

**T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KRONİK MYELOİD LÖSEMİ (KML) VAKALARINDA
MİNİMAL REZİDÜEL HASTALIĞIN İZLENMESİ**

Serpil KAHRAMAN AĞBABA

**Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA
2008**

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KRONİK MYELOİD LÖSEMİ (KML) VAKALARINDA
MİNİMAL REZİDÜEL HASTALIĞIN İZLENMESİ

Serpil KAHRAMAN AĞBABA

Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof Dr. Serap EMRE

ANKARA
2008

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼'ne,

Bu alışma j¼rimiz tarafından Tıbbi Biyoloji Programında Y¼ksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Prof Dr Meral ¼ZG¼Ç
Hacettepe ¼niversitesi

Danışman

Prof Dr Serap EMRE
Hacettepe ¼niversitesi

¼ye

Prof Dr M. Tezer KUTLUK
Hacettepe ¼niversitesi

¼ye

Prof Dr Ahmet KART
Hacettepe ¼niversitesi

¼ye

Doç Dr Y etin KOCAEFE
Hacettepe ¼niversitesi

ONAY

Bu tez, Hacettepe ¼niversitesi Lisans¼st¼ Eğitim-¼ęretim ve Sınav Y¼netmelięi'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki j¼ri ¼yeleri tarafından uygun g¼r¼lm¼ř ve Enstit¼ Y¼netim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof Dr Hakan S ORER

Enstit¼ M¼d¼r¼

TEŞEKKÜR

Bu tez çalıŐmasının gerçekleŐmesinde Tez danıŐmanım olarak bana verdiği destek ve bilimsel katkılarından dolayı sevgili hocam Sayın Prof Dr Serap Emre' ye, meslek yaŐamım boyunca manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Prof Dr M. Tezer Kutluk' a, bilgisini daima benimle paylaŐan değerli hocam Doç Dr Evren Özdemir' e, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı' nda görev yapan tüm hocalarıma, tüm asistan arkadaşlarıma, eğitim-öğretim hayatım boyunca sevgi ve sabırla beni her zaman destekleyen ve her zaman benimle birlikte olacaklarını bildiğim aileme, sevgili eŐim Nejdet' e, her zaman bana yaşama sevinci veren canım oğlum Ege Arda' ma sonsuz teŐekkürlerimi sunuyorum.

ÖZET

Kahraman Ağbaba, S. Kronik Miyeloid Lösemi hastalarında minimal rezidüel hastalığın izlenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi

Biyoloji Yüksek Lisans Tezi, Ankara 2008. Kronik Myeloid Lösemi (KML); hematopoetik bir kök hücrenin neoplastik transformasyonundan kaynaklanan klonal bir hastalıktır. 9. ve 22. kromozomun karşılıklı translokasyonu ile oluşan Ph kromozomunun varlığı KML için tanı koydurucu bir özelliktir.

Hastaya uygulanan tedaviden kaçan ve relapsa neden olan hücrelerin varlığı minimal rezidüel hastalık (MRD) kavramını gündeme getirmiştir. KML hastaları MRD açısından belirli periyotlarda izlenirler. MRD'ın tesbiti, hastalığın prognozunun izlenmesi ve relapsa girdiğinde tedbirlerin alınması için oldukça önemlidir.

MRD'ın takibinde en hassas ve güvenilir metot olarak RT-PZT kullanılmaktadır.

KML hastalarında imatinib mesilat tedavisi etkin bir tedavi yöntemi olmasına karşın, hastalar zamanla direnç geliştirebilmektedir.

Bu çalışmada KML hastalarında minimal residual hastalık ve çoklu ilaç direnci değerlendirilmesinde RT-PZT yöntemi ile BCR-ABL ve MDR1 gen ifade seviyelerine ve MDR1 C3435T polimorfizminin incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışma sonucunda 17 hastanın BCR-ABL ve MDR1 ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar bulunamamasına rağmen ilaç direnci geliştiği düşünülen üç hastada MDR 1' in ve BCR-ABL' yüksek ifadeleri tespit edilmiştir.

Hastaların polimorfizm incelemesinde % 25 CC, %47 CT; %28 TT bulunmuş, kontrol grubunda ise % 25 CC, % 61 CT, %14 TT bulunmuştur. Hasta grubunun iki kat daha fazla TT genotipini taşıdığı gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kronik myeloid lösemi, minimal rezidüel hastalık, çoklu ilaç direnci, MDR1 C3435T polimorfizmi

ABSTRACT

Agbaba Kahraman, S. Following up minimal residual disease in Chronic Myeloid Leukemia Patients. Hacettepe University Institute of Health Sciences, MS.Thesis in Medical Biology, Ankara, 2008. Chronic Myeloid Leukemia (CML) is a clonal disorder which is based on neoplastic transformation of a haematopoietic stem cell. Presence of Ph chromosome which is the result of a translocation between chr 9 and 22 is from the diagnostic for CML. The presence of cells that cause relapse and escape treatment bring the concept of minimal residual disease (MRD). CML patients are followed up for MRD at spesific periods. Detection of MDR is very important to follow the disease prognosis and to be cautious of relapse. RT-PCR is the most sensitive and reliable method to detect MRD. Although imatinib mesilat is the most effective treatment, patients may become resistant on the course of treatment. The aim of this study is to evaluate minimal residual disease and multiple drug resistance by RT-PZT and analyse the expression levels of BCR-ABL, MDR1 gene and detecte the MDR1 C3435T polymorphism in CML patients. As a result of this study show that although there was no significant statistical corelation between the expression of BCR-ABL and MDR1 genes in 17 patients, higher gene expression was found in three patients who were candidates to develop drug resistance. In the polymorphism study, the genotype frequency of patients were calculated as follows; 25% of the patients 'CC', 47% of them 'CT' and 28% of them 'TT'. In control group it was found as 25% 'CC', 61% 'CT' and 14% TT. According to these results, it was determined that the ' TT' genotype is encountered two folds in the patient population.

Key Words: Chronic myeloid leukemia, minimal residual disease ,multidrug resistance , MDR1 C3435T polymorphism.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
1.GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. KML.....	3
2.2. Ph Kromozomu.....	6
2.3. ABL Gen ve Proteinin Yapısı.....	7
2.4. BCR Gen ve Proteinin Yapısı.....	9
2.5. BCR-ABL Füzyon Geni.....	11
2.6. Bcr-Abl Füzyon Proteinin Yapısı ve Hastalık Fenotipi.....	14
2.7. BCR-ABL Patogenezi ile İlgili Mekanizmalar.....	17
2.7.A. Hücresel Adezyonun Bozulması.....	17
2.7.B. Apoptozisin İnhibisyonu.....	17
2.7.C. Mitojenik Sinyal Yolaklarının Aktivasyonu.....	18
2.8. KML’de Uygulanan Tedavi Yöntemleri.....	20
2.8.A. Konvansiyonel Kemoterapi.....	20
2.8.A.1. Hidroksiüre.....	20
2.8.A.2. Busulfan.....	20
2.8.B. Küratif Tedavi.....	20
2.8.B.1. İFN- α	20
2.8.B.2. İmanitib Mesilat.....	21
2.8.B.3. Allojenik Hematopoetik Kök Hücre Nakli.....	22
2.9. Çoklu İlaç Direnci.....	25
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER.....	28

3.1. Bireyler.....	28
3.2. Çalışmada Kullanılan Malzemeler.....	29
3.2.A. Kandan RNA İzolasyon Protokolü.....	30
3.2.B. cDNA Protokolü.....	31
3.2.C. M(9;22) P210 ^{BCR-ABL} Çalışma Protokolü.....	32
3.2.D. m(9;22) P190 ^{BCR-ABL} Çalışma Protokolü.....	34
3.2.E. β -2Mikroglobulin Çalışma Protokolü.....	34
3.2.F. MDR1 Çalışma Protokolü.....	35
3.3. MDR1 Polimorfizmi.....	38
3.3.A. Kandan DNA İzolasyonu.....	38
3.3.B. Hibridizasyon.....	40
4. BULGULAR.....	42
5. TARTIŞMA.....	52
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	57
KAYNAKLAR.....	58

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABL	Abelson
ALL	Akut Lenfoid Lösemi
AML	Akut Myeloid Lösemi
Atm	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenozin Trifosfat
BCR	Breakpoint Cluster Region
C	Sitozin bazı
CaLB	Calcium-dependent lipid binding
CBL	Casitas-B-lineage lymphoma protein
C-terminal	Karboksi Ucu
dATP	Deoksiriboadenozintrifosfat
dCTP	Deoksiribositidintrifosfat
ddH ₂ O	Deiyonize Su
dGTP	Deoksiriboguanozintrifosfat
dk	Dakika
dNTP	Deoksi Ribonükleotit Trifosfat
G	Guanin Bazı
Grb- 2	Growth factor receptor bound - protein 2
GTP	Guanidin trifosfat
IFN- α	İnterferon alfa
Ile	İzolösin
JAK	Janus Kinase
kb	Kilobaz

kDa	Kilodalton
KLL	Kronik Lenfoid Lösemi
KML	Kronik Myeloid Lösemi
LAP	Lökosit Alkalen Fosfataz
M	Molarite
M-BCR	Major breakpoint cluster region
m-BCR	Minör breakpoint cluster region
MDR	Multidrug resistance
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar
NES	Nuclear Export Signals
ng	Nanogram
NES	Nuclear Export Signals
NLS	Nuclear Localization Signals
N-terminal	Amino terminal
PZT	Polimeraz Zincir Tepkimesi
Ph	Philadelphia Kromozomu
PI3K	Fosfoinozid 3-Kinaz
PKC	Protein kinaz C
rpm	Dakikadaki Dönüş Sayısı
sn	Saniye
SOS	Son of sevenless

STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
T	Timin bazı
Taq	Thermus aquaticus
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
$\mu\text{-BCR}$	Mikro breakpoint cluster region

ŞEKİLLER

Sayfa

2.1. Kronik Myeloid Lösemnin gelişimi.....	5
2.2.1. Ph kromozomunun (22q-) ve 9q+'ın gösterimi.....	7
2.3.1. Abl proteininin yapısı.....	9
2.4.1. Bcr proteinin yapısı.....	10
2.5.1. BCR ve ABL genlerinin başlıca kırılma bölgeleri.....	13
2.6.1. BCR-ABL geninin başlıca formları.....	15
2.7.1. Bcr-abl ile ilgili oluş mekanizmaları	18
2.7.2. BCR-ABL vasıtasıyla etkilenen sinyal yolları.....	19
2.8.2. İmanitib mesilatın etki mekanizması.....	22
Çalışma sonrası amplifikasyon eğrilerinin gösterildiği pencere.....	36
Standart eğri.....	37
3.3.1. PGX-HIV Strip.....	41
%P210 BCR-ABL/ β -2M değerleri.....	46
6 numaralı hastanın gen ekspresyon değerlerinin grafiği.....	47
10 numaralı hastanın gen ekspresyon değerlerinin grafiği.....	48
9 numaralı hastanın gen ekspresyon değerlerinin grafiği.....	49

TABLÖLAR

	Sayfa
1. Hastaların klinik özellikleri.....	42
2. P210 BCR-ABL ekspresyon düzeyinin logaritma 10 tabanında gösterimi.....	43
3. BCR-ABL ve MDR1'in gen ekspresyonlarının logaritmik değerleri (\log_{10})..	45
4. MDR-1 C3435T polimorfizminin dağılımı.....	50
5. MDR-1 C3435T polimorfizminin allel dağılımı.....	50
6. Hasta va Kontrol grubunun MDR1 C3435T polimorfizminin dağılımı	51

ÇALIŞMA PROTOKOLLERİ

Sayfa

3.2.A. Kandan RNA İzolasyon Protokolü.....	30
3.2.B. cDNA Protokolü.....	31
3.2.C. M(9;22) P210 ^{BCR-ABL} Çalışma Protokolü.....	32
3.2.D. m(9;22) P190 ^{BCR-ABL} Çalışma Protokolü.....	34
3.2.E. β -2 Mikroglobulin Çalışma Protokolü.....	34
3.2.F. MDR1 Çalışma Protokolü.....	35

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz olarak büyümesi ve çoğalması sonucu oluşan genetik bir hastalıktır. Hematopoetik sistemdeki anormal hücre çoğalması ile karakterize olan lösemilerde oluşan kromozomal değişikliklerin analizi, lösemi tipinin doğru belirlenmesi, remisyon ve relaps durumlarında hastalığın prognozunun anlaşılması ve minimal rezidüel hastalıkların takibinde yardımcı olmaktadır.

Lösemi alt grublarından biri olan Kronik Myeloid Lösemi (KML), özgül kromozom anomalisi ile tanımlanan ilk kanser tipidir.KML vakalarının %90' ından fazlasında Philadelphia (Ph) kromozomu görülmektedir. Hastalığın ortaya çıkması ve ilerlemesi ile ilgili yakın ilgisinin olduğu düşünülmektedir. Ph kromozomu 9q34 deki ABL protoonkogeninin 22q11 deki bcr geni karşılıklı translokasyonu ile oluşan BCR-ABL füzyon geni ortaya çıkar.

Hastaya uygulanan tedaviden kaçan ve relapsa neden olan hücrelerin varlığı minimal rezidüel hastalıktır. KML hastalarında, rezidüel hastalık analizlerinin temel amacı tedaviye cevap veren hastaların değerlendirilmesi ve erken relapsın tayin edilebilmesidir. Tedavi alan KML hastalarında hastalık tekrarlayabilmekte ve ilaca karşı direnç gelişebilmektedir.

Gözlenen bu çoklu ilaç direncinden (MDR) '*Multidrug resistance*' sorumlu birçok mekanizma tanımlanmıştır. Bunlardan biri p-glikoprotein (MDR1) dir. BCR-ABL ve MDR1 genlerinin transkripsiyon düzeylerinin hızlı ve çok daha hassas olarak tesbit edilebilmesi, hastalığın kinetiğinin izlenmesi için en uygun yöntem Kantitatif Revers transkriptaz-polimeraz zincir tepkimesidir (RT-PZT).

Bu tez çalışmasında hastanemize KML tanısı veya şüphesiyle gelen vakaların periferik kan örneklerinden total RNA izolasyonu yapıp, mRNA' sından revers transkriptaz enzimi ile cDNA' ları elde edilerek PZT tekniği ile amplifikasyonu sonucu BCR-ABL füzyon geni ve MDR1 geninin ifadelerindeki artış ve azalmaları

kantitatif ölçümlerle belirlenerek minimal rezidüel hastalık ve çoklu ilaç direnci açısından değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KML

KML, hematopoetik bir kök hücrenin neoplastik transformasyonundan kaynaklanan klonal bir myeloproliferatif hastalıktır. İlk kez 1845' te araştırmacılar Craigie, Bennett, ve Virchow tarafından tanımlanmıştır.

1960' ta Nowell ve Hungerford ilik hücrelerinde G grubu kromozomda uzun kolun büyük parçasının koparak kaybolduğunu tanımlamış ve kısaltmış bu kromozoma bulunduğu şehrin adı olan Philadelphia (Ph) Kromozomu adını vermişlerdir. Rowley, 22. Kromozomun kopan bu parçasının kaybolmadığını 9. kromozomun uzun koluna transloke olduğunu göstermiştir (1). Klinik gelişimi ve spesifik kromozom anomalisi nedeni ile KML en iyi tanımlanmış ve en çok çalışılmış myeloproliferatif bir hastalıktır. Batı ülkelerinde 1-2 /100.000 insidansı bulunduğu ve tüm lösemilerin %20-30'unu oluşturduğu bildirilmektedir. Erkeklerle kadınlar arasında görülme olasılığı 1.3- 1' dir (2). Erkeklerde daha sık görülmektedir. KML her yaş grubunu etkilemekle birlikte görülme yaşı 40' ların ortaları olup 40-60 yaş arasında artış göstermektedir. Amerika Birleşik devletlerinde her yıl 3500-5000 yeni vaka görülmektedir (3). KML hastalarının %90' ından fazlasında Ph kromozomu görülmektedir. Çocuklarda ise nadir görülür ve çocukluk çağı lösemilerin %2-3' ünü oluşturmaktadır. Batı ülkelerinde çocuklarda insidansı 1 000 000' da 1' dir.(4)

Klinik bulgular; yorgunluk, kilo kaybı, iştahsızlık, dalak ve karaciğer büyümesidir. Hastaların yaklaşık %40' ı tanıyı semptomsuz alırlar. Periferik kanda; beyaz kan hücrelerinin sayısı 25.000 mm³/ml, %30-50 oranında artmış trombosit sayısı, bazofil sayısının artması (bazofili), azalmış lökosit alkalen fosfataz (LAP) aktivitesi, periferik yaymada granülosit farklılaşmasının tüm basamakları gözlenir.

Kemik iliğinde; hiperselülerite ile azalmış yağ içeriği, myeloid/ eritrosit hücrelerinin oranının artması, megakaryositlerin sayısının artması izlenmektedir.

Başlatıcı olayın genellikle tek pluripotent hematopoetik kök hücrenin t(9;22) kromozomal translokasyonu ile oluştuğu düşünülmektedir. Oluşan BCR-ABL füzyon geni büyüme avantajı sağlar ve klonal artış gerçekleşir. Böylelikle genomik kararsızlığa neden olur (5) . Oluşan Bcr-Abl artmış ve sürekli tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. Bu aktivite myeloid hücrelerine proliferasyonunu sağlar.(6)

KML; üç farklı klinik evre ile karakterizedir. İlk faz olan kronik fazda, periferik kanda lökositoz ve sıklıkla trombositoz, bazofili gözlenir. Hastaların yaklaşık % 85' i bu fazda tanı alırlar. Hematopoetik kök hücrelerinin (HKH) BCR-ABL füzyon gen ekspresyonuyla hastalık başlar (Şekil 2.1.1.). HKH' ler myeloid öncülleri (MÖ) ve lenfoid öncülleri (LÖ) şeklinde farklılaşır. MÖ' ler granülosit/makrofaj öncülleri (GMÖ; granülosit öncülleri (G), makrofajlar (M) ve megakaryosit/eritrosit öncülleri (MEÖ) eritrositler, megakaryositler ve onların ürünü trombositler şeklinde farklılaşır. Lenfosit öncülleri T hücreleri, B hücreleri şeklinde farklılaşır. Bu dönemde farklılaşma yeteneğini kaybetmemiş pluripotent kök hücrelerinden gelen Ph (+) lösemik klonunun çok fazla çoğalması söz konusudur. Bu hücrelerin farklılaşması sonuna kadar devam etmekte ve yüksek miktarda granülosit dolaşımında yer almaktadır. Kısaca KML'nin kronik fazı granülositik hücre serisinin kütlece artışı ile karakterizedir. Kronik fazın ortalama uzunluğu 3-4 yıldır.

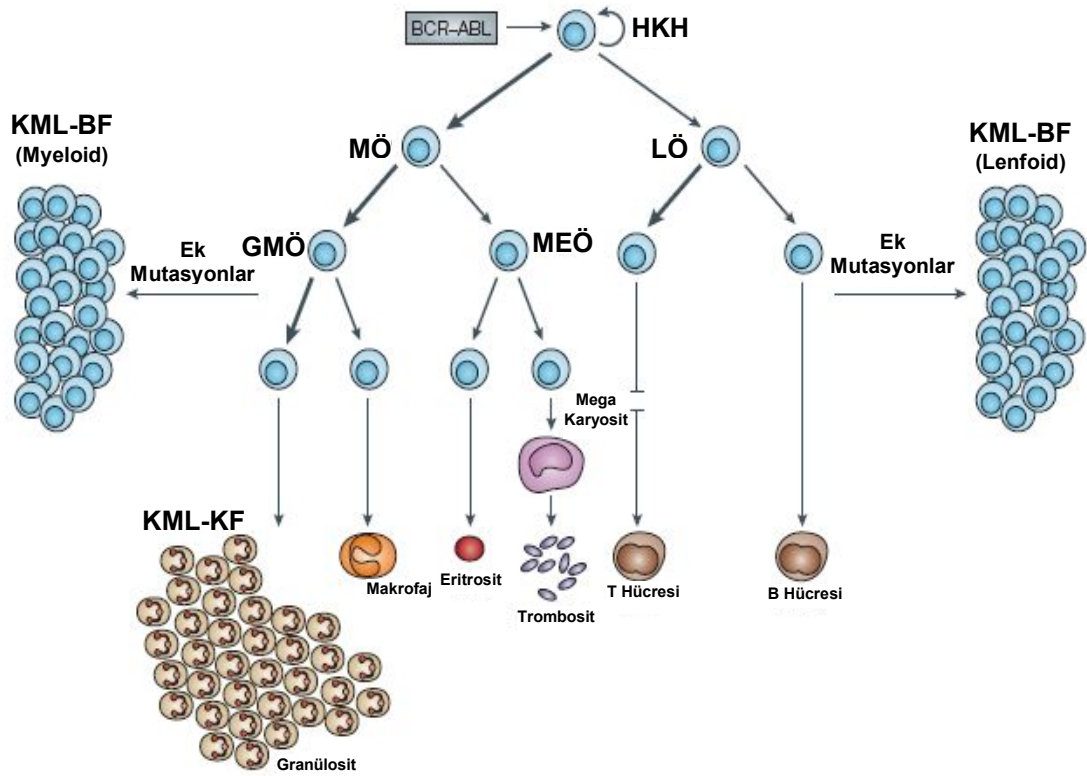
İkinci faz olan akselere faz her hastada gözlenmeyebilir. Akselere fazda nötrofil farklılaşması bozulmaya başlar ve lökosit sayısını myelosüpresif ilaçlarla kontrol altında tutmak zorlaşır.

Edinilmiş genetik mutasyonlarla hastalık blast veya blastik faza geçer. Blastik fazda hastalığın prognozu kötüdür ve ortalama yaşam süresi 3-6 aydır (7). Blast faz yaklaşık hastaların 2/3' inde myeloid ya da 1/3' ünde lenfoid blast hücrelerinin birikmesiyle karakterizedir (8). Kemik iliği veya periferik kana geçen blast hücrelerinin sayısı %30 veya daha üzerindedir. KML' nin blast fazı akut lösemiye benzer ve myeloid, lenfoid blastlar farklılaşmayı başaramazlar.

Vakaların 1/3' ünde blastlar lenfoid morfolojisine sahiptir. CD10 “common acute lymphoblastic leukemia antigen” ve terminal deoksinükleotidil transferaz gibi lenfoid belirleyicilerini eksprese ederler (9). Blast fazda en yaygın görülen kromozomal değişiklikler, ikinci bir Ph kromozomu, kromozom 8' in trizomisi (+8),

kromozom 17' in uzun kolunun izokromozomu i(17q)' dur. Daha az yaygın olarak kromozom19 ve kromozom21' in trizomileri (+19, +21) görülmektedir.

Transformasyon esnasındaki blastların fenotipi KML'deki hangi HKH'lerinin baskın olduğunu göstermektedir. Hastadan hastaya farklılık göstermekle birlikte, olguların %65' inde myeloid blastlar, %30' unda lenfoid blastlar, %5' inde ise megakaryositik veya farklılaşmamış blastlar bulunmaktadır. Vakaların büyük bir kısmında KML' in sonu genellikle birkaç aylık yaşamları olan Akut Lösemidir.

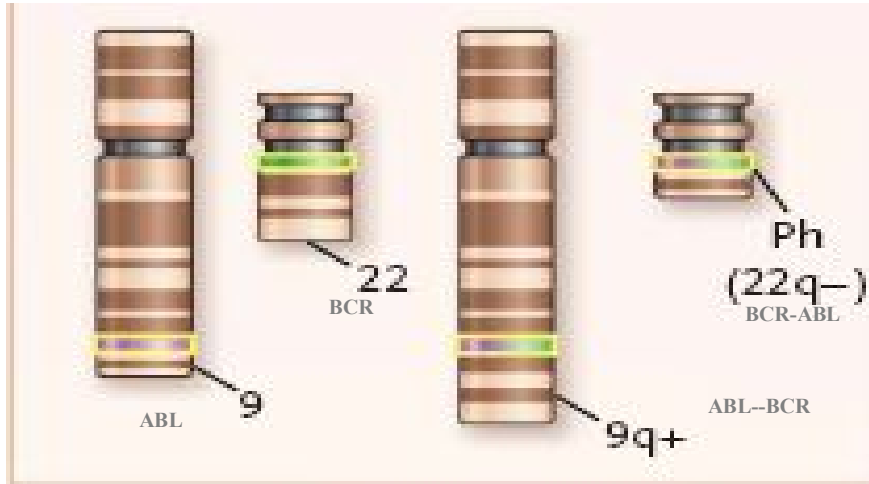


Şekil 2.1.1. Kronik Myeloid Lösemimin gelişimi.

2.2. Ph KROMOZOMU

Kanser ile ilişkisi bulunan ilk kromozom anomalisi Ph kromozomudur. Sitogenetikte uygulanan tekniklerin gelişmesi ile kromozomlarda daha detaylı bant boyama teknikleri sonucu bu iki kromozomdaki kırık noktaları tespit edilerek 9 numaralı kromozomun uzun kolu ile 22 numaralı kromozomun uzun kolu arasındaki karşılıklı translokasyon olduğu anlaşıldı. Bunun sonucunda küçük bir 22 numaralı kromozom ile daha uzun 9 numaralı kromozom ortaya çıkmaktadır. Ph kromozomu 5' bcr ile 3' abl dizilerinin birleşmesiyle oluşan BCR-ABL (22q-) onkogenini taşır. Kromozom 9 üzerindeki diğer translokasyon paterni olan ABL-BCR (9q+) KML hastalarının yaklaşık %60' ında eksprese edilir ama bunun hiçbir biyolojik fonksiyonu yoktur ve henüz fenotipi bilinmemektedir (Şekil 2.2.1.).

KML' ye neden olan faktörler hala bilinmemekle birlikte epidemiyolojik çalışmalar iyonize edici radyasyon (IR)' un etken olduğunu göstermişlerdir. Çünkü IR çift zincirli DNA kırıklarına yol açabildiği en iyi bilinen ajanlardan biridir. Kromozom 9 ve 22' nin hücre çekirdeğindeki topografik yerleşimlerinde resiprokal translokasyonlarını kolaylaştırmaktadır. İnsan hematopoetik hücrelerinde ABL ve BCR genlerinin konfokal mikroskopi ve floresan in situ hibridizasyon (FISH) teknikleri ile gösterilmesi sonucu hücre siklusunun S fazından G2 fazına geçişte yanyana geldiklerini göstermiştir. ABL ve BCR genlerinin birleşmelerinin en kritik anının hücre döngüsünün bu periyodu olduğunu düşündürmektedir. 2002 yılında Saglio ve arkadaşları tarafından kromozom 22 üzerindeki BCR genine ve kromozom 9 üzerinde ABL genine çok yakın yerleşimli duplike olmuş büyük genomik segmentler gösterilmiştir. Bu segmentlerin fonksiyonel bir BCR-ABL füzyon geni oluşturmak üzere her iki kromozom arasındaki homolog rekombinasyonu kolaylaştırdığı düşünülmektedir. KML vakalarının %90' ından fazlasında, erişkin ALL vakalarının 1/3 ünde ve çocuk ALL ile AML vakalarının %6' sında t(9;22)(q34.1;q11.7) görülmektedir (10).



Şekil 2.2.1. Ph kromozomunun(22q-) ve 9q+'ın gösterimi.

2.3. ABL GEN VE PROTEİNİNİN YAPISI

ABL geni, Abelson Murine Leukemia Virus (A-MuLV) onkogeni v-abl' nin insan homologudur. 230 kb uzunluğunda bir gen olup 11 ekzon içerir. 9q34' de lokalize olan ABL geni 145 kD' luk bir reseptör olmayan tirozin kinazı kodlar (11).Abl proteinini kodlayan ABL geninin iki alternatif 1. ekzonu, 1a ve 1b, alternatif kesilmeye uğrayarak 5 ve 6,5 kb' lık mRNA transkriptlerini oluşturur. Bu kesilme varyantlarının translasyonu, yalnızca N-terminal sekansları birbirinden farklı olan iki ABL izoformunun oluşmasını sağlar.

Abl proteini, tirozin kinaz ailesine aittir. Çekirdekte ve sitoplazmada bulunabilir. Proteinin yerleşimi NLS ve NES' ler ile kontrol edilmektedir. Abl tip1b proteininin üzerinde bir miristolasyon bölgesi vardır ve bu nedenle bu protein plazma membranına bağlanabilir.

Abl' nin N-terminaline doğru yerleşen üç bölgesi, bir protip non-reseptör tirozin kinaz olan Src içindeki bölgeler ile yüksek derecede homoloji gösterir. Bu bölgeler ABL' in tirozin kinaz fonksiyonunu düzenler. SH1 bölgesi ABL' nin kinaz bölgesidir. SH2 ve SH3 bölgeleri ise katalitik değildir ve tirozin kinaz aktivitesini düzenleyen diğer proteinler için bağlanma bölgesi oluştururlar. SH3 bölgesi, SH1 bölgesinin kinaz aktivitesinin düzenlenmesi için şarttır. ABL' nin orta bölgesi, Crk ve Crkl gibi proteinlerin SH3 bölgelerine bağlanmayı sağlayan prolinden zengin diziler içerir. (12, 2)

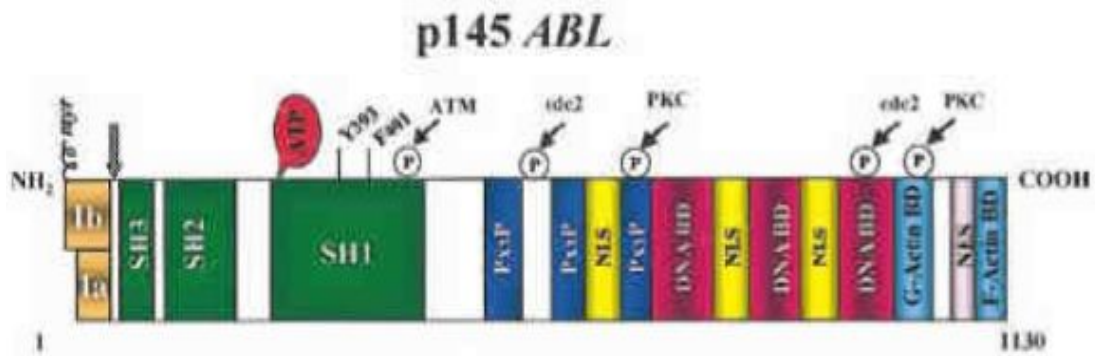
ABL' nin C-terminal bölgesinde aktin filamentlerine bağlanmayı sağlayan bölgeler, DNA' ya bağlanmayı sağlayan bölgeler, 3 adet Nükleer Lokalizasyon Sinyali (NLS) bölgesi, 1 adet Nükleer Export Sinyali (NES) bölgesi bulunur (Şekil 2.3.1.).

Abl normalde çekirdekte bulunur. NLS' lerin kaybı ABL' nin sitoplazmaya translokasyonu ile sonuçlanır. ABL' nin tirozin kinaz aktivitesi fizyolojik koşullar altında sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. SH3 bölgesi bu inhibisyon işlemi kritik rol oynar. Çünkü bu SH3 bölgesinin delesyonu ve yer değişimi ile protein kinaz işlevi aktive olmaktadır.

ABL' nin çok sayıda fonksiyonu vardır. Başlıca; Nükleer ABL: Genotoksik strese karşı p53 ya da bunun işlevsel homologu olan p73' u kontrol ederek apoptozisi indükler. Hücre siklusunun G1 fazında tutulmasını sağlayarak büyümenin negatif düzenleyicisi olarak rol alır.

Sitoplazmik ABL: İntegrinlerden sinyal iletiminde rol alır.

Transgenik farelerle yapılan çalışmalarda, homozigot ABL gen delesyonu taşıyan farelerin normal gelişimini tamamlayamadığı ve gelişim geriliği, lenfoid organ hiperplazisi ve adrenal yetersizlikten dolayı prenatal dönemde öldüğü gösterilmiştir. (12, 13).



Şekil 2.3.1. Abl proteininin yapısı. Tip Ia formu Tip Ib formundan biraz daha kısadır. Y393 kinaz domaininde otofosforilasyon bölgesidir. F401 çok iyi korunmuştur. Proteinin orta bölgesinde 3 adet prolince zengin bölge, 3 adet nükleer lokalizasyon sinyal bölgesi, DNA, G-aktin, F-aktin bağlanma bölgesi, nükleer eksport sinyal bölgesi içerir. Fosforilasyon bölgeleri Atm, cdc2, PKC ile gösterilmiştir. (Deininger ve ark. 2000)

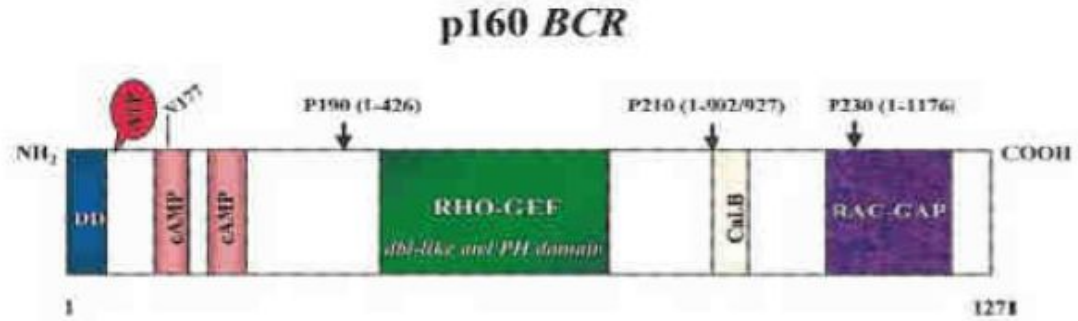
2.4. BCR GEN VE PROTEİNİN YAPISI

BCR geni 23 ekzon içerir. 1270 aminoasitten oluşmuştur. Gen ürünü 160 kD' luk birkaç işlevsel bölgesi olan bir sitoplazmik proteindir (Şekil 2.4.1.).

N-terminalinden itibaren ilk 426 aminoasitlik bölge özellikle önemlidir. Çünkü BCR geninin 1. ekzonu tarafından kodlanır ve tüm Bcr-Abl füzyon proteini izoformlarında yer alan tek polipeptit dizisidir. Bu kısım proteinin serin/threonin kinaz bölgesini ve iki adet serin/threonin'ce zengin bölgeyi içerir. Serin/threonin kinaz bölgesi otofosforilasyondan ve bilinen tek substratı olan Bap-1(BCR-associated protein 1)' in fosforilasyonundan sorumludur. Bu bölgede bulunan 177. pozisyondaki tirozinin fosforilasyonu önemlidir. Çünkü BCR' ı Ras N- Terminal bölgesinde 'coiled-coil' bölgesi in vivo ortamda dimerizasyona olanak sağlar. Transformasyon için gereklidir. Sarmal-bobin şeklindedir.

RHO-GEF Bölgesi; Bcr proteinin merkezinde bulunur. Cdc24, Dbl, Vav ve Cdc25 gibi birkaç guanin nükleotid değişim faktörü (GEF) ile homoloji gösterir.

GEF'ler G-proteinlerinde GDP-GTP değişimini sağlayarak aktivasyonu gerçekleştirirler. C-Terminali; Rac için GTPaz- aktive edici protein(GAP) fonksiyonu goren bir bölge içerir. Bu GAP bölgesi Rac ile etkileşerek GTP hidrolizini hızlandırır. Böylece BCR' ın G-proteinleri aracılı sinyal iletiminde ikili etkisinin olduğu anlaşılmaktadır; merkezi bölge uyarıcı rol oynarken C-terminal bölgesi tirozin kinaz aktivitesinin inhibisyonuna yol açar. BCR^{-/-} farelerle yapılan çalışmalarda, BCR fonksiyonlarının normal hücre fizyolojisi için çok gerekli olmadığı sonucunu vermiştir bu farelerde saptanabilen tek defekt, artmış nötrofilik oksidatif yanma olarak bulunmuştur (12).



şekil 2.4.1. Bcr proteinin yapısı. N-terminalinde dimerizasyon domaini (DD), siklik adozinmonofosfat kinaz (cAMP) homolojisi gösteren domain bulunur. Grb-2'in bağlanması için Y177 çok önemli otofosforilasyon bölgesi, proteinin merkezinde Rho- guanidin nükleotid değiştirme faktörü (Rho-GEF), C terminalinde kalsiyum bağımlı lipid bağlı (CaLB) ve Rac-GTPaz (Rac-GAP) bölgesi bulunur.BCR-ABL füzyon proteinlerinin kırılma pozisyonları okla gösterilmiştir. (Deininger et al.2000)

2.5. BCR-ABL FÜZYON GENİ

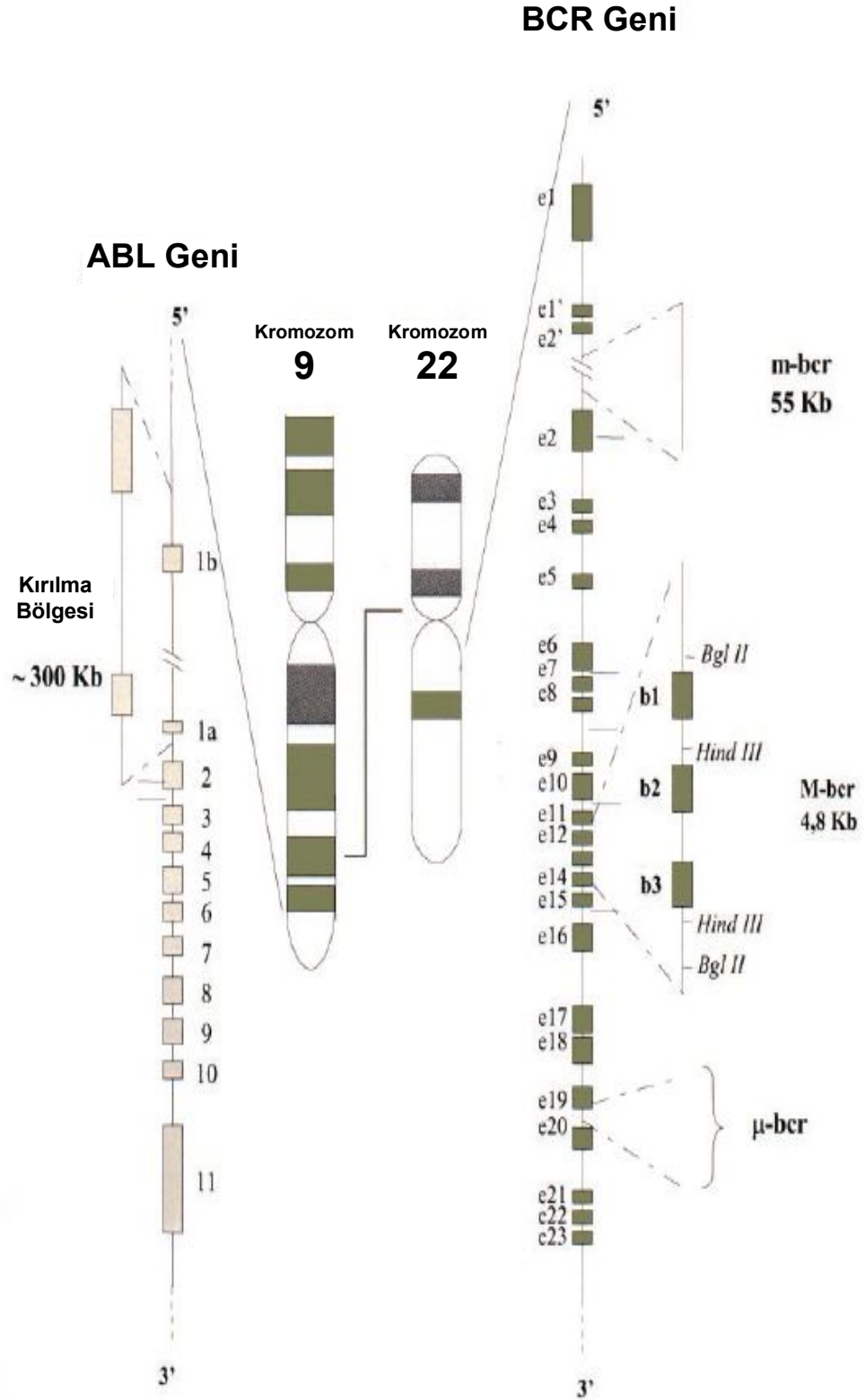
BCR ve ABL genlerinin özel bölgelerinden kırılması (Şekil 2.5.1.) ve birleşmesi sonucu ortaya çıkan BCR-ABL füzyon geni, hematolojik malignitelerle birlikte söz edilmektedir.

ABL'deki kırılma noktaları; Kırılma ABL geninin üzerinde 300 kb' dan uzun olan 5' segmentinin herhangi bir yerinde meydana gelebilir. Kırılma noktaları; sıklıkla ekzon 1b ve ekzon 1a arasındaki intronik dizide, ekzon 1a' nın 3' ucunda yer alan dizide, ya da ekzon 1b' nin 5' ucunda yer alan intronik dizide yer alabilirler. Bu nedenle BCR-ABL füzyon genleri 1b ve 1a ekzonlarını veya tek başına ekzon 1a' yı ya da her iki alternatif ekzonunda bulundurmayabilir. Füzyon geninin yapısı ne olursa olsun BCR-ABL mRNA' sı 1. ekzonu içermez ve BCR ekzonlarını içeren transkript direkt ABL ekzon a2' ye bağlanır.

BCR'deki kırılma noktaları; BCR geninde, başlıca üç tanımlanmış bölgede kırılma noktaları yer alır. KML hastalarının %95' inde ve ALL hastalarının yaklaşık 1/3' ünde BCR geni "Major breakpoint cluster region" (M-bcr) adı verilen 5.8 kb' lık bölgenin içinde kısalmaya uğrar. Bu bölge orjinal adı b1-b5 olan ve günümüzde ise e12-e16 olarak adlandırılan beş ekzondan oluşur. Kırılmaların büyük çoğunluğu ya ekzon 13' ün (b2) ya da ekzon14' ün (b3) 3' bölgelerindeki intronlarda oluşur. Oluşan hibrid transkriptler ya e13a2 (b2a2) ya da e14a2 (b3a2) birleşmesine sahiptirler. Her iki durumda da mRNA 210 kD' luk p210 Bcr-Abl füzyon proteinini kodlayan 8.5 kb' lık bir diziden oluşur. KML hastalarının %99' unda b2a2 ve b3a2 olarak iki tip bcr-abl bileşkesi gözlenmektedir (14).

Ph pozitif ALL hastalarının 2/3' ünde ve nadir KML ve AML vakalarında bcr' deki kırılma M-bcr' in 5' bölgelerinde yer alan "minör breakpoint cluster region" (m-bcr) olarak adlandırılan bölgede oluşur. Bu bölge BCR geninin alternatif 2.ekzonları olan e2' ve e2 arasında yer alan 54.4 kb' lık bir introndur. m-bcr' da kırılma noktalarına sahip BCR-ABL füzyon genleri BCR' deki alternatif 1. ekzonlar (e1 ve e1') ile birlikte alternatif 2. ekzon olan (e2')' yi içerirler.

BCR geni üzerinde tanımlanmış üçüncü kırılma demeti bölgesi “Micro Breakpoint Cluster Region”(μ-bcr) olarak adlandırılmıştır. Bu durumda kırıklar, BCR geninin 3' ucuna yakın olan e19(c3) ve e20(c4) ekzonları arasında gerçekleşir. Hibrid geninin transkripsiyonu, 230 kD' luk bir protein olan p230 bcr-abl' ı kodlayan e19a2 füzyon transkriptinin oluşumunu sağlar. Ayrıca e13a2, e14a2, e1a2, e19a2' den farklı birleşim şekline sahip bazı atipik BCR-ABL transkriptleri rapor edilmiştir. e6a2 ve e2a2 birleşimine sahip füzyon transkriptler rapor edilmiştir. e2a2 birleşiminin görüldüğü KML vakasının, ek bir Ph kromozomu ve monozomi 7 ile beraber daha agresif bir klinik seyir gösteren hastalığa sahip olduğu belirtilmiştir. e8a2, e15a2, e1a3, e13a3, e14a3 transkriptlerine sahip hastalarda tespit edilmiştir. (15, 2, 1, 16, 12, 11, 17, 18, 19).



Şekil 2.5.1. BCR ve ABL genlerinin başlıca kırılma bölgeleri. (F. Pane, Intriieri M, Quintarelli C 2002)

2.6. BCR-ABL FÜZYON PROTEİNİN YAPISI VE HASTALIK FENOTİPİ

Bcr-Abl proteinleri, ABL ekzon 1' in BCR' nin farklı kısımlarıyla yer değiştirdiği füzyon geninden kodlanır. Füzyon geninde yer alan ABL içeriği değişmediğinden hastalık fenotipindeki değişkenlik BCR geni tarafından kodlanan protein dizilerinden kaynaklanmaktadır (Şekil 2.6.1.).

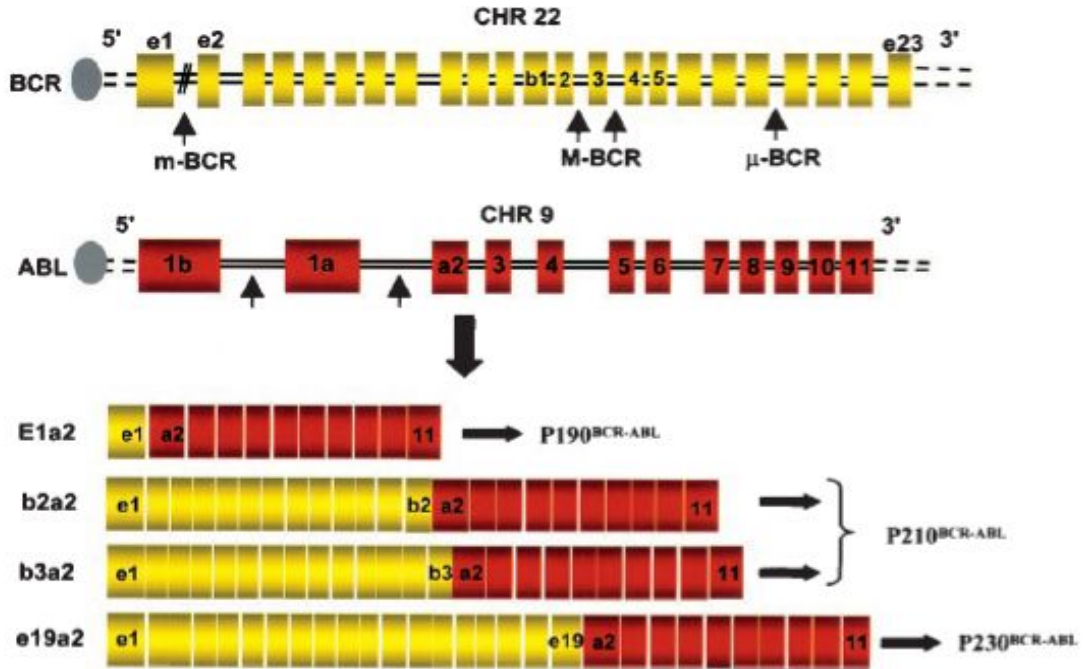
P210 BCR-ABL ekspresyonu: Klasik tipte KML' nin ilgili olduğu onkoproteindir. Hastalığın kronik fazındaki belirgin özelliği granülositik ve megakaryositik serilerdeki aşırı artıştır. Mekanizması iyi bilinmese de p210 Bcr-Abl' nin granülositik farklılaşma ve maturasyonla ilgili hücre sinyal yollarını bozduğu düşünülmektedir. Genede bu bozulma çok ağır değildir. Hücrelerin bir kısmı olgun nötrofiller, eozinofiller ve bazofiller oluşturmak üzere gelişimlerinin son basamaklarına ulaşabilirler. P210 Bcr-Abl onkoproteininin e13a2 (b2a2) ve e14a2 (b3a2) bileşkelerini taşıyan iki farklı formu bulunur. Ekzon e14, 75 nükleotid içerir, sonuç olarak e14a2 birleşmesine sahip füzyon geninin kodladığı onkoproteinde fazladan 25 aminoasit bulunur.

M-bcr kırılma noktası pozisyonunun hastalık fenotipine etkisinin araştırıldığı ilk çalışmalar sonucunda e13a2 birleşmesine sahip onkoproteinlerin yer aldığı KML tipinde akut fazın daha geç dönemlerde başladığı öne sürüldü. Fakat daha büyük örneklemelerle yapılan çalışmalar sonucunda, bu düşünüşün yanlış olduğu ve p210 Bcr-Abl' yi kodlayan transkript tipinin herhangi bir prognostik değer taşımadığı gösterilmiştir.

P190 BCR-ABL ekspresyonu : Sıklıkla ALL' de görülürken belirgin bir monositozun olduğu bazı KML hastalarında da görülebilir. P190 Bcr-Abl mRNA' sı e1a2 birleşimini içerir ve proteinin toplam onkojenik potansiyeli yalnızca BCR ekzon e1' den gelen dizilerle sınırlıdır. Bu tip proteinin eksprese olduğu dominant hastalık tipinin ALL olması, myeloid öncüllerinden çok lenfoid öncüllerindeki belirli metabolik yolların seçici olarak bozulması demektir.

P230 BCR-ABL ekspresyonu : Bcr-Abl füzyon proteinlerden en büyüğü olan bu protein, e19a2 birleşkesine sahip mRNA transkriptlerince kodlanır. e19a2 transkriptine sahip hastalarda nadir görülen myeloproliferatif bir hastalık olan Nötrofilik- KML' ye ait özellikler gözlenmiş. Nötrofilik-KML' yi klasik KML' den ayıran özellikler; daha hafif ve yavaş klinik seyir, daha az splenomegali, hastalığın blastik transformasyona dönüşümü gecikmiş, hatta hiç gözlenmeyebilir. Dolaşımdaki baskın lösemik myeloid hücre tipi olgun granülositlerdir. Ayrıca μ -bcr bölgesi kırığının, M-bcr' den farklı olduğundan, iyi huylu fenotipten sorumlu olduğu düşünülmektedir. P230 Bcr-Abl; Bcr' nin peptid dizisinin %90' ından fazlasını içerir. Sadece C-terminalindeki GAP homoloji bölgesinin 2/3' ünü bulundurmaz. Kalan 1/3' lük kısım fonksiyonel olarak aktiftir ve GAP aktivitesi için gereklidir. Bu onkoproteinini eksprese eden KML öncüllerinin, hem normal hem de transloke BCR alleleri fizyolojik olarak normal GAP aktivitesi gösteren bir protein eksprese edebildiklerinden, granülositik diferansiyonun normal basamaklarından geçebildiği öne sürülmüştür.

Bu hipotez, p230 Bcr-Abl' deki ek BCR dizilerinin diğer iki füzyon proteinine göre daha hafif seyirli bir myeloproliferatif hastalıkla sonuçlanan bir fonksiyona yol açtığı görüşü ile uyumludur.



Şekil 2.6.1. BCR-ABL geninin başlıca formları.

Yüksek hassasiyetteki ‘Kantitatif Revers Transkriptaz- Polimeraz Zincir Tepkimesi’ (RT-PZT) metodu kullanıldığında, hücrelerinde M-bcr kırılma noktası bulunan ve eksprese edilen füzyon proteini p210 Bcr-Abl olan hastalarda e1a2 bileşkesine sahip transkriptlerde saptanabilir. Erken dönemlerde, p210 bcr-abl kodlayan mRNA’ ya ek olarak BCR-ABL’ nin p190 formunu kodlayan BCR-ABL mRNA’ sının bulunması, bu durumun bir şekilde hastalıkta akut faza ya da blast krizine olan ilerlemeyle ilişkili olduğu düşünülmüştür. Sonraki çalışmalarda ise, bu p190 tipi BCR-ABL mRNA moleküllerinin, tek ve klasik M-bcr kırılma noktası bulunan KML hastalarının %90’ ından fazlasında, hastalığın fazından bağımsız olarak saptanabildiğini ortaya çıkarmıştır. Daha baskın olan p210Bcr-Abl mesajına karşın düşük düzeylerdeki ekspresyonları, e1a2 transkriptlerinin büyük olasılıkla e13a2 ya da e14a2 transkriptlerinden birinin alternatif kesilmesiyle oluştuğunu düşündürmektedir.

2.7. BCR-ABL PATOGENEZİ İLE İLGİLİ MEKANİZMALAR

BCR-ABL aracılı malign transformasyonda üç majör mekanizma etkilidir (Şekil 2.7.1.).

2.7.A. HÜCRESEL ADEZYONUN BOZULMASI

Adezyon molekülleri, hücrelerin özgül olarak dokulara yönelmelerinde, birbirlerini tanımalarında, embriyogenez, hücre büyümesi, hücre farklılaşması ve inflamasyon gibi olguların düzenlenmesinde görev alırlar.

Normal hematopoezde öncül hücreler kemik iliği stroma hücrelerine ve ilgili ekstraselüler matrikse tutunur. Matriks, fibronektin gibi stromal hücrelerce sentezlenen ve öncül hücrelerin yüzeylerinde eksprese olan reseptörler için adezif ligand fonksiyonu gören proteinlerden oluşur. Adezyon, öncül hücrelerin sitokin salgılayan hücrelerin yakınında bulunabilmesi için şarttır. Böylece hematopoetik öncüller, sitokinler ile iletilen lokal sinyalleri almak üzere birarada tutulurlar.

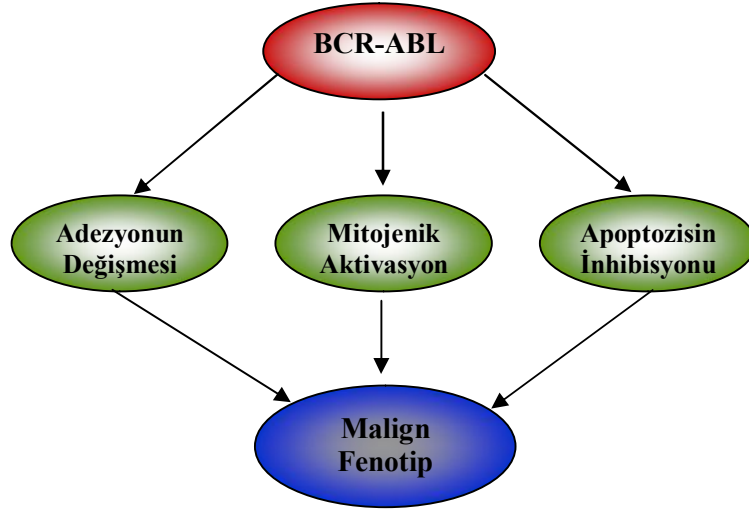
Öncül hücrelerin gelecekları de bu sinyaller ile belirlenir. Aldıkları ya da alamadıkları sitokin mesajlarına göre hayatta kalır ya da apoptoza uğrarlar. KML Ph pozitif öncül hücrelerinin kemik iliği stroma hücrelerine ve ekstraselüler matrikse adezyonları azalır. Böylece bu öncül hücreler, normal adezif progenitörlere sağlanan sinyallerden yoksun kalırlar. Stromaya adezyon hücre proliferasyonunu negatif olarak düzenler ve KML hücreleri değişen adezyon özellikleri ile bu düzenden kaçış gösterirler.

2.7.B. APOPTOZİSİN İNHİBİSYONU

Apoptozis, hücrenin yaşam çemberi boyunca yapım-yıkım dengesinin sürdürülmesini sağlar. Genetik olarak planlanmış hücre ölümü olarak tanımlanmış apoptozis, belirli bir hücre klonunun genişlemesini sınırlar. Fare ve insan hücre hatlarına eksojen olarak BCR-ABL transfeksiyonu, büyüme faktörü geri çekilmesiyle indüklenen apoptozisi inhibe etmiştir. Ayrıca genotoksik ajanlara karşı apoptoza karşı da artmış direnç gözlenmiştir.

BCR-ABL'ın hücre hatlarında apoptozu nasıl inhibe ettiği iyi anlaşılamamıştır. Bcl-2 protein ailesinin üyeleri BCR-ABL aracılı anti-apoptoza

yardımcı olabilirler. BCR- ABL, Ras ve PI-3K aracılığıyla Bcl-2 ailesi üyelerini upregüle edebilmektedir. Bcl-2, Raf-1'in mitokondriye hedeflenmesinde ve böylece pro-apoptopik protein Bad' ın inaktivasyonunda rol oynar.



Şekil 2.7.1. Bcr-abl ile ilgili oluş mekanizmaları (Deninger 2000).

2.7.C. MİTOJENİK SİNYAL YOLAKLARININ AKTİVASYONU

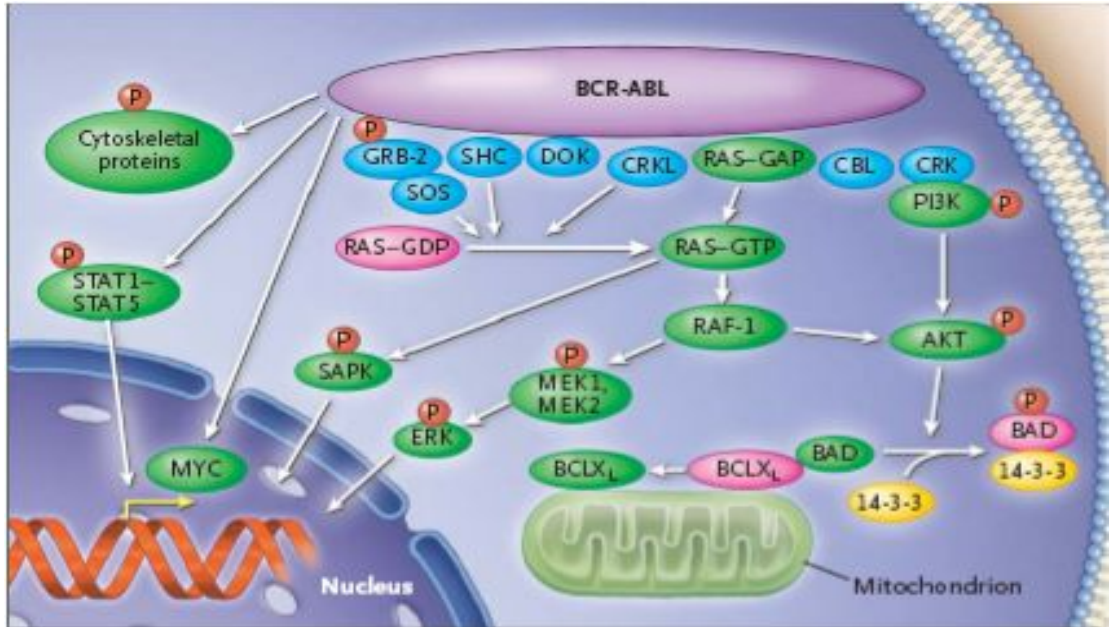
BCR-ABL mitojenik potansiyele sahip birçok sinyal yolağını aktive etmektedir (Şekil 2.7.2.).

- **Ras ve MAP kinaz yolları**

Ras ve Raf protoonkogendir. BCR-ABL, Ras sinyal yolağını aktive eden proteinlere direkt bağlanabilir.

Tirozin177 rezidüsünün otofosforilasyonu, adaptör proteini Grb-2 için bağlanma bölgesi oluşturur. Grb-2 ise SOS proteinine bağlanır. SOS proteinin inaktif GDP bağlı Ras' ı aktif GTP bağlı Ras haline getirir. İstirahat halindeki hücrelerde Ras proteinleri inaktif (Ras-GDP) halde bulunurlar. Aktive olan Ras proteini Raf-1' e yüksek afinite ile bağlanır. Aktifleşen Raf-1 MAP kinaz sinyal kaskadını aktifleştirir.

- **Jak-Stat yolağı:** Normal hücrelerde, Janus kinazların aktivasyonu (JAK) ile STAT “Signal transducer and activator of transcription” lar aktif hale gelir. Ancak BCR-ABL pozitif hücrelerde JAK’ lara ihtiyaç duymadan direkt olarak fosforile ederek transformasyona yol açar. Günümüzde yedi STAT proteini tanımlanmıştır. STAT3 ve STAT5 aktivitelerinin kontrolsüz işleyişi malign transformasyonda rol oynamaktadır. Devamlı aktif olan STAT proteini antiapoptotik yolları uyararak malign süreçte etkili olabilmektedir (20, 12).
- **PI-3 Kinaz yolağı:** Fosfoinozitid-3 kinaz (PI-3K) ailesi, büyüme ve yaşama sinyallerinin iletiminden sorumlu proteinlerdir (21). BCR-ABL pozitif hücre hatlarının ve primer hücrelerin proliferasyonu PI-3 kinaz aktivitesine bağlıdır. BCR-ABL, PI-3 kinazı Crk, Crkl, p120 aracılığıyla aktive eder. Aktive PI-3 kinaz, bir serin/treonin kinaz olan efektör Akt’ yi aktive eder. Akt aktivasyonu pro-mitojeniktir. Hücre siklusunun inhibitörü olan P27’ yi downregüle eder.
- **Myc yolağı:** Myc onkoproteininin overekspresyonu birçok insan malignitesinde gösterilmiştir. Myc’ in aktivasyonu ile BCR-ABL’ in hücresel transformasyona yol açtığı sıçan fibroblastlarında gösterilmiştir (22).



Şekil 2.7.2. BCR-ABL vasıtasıyla etkilenen sinyal yolları.

2.8. KML' DE UYGULANAN TEDAVİ YÖNTEMLERİ

Allojenik kök hücre transplantasyonu KML için bilinen tek tedavi edici yöntemdir. Ancak çoğu hasta ilerlemiş yaş (ki bu durum onların tedavinin ciddi yan etkilerini tolere edememelerine sebep olur.) veya uygun kök hücre vericisinin olmamasından dolayı bu tedaviden faydalanamaz. KML' nin oluşumu için BCR-ABL füzyon geninin gerekli olmasının ve ABL' nin tirozin kinaz aktivitesinin BCR-ABL' nin transformasyonu için gerekli olduğunun keşfedilmesi ABL kinazı tedavi için dikkat çekici bir hedef haline getirmiştir. KML tedavisinde öncelikle lökosit sayısı azaltılmalı ve küratif tedaviye geçilmelidir.

Günümüzde bilinen en iyi tedavi şekli genç hastalarda %100 HLA-uygun verici varlığında Allojenik hematopoetik kök hücre naklidir.

2.8.A. Konvansiyonel Kemoterapi

2.8.A.1. Hidroksiüre: Ribonükleotid redüktaz inhibitörüdür. Lökosit sayısını hızlıca düşürür, ciddi bir yan etkisi yoktur, iyi tolere edilir. İlaç kesilince etkisi hemen sonlanır. Ph kromozomunu negatifleştirmez.

2.8.A.2. Busulfan: Günümüzde pek kullanılmamaktadır. Ciddi yan etkileri vardır. Hidroksi üreye göre etkisi geç başlar ve geç sonlanır.

2.8.B. Küratif Tedavi

Günümüzde 3 tedavi seçeneği vardır. İnterferon-alfa (İFN- α), Tirozin kinaz inhibitörü (imatinib mesilat), Allojenik hematopoetik kök hücre naklidir.

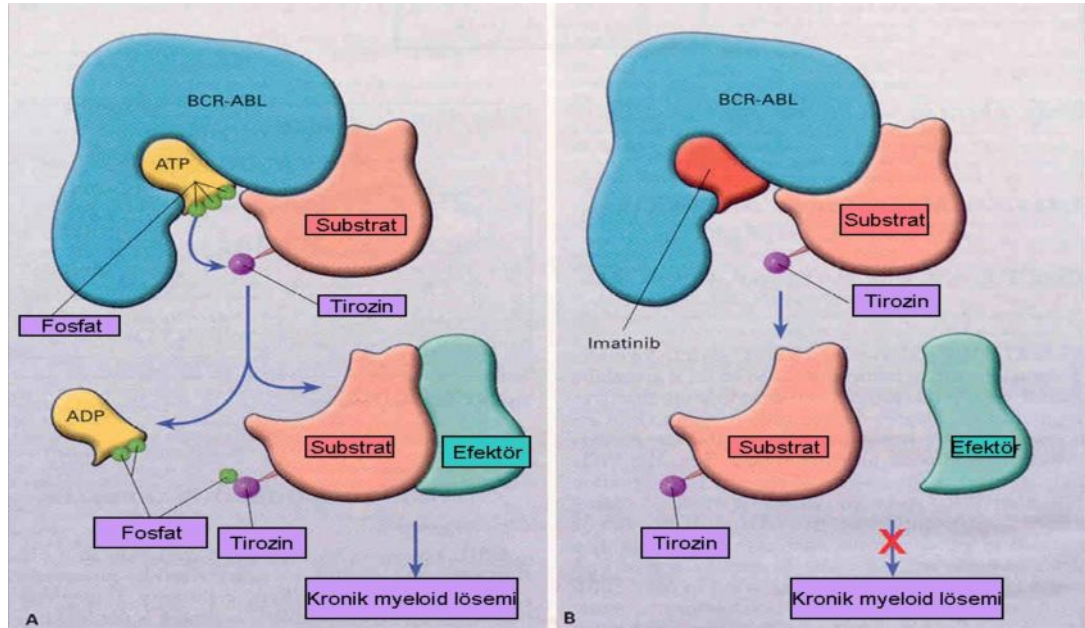
2.8.B.1. İFN- α : Allojenik kök hücre nakli olma şansı olmayan Ph pozitif KML hastaları için iyi bir tedavi seçeneği olmuştur (imatinib mesilat kullanıma girmeden önce). İFN- α ' nın KML' deki etki mekanizması tam bilinmemektedir. Antiproliferatif, antianjiogenik, immun modulator ve stromal hücreler ile adhezyon molekülleri arasındaki ilişkiyi düzenler. İFN- α tek başına veya diğer ajanlarla birlikte uygulanan tedavi şeklidir (23, 51).

2.8.B.2. İmanitib Mesilat: 2-fenil-aminopirimidin türevidir. BCR-ABL' nin tirozin kinaz aktivitesini inhibe eder. İmanitib mesilat, enzimatik bölgesinde ATP ile yarışa girerek, ABL'in kinaz aktivitesini bloke eder. İmanitib mesilat BCR-ABL' i eksprese eden hücreler için seçici toksite gösterir. İFN- α ' ya göre yan etkileri daha az ve sitogenetik yanıt oranı daha yüksektir. İmanitib mesilat kullanımı ile karşılaşılan en önemli sorun hastalarda belli bir süre sonra tedaviye direncin gelişmesidir. Dirence yol açan mekanizmalar, BCR-ABL amplifikasyonu, BCR-ABL'in kinaz bölgesinde meydana gelen nokta mutasyonları, yeni sitogenetik anormallikler, P-gp'nin aşırı ekspresyonudur. İmanitib direnci ile ilgili çeşitli mutasyonlar rapor edilmiştir bunlardan bazılarında T315I threoninin izolösine dönüşmesini sağlayan, M351T' de metioninin threonine, E255K' da glutamik asitinin lizine dönüşmesini sağlayan mutasyonları örnek olarak verebiliriz (5). Direncin üstesinden gelmek için ya ilaç dozajı artırılmalı ya da etkili ilaç kombinasyonları kullanmak gerekir.

Çalışmamızdaki hasta grubunda bir hastaya İFN- α başlanmış daha sonra imanitib'e başlanmıştır. İmanitib KML hastalarında yaygın kullanıldığından etki mekanizması şu şekildedir.

İmanitib mesilatın etki mekanizması;

İmanitib, BCR-ABL' in ATP tarafından doldurulan bağlanma cebine bağlanarak normalde ATP tarafından karşılanan fosfat gruplarının eksikliğine ve böylece substrat fosforilasyonun engellenmesine yol açar. Fosforillenmemiş tirozine sahip substratlar , efektör moleküllere bağlanmak için gerekli şekli alamazlar. İmanitib, Bcr-Abl proteininin inaktif konformasyonda kalmasını indükler, ATP'den fosfat transferini engeller ve aşağı yönde sinyal iletim yollarını bloke ederek büyüme duraklamasına ya da apoptozise neden olur (24, 25, 26). Şekil (2.8.2.).



Şekil 2.8.2. İmanitib mesilatın etki mekanizması

2.8.B.3. Allojenik Hematopoetik Kök Hücre Nakli: HLA-uygun verici genç hastalar için en uygun tedavi şeklidir. Özellikle erken kronik faz ve düşük risk grubundaki hastalarda uzun dönem hastalısız ve uzun sağkalım gözlenmektedir. Nakil sonra erken relapsı tayin etme MRD testleri oldukça önem kazanmaktadır. Hastalarda nakil sonra 6 aylık dönemde RT-PZT ile BCR-ABL transkriptleri saptanırsa relaps riski yüksek gruptadırlar. Moleküler relaps geliştiren hastalarda birkaç sonra sitogenetik relaps ve hematolojik relaps gözlenir (27).

Tedaviye yanıt klinik, hematolojik ve sitogenetik düzeyde değerlendirilir. Klinik tam yanıt KML' nin neden olduğu semptomların kaybolması, hematolojik tam yanıt periferik kan değerlerinin normale dönmesi, sitogenetik yanıt ise; Ph kromozom oranının tespit edilmesi ile değerlendirilir. Tam cevap (CCR) %100 Ph-negatif metafaz, Major cevap(MCR) 65-99 % Ph-negatif metafaz, 10-64 %Ph-negatif metafaz minor cevap(mCR), %90' dan fazla Ph-pozitif metafaz cevapsız (NCR) şeklinde değerlendirilir. Moleküler yanıt ise, RT-PZT yöntemi ile BCR-ABL transkriplerinin saptanamamasıdır (28, 29 ,30).

Tanıda vücuttaki lösemi hücrelerinin sayısı yaklaşık 10^{12} dir. Tam remisyonu (CCR) sağlamış hastalar hala 10^9 lösemi hücrelerini vücutlarında barındırırlar. Eğer kemoterapi yada Allojenik kök hücre nakli ile yok edilemezse bu hücreler relapsın sorumludur (5, 31).

Lösemi tedavisinde son yıllardaki gelişmelere rağmen, relapsın varlığı hala ciddi bir problem olarak devam etmektedir. Hastaya uygulanan tedaviden kaçan ve relapsa neden olan hücrelerin varlığı minimal rezidüel hastalık (MRD) tanımlamasını gündeme getirmiş ve tedavi sonrası relapsa yol açan en önemli nedenin MRD olduğunu düşündürmüştür. Remisyonda görülen hücrelerde MRD' in belirlenmesi klinik relapsın tesbitinde önemli rol üstlenmektedir. Kemik iliği transplantasyonu sonrası hastanın izlenmesi, relapsın erken safhada yakalanması açısından çok önemli olmaktadır. Yine kemoterapi alan hastaların remisyonunun gerçek olup olmadığının tesbiti bu tekniklerin güvenilirliğine bağlıdır. MRD' nin tesbiti, hastalığın prognozunun izlenmesi ve relapsa girdiğinde tedbirlerin alınması için oldukça önemlidir (32).

MRD' in tespiti için kullanılan metotlar ve hassasiyetleri aşağıdaki gibidir:

Metot	hedef	materyal	hassasiyet%
Konvansiyonal			
Sitogenetik	Ph kromozomu	Kİ	1- 10
FISH	BCR ve ABL'in yanyana konulması	Kİ / PK	0,2- 5
Southern Blot	M-bcr	Kİ / PK	1- 10
Western Blot	BCR-ABL proteini	Kİ / PK	0,2- 1
Kantitatif RT-PCR	BCR-ABL mRNA	Kİ / PK	0,001- 0,0001

Kİ: Kemik iliği PK: Periferik kan

Minimal rezidüel hastalığın değerlendirilmesi için kullanılan tekniklerden biri olan konvansiyonal sitogenetikdir. 100 normal hücrede bir lösemi hücresi tespit edilebilir. Tedavi süresince meydana gelebilecek genomik değişiklikleri belirlemek ve sitogenetik remisyonu tanımlamak için seçilebilir ancak hassasiyeti düşüktür. Southern Blot ve Western Blot hassasiyetleri düşük ve oldukça zahmetli metotlardır.

Daha hassas bir izleme için FİSH ya da kantitatif RT-PZT teknikleri önerilmektedir (32, 33, 36, 43).

Kantitatif RT-PZT Tekniği; Materyalin , ilk miktarını kantite eden spesifik, duyarlı, tekrarlanabilir ve reaksiyon sırasındaki amplikon üretimini, floresan yayılımını indikatör olarak kullanarak ölçüm yapılan bir metottur. Hassasiyeti oldukça yüksek bir metottur, 10^6 normal hücredeki bir malign hücreyi tespit edebilmektedir. Amplikonun tespitinde iki materyal kullanılır. Floresan prob lar ve DNA' ya bağlanan ajanlardır. Çalışmamızda floresan prob olarak Taqman prob kullanılmıştır. Taqman prob metotunda örneklerdeki cDNA hedef sekans miktarının ölçümünü yaparken Taq Polimerazın 5' ekzonükleaz aktivitesi kullanılır. Prob 5' ucuna bağlı haberci bir boya, [genellikle de FAM (6-karboksifloresein)], 3' ucuna baskılayıcı boya [TAMRA (karboksitetrametilrodamin) en tipik olarak bilinen baskılayıcı boyadır] içerir. Taq Polimeraz Taqman probun bağlı olduğu hedef bölgeyi çoğaltmaya başladığında, 5' nükleaz aktivitesi probu kesmeye başlar. Baskılayıcı boya haberci boyanın floresan emisyonunu prob bozulmadığında önleyebilir. Reaksiyon sırasında probun bölünmesi haberci ve baskılayıcı boyayı birbirinden ayırır. Böylece haberci boyanın her döngüde serbest kalması ile doğru orantılı olarak artan floresan ışımaya yol açar. PZT ürünlerinin çoğalması haberci boyanın floresanda artması ile saptanır ve CCD kamera gibi dijital görüntü sistemleri kullanılarak görüntü oluşturulur (34).

Eşik değeri veya Ct değeri, PZT ürünlerinin çoğalmasında önemli artışın olduğu zamanki sıklıktır. Ct, log-lineer fazda PZT ürününün eksponansiyal büyümesi ile sinyal artmasının başlama belirtisidir ve bu faz reaksiyon hakkında en kullanışlı bilgiyi sağlar. Kantitasyon için en önemli parametre Ct değeridir. Ct değeri ile kopya sayısı birbiriyle ters orantılıdır. Yüksek kopya sayısı olan örneğin Ct değeri düşüktür (35,14).

Yapılan allojenik kök hücre naklinden sonra kandaki BCR-ABL transkript sayısının ölçülmesi relaps riskini belirlemede önemlidir. KML' li hastalarda imanitib mesilat standart tedavi olmuştur. İmanitib, BCR-ABL geninin tirozin kinaz aktivitesinin güçlü ve seçici inhibitörüdür. Yapılan çalışmalarda imanitib kullanan hastalarda güçlü cevap ve sabit remisyonda kalma rapor edilmiştir, yalnız kronik fazda bazı hastalarda major sitogenetik cevabı başaramama ya da kaybetme, ve

akselere/ blastik faza ilerleme ya da relaps gözlemlenmiştir. Bu da imanitibe direnci araştırmacılar için ilgi çekici hale getirmiştir. İmanitibe direncin çeşitli mekanizmalarla ilişkisi olabilir bu durum hala bir fenomendir: BCR-ABL geninin overekspresyonu ve amplifikasyonu, ATP-bağlanma bölgesindeki nokta mutasyonları ile yeniden kinaz aktivasyonu kazanması ya da MDR1 geninin overekspresyonunu ilaç dirençliliğinde düşünölebilecek seçeneklerdir.

2.9. ÇOKLU İLAÇ DİRENCİ

Kanserin tedavisinde kemoterapinin çok önemli bir yeri vardır. Ancak normal doku ve hücrelere olan yan etkileri yanısıra kemoterapinin tedavi etkinliğini sınırlayıcı en önemli faktörlerden biride kemoterapötiklere dirençli kanser hücre varyantlarıdır. Bu varyant hücreler spesifik tek bir ilaca direnç gösterebilecekleri gibi değişik kimyasal yapılardaki ve değişik etki mekanizmalarına sahip birbirinden farklı birçok ilaca direnç gösterebilmektedir. Kanser tedavisinde kemoterapi başarısızlığının önde gelen nedenlerinden biri çoklu ilaç direncidir.

İnvitro ve in-vivo çalışmalarla çoklu ilaç direncinden sorumlu farklı birçok mekanizma ortaya çıkmaktadır.

Apoptotik mekanizmalardaki bozukluk, ilacın hücre içi konsantrasyonunun azalması, ilacın aktivasyonunun bozulması, ilacın katabolizmasının hızlanması, hücre içinde hedef enzim konsantrasyonunun azalması ya da yapısal değişikliğe uğraması, DNA tamir mekanizmalarının hızlanması bugün çoklu ilaç direncinde en sıklıkla rol oynadığı düşünölen mekanizmaları oluşturmaktadır (37).

MDR ilk kez memeli hücrelerinde 1970 yılında keşfedilmiştir. Çoklu ilaç direncinde en bilinen mekanizma, insan MDR1 geni tarafından kodlanan 170 kDa ağırlığında bir transmembran proteini olan p-glikoproteininin (P-gp) aşırı ekspresyonudur. P-gp ilk kez 1976 yılında Ling ve Juliano tarafından rapor edilmiştir. P-gp, ATP- bağımlı bir pompa olarak iş görür ve hücre içi ilaç konsantrasyonunu sitotoksik seviyenin altında tutar.(38)

P-gp; ‘‘ATP-binding cassette (ABC)’’ ailesinin bir üyesidir. ABCB1 geni tarafından kodlanır buna yaygın olarak MDR1 geni de denilmektedir. 7 no’ lu kromozomun

uzun kolunun 21-31 bandında yeralır (7q21-31) ve 28 ekzona sahiptir. MDR gen ailesinin insanda 2 üyesi bulunmaktadır, MDR1 ve MDR3 şeklindedir, farelerde ise *mdr1a*, *mdr1b*, *mdr2* olmak üzere 3 gen bulunmaktadır. İnsandaki MDR1 ile rodentlerdeki *mdr1a/mdr1b* aynı fonksiyona sahiptir, ilacın dışarı transportunu sağlar. P-gp '*molecular vacuum cleaner*' olarak iş görür, bu modele göre P-gp substratını hücrenin içinden membrana doğru basit difüzyonla hareket ettirir (39).

P-glikoprotein yapısı, 6 transmembran bölüm ve nükleotid bağlama sekansı içeren homolog iki yarıdan oluşur, 1280 aminoasite sahiptir. Molekülün N-terminalinin yarısının ekstrasellüler bölgesinde tek glikolizasyon bölgesi vardır. P-glikoprotein, adenosin-3-fosfat' a (ATP) bağımlı bir protein olup, ilaçların hücreden dışarı atım pompası olarak çalışmakta ve hücre içi ilaç düzeyini düşük seviyede tutarak, klasik MDR olarak adlandırılan, antrasiklinler, epipodofilotoksinler, aktinomisin D, vinka alkaloidleri ve bazı alkilleyici ajanlara karşı dirence neden olmaktadır.

P-gp; yalnızca tümör dokusu ile sınırlı değildir normal dokularda da eksprese olur. Karaciğerde, kolonda, adrenal bezinde, jejunum ve pankreasta, böbrekte, hematopoetik kök hücrelerde, periferik kanda mononükleer hücrelerde, olgun makrofajlarda, T ve B lenfositlerde P-gp ekspresyonu vardır. MDR1 mRNA' sını birkaç lenfosit soylarında da yüksek seviyede CD56⁺ hücrelerinde, düşük seviyede ise CD8⁺, CD4⁺, CD15⁺, CD19⁺, CD14⁺ hücrelerinde bulunmuştur(40).

P-gp oldukça geniş substrat spesifikliğine sahiptir. Bu substratlar genellikle hidrofobik ve amfipatiktir. Bu substratların içinde bazı antikanser ilaçlar (imatinib mesilat gibi), HIV proteaz inhibitörleri, immünosüpresanlar, antibiyotikler, antihistaminiklerdir.

P-gp' in genetik bazlı veya sonradan edinilmiş değişimlerle aktivitesinin değişmesi toksinlere maruz kalmayı artırabilir bu mekanizma vasıtasıyla da tümör oluşma riskinin artmasına katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

P-gp' nin hangi kanserlerde ilaç direncinden sorumlu olduğunun ortaya konması için yapılmış çalışmaların çoğu hematopoetik kanserler üzerinedir. Lösemi, lenfoma ve multiple myelomada başta düşük ekspresyon göstermekle birlikte özellikle kemoterapi sonrası ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. P-gp ile AML hastalarında çok sayıda çalışma yapılmış olup AML hastalarının 1/3' ünde tanı anında, %50' sinde

ise ilk nükste yüksek seviyelerde P-gp ekspresyonunun olduğu gösterilmiştir. AML hastalarında P-gp ekspresyon seviyesinin nüks ihtimali ile korele olduğu bildirilmiştir. KML hastalarının blast krizi döneminde P-gp' nin aşırı ekspresyonu gözlenmiştir.

İlaçlara yanıt ve ilaçlara bağlı yan etkiler ilaç metabolize eden enzimlerdeki genetik değişikliklere bağlı olarak aynı toplumdaki bireyler arasında farklılıklar gösterir. Bu fark ilaç direnci oluşturan MDR genlerinin artmış ekspresyonuna bağlı olabilir. MDR1 geninin 26. ekzonunda tek nükleotid polimorfizmi C3435T (Ile1145 Ile) P-glikoprotein ekspresyonunu azaltmaktadır. Ayrıca MDR1 gen polimorfizmi toplumlararası farklılıklar göstermektedir. Son yıllarda MDR1 geninde 40' dan fazla SNP gösterilmiştir (41).

3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Bireyler

- Bu tez çalışması kapsamında Kronik Miyeloid Lösemi tanısı konulan 32 hastanın 17' sinde BCR-ABL ve MDR1 gen ifadelerine 0-48. ay aralığında bakılmış, MDR1 C3435T polimorfizm değerlendirilmesi 32 KML hastasında ve 36 sağlıklı bireyde çalışılmıştır.
- 17 KML hastasının klinik değerlendirmeleri Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Onkoloji Anabilim Dalında yapılmıştır.
- Tüm çalışmalar kişilerden 'Bilgilendirilmiş Onam Formu' ve H.Ü. Tıbbi, Cerrahi ve İlaç Araştırmaları Etik Kurulu' nun Onayı alınarak (20 07 2006 tarihli FON 06/30-6 karar no) gerçekleştirilmiştir.

3.2. Çalışmada Kullanılan Malzemeler

RNA izolasyonu için İnvitex marka RNA izolasyon kiti kullanıldı.

Yıkama solusyonu 1; Kaotropik tuz, izoamilalkol, etanol, DEPC' li ddH₂O

Yıkama solusyonu 2; Etanol, izoamilalkol, DEPC' li ddH₂O

Elüsyon solusyonu (EL); DEPC' le muamele edilmiş dH₂O içerir.

Lizis Tampon; 2-merkaptoetanol, EDTA, DEPC'li ddH₂O, kaotropik tuz içerir.

cDNA sentezi

10X Reverz Transkripsiyon tamponu

MgCl₂ 25mM

dNTP miks 10mM(her birinden (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 2,5 mM)

10X Random Hekzamer 50µM, 50 nmol

RNAaz inhibitör(2000U) 20 ünite/µl

Multiscrib Reverz transkriptaz, (5000U)50ünite/µl

dH₂O

M(9;22), m(9;22), MDR1 tesbiti;

MgCl₂ 50mM

10 X PCR Tampon

10 X Pasif referans boya solusyonu

AmpliTaq Gold DNA Polimeraz (1250U) 5 ünite/ µl

Her bir test için 5 X miks (her bir çalışmaya spesifik primerleri ve probu içeren karışım)

MDR1 Polimorfizmi ;

PGX-HIV Strip kiti kullanıldı. Kitin içindeki solusyonlar; Hibridizasyon buffer, Yıkama solusyonu A, Yıkama solusyonu B, Denatürasyon solusyonu, Renk Artırıcı, Konjugat solusyonu (Streptavidin-alkalin fosfataz içerir.), Amplifikasyon miski(içinde çalışılacak bölgeye özgü biyotinlenmiş primerleri içerir.), Taq dilusyon buffer, Taq Polimeraz' dır.

Kandan DNA izolasyonu için İnvitek marka izolasyon kiti kullanıldı. Kitin içindeki solusyonlar; Bağlama solusyonu, Yıkama solusyonu 1, Yıkama solusyonu 2, Proteinaz K, Lizis Buffer A, Elüsyon Buffer D şeklindedir.

Kantitasyondaki ana hedef, gen anlatımının ölçülmesi olduğundan kantitatif PZT yöntemi, mRNA üzerinden gerçekleştirilir. RNA her türlü dokudan elde edilmekle birlikte hematolojide kullanımı en kolay materyal kandır. Hastalardan alınan periferik kan örneklerinden RNA izolasyonu aşağıdaki protokolle göre yapılmıştır.

3.2.A. KANDAN RNA İZOLASYON PROTOKOLÜ

Eritrositlerin parçalanması

- 15 ml' lik tüp içerisine 10 ml soğuk EL konulur sonra 1- 1,5 ml kan eklenir. Buz içinde 15 dk. inkübe edilir.

Lökositlerin Toplanması

- 4000 rpm' de 5 dk +4 °C santrifüj edilir, süpernatant atılır.
- 5 ml soğuk EL pellet üzerine eklenir.
- Vortekslenir ve 4000 rpm de 5 dk. +4 derecede santrifüj edilir.
- Tüm süpernatant uzaklaştırılır.

Lökositlerin parçalanması.

- 900 µl lizis Solusyon DCT hücre peleti üzerine eklenir, vortekslenir.. 10dk. Oda ısısında inkübe edilir.

Genomik DNA'nın uzaklaştırılması

- Örnek 12,000 rpm de 18 °C derecede 30 sn santrifüj edilir.
- Süpernatant yeni bir tüpe aktarılır.
- Total RNA'nın spin filtreye bağlanması
- 800 µl %70 'lik etanol süpernatant üzerine eklenir.

- Yeni bir tüpe spin filtre yerleştirilir.
- Karışımdan 850 µl spin filtreye aktarılır.
- 10,000 rpm de 1dk. Santrifüj edilir.

Spin filtrenin 1. yıkanması (18 °C)

- 500 µl Yıkama solusyonu 1 spin filtre içine aktarılır ve 10,000 rpm' de 30 sn santrifüj edilir. Filtre tüpe yerleştirilir.

Spin filtrenin 2. yıkanması (18 °C)

- 750 µl Yıkama solusyonu 2 spin filtre içine aktarılır ve 10,000 rpm' de 30 sn santrifüj edilir. Filtre tüpe yerleştirilir

Spin filtrenin kurutulması

- Etanol artıklarını uzaklaştırmak için filtreyi tek başına 12,000rpm' de 3 dk. Santrifüj edilir.

Total RNA'nın elde edilmesi

- Spin filtre tüp içine yerleştirilir ve 30-60µl (arasında) Elution Buffer R spin filtreye eklenir.
- Oda ısısında 2 dk. inkübe edilir ve 8,000 rpm'de , 18 °C'de, 1 dk santrifüj edilir
- Filtre atılır ve RNA buz üzerinde saklanır.

(Bu yöntemle 1-5 µg RNA elde edilir.)

Total RNA elde edildikten sonra RNA'dan DNA'ya çevirim için cDNA protokolü uygulandı.

3.2.B. cDNA PROTOKOLÜ

<u>Reaktifler</u>	<u>Miktar (1 örnek için)</u>
10X Revers Transkripsiyon buffer	5.0 µl
MgCl ₂	11.0 µl
25X dNTP	2.5 µl
10X Random Hekzamer	2.5 µl
RNAaz inhibitor	3.0 µl
<i>Multiscribe</i> Reverz transkriptaz, 50 U/µl	1.25 µl
dH ₂ O	14.75 µl
Toplam hacim	40.0 µl

Toplam hacim 40 µl olacak şekilde hazırlanıp üzerine 10 µl elde edilen total RNA ilave edilmiştir. Aşağıdaki siklus ve derecelerde ABI 9700 *Thermal Cycler* cihazında cDNA elde etme işlemi gerçekleştirilmiştir. Çalışma gerçekleştirilene kadar örnekler +4 °C’ de saklanmıştır.

	Sıcaklık	Süre
1.	25 °C	10 dakika
2.	48 °C	60 dakika
3.	4 °C	Sonsuz

3.2.C. M(9;22) P210^{BCR-ABL} ÇALIŞMA PROTOKOLÜ

Reaksiyon Karışımı

Reaktif	Miktar	Final Konsantrasyonu
Steril distile su	8,7 µl	-----
10 x PCR Buffer	2,5 µl	1X
10 X Pasif referans boya solusyonu	2,5 µl	1X
MgCl ₂	4 µl	8 mM
5 x karışım	5 µl	1X
AmpliTaq Gold DNA polimeraz	0,3 µl	1.5 Ünite (reaksiyon başına)
<i>cDNA</i>	2 µl	2 µl
Toplam Hacim	25 µl	

cDNA miktarları spektrofotometrede ölçülerek 50 ng' a dilue edilmiştir. Kantitatif çalışma, P210^{BCR-ABL} M(9;22), P190^{BCR-ABL} m(9;22), MDR1 genlerine özgü 8 standartla ve negatif kontrolle birlikte yapılmıştır. Standartlar, kopye sayısı belli olan pozitif kontrollerdir. Negatif kontrolde amplifikasyon eğrisi görülmemelidir. Sadece β -2M' de 8 yerine 3 standart kullanılmıştır.

P210^{BCR-ABL} ve P190^{BCR-ABL} için pozitif kontrol değerleri 100.000, 10.000, 2500, 500, 100, 50, 25, 5 moleküldür. MDR1' in pozitif kontrolleri 1.000.000, 250.000, 25.000, 5.000, 1.000, 250, 100,25 molekül, β -2M 'in pozitif kontrolleri 100.000, 1.000.000, 10.000.000 molekül şeklindedir. Negatif kontrol 23 μ l + 2 μ l dH₂O olacak şekilde hazırlanmıştır.

Her gen ekspresyonunun ölçümü için gene özgü protokolle hazırlanan karışımdan 23 μ l çalışma plate'indeki çalışılacak tüm kuyucuklara ilave edilip üzerine 2 μ l hastaların cDNA' ları eklenir (23 μ l karışım + 2 μ l hasta örneği) . Pozitif kontrollere 25 μ l karışımdan ilave edilir. M(9;22), m(9;22), MDR1, β - 2 Mikroglobulin için aşağıdaki PZT programı seçilmiştir. Çalışmamızda normalizasyon için referans gen olarak β -2 mikroglobulin kullanılmıştır.

<i>Sıcaklık</i>	<i>Süre</i>	
50 °C	2 dakika	
95 °C	10 dakika	} 40 döngü
95 °C	15 saniye	
60 °C	1 dakika	
4 °C	Sonsuz	

3.2.D. m(9;22) P190^{BCR-ABL} ÇALIŞMA PROTOKOLÜ

Reaksiyon Karışımı

Reaktif	Miktar	Final Konsantrasyonu
Steril distile su	9,8 µl	-----
10 x PCR Buffer	2,5 µl	1X
10X Pasif referans boya solusyonu	2,5 µl	1X
MgCl ₂	3 µl	6 mM
5 x Miks (dNTP, primerler, prob)	5 µl	200 nM, 80 nM
AmpliTaq Gold DNA polimeraz	0,2 µl	1 Ünite (reaksiyon başına)
<i>cDNA</i>	2 µl	2 µl
Toplam Hacim	25 µl	

3.2.E. β-2Mikroglobulin ÇALIŞMA PROTOKOLÜ

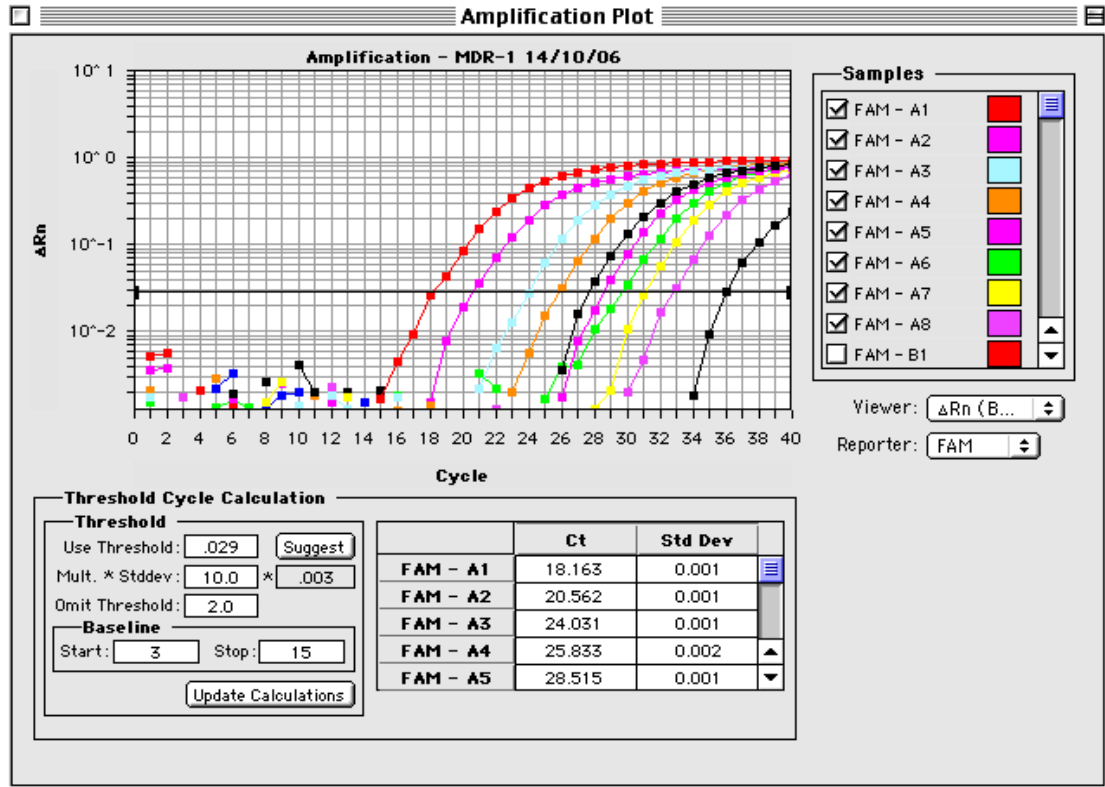
Reaksiyon Karışımı

Reaktif	Miktar
Steril distile su	12,5 µl
2X Master Miks	5,75 µl
Forward Primer	0,75 µl
Reverse Primer	0,75 µl
Prob	0,25 µl
cDNA	5,0 µl
Toplam hacim	25,0 µl

3.2.F. MDR1 ÇALIŞMA PROTOKOLÜ

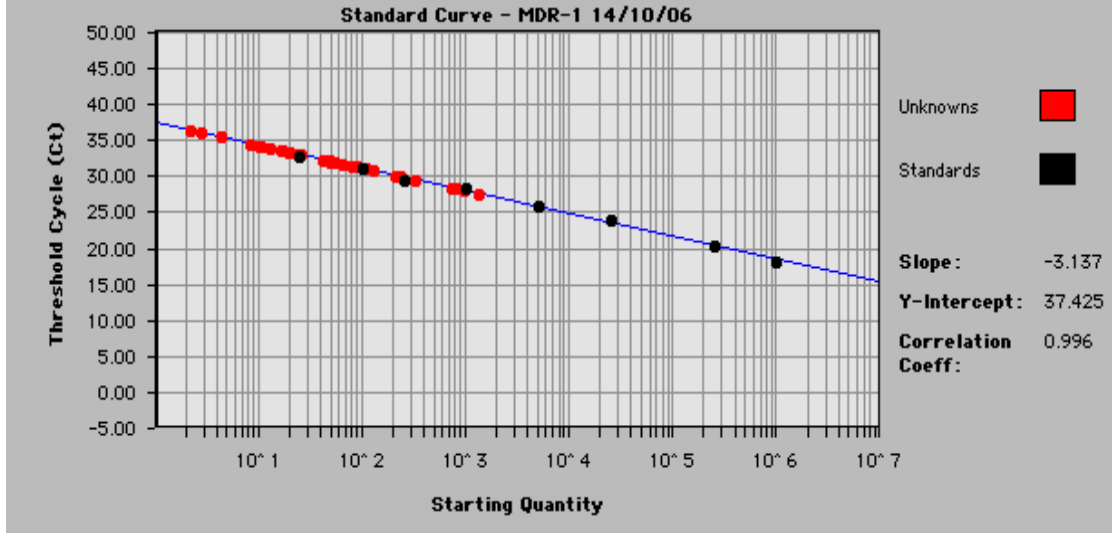
Reaksiyon Karışımı

Reaktif	Miktar	Final Konsantrasyonu
Steril distile su	9,8 µl	-----
10 x PCR Buffer	2,5 µl	1X
10 X Pasif referans boya solusyonu	2,5 µl	1X
MgCl ₂	3 µl	6 mM
5 x Miks (dNTP, primerler, prob)	5 µl	1X
AmpliTaq Gold DNA polimeraz	0,2 µl	1 Ünite (reaksiyon başına)
<i>cDNA</i>	2 µl	2 µl
Toplam Hacim	25 µl	



Şekil 9. Çalışma sonrası amplifikasyon eğrilerinin gösterildiği pencere.

Her reaksiyon için ve her amplifikasyon siklusunda elde edilen floresan miktarını gösterir. Eşik değeri (Ct) X düzleminde, yatay olarak gösterilmiştir. Siyah amplifikasyon eğrileri orta ve düşük düzeydeki gen ifadelerini göstermektedir. (Hastalara ait değerlerdir). Negatif kontrolde amplifikasyon eğrisi görülmemelidir. Mavi noktalar negatif kontrolü göstermektedir. Şekil 9’da oklarla gösterilmeyen eğriler ise pozitif kontroller aittir. Pozitif kontrollerin molekül (kopye) sayısı ve artışın olduğu Ct değerine göre standart eğri çizilerek kantitatif hesaplama yapılmaktadır. Standart eğri Şekil 10’ da gösterilmiştir.



Şekil 10. Standart eğri

Kantitasyon hesaplamalarında en az üç standart kullanılarak korelasyon eğrisi çizilmelidir. Standart eğrinin slope değeri -2 ile -4,7 aralığında korelasyon katsayısının (r) değerinin de 0,95 ile 0,999 aralığında olması gereklidir.

3.3. MDR1 POLİMORFİZMİ

MDR1 Polimorfizmi çalışmada PGX-HIV marka stript testi kullanılmıştır. DNA izolasyonu için İnvitek'in izolasyon kiti, Hibridizasyon Cihazı olarak Oto-Lipa cihazı kullanılmıştır.

3.3.A. Kandan DNA İzolasyonu

1. 200 µl kan örneği, 200 µl lizis buffer A ve 20 µl Proteinaz K tüpe konulur. 10 dakika 56°C'de inkübasyona bırakılır.
2. 400 µl Binding Buffer tüpe eklenir, Sıvının tamamı filtrelili tüpe aktarılır , 3 dk oda ısısında inkübe edilir ve 12 000 rpm' de 2 dk santrifüj edilir.
3. Toplama tüpü değiştirilir, filtre üzerine 500 µl Yıkama solusyonu 1 eklenir ve 12 000 rpm' de 1 dk santrifüj edilir.
4. Toplama tüpü değiştirilir, filtre üzerine 800 µl Yıkama solusyonu 2 eklenir ve 12 000 rpm' de 1 dk santrafuj edilir. Filtre boş toplama tüpüne aktarılır en yüksek hızda 4 dk santrifüj edilerek alkolden arındırılır.
5. Filtre ependorf tüpe aktarılır ve alkolün tamamen uzaklaşması için 3 dk kapak açık biçimde oda sıcaklığında inkübe edilir. Filtre membranının tam ortasına ısıtılmış 56 °C' deki 200 µl Elüsyon Buffer-D eklenir, 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilir. 10 000 rpm'de 1dk santrafuj edilir ve filtre atılarak, örnek alınır ve analiz edilene kadar -20 °C' de saklanır.

İzolasyon işleminden sonra uygun PZT koşulları belirlendikten sonra polimeraz zincir reaksiyonu uygulandı.

Enzim Hazırlama:

Taq DNA polimeraz (5U/µl) : 0,4 µl

Taq DNA Buffer : 4,6 µl

+-----

5,0 µl

Reaktif Hazırlama	
Amplifikasyon Miks	15 µl
Hazırlanan Enzim (1U)	5 µl
Örnek	5 µl
Toplam PZT reaksiyon Hacmi	25 µl

PZT Protokolü

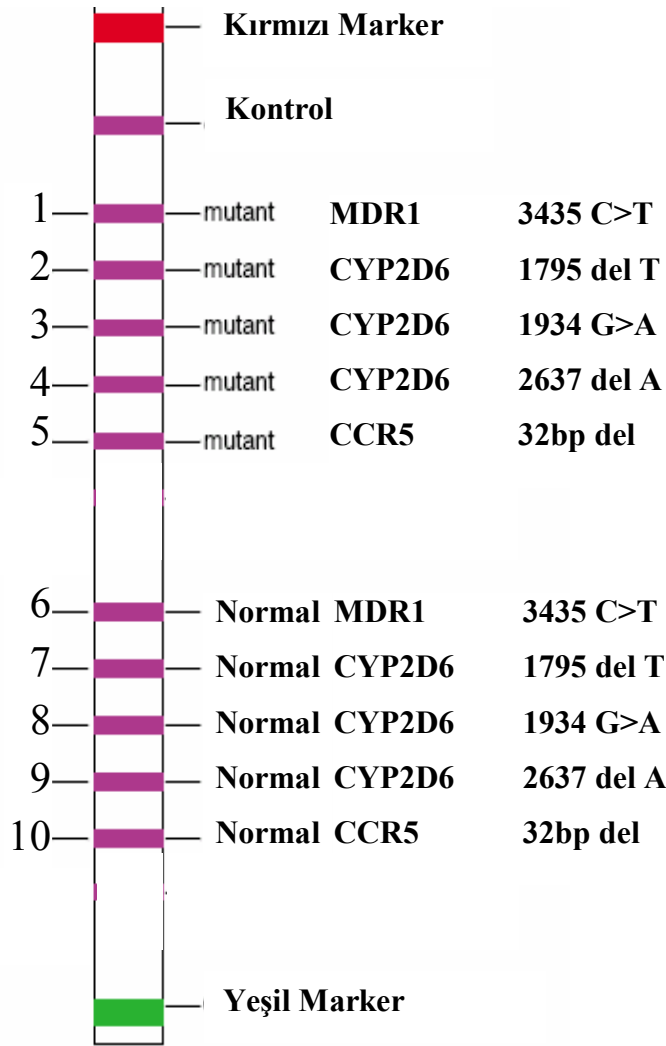
94 °C	-----	02:00 dakika	} 35 Döngü
94 °C	-----	00:15 saniye	
58 °C	-----	00:30 saniye	
72 °C	-----	00:30 saniye	
72 °C	-----	03:00 dakika	
4 °C	-----	Sonsuz	

PZT işlemi ABI 9700 cihazında yapılmış olup MDR1 ürünü 81 baz çiftidir. PZT ile çoğaltılan uygun hedef bölgesi ürünleri hibridizasyon için Oto-Lipa cihazına yüklendi.

3.3.B. Hibridizasyon

1. 10 µl denatürasyon solüsyonu örneklerin çalışılacağı kuyucuklarının köşelerine pipetlenir. 10 µl PZR ile çoğaltılmış örnekler denatürasyon solüsyonuna pipetlenerek karıştırılır ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilir.
2. Örneklerin üzerine önceden ısıtılmış 1 ml hibridizasyon solüsyonu konulur ve homojen renk elde edilene kadar yavaşça çalkalanır.
3. Stripler dikkatlice plate kuyularına yerleştirilir.
4. Stripler 45 °C'de 30 dakika çalkalanarak inkübe edilir.
5. Hibridizasyon solüsyonu pipet kullanılarak tamamen kuyucuklardan boşaltılır.
6. Her bir kuyucuğa 1 ml Yıkama solusyonu I eklenir 1 dakika çalkalanarak boşaltılır ve 1 ml WASH A solüsyonu ile 15 dakika 45 °C'de çalkalanarak inkübe edilir.
7. Kuyucuklardan Yıkama solusyonu I boşaltılır ve yeniden 1 ml WASH A solüsyonu ile 15 dakika 45 °C'de çalkalanarak inkübe edilir. Sonra Yıkama solusyonu I tamamen boşaltılır.
8. Her bir kuyucuğa 1 ml konjugat solusyonu eklenir ve 15 dakika oda sıcaklığında çalkalanarak inkübe edilir.
9. Her bir kuyucuğa 1 ml Yıkama solusyonu II solusyonu eklenir 1 dakika çalkalanarak boşaltılır ve 1 ml Yıkama solusyonu II 5 dakika oda sıcaklığında çalkalanarak inkübe edilir.
10. Kuyucuklardan Yıkama solusyonu II boşaltılır ve yeniden 1 ml Yıkama solusyonu II solüsyonu ile 5 dakika oda sıcaklığında çalkalanarak inkübe edilir
11. Her bir strip üzerine 1 ml Konjugat solüsyonu eklenir ve karanlıkta test koşullarına bağlı olarak bantların oluşmasına göre en az 15 dakika çalkalanarak inkübe edilir.
12. Bant oluşma işlemi striplerin iki kez distile su ile yıkanması ile sonlandırılır.
13. Son olarak, stripler kuyucuklardan alınarak kurutma kağıdının arasına konularak kurutulur ve değerlendirme aşamasına geçilir.

Kandan genomik DNA elde edilir ve biyotin işaretli primerlerin kullanıldığı multipleks PZT ile mutasyonlu ve normal gen bölgeleri çoğaltılır. PZT ürünleri nitroselülaz membran üzerindeki allel-spesifik fragmentlere hibridize edildikten sonra görünür hale getirilerek değerlendirme yapıldı (Şekil 3.3.). Yapılan bu değerlendirme, yalnız normal MDR1’ de bant varsa CC genotipi, hem normal MDR1’ de hem de mutant MDR1’ de bant varsa CT genotipi, sadece mutant MDR1’ de bant varsa TT genotipi ifade etmektedir. (Çalışmada sadece MDR1 polimorfizmi değerlendirilmiştir.)



Şekil 3.3.1. PGX-HIV Strip

4.BULGULAR

Bu tez çalışmasında toplam 32 KML hastasının 17' sinde 48 ay boyunca düzenli olarak BCR-ABL ve MDR1 gen ifadeleri ölçümleri yapıldı. 17 hastanın 8'i erkek 9' u kadın ve tanıdaki ortalama yaş 47' dir. Tanı anındaki sokal skor değerlendirilmesine göre 12 hasta düşük riskli, 3 hasta orta derecede riskli, 2 hasta yüksek riskli grupta bulunmuştur. Tanı anında yalnızca bir hasta akselere fazda, diğer 16 hasta kronik fazdadır. Hastaların klinik özellikleri Tablo 1' de özetlenmiştir.

Tablo 1. Hastaların klinik özellikleri

Özellikler	Hastalar n = 17
Yaş	
Aralık	25 - 69
Ortalama	44
Cinsiyet	
Kadın	9
Erkek	8
Beyaz küre Sayısı(X 10 ⁹ /L)	
Aralık	25 - 444
Ortalama	124
Trombosit Sayısı(X 10 ⁹ /L)	
Aralık	187 - 1442
Ortalama	484
Blast Sayısı %	2
Eozinofil	1
Bazofil	3
Splenomegali (hasta sayısı)	10
Sokal Skor	
Düşük	12
Orta	3
Yüksek	2
Önceki Tedaviler	
Hidroksiüre	16
IFN	3

Periyodik olarak P210^{BCR-ABL} mRNA füzyon transkriptleri ölçülen 17 hastanın log₁₀ tabanında gen ifadeleri Tablo 2’ de gösterilmektedir. Tablo 2’nin değerlendirilmesinde 10 hastada tanı anında P210^{BCR-ABL} ifadeleri saptandı. Gen ifadesi bir hastada log 4, 2 hastada log 3- 3,5 aralığında, 6 hastada log 2,9–1,9 aralığında, bir hastada log 0,3 olarak saptanmıştır. Bu tabloya göre hastaların diğer aylardaki P210^{BCR-ABL} ifadeleri *Friedman* testine göre mukayese edildiğinde, BCR-ABL ekspresyonunun 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24. ay BCR-ABL ölçümlerinin ikili karşılaştırmaları yapıldığında sadece 0.ay ölçümleri diğer aylara göre yüksek çıkmıştır (p<0.001). Diğer aylardaki ölçümler arasında bir farklılık bulunamamıştır. (p>0,05). Yapılan *Kaplan-Meiyer* testine göre hastaların 5 yıllık sağkalımları %59 bulunmuş, BCR-ABL seviyelerindeki değişiklikler *Spearman’s rho* testine göre yaştan, cinsiyetten, WBC, LDH, Plt’ten bağımsız bulunmuş, istatistiksel bir anlam bulunmamıştır.

Tablo 2. P210 BCR-ABL ekspresyon düzeyinin logaritma 10 tabanında gösterimi (log₁₀).

	P210 ^{BCR-ABL} ekspresyonu (log ₁₀)									
	0.AY	3.AY	6.AY	9.AY	12.AY	18.AY	24.AY	30.AY	36.AY	48.AY
1	3,1	2	1,6	0	0					
2	3,3	1	0	0	0	0	0			
3		0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	4		0	0	0	0				
5	1,9	0	0	0	0	0	0	0		
6	2,5	0	1,3	1,5	-0,1	0	1,1	0,7	1,2	
7	0,3	0	0	0	0	0	0			
8		0,3	0	0	0	0	0			
9	2,5	0,9	1,8	0,7	1,1	0	1,3			
10		1,9	2,6	0,5	0	0,7	1,1	1,7	0	2,5
11	2,5					0,5	0	1	0	
12							0	0,6	0	0
13	2,4	2,5	1,6	0	0,9	1,6	0	0	0	0
14	2,9	2		0						
15					0					
16					3,2					
17					1,4		2	2,1		2,5

0: Hastada P210 BCR-ABL füzyon transkripti saptanamadığını ifade etmektedir.

17 hasta ve kontrol bireyleri de P190^{BCR-ABL} açısından değerlendirilmiş ve tüm sonuçlar negatif bulunmuştur.

İlaç dirençliliğinin değerlendirmesinde çalışmamızda MDR1 gen ekspresyonu analiz edildi. Sonuçlar, P210^{BCR-ABL} ve MDR1 ekspresyonları şeklinde Tablo 3’de gösterilmiştir. MDR1’ in *Friedman* testine göre 0, 3, 6, 9, 12,18,24. ay ölçümleri birbirinden farklı bulunmamıştır. Hastaların tedavi süresince MDR1 ölçümleri birbiriyle kıyaslandığında anlamlı sonuç bulunamadı($p > 0.051$). MDR1’ in zaman içinde değişimi anlamlı değildir.

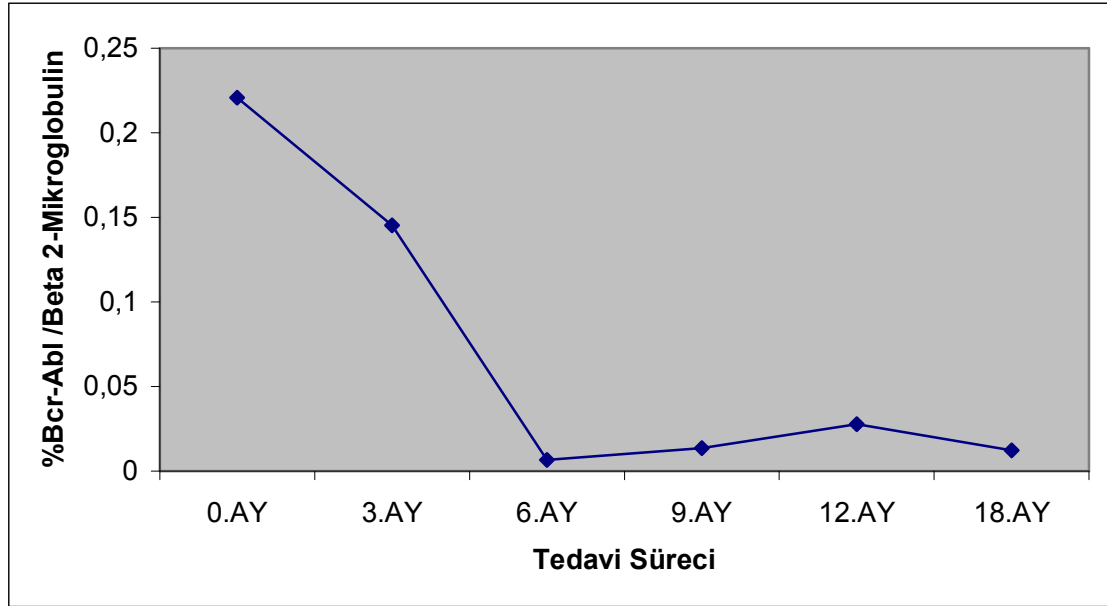
P210 BCR-ABL ve MDR1’ in zaman içinde birlikte değişimlerine *Spearman’s rho* korelasyon katsayı ile bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunamamıştır.

Tablo 3. P210^{BCR-ABL} ve MDR1'in gen ekspresyonlarının logaritmik değerleri (log₁₀)

	0.AY		3.AY		6.AY		9.AY		12.AY		18.AY		24.AY		30.AY		36.AY		48.AY	
	P210	MDR1	P210	MDR1	P210	MDR1	P210	MDR1	P210	MDR1	P210	MDR1	P210	MDR1	P210	MDR1	P210	MDR1	P210	MDR1
1	3,1	-1,1	2	1,2	1,6	0,8	0	2,2	0	0,04										
2	3,3	0	1	1,4	0	0	0	1,3	0	0,51	0	-0,1	0	1,63						
3			0	1,9	0	1,3	0	0,18	0	1,3	0	1,5	0	0	0	1	0	-0,1	0	-0,1
4	4	2,9			0	0	0	1,3	0	3,3	0	0,9								
5	1,9	-1,1	0	1,9	0	0,2	0	1,4	0	0,8	0	0,6	0	1	0	0,9				
6	2,5	-0,6	0	0	1,3	3	1,5	2,7	-0,1	1,3	0	0,8	1,1	1,2	0,7	0,04	1,2	3,1		
7	0,3	0	0	1,7	0	1,5	0	-0,3	0	-0,3	0	-0,2	0	0,5						
8			0,3	0	0	1,4	0	0,04	0	3,1	0	1,2	0	0,6						
9	2,5	1,3	0,9		1,8	2,5	0,7	2,6	1,1	1,3	0	0	1,3	0,9						
10			1,9	1,7	2,6	-0,6	0,5	0	0	0,6	0,7	2,5	1,1	2,3	1,7		0	1,2	2,5	-0,5
11	2,5	1,9									0,5	-1,3	0	1,8	1	2,9	0	0		
12													0		0,6	2,2	0		0	3,4
13	2,4	2,4	2,5	2,6	1,6	1,1	0	1,3	0,9	0,9	1,6	1,4	0	1,7	0	-0,2	0	0,85	0	0,2
14	2,9	-0,6	2	-0,2			0	0												
15					0	2,3			0	2,62										
16									3,2	0										
17									1,4	1,5			2	1	2,1	0			2,5	

P210; P210^{BCR-ABL} değerini göstermektedir.

P210^{BCR-ABL} / β -2M sonuçlarının değerlendirilmesi $\Delta\Delta C_t$ testi ile yapılmıştır. Hastaların tanı anından itibaren aldıkları tedaviye cevap olarak gösterdikleri eğri Şekil 1' de gösterilmiştir. P210^{BCR-ABL} gen ifadesindeki en fazla azalma 3-6. ay aralığında saptanmıştır. Tedaviye maksimum cevap bu aylar arasında alınmıştır.



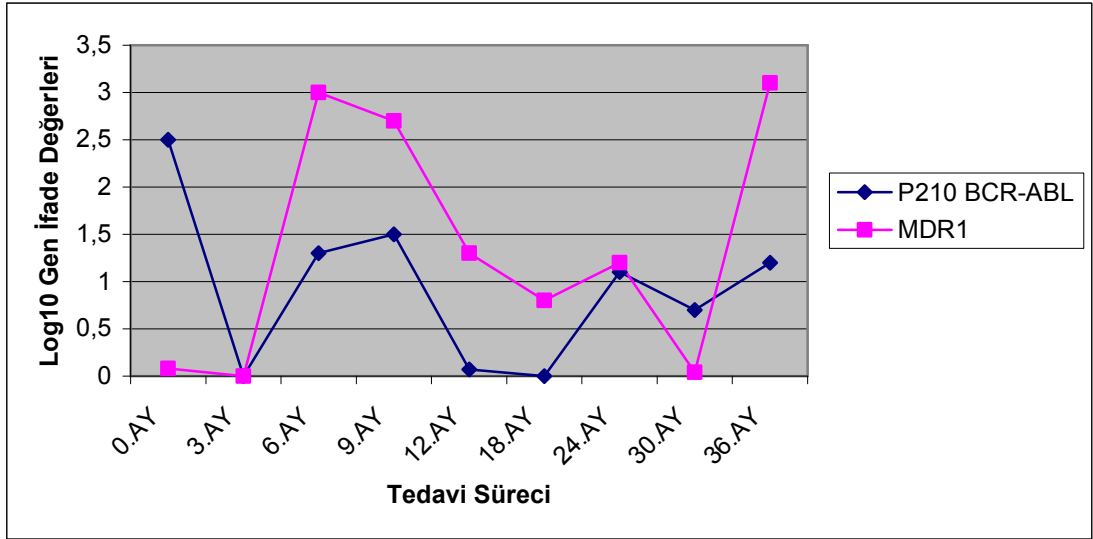
P210^{BCR-ABL}, BCR-ABL şeklinde kısaltılmıştır.

Şekil 1. % P210^{BCR-ABL} / β -2M değerleri

Yaptığımız çalışmada hastalarımızın %91' inde tedaviden 3 ay sonra BCR-ABL ekspresyon seviyesinde azalma, %9' unda ise artma gözlenmiştir. Tedavinin 6. ayında ise hastaların % 73' ünde BCR-ABL ekspresyonunda azalma, %27' inde ise artma gözlenmiştir. Tedavinin 9. ayında ise hastaların % 87,5' inde BCR-ABL ekspresyonunda azalma, %12,5' unda ise artma gözlenmiş. Tedavinin 12. ayında ise hastaların %78' inde BCR-ABL ekspresyonunda azalma, %22' sinde ise artma gözlenmiştir. Tedavinin 18. ayında ise hastaların %60'unda BCR-ABL ekspresyonunda azalma, %40'unda ise artma gözlenmiştir. BCR-ABL ifadesindeki artışın ilaca karşı direnç oluşturduğu düşünülmektedir. İlaç direnci oluşan hastalarda BCR-ABL ekspresyonunun artışı ile birlikte MDR1 geninin ekspresyonunda da artış gözlenmiştir.

İlaç direnci geliştirdiği düşünülen ve Tablo 3'ün verilerine göre yapılan Şekil 2'deki hastanın gen ifadelerinin değerlendirilmesi gösterilmiştir. Şekil 2'e göre hastanın aldığı tedaviye cevap 3. ayda oluşmuş ve BCR-ABL füzyon transkripti saptanmamıştır. BCR-ABL ekspresyonu ile MDR1 ekspresyonunda korele artış bulunmuştur.

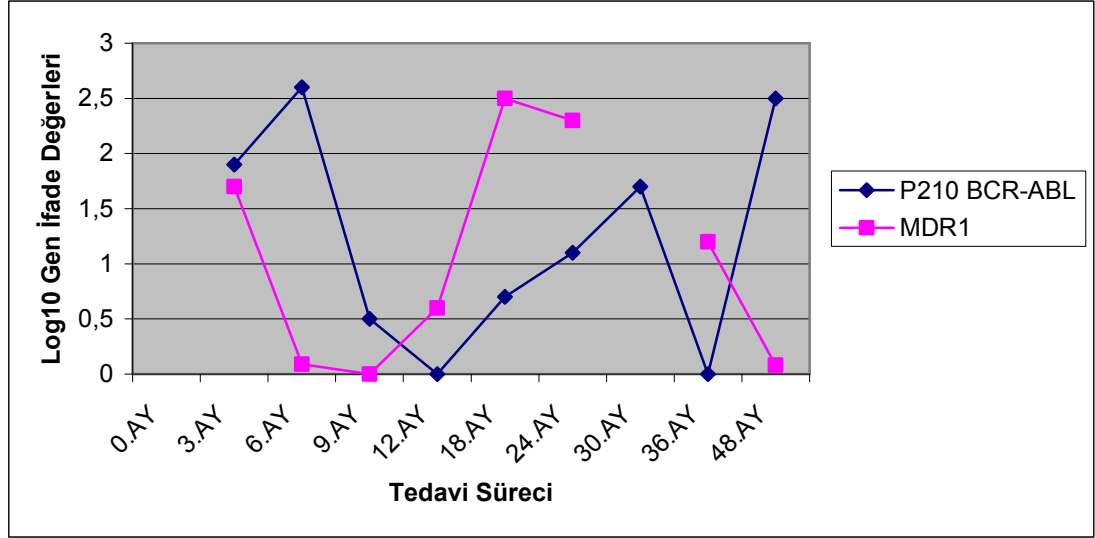
İlaç direnci geliştirdiği düşünülmesinin en önemli nedeni BCR-ABL saptanamayıp, negatif sonuç bulduktan sonra sonraki aylarda tekrar BCR-ABL ekspresyonunda artışın olması, hastaların remisyona girememesidir.



Şekil 2. 6 numaralı hastanın gen ekspresyon değerlerinin grafiği

Şekil 2'in bulguları 6 numaralı hastada 0.ay BCR-ABL füzyon transkripti 291 kopye olarak bulunmuş ve imanitibe 400mg/gün olarak başlamıştır. 3.ay BCR-ABL füzyon transkripti saptanmamıştır. 6. ay BCR-ABL füzyon transkripti 18 kopye 9. ay BCR-ABL füzyon transkripti 30 kopye tespit edilmiş ve imanitib günlük 400mg' dan 600 mg' a çıkarılmış, 12. ay BCR-ABL füzyon transkripti 1 kopye gelmiş, 18. ay BCR-ABL füzyon transkripti saptanamamış sonuç negatif, 24.ay BCR-ABL füzyon transkripti 12 kopye bulunmuştur. 30. ayda BCR-ABL füzyon transkripti 5 kopye 36.ayda BCR-ABL füzyon transkripti 13 kopye bulunmuştur. Hasta imanitibi günlük 600 mg kullanmaya devam etmektedir.

Şekil 3’de ilaç direnç geliştiren 2. hastaya ait ekspresyon değerleri vardır. Bulgular aşağıda özetlenmiştir.

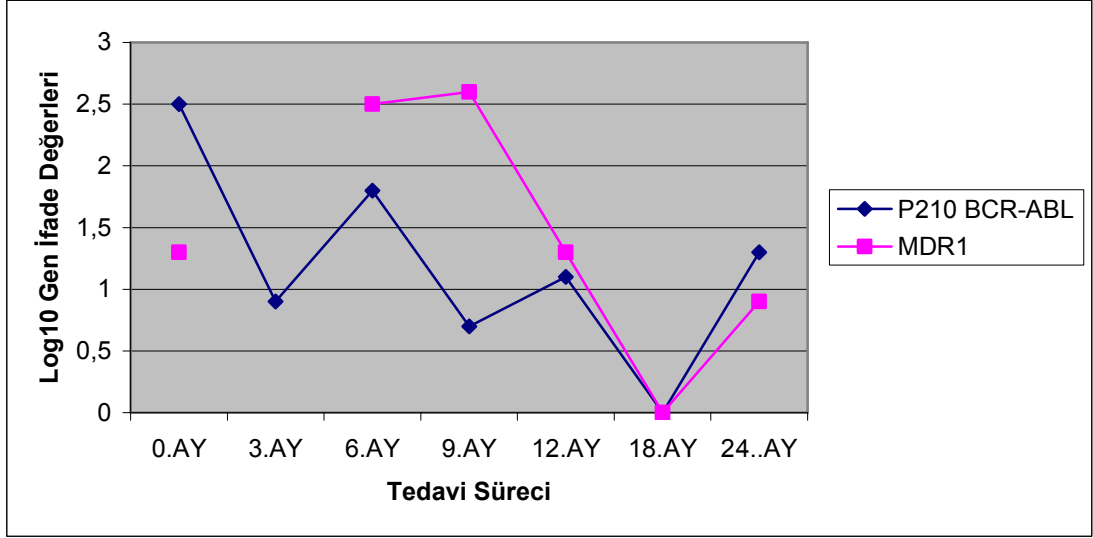


Şekil 3. 10 numaralı hastanın gen ekspresyon değerlerinin grafiği

Şekil 3’un bulguları; 10 numaralı hasta dış merkezde tanı almış, imanitib 400 mg/gün başlanmıştır. 3 ay sonra pansitopeni nedeniyle imanitib kesilmiş ama BCR-ABL füzyon transkripti 72 kopye olarak saptandığından imanitibe tekrar başlanmıştır(400 mg).

6.ay BCR-ABL füzyon transkripti 410 kopye, 9. ay BCR-ABL füzyon transkripti 3 kopye, 12. ay BCR-ABL füzyon transkripti negatif bulunmuştur. 18. ay BCR-ABL füzyon transkripti 8 kopye bulunmuş imanitib 600 mg/gün’ a artırılmıştır ancak hematolojik toksisite nedeniyle ilaç kesilmiştir. Hasta 1 ay ilaç kullanmamıştır. 24.ayda BCR-ABL füzyon transkripti 12 kopye çıkınca tekrar ilaca 400mg/gün olarak başlandı. 30.ay BCR-ABL füzyon transkripti 55 kopye tespit edilmiş ve ilaç 600mg’a çıkarılmıştır. 36.ayda BCR-ABL füzyon transkripti saptanmamıştır. 48. ay BCR-ABL füzyon transkripti 202 kopye bulunmuştur. İmanitib 600mg/gün alıyor kopye sayısı artmaya devam ederse başka ilaç denemesi planlanmıştır. İlaç direnci oluşturduğu düşünülen hastanın gen ifade değerleri şekil 3’ de gösterilmiştir.

BCR-ABL ile MDR1 gen ifadelerinde artış ve azalmalarında uyumluluk vardır. Aynı değerlendirme Şekil 4' deki hasta içinde yapılmıştır.



Şekil 4. 9 numaralı hastanın gen ekspresyon değerlerinin grafiği

Şekil 4'ün bulguları; 9 numaralı hasta KML tanısıyla HÜTF' ye gelmiş 303 kopye BCR-ABL füzyon transkripti tespit edilmiş, imanitib 400 mg/gün başlanmıştır.

İmanitib'den 3 ay sonra BCR-ABL füzyon transkripti 8 kopye bulunmuş fakat nötropeni nedeniyle imanitib kesilmiş, bir ay sonra tekrar 300 mg/gün başlanmıştır, 6.ay BCR-ABL füzyon transkripti 63 kopye , 9. ay BCR-ABL füzyon transkripti 5 kopye, 12. ay BCR-ABL füzyon transkripti 14 kopye imanitib 400mg'a çıkarıldı. 3 ay sonra lökopeni nedeniyle doz 300 mg'a indirildi. 18.ay BCR-ABL füzyon transkripti saptanamamıştır. 24. ay BCR-ABL füzyon transkripti 18 kopye tespit edilince imanitib 600 mg'a çıkarıldı. 2 X 400mg/ gün kullanıyor. Bulantı nedeniyle hasta 600mg'ı tek dozda alamıyor.

32 KML hastasının MDR-1 C3435 T polimorfizmi açısından değerlendirilmesi Tablo 5’ de gösterilmiştir. 9 KML hastasında bu polimorfizmi homozigot olarak taşıdığı, 15’ inin heterozigot olarak taşıdığı ve 8 hastanın ise taşımadığı saptanmıştır.

37 Sağlıklı bireyin 9’ unun CC, 22’ sinin (CT) heterozigot, 5’ inin (TT) homozigot olduğu bulunmuştur (Tablo 4). Hasta ile kontrol grubu karşılaştırıldığında hasta bireylerde 2 kat daha fazla TT genotipi gözlenmiştir. MDR1 polimorfizminin allel dağılımına baktığımızda sonuçların birbirinden farklı olmadığını gördük (Tablo 5).

Allel dağılımları ise Tablo 5’de gösterilmiştir. Hasta ve kontrol grubunun MDR1 C3435T polimorfizminin genotip dağılımı Tablo 6’ da gösterilmiştir.

Tablo 4 MDR-1 C3435T polimorfizminin genotip dağılımı

	n	CC (n) %n	CT (n) %n	TT (n) %n
Hasta	32	(8) 25,0	(15) 46,88	(9) 28,12
Kontrol	36	(9) 25,00	(22) 61,11	(5) 13,89

Tablo 5 MDR-1 C3435T polimorfizminin allel dağılımı

	n	%T	%C
Hasta	64	% 51,57	%48,43
Kontrol	72	% 44,45	%55,55
p		0,4	0,6

Tablo 6. Hasta ve Kontrol grubuna ait MDR1 C3435T polimorfizminin genotip dağılımı

	HASTA			KONTROL	
1	D.U	TT	1	S.S	CT
2	A.D	CT	2	T.P	CC
3	N.I	CT	3	O.Ö	TT
4	M.S	TT	4	E.K	CT
5	C.Y	CC	5	A.D	CT
6	F.Ö	CT	6	N.G	CC
7	M.I	CT	7	S.B	CT
8	A.C	TT	8	G.B	CT
9	İ.S	CT	9	B.B	CT
10	A.Ö	TT	10	Ş.U	CT
11	S.T	TT	11	P.H	CT
12	H.B	TT	12	G.E	CT
13	T.G	CT	13	T.I	CT
14	Y.G	CT	14	M.Ö	TT
15	S.E	CC	15	H.A	TT
16	K.S	CT	16	L.T	CT
17	H.A	CT	17	M.D	TT
18	S.K	CT	18	M.K	CT
19	F.Ö	CC	19	L.A	CT
20	K.D	CC	20	A.T	CT
21	S.N	TT	21	Y.Ş	CT
22	Ü.Ç	TT	22	Y.B	CC
23	F.M.L	CT	23	N.Ö	CC
24	Ş.Y	CC	24	B.A	TT
25	S.B	CC	25	P.Y	CT
26	S.A	CC	26	H.U	CT
27	A.K	CT	27	N.Ç	CC
28	İ.A	CC	28	H.K	CC
29	A.D	CT	29	S.E	CT
30	S.B	TT	30	S.Ç	CT
31	İ.K	CT	31	D.Y	CC
32	R.B	CT	32	F.Ö	CC
33			33	M.A	CT
34			34	H.K	CT
35			35	İ.Ş	CC
36			36	E.O	CT

5. TARTIŞMA

Rezidüel hastalığı tespit etmek için kullanılan metotların amacı; kemik iliği transplantasyonu sonrası hastanın izlenmesi, relapsın erken safhada yakalanması, kemoterapi alan hastaların remisyonunun gerçek olup olmadığının tesbiti, tedavi protokolünün yararlılığının değerlendirilmesidir.

MDR' nin tesbiti, hastalığın prognozunun izlenmesi ve relapsa girdiğinde tedbirlerin alınması için oldukça önemlidir.

Kantitatif RT-PZT yöntemi BCR-ABL ve MDR1 mRNA' sını ölçmek için kullanılan hassas tekniklerden tekniklerden biridir.

KML hastalarının tedavisinde BCR-ABL füzyon geninin selektif inhibitörü olan imanitib mesilat kullanılır. Özellikle kronik faz başta olmak üzere, KML' nin tüm safhalarında bulunan hastalarda etkili bir ajandır. Yaptığımız çalışmada hastaların %100'u hematolojik cevabı başarmış, tedavinin 3. ayında hastaların %54'ü CCR (%100 Ph (-) metafaz hücresi) 'ı , % 31'i ise moleküler cevabı (Moleküler cevap: Kantitatif RT-PZT yöntemi ile BCR-ABL ekspresyonunun saptanamamasıdır.) başarmıştır. Tedavinin 6. ayında %55' i CCR'ı, % 40'ı moleküler cevabı sağlamış, %8' i moleküler cevabı kaybetmiştir.

Tedavinin 9. ayında ise, hastaların % 81'i CCR'ı, %75'i moleküler cevabı başarmıştır. 12. ayda % 90 oranındaki hastada CCR' ı, % 69'u ise moleküler cevabı sağlamıştır. 3. ayda BCR-ABL ekspresyonunun ortalama değeri %0,14, 6. ayda %0,006, 9. ayda % 0,013, 12. ayda % 0,028, 18. ayda %0,0128 olarak bulunmuştur. Gamberrti ve ark. 2005 yılında yaptığı çalışmada tedavi süresince elde edilen BCR-ABL ortalama değerleri ile uyumluluk göstermiş ve BCR-ABL ifadesindeki azalma en fazla 3-6. ay arasında düşmüştür. İmanitib hedefe yönelik spesifik tedavi edici ajan olduğu için hastalarda yüksek oranda tedavi başarısı sağlanmıştır. Fakat imanitib tedavisine karşı hastalarda zamanla direnç gelişebileceği birçok çalışmada gösterilmiştir.

Hochhaus A. ve ark. 2000 yılında yapmış olduğu çalışmada İmanitibe dirençli olan 72 KML hastasının 7'sinde 10 kat fazla artmış BCR-ABL seviyesi tespit

edilmiştir. 19 hastada ek kromozom anomalileri ve 29 hastada ise ABL tirozin kinaz bağlanma bölgesinde çeşitli nokta mutasyonları tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda dirençliliğin BCR-ABL' e bağlı olarak gelişmiş olabileceği belirtilmektedir (43). Yaptığımız çalışmada direnç gelişen 3 hasta remisyonda uzun süre kalamamış ve BCR-ABL ifadesinde tekrar artış gözlenmiştir.

2005 yılında yapılan çalışmada hastalarda imanitibe direnç, tedaviye başladıktan 9-12 ay sonra oluşmuş ancak 12 aylık veya daha uzun süreli ilaç tedavisiyle major sitogenetik veya komple sitogenetik cevabı sağlamış bazı hastalarda da ilaca direnç geliştiği gösterilmiştir. Yaptığımız çalışmada ise hastalarda tedaviye başladıktan 18-24 ay sonra direnç oluşmuştur.

Galimberti ve ark. 2005 yılında (42) yapmış olduğu çalışmada 33 KML hastasının 4 haftalık imanitib tedavisi ile tümü hematolojik cevabı sağlamıştır. Hastaların yaklaşık %96' sı tedaviye başladıktan sonraki 3 ayda BCR-ABL ekspresyonundaki azalma 1,5 log' dan fazla , BCR-ABL ekspresyonundaki ortalama değer % 0,02 bulunmuş ve İmanitib tedavisinden 6 ay sonra hastaların %72' sinde BCR-ABL ekspresyonundaki azalma 2 log' dan fazla olmuştur.

6. aydaki BCR-ABL ekspresyonundaki ortalama değer %0,002 olarak bulunmuştur. Hastaların % 14' unde ise BCR-ABL transkriptlerinde ortalama 0,5 log' luk artış olmuş, 12 aydan sonra ise hastaların % 23' unde PCR negatif, ancak %36' ında BCR-ABL ekspresyonunda 2 log'dan fazla artış gözlemlenmiştir. BCR-ABL ekspresyonundaki ortalama değer % 0,003' dür. Tedavi süresince en yüksek düşüş 3-6. aylar arası olmuştur. 18 aydan sonra ise hastaların %38' inde PCR negatif bulunmuştur. Kantitatif data göstermiştir ki BCR-ABL ifadesindeki en büyük azalma tedaviden sonraki 3-6 ay arası olmuştur. Bu azalma sitogenetik cevapla korele olmuştur. CCR' daki hastalarda ekspresyondaki azalma 3 log ya da daha fazla olmuştur. Major ya da CCR' ı başaramamış hastalar da MDR1 seviyesindeki artış 10 kattan fazla olmuştur.. BCR-ABL ve MDR1 ekspresyonundaki artış birlikte gözlemlenmiştir. Tanı anında tüm örneklerin MDR1 pozitif sebebi hematopoetik kök hücrelerde bu genin fizyolojik ekspresyonu olduğunun düşünülmesidir.

İmanitib tedavisinden 3 ay sonra hastaların %36' sında MDR1 ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir. Hastaların %89' unda BCR-ABL ifadesinde azalma gözlenmiştir.Yapılan bu çalışmalarda ilaca direnç; BCR-ABL'in amplifikasyonu ve ifadesindeki artma, BCR-ABL' in kinaz bölgesinin mutasyonları, en çok görülen mutasyon imanitib ile hidrojen bağı oluşturan T315I bölge mutasyonları, MDR1 geninin aşırı ifadesi ile ilaç konsantrasyonunun azalması sonucu oluştuğu düşünülmektedir.

Yaptığımız çalışmada hastaların hepsinde tanı anında düşük seviyede de olsa MDR1 gen ifadesi var (çünkü hematopoetik kök hücrelerde fizyolojik ekspresyon görülüyor). İlaça karşı direnç geliştiği düşünülen hastalarımızda BCR-ABL gen ifadesinin saptanamadığı dönemden sonraki dönemlerde BCR-ABL ve MDR1 genlerinin ifadelerindeki artış uyumluluk göstermiştir.

Hematolojik malignansiler ile MDR1 polimorfizmi arasında ilişkiyi açıklayabilecek yayınlar bulunmaktadır. Jamroziak K ve ark.yapmış olduğu çalışmada C3435CT polimorfizmi ile çocukluk çağı ALL arasında pozitif korelasyon bulunmuş ve TT genotipi taşıyanları, diğer genotipleri taşıyanlara oranla ALL geliştirme de daha yüksek riskli bulunmuşlar ve CC genotipini taşıyanların anlamlı derecede kötü prognoza sahip olduğunu bildirmişlerdir (p=0.008) (44) .

405 AML' li erişkin hastada yaptığı çalışmada CC genotipi ile kötü prognoz arasında uyumluluk gösterilmiştir. CT genotipine sahip bireylerin ortalamanın üzerine sağkalım sağladığı gösterilmiştir. Böylece MDR1 geninin allelik varyasyonlarının protein ekspresyonuna ve fonksiyonuna etki edebileceği gösterilmiştir (45).

Hattori H ve ark.' larının 2007 yılında yaptığı çalışmada çocukluk çağı ALL'de MDR1 ekspresyonu ile MDR1 C3435T polimorfizmine bakmışlar ve gen ekspresyonu ile polimorfizm arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamamıştır (46).

60 yaş ve üzeri 150 AML hastasında yaptığı çalışmada genotipler arasında MDR1 mRNA ifadesi düzeyinde bir farklılık bulunamamış tüm hastalarda yüksek seviyede

MDR1 mRNA ifadesi bulunmuştur. AML ile yüksek MDR1 mRNA ifadesi arasında pozitif korelasyon tespit edilmiştir (50) .

198 KML' li hasta ile yaptığı çalışmada MDR1 ekspresyonu ile yaş, lökosit sayısı, trombosit sayısı arasında bağlantı bulmuşlar, 50 yaşının üzerindeki hastalarda MDR1 ekspresyonunu daha yüksek bulunmuşlardır (47).

Yapılan çalışmalarda blastik fazdaki KML hastalarında P-gp ekspresyonunun yüksek , kronik fazdaki hastalarda ya çok az ya da hiç P-gp ekspresyonunu tespit edememişlerdir. Hiçbir çalışmada KML hastalarında MDR ekspresyonu ile prognostik değer arasında bir korelasyon rapor edilememiştir (48).

Çalışmamızda hastalarda % 28,12 TT, kontrol grubunda ise %13,89 oranında TT bulunmuş, TT genotipinin görülme sıklığı kontrol grubuna göre fazla olmasına rağmen MDR1 ekspresyonu ile TT genotipinin *Mann-Whitney* testine göre ikili karşılaştırması yapıldığında anlamlı bir sonuç bulunamamıştır.

MDR1 C3435T polimorfizmi kolon kanseri, renal karsinom, ülseratif kolit ile ilişkili bulunmuştur. Siegmund ve ark.' larının (2002) yaptığı çalışmada 212 hasta birey ve 567 sağlıklı bireyle çalışmışlar ve T alleli ve TT genotipi ile renal epitel tümör riski arasında pozitif korelasyon bulmuşlardır (49).

MDR1 3435 TT yada CT genotipini taşıyanlarla CC genotipiyle mukayese edildiğinde çocukluk çağı ALL'de nüks riski anlamlı derecede düşük bulunmuştur.

113 çocukluk çağı ALL'de 175 sağlıklı bireyde çalışılmış ve hastaların %30'unda TT, sağlıklı bireylerde ise %19 TT genotipi taşıdığı gösterilmiştir. Sonuçta 1.8 kat daha fazla ALL geliştirme riski bulunmuştur (44).

Yaptığımız çalışmada da hastaların % 28,12 TT, kontrol grubunda ise %13,89 oranında TT bulunmuştur. TT genotipini taşıyanlar hasta grubunda iki kat daha fazladır. TT genotipinin KML geliştirmede etkili olabileceği düşünülebilir fakat bunu destekleyici bilgiye referanslarda rastlanmamıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında

KML hastalarında T allel frekansı yüksek bulunmuş olmasına rağmen fark anlamlı değildir ($p= 0,414$) (Tablo 5)

17 KML hastasının BCR-ABL gen ifadesindeki en yüksek azalmalar 3-6. aylar arasında olmuştur. 3 hastada BCR-ABL ekspresyonu ile MDR1 ekspresyonundaki artış korele olmuştur. Kontrol grubu ile hasta grubu MDR1 C3435T polimorfizmi açısından değerlendirildiğinde hasta grubunda TT polimorfizmi 2 kat daha fazla bulunmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

KML hastalarında MRD' ın izlenmesinde en hassas ve güvenilir metot Kantitatif RT-PZT metottur.

Hastaların imanitib tedavisine cevap olarak gösterdikleri BCR- ABL ekspresyonun ortalama değerleri 3.ayda BCR-ABL ekspresyonun ortalama değeri %0,14, 6.ayda %0,006, 9.ayda % 0,013, 12.ayda % 0,028, 18. ayda %0,0128 olarak bulunmuştur. Hastalar en güçlü cevabı 3-6. aylar arasında vermiştir.

Kantitatif RT-PZT metodu ile 17 hastanın MDR1 ve BCR-ABL ölçümlerini birlikte yapılmıştır ve ilaca direnç oluşan hastalarda MDR1 ve BCR-ABL gen ifadelerinin birbirleriyle korele olarak artığı saptanmıştır. MDR1'in imanitib direnci ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir.

İlaç direnci geliştieği düşünölen hastada BCR-ABL ekspresyonu saptanamamış iken MDR1 ekspresyonunda artış görölmüş ve hastanın BCR-ABL negatif ölçümünden bir sonraki dönemdeki ölçümde BCR-ABL ekspresyonunda artma tespit edilmiştir. İlaç direnci geliştieği düşünölen fazla sayıda örnekle çalışılabilirse belki de MDR1'in ilaç direncinde ön bildirgeç olabileceği kanısına varılabilir.

MDR1C3435T polimorfizmi ile MDR1 gen ekspresyon düzeyi arasında korelasyon saptanamadı. Hasta bireylerin kontrol grubu ile mukayesinde iki kat daha fazla TT genotipini taşıdığı bulundu. KML geliştirmede TT genotipi yüksek riskli grup olabilir fikrini doğurdu fakat literatürde KML ile TT genotipi arasında bağlantı sağlayıcı bilgi olmadığından çok merkezli, fazla sayıda KML hastası ile değerlendirme yapılması önerildi.

KAYNAKLAR

1. Litzow, M.R., 2006., Imatinib Resistance Obstacles and Opportunities. *Arch Pathol Lab Med.* 130, 669-679.
2. Faderl S., Talpaz M., Estrov Z., O'Brien S., Kurzrock R., Kantarjian H.M., 1999., Chronic Myeloid Leukemia: Biology and Therapy . *Ann.Intern Med.*, 131, 207-219
3. Deninger M.W.N., Druker J.B., 2003., Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imanitib., *Pharmacol Rev.*, 55, 401-423
4. Millot F., Traore P., Guilhot J., Guilhot J., Nelken B., Leblanc T., Leverger G., Plantaz D., Bertrand Y., Bordigoni P., Guilhot F., 2005., Clinical and biological features at diagnosis in 40 children with chronic myeloid leukemia. *Pediatrics.*, 116 :140-143
5. Goldman J., 2004., Monitoring minimal residual disease in BCR-ABL positive chronic myeloid leukemia in the imanitib era. *Curr Opin Hematol.*, 12, 33-39
6. O'Dwyer M.E., Mauro M.J., Druker B.J., 2002., Recent Advancements in the Treatment of Chronic Myelogenous Leukemia. *Annu.Rev.Med.*, 53, 369-381
7. Ohno R., 2006., Treatment of chronic myeloid leukemia with imanitib mesylate., *Int J Clin Oncology.*, 11, 176-183
8. Ren R., 2005., Mechanism of Bcr-Abl in the pathogenesis of chronic myelogenous leukemia *Nature reviews/ cancer* 5, 172-183
9. Griffin J.D., Todd R.F., Ritz J., Nadeler L.M., Canellos G.P., Rosenthal D., 1983., Differentiation patterns in the blastic phase of chronic myeloid leukemia., *Blood* ., 61, 85-91
10. Goldman J.M., Melo J.V., 2003., Chronic myeloid leukemia-Advances in biology and new approaches to treatment., 349, 1451-1464
11. Pane F., Intrieri M., Quintarelli C. et al. 2002., BCR/ABL genes and leukemic phenotype: from molecular mechanism to clinical correlation. *Oncogene* 21,8652-8667
12. Deininger M.W.N., Goldman J.M., Melo J.V., 2000. The molecular biology of chronic myeloid leukemia., *Blood*, 3343-3356
13. Saglio G., Cilloni D., 2004., Abl: The prototype of oncogenic fusion proteins *Cell Mol.Life Sci* 61, 2897-2911

14. Amabile M., Giannini B., Testoni N., Montefusco Vittorio., ve diğ erleri., 2001, Real-time quantification of different types of bcr-abl transcript in chronic myeloid leukemia., *Haematologica* , 86, 252-259
15. Walz C., Sattler M., 2005., Novel targeted therapies to overcome imatinib mesylate resistance in chronic myeloid leukemia (CML)., *Clinical Rev. In Onc / Hemat* 25-31
16. Sawyers, C.L., 1999., Chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*. 340,1330-1340
17. Appleby N., Burke E., Curran T.A., Neary E., 2005, Chronic Myeloid Leukemia Molecular abnormalities and treatment options., *TSMJ*, 6, 45-51
18. Teferi A., Dewald G.W., Litzow M.L., Cortes J., Mauro M.J., Talpaz M., Kantarjian H.M., 2005., Chronic myeloid leukemia: Current application of cytogenetics and molecular testing for diagnosis and treatment., *Genetics in clinical practice*., 80(3), 390-402
19. Chasseriau J., Rivet J., Bilan F., Chomel J.C., Guilhot F., Kitzis A., 2004., Characterization of the different BCR-ABL transcripts with a single multiplex RT-PCR., *Journal molecular diagnostics*., 6(4), 343-347
20. Doğan A.L., Güç D., 2004., Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser., *Hacettepe Tıp Dergisi*., 35, 34-42
21. Chang F, Lee JT, Navolanic PM, et al., 2003., Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: A target for cancer chemotherapy., *Leukemia* 17, 590-603
22. Melo J.V., Deininger M.W.N., 2004., Biology of chronic myelogenous leukemia -signaling pathways of initiation and transformation., *Haematology/Oncology Clinics of North America*., 18, 545-568
23. Salesse S., Verfaillie C.M., 2002., BCR/ABL : from molecular mechanism of leukemia induction to treatment of chronic myelogenous leukemia., *Oncogene*., 21, 8547-8559
24. Branford, S., Rudk1, Z., Walsh, S., Parkinson, I., Grigg, A., Szer, J., Taylor, K., Herrmann R., Seymour, J.F., Arthur, C., Joske, D., Lynch, K., Hughes, T., 2003. 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 apoor prognosis. *Blood*. 102(1), 276-283

25. Corbin A.S., La Rosee P., Stoffregen, E.P., Druker, B.J., Deininger, M.W., 2003., Several Bcr-Abl kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib. *Blood* 101, 4611–4614
26. Savage D.G., Antman K.H., 2002., Imatinib mesylate- a new oral targeted therapy., *Drug therapy* 346, 683-693
27. Bagg A., 2002., Chronic myeloid leukemia A minimalistic view of post-therapeutic monitoring., *Journal of molecular diagnostic.*, 4, 1-11
28. Martinelli G., Iacobucci I., Soverini S., Cilloni D., Saglio G., Pane F., Baccarani M., 2006., Monitoring minimal residual disease and controlling drug resistance in chronic myeloid leukemia patients in treatment with imatinib as a guide to clinical management., *Hematological oncology.*, 24, 196-204
29. Lange T., Bumm T., Otto S., Kovacs I., Köhler T., Deininger M.W.N., 2004., Quantative reverse transcriptase polymerase chain reaction should not replace conventional cytogenetics for monitoring with chronic myeloid leukemia during early phase of imatinib therapy., *Hematologica.*, 89, 49-57
30. Kaeda J., Chase A., Goldman J.M., 2002., Cytogenetic and molecular monitoring of residual disease in chronic myeloid leukemia., *Acta Haematology.*, 107, 64-75
31. Löwenberg B., 2003., Minimal residual disease in chronic myeloid leukemia., *New England Journal of Medicine* 349, 1400-1401
32. Chung N.G., Buxhofer V., Radich J.P., 2006., The detection and significance of minimal residual disease in acute and chronic leukemia. *Journal Compilation* 68 , 371-385.
33. Hochhaus A., 2002., Minimal residual disease in chronic myeloid leukemia patients. *Best Practice&Research Clinical Haematology* 15, 159-178
34. Van der Velden V.H.J., Hochhaus A., Cazzaniga G., Szczepanski T., Gabert J., Van Dongen J.J.M., 2003., Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects., *Leukemia.*, 17, 1013-1034
35. Preudhomme C., Revillion F., Merlat A., Hornez L., Roumier C., Duflos-Grardel N., Jouet J.P., Cosson A., Peyrat J.P., Fenaux P., 1999., Detection of BCR_ABL transcripts in Chronic myeloid leukemia (CML) using a realtime quantitative RT-PCR assay., *Leukemia*, 13, 957-964

36. Faderl S., Hochhaus A., Hughes T., 2006., Monitoring of minimal residual in chronic myeloid leukemia. *Haematology /Oncology Clinics of North America.*, 18, 657-670
37. Norgaard JM, Hokland P., 2000., Biology of Multiple Drug Resistance in Acute Leukemia. *International Journal of Hematology* ., 72, 290-297
38. Alexandrova R., 1998., Multidrug resistance and P-glycoprotein., *Experimental pathology and parasitology.*, 1, 62-66.
39. Jamroziak K., Robak T., 2004., Pharmacogenomics of MDR1/ABCB1 gene: the Influence on risk and clinical outcome of haematological malignancies., *Hematology.*, 9(2), 91-105
40. Fromm M.F., 2002., The influence of MDR1 polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans., *Advanced Drug Delivery reviews.*, 54, 1295-1310
41. Bebek N., Çine N., Öner G.Ö., Eşkazan E., Özbek U., 2005., Genotype and allele frequencies of MDR-1 C3435>T polymorphism in Turkish population, *Journal of Neurological sciences*, 22,3, 37, 261-265
42. Galimberti S., Cervetti G., Guerini F., 2005., Quantitative molecular monitoring of bcr-abl and mdrl transcripts in patients with chronic myeloid leukemia during imatinib treatment., *Cancer Genetics and Cytogenetics.*, 162, 57-62
43. Hochhaus A. Weisser A. , Rosee L.P. , Emig M. , Müller M.C. , Saubelle S. ,Reiter A. Kuhn C., Berger U., Hehlmann R. ,Cross N.C.P., 2000., Detection and quantification of residual disease in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia.* 14, 998-1005
44. Jamroziak K., Mlynarski W., Balcerzak E., Mistygacz M., Trelinska J., Bodalski J., Robak T., 2004., Functional polymorphism of MDR1 gene: an impact on genetic susceptibility and clinical outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia *European Journal of Haematology.*, 72, 314-321
45. Illmer T., Schuler U.S., Thiede C., Kim R.s., Ferund D., Schaich M., 2002., MDR gene polymorphism affect therapy outcome in acute myeloid leukemia patients. *Cancer Res.* 62, 4955-4962
46. Hattori H., Sumionoe A., Wada M., Koga Y., Koga Y., Kohno K., Okamura J., Hara T., Matsuzaki A., 2007., Regulatory polymorphisms of multidrug resistance 1 (MDR1) gene are associated with the development of childhood acute lymphoblastic leukemia., *Leukemia Research.*, 1-8

47. Giles F.J., Cortes J., Thomas A.D., Talpaz M., Albitar M., 1999., Multidrug resistance protein expression in chronic myeloid leukemia., *American cancer society.*, 13, 805-812
48. Duhem C., Dicato M., 1996., What does multidug resistance expression mean in clinic., *The oncologist.* 1,151-158
49. Sigmund W., 2002., The effects of human MDR1 genotype on the expression of duodonal p-glycoprotein and disposition of the probe drug talional *Clin. Pharmacol Ther* 72, 572-583
50. Holt B., Heuvel-Eibrink M., Schaik R., Ilse P., Wiemer E.A.C., Vossebeld P., Löwenberg B., 2006, ABCB1 gene polymorphism are not associated with treatment outcome in elderly acute myeloid leukemia patients., *Clinical Pharmacology Therapeutics.*, 80, 5, 427-438
51. Cardana-Quintas A., Cortes J.E., 2006., Chronic myeloid leukemia: diagnosis and treatment., Symposium on oncology practice hematological malignancies., 81(7), 973-988