O	28 µl
Final hacim	70 µl

Bu aşamada software programında 24 kuyucuklu plateler için çalışma planı hazırlandı ve pyrosekanslama için ne kadar enzim, substrat ve nükleotidler gerektiği hesaplandı.

Ardından iki adet plate hazırlandı: El ünitesinde saflaştırılacak olan PCR aşama-2 ürünleri ve streptavidin sefaroze bilyelerin karışımının bulunduğu PCR plate ve saflaştırma sonucunda oluşan PCR ürünlerinin içerisine konulup Q24 Pyromark cihazına yüklenecek olan Q24 plate.

24 kuyucuklu PCR plateninin her bir kuyucuğuna 70 µl Tablo-19'daki miksten konulduktan sonra çalışma planında uygun şekilde üzerilerine 10 µl PCR aşama-2 ürünleri eklendi. PCR plate sızdırma olmayacak şekilde kapatıldı. Plate çalkalayıcıda 1400 RPM'de 5-10 dk çalkalandı.

24 kuyucuklu Q24 plate'in her bir kuyucuğuna çalışma planında hazırlandığı şekilde 2,5 µl ilgili sekans primeri ve 22,5 µl annealing buffer kondu. Elde edilmiş olan PCR plate ve Q24 plate aynı oryantasyonda olacak şekilde vakum çalışma alanına yerleştirildi.

Vakum pompası ile PCR platenin PCR ürünleri el ünitesine vakumlandı. Ardından %70 etanolde 5 sn, denatürasyon solüsyonunda 5 sn, Washing Bufferda 10 sn bekletilerek vakumlandı. Böylece vakum ünitesindeki filtreye vakumlanmış olan sefaroze bilyelere tutturulmuş PCR ürünleri saflaştırıldı ve danüte edildi. El ünitesi 90 dereceyi geçecek şekilde ters döndürüldü ve 5 sn tutularak filtre problemlerinden sıvının uzaklaştırılması sağlandı. El ünitesi Q24 plate kuyucuklarına daldırıldı ve sekans primeri içeren buffer üzerine PCR-2 ürünleri bırakıldı. Q24 plate önceden 80°C ısıtılmış plate holder üzerine kondu ve 2 dk tutuldu. Ardından oda sıcaklığında 5 dk beklendi.

Sekanslama için gerekli olan enzim, substrat ve nükleotidler çalışma planında hesaplanan miktarlarda kartuşa eklendi. Kartuş ve Q24 plate, Pyromark Q24 cihazına yüklendi. Çalışma planı dosyalarını içeren USB cihaza takıldı ve cihaz çalıştırıldı. Sonuçlar USB'ye kaydedildi ve Pyromark Q24 software ile analiz edildi.

Her bir assay için kendi dispensasyon orderları ile analiz edildi. 253 ve 359 primeri içeren kuyucukların analizleri iki farklı “sequence to analyze” ile okundu ve wild type dizi ile karşılaştırıldı (Tablo-21).

Tablo-21 ABL Kinaz Bölge Pyrosekans Analizi İçin Diziler ve Dispensasyon Sıraları

Assay	Sequence to analyze
253	Sequence to analyze 1: T/CACGGGG/AAGGTGTACGA Sequence to analyze 2: TA/TCGGGGA/TGGTGTACGA Dispensation order: GCTACGGATGTGTAC
299	Sequence to analyze: AC/G/ACAGGTTAGGGTGTTT Dispensation order: GAGCAGTAGTG
315	Sequence to analyze: A/GC/TTGAGT/C/GTC/A/GATGACCT Dispensation order: TCTCAGCTGCAGCTCGATGA
359	Sequence to analyze 1: CT/GTCATCCACA Sequence to analyze 2: CTT/GCATCCACA Dispensation order: ACTGTGCATC

Dizilerdeki saptanan baz değişiklikleri önceden belirlenmiş LOD ve LOB değerlerine bakılarak gerçekten bir mutasyon olup olmadığı ve yüzdesi saptandı.

Tablo-22 ABL Kinaz Bölgesindeki Wild Type ve Mutasyonlu Diziler

Assay (Yön)		Dizilim	
BCR-ABL 253 (Forward)	wt	TACGGGGAGGTGTACGA	SEQ TO ANALYZE 1
	Y253H E255K	CACGGGGAGGTGTACGA TACGGGAAGGTGTACGA	
	Y253F E255V	TTCGGGGAGGTGTACGA TACGGGGTGGTGTACGA	SEQ TO ANALYZE 2
BCR-ABL 299 (Reverse)	wt	ACCAGGTTAGGGTGTGTTGATCTCT	
	V299L(ctg) V299L(ttg)	AGCAGGTTAGGGTGTGTTGATCTCT AACAGGTTAGGGTGTGTTGATCTCT	
BCR-ABL 315 (Forward)	wt	ACTGAGTTCATGACCTACGGGAACCT	
	T315I	ATTGAGTTCATGACCTACGGGAACCT	
	F317V	ACTGAGGTCATGACCTACGGGAACCT	
	F317L(ctc)	ACTGAGCTCATGACCTACGGGAACCT	
	F317L(tta)	ACTGAGTTAATGACCTACGGGAACCT	
	F317L(ttg)	ACTGAGTTGATGACCTACGGGAACCT	
T315A	GCTGAGTTCATGACCTACGGGAACCT		
BCR-ABL 359 (Forward)	wt	CTTCATCCACAGAGATCTTGCTGCCCCG	SEQ TO ANALYZE 1
	F359V	CGTCATCCACAGAGATCTTGCTGCCCCG	
	F359C	CTGCATCCACAGAGATCTTGCTGCCCCG	SEQ TO ANALYZE 2

Tablo-23 ABL Kinaz Bölge Mutasyonlarının LOB ve LOD Değerleri

Mutasyon		LOB (%)	LOD (%)
Y253H	TAC>CAC	2,19	5,53
Y253F	TAC>TTC	0	9,38
E255K	GAG>AAG	8,96	12,41
E255V	GAG>GTG	3,31	13,27
V299L	GTG>CTG	5,02	18,56
V299L	GTG>TTG	6,05	12,69
T315A	ACT>GCT	1,57	3,01
T315I	ACT>ATT	0,62	2,88
F317L	TTC>TTA	6,64	13,99
F317L	TTC>TTG	3,95	6,61
F317L	TTC>CTC	2,88	7,80
F317V	TTC>GTC	4,60	7,73
F359V	TTC>GTC	1,31	4,24
F359C	TTC>TGC	1,19	5,68

Mutasyon frekansı, belirlenmiş olan LOD'den küçükse mutasyon yoktur, LOD değerinden %3'ün üzerinde yüksekse mutasyon vardır. Eğer iki değer arasında ise potansiyel düşük seviyeli mutasyon olarak yorumlanır. Potansiyel düşük mutasyon çıkan hastalar tekrar edildi. Her iki çalışma sonucu LOD değeri ve üzerinde ise düşük seviyeli mutasyon olarak yorumlandı.

3.6. Etik Onay

Çalışmaya başlamadan önce Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan onay alınmıştır (Onay tarihi 05.05.2017 ve dosya numarası B.30.2.ODM.0.20.08/916).

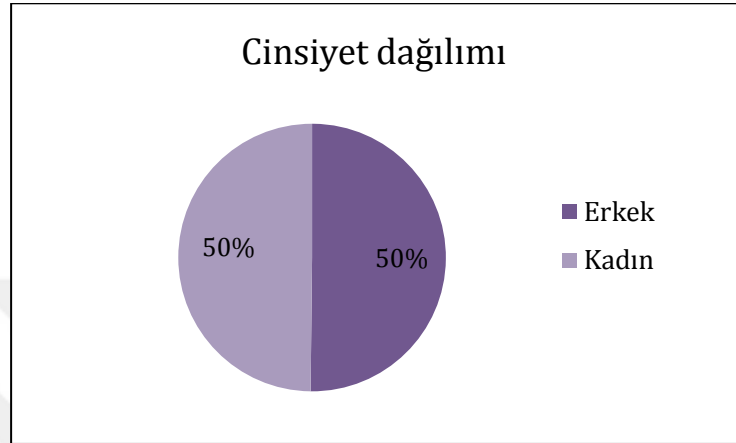
3.7. İstatistiksel Değerlendirme

Hastaların bulgu ve sonuçları, SPSS (Statistical Package For Science Studies) For Windows 15,0 İstatistik Paket programı ile değerlendirilmiş veriler ortalama \pm SD ve ortanca (min.- maks.) olarak belirtilmiştir. İstatistiksel yöntem olarak, Ki-kare testi, Mann-Whitney U testi, Bağımsız İki Örneklem t Testi, Kaplan-Meier sağ kalım analizi, log rank testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

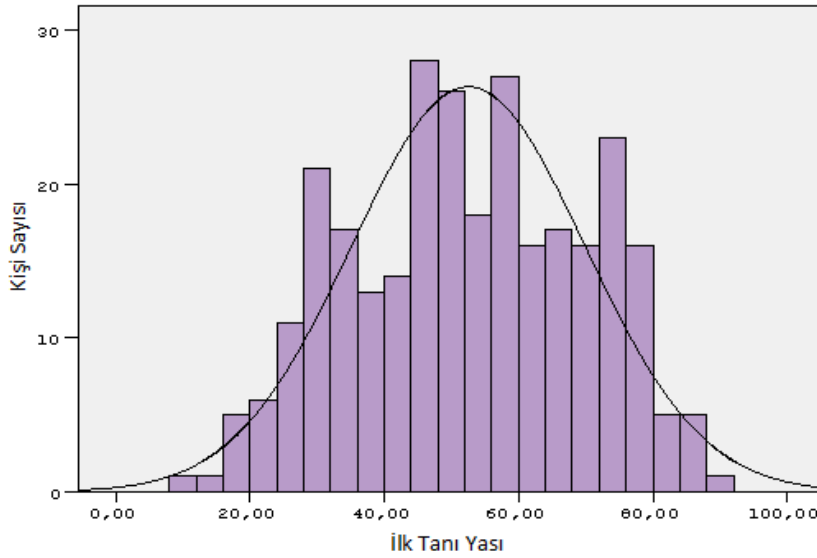
4.1. Hastalar ve Cinsiyet ve Yaşa Göre Dağılımı

Çalışmaya alınan 287 hastanın 144 (%50.2)'ü erkek, 143 (%49.8)'ü kadındı. Erkek/kadın oranı 1:1'di. (Şekil-10)



Şekil-10 KML Hastalarının Cinsiyete Göre Dağılımı

Hastaların tanı anındaki yaşları ortalaması 52.5 ± 17.3 yıl idi. En küçük tanı yaşı 11.9, en büyük tanı yaşı 90.5 idi (Şekil-11).



Şekil-11 KML Hastalarının İlk Tanı Yaşları Dağılımı

4.2. Hastaların İlaç Yanıt Durumuna Göre Dağılımı

287 hastanın 26'sının (%9.1) takipleri yoktu. Takipli 261 hastanın 110'u (%42.2) ilaca dirençli olarak saptandı. 151 (%57.8) hasta ise ilaca yanıtlı idi (Tablo-24).

Tablo-24 Hastaların İlaç Yanıt Durumuna Göre Dağılımı

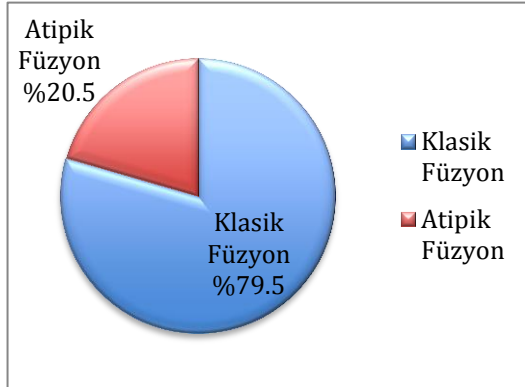
	Sayı	Yüzde(%)
İlaç Yanıtsız	110	%42.2
İlaç Yanıtlı	151	%57.8
Toplam	261	

4.3. Hastaların Sağkalım Durumu

Takipli hastaların tümünün (n:261) ortalama sağkalım süresi 177.5 ay olarak gözlemlendi.

4.4 Hastaların FISH Analiz Sonuçlarına Göre Değerlendirilmesi

FISH analizi yapılan ve sonuç elde edilebilen 224 hastanın 178'inde (%79.5) klasik füzyon (FFGR), 46'sında (%20.5) atipik füzyon paternleri saptandı (Şekil-12). Klasik füzyonlu 178 hastanın 15'i takibimizden çıkmıştı ve yanıt durumlarını tespit edemedik. Takipli 163 klasik füzyonlu hastanın 73 (%44.8)'ü yanıtsızdı. Atipik füzyonlu 46 hastanın 2'si takibimizden çıkmıştı. Atipik füzyonlu 44 hastanın ise 24 (%54,5)'ü yanıtsızdı. Arada istatistiksel fark olmamasına rağmen atipik füzyonlu grupta ilaca yanıtsızlık oranı daha yüksekti.

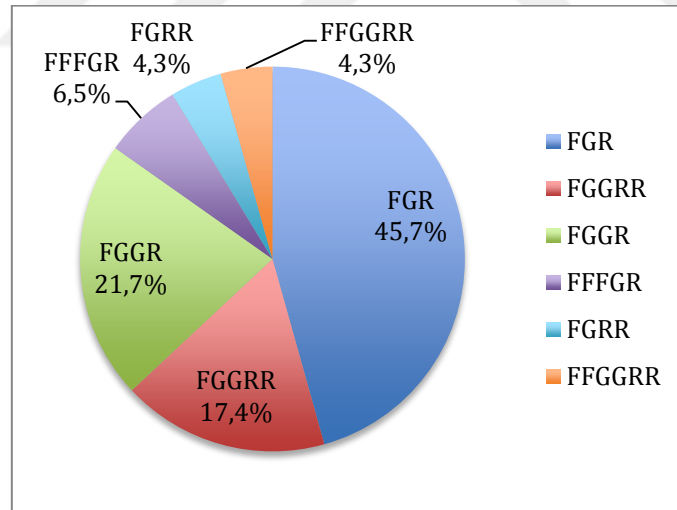


Şekil-12 Hastaların FISH Analiz Sonuçlarına Göre Dağılımı

Klasik füzyon saptanan 178 hastanın 90 (%50.5)'i erkek, 88 (%49.5)'i kadındı. Tanı yaşları ortalaması 54.3 ± 17.7 yıl, en küçük tanı yaşı 11.9 yıl, en büyük tanı yaşı 90.5 yıl idi. Atipik füzyon saptanan 46 hastanın 24 (%52.2)'ü erkek, 22 (%47.8)'si kadındı. Tanı yaşlarının ortalaması 48.2 ± 15.2 yıl, en küçüğü 17.9 yıl, en büyüğü 77.6 yıl idi. Atipik füzyon ile klasik füzyonlu hastaların tanı yaşları arasında anlamlı fark saptandı ($p=0,03$).

Atipik füzyon paternlerini klasik füzyon paterni olan FFGR'den farklı olan paternler için kullandığımız ifade etmiştik. FGR ABL ve BCR delesyonlarını, FGGR ABL delesyonlarını, FGRR BCR delesyonlarını, FGGR kompleks varyant translokasyonları, FFFGR fazladan bir *Ph* kromozomu varlığını göstermekteydi.

Atipik füzyon paternleri incelendiğinde 21 hastada FGR, 8 hastada FGGR, 10 hastada FGGR, 2 hastada FGRR, 3 hastada FFFGR, 2 hastada FFGRR füzyon paternleri saptandı (Şekil-13).

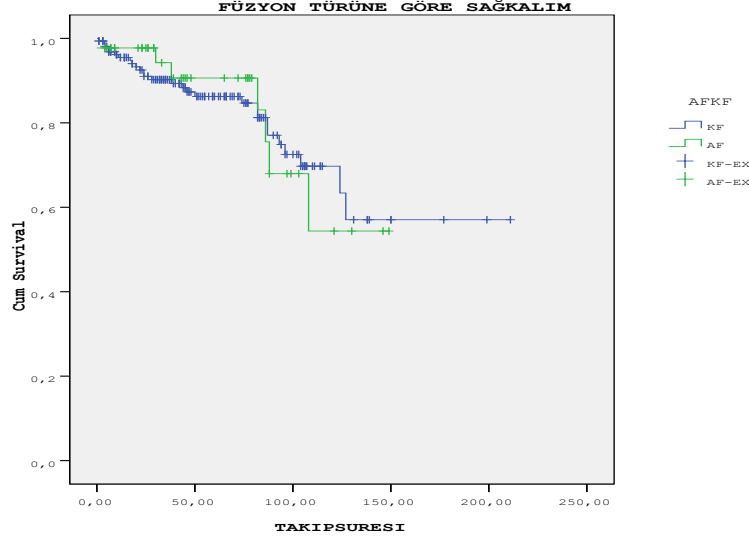


Şekil-13 Atipik FISH Paternlerinin Dağılımı

4.5. Hastaların Sağlık Açısından Değerlendirilmesi

Tüm hastaların (n:261) ortalama sağkalım süresi 177.5 ay olarak gözlemlendi. FISH analizinde klasik füzyon ve atipik füzyon paterni olan 207 hastanın sağkalım süresi ise 153.7 aydı.

FISH analizinde klasik füzyon paterni olan hastaların ortalama sağkalım süresi 154.3 ay, atipik füzyon paterni olan hastaların ortalama sağkalım süresi 117.4 ay olarak gözlemlendi. İki grup arasında sağkalım açısından istatistiksel bir fark gözlenmedi (log rank $p=0,9$). (Şekil-14).



Şekil-14 Hastaların Füzyon Türüne Göre Sağkalım Eğrisi

4.6. Hastaların *Excitus* Durumuna Göre Dağılımı

261 hastanın 45'i (%17.2) izlem süresince *excitus* oldu. *Excituslar* cinsiyet durumuna göre incelendiğinde 127 erkek hastadan 30'u (%23.6), 134 kadın hastadan ise 15'i (%11.2) *excitus* olarak saptandı ($p<0.05$). Erkek hastaların ortalama sağkalım süresi 129.3 ay iken, kadın hastaların ortalama sağkalım süresi 196.3 ay olarak saptandı. İki grup arasında *excitus* ve sağkalım açısından anlamlı bir farklılık saptandı ($p=0,001$).

Yanıtsız 110 hastanın 31(%28.1)'i, yanıtlı 151 hastanın 14(%9.3)'ü *excitus* olmuştu. İki grup arasında anlamlı bir farklılık saptandı($p<0.05$).

Klasik füzyonlu 163 hastanın 28(%17.2)'i, atipik füzyonlu 44 hastanın 7(%15.9)'si *excitus* olmuştu. Klasik füzyonlu hastaların *excitus* oranı ile atipik füzyonlularınki arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Klasik füzyonlu ilaca dirençli 73 hastanın 20 (%27.4)'si, klasik füzyonlu ve ilaca yanıtlı 90 hastanın 8 (%8.8)'i *excitus* olmuştu ($p<0.05$). Atipik füzyonlu ilaca dirençli 24 hastanın 7(%29.2)'si *excitus* olurken ilaca yanıtlı hastaların hiçbiri *excitus* olmamıştı.

Tablo-27 Yanıt ve Füzyon Tipine Göre *Excitus* Oranları

EX/HASTA	Klasik Füzyon	Atipik Füzyon	Füzyon Tipi Bilinmeyen	TOPLAM
YANITLI	8/90 %8.8	0/20 0	6/41 %14.6	14/151 %9.3
YANITSIZ	20/73 %27.4	7/24 %29.2	4/13 %30.7	31/110 %28.1
TOPLAM	28/163 %17.2	7/44 %15.9	10/54 %18.5	45/261 %17.2

Tüm hastalardaki *excitus* oranı(%17.2) ile dirençli klasik füzyonlu hastaların *excitus* oranları(%27.4) karşılaştırıldığında dirençli klasik füzyonlu hastalarda yüksek *excitus* oranı saptandı(p=0.05). Tüm hastalardaki *excitus* oranı (%17.2) ile dirençli atipik füzyonlu hastaların *excitus* oranı (%29.1) karşılaştırıldığında dirençli atipik füzyonlu hastalarda daha yüksek *excitus* oranı saptandı ancak istatistiksel fark gözlenmedi (p=0.1).

Tüm hastalardaki *excitus* oranı (%17.2) ile dirençli hastaların *excitus* oranı (%28.1) karşılaştırıldığında dirençli hastalarda yüksek *excitus* oranı saptandı (p=0.02). Tüm hastalardaki *excitus* oranı (%17.2) ile dirençli atipik füzyonlu hastalardan FGR olanların *excitus* oranı (%30.7) karşılaştırıldığında dirençli FGR'li hastalarda yüksek saptandı ancak istatistiksel fark gözlenmedi (p=0.3). Tüm hastalardaki *excitus* oranı (%17.2) ile dirençli AF'lu olup FGR dışında füzyonu olanların *excitus* oranı (%27.3) karşılaştırıldığında ikinci gruptaki hastalarda yüksek saptandı ancak istatistiksel fark gözlenmedi (p=0.2). Atipik füzyon grubundaki hastalar FGR ve olmayanlar olarak ayrılıp *excitus* oranları karşılaştırılığında (%27 vs %30) arada istatistiksel bir fark bulunamamıştır.(p=0.8). Atipik füzyon grubundaki FGGR hastalardaki *excitus* oranları karşılaştırılığında (%27 vs %30) arada istatistiksel bir fark bulunamamıştır (p=0.8).

Tablo 28 Hastaların Direnç Açısından Karşılaştırılması

		Direnç Yüzdesi	Dirençli/ Hasta	P değeri
a	Dirençli / Tüm Hasta	%42.1	110/261	
b	Dirençli KF / Tüm KF	%44.7	73/163	a versus b p>.05
c	Dirençli AF / Tüm AF	%54.5	24/44	a versus c p>.05
d	Dirençli AF-FGR / Tüm AF-FGR	%52.3	11/21	a versus d p>.05
e	Dirençli AF-FGR-hariç/ Tüm AF-FGR hariç	%56.5	13/23	a versus e p>.05
f	Dirençli AF-FGGR / Tüm AF-FGGR	%33.3	3/9	a versus f p>.05
g	Dirençli AF-FGGR hariç / Tüm AF-FGGR hariç	%60	21/35	a versus g p<0.5

Tablo 29 Hastaların Excitus Oranları Açısından Karşılaştırması

		<i>Excitus</i> Yüzdesi	<i>Excitus</i> / Hasta	P değeri
a	Tüm Hastalar	%17.2	45/261	
b	Tüm FISH Grubu	%16.9	35/207	
c	FISH Grubu Klasik füzyon	%17.1	28/163	
d	FISH Grubu Atipik füzyon	%15.9	7/44	
e	Tüm Grup Dirençli	%28.1	31/110	a versus e <i>p < .05</i>
f	FISH Grup Klasik Füzyon Dirençli	% 27	20/73	a versus f <i>p < .05</i>
g	FISH Grup Atipik Füzyon Dirençli	% 29	7/24	a versus g <i>p < .05</i>
h	FISH Grup AF-FGR	%14.2	4/23	a versus h p>.05
i	FISH Grup FGR hariç AF	%17.3	3/21	a versus i p>.05
j	Dirençli FISH Grup AF-FGR	% 27.2	3/11	a versus j p>.05

k	Dirençli FISH Grup FGR hariç AF	%30.7	4/13	a versus k p>.05
l	FISH Grup FGGR AF	%11	1/9	a versus l p>.05
m	FISH Grup Dirençli FGGR AF	%33	1/3	a versus m p>.05

4.7. Yanıtsız Hastaların Fazlarına Göre Dağılımı

110 yanıtsız hastanın 7(%6.3)'si akselere fazda, 16(%14.5)'sı ise blastik fazda idiler. Blastik fazdaki hastaların 7'si, akselere fazdaki hastaların 1'i tanı anında bu fazda idiler. Geri kalan hastalar izlemimiz esnasında kronik fazdan akselere blastik faza dönüşmüşlerdi. ABL kinaz bölgesi mutasyon analizi yapabildiğimiz 90 hastadan 5(%5.5)'i akselere fazda, 14(%15.5)'ü blastik fazda idi. 90 hastanın tanı anında 6'sı blastik fazda 1'i akselere fazda idi. Diğer akselere ve blastik fazdaki hastalar kronik fazdan izlemimiz süresince dönüşmüşlerdi.

4.8 ABL Kinaz Bölgesi Mutasyonlarının Dağılımı

Dirençli olduğu tespit edilen 110 hastadan 90'ına ABL kinaz bölge mutasyon analiz paneli (Y253H, Y253F, E255K, E255V, V299L, T315A, T315I, F317L, F317V, F359V, F359C) uygulandı. 90 hastanın 13(%14.4)'ünde mutasyon saptandı. 8 hastada (%8.9) T315I, 2 hastada(%2.2) Y253H, 1 hastada(%1.1) E255K, 1 hastada(%1.1) V299L ve 1 hastada (%1.1) F317L saptanmıştır.

Tablo-30 Hastaların ABL Kinaz Bölge Mutasyon Sonuçları

Mutasyon	Hasta sayısı	Yanıtsız Hastalar İçindeki Oran (n:90)	Mutasyon Saptanan Hastalar İçindeki Oran(n:13)
T315I	8	%8.9	%61.5
Y253H	2	%2.2	%15.4
E255K	1	%1.1	%7.7
V299L	1	%1.1	%7.7
F317L	1	%1.1	%7.7
TOPLAM	13	%14.4	%100

Yanıtsız hastalardan mutasyon analizi yapılan 19'u akselere-blastik fazdaki hastanın %36.8'inde mutasyon saptanmışken 71 kronik fazdaki hastanın 6(%8.4)'sında mutasyon saptanmıştı ($p<0.05$).

Tablo-31 Hastaların Fazlarına Göre Mutasyon Durumu

	Mutasyon yok	Mutasyon var	Toplam
Kronik faz	65	6 (%8.4)	71
Akselere-blastik faz	12	7 (%36.8)	19
Toplam	77	13 (%14.4)	90

$p<0.05$

Dirençli atipik füzyonlu hastalardan sonuçlarına ulaşılabilen 22'sinin 4(%18.2)'ünde mutasyon saptandı. Dirençli klasik füzyonlu hastalardan sonuçlarına ulaşılabilen 61'inin 9(%14.8)'unda mutasyon saptandı ($p>0.05$). Yanıtlı olan ancak FISH'te atipik füzyon paternleri saptanan 22 hastadan 18'inin mutasyon analizi sonuçlarına ulaşıldı. Hiçbirinde mutasyon tespit edilmedi.

Tablo-32 Hastaların Mutasyon Durumuna Göre *Excitus* Oranları

	MUTASYON POZİTİF	MUTASYON NEGATİF	
SAĞ	8(%61.5)	59 (%76.6)	
EX	5 (%38.5)	18(%23.4)	p>0.05
	13	77	

4.9 ABL Kinaz Bölgesi Mutasyonu Saptanan Hastaların Klinik Özellikleri

Mutasyon saptanan 13 hastanın klinik ve laboratuvar bulguları tabloda gösterildi.

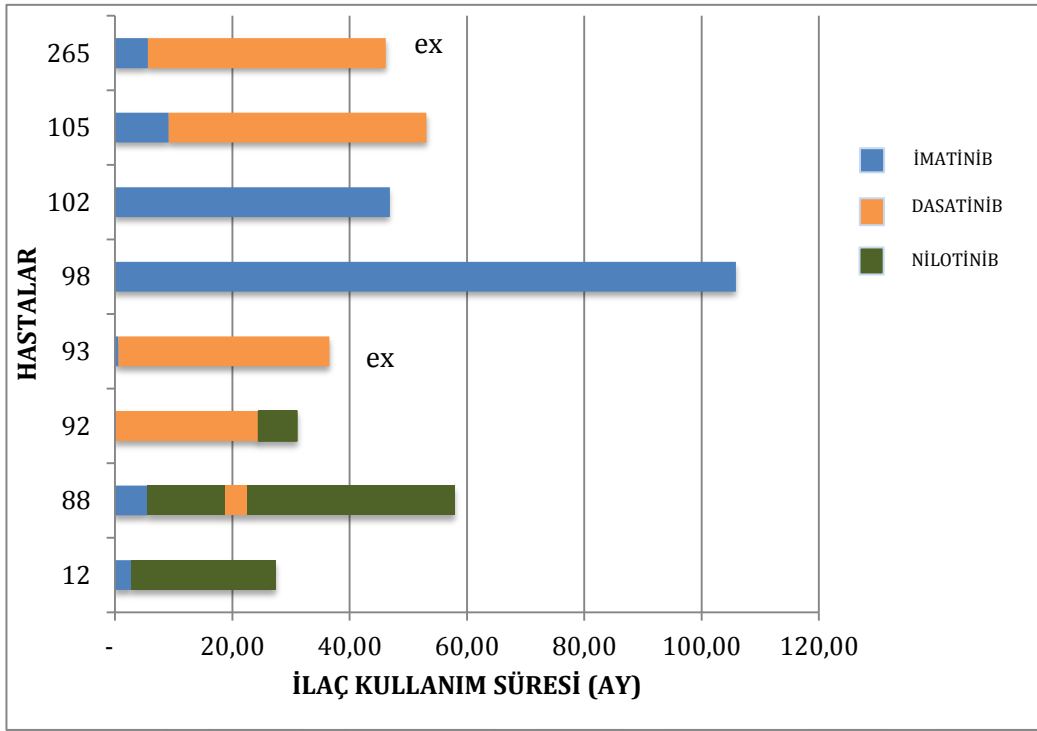
Tablo-33 ABL Kinaz Bölge Mutasyonu Olan Hastaların Klinik-Laboratuvar Özellikleri

HASTA	MUTASYON	TANI YAŞI	DİRENÇ DURUMU	EX YAŞI	FÜZYON TİPİ	Tanıdaki BK	Tanıdaki HB	Tanıdaki PLT	TEDAVİLER
12	T315I	27.9	Primer Direnç	-	FGRR	238.9	10.9	337	İ-N
88	T315I	24.5	Primer Direnç	-	KF	63.7	12.8	980	İDN
105	T315I	80.6	Primer Direnç	-	KF	217.3	9	414	İD
98	T315I	44.4	Sekonder Direnç	-	KF	80.1	11.5	140	İ
102	T315I	54.2	Sekonder Direnç	-	FGR	25.43	12.5	353	İ
92	T315I	72.8	Blastik Faz	-	KF	95.7	8	172	DN
93	T315I	48.1	ALL dönüşüm	51.2	FGR	37	11.9	36.8	İD
265	T315I	35.5	Blastik Dönüşüm	39.3	KF	42.7	12.9	131	İD
61	Y253H	35.9	Primer Direnç	-	KF	248.1	7.4	810	İN
157	Y253H	77.4	Blastik Faz	86.3	FGGR	YOK	YOK	YOK	İND
33	E255K	52.8	ALL Dönüşüm	54.6	KF	48.1	9.6	265	İD
179	V299L	73.6	AML Dönüşüm	82.2	KF	YOK	YOK	YOK	İD
251	F317L	66.4	ALL Dönüşüm	-	KF	104.4	10	160	İD

T315I Saptanan Hastalar: Çalışmamızda T315I saptanana 8 hastanın tümü dirençli olarak tanımlanan grupta idi. T315I saptanan 8 hastanın 3'ü erkek, 5'i kadındı. Tanı yaşları ortalaması 48.5 yıldı. 8 hastanın 3 (%37.5)'ü blastik fazda 5'i kronik fazda idi. Hastaların 2'si(%25) *excitus* olmuştu. Excitus olan hastaların 2'si de blastik fazda idi.

T315I mutasyonu taşıyan hastaların tanı anında 2'sinin sitogenetik analizinde metafaz elde edilemezken birinde near tetraploidi ile birlikte Ph kromozomu saptandı. Diğer 5 hastada ise Ph kromozomu dışında bir sitogenetik anomali saptanmadı. FISH analizlerinde 8 hastanın 5(%62.5)'inde klasik füzyon paternleri, 3(%37.5)'ünde atipik füzyon paternleri saptandı. Atipik füzyon paternlerinin 1'i kompleks translokasyonları düşündürülen FGGRR paterni, 2'si ise der9 delesyonlarını gösteren FGR paternlerinde idi.

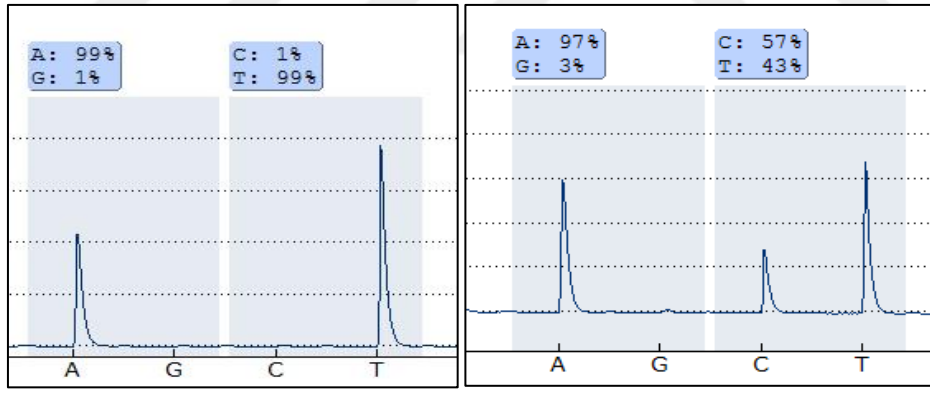
T315I taşıyan 8 hastanın 7'sinde ilk tedavi olarak imatinib, 1'inde dasatinib başlanmıştı. İki hasta halen imatinib kullanmakta idi (105 ve 46 ay) ve MMY elde edilememişti. 6 hastada ikinci ilaca geçilmişti. 2. ilaç olarak 3 hastada dasatinibe, 3 hastada nilotinibe geçilmişti. İkinci ilaca geçiş için geçen süre ortalaması 5.23 aydı. İkinci ilaç olarak nilotinibe geçilen hastalardan birisinde 24.6. ayında halen MMY elde edilememişti ve takibimizden çıkmıştı. Diğer iki hastadan birisinde 6 aydır nilotinib kullanmasına rağmen MMY elde edilememişti. Bir hastada ise dasatinibe geçilmiş ardından tekrar nilotinib kullanmış ancak yanıt alınamamıştı. İkinci ilaç olarak dasatinibe geçilen hastaların tümünde dasatinibe direnç saptanmıştır. 3 hastadan birisi takibinin 40. ayında *excitus* olmuştu. Sonuçta hastalarımızın imatinib kullanan 7'sinin hepsi, dasatinib kullanan 5 hastanın hepsi ve nilotinib kullanan 3 hastanın tümünde ilaçlara direnç saptanmıştır.



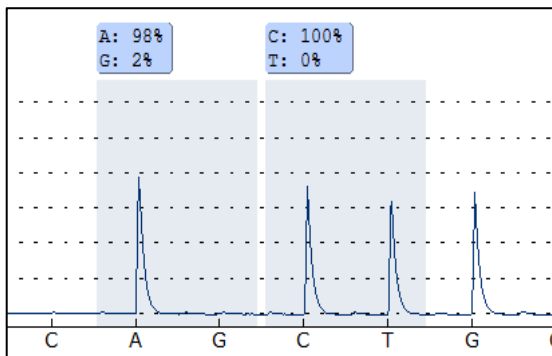
Şekil-15 T315I Taşıyan Hastaların İlaç Kullanım Durumları

a) %99 T315I

b) %43 T315I



c) WT

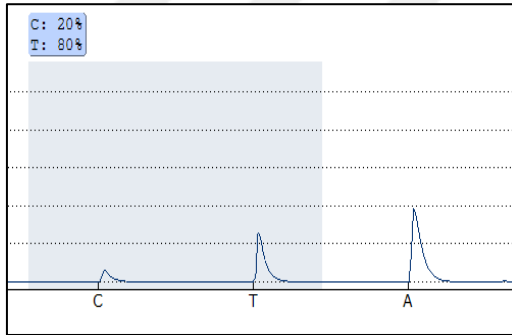


Şekil-16
T315I Taşıyan Hastaların
Pyrosekans Görüntüleri

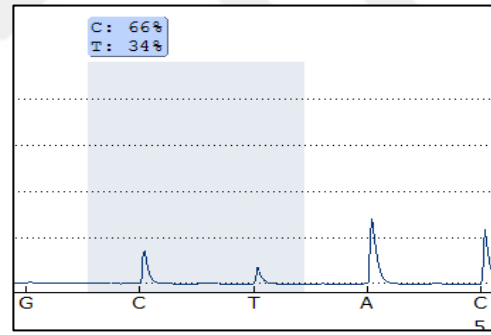
Y253H Saptanan Hastalar: Y253H taşıyan 2 hastamız vardı. Çalışmamızda %2.2 sıklıkta bu mutasyonu saptadık. Hastalarımızın tanı yaşları ortalaması 56.7 yıl idi. İki hastamızın da sitogenetik sonuçlarına ulaşamazken FISH analizlerinde birinde KF diğerinde AF(FGGR) saptandı. Hastalarımızın biri *excitus* olmuştu. Hastalardan birisi kronik fazda diğeri blastik fazda idi. Kronik fazdaki hastamızın ilk tanı yaşı 35.9 yıl idi. Tanı anındaki sitogenetik analizde metafaz elde edilememiş yapılan FISH analizinde klasik füzyon saptanmıştı. 6 ay imatinib kullanmış hastada yanıt alınamamış ve nilotinibe geçilmişti. 9 aylık kullanıma rağmen MMY elde edilememişti. Y253H saptanan ikinci hastamızın ilk tanı yaşı 77.4 yıldır.

Tanı anındaki sitogenetik analiz sonucuna ulaşamadı ancak FISH analizinde atipik füzyon paterni (FGGR) saptanmıştı. Hastamız 2 yıl imatinib kullanmış yanıt alınmış ardından tedaviye devam etmemiş ve blastik fazda yeniden başvurmuştu. İkinci ilaç olarak nilotinib başlanmış ve 3.5 ay kullanmış ardından yanıt alınamayarak dasatinibe geçilmişti. Dasatinib başlandıktan sonra 4. ayda *excitus* olmuştu.

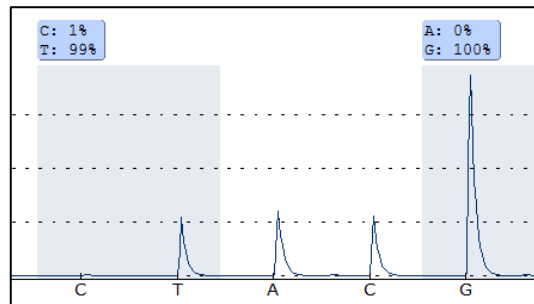
a) Y253H %20 mutant



b) Y253H %66 mutant



c) WT

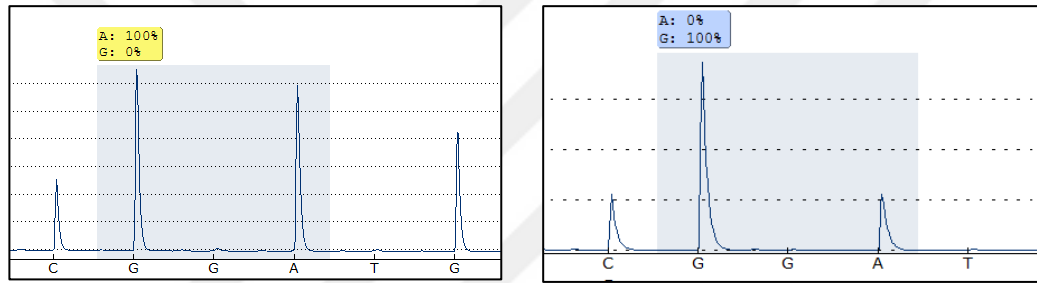


Şekil-17 Y253H Taşıyan Hastaların Pyrosekans Görüntüleri

E255K Saptanan Hasta: 1 hastamızda E255K saptadık. Çalışmamızdaki mutasyon sıklığı %1.1'di. Biz çalışmamızda dirençli hastalarda E255K oranını %1.1 bulduk. Hastamız blastik fazda başvurmuş, bu nedenle mutasyon analizine alınmıştı. Başvuruda sitogenetik analizde 46,XY,t(9;22)(q34;q11), FISH analizinde ise klasik füzyon saptanmıştı. RT-PCR BCR-ABL analizinde majör BCR-ABL füzyon transkripti saptanmıştı. 2.2 ay imatinib tedavisi ardından hastamız pre-B ALL dönüşüm olarak kabul edilmiş dasatinib ve ALL kemoterapisi başlanmıştı. Hastamız tedavi görürken 3.7 ay sonra *excitus* olmuştu. Tanı anında yapılan pyrosekans analizinde %100 oranında E255K saptanmıştı.

a) E255K %100 mutant

b) WT

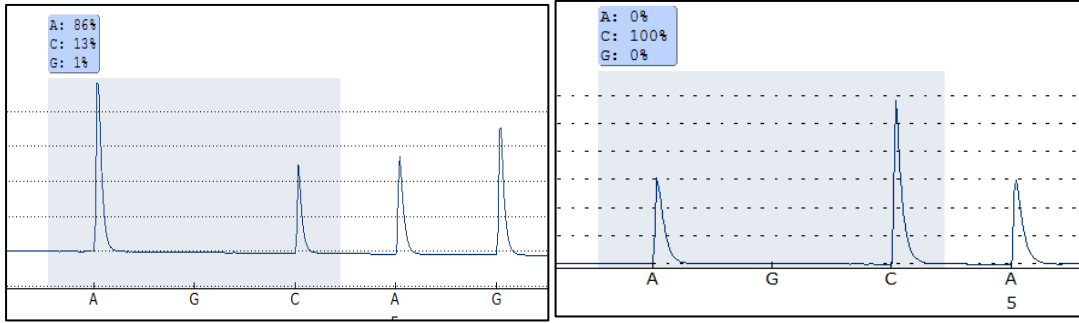


Şekil-18 E255K Taşıyan Hastanın Pyrosekans Görüntüsü

V299L Saptanan Hastalar: 1 hastamızda V299L saptadık. Çalışmamızdaki mutasyon sıklığı %1.1'di. İlk tanı yaşı 73.6 yıl idi. Sitogenetik analiz sonucuna ulaşamayan hastada FISH analizinde klasik füzyon sinyal paterni saptanmıştı. İmatinib başlanan hastada önce yanıt elde edilmiş 84 ay imatinib kullandıktan sonra sekonder yanıtızsızlık gelişmiş dasatinibe geçilmiş ardından blastik dönüşüm (AML) gelişmişti. Direnç gelişen dönemde yapılan sitogenetik analizde trizomi 12, trizomi 21 ve i(17q) saptanmıştı. Yapılan ABL kinaz bölge mutasyonu analizinde %86 oranında V299L saptandı.

a) V299L %86 mutant

b) WT

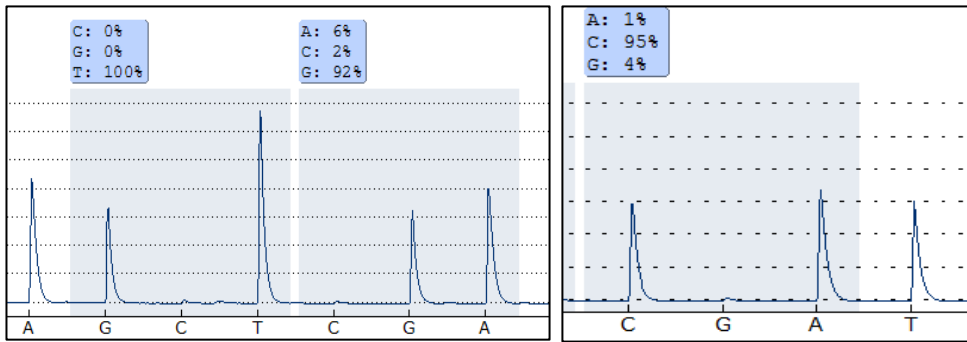


Şekil-19 V299L Taşıyan Hastanın Pyrosekans Görüntüsü

F317L Saptanan Hasta: 1 hastamızda F317L saptadık. Mutasyon sıklığı %1.1'di. Hastamızın ilk tanı yaşı 66.4 yıl idi. Tanı anında yapılan kemik iliği sitogenetik analizine metafaz bulunamadı ve FISH analizinde KF saptandı. 3 ay imatinib kullandıktan sonra ALL blastik faza dönüştüğü için dasatinibe geçildi. Dasatinibe 8.5 aylık izlem süresince yanıt elde edilemedi. Hastada pyrosekans analizinde %92 oranında F317L saptandı.

a) F317L %92 mutant

b) WT



Şekil-20 F317L Mutasyonu Taşıyan Hastanın Pyrosekans Görüntüsü

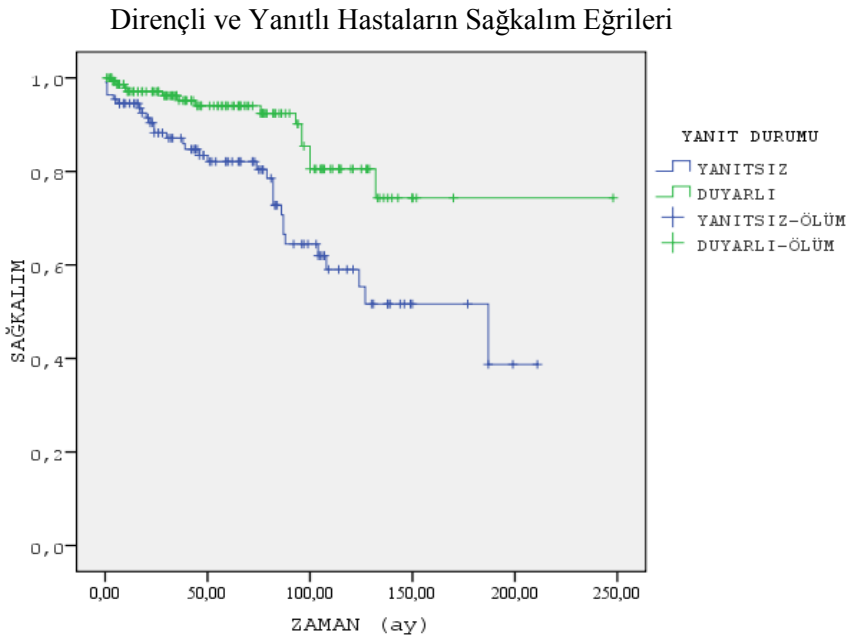
4.10. Hastaların Klinik Ve Laboratuvar Bulguları

Hastalar füzyon tipleri ve yanıt durumlarına göre gruplandırılarak tanı anındaki yaş ortalamaları, ultrasonografi veya bilgisayarlı tomografi aracılığıyla ölçülen karaciğer ve dalak büyüklükleri ortalamaları, beyaz küre sayısı, hemoglobin, hematokrit, trombosit, sedim, LDH ve β_2 mikroglobulin düzeyleri ortalamaları karşılaştırıldı.

4.10.1. Dirençli ve Yanıtlı Hastaların Karşılaştırılması

Yanıtlı gruptaki 151 hasta ile dirençli gruptaki 110 hasta karşılaştırıldığında iki grup arasında dalak büyüklüğü, beyaz küre sayısı, hemoglobin, hematokrit ve β_2 mikroglobulin düzeyleri ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. İlk tanı yaşı, karaciğer büyüklüğü, trombosit düzeyi, sedim, LDH açısından istatistiksel bir fark bulunmamıştır.

Dirençli grupta dalak daha büyük, beyaz küre daha yüksek, hemoglobin ve hematokrit daha düşük, β_2 mikroglobulin daha yüksek saptanmıştır. Sağkalım açısından değerlendirildiğinde dirençli grup istatistiksel olarak önemli şekilde daha kısa sağkalıma sahipti ($p<0.05$)



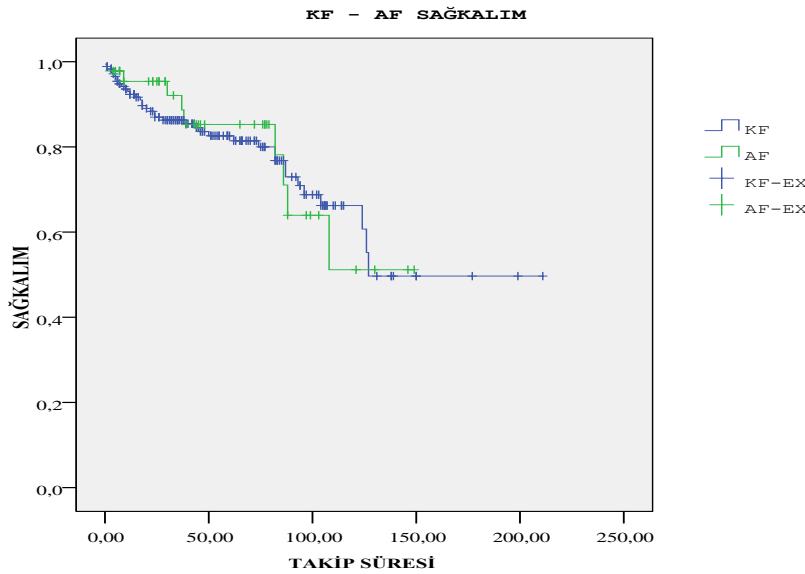
Şekil-21 Hastaların Yanıt Durumuna Göre Sağkalım Eğrisi *Log rank $p=0,001$

Tablo-34 Dirençli ve Yanıtlı Hastaların Klinik-Laboratuvar Bulguları Karşılaştırılması

	DİRENÇLİ	YANITLI	P değeri
İlk Tanı Yaşı (Yıl)	50±18,5	53±16.2	0.1
Karaciğer (mm)	181.2±25.9	178.7±25	0.6
Dalak (mm)	181.8±61.1	153±41.2	0.01
Beyaz Küre (x10 ⁹ /L)	153.2±136	104.3±85.9	0.01
Hemoglobin (g/dL)	10.7±2.1	11.5±2.1	0.007
Hematokrit (%)	32.2±6.2	35.4±6.2	0.000
Trombosit (/dL)	430,153±322,002	497,983±353,318	0.06
Sedim (mm/saat)	28.8±27,1	20.2±21.9	0.1
LDH (U/L)	987.6±586.6	903.8±647.7	0.08
B2M (ng/mL)	3,040.1±1,513.7	2,581.5±914	0.02
Sağkalım (ay)	139.5	206.6	0.001
SAYI	110	151	

4.10.2. Klasik Füzyonlu ve Atipik Füzyonlu Hastaların Karşılaştırılması

Klasik füzyonlu hastalar (163 hasta) ile atipik füzyonlu hastalar (44 hasta) karşılaştırıldığında sadece ilk tanı yaşları açısından anlamlı bir farklılık saptandı. Atipik füzyonlu hastaların ilk tanı yaşı ortalaması daha erken yaşlarda idi.



Şekil-22 FISH Füzyon Tipine Göre Sağkalım Eğrisi

Tablo-35 KF ve AF Hastaların Klinik-Laboratuvar Bulguları Karşılaştırması

	KF	AF	P
İlk Tanı Yaşı (Yıl)	53.5±17.6	47.7±15.1	0.03
Karaciğer (mm)	179.3±17.6	178.3±23.4	0.7
Dalak (mm)	159.6±48.8	169.2±36.4	0.9
Beyaz Küre (x10 ⁹ /L)	102.4±99	127.8±78	0.3
Hemoglobin (g/dL)	11.1±2.4	11.1±1.9	0.8
Hematokrit (%)	33.9±8.1	33.6±4.8	0.8
Trombosit (/dL)	444,973±296,785	353,846±213,918	0.1
Sedim (mm/saat)	26.7±26.2	27.7±24.6	0.9
LDH (U/L)	883.2±653.1	935.3±556.1	0.3
B2M (ng/mL)	3,008.9±1,656	2,294.2±565.3	0.4
Sağkalım (ay)	154.3	117.4	0.9
SAYI	163	44	

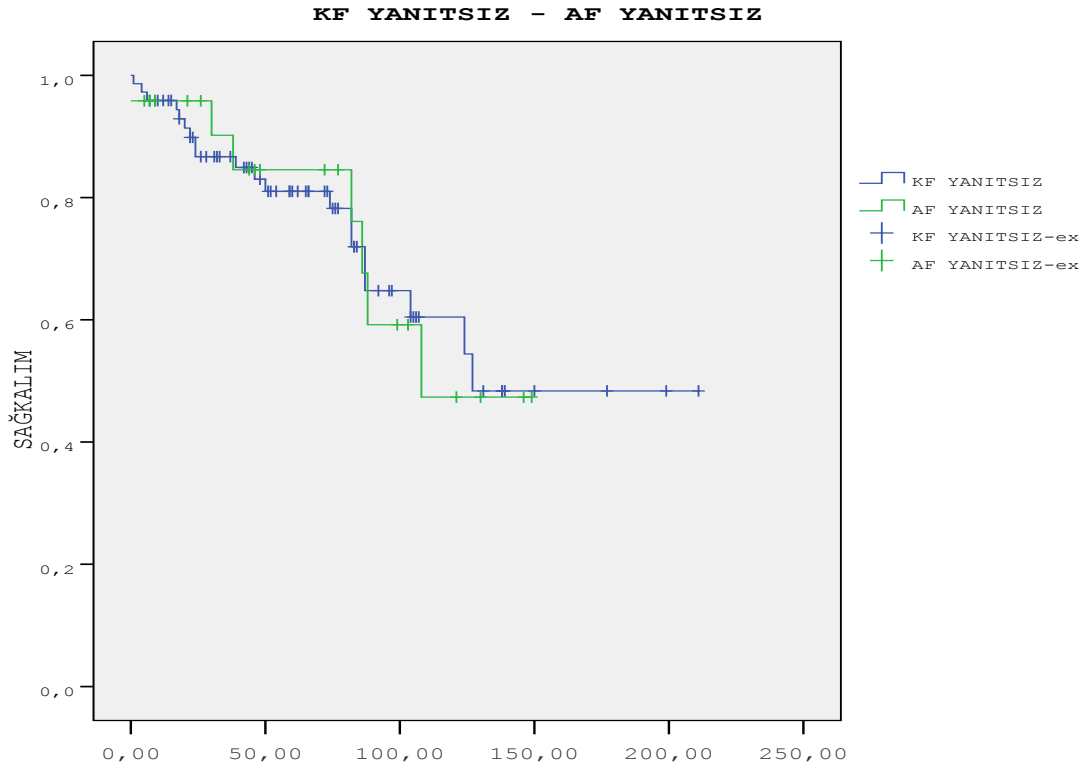
4.10.3. Dirençli Hasta Grubundaki Klasik Füzyonlu Hastalar İle Dirençli Hasta Grubundaki Atipik Füzyonlu Hastaların Karşılaştırılması

Dirençli gruptaki atipik füzyonlu 24 hasta ile dirençli gruptaki klasik füzyonlu 73 hasta karşılaştırıldığında incelenen parametreler açısından anlamlı bir fark saptanmadı. 1. gruptaki 24 hastanın 7(%29)'si, 2. gruptaki 73 hastanın 20(%27)'si *excitus* olmuştu (Tablo-33).

Tablo-36 Dirençli KF'lu Hastalar ile Dirençli AF'lu Hastaların Sağlık Durumlarının Karşılaştırılması

	KF DİRENÇLİ	AF DİRENÇLİ	
SAĞ	53	17	70
EX	20 (%27.4)	7 (%29.2)	27
	73	24	97

p>,05

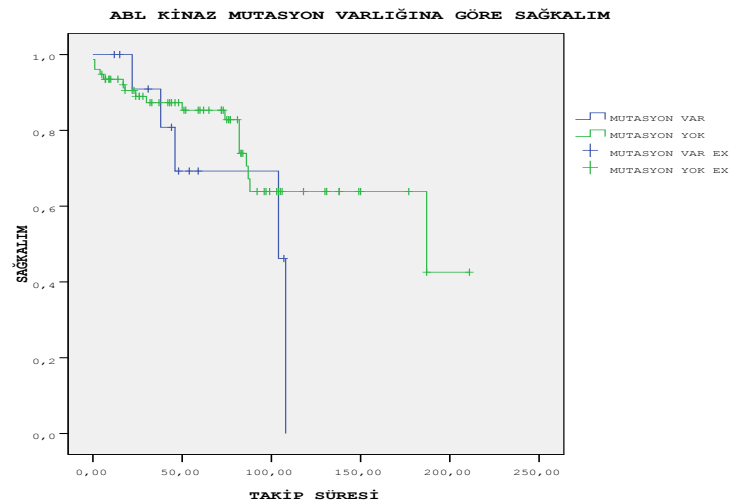


Tablo-37 Dirençli KF'lu Hastalarla Dirençli AF'lu Hastaların Klinik-Laboratuvar Bulguları Karşılaştırması

	YANITSIZ KF	YANITSIZ AF	P
İlk Tanı Yaşı (Yıl)	51.1	46.1	0.2
Karaciğer (mm)	184.6±25.3	174.6±25.8	0.3
Dalak (mm)	192.9±69.4	162.5±29.1	0.3
Beyaz Küre (x10 ⁹ /L)	157.6±143	154.6±125	0.8
Hemoglobin (g/dL)	10.6±2.1	10.9±2	0.5
Hematokrit (%)	32.1±6.4	32.7±5.6	0.6
Trombosit (/dL)	458,000±350,280	357,167±220,276	0.3
Sedim (mm/saat)	27.6±27.6	32.6±26.5	0.4
LDH (U/L)	1,029.5±634.7	849.3±442	0.4
B2M (ng/mL)	3,107.1±1,568.2	2,742.5±1,289.6	0.2
Sağkalım (ay)	139.8	108.8	0.9
SAYI	73	24	

4.10.4 Dirençli Hasta Grubunda ABL Kinaz Bölge Mutasyonu Saptanan Hastalarla Saptanmayan Hastaların Karşılaştırılması

Dirençli hasta grubundaki 110 hastadan ABL kinaz bölge mutasyon analiz sonuçlarına ulaşılabilen 90 hastadan mutasyonu olan 13 hasta ile mutasyon saptanmayan 77 hastanın tanı anındaki klinik ve laboratuvar sonuçları karşılaştırıldığında arada istatistiksel bir fark saptanmadı.



Şekil-25 Hastaların Mutasyon Durumuna Göre Sağkalım Eğrisi log rank p=0.1

Tablo-42 Dirençli Hastalardan Mutasyon Saptananlar ile Saptanmayanların Klinik-Laboratuvar Bulgularının Karşılaştırılması

	MUTASYON OLANLAR	MUTASYON OLMAYANLAR	P
İlk Tanı Yaşı (Yıl)	53.4	49.2	0.4
Karaciğer (mm)	169.3±11.1	185.5±29.1	0.1
Dalak (mm)	190±59.9	187.7±65.3	0.7
Beyaz Küre (x10 ⁹ /L)	109.2±84.4	165.2±140.4	0.2
Hemoglobin (g/dL)	10.5±1.9	10.5±2	0.8
Hematokrit (%)	32.6±5.2	31.7±6.1	0.6
Trombosit (/dL)	404,454±293,393	434,571±336,036	0.7
Sedim (mm/saat)	32.2±25.1	30.3±28.9	0.6
LDH (U/L)	827.5±433.5	1,011.4±606.1	0.4
B2M (ng/mL)	2,370.1±1,052.5	3,033.8±1,002.6	0.07
Sağkalım (ay)	85	150.1	0,1
SAYI	13	77	

TARTIŞMA

KML tedavisinde 2002 yılında FDA onayı almış olan ilk tirozin kinaz inhibitörü olan İmatinib'in klinik kullanıma girmesi ile hastaların yaşam süresi önemli şekilde uzamıştır. Ancak olguların bir kısmında imatinibe hiç yanıt alınamamış semptomlar devam etmiştir. Yine bir grup hastada ise imatinibe yanıt alındıktan ve BCR-ABL füzyonu kaybolduktan bir süre sonra tekrar malign hücrelerin ortaya çıktığı gözlenmiştir. Dirençlilik durumu yeni ilaçların keşfine kapı aralamış ve 2. ve 3. kuşak tirozin kinaz inhibitörleri geliştirilmiş ve daha iyi yanıtlar alınmıştır.

IRIS çalışmasında 8 yıllık takip sonucunda imatinib kullanan hastaların %16'sı tedaviyi yetersiz hale geldiği için bırakmıştır (33). DASISION çalışmasında 5 yıllık imatinib kullanımında majör moleküler direnç oranını %36 olarak bulunmuştur(49). Biz de yaptığımız çalışmada 287 hastanın takipleri olan 261'inin 110 (%42)'unu ilaca dirençli bulduk. Tüm hastaları değerlendirdiğimizde ise 287 hastanın 110(%38)'u dirençli idi Çalışmamız DASISION (2016) çalışması ile uyumlu idi.

Şahin ve ark (2013) tarafından Türk hastalar üzerinde yapılan çokmerkezli bir çalışmada 1133 KML hastası incelenmiştir (105). Bu çalışmadaki tanı anındaki ortalanca yaş (46.1±14.8) ve kadın:erkek oranı (50.7:49.3) çalışmamızla uyumluydu. Bu çalışmada hastaların %36.2'si imatinibe dirençli idi ve bu oran bizim çalışmamızdaki oranlarla benzerdi. Hastaların %7.6'sı *excitus* olmuştu ve ortalanca sağkalım süresi 218 aydı. Çalışmamızda *excitus* oranı daha yüksek (%17.2) ve ortalanca sağkalım süresi (177.5 ay) daha kısaydı.

KML'nin tanı anındaki prognozunu belirlemek için pek çok çalışma yapılmıştır. Tanı yaşı, dalak büyüklüğü, trombosit sayısı, blast oranı, eozinofil, bazofil yüzdeleri ve sitogenetik değişiklikler prognozu belirlemede kullanılan skorlamalarda önemli yer tutmuştur.

Biz de yanıt durumuna göz önüne alarak oluşturduğumuz 3 gruptaki hastaların bu değerlerini karşılaştırdık. Yanıtsız gruptaki 110 hasta ile yanıtli gruptaki 151 hastayı karşılaştırdığımızda dirençli grupta dalak büyüklüğü, beyaz küre sayısı, hemoglobin düzeyleri ve β_2 mikroglobulin ortalamalarını istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı bulduk. Dirençli grupta dalak daha büyük, beyaz küre sayısı daha fazla, hemoglobin

daha düşük, β_2 mikroglobulin daha yüksek saptandı. Trombosit düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da dirençli grupta bariz şekilde düşük gözlemlendi. Yine LDH düzeyleri gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmasa da dirençli grupta daha yüksekti. İlk tanı yaşları, karaciğer büyüklükleri ve sedim düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Dirençli hastaların mortalite oranları da yanıtli hastalardan istatistiksel olarak farklı saptandı. Bu durum literatürle uyumlu idi(50-52).

KML hastalarının %10-15'inde derive 9. kromozomun kırık bölgesinin bitişiğindeki bölgede 0,5-8 Mb büyüklüğünde delesyonlar saptanmıştır. Bu delesyonların büyük kısmı FISH probları ile saptanabilecek (Atipik füzyonlar) düzeylerde olup şimdiye dek bu derivatif yapının prognostik önemi ile ilgili çalışmalar yapılmış ve birbiriyle çelişen sonuçlar elde edilmiştir.

Literatürde FISH analizinde saptanabilecek atipik füzyon paternleri sıklığı çalışmalar arasında kullanılan yöntem ve FISH prob özelliklerine göre %9.2 ila %28.5 arasında değişmektedir. Bizim oranımız da (%20) bu aralık içerisinde bulunmaktaydı.

Atipik füzyon paternleri ile klasik füzyon paternleri arasında prognostik bir etkinin bulunup bulunmadığı ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Atipik füzyon grubu içinde bulunan der9q delesyonlu hastaların delesyon olmayan hastalara göre α -interferon'a daha fazla oranda dirençli oldukları gösterilmiştir(53). Sonraki çalışmalarda der9q delesyonlu hastaların sağkalım süresi anlamlı şekilde kısa bulunmuştur. Ayrıca tanı yaşı 9. kromozom delesyonları varlığında daha ileri, dalak büyüklüğü daha az, beyaz küre sayısı daha yüksek, hemoglobin miktarı ve trombosit sayısı daha düşük bulunmuştur (54).

Tablo-43 Çalışmamızdaki Atipik Füzyon Sıklıklarının Literatür ile Karşılaştırılması

	FGR	FGGR	FGRR	FGRR	FFFGR	
Çalışmamız	23 (%10.2)	10(%4.5)	8(%3.6)	2(%0.8)	3(%1.3)	46/224 %20.5
Sinclair (54)	14 (%25)	2(%3.5)	-	-	-	16/56 %28.5
Storlazzi (55)	6 (%8.5)	2 (%2.7)	1(%1.4)	1 (%1.4)	-	10/71 %14
Huntly (56)	30(%12)	7(%2)	-	2(%0,07)	-	39/253 %15
Kolomietz (57)	23 (%9.2)	-	-	-	-	23/250 %9.2
TH Lim (58)	10(%10,4)	3(%3,1)	9 (%9,4)	2(%2,1)	3(%3,1)	27/96 %28.1
Huntly (59)	28(%7,2)	12(%3)	*	5(%1,2)	-	59/391 %15
Primo (60)	11 (%8.1)	2 (%1.5)			3 (%2.2)	16/135 %11.8
Jain P (61)	%11	%4	%1	%2.5	%6.5	%25

Tirozin kinaz inhibitörleri öncesi dönemde takip edilen hastalar üzerinde yapılan çalışmalardan Huntly ve ark.(2001), Kolomietz ve ark(2001) ve Storlazzi ve ark.(2002)'nin çalışmaları bu sonuçları desteklemiştir. Huntly benzer veriler elde etse de sadece trombosit sayısının istatistiksel olarak farklı bulmuştur (54-57).

İmatinib öncesi konvansiyonel kemoterapi ve interferon- α kullanılan hastalarda yapılan çalışmalarda delesyonlar kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. [Sinclair PB (2000), Huntly BJ(2001), Kolomietz E(2001), Cohen N(2001) Storlazzi(2002)]. Bu dönemde sadece tek bir çalışma yanıt ve sağkalım açısından bir fark saptamamıştır. [Yoong Y(2005)][62]

İmatinib ile tedavi edilen hastalarda yapılan çalışmalardan olan Huntly ve ark.'nın 2003'te yaptığı çalışmada FISH analizi ile delesyon saptanan grupla saptanmayan grup karşılaştırılmış önceki tedaviler ile yapılan çalışmaların aksine sağkalım ve tanı anındaki beyaz küre, hemoglobin ve trombosit sayıları açısından bir fark saptanmamıştır. Ancak delesyonlu grupta THY, MSY anlamlı olarak düşük bulunmuştur(59). Lee ve ark. ABL delesyonlarında progresyonsuz sağkalımı

istatistiksel olarak farklı ve kısa bulmuştur(63). Sonraki çalışmalar (Quintas-Cardama ve ark. (2005)(64), Yoong ve ark.(2005)(62), Fourouclas ve ark. (2006)(65), Kim ve ark.(2008)(66)) önceki çalışmaların aksine delesyonlu ve delesyonsuz grup arasında sağkalım ve remiyon açısından fark bulamamıştır. Yoong ve ark.(2005) delesyon 9q hastalarında beyaz küre sayısını anlamlı şekilde yüksek bulmuştur(62).

2010 yılında yayınlanan GIMEMA CML Working Party analiz sonuçlarına göre imatinible tedavi edilen hastalarda delesyon 9q'nun prognoz üzerine herhangi bir etkisi gösterilememiştir. Ancak delesyon olan hastaların yaşı anlamlı şekilde daha küçük saptanmıştır(34).

Fourouclas ve ark. (2006) delesyonun büyüklüğü ile prognoz arasında ilişki olup olmadığını araştırmış ve büyük delesyonu olan hasta grubunu daha küçük delesyonlu hasta grubuna göre sağkalım açısından farklı bulmuştur(65). Ancak biz bu konuda bir çalışma yapmadığımız için bu açıdan yorum yapamadık.

Kim ve ark.(2008) 9q delesyonlu hastaların ABL kinaz bölge mutasyonlarına bakmış ve delesyonlu grubun %5'inde mutasyon saptarken delesyonsuz grupta %13 mutasyon saptamıştır(66). Bizim çalışmamızda atipik füzyon saptanan ve dirençli olan 24 hastanın sonuçlarına ulaşılabilen 22'sinin 4'ünde mutasyon saptandı. Atipik füzyon grubundaki bu 22 hastanın 11'i Kim ve ark'nın çalışmasındaki del der(9) ile uyumlu idi ve bu 11 hastanın 1'inde mutasyon saptanmıştı. Yanıtlı olan atipik füzyonlu 22 hastadan sonuçlarına ulaşılabilen 18 hastanın hiçbirinde mutasyon saptanmadı. Bizim çalışmamız bu açıdan bu çalışma ile benzerdi.

Varyant translokasyonlar 9 ve 22'ye ek olarak bir veya daha fazla kromozomun tutulumu ile ilişkilidir ve KML hastalarında %2-10 arasında rapor edilmiştir. Varyant Ph basit ve kompleks formda olabilir. Basit formunda 22q11 ve başka bir kırık noktası arasında bir translokasyon oluşurken kompleks formunda 22q11, 9q34 ve en az bir tane başka kırık noktası olaya katılmıştır(68). FISH analizindeki FGGR kompleks varyant translokasyonları temsil etmektedir. INF- α ile tedavi edilen olgularda kötü prognozla ilişkilendirilmiştir(69). El-Zimaity ve ark (2004) varyant translokasyon taşıyan hastaların imatinib kullanımı ile beraber varyant olmayan translokasyon taşıyan hastalarla benzer ilaç yanıtı oranları, cevap süreleri ve sağkalım süreleri gösterdiğini bulmuştur. Yine bu iki grup arasında beyaz küre ve trombosit

sayıları ile hemoglobin düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulamamışlardır(70). Pek çok başka çalışma varyant translokasyonlu hastaların prognostik olarak farklı olmadıklarını göstermiştir(68,71-76). Ancak kimi çalışmalarda ise variant translokasyon kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (77-79).

Biz de atipik füzyon oranını %20.5 (46/224) bulduk. BCR ve ABL delesyonlarını temsil eden FGR olan 23 hastanın oranını %10.2 (23/224), derive 9'daki ABL delesyonlarını temsil eden FGGR'li 10 hastanın oranını (10/224) %4.5 bulduk. Bu da literatürdeki oranlarla uyumlu idi.

Çalışmamızda atipik füzyon grubundaki hastaların ilk tanı yaşları istatistiksel olarak anlamlı biçimde daha küçüktü. Bu literatürdeki Kolomietz'in 2001'deki(57) ve Gimema CML Çalışma grubunun 2010'daki yayınındaki(34) bulgularla uyumluydu.

Çalışmamızda iki grup arasında yanıt ve sağkalım açısından fark saptanmadı. Bu da imatinib kullanılan hastalarla yapılan çalışmalar olan Quintas-Qardama(2005)(64), Kim (2008)(66), Gimema CML Çalışma grubunun 2010'daki çalışma bulguları(34) ile uyumlu idi.

Literatürde tirozin kinaz böge mutasyonlarının sıklığı ve prognozu üzerinde çok çalışılan konulardan birisidir. Bu amaçla pek çok farklı metod geliştirilmiş ve bu farklı metodlar kullanılarak çalışmalar yapılmıştır. Bunlardan en yaygın kullanılanı sanger dizilemedir. Daha az sıklıkta DHPLC ve çok az sayıda çalışmada bizim kullandığımız pyrosekanslama yapılmıştır. Her bir metodun birbirine üstünlük ve dezavantajları mevcuttur.

Tablo-44 ABL Kinaz Bölge Mutasyonları Sıklığının Literatürle Karşılaştırılması

ÇALIŞMA	Y253F	Y253H	E255K	E255V	V299L	T315I	T315A	F317L	F317V	F359V	F359C	TOPLAM
Çalışmamız	0	2.2	1.1	0	1.1	8.9	0	1.1	0	0	0	14.4
Branford (80)	1.4	0	3.5	0.7	0	1.4	0	1.4	0	1.4	0	9.8
Soverini (46)	5.7		7		0	5	0	0.6	0	4.7	0	23
Jabbour (81)	0	2.3	0	1.2	0.6	1.7	0	4	0	0.6	1.2	11.6
Cortes (82)	0.5	1.4	1.4	0	0	4.6	0	3.2	0	0.5	1.4	13
Khorashad (83)*	0.3	0.6	0	0.3	0	0.6	0	0.3	0	0.9	0	3
Ang (84)	7.4		13.8		0	4.2	0	2.1	2.1	3		32.6
Kim(85)	2.7	7.2	8.1	4.5	0	17.1	0	2.7	0	2.7		45
Markose(86)	4		4		0	5.2	0	1.3	0	0	0	14.5
Qin(87)	0	8	4.7		0	5.5	0	0.8	0	5.5		24.5
Bengio (88)	0	2.6	1.6	1.9	0	2.6	0	0	0	0.6	1.2	10.5
Meggyesi(89)	0	1.3	0	3	0	5.4	0	0	0	2.7	0	12.4
Wongboonma(90)*	0	3.5	1.7	0.6	0	6.4	0	0	0	1.2	0	13.4
Elias (91)	0	0.8	3.2	0	0	7.2	0	0	0	0	1.6	12.8
Hughes (92)*	0	0.3	0.9		0.9	3.3	0	0.9	0	1.5		7.8
Shantashri (93)	2.1	6.4	0	1.1	0	4.3	0	1.1	0	1.1	0	16.1
Patkar (94)	0.2	3.6	2.1	0.5	0.2	7.2	0	2.6	0	0.8	0.3	17.5
Ursan (95)	0.5	0.5	1.3	0.2	0.08	1.2	0	0.3	0	0.9	0.0	5.1
mycancergenome	0.6	2	2.3	0.3	0.1	6.3	0	1.8	0.03	1.6	0.3	15.4

*Direnç durumuna bakılmaksızın yapılan çalışmalar

Literatürde mutasyonlar açısından seçim kriterlerine ve kullanılan yöntem ve bağlı olarak mutasyon bulma oranını %10.3 ila %63 arasında saptanmıştır. Branford ve ark.(2003) direnç durumuna bakılmaksızın sanger dizileme ile %18.7 hastada mutasyon saptamıştır(80). Direnç durumuna bakılmadan sanger ile yapılan farklı iki çalışmada mutasyon oranları %11.6 ile %10.3 bulunmuştur. Yine direnç durumuna bakılmadan DHPLC ve sanger ile yapılan bir çalışmada bu oran %21.6 bulunmuştur.

Dirençli hastalar üzerinde sanger ile yapılan çalışmalarda ise %22.4 ila %63 arasında çok farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Tablo-45 ABL Kinaz Bölge Mutasyonu Analiz Çalışmalarındaki Mutasyon Saptama Oranının Hasta Seçimi ve Kullanılan Yönteme Göre Analizi

	Yöntem	Hasta seçimi	Mutasyonlu hasta yüzdeleri
Çalışmamız	Pyrosekans	Dirençli	%14.4
Branford (80)	Sanger	Yanıtlı-dirençli	18.7
Soverini (46)	DHPLC	Dirençli KML-ALL	43
Jabbour (81)	Sanger	Dirençli	36
Cortes (82)	Sanger	Dirençli	26
Khorashad (83)	Sanger	Yanıtlı-dirençli	11.6
Ang (84)	Sanger	Dirençli	44.6
Kim (85)	Sanger-ASO	Dirençli	63
Markose (86)	Sanger	Dirençli	34
Qin (87)	Sanger	Dirençli	63
Bengio (88)	Sanger	Dirençli	23.4
Meggyesi (89)	Sanger	Dirençli	36
Wongboonma (90)	DHPLC-sanger	Yanıtlı-dirençli	21.6
Elias (91)	DHPLC-sanger	Dirençli	22.4
Hughes (92)	Sanger	Yanıtlı-dirençli	10.3
Shantashri (93)	Sanger	Dirençli	43.6
Patkar (94)	Sanger	Dirençli	29.6

Bizim baktığımız mutasyonlar açısından değerlendirirsek direnç durumuna bakılmaksızın yapılan çalışmalarda mutasyon oranları %3-13.4 arasında bulunmuştur. Dirençli olgular üzerinde yapılan çalışmalarda ise %10.5-45 arasında oldukça değişken oranlarda saptanmıştır. Ancak çalışmaların çoğunda bu oranlar %10-20 arasında idi. Databazlardan mycancergenome verilerine göre bizim baktığımız mutasyonların sıklığı %15.4'tür. Biz de imatinib dirençli olgularda pyrosekasnlama ile mutasyon sıklığını %14.4 olarak saptadık.

T315I literatürde dirençli olgularda %1.2-17.1 gibi çok değişken bir aralıkta saptanmıştır. Databazlarda ise sıklığı %6.3'tir. Biz de çalışmamızda bu oranı %8.9 olarak bulduk. T315I mutasyonu imatinib, nilotinib ve dasatinibe dirençle karakterizedir (96-97). Ancak ponatinib kullanımı ile bu direnç yenilebilmektedir (98). Çalışmamızda T315I saptanan 8 hastanın 3(%37.5)'ü blastik fazda 5'i kronik fazda idi. Kronik faz hastaların 3'ünde primer direnç, 2'sinde sekonder direnç saptanmıştı. Bütün hastalarımız imatinibe dirençli grupta idi. T315I mutasyonu taşıyan hastaların FISH analizlerinde 8 hastanın 5(%62.5)'inde klasik füzyon paternleri 3(%37.5)'ünde atipik füzyon paternleri saptandı. Atipik füzyon paternlerinin 1'i kompleks translokasyonları düşündüren FGGRR paterni, 2'si ise BCR ve ABL delesyonlarını gösteren FGR paternlerinde idi.

Hastalarımızda saptanan Y253H ve E255K nilotinibe karşı, V299L ve F317L dasatinibe karşı dirençle ilişkilendirilmiştir.

Hughes ve ark nilotinib ile yaptıkları çalışmada Y253H taşıyan hastalarda THY, TSY ve MMY elde edememişlerdir. Aynı çalışmada E255K saptanan hastalarda THY oranı %71, MSY oranı %43, MMY oranı %14 olarak saptanmış TSY hiçbir hastada elde edilememiştir(99). Soverini 2009'daki çalışmasında Y253H ve E255K saptadıkları hastaların nilotinibe yanıt vermediklerini raporlamışlardır(100).

Müller ve ark dasatinibe yaptıkları çalışmada E255K mutasyonu taşıyan hastaların TSY oranını %38, MSY oranını %56, THY oranını %88 olarak bulmuşlardır. Yine aynı çalışmada Y253H taşıyan hastalarda oranlar sırasıyla %61, %65 ve %87 bulunmuştur. F317L taşıyan hastalarda ise %7, %14 ve %93 saptanmıştır. T315 taşıyan hastalarda ise hiçbirinde TSY elde edilememiş MSY ve THY oranları sırasıyla %10 ve %29 oranlarında saptanmıştır (101).

Y253H mutasyonu saptadığımız 2 hastamız vardı ve mutasyon sıklığı %2.2 olarak saptandı. İki hastamız da nilotinibe dirençli saptanmıştı. Bu bulgular literatürle uyumluydu.

1 hastamızda E255K saptamıştık. Biz çalışmamızda dirençli hastalarda E255K oranını %1.1 bulduk. Mutasyon oranı çalışmalar arasında %0 ile %8.1 arasında değişmekteydi. Hastamız blastik fazda başvurmuş, bu nedenle mutasyon analizine

alınmıştı. İlk tanı yaşı 52.8 yıl idi. Yaş ortalaması genel KML popülasyonu(52.5yıl) benzerdi. 2.2 ay imatinib tedavisi ardından hastamız pre-B ALL dönüşüm olarak kabul edilmiş dasatinib ve ALL kemoterapisi başlanmıştı. Hastamız tedavi görürken 3.7 ay sonra *excitus* olmuştu. Literatürde E255K taşıyan hastalarda dasatinibe yanıt oranı %70 olarak saptanmıştır.

Müller ve ark'nın F317L mutant hastalarda dasatinibe yaptıkları çalışmada TSY, MSY ve THY'ı %7, %14 ve %93 saptanmıştır. Hastalar dasatinibe dirençli iken nilotinibe duyarlıdır(102).

1 hastamızda F317L saptamıştık. Mutasyon sıklığı literatürde 0 ile %3.2 arasında değişmekteydi. Bizim oranımız da bu sınırlar içindeydi. Hastamızda literatürle uyumlu biçimde imatinib ve dasatinibe yanıtızlık mevcuttu.

V299L imatinibe ve dasatinibe dirençli nilotinibe duyarlıdır(103). Çalışmada imatinib direnci sonrasında nilotinibe geçilmiş 125 hastanın hepsine yanıt alınmışken, dasatinibe geçilmiş 170 hastanın %5'inde yanıtızlık gelişmişti (104).

1 hastamızda V299L saptadık. Literatürde nadir görülen bir mutasyon olup sıklığı %0 ile %0.6 arasında değişmekteydi. Bizim mutasyon sıklığımız (%1.1) literatürden yüksekti. İmatinibe sekonder direnç gelişmiş blastik faza dönüşüm olmuş dasatinibe yanıt alınamıştı. Bu açıdan literatürle uyumlu idi.

Kısaca bu çalışma bölgemiz KML popülasyonunda ilaca dirençli olduğu öngörülen grupta taradığımız 12 mutasyon sıklığının %14.4 oranında olduğunu gösterdi. Oranın genel literatürden daha düşük oluşunun kullanılan protokole bağlanabileceği ya da bölgesel ve etnik farklılıklardan da kaynaklanabileceği düşünüldü. Atipik FISH paternlerinin dirençli grubu saptamada istatistiksel olmayan zayıf bir katkısı olduğu görüldü ancak hasta sayısının azlığının bunda rolü olabileceği tartışıldı. Mutasyonlardan en sık görülen T315I'nın 3/8'i blastik faz hastası idi. Bu da blastik faz ilişkisinin güçlü olduğunu ve tanı anında saptanması durumunda kötü prognoz için prediktif olabileceğini akla getirmekte idi.

Türkiyede konusunda bugün için en geniş hasta popülasyonu yansıtan çalışmamızın, KML'li hastalarımızın denetimini güçlendireceği ve tedavi şansını artıracığı inancındayız.



6. SONUÇLAR

1. KML tanılı 144 erkek, 143 kadın toplam 287 hasta değerlendirildi. Hastaların tanı anındaki yaşları ortalaması 52.5 ± 17.3 yıl idi.
2. Takiplerine ulaşılabilen 261 hastada imatinib tedavisine yanıtızlık oranı %42.2 olarak saptandı.
3. Tanı anındaki FISH BCR-ABL sonuçlarına ulaşılabilen 224 hastanın %79.5'inde KF paterni, %20.5'inde AF paternleri saptandı.
4. AF paternleri incelendiğinde %45.7 FGR, %21.7 FGGR, %17.4 FGRR, %6.5 FFFGR, %4.3 FFGGR, %4.3 FGRR saptandı.
5. AF paterni saptanan hastaların tanı yaşı ortalaması 47.7 yıl, KF paterni saptanan hastalarından 53.5 yıl anlamlı şekilde daha erkendi ($p=0.03$).
6. FISH'te AF görülmesinin direnç ve *excitus* oranlarını belirlemede özgün bir katkısı görülmedi. Tüm Grubun direnç oranı AF grubu ile kıyaslandığında AF Lehine %11 artış görülmektedir. Ancak fark istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır. Bu sonuçta hasta sayısı kısıtlılığının etkisi olabilir.
7. Hastaların %17.2'si *excitus* oldu. Erkek hastaların *excitus* oranları kadın hastalarından istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti (%23.6 vs %11.2, $p<0.05$).
8. Yanıtız hastaların *excitus* oranları yanıtılı hastalarından anlamlı şekilde yüksekti (%28.1 vs %9.3).
9. AF paterni olan hastalarla KF paterni olan hastaların *excitus* oranları arasında anlamlı fark yoktu (%15.9 vs %17.2, $p>0.05$).
10. Ortalama sağkalım süreleri açısından dirençli ve yanıtılı grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı (139.5 ay vs 206.6 ay, $p<0.01$).
11. Ortalama sağkalım süreleri açısından AF ve KF'lu hastalar arasında istatistiksel fark saptanmadı. (117.4 ay vs 154.3 ay, $p>0.05$).

12. Dirençli hastaların 13'ünde (%14.4) ABL kinaz bölge mutasyonları saptandı. 8 hastada T315I, 2 hastada Y253H, 1 hastada E255K, 1 hastada V299L ve 1 hastada F317L saptanmıştır.
13. Dirençli hastalardaki 19 akselere-blastik fazdaki hastanın %36.8'inde mutasyon saptanmışken, 71 kronik fazdaki hastanın 6(%8.4)'sında mutasyon saptanmıştı (p<0.05).
14. Yanıtlı ancak AF'lu hastalarda ABL kinaz bölge mutasyonu saptanmadı.
15. Dirençli hastalarda yanıtlı olanlara göre dalak daha büyük, beyaz küre daha yüksek, hemoglobin daha düşük, β_2 mikroglobulin daha yüksek saptandı. (p<0.05).
16. AF'lu hastalarla KF'lu hastalar karşılaştırıldığında karaciğer ve dalak büyüklüğü, hemogram değerleri, sedim, LDH ve β_2 mikroglobulin açısından anlamlı fark saptanmadı.
17. Dirençli hastalardan KF'lu ve AF'lu olanlar arasında *excitus* oranları açısından anlamlı fark saptanmadı. Bu iki grup arasında bakılan klinik ve laboratuvar parametreler açısından fark saptanmadı.
18. T315I en sık görülen mutasyondur ve T315I saptanan hastalar tüm TKI'ne dirençle karakterize idi.

KAYNAKLAR

1. Kaushansky K, Lichtman M, Prchal J, Levi M.M, Press O, Burns L, Caligiuri M. Williams Hematology, Ninth Edition, 2015;1437-1490
2. Hoffman R, Benz EJ, Silberstein LE, Heslop H, Weitz J, Anastasi J. Hematology, 6th Edition Basic Principles and Practice, Expert Consult Premium Edition, 2013;981-997
3. Siegel R, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. CA Cancer J Clin 2017;00:00–00
4. Ichimaru M, Ichimaru T, Belsky JL: Incidence of leukemia in atomic bomb survivors belonging to a fixed cohort in Hiroshima and Nagasaki 1950–1971. J Radiat Res (Tokyo) 19:262, 1978.
5. Longo DL. Harrison's Hematology and Oncology 2nd Edition, 2013;175-181
6. Björk J, Albin M, Welinder H, et al (2001) Are occupational, hobby, or lifestyle exposures associated with Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia? Occup Environ Med 58(11):722–7
7. Chereda B, Melo JV. Natural course and biology of CML. Ann Hematol (2015) 94(Suppl 2):S107–S121
8. Wang JY. The capable ABL: what is its biological function?. Mol Cell Biol. 2014 Apr;34(7):1188-97.
9. McWhirter JR, Galasso DL, Wang JY. A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. Mol Cell Biol 1993;13:7587–7595
10. Score J, Calasanz MJ, Ottman O, Pane F, Yeh RF, Sobrinho-Simoes MA, Kreil S, Ward D, Hidalgo-Curtis C, Melo JV, Wiemels J, Nadel B, Cross NC, Grand FH (2010) Analysis of genomic breakpoints in p190 and p210 BCR-ABL indicate distinct mechanisms of formation. Leukemia 24(10):1742–1750
11. Saglio G, Pane F, Gottardi E, et al: Consistent amounts of acute leukemia-associated P190BCR/ABL transcripts are expressed by chronic myelogenous leukemia patients at diagnosis. Blood 87:1075, 1996
12. Diekmann D, Brill S, Garrett MD, et al: BCR encodes a GTPase-activating protein for p21rac. Nature 351:400, 1991.
13. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D (1990) Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. Science 247(4944):824–830
14. Goldman JM, Melo JV (2003) Chronic myeloid leukemia—advances in biology and new approaches to treatment. N Engl J Med 349(15):1451–1464

15. Zhao JJ, Cheng H, Jia S, Wang L, Gjoerup OV, Mikami A, Roberts TM (2006) The p110alpha isoform of PI3K is essential for proper growth factor signaling and oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(44):16296–16300
16. Sattler M, Salgia R, Okuda K, Uemura N, Durstin MA, Pisick E, Xu G, Li JL, Prasad KV, Griffin JD (1996) The proto-oncogene product p120CBL and the adaptor proteins CRKL and c-CRK link c-ABL, p190BCR/ABL and p210BCR/ABL to the phosphatidylinositol-3' kinase pathway. *Oncogene* 12(4):839–846
17. Sattler M, Mohi MG, Pride YB, Quinnan LR, Malouf NA, Podar K, Gesbert F, Iwasaki H, Li S, Van Etten RA, Gu H, Griffin JD, Neel BG (2002) Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL. *Cancer Cell* 1(5):479–492
18. Holyoake TL, Vetrie D The chronic myeloid leukemia stem cell: stemming the tide of persistence. *Blood*. 2017;129(12):1595-1606
19. Sheng Z, Ma L, Sun JE, Zhu LJ, Green MR (2011) BCR-ABL suppresses autophagy through ATF5-mediated regulation of mTOR transcription. *Blood* 118(10):2840–2848
20. Hsieh MY, Van Etten RA (2014) IKK-dependent activation of NF kappa B contributes to myeloid and lymphoid leukemogenesis by BCR-ABL1. *Blood* 123(15):2401–2411
21. Klejman A, Schreiner SJ, Nieborowska-Skorska M, Slupianek A, Wilson M, Smithgall TE, Skorski T (2002) The Src family kinase Hck couples BCR/ABL to STAT5 activation in myeloid leukemia cells. *EMBO J* 21(21):5766–5774
22. Hu Y, Liu Y, Pelletier S, Buchdunger E, Warmuth M, Fabbro D, Hallek M, Van Etten RA, Li S (2004) Requirement of Src kinases Lyn, Hck and Fgr for BCR-ABL1-induced B-lymphoblastic leukemia but not chronic myeloid leukemia. *Nat Genet* 36(5):453–461
23. White D, Saunders V, Lyons AB, Branford S, Grigg A, To LB, Hughes T (2005) In vitro sensitivity to imatinib-induced inhibition of ABL kinase activity is predictive of molecular response in patients with de novo CML. *Blood* 106(7):2520–2526
24. Danisz K and Blasiak J: Role of anti-apoptotic pathways activated by BCR/ABL in the resistance of chronic myeloid leukemia cells to tyrosine kinase inhibitors. *Acta Biochim Pol.* 2013;60(4):503-14.
25. Goff DJ, Recart AC, Sadarangani A, et al: A pan-BCL1 inhibitor renders bone marrow resident human leukemia stem cells sensitive to tyrosine kinase inhibition. *Cell Stem Cell* 12:316, 2013
26. Savona M, Talpaz M: Getting to the stem of chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer* 8:341, 2008.

27. Clarkson BD, Strife A, Wisniewski D, et al: New understanding of the pathogenesis of CML: A prototype of early neoplasia. *Leukemia* 11:1404, 1997.
28. Hehlmann R, Heimpel H, Hasford J, et al. Randomized comparison of interferon-alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. The German CML Study Group. *Blood* 1994;84:4064–4077.
29. Guilhot F, Chastang C, Michallet M, et al. Interferon alfa-2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia. French Chronic Myeloid Leukemia Study Group. *N Engl J Med* 1997;337:223–229.
30. Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, et al. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;295:139–145.
31. Corbin AS, Agarwal A, Loriaux M, et al. Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *J Clin Invest.* 2011;121:396–409
32. O'Brien, S., Guilhot, F., Larson, R., Gathmann, I., Baccarani, M., Cervantes, F. et al. (2003) Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 348: 994–1004.
33. Deininger, M., O'Brien, S., Guilhot, F., Goldman, J. and Hochhaus, A. Hughes, T. et al. (2009) International Randomized Study of Interferon Vs STI571 (IRIS) 8-year follow up: sustained survival and low risk for progression or events in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) treated with imatinib. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 114: 1126.
34. Castagnetti F, Testoni N, Luati S, et al: Deletions of the derivative chromosome 9 do not influence the response and the outcome of chronic myeloid leukemia in early chronic phase treated with imatinib mesylate: GIMEMA CML working party analysis. *J Clin Oncol* 28:2743, 2010
35. Redaelli, S., Piazza, R., Rostagno, R., Magistrini, V., Perini, P., Marega, M. et al. (2009) Activity of bosutinib, dasatinib, and nilotinib against 18 imatinib resistant BCR/ABL mutants. *J Clin Oncol* 27: 469–471.
36. Cortes JE, Kim DW, Kantarjian HM et al. Bosutinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: results from the BELA trial. *J Clin Oncol.* 2012; 30:3486-92.
37. Nazha A, Kantarjian H, Cortes J & Quintana's-Cardama A. Omacetaxine mepesuccinate (synribo) - newly launched in chronic myeloid leukemia. *Expert Opin. Pharmacother.* (2013) 14(14):1977-1986
38. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood.* 2013;122:872-884.

39. Jabbour E, Cortes J, Santos FP, et al. Results of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for chronic myelogenous leukemia patients who failed tyrosine kinase inhibitors after developing BCR-ABL1 kinase domain mutations. *Blood*. 2011;117:3641-3647.
40. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology Chronic Myeloid Leukemia. v.2.2017. Available at: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF
41. Quintás-Cardama A1, Kantarjian HM, Cortes JE. Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer Control*. 2009 Apr;16(2):122-31.
42. Jabbour EJ, Cortes JE, Kantarjian HM. Resistance to tyrosine kinase inhibition therapy for chronic myelogenous leukemia: a clinical perspective and emerging treatment options. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2013 Oct;13(5):515-29. doi: 10.1016/j.cml.2013.03.018. Epub 2013 Jul 26.
43. Milojkovic D, Apperley J. Mechanisms of resistance to imatinib and second-generation tyrosine inhibitors in chronic myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2009; 15:7519-27.
44. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*. 2001;293:876-880.
45. Soverini S, Hochhaus A et al. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood* First Edition paper, May 11, 2011; DOI 10.1182/blood-2010-12-326405.
46. Soverini S, Colarossi S, Gnani A, et al. Contribution of ABL kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of Philadelphia-positive patients. The GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res* 2006; 12:7374-9.
47. Kaleem B, Shahab S et al. Chronic Myeloid Leukemia - Prognostic Value of Mutations. *Asian Pac J Cancer Prev*, 16 (17), 7415-7423
48. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, 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.
49. Cortes JE, Saglio G, Kantarjian HM, Baccarani M, Mayer J, Boqué C, et al. Final 5-year study results of DASISION: the dasatinib versus imatinib study in treatment-naïve chronic myeloid leukemia patients trial. *J Clin Oncol*. 2016;34:2333-40.
50. Pfirrmann M, Baccarani M, Saussele S, Guilhot J, Cervantes F, Ossenkoppele G, Hoffmann VS, Castagnetti F, Hasford J, Hehlmann R, Simonsson B. Prognosis of

long-term survival considering disease-specific death in patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2016 Jan;30(1):48-56. doi: 10.1038/leu.2015.261. Epub 2015 Sep 29.

51. Kantarjian HM, Smith TL, McCredie KB, Keating MJ, Walters RS, Talpaz M, Hester JP, Bligham G, Gehan E, Freireich EJ. Chronic myelogenous leukemia: a multivariate analysis of the associations of patient characteristics and therapy with survival. *Blood*. 1985 Dec;66(6):1326-35.
52. Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, Tura S, Gomez GA, Robertson JE, Tso CY, Braun TJ, Clarkson BD, Cervantes F, et al. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. *Blood*. 1984 Apr;63(4):789-99. *Cancer Genet Cytogenet*. 2001 Jul 15;128(2):114-9.
53. Cohen N, Rozenfeld-Granot G, Hardan I, Brok-Simoni F, Amariglio N, Rechavi G, Trakhtenbrot L. Subgroup of patients with Philadelphia-positive chronic myelogenous leukemia characterized by a deletion of 9q proximal to ABL gene: expression profiling, resistance to interferon therapy, and poor prognosis.
54. Sinclair PB, Nacheva EP, Leversha M, Telford N, Chang J, Reid A, Bench A, Champion K, Huntly B, Green AR. Large deletions at the t(9;22) breakpoint are common and may identify a poor-prognosis subgroup of patients with chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000 Feb 1;95(3):738-43.
55. Storlazzi CT, Specchia G, Anelli L, Albano F, Pastore D, Zagaria A, Rocchi M, Liso V. Breakpoint characterization of der(9) deletions in chronic myeloid leukemia patients. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002 Nov;35(3):271-6.
56. Huntly BJ, Reid AG, Bench AJ, Campbell LJ, Telford N, Shepherd P, Szer J, Prince HM, Turner P, Grace C, Nacheva EP, Green AR. Deletions of the derivative chromosome 9 occur at the time of the Philadelphia translocation and provide a powerful and independent prognostic indicator in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2001 Sep 15;98(6):1732-8.
57. Kolomietz E, Al-Maghrabi J, Brennan S, Karaskova J, Minkin S, Lipton J, Squire JA. 2001. Primary chromosomal rearrangements of leukemia are frequently accompanied by extensive submicroscopic deletions and may lead to altered prognosis. *Blood* 97:3581–3588.
58. Lim TH, Tien SL, Lim P, Lim AS. The incidence and patterns of BCR/ABL rearrangements in chronic myeloid leukaemia (CML) using fluorescence in situ hybridisation (FISH). *Ann Acad Med Singapore*. 2005 Oct;34(9):533-8.
59. Huntly BJ, Guilhot F, Reid AG, Vassiliou G, Hennig E, Franke C, Byrne J, Brizard A, Niederwieser D, Freeman-Edward J, Cuthbert G, Bown N, Clark RE,

Nacheva EP, Green AR, Deininger MW. Imatinib improves but may not fully reverse the poor prognosis of patients with CML with derivative chromosome 9 deletions. *Blood*. 2003 Sep 15;102(6):2205-12. Epub 2003 May 15.

60. Primo D, Taberero MD, Rasillo A, Sayagués JM, Espinosa AB, Chillón MC, Garcia-Sanz R, Gutierrez N, Giralt M, Hagemeyer A, San Miguel JF, Orfao A. Patterns of BCR/ABL gene rearrangements by interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) in BCR/ABL+ leukemias: incidence and underlying genetic abnormalities. *Leukemia*. 2003 Jun;17(6):1124-9.
61. Jain PP, Parihar M, Ahmed R, Abraham A, Vishwabandya A, George B, Mathews V, Srivastava A, Srivastava VM. Fluorescence in situ hybridization patterns of BCR/ABL1 fusion in chronic myelogenous leukemia at diagnosis. *Indian J Pathol Microbiol*. 2012 Jul-Sep;55(3):347-51. doi: 10.4103/0377-4929.101742.
62. Yoong Y, VanDeWalker TJ, Carlson RO, Dewald GW, Tefferi A. Clinical correlates of submicroscopic deletions involving the ABL –BCR translocation region in chronic myeloid leukemia. *Eur J Haematol* 2005; 74: 124–127.
63. Lee DS, Lee YS by interphase fluorescence in situ hybridization and its association with disease progre, Yun YS, Kim YR, Jeong SS, Lee YK, She CJ, Yoon SS, Shin HR, Kim Y, Cho HI. A study on the incidence of ABL gene deletion on derivative chromosome 9 in chronic myelogenous leukemia by interphase fluorescence in situ hybridization and its association with disease progression. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003 Jul;37(3):291-9.
64. Quintas-Cardama A, Kantarjian H, Talpaz M, O'Brien S, Garcia-Manero G, Verstovsek S, Rios MB, Hayes K, Glassman A, Bekele BN, Zhou X, Cortes J. Imatinib mesylate therapy may overcome the poor prognostic significance of deletions of derivative chromosome 9 in patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 2005 Mar 15;105(6):2281-6. Epub 2004 Nov 30.
65. Fourouclas N, Campbell PJ, Bench AJ, Swanton S, Baxter EJ, Huntly BJ, Green AR. Size matters: the prognostic implications of large and small deletions of the derivative 9 chromosome in chronic myeloid leukemia. *Haematologica*. 2006 Jul;91(7):952-5.
66. Kim DH, Popradi G, Sriharsha L, Kamel-Reid S, Chang H, Messner HA, Lipton JH. No significance of derivative chromosome 9 deletion on the clearance kinetics of BCR/ABL fusion transcripts, cytogenetic or molecular response, loss of response, or treatment failure to imatinib mesylate therapy for chronic myeloid leukemia. *Cancer*. 2008 Aug 15;113(4):772-81. doi: 10.1002/cncr.23607.

67. Yoong Y, VanDeWalker TJ, Carlson RO, Dewald GW, Tefferi A. Clinical correlates of submicroscopic deletions involving the ABL –BCR translocation region in chronic myeloid leukemia. *Eur J Haematol* 2005; 74: 124–127
68. Eyüpoğlu D, Bozkurt S, Haznedaroğlu İ, Büyükaşık Y, Güven D. The Impact of Variant Philadelphia Chromosome Translocations on the Clinical Course of Chronic Myeloid Leukemia. *Turk J Haematol*. 2016 Mar 5;33(1):60-5. doi: 10.4274/tjh.2015.0237.
69. Albano, F., Specchia, G., Pannunzio, A., Roberti, M.G., Buquicchio, C., Mestice, A., Greco, G. & Liso, V. (2001) Variant t(9;22) translocation may identify a subgroup of chronic myeloid leukemia patients with poor prognosis. *Blood*, 98, 321a (abstract no. 1354).
70. El-Zimaity MM, Kantarjian H, Talpaz M, O'Brien S, Giles F, Garcia-Manero G, Verstovsek S, Thomas D, Ferrajoli A, Hayes K, Nebiyu Bekele B, Zhou X, Rios MB, Glassman AB, Cortes JE. Results of imatinib mesylate therapy in chronic myelogenous leukaemia with variant Philadelphia chromosome. *Br J Haematol*. 2004 Apr;125(2):187-95.
71. Valencia A, Cervera J, Such E, Barragán E, Bolufer P, Fuster O, Collado R, Martínez J, Sanz MA. Complex variant t (9; 22) chromosome translocations in five cases of chronic myeloid leukemia. *Adv Hematol* 2009;2009:187125.
72. Fabarius A, Leitner A, Hochhaus A, Müller MC, Hanfstein B, Haferlach C, Göhring G, Schlegelberger B, Jotterand M, Reiter A, Jung-Munkwitz S, Proetel U, Schwaab J, Hofmann WK, Schubert J, Einsele H, Ho AD, Falge C, Kanz L, Neubauer A, Kneba M, Stegelmann F, Pfreundschuh M, Waller CF, Spiekermann K, Baerlocher GM, Lauseker M, Pfirrmann M, Hasford J, Saussele S, Hehlmann R; Schweizerische Arbeitsgemeinschaft für Klinische Krebsforschung (SAKK) and the German CML Study Group. Impact of additional cytogenetic aberrations at diagnosis on prognosis of CML: longterm observation of 1151 patients from the randomized CML Study IV. *Blood* 2011;118:6760-6768.
73. Koshiyama DB, Capra ME, Paskulin GA, Rosa RF, Oliveira CA, Vanelli T, Fogliatto LM, Zen PR. Cytogenetic response to imatinib treatment in Southern Brazilian patients with chronic myelogenous leukemia and variant Philadelphia chromosome. *Ann Hematol* 2013;92:185-189.
74. Marzocchi G, Castagnetti F, Luatti S, Baldazzi C, Stacchini M, Gugliotta G, Amabile M, Specchia G, Sessarego M, Giussani U, Valori L, Discepoli G, Montaldi A, Santoro A, Bonaldi L, Giudici G, Cianciulli AM, Giacobbi F, Palandri F, Pane F, Saglio G, Martinelli G, Baccarani M, Rosti G, Testoni N; Gruppo Italiano Malattie E Matologiche dell'Adulto (GIMEMA) Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. Variant Philadelphia translocations: molecular-

cytogenetic characterization and prognostic influence on frontline imatinib therapy, a GIMEMA Working Party on CML analysis. *Blood* 2011;117:6793-6800.

75. Hsiao HH, Liu YC, Tsai HJ, Hsu JF, Yang WC, Chang CS, Lin SF. Additional chromosome abnormalities in chronic myeloid leukemia. *Kaohsiung J Med Sci* 2011;27:49-54.
76. Mysorekar Vijaya V, Subramanian Murali, Kilara Nalini, Sundareshan Tambarahalli S. Variant Philadelphia translocations in chronic myeloid leukemia: A report of five cases. *J Cancer Res Ther.* 2015 Jul-Sep;11(3):654. doi: 10.4103/0973-1482.138036.
77. Fabio Stagno, Paolo Vigneri, Vittorio Del Fabro, Stefania Stella, Alessandra Cupri, Michele Massimino, Carla Consoli, Loredana Tambè, Maria Letizia Consoli, Agostino Antolino & Francesco Di Raimondo (2010) Influence of complex variant chromosomal translocations in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors, *Acta Oncologica*, 49:4, 506-508, DOI: 10.3109/02841861003660031
78. Gorusu M, Benn P, Li Z, Fang M. On the genesis and prognosis of variant translocations in chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007 Mar;173(2):97-106.
79. Lee SE, Choi SY, Bang JH, Kim SH, Jang EJ, Byeun JY, Park JE, Jeon HR, Oh YJ, Kim M, Kim DW. The long-term clinical implications of clonal chromosomal abnormalities in newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib mesylate. *Cancer Genet* 2012;205:563-571.
80. Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Parkinson I, Grigg A, Szer J, Taylor K, Herrmann R, Seymour JF, Arthur C, Joske D, Lynch K, Hughes T. 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 Jul 1;102(1):276-83. Epub 2003 Mar 6.
81. Jabbour E, Kantarjian H, Jones D, Talpaz M, Bekele N, O'Brien S, Zhou X, Luthra R, Garcia-Manero G, Giles F, Rios MB, Verstovsek S, Cortes J. Frequency and clinical significance of BCR-ABL mutations in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate. *Leukemia.* 2006 Oct;20(10):1767-73. Epub 2006 Jul 20.
82. Cortes J, Jabbour E, Kantarjian H, Yin CC, Shan J, O'Brien S, Garcia-Manero G, Giles F, Breeden M, Reeves N, Wierda WG, Jones D. Dynamics of BCR-ABL

kinase domain mutations in chronic myeloid leukemia after sequential treatment with multiple tyrosine kinase inhibitors. *Blood*. 2007 Dec 1;110(12):4005-11. Epub 2007 Sep 4.

83. Khorashad JS, de Lavallade H, Apperley JF, Milojkovic D, Reid AG, Bua M, Szydlo R, Olavarria E, Kaeda J, Goldman JM, Marin D. Finding of Kinase Domain Mutations in Patients With Chronic Phase Chronic Myeloid Leukemia Responding to Imatinib May Identify Those at High Risk of Disease Progression *J Clin Oncol*. 2008 Oct 10;26(29):4806-13. doi: 10.1200/JCO.2008.16.9953. Epub 2008 Jul 21.
84. Ang AL, Wang ZP, Yang LY, Natesan V, Poon M, Koh LP, Goh YT, Chowbay B and Chuah C. The M351T BCR-ABL Kinase Mutation Is Uncommon in Asian Patients with Imatinib-Resistant Chronic Myeloid Leukemia: Possible Relationship with Imatinib Plasma Levels. *Blood* 2008 112:2122.
85. Kim SH, Kim D, Kim DW, Goh HG, Jang SE, Lee J, Kim WS, Kweon IY, Park SH. Analysis of Bcr-Abl kinase domain mutations in Korean chronic myeloid leukaemia patients: poor clinical outcome of P-loop and T315I mutation is disease phase dependent. *Hematol Oncol*. 2009 Dec;27(4):190-7. doi: 10.1002/hon.894.
86. Markose P, Chendamarai E, Balasubramanian P, Velayudhan SR, Srivastava VM, Mathews V, George B, Viswabandya A, Srivastava A, Chandy M. Spectrum of BCR-ABL kinase domain mutations in patients with chronic myeloid leukemia from India with suspected resistance to imatinib-mutations are rare and have different distributions. *Leukemia & Lymphoma*, December 2009; 50(12): 2092–2095.
87. Qin Y, Chen S, Jiang B, Jiang Q, Jiang H, Li J, Li L, Lai Y, Liu Y, Huang X. Characteristics of BCR-ABL kinase domain point mutations in Chinese imatinib-resistant chronic myeloid leukemia patients. *Ann Hematol*. 2011 Jan;90(1):47-52. doi: 10.1007/s00277-010-1039-5. Epub 2010 Aug 10.
88. Bengiό RM, Riva ME, Moiraghi B, Lanari E, Milone J, Ventriglia V, Bullorsky E, Tezanos Pinto Md, Murro H, Bianchini M, Larripa I. Clinical outcome of chronic myeloid leukemia imatinib-resistant patients: do BCR–ABL kinase domain mutations affect patient survival? First multicenter Argentinean study. *Leukemia & Lymphoma*, September 2011; 52(9): 1720–1726
89. Meggyesi N, Kozma A, Halm G, Nahajevszky S, Bάtai A, Fekete S, Barta A, Ujj G, Lueff S, Sipos A, Adάm E, Bors A, Reményi P, Masszi T, Tordai A, Andrikovics H. Additional Chromosome Abnormalities, BCR-ABL Tyrosine Kinase Domain Mutations and Clinical Outcome in Hungarian Tyrosine Kinase

Inhibitor- Resistant Chronic Myelogenous Leukemia Patients. *Acta Haematol* 2012;127:34–42

90. Wongboonma W, Thongnoppakhun W, Auewarakul CU. BCR-ABL kinase domain mutations in tyrosine kinase inhibitors-naïve and -exposed Southeast Asian chronic myeloid leukemia patients. *Exp Mol Pathol*. 2012 Apr;92(2):259-65. doi: 10.1016/j.yexmp.2012.01.007. Epub 2012 Jan 31.
91. Elias MH, Baba AA, Azlan H, Rosline H, Sim GA, Padmini M, Fadilah SA, Ankathil R. BCR-ABL kinase domain mutations, including 2 novel mutations in imatinib resistant Malaysian chronic myeloid leukemia patients—Frequency and clinical outcome. *Leukemia Research* (2014) 454–459
92. Hughes TP, Saglio G, Quintás-Cardama A, Mauro MJ, Kim DW, Lipton JH, Bradley-Garelik MB, Ukropec J, Hochhaus A. BCR-ABL1 mutation development during first-line treatment with dasatinib or imatinib for chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Leukemia* (2015) 29, 1832–1838.
93. Vaidya S, Vundinti BR, Shanmukhaiah C, Chakrabarti P, Ghosh K. Evolution of BCR/ABL gene mutation in CML is time dependent and dependent on the pressure exerted by tyrosine kinase inhibitor. *PLoS One*. 2015 Jan 28;10(1):e0114828. doi: 10.1371/journal.pone.0114828. eCollection 2015.
94. Patkar N, Ghodke K, Joshi S, Chaudhary S, Mascerhenas R, Dusseja S, Mahadik S, Gaware S, Tembhare P, Gujral S, Kabre S, Kadam-Amare P, Jain H, Dangi U, Bagal B, Khattry N, Sengar M, Arora B, Narula G, Banavali S, Menon H, Subramanian PG. Characteristics of BCR-ABL kinase domain mutations in chronic myeloid leukemia from India: not just missense mutations but insertions and deletions are also associated with TKI resistance. *Leuk Lymphoma*. 2016 Nov;57(11):2653-60. doi: 10.3109/10428194.2016.1157868. Epub 2016 Mar 21.
95. Ursan ID, Jiang R, Pickard EM, Lee TA, Ng D, Pickard AS. Emergence of BCR-ABL kinase domain mutations associated with newly diagnosed chronic myeloid leukemia: a meta-analysis of clinical trials of tyrosine kinase inhibitors. *J Manag Care Spec Pharm*. 2015 Feb;21(2):114-22.
96. von Bubnoff N, Manley PW, Mestan J, Sanger J, Peschel C, Duyster J. Bcr-Abl resistance screening predicts a limited spectrum of point mutations to be associated with clinical resistance to the Abl kinase inhibitor nilotinib (AMN107). *Blood*. 2006 Aug 15;108(4):1328-33. Epub 2006 Apr 13.
97. O'Hare T, Eide CA, Deininger MW. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2007 Oct 1;110(7):2242-9. Epub 2007 May 11.

98. Cortes JE1, Kim DW, Pinilla-Ibarz J, le Coutre P, Paquette R, Chuah C, Nicolini FE, Apperley JF, Khoury HJ, Talpaz M, DiPersio J, DeAngelo DJ, Abruzzese E, Rea D, Baccarani M, Müller MC, Gambacorti-Passerini C, Wong S, Lustgarten S, Rivera VM, Clackson T, Turner CD, Haluska FG, Guilhot F, Deininger MW, Hochhaus A, Hughes T, Goldman JM, Shah NP, Kantarjian H; PACE Investigators. A phase 2 trial of ponatinib in Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med.* 2013 Nov 7;369(19):1783-96. doi: 10.1056/NEJMoa1306494. Epub 2013 Nov 1.
99. Hughes T, Saglio G, Branford S, Soverini S, Kim DW, Muller MC, et al. Impact of baseline BCR-ABL mutations on response to nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase. *J Clin Oncol* 2009;27:4204–10.
100. Soverini S, Gnani A, Colarossi S, Castagnetti F, Abruzzese E, Paolini S, et al. Philadelphia-positive patients who already harbor imatinib-resistant Bcr-Ablkinase domain mutations have a higher likelihood of developing additional mutations associated with resistance to second- or third-line tyrosine kinase inhibitors. *Blood* 2009;114:2168–71.
101. Muller MC, Cortes JE, Kim DW, Druker BJ, Erben P, Pasquini R, et al. Dasatinib treatment of chronic-phase chronic myeloid leukemia: analysis of responses according to preexisting BCR-ABL mutations. *Blood* 2009;114:4944–53.
102. Fava C, Kantarjian H, Cortes J, Jabbour E. Development and targeted use of nilotinib in chronic myeloid leukemia. *Drug Des Devel Ther.* 2009 Feb 6;2:233-43.
103. Shah NP, Skaggs BJ, Branford S, Hughes TP, Nicoll JM, Paquette RL, Sawyers CL. Sequential ABL kinase inhibitor therapy selects for compound drug-resistant BCR-ABL mutations with altered oncogenic potency. *J Clin Invest.* 2007 Sep;117(9):2562-9.
104. Jabbour E, Morris V, Kantarjian H, Yin CC, Burton E, Cortes J. Characteristics and outcomes of patients with V299L BCR-ABL kinase domain mutation after therapy with tyrosine kinase inhibitors. *Blood.* 2012 Oct 18;120(16):3382-3. doi: 10.1182/blood-2012-04-424192.
105. Sahin F, Saydam G, Cömert M, Uz B, Yavuz AS, Turan E, Yönel I, Atay H, Keltikli E, Turgut M, Pehlivan M, Akay MO, Gürkan E, Paydaş S, Kahraman S, Demirkan F, Kırkıızlar O, Akpınar S, Pamuk GE, Demir M, Ozbaş HM, Sönmez M, Gültürk M, Salihoğlu A, Eşkazan AE, Ar C, Haydaroğlu Şahin H, Ongören S,

Başlar Z, Aydın Y, Yenere MN, Tüzüner N, Ferhanoglu B, Haznedaroglu IC, Ilhan O, Soysal T. Turkish Chronic Myeloid Leukemia Study: Retrospective Sectional Analysis of CML Patients. Turk J Haematol. 2013 Dec;30(4):351-8. doi: 10.4274/tjh.2013.0151. Epub 2013 Dec 5.

