

BETÜL BOZKURT BULAKÇI

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2018



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

(DOKTORA TEZİ)

**KRONİK MYELOSİTİK LÖSEMİ HASTALARINDA
MOLEKÜLER MONİTÖRİZASYON-KLİNİK SEYİR
İLİŞKİSİNİN VE SLC22A1 MRNA EKSPRESYONUNUN
ARAŞTIRILMASI**

BETÜL BOZKURT BULAKÇI

**DANIŞMAN
PROF. DR. ŞÜKRÜ PALANDUZ**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2018

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı, Genetik Programında Doktora öğrencisi Betül BOZKURT BULAKÇI tarafından Prof. Dr. Şükrü PALANDUZ'un danışmanlığında hazırlanan "Kronik Myelositik Lösemi Hastalarında Moleküler Monitörizasyon Klinik Seyir İlişkisinin ve SLC22A1 mRNA Ekspresyonunun Araştırılması" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 07/05/2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Şükrü PALANDUZ

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi
İç Hast. A.D. Tıbbi Genetik B.D.



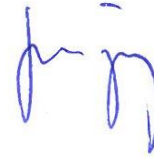
Prof. Dr. Kıvanç ÇEFLİ

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi
İç Hast. A.D. Tıbbi Genetik B.D.



Prof. Dr. Akif Selim YAVUZ

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi
İç Hast. A.D. Hematoloji B.D.



Doç. Dr. Hakan GÜRKAN

Trakya Üni. Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı



Doç. Dr. Emel ERGÜL

Kocaeli Üni. Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Betül BOZKURT BULAKÇI

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Doktora Programı'ndaki eğitim sürem boyunca desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım çok değerli hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Şükrü PALANDUZ'a,

Tezimin her aşamasında kıymetli önerileriyle yol gösteren, tez izleme komitemde yer alan hocalarım Prof. Dr. Kıvanç ÇEFLE ve Prof. Dr. Akif Selim YAVUZ'a,

Bilgi ve deneyimleriyle yolumu aydınlatan ve emeği geçen ismini sayamadığım tüm hocalarıma,

Tezimi hazırlamamda büyük katkıları bulunan Dr. Aynur DAĞLAR ADAY ve Dr. Başak GÜRTEKİN'e, doktora eğitimime başladığım ilk gün tanıştığım, yardımseverliği, güleryüzü ve içten arkadaşlığı ile her zaman yanımda olan çok değerli arkadaşım Dr. Gözde ÖZTAN'a,

Yurt içi lisansüstü burs programı kapsamında sağladığı destekten ötürü Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK),

Bugünlere gelmemde çok büyük emeği olan ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili annem, babam ve kardeşime, varlıklarıyla hayatımı anlamlı kılan eşim, oğlum ve kızıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 57862

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİ
ABSTRACT.....	Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. KML Oluşum Mekanizması ve Patogenezi	2
2.2. KML Etiyolojisi	3
2.3. KML Tanısı.....	3
2.4. KML Prognozu	4
2.4.1. KML risk skorlamaları.....	4
2.4.2. İlave sitogenetik aberasyonların varlığı	5
2.4.3. Varyant translokasyonlar	5
2.4.4. Farmakokinetik değişiklikler	5
2.4.5. Mutasyonlar	6
2.5. KML Evreleri.....	6
2.6. Tedavi Seçenekleri.....	7
2.7. Evrelere Göre Tedavi Yaklaşımları	9
2.8. Tedaviye Yanıt [1, 105]	10
2.8.1. Tam hematolojik yanıt (THY) kriterleri	10
2.8.2. Sitogenetik Yanıt (SY) kriterleri.....	10
2.8.3. Moleküler Yanıt (MY) kriterleri	10
2.9. Tedavi Yanıtının İzlenmesi [1, 105]	10
2.10. SLC22A1 Geni ve OCT-1 Proteini.....	12

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	14
3.1. Örneklem Bilgileri	14
3.2. Veri Toplama Aşaması	14
3.3. Laboratuvar	14
3.3.1. Laboratuvar malzemeleri	15
3.3.2. Total RNA İzolasyonu	15
3.3.3. RNA Yoğunluğunun Ölçümü	16
3.3.4. cDNA Sentezi	17
3.3.5. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)	17
3.4. İstatistik.....	19
4. BULGULAR.....	20
5. TARTIŞMA	29
KAYNAKLAR	33
FORMLAR	49
GÖNÜLLÜ ONAY FORMU	52
HASTA TAKİP FORMU	53
ETİK KURUL KARARI	55
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	56
ÖZGEÇMİŞ	57

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: cDNA sentez bileşenleri-1	17
Tablo 3-2: cDNA sentez bileşenleri -2	17
Tablo 3-3: PCR bileşenleri	18
Tablo 3-4: Kantitatif Real Time PCR döngüleri.....	19
Tablo 4-1: Demografik özellikler-1	20
Tablo 4-2: Demografik özellikler-2.....	20
Tablo 4-3: Tedaviye yanıtı göre cinsiyet karşılaştırması	21
Tablo 4-4: Tedaviye yanıtı göre yaş ortalaması karşılaştırması.....	21
Tablo 4-5: Tedaviye yanıtı göre tanı yaşı ortalaması karşılaştırması	21
Tablo 4-6: Duyarlı ve dirençli grupta imatinib öncesi tedavinin karşılaştırılması	21
Tablo 4-7: Kullanılan ilaçlar (genel)	22
Tablo 4-8: Tedaviye duyarlı hastaların kullandıkları ilaçlar	22
Tablo 4-9: Tedaviye dirençli hastaların kullandıkları ilaçlar.....	23
Tablo 4-10: BCR-ABL Kinaz domain mutasyonu değerlendirmesi	24
Tablo 4-11: Tedavi yanıtına göre mutasyon varlığı karşılaştırması	25
Tablo 4-12: OCT-1 ekspresyon düzeyinin tedavi yanıtına göre karşılaştırılması	25
Tablo 4-13: Mutasyonu olan ve olmayan hastaların OCT-1 ekspresyonunun karşılaştırılması.....	26
Tablo 4-14: Tedaviye dirençli hastaların mutasyon durumuna göre OCT-1 ekspresyonunun karşılaştırılması	26
Tablo 4-15: Tedaviye duyarlı ve mutasyonu olmayan dirençli hastaların OCT-1 ekspresyonunun karşılaştırılması	26

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4-1: Tedaviye duyarlı hastaların kullandıkları ilaçlar.....	23
Şekil 4-2: Tedaviye dirençli hastaların kullandıkları ilaçlar.....	24
Şekil 4-3: İmatinibe duyarlı ve dirençli hastalarda OCT-1 ekspresyon düzeyi grafiği ..	25
Şekil 4-4: Referans gene ait (HPRT) PCR amplifikasyon eğrileri	27
Şekil 4-5: Hedef gene ait (OCT-1) PCR amplifikasyon eğrileri	28



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ABL: abelson

alloHSCT: allogenik hematopoetik kök hücre nakli

β -ME: β -Merkaptoetanol

BCR: breakpoint cluster region

CT: Treshold Cycle

DNA: deoksiribo nükleik asit

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

ELN: European LeukemiaNet

EUTOS: European Treatment and Outcome Study

HU: hidroksiüre

IFN-alfa: interferon alfa

IRIS: İnterferon alfa ve STI571'in Uluslararası Randomize Çalışması

KML: Kronik Myelositik Lösemi

M-CSF: makrofaj koloni stimüle edici faktör

MMY: majör moleküler yanıt

NCCN: National Comprehensive Cancer Network

OCT: organik katyon taşıyıcı

P: kromozom kısa kolu

PDGF: platelet derived growth factor

Ph: Philadelphia kromozomu

Q: kromozom uzun kolu

RNA: ribonükleik asit

RT-QPCR: real time quantitative polymerase chain reaction (gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu)

SNP: single nucleotide polymorphism (tek nükleotid polimorfizmi)

TKİ: tirozin kinaz inhibitörü

ÖZET

Bulakçı BB. Kronik Myelositik Lösemi hastalarında moleküler monitörizasyon-klinik seyir ilişkisinin ve SLC22A1 mRNA ekspresyonunun araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü ABD, Genetik BD. Doktora Tezi. İstanbul. 2018.

Kronik myeloid lösemi (KML), miyeloproliferatif hastalıklar grubunda yer alan ve Filadelfiya kromozomunun varlığı ile karakterize klonal bir hastalıktır. Patogenezinde BCR-ABL füzyon geninin kontrolsüz tirozin kinaz aktivitesi bulunmaktadır. Tedavide kullanılan tirozin kinaz inhibitörlerine gelişen direnç nedeniyle prognostik belirteçlerin araştırılması günümüzde önem kazanmıştır. SLC22A1 geni imatinibin hücre içine alınmasında görevli olan OCT-1 proteinini kodlamaktadır. Çalışmamızda tedaviye duyarlı ve dirençli hasta grubunda SLC22A1 geninin ekspresyon düzeyini karşılaştırmayı amaçladık. KML tanısı olan 101 gönüllü hasta ile çalışıldı. Bunların 51'i imatinibe duyarlı iken 50'si dirençliydi. Hastalardan alınan kan örneklerinden RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve RT-QPCR yapıldı. Çıkan değerler Livak formülüne yerleştirilerek hedef (SLC22A1) ve referans genlerin (HPRT) göreceli ekspresyon düzeyleri belirlendi. İstatistiksel karşılaştırmalarda Student-t testi, Mann Whitney U testi, Ki-kare ve Fisher'in Kesin Ki-kare testi kullanıldı. Tedaviye duyarlı ve dirençli gruplar arasında, cinsiyet, yaş ortalaması, tanı yaşı ortalaması açısından anlamlı farklılık yoktu. Toplamda 40 hastaya mutasyon analizi yapılmıştı. En sık saptanan mutasyon F359V mutasyonu idi. İmatinibe duyarlı ve dirençli grup arasında OCT-1 ekspresyonu açısından anlamlı farklılık saptanmadı. Bu alanda yapılan çok sayıda ekspresyon çalışması mevcuttur ancak çalışılan hücrelerdeki, yöntemlerdeki ve popülasyondaki farklılıklar, SLC22A1 gen ekspresyonunun dinamik olması, posttranslasyonel düzenlemeler, epigenetik değişiklikler gibi sebeplerden ötürü birbiriyle uyumsuz sonuçlar elde edilmektedir. Daha geniş çaplı ve standardize araştırmaların yapılması bilime büyük katkılar sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: KML, SLC22A1 geni, OCT1 proteini, gen ifadesi, tirozin kinaz inhibitörleri

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 57862

ABSTRACT

Bulakçı BB. Investigation of molecular monitoring-clinical course relationship and SLC22A1 mRNA expression in Chronic Myelocytic Leukemia patients. İstanbul University, Institute of Health Sciences, Aziz Sancar Experimental Medical Research Institute, Genetic Department, PhD Thesis. İstanbul. 2018.

Chronic myeloid leukemia (CML) is a clonal disorder characterized by the presence of the Philadelphia chromosome, CML is present in the group of myeloproliferative diseases. In its pathogenesis the uncontrolled tyrosine kinase activity of the BCR-ABL fusion gene is present. Because of resistance to treatment tyrosine kinase inhibitors, prognostic markers have become important nowadays. SLC22A1 encodes the protein OCT-1, which is involved in the uptake of the broad imatinib into the cell. We aimed to compare the expression level of the SLC22A1 gene in the treatment-sensitive and resistant group of patients in our study. 101 volunteer patients with CML were studied. 51 of them were imatinib sensitive while 50 were resistant. RNA isolation, cDNA synthesis and RT-QPCR were performed on peripheral blood samples from patients. The resulting values were placed in the Livak formula to determine the relative expression levels of the target (SLC22A1) and reference genes (HPRT). Student-t test, Mann-Whitney U test, Chi-square test and Fisher's exact test were used for statistical comparisons. There was no significant difference between the groups that were sensitive and resistant to treatment, in terms of gender, age average, and age of diagnosis. Mutation analysis was performed on 40 patients in total. The most frequently identified mutation was F359V mutation. There was no significant difference in the expression of OCT-1 between the imatinib-sensitive and resistant group. There are a number of expression studies performed in this area, but inconsistent results are obtained due to reasons such as differences in the methods and populations of the cells studied, dynamic expression of the SLC22A1 gene, posttranslational regulation, epigenetic changes. Larger and more standardized researches will provide greater benefits.

Key Words: CML, SLC22A1 gene, OCT1 proteine, gene expression, thyrosine kinase inhibitors

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 57862

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik miyeloid lösemi (KML), miyeloid öncül hücrelerin kontrolsüz bir biçimde çoğalarak kemik iliğinden periferik kana geçtiği klonal miyeloproliferatif bir hastalıktır [1]. Hastalıktan sorumlu olan genetik değişiklik, 9 ve 22 numaralı kromozomların, bir translokasyon neticesinde birleşerek BCR-ABL (breakpoint cluster region-Abelson) füzyon genini içeren Filadelfiya (Philadelphia) kromozomunun (Ph) oluşmasıdır [2]. BCR-ABL füzyon geni tarafından kodlanan peptidin tirozin kinaz aktivitesi artmıştır. Bu durum aşırı hücre proliferasyonuna yol açarak kanserleşmeyi başlatır. Tedavide bu aktiviteyi bloke eden tirozin kinaz inhibitörleri (TKİ) kullanılır. Tirozin kinaz inhibitörlerinden biri olan imatinib, erken evre KML hastalarında yüksek başarı göstermektedir, ancak direnç gelişimi nedeniyle ileri evre KML hastalarındaki imatinib başarısı erken evredekinden çok daha düşüktür [3]. Direnç gelişiminde rol alan mekanizmalardan biri de ilacın hücre içine alınmasında aksamadır. İmatinibin hücre içine alınmasından OCT-1 (organik katyon taşıyıcı) proteini sorumludur. Bu proteini kodlayan SLC22A1 geninin ekspresyon düzeyinin tedavi yanıtını etkilediğinin gösterilmesi, tedavi direncinin öngörülebilmesine, tedavi seçeneklerinin daha doğru değerlendirilmesine ve hastaya uygun tedavi başlanmasına katkı sağlayabilecektir.

Çalışmamızda KML tanılı hastaların izlemi sırasında elde edilen moleküler ve sitogenetik sonuçların incelenerek, imatinib tedavisine duyarlı ve dirençli hastalarda SLC22A1 geninin ekspresyonuna bakılması ve ekspresyon düzeyi ile tedaviye yanıt arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KML Oluşum Mekanizması ve Patogenezi

Kronik miyeloid lösemi sıklıkla 40-60 yaşları arasında görülen bir kök hücre hastalığıdır. Erkeklerde daha sık (E/K:1,3/1) rastlanmaktadır, erişkin lösemilerinin de yaklaşık %15'ini oluşturmaktadır [1]. Dokuz ve 22 numaralı kromozomlar arasındaki resiprokal translokasyon sonucunda 22. kromozomun q kolu kısalıp Filadelfiya kromozomunu oluşturur [2, 4]. Hastaların büyük bölümünde (>%90) bu kromozom sitogenetik tetkiklerle saptanabilir. Bazılarında ise KML bulguları olmasına rağmen Filadelfiya kromozomu saptanamaz ve moleküler yöntemlerle BCR-ABL gösterilebilir. Bu hastalar maskeli (kriptik) KML olarak adlandırılır. Filadelfiya negatif ve BCR-ABL negatif hastalar ise atipik KML olarak adlandırılırlar ve farklı bir antiteyi oluştururlar [5]. Yirmi iki numaralı kromozomun q11 bandındaki Breakpoint Cluster Region (BCR) geni ve 9 numaralı kromozomun q34 bandına yerleşik Abelson (ABL1) genleri yanyana gelerek yeni bir gen olan BCR-ABL1 füzyon genini meydana getirir [6-9]. Normal Abl proteini; hücre siklusunun düzenlenmesinde [10, 11], genotoksik strese hücrel cevapta [12], ve integrin sinyal yolu aracılığıyla hücrel mikro çevre ile iletişimde [13] görevlidir ve bu proteinin tirozin kinaz aktivitesi sıkı bir şekilde kontrol edilir [3]. Çeşitli hücre içi ve hücre dışı kaynaklara ait sinyalleri birleştirerek hücre siklusu ve apoptozla ilgili olaylarda rol alır [2].

BCR geninin kırılma noktasının yerleşimine göre 3 tip füzyon protein oluşmaktadır: p190^{BCR/ABL} (M-bcr breakpoint), p230^{BCR/ABL} (μ -bcr breakpoint) ve KML'de sık gözlenen p210^{BCR/ABL} (M-bcr breakpoint) [14]. Bunlardan 210 kDa ağırlığındaki p210 peptidi, otonom olarak çalışan bir tirozin kinaz aktivitesine sahiptir [3]. Hücre proliferasyonu, DNA tamiri, hücre siklusu gibi çeşitli yollarda görevli olan proteinleri fosforilleyerek adezyon özelliklerinin değişmesine, apoptoz kaybına, genetik instabiliteye [15-17], Ph pozitif hücre klonunun çoğalmasına ve lökositoya neden olur.

KML patogenezinde rol alan çeşitli mekanizmalar tanımlanmıştır. Bunların ilki, normal fizyolojik şartlarda çok sıkı bir şekilde kontrol edilen Abl tirozin kinaz aktivitesinin regülasyonundaki bozulmadır. Diğerleri ise, hücrelerin adezyon özelliklerinin değişmesi [18], mitogenik sinyal aktivasyonu [19] ve apoptozun baskılanmasıdır [17].

KML öncül hücrelerinin adezyon özelliği hem kemik iliğinde bulunan stroma hücrelerinde hem de ekstraselüler matrikste zayıflamıştır [18, 20]. Stromaya adezyon, hücre proliferasyonunu negatif etkilemektedir ve KML hücreleri bozulmuş adezyon özellikleri nedeniyle bu düzenlemeyi kurtulmaktadırlar. KML tedavisinde kullanılan bir ajan olan interferon- alfa'nın (IFN-alfa) bu adezyon defektini düzelttiği bilinmektedir [21].

Mitogenik sinyal aktivasyonu Ras ve MAP kinaz yolları, Jak-Stat yolağı, PI3 kinaz yolağı ve Myc yolağı vasıtasıyla olur. Birçok çalışmada BCR-ABL pozitif hücre serilerinin, DNA hasarının indüklediği apoptoza dirençli olduğu gösterilmiştir [17, 22].

2.2. KML Etiyolojisi

Kromozomal translokasyona neden olan etmenler net olarak tespit edilememiştir ancak yapılan epidemiyolojik çalışmalarda iyonize radyasyona maruziyetin KML için önemli bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir [23, 24]. İn vitro ortamda iyonize radyasyona maruz bırakılan hematopoetik hücrelerde BCR-ABL füzyon transkripti oluşumunun indüklendiği gösterilmiştir [25]. Yapılan araştırmalarda BCR ve ABL genleri arasındaki fiziksel mesafenin insan lenfositlerinde [26] ve CD34 hücrelerde [27] rastlantısal bir yerleşimden daha kısa olduğu saptanmış ve bu durumun her 2 gen arasındaki translokasyon olaylarını kolaylaştırabileceği belirtilmiştir.

Bunun yanı sıra, hematopoetik hücrede BCR-ABL translokasyonunun mevcut olmasının tek başına lösemi oluşturmak için yeterli olmadığını, BCR-ABL füzyon transkriptlerinin M-bcr ve m-bcr tiplerinin birçok sağlıklı bireyin kanında düşük miktarda saptandığını belirten çalışmalar da mevcuttur [28, 29]. Ph⁺ lösemisinin bu kişilerin neden az bir kısmında olduğu henüz net değildir. Translokasyonun, terminal farklılaşmaya gidip elimine olacak hücrelerde oluşuyor olması ya da Bcr-Abl ekspres eden hücrelerin immün yanıt tarafından baskılanması/elimine edilmesinin bu duruma yol açabileceği belirtilmektedir [30].

2.3. KML Tanısı

Türk Hematoloji Derneği'nin 2016'da yayımladığı Ulusal Tanı ve Tedavi Klavuzu'nda [1] kronik evre KML hastalarının öncelikle anamnez, fizik muayene, hemogram, periferik yayma ve biyokimyasal tetkiklerle değerlendirilmesi, bir sonraki aşamada da kemik iliği aspirasyonu ya da biyopsisi yapılması önerilmektedir. Kemik

iliği örneğinin alınmadığı durumlarda sitogenetik incelemenin periferik kandan yapılabileceği belirtilmiştir. Tanı sırasında Sokal, Euro (Hasford) ve EUTOS (European Treatment and Outcome Study) risk skorunun hesaplanması [31-33] ve moleküler yanıtın takibi için periferik kandan BCR- ABL1 kantitatif PCR çalışılması da önerilmektedir [1].

2.4. KML Prognozu

Tanı esnasındaki klinik özellikler, tedaviye erken yanıt, bazı kinaz domain mutasyonlarının varlığı ve ilave sitogenetik ve moleküler değişiklikler KML hastalarında prognozu etkileyebilmektedir [34].

2.4.1. KML risk skorlamaları

KML hastalarının tanı anındaki özelliklerine göre risk sınıflarına ayırmada kullanılırlar. Günümüzde 3 farklı skorlama sistemi mevcuttur: Sokal, Hasford ve EUTOS. 1984 yılında kullanıma giren Sokal sınıflaması, standart kemoterapi (busulfan ya da hidroksiüre) ile tedavi edilmekte olan hastaları, her biri farklı yaşam beklentisi süresine sahip 3 risk grubuna ayırmaktadır [35].

Sokal Risk Skoru Hesaplanması [31]

Skor = $0.0116 \times [\text{yaş (yıl)} - 43.4] + 0.0345 \times (\text{dalak} - 7.51) + 0.188 \times [(\text{trombosit sayısı}/700) - 0.563] + 0.0887 \times (\text{blast} - 2.10)$ formülü ile hesaplanır.

Elde edilen sonuç 3 risk kategorisinde sınıflanır. 0,8'in altı 'düşük risk', 0,8-1,2 arası 'orta risk', 1,2'nin üzeri ise 'yüksek risk' olarak nitelendirilir.

Erken evre KML'de interferon alfanın kullanımının yaygınlaşmasıyla Sokal sınıflaması prognostik önemini kaybetmiştir yerine Hasford skorlama sistemi geliştirilmiştir [32].

Euro, Hasford Risk Skoru Hesaplanması [32]

Skor = $(0.6666 \times \text{yaş} [\text{yaş} < 50 \text{ ise } 0; \text{bunun dışında } 1] + 0.0420 \times \text{dalak boyutu} + 0.0584 \times \text{blast} [\%] + 0.0413 \times \text{eozinofil} [\%] + 0.2039 \times \text{bazofil} [\text{bazofiller} < 3\% \text{ ise } 0; \text{bunun dışında } 1] + 1.0956 \times \text{trombosit sayısı} [\text{trombositler} < 1.500 \times 10^9/\text{L} \text{ ise } 0, \text{bunun dışında } 1]) \times 1.000$ formülü ile hesaplanır.

Elde edilen sonuç 3 risk kategorisinde sınıflanır. 780 ve altı ‘düşük risk’, 781-1480 arası ‘orta risk’, 1480’in üzeri ise ‘yüksek risk’ olarak nitelendirilir.

2011’de EUTOS (European Treatment and Outcome Study) birinci kuşak tedavide standart imatinib kullanımını değerlendiren skarlama sistemi devreye girmiştir.

EUTOS Risk Skoru Hesaplaması [33]

Skor = Dalak x 4 + bazofiller x 7 formülü ile hesaplanır.

Elde edilen sonuç 2 risk kategorisinde sınıflanır. 87 ve altı ‘düşük risk’, 87’in üzeri ise ‘yüksek risk’ olarak nitelendirilir.

18. aydaki tam sitogenetik yanıt tahmininde ve 5 yıllık ilerlemesiz sağkalım tahmininde EUTOS skarlama sisteminin Sokal ve Hasford’dan daha başarılı olduğu bulunmuştur [33]. Ancak bu skarlama sistemleri daha çok klinik özelliklere dayandığı için, genetik ve moleküler parametreler içermediği için nispeten kısıtlı bilgiler sağlamaktadır [34].

2.4.2. İlave sitogenetik aberasyonların varlığı

İlave sitogenetik anomalilerin yeni tanı alan KML hastalarının yaklaşık %10-15’inde mevcut olduğu bildirilmiştir [36]. Bu anomalilere sahip hastaların tam sitogenetik yanıt ve majör moleküler yanıtı ulaşma süresinin daha uzun olduğunu [37], bu anomalilerin tedavi esnasında oluşmasının, hastalık evresinin hızlanmış evre ya da blast krizine ilerlemesine yol açtığını [38] ve bu hastaların prognozlarının çok daha kötü olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [39].

2.4.3. Varyant translokasyonlar

KML hastalarının tamamına yakını t(9;22)(q34;q11) translokasyonu neticesinde oluşan bir BCR-ABL füzyon genine sahiptir ancak hastaların %5-10’unda 9 ve 22 numaralı kromozomları ve bazen de bir ya da daha fazla sayıda diğer kromozomları içeren daha kompleks düzenlenmeler mevcuttur [40]. Ancak bu varyant translokasyonların prognostik değeri tartışmalıdır [41-45].

2.4.4. Farmakokinetik değişiklikler

İlacın emilim bozukluğu, ilacı metabolize eden sitokrom p450 enzim aktivitelerinde değişiklik olması, ilaç bağlayıcı proteinlerin plazma düzeyindeki değişiklikler ya da ilacın hücre içine alınmasını ve hücreden atılmasını sağlayan

proteinlerin aktivitelerindeki değişiklikler ilacın hedef dokuya yeterli miktarda ulaşmasını etkilemektedir. İmatinibi hücre içine taşıyan en önemli taşıyıcı OCT1 proteindir [46]. İmatinibin hücre içine girme seviyesini gösteren OCT1 aktivitesinin uzun vadedeki direnç gelişme riskini öngörebileceği belirtilmiştir [47]. İmatinib plazma düzeyinin prognostik değeri konusunda da çalışmalar yapılmış ancak fikir birliğine varılmamıştır [48-51].

2.4.5. Mutasyonlar

BCR-ABL kinaz domain mutasyonları da önemli bir direnç geliştirme mekanizmasıdır [52] ve imatinib tedavisi sırasında edinilen çoğu mutasyon direnç gelişimine ve kötü prognoza işaret etmektedir [34]. İmatinibe dirençli tüm vakaların yaklaşık %40-50'sinde sebebin bu mutasyonlar olduğu bildirilmiştir [53, 54]. Relaps ile en çok ilişkilendirilen mekanizmanın da kinaz domain mutasyonları olduğunu söyleyen yayınlar mevcuttur [55]. Kinaz bölgesinde nokta mutasyonları ve çerçeve kaydırma mutasyonlarının yanı sıra kinaz bölgesi dışındaki SH2, SH3 ve Cap bölgesinde de mutasyonların görülebildiğini ve bu mutasyonların da imatinib direnci ile ilgili olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur [56]. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) kılavuzlarında, tirozin kinaz inhibitörü tedavisinin başlangıcında yetersiz yanıt olduğunda ya da relaps, hastalık ilerlemesi gibi durumların varlığında mutasyon analizlerinin yapılması önerilmektedir [57]. İleri evrede tanı alan tüm hastaların da mutasyon analizlerinin yapılması European LeukemiaNet (ELN) tarafından önerilmektedir [52].

2.5. KML Evreleri

KML sıklıkla 3 farklı klinik evre şeklinde görülmektedir: kronik, hızlanmış ve blastik evre [31]. Tanı anında hastaların %30 kadarı asemptomatik, %10'u hızlanmış evrede, %10'u da blastik evrede olabilmektedir [1]. Tedavisiz kaldığında KML tipik olarak 4-6 yıl içinde başlangıç evresi olan kronik evreden hızlanmış evreye ve sonraki 1 yıl içinde de ölümcül evre olan blastik krize ilerler [58]. Blastik evre hastaların yaklaşık üçte ikisinde miyeloid fenotipte, kalan kısmında ise lenfoid fenotipte görülmektedir [59] ve 3-6 ay yaşam beklentisiyle kötü bir prognoza sahiptir. Hastaların çoğu kronik evrede hekime başvurup tanı alırlar [60].

2.6. Tedavi Seçenekleri

KML'nin ilk tedavisi dalak ışınlaması (x-ray), busulfan ve hidroksiüre gibi konvansiyonel ilaçlardı. Bu tedaviler hastalığın kronik evresi boyunca yaşam kalitesini arttırmakta ancak hastalığın ilerlemesine etki edememekteydi [5, 61, 62]. Allogenik kök hücre nakli KML tedavisinde çığır açan ilk önemli adım olarak kabul edilmektedir, çünkü nakile uygun olan hastaların yaklaşık %50'si tedavi edilebilmektedir [63, 64]. İkinci önemli adım, hastaların %15-30'unu tam sitogenik yanıtı kavuşturabilen insan rekombinant interferon-alfanın tedaviye girmesi olmuştur [65]. Ancak istenmeyen toksisite nedeniyle interferon-alfanın kullanımı yıllar içinde kısıtlanmıştır [66]. İmatinib öncesi dönemde tedavinin esas hedefi 'yaşam süresinin uzatılması' idi ve 'tam şifa' sadece allogenik kök hücre nakli başarılı olan hastalar için söz konusuydu.

İki binli yıllardan sonra tirozin kinaz inhibitörü olan imatinibin kullanıma girmesiyle tedavi stratejisi ve neticeleri tamamen değişmiştir. Günümüzdeki tedavi hedefleri, hastalığın hızlanmış evreye ilerlemesinin önlenmesi, lösemiden ölüm riskinin sıfıra indirilmesi, yaşam süresinin ve yaşam kalitesinin lösemi olmayan bireylerinkine yaklaştırılması olarak sayılabilmektedir [67].

Tirozin kinaz inhibitörleri (TKİ), belirgin bir yan etki yaratmadan majör moleküler remisyonu sağlayıp, yaşam süresini anlamlı olarak uzatabilmektedir. Bu ilaçlar BCR-ABL proteininin tirozin kinaz aktivitesini bloke etmektedirler. İmatinib, BCR-ABL'nin ATP bağlayan bölgesine yarışmalı şekilde bağlanarak inaktive eder ve sinyalin alt yollara ulaşmasını önler [68, 69]. Bunun yanı sıra c-ABL [70], Tel/ABL, c-KİT [68, 71] ve PDGF (platelet derived growth factor) reseptörleri [71], makrofaj koloni stimüle edici faktör reseptörü (M-CSF) de [72] imatinib tarafından bloke edilmektedir.

IRIS (İnterferon alfa ve STI571'in Uluslararası Randomize Çalışması), Ph+ lösemilerin tedavisinde imatinib kullanımının klinik ve bilimsel arka planını oluşturmuştur. Bu çalışmanın faz 3 sonuçları doğrultusunda, imatinib, majör sitogenetik yanıt, tam sitogenetik yanıt oranlarını ve hızlanmış evreye ya da blastik evreye ilerlememe oranlarını, interferon alfa + sitarabine kıyasla anlamlı olarak daha fazla arttırmıştır ve Filadelfiya pozitif (Ph+) KML için onaylanmış ilk tirozin kinaz inhibitörü olmuştur [73]. IRIS çalışmasının takibinde, imatinibin 8 yıllık tedavi süresince etkinlik ve güvenilirliği doğrulanmıştır [74-76]. BCR-ABL1 tirozin kinaz inhibitörünün

kullanılmaya başlanması, KML tedavisinde büyük bir ilerleme yaşanmasına yol açmıştır. TKI tedavisi KML'nin ileri evrelere ilerlemesini anlamlı olarak yavaşlatmaktadır.

İmatinib, kronik evre KML hastalarının çoğunda mükemmel bir sitogenetik ve moleküler yanıt elde edilmesini sağlamaktadır [76], yeni tanı KML hastalarının yaklaşık %95'i tam hematolojik yanıt, %80'i de tam sitogenetik remisyona kavuşmaktadırlar [73] ancak hastaların %25-30'unda primer direnç ya da suboptimal yanıt gözlenmektedir [77] ve bu hastalar hastalığın ilerlemesi bakımından oldukça yüksek risk altındadırlar [78]. İmatinib direnci primer ve sekonder olarak iki gruba ayrılır: primer (intrinsik) direnç, tedavinin başlangıcından itibaren direnç görülmesi ve sekonder (edinilmiş) direnç, tedavinin ilerleyen aşamalarında imatinib kullanımı sonucu gelişen dirençtir [79, 80].

İmatinibe yanıtı etkileyen faktörler KML evresi, BCR-ABL1 bağımlı mekanizmalar ve BCR-ABL1'den bağımsız mekanizmalar başlıkları altında toplanabilmektedir [81]. BCR-ABL1'e bağımlı mekanizmalar BCR-ABL1'in tirozin kinaz domainindeki mutasyonlar ve/veya BCR-ABL1 proteininin overekspresyonu ile ilgili iken [82], BCR-ABL1'den bağımsız mekanizmalar imatinib farmakokinetiği, BCR-ABL1'den sonraki onkogenik yollarla ilgilidir [83].

Tedaviye yanıtsızlık, hastanın tedaviye uyumsuzluğu [84], değişken metabolize edici enzim aktiviteleri [85], ilaç etkileşimleri [86], hücre içine ve hücre dışına taşıyıcı protein aktiviteleri [87], BCR-ABL mutasyon varlığı [82] gibi durumlarla ilişkili olabilmektedir [88]. İmatinib tedavisine başlanmadan önceki döneme ait hastalık süresi, tedavi öncesi periferik kandaki blast sayısı ve altıncı aydaki sitogenetik yanıt, kronik evre KML hastalarında mutasyona bağlı direnç gelişimi için risk faktörlerindendir [89].

İmatinibden daha potent olan 5 yeni tirozin kinaz inhibitörü üretilmiştir: nilotinib, dasatinib, bosutinib, ponatinib ve rebastinib. Nilotinibin yarılanma ömrü imatinibe benzerdir (yaklaşık 17 saat) [90], imatinibe dirençli bazı mutasyonlarda etkili olup [91] imatinibe göre 25 kat daha potenttir [92]. Ancak F317L, V299L ve T315A gibi nilotinibe dirençli mutasyonlar da mevcuttur [52]. ABL kinaz domainin hem aktif hem inaktif konformasyonuna bağlanabilen dasatinibin [93] yarılanma ömrü imatinibden daha kısadır (yaklaşık 3,6 saat) [90] . T315I, F317V/L gibi bazı mutasyonlar hariç [94] diğer mutasyonlara etkilidir ve tirozin kinazı inhibe edici etkisi

imatinibden 100-300 kat daha fazladır [3, 95]. Bosutinib de T315I ve V299L hariç olmak üzere imatinibe dirençli çoğu mutasyonda etkilidir [96, 97]. Yaklaşık 22-27 saatlik bir yarılanma ömrü vardır ve önceden dastinib ya da nilotinib verilmiş olan hastalarda etkin olduğu gösterilmiştir [90, 98-100]. Ponatinib T315I mutasyonunda etkilidir [101], ileri evre KML hastalarında etkin bir ilaç olduğu kanıtlanmıştır [102]. Rebastinib de T315I mutasyonunda etkili olan diğer bir tirozin kinaz inhibitörüdür [103].

ELN, günlük klinik uygulamada KML hastalarının tıbbi yönetimi için öneriler geliştirmiştir [104]. İmatinib direncini, intoleransı, tedaviye uyumsuzluk ya da ileri evrelere geçişi saptayabilmek için, tedaviye yanıtın ve prognostik faktörlerin dikkatli ve yakın bir şekilde takip edilmesi gereklidir. Sonrasında da ikinci kuşak tedavilerin yararları göz önünde bulundurulmalıdır. Tedavi başarısı için gerekli olan tüm veri ve izlem şemaları uygun şekilde kaydedilmelidir.

2.7. Evrelere Göre Tedavi Yaklaşımları

Ucuz ve hızlı etkili ve güvenli bir ilaç olması bakımından ve çok yüksek lökosit sayısını düşürdüğünden hidroksiüre, tahlil sonuçları çıkana kadar ilk birkaç gün hastalığı kontrol altına alma amacıyla kullanılmaktadır [67]. Allogenik kök hücre nakli ise günümüzde de tam ve daimi moleküler negatifliği sağlayabilen tek tedavi yöntemidir.

BCR-ABL'nin tirozin kinaz aktivitesini inhibe eden imatinib mesilatın 1998 yılında kullanıma girmesi ile tedavi stratejilerinde ve sonuçlarında dramatik değişiklikler olmuştur. Tirozin kinaz inhibitörlerine yanıtın düzeyi ve elde edilme süresi KML hastalarında pognozun öngörülmesinde oldukça önemlidir. Dikkatli bir sitogenetik ve moleküler izlem, tedavide en uygun tirozin kinaz inhibitörünün seçilmesine yardımcı olmaktadır. ELN 2013 yılında, KML için optimal sitogenetik ve moleküler izleme dair öneriler oluşturmuştur [105].

Ph+ KML hastalarının birinci basamak tedavisinde 3 çeşit (imaitinib, nilotinib ve dasatinib), ikinci basamak tedavisinde ise 2 çeşit tirozin kinaz inhibitörü (bosutinib ve ponatinib) kullanılabilir. İlaç seçiminde hastaya bağlı, ilaca bağlı ve finansal olmak üzere çok sayıda faktör devreye girmektedir.

Her ne kadar KML hastaları için potansiyel bir küratif tedavi olarak kabul edilen

allogenik hematopoetik kök hücre nakli (alloHSCT), standart olarak ileri evredeki hastalar için uygulansa da, hızlanmış ya da blastik evredeki hastaların alloHSCT sonrası seyri kronik evredekilere göre daha kötüdür. AlloHSCT sonrası 3 yıllık yaşam beklentisi kronik evre KML hastalarında %91 iken, hızlanmış /blastik evre KML hastalarında %59'dur [106].

2.8. Tedaviye Yanıt [1, 105]

Kronik miyelositik lösemi takibinde hematolojik, sitogenetik ve moleküler parametreler kullanılmaktadır. Tedaviye yanıtın değerlendirilmesi için de hematolojik yanıt, sitogenetik yanıt ve moleküler yanıt tanımları kullanılmaktadır.

2.8.1. Tam hematolojik yanıt (THY) kriterleri

Lökosit sayısının 10.000/ μ L'nin altında olması, periferik kanda bazofil sayısının %5'in altında olup, miyeloblast, promiyelosit ve miyelosit hücrelerinin görülmemesi, trombosit sayısının 450.000/ μ L'nin altında olması ve dalağın palpe edilememesidir.

2.8.2. Sitogenetik Yanıt (SY) kriterleri

En az 20 metafazın değerlendirilmesi gereken sitogenetik incelemede Ph + metafazın olmaması 'tam sitogenetik yanıt', Ph + metafaz oranının %1 ile % 35 arasında olması 'kısmi sitogenetik yanıt', Ph + metafaz oranının % 36 ile % 65 arasında olması 'minör sitogenetik yanıt', Ph + metafaz oranının % 66 ile % 95 arasında olması 'minimal sitogenetik yanıt', Ph + metafaz oranının %95'in üzerinde olması 'sitogenetik yanıtsızlık' olarak tanımlanmaktadır.

2.8.3. Moleküler Yanıt (MY) kriterleri

BCR-ABL1/ABL1 oranının % 0,1 ve altında olması majör moleküler yanıt (MMY, MY^{3.0}); BCR-ABL1 oranının %0.01 ve altında olması ya da cDNA'nın 10.000 ABL1 kopyadan fazla olması MY^{4.0} ; BCR-ABL1 oranının %0.0032 ve altında olması ya da cDNA'nın 32.000 ABL1 kopyadan fazla olması MY^{4.5} olarak tanımlanmıştır. RT-PCR ya da nested PCR ile BCR-ABL1 tespit edilemediğinde ise moleküler olarak tespit edilemeyen lösemiden bahsedilmektedir.

2.9. Tedavi Yanıtının İzlenmesi [1, 105]

Tedaviye yanıt monitörizasyonu hematolojik, sitogenetik ve moleküler parametrelerin belli aralıklarla incelenmesiyle yapılmaktadır. Hematolojik testlerin tanı

anından itibaren tam hematolojik yanıt sağlanana kadar ikişer hafta arayla, sonrasında en az üç ayda bir yapılması; sitogenetik testlerin tanı anında, üçüncü ve altıncı aylarda, tam sitogenetik yanıtı kavuşana kadar yılda iki kez, tam sitogenetik yanıtı kavuştuktan sonra yılda bir kez yapılması; tedaviye yanıtızsızlık, açıklanamayan anemi, lökopeni, trombositopeni gibi durumlarda daima yapılması önerilmektedir. Moleküler izlem RT-QPCR yöntemiyle yapılır. Majör moleküler yanıtın elde edilmesi ve doğrulanmasına kadar 3 ayda bir, sonrasında 3-6 ayda bir yapılması; uyarı durumunda moleküler ve sitogenetik testlerin daha sık yapılması önerilmektedir. Tedaviye yanıt alınmadığında (uyarı, yanıtızsız durumda), tedavide herhangi bir değişiklik yapılmadan evvel ve hızlanmış ya da blastik evrede karşılaşılan tüm hastalara moleküler mutasyon analizi yapılmalıdır.

İki bin dokuz yılındaki ELN kılavuzunda dört gruba ayrılan (optimal yanıt, suboptimal yanıt, yanıtızsız, uyarı) tedaviye yanıt sınıflaması [63], 2013 yılında yeniden gözden geçirilmiştir. Yeni sınıflama optimal yanıt, uyarı ve yanıtızsız şeklinde güncellenmiştir [105].

Birinci kuşak tirozin kinaz inhibitörü ile tedavinin 3. ayında BCR-ABL1 oranının %10'dan az olması ve/veya Filadelfiya pozitif metafaz oranının %35'den az olması, tedavinin 6. ayında BCR-ABL1 oranının %1'den az olması ve/veya Filadelfiya pozitif metafazın olmaması, tedavinin 12. ayında ya da herhangi bir döneminde BCR-ABL1 oranının % 0,1'den az olması 'optimal yanıt'; tedavi başlangıcında yüksek risk bulunması ya da Filadelfiya pozitif hücrelerde klonal kromozom anomalisi olması, tedavinin 3. ayında BCR-ABL1 oranının %10'dan fazla olması ve/veya Filadelfiya pozitif metafaz oranının %36 ile %95 arasında olması, tedavinin 6. ayında BCR-ABL1 oranının %1 ile %10 arasında olması ve/veya Filadelfiya pozitif metafaz oranının %1 ile %35 arasında olması, tedavinin 12. ayında BCR-ABL1 oranının %0.1 ile %1 arasında olması, tedavinin herhangi bir döneminde Filadelfiya negatif hücrelerde klonal kromozom anomalisi olması 'uyarı'; tedavinin 3. ayında tam hematolojik yanıtın olmaması ve/veya Filadelfiya pozitif metafaz oranının %95'den fazla olması, tedavinin 6. ayında BCR-ABL1 oranının %10'dan fazla olması ve/veya Filadelfiya pozitif Ph+ metafaz oranının %35'ten fazla olması, tedavinin 12. ayında BCR-ABL1 oranının %1'den fazla olması ve/veya Filadelfiya pozitif metafaz saptanması, tedavinin

herhangi bir döneminde tam hematolojik yanıt kaybı, tam sitogenetik yanıt kaybı, teyit edilmiş majör moleküler yanıt kaybı, mutasyon tespiti, Filadelfiya pozitif hücrelerde klonal kromozom anomalisi varlığı gibi durumlar ise ‘yanıtsız’ olarak değerlendirilmektedir [1, 105]. Optimal yanıtta mevcut tedaviye devam edilmesi, yanıtsızlık durumunda tedavide değişiklik yapılması, uyarı durumunda ise tedavi yanıtının daha yakından takip edilmesi önerilmektedir [105].

Hastaların tedaviye yanıtını öngörebilmek, uygun ilaç ve doz seçilebilmesi için oldukça önemlidir. Bu bağlamda hangi parametrelere bakılabileceği, hangilerinin anlamlı ve değerli bilgi verdiği konusunda çok çeşitli araştırmalar yapılmıştır. In vitro ortamda BCR-ABL kinaz aktivitesinin %50’sinin baskılanabilmesi için gereken imatinib konsantrasyonu ($IC_{50}^{imatinib}$), KML hücrelerinin imatinibe duyarlılığını belirleyen bir testtir [107] ve imatinibe duyarlılığı fazla olan (düşük $IC_{50}^{imatinib}$) hastaların moleküler yanıtının daha iyi olduğunu gösterilmiştir [108]. Bunun yanı sıra OCT1 aktivitesi [47], OCT1 mRNA düzeyi [109] ve gen ekspresyon profilleri de bu amaçla çalışılmıştır.

2.10. SLC22A1 Geni ve OCT-1 Proteinini

İmatinibin hücre içine aktif transportu OCT1 proteinine bağlıdır [46, 110]. OCT1 proteini, SLC (solute carrier family) ailesine ait bir taşıyıcı proteindir [111, 112]. Bu ailenin alt grubunu oluşturan SLC22 ailesi, organik katyon taşıyıcıları (OCT) da kapsayan 12 üyeye sahiptir [46]. OCT proteinleri, SLC22A ailesinin çoğu üyesi gibi 12-alfa helikal transmembran domaine ve hücre içinde lokalize C- ve N- terminal uçlara sahiptir [113] ve toksinler, ilaçlar, ksenobiyotikler gibi çeşitli organik katyonların taşınmasında görev alırlar. OCT1’i kodlayan SLC22A1 geni 6q26 üzerinde yerleşiktir [114], 11 ekzon ve 10 intron içerir [115, 116].

Kronik miyeloid löseminin patogenezinin BCR-ABL proteininin artmış tirozin kinaz aktivitesi sorumlu olduğundan, tedavide bu aktiviteyi inhibe eden imatinib kullanılmaktadır. Tirozin kinaz inhibitörlerine yanıtın düzeyi ve elde edilme süresi KML hastalarında prognozun öngörülmesinde oldukça önemlidir. İmatinib tedavisi altındaki hastaların yaklaşık %25-30’unda primer direnç ya da suboptimal yanıt görülmektedir [77], bu hastalarda hastalığın ilerleme riski anlamlı olarak yüksektir. İlacın hücre içine alımını sağlayan proteini kodlayan genlerin ekspresyonunda azalma, tedaviye yanıtsızlık ile ilişkili olan durumlardan bir tanesidir. İmatinibin hücre içine

alımını sağlayan protein olan OCT-1'in aktivitesinin ve bu proteini kodlayan SLC22A1 geninin ekspresyon düzeyinin de imatinib cevabını etkilediği gösterilmiştir. Bu genin fazla eksprese olmasının, tedavi başarısıyla doğru orantılı olduğu bulunduğu çalışmalar mevcuttur [84, 109, 117].

İmatinib cevabını öngörmeye yarayan, tanımlanmış çeşitli parametreler sayesinde yüksek doz imatinibe ya da daha potent bir tirozin kinaz inhibitörüne ihtiyaç duyan hastaların belirlenebileceği öngörülmektedir [107]. Çünkü OCT1 fonksiyonu düşük olan hastalarda imatinibin hücre içi konsantrasyonunun da düşük olacağı varsayılarak bazı hastalarda daha yüksek doz imatinib kullanılması, ya da nilotinib ve dasatinib gibi hücre içine alımı OCT1 proteininden bağımsız olan [46] ikinci nesil tirozin kinaz inhibitörlerinin kullanılması gerekebilmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örneklem Bilgileri

İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen projemiz kapsamında, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji polikliniğinde, yeni tanı konmuş veya kronik miyeloid lösemi (KML) tanısıyla takip edilen hastalar ile Helsinki Bildirgesi'ne uygun olarak çalışılmıştır. Kronik miyeloid lösemi tanısı hastaların klinik, hematolojik, sitogenetik ve moleküler verilerine dayanarak, 2008 DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) sınıflamasına göre konulmuştur. Hasta seçimi ve demografik bilgiler için hasta dosyaları incelenmiştir. Hasta dosyalarındaki moleküler monitörizasyon sonuçları ELN kriterlerine [105] göre incelenerek, duyarlı (optimal yanıt verenler) ve dirençli (uyarı ve yanıtız olanlar) olarak iki grupta toplanmıştır. İmatinib tedavisine duyarlı olan 51, dirençli olan 50, toplamda 101 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayandırılmıştır. Gönüllülerin araştırmaya dahil edilme kriterleri; 18 yaşın üzerinde olmak, KML tanısına sahip olmak ve İmatinib tedavisi almış ya da alıyor olmak şeklinde belirlenmiştir. Projeye başlamadan önce İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na başvurulmuş ve 26.06.2015 tarihli, 1330 sayılı onay belgesi alınmıştır.

3.2. Veri Toplama Aşaması

Çalışmamıza dahil edilen tüm hastaların dosyaları Ocak 2016-Aralık 2016 tarihleri arasında incelenerek, yaş, cinsiyet gibi demografik verileri ve KML tanısının konulduğu tarih, ilaç tedavisine başlangıç tarihi, hangi ilaçların kullanıldığı, moleküler testlerin tarihleri ve sonuçları, BCR-ABL kinaz domain mutasyonu varlığı gibi tıbbi verileri kaydedilmiştir.

3.3. Laboratuvar

Hastaların takibi sürecinde rutin uygulama için alınan periferik kan örnekleri kullanılmıştır. Ocak 2017-Aralık 2017 tarihleri arasında, Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda bu örneklerden öncelikle total RNA izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra total RNA örneklerinden cDNA elde edilmiştir. Hedef gen (OCT1) ve referans gene (HPRT1) ait primer ve probalar kullanılarak RT-QPZR (gerçek zamanlı kantitatif

polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemi ile hedef ve referans gene ait cDNA'lar çoğaltılıp ekspresyon düzeyleri ölçülmüştür.

3.3.1. Laboratuvar malzemeleri

- Buzdolabı (-80 °C ve -20 °C)
- Santrifüj cihazı
- Nanodrop cihazı (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific, ABD)
- Roche LightCycler 480 II Real Time PCR System
- Qiagen RNeasy Mini Kit (katalog no: 74104)
- Qiagen RT2 First Strand Kit (katalog no: 330404)
- 0,5-10 µl pipet ucu
- 1-200 µl pipet ucu
- 100-1000 µl pipet ucu
- Qiagen RT² FAST SYBR Green/ROX PCR Master mix (katalog no: 330620)
- Qiagen RT² qPCR Primer Assay (200 rxn) (katalog no: 330001)
- 1,5 ml DNase RNase free mikrosantrifüj tüpü
- 0,2 ml DNase RNase free mikrosantrifüj tüpü
- 15 militrelik falkon tüpü

3.3.2. Total RNA İzolasyonu

Çalışmaya başlamadan önce soğutmalı santrifüj +4° C'ye getirilmiştir. Her örnek için 600 µl RLT buffer ve 6 µl β-Merkaptoetanol (β-ME) olacak şekilde örnek sayısına göre hesaplanarak karışım hazırlanmıştır.

1. On milyon lökosit içeren periferik kan örneği hacmi hesaplanarak falkon tüp içine alınmıştır. Bu hacmin 3 katı kadar eritrosis lizis buffer ilave edilmiştir.
2. 15-20 dakika +4° C'de inkübe edilip, inkübasyon sırasında 1-2 defa tüp alt-üst edilerek çalkalanmıştır.
3. +4° C'de 400 x g'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatant kısmı atılmıştır.
4. Tüplerin dibinde kalan lökositlerin üzerine, kan hacminin 2 katı kadar lizis buffer ilave edilip hafifçe vortekslenerek tekrar süspansiyon haline getirilmiştir.
5. +4° C'de 400 x g'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatant kısmı atılmıştır.
6. Dipte kalan lökositlerin üzerine 600 µl RLT buffer β-ME karışımı ilave edilip iyice vortekslenerek lökosit membranlarının parçalanması sağlanmıştır.

7. Lizat homojenize edici lila kolonları içeren 2 mililitrelik tüplerin içine direkt olarak konulup maksimum hızda 2 dakika santrifüj edilerek homojen hale getirilmiştir.
8. Lizatı homojenize etmek için %70'lik etanolden 600 µl eklenip pipetle karıştırılmıştır.
9. Örneğin 700 µl beyaz kolonları içeren 2 mililitrelik tüplerin içine konulup 8000 x g'de 15 sn santrifüj edilmiştir.
10. Toplayıcı tüp değiştirilerek 9. basamak tekrar edilmiştir.
11. Toplayıcı tüp değiştirilerek filtreye 700 µl birinci yıkama bufferı (Buffer RW1) ilave edilerek 8000 x g'de 15 sn santrifüj edilmiştir.
12. Toplayıcı tüp değiştirilerek 500 µl ikinci yıkama bufferı (Buffer RPE) ilave edilerek 8000 x g'de 15 sn santrifüj edilmiştir. Bu işlem bir kez daha tekrar edilmiştir.
13. Toplayıcı tüp değiştirilerek içerisine hiç bir şey koymadan kapağı kapatılıp son hızda 3 dakika santrifüj edilmiştir.
14. Kolon 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiş, 50 µl RNaz içermeyen su direkt olarak filtrenin üzerine konulmuştur. 1 dakika bekletildikten sonra 8000 x g'de santrifüj edilerek RNA'nın filtreden tüpe geçmesi sağlanmıştır.
15. Nanodrop cihazında (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific, ABD) izole edilen RNA'nın spektrofotometrik olarak yoğunluğu, nükleik asit ve kimyasal saflığı analiz edilmiştir.
16. RNA örnekleri çalışma aşamasına kadar -80° C'de saklanmıştır.

3.3.3. RNA Yoğunluğunun Ölçümü

Hasta ve kontrollerden elde edilen RNA'ların yoğunlukları NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, ABD.) ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. Ölçüm öncesinde kör olarak su kullanıldı. 2 µl su Nanodrop'ta ölçülüp, sonraki ölçümler için cihaz ayarı yapıldı. İzole edilen RNA'lardan 2 µl alınıp Nanodrop'a konularak hazırlanan örneğin 230, 260 ve 280 nm dalga boylarındaki optik dansitesi ölçüldü ve yoğunlukları hesaplandı. Elde edilen konsantrasyon sonuçları 100-600 ng/µl aralığındaydı. Nükleik asit saflığını gösteren A260/A280 oranı ve kimyasal saflığı gösteren A260/A230 oranı yaklaşık olarak 2 idi. Bu bulgular elde edilen RNA kalitesinin çok iyi olduğunu göstermektedir. Örnekler -80 °C'de saklandı.

3.3.4. cDNA Sentezi

Kontrol ve hastalara ait RNA numunelerinden cDNA elde etmek için ‘‘Qiagen RT2 first strand kit’’ kullanıldı ve işlemler, üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirildi. Reaktifler çözündükten sonra kısa süreli santrifüj yapıldı. Tablo 3.1’de miktarları verilen bileşenler karıştırıldı ve hazırlanan çözelti 42°C’de 5 dakika bekletildi.

Tablo 3-1: cDNA sentez bileşenleri-1

Total RNA	25 ng-5 µg
Buffer GE	2 µl
Nükleaz içermeyen steril su	değişken
Toplam hacim	10 µl

Bu işlemten sonra cihazdan çıkarılan her bir örneğin üzerine Tablo 3.2’de gösterilen karışımdan 10 µl ilave edildi ve karıştırıldı. Hazırlanan örnek tüpleri cDNA sentezi için 42°C’de 15 dakika, 95°C’de 5 dakika ‘‘thermal cycler’’ cihazında tutuldu. Her reaksiyonda nükleaz içermeyen 91 µl steril su eklendi ve karıştırıldı. RT PCR aşamasına kadar -20 °C’de saklandı.

Tablo 3-2: cDNA sentez bileşenleri -2

5X Reaksiyon tampon	4 µl
Kontrol P2	1 µl
RE3 Ters Transkriptaz karışımı	2 µl
Nükleaz içermeyen steril su	3µl
Toplam hacim	10 µl

3.3.5. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Hedef ve referans genler olan OCT1 ve HPRT genlerinin periferik kandaki ekspresyon düzeyini belirlemek için kullanılan primer çiftleri [87] dizisi aşağıdaki gibidir:

SLC22A1 geni için forward 5’-CTG AGC TGT ACC CCA CAT TCG -3’

reverse 5'-CCA ACA CCG CAA ACA AAA TGA -3'

HPRT geni için forward 5'-GACCAGTCAACAGGGGACAT-3'

reverse: 5'-GTGTCAATTATATCTTCCACAATCAAG-3'

Tablo 3.3'te belirtilen PCR bileşenleri ile hazırlanan 20 µl'lik reaksiyon karışımı "LightCycler 480II" cihazı kullanılarak Tablo 3.4'te gösterilen çoğaltım programına tabi tutuldu.

Tablo 3-3: PCR bileşenleri

PCR Bileşenleri	Volüm
Su	8 µl
2X Master Mix	10 µl
Real Time Ready Assay	1 µl
cDNA	1 µl
Total Volüm	20 µl

Her deneyde, yaklaşık miktarları önceden bilinen kontrol cDNA'ları da kullanılarak PCR verimi hesaplandı. Hedef (OCT1) ve referans gene (HPRT1) ait çoğaltılan cDNA'ların miktar değerlendirilmesi relatif kantifikasyon yöntemi kullanılarak farklılık oranları nicel olarak ortaya kondu. Hedef genin eşik siklusları (C_T) referans genin analog C_T 'sine göre düzeltildi. Referans geni (HPRT1) reaksiyonun internal kontrolü olarak kullanıldı. Göreceli gen ekspresyon düzeyleri $2^{-\Delta CT}$ formülü kullanılarak ($\Delta C_t = C_t \text{ OCT1} - C_t \text{ HPRT}$) hesaplanıp ve relatif kantifikasyon değerleri belirlendi [118].

Tablo 3-4: Kantitatif Real Time PCR döngüleri

Program Türü	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
İlk denatürasyon	95	10 dakika	1
Denatürasyon	95	10 saniye	45
Bağlanma	60	30 saniye	
Uzama	72	1 saniye	
Soğuma	40	30 saniye	1

3.4. İstatistik

İstatistiksel analizler SPSS 21.0 veri programında yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler; nicel değişkeler için ortalama $\pm$ standart sapma, nitel değişkenler için medyan, minimum-maksimum ile değerlendirildi. Grupların nicel değişkenler yönünden karşılaştırılmasında normal dağılım şartını sağlayan veriler için Student-t testi, normal dağılım şartını sağlamayan veriler için Mann Whitney U testi kullanıldı. Grupların nitel değişkenler yönünden karşılaştırılmasında Ki-kare testi, Fisher'in Kesin Ki-kare Testi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirmelerde $p < 0,05$ olması istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 101 hastanın %50,5'i (n=51) tedaviye duyarlı, %49,5'i (n=50) ise dirençliydi. Toplamda kadın hasta oranı %48,5 (n=49), erkek hasta oranı ise %51,5 (n=52) idi. Tüm hastaların yaş ortalaması $55,04 \pm 13,35$, tanı yaşı ortalaması ise $44,9 \pm 13,4$ 'tü. Hastaların demografik özellikleri (cinsiyet, yaş, tanı yaşı) Tablo 4.1 ve Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4-1: Demografik özellikler-1

Özellik	N (%)
Cinsiyet	
Kadın	49 (%48,5)
Erkek	52 (%51,5)
Tedaviye Yanıt	
Duyarlı	51 (%50,5)
Dirençli	50 (%49,5)

Tablo 4-2: Demografik özellikler-2

	Minimum	Maksimum	Ortalama $\pm$ Std.Sapma
Yaş	25	83	$55,04 \pm 13,35$
Tanı Yaşı	16	77	$44,9 \pm 13,4$

Cinsiyet ve tedaviye yanıt durumu ki-kare testi ile karşılaştırıldı, tedaviye duyarlı olan grupta kadınların oranı %47,1 iken, bu oran tedaviye dirençli grupta %50 idi. Arada istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmamaktaydı ($p>0,05$) (Tablo 4.3). Yaş ve tanı yaşı ortalamasının tedaviye yanıt durumu ile karşılaştırması Student-t testi ile yapıldı. Tedaviye duyarlı olanların yaş ortalaması $55,51 \pm 13,63$ iken, tedaviye dirençli olanlarınki $54,56 \pm 13,20$ idi. Arada istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmamaktaydı ($p>0,05$) (Tablo 4.4). Tedaviye duyarlı olanların tanı yaşı ortalaması

45,96 $\pm$ 13,78 iken, tedaviye dirençli olanlarınki 43,82 $\pm$ 13,08 idi. Arada istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmamaktaydı ($p>0,05$) (Tablo 4.5).

Tablo 4-3: Tedaviye yanıt göre cinsiyet karşılaştırması

Tedaviye Yanıt Durumu	N	Kadın	Erkek	χ^2	p
Duyarlı	51	24 (%47,1)	27 (%52,9)	0,087	0,843
Dirençli	50	25 (%50)	25 (%50)		

Tablo 4-4: Tedaviye yanıt göre yaş ortalaması karşılaştırması

Tedaviye Yanıt Durumu	N	Ortalama $\pm$ std. sapma	t	p
Duyarlı	51	55,51 $\pm$ 13,63	0,356	0,723
Dirençli	50	54,56 $\pm$ 13,20		

Tablo 4-5: Tedaviye yanıt göre tanı yaşı ortalaması karşılaştırması

Tedaviye yanıt durumu	N	Ortalama $\pm$ std. sapma	t	p
Duyarlı	51	45,96 $\pm$ 13,78	0,798	0,427
Dirençli	49	43,82 $\pm$ 13,08		

Hastaların %40,6'sında (n=41) tirozin kinaz inhibitörü tedavisine başlanmadan önce hidroksiüre ya da interferon-alfa gibi ön tedaviler uygulanmıştı. Tirozin kinaz inhibitörü tedavisine duyarlı ve dirençli hastalar karşılaştırıldığında, dirençli grupta önceden hidroksiüre ve/veya interferon-alfa kullanım oranı duyarlı gruba göre daha fazlaydı, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,002$). Bu durum tablo 4.6'da gösterilmiştir.

Tablo 4-6: Duyarlı ve dirençli grupta imatinib öncesi tedavinin karşılaştırılması

HU/IF-alfa kullanımı	Duyarlı N (%)	Dirençli N (%)	χ^2	p
Evet	13 (%25,5)	28 (%56)	9,746	0,002
Hayır	38 (%74,5)	22 (%44)		
Toplam	51 (%100)	50 (%100)		

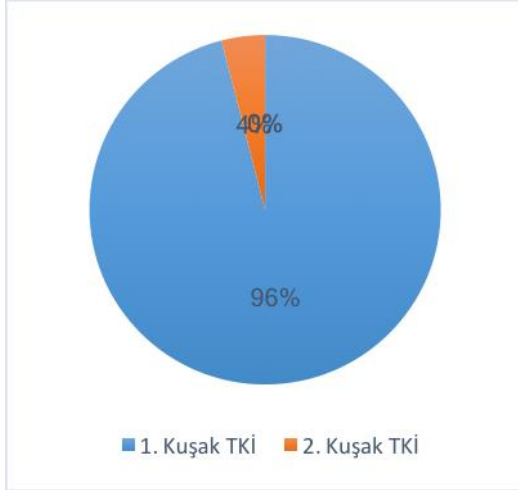
Hastaların tedaviye yanıt düzeyleri, kullandıkları ilaçların çeşitliliğini etkilemekteydi. Bazı hastalar tanı anından itibaren aynı tirozin kinaz inhibitörünü kullanırken, bazılarında doz ve ilaç değişikliği yapılmıştır. Toplamda 100 hastanın ilaç bilgisine ulaşılabildi. Kullanılan ilaçların çeşitliliği ve sıralaması Tablo 4.7’de, tedaviye duyarlı ve dirençli gruplarda ilaç kullanım çeşitliliği ise Tablo 4.8 ve 4.9’da gösterilmiştir.

Tablo 4-7: Kullanılan ilaçlar (genel)

İlaç	N (%)
İmatinib	63 (%63)
İmatinib→Nilotinib	8 (%8)
İmatinib→Dasatinib	8 (%8)
İmatinib→Nilotinib→Dasatinib	10 (%10)
İmatinib→Dasatinib→Nilotinib	4 (%4)
İmatinib→Dasatinib→Nilotinib→Ponatinib	1 (%1)
İmatinib→Dasatinib→Ponatinib	1 (%1)
Nilotinib	3 (%3)
Nilotinib→İmatinib→Dasatinib	1 (%1)
Dasatinib→İmatinib	1 (%1)
Toplam	100 (%100)

Tablo 4-8: Tedaviye duyarlı hastaların kullandıkları ilaçlar

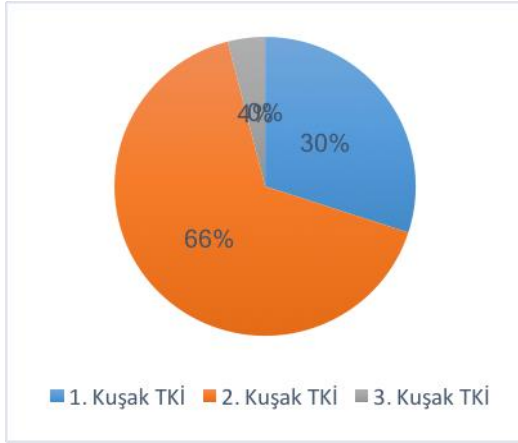
İlaç	N (%)
İmatinib	48 (%96)
Nilotinib	2 (%4)
Toplam	50 (%100)



Şekil 4-1: Tedaviye duyarlı hastaların kullandıkları ilaçlar

Tablo 4-9: Tedaviye dirençli hastaların kullandıkları ilaçlar

İlaç	N (%)
İmatinib	15 (%30)
İmatinib→Nilotinib	8 (%16)
İmatinib→Dasatinib	8 (%16)
İmatinib→Nilotinib→Dasatinib	10 (%20)
İmatinib→Dasatinib→Nilotinib	4 (%8)
İmatinib→Dasatinib→Nilotinib→Ponatinib	1 (%2)
İmatinib→Dasatinib→Ponatinib	1 (%2)
Nilotinib	1 (%2)
Nilotinib→İmatinib→Dasatinib	1 (%2)
Dasatinib→İmatinib	1 (%2)
Toplam	50 (%100)



Şekil 4-2: Tedaviye dirençli hastaların kullandıkları ilaçlar

Hastaların mutasyon değerlendirme sonuçları Tablo 4.10’da belirtilmiştir.

Tablo 4-10: BCR-ABL Kinaz domain mutasyonu değerlendirilmesi

Mutasyon	N (%)
Mutasyon bakılmamış	61 (%60,4)
Mutasyon saptanmamış	33 (%32,7)
F355V	1 (%1)
F359V	2 (%2)
PE255V	1 (%1)
PG250E	1 (%1)
L387M	1 (%1)
PL248V	1 (%1)

Tedaviye yanıtı göre gruplandırdığımızda, tedaviye duyarlı 51 hastanın 46’sında (%90,2) mutasyon varlığına bakılmamış, 5’inde ise (%9,8) mutasyon olup olmadığına bakılmış ancak herhangi bir mutasyona rastlanmamıştır. Tedaviye dirençli 50 hastanın 15’inde (%30) mutasyon varlığına bakılmamış, 28’inde (%56) mutasyon saptanmamış, 7’sinde ise (%14) Tablo 4.10’da belirtilen mutasyonlara rastlanmıştır. Mutasyon testi yapılan 40 hasta ve tedaviye yanıt değişkeni Fischer Exact Test (Fischer’in kesin kıkare testi) ile karşılaştırıldı. Tedaviye duyarlı ve dirençli grup arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$) (Tablo 4.11).

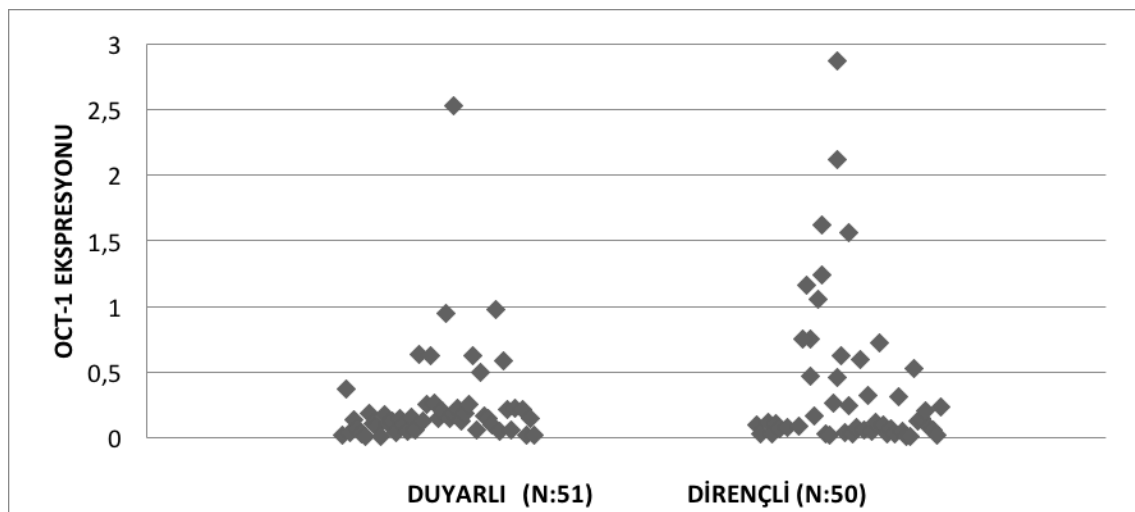
Tablo 4-11: Tedavi yanıtına göre mutasyon varlığı karşılaştırması

Mutasyon Sonucu	Duyarlı	Dirençli	Toplam	p
Mutasyon var	0	7	7	0,565
Mutasyon yok	5	28	33	

Hastaların göreceli ekspresyon değerleri $2^{-\Delta Ct}$ metoduyla ($\Delta Ct = Ct_{OCT1} - Ct_{HPRT}$) değerlendirildi. Hesaplanan değerler normal dağılım göstermediğinden, tedaviye duyarlı ve dirençli grup arasındaki göreceli ekspresyon düzeyi karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi kullanıldı. Her iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık saptanmadı ($p > 0,05$) (Tablo 4.12). Şekil 4.1'deki dağılım grafiğinde tedaviye duyarlı ve dirençli hastaların rölatif ekspresyon düzeyleri görülmektedir.

Tablo 4-12: OCT-1 ekspresyon düzeyinin tedavi yanıtına göre karşılaştırılması

	N	Median	Minimum	Maksimum	Z	p
Duyarlı	51	0,14865089	0,01074642	2,53151319	0,075	0,940
Dirençli	50	0,11868558	0,00797666	2,86791050		

**Şekil 4-3: İmatinibe duyarlı ve dirençli hastalarda OCT-1 ekspresyon düzeyi grafiği**

Tüm hastalar arasında mutasyon saptanmamış 33 hasta ve mutasyon saptanmış olan 7 hastanın göreceli OCT-1 ekspresyon değerleri Mann Whitney U testi ile hesaplandı (Tablo 4.13). İki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 4-13: Mutasyonu olan ve olmayan hastaların OCT-1 ekspresyonunun karşılaştırılması

	N	Median	Minimum	Maksimum	Z	p
Mutasyon yok	33	0,14865089	0,02683017	2,867910496	0,587	0,557
Mutasyon var	7	0,09739557	0,013602353	1,156688184		

Sadece tedaviye dirençli olan hastalar arasında mutasyon saptanan ve saptanmayanların OCT-1 ekspresyonu karşılaştırılması Mann Whitney U testi ile yapıldı (Tablo 4.14). Aralarında anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 4-14: Tedaviye dirençli hastaların mutasyon durumuna göre OCT-1 ekspresyonunun karşılaştırılması

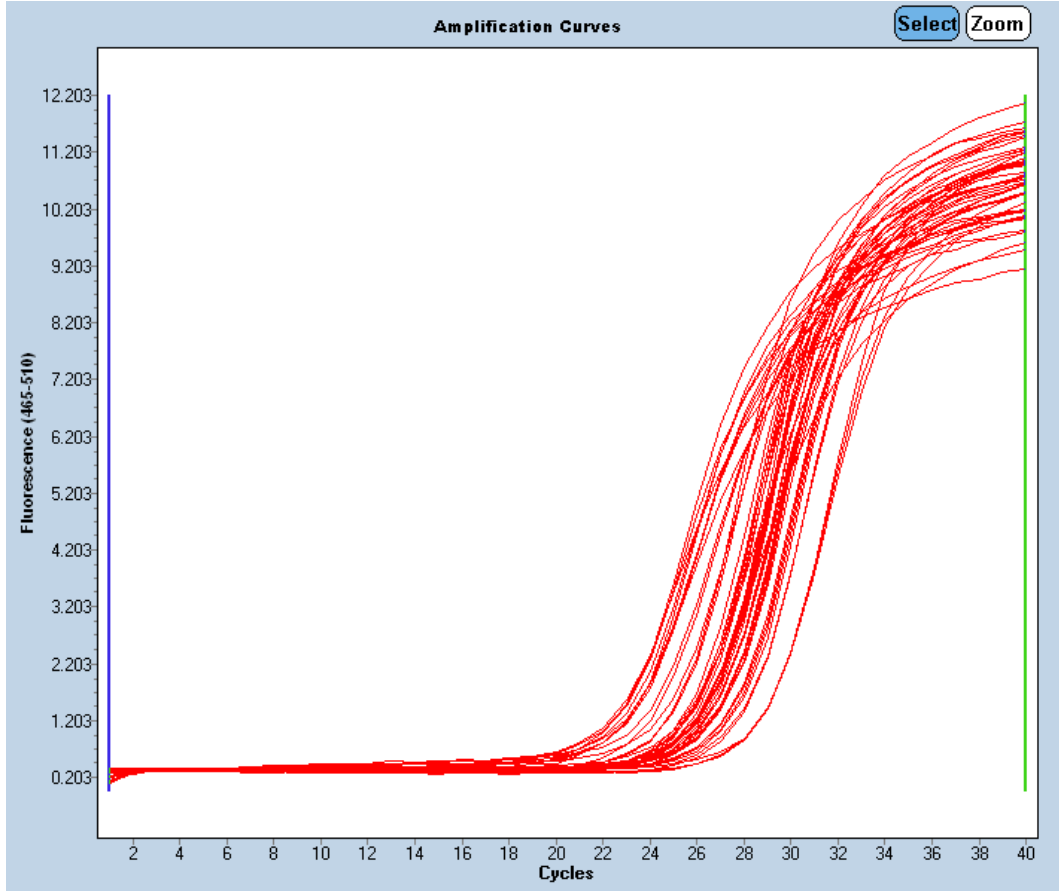
	N	Median	Minimum	Maksimum	Z	p
Mutasyon yok	28	0,2013000695	0,02683017	2,867910496	0,784	0,433
Mutasyon var	7	0,097395572	0,013602353	1,156688184		

Tedaviye duyarlı olan tüm hastalar ve tedaviye dirençli olanlardan mutasyon saptanmayan hastaların OCT-1 ekspresyonu karşılaştırılması Mann Whitney U testi ile yapıldı (Tablo 4.15), aralarında anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

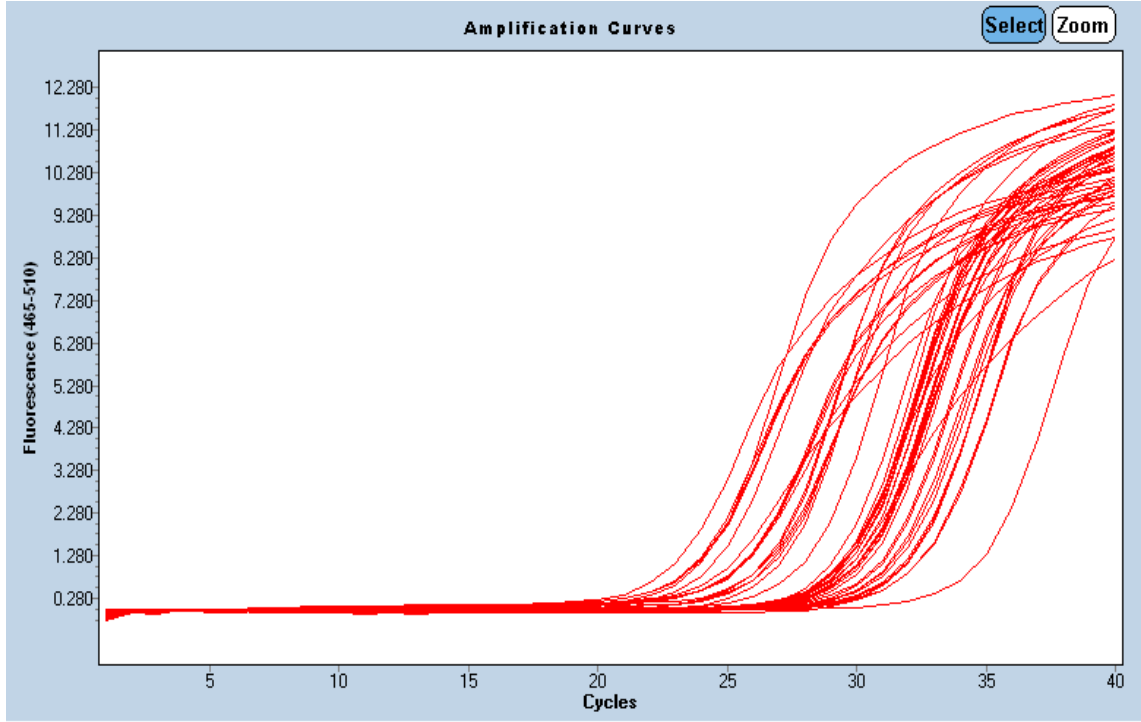
Tablo 4-15: Tedaviye duyarlı ve mutasyonu olmayan dirençli hastaların OCT-1 ekspresyonunun karşılaştırılması.

	N	Median	Minimum	Maksimum	Z	p
Duyarlılar	51	0,148650889	0,01074642	2,531513188	0,989	0,323
Mutasyonu olmayan dirençliler	28	0,2013000695	0,02683017	2,867910496		

Referans ve hedef gene ait PCR amplifikasyon eğrisi grafikleri Şekil 4-2 ve Şekil 4-3'te belirtilmiştir.



Şekil 4-4: Referans gene ait (HPRT) PCR amplifikasyon eğrileri



OCT-1 genine ait hastaların amplifikasyon eğrileri

Şekil 4-5: Hedef gene ait (OCT-1) PCR amplifikasyon eğrileri

5. TARTIŞMA

Kronik myeloid lösemi, güncellenen tanı, takip ve tedavi klavuzları, tedaviye direnç geliştirme mekanizmaları ve prognostik belirteçler konusunda çok sayıda bilimsel araştırmanın yapıldığı bir hastalıktır. Çalışmamızı yürüttüğümüz hasta grubunun cinsiyet dağılımı ve tanı yaşı ortalaması genel ortalama ile uyumludur [1, 119, 120]. Cinsiyet, yaş ortalaması ve tanı yaşı ortalaması gibi demografik verileri tedaviye yanıt durumu ile karşılaştırdığımızda istatistiksel açıdan anlamlı farklılık saptamadık. Çalışmamız retrospektif bir çalışmadır ve hastaların yaşam beklentisi takibi yapılmamıştır, bu sebeple imatinibe duyarlı ve dirençli grubun yaş ortalaması karşılaştırması kesitsel bir veri olmaktan öteye gitmemektedir. Imatinib tedavisine dirençli olan grupta imatinib öncesi (HU, IFN-alfa) tedavi oranının anlamlı olarak yüksek saptanmıştır. Çalışmamızda en sık saptadığımızı BCR-ABL kinaz domain mutasyonu, 7 hastanın ikisinde mevcut olan F359V mutasyonudur. Yayınlarda bildirilen en sık mutasyon olan T315I mutasyonu [55] ise hastalarımızda saptanmamıştır.

Çalışmamızda, tedaviye direnç mekanizmalarından birini; imatinibin hücre içine alınmasını sağlayan OCT1 proteinini kodlayan SLC22A1 geninin ekspresyon düzeyinin imatinibe yanıtı etkileyip etkilemediğini araştırdık ve imatinibe duyarlı ve dirençli hasta grubunda OCT-1 proteini ekspresyonunun anlamlı bir farklılık göstermediğini saptadık. Literatürde bu alanda yapılan çok sayıda çalışma vardır. Bunların bir kısmında SLC22A1'in yüksek düzeyde eksprese olması, tedaviye olumlu yanıt ile ilişkilendirilmiştir [84, 109, 117, 121, 122]. Crossman ve arkadaşları, KML tanısına sahip, tedaviye yanıt veren 15 hasta ve tedaviye yanıtı olmayan 15 hastaya ait kemik iliği mononükleer hücrelerinde SLC22A1 mRNA düzeylerine bakmışlar ve tedaviye yanıt veren grupta bu genin ekspresyonunun anlamlı olarak yüksek olduğunu saptamışlardır [109]. Wang ve ark, 2008'de yaptıkları bir çalışmada periferik kan lökositlerinde SLC22A1 mRNA düzeyini ölçmüşler ve bu genin ekspresyon düzeyinin ilerlemesiz sağkalımı öngörebildiğini kanıtlamışlardır [117]. ABCB1 ve ABCG2 gibi imatinibi hücre dışına taşıyan proteinlerin yüksek düzeyde eksprese olmasının ve SLC22A1'in düşük düzeyde eksprese olmasının imatinib tedavisine yanıtı ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır [123, 124]. De Lima ve arkadaşlarının çalışmasında SLC22A1 mRNA ekspresyonu, major moleküler yanıtı ulaşan hasta

grubunda, ulaşamayanlara göre anlamlı olarak daha fazla bulunmuş, ancak hastaların tanı anındaki ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır [123]. Zhang ve arkadaşlarının çalışmasında da benzer bir neticeye ulaşılmıştır [125].

Bu çalışmaların yanı sıra, bizim çalışmamızda olduğu gibi, SLC22A1 ekspresyonu ve tedaviye yanıt ilişkisinin saptanamadığı çalışmalar da mevcuttur [87, 126]. Razga ve arkadaşları, 30 hastanın kemik iliği ve periferik kan örneklerinde tedavi öncesi SLC22A1 ekspresyonuna bakmış, ancak ELN kriterleri uyarınca, 6. ve 12. aydaki yanıt ile ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı farklılık saptayamamışlardır [126].

OCT proteinlerinin imatinib transportuna katkısını araştırmak için bu proteinlerin inhibitörlerinin (prazosin ve prokainamid) kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur [109, 110]. Prazosin varlığında ve yokluğunda, imatinibin hücre içine alımındaki farklılık “OCT-1 aktivitesi” olarak tanımlanmıştır. İmatinibin IC50 değerinden çok daha fazla miktarda prazosin eklenmesine rağmen [127] hücre içine imatinib geçişinin tamamen inhibe olmaması, OCT-1 ile ilişkili mekanizmalara ilave olarak altta yatan farklı mekanizmalar olduğunu düşündürmüştür [46]. White ve arkadaşları, KML hastalarında OCT-1 aktivitesini ve OCT-1 mRNA düzeyini değerlendirdikleri bir çalışmada, mRNA düzeyinin tedaviyi öngörmede tek başına yetersiz olduğunu, ancak tedaviye başlamadan önce bakılan OCT-1 aktivitesinin önemli bir prognostik belirteç olduğunu öne sürmüşlerdir [47].

Grinfeld ve arkadaşları, farklı araştırmalar arasındaki bu tutarsızlıkların bir kısmının, araştırmada kullanılan hücrelerin çeşitliliğine (tam kan, mononükleer hücreler, seçilmiş CD34+ hücre popülasyonu...vb) ya da SLC22A1 ekspresyonunun ölçüm yöntemindeki farklılıklara bağlı olabileceğini belirtmişlerdir [128].

Kronik imatinib kullanımının ilaç taşıyıcı proteinlerin ekspresyonunu değiştirebildiği saptayan çalışmalar mevcuttur [129, 130]. Gromicho ve arkadaşlarının yaptıkları in vitro deneysel bir çalışmada hücreler artan imatinib konsantrasyonlarına maruz bırakılarak imatinibe dirençli hale getirilmiş ve bu süreçte SLC22A1 mRNA ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir ve SLC22A1'in ekspresyonunun dinamik seyirli olması nedeniyle, tedavi öncesi bakılan ekspresyon düzeyinin tedavi neticesini öngörmede o kadar da anlamlı olamayabileceği kanısına varılmıştır [129]. Bir başka çalışmada ise tedaviye duyarlı hasta grubunda SLC22A1 gen ekspresyonunun imatinib kullanım süresiyle doğru orantılı olarak arttığı gözlenmiştir [131]. İmatinibe dirençli

hastalarla yapılan başka bir çalışmada, imatinibe direncin saptandığı andaki OCT-1 ekspresyon düzeyinin, ilaca başlanmadan önceki düzeye göre anlamlı olarak azaldığı bildirilmiştir [132]. Bu sebeple, hastalardan belli zaman aralıklarıyla alınan örneklerde bakılan OCT-1 ekspresyonunun dinamik olduğunun gösterilmesi [131], bizim çalışmamızda olduğu gibi tek bir anda alınan örneklerle ait ekspresyonun karşılaştırıldığı çalışmalarda neden birbirinden farklı sonuçlar çıktığını açıklayabilir.

Öte yandan, tedaviye yanıtı protein miktarı, transkript miktarı gibi parametreler tek başına belirleyemeyebilir. Üretilen proteinin fonksiyon gösterebilme derecesi de oldukça önemlidir. Proteinlerin DNA'daki kodlara uygun bir şekilde yazılması, hatalı sentezlenen mRNA ve proteinlerin yok edilmesi, posttranslasyonel aşamada gerçekleşen modifikasyonların hatasız gerçekleşmesi, vücuda giren toksinler, kimyasallar ve ksenobiyotikler, proteinlerin işlevselliğini belirleyen etmenlerden bazılarıdır. Dolayısıyla mRNA düzeyi, gen ekspresyon düzeyi gibi sadece translasyon aşamalarını değerlendiren çalışmalar, protein fonksiyonunu öngörmeye yeterli bilgi sağlayamayabilir.

DNA baz diziliminde herhangi bir değişikliğin olmadığı kuşaklar arası aktarılabilen gen ekspresyon paternindeki değişiklikler epigenetik değişiklikler olarak adlandırılır [119]. Çeşitli lösemi tiplerinde saptanmış olan DNA hipermetilasyonu da bunlardan biridir ve KML'nin progresyonu ve imatinib direnci ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [133].

Tüm bunların yanı sıra, ilaç taşıyıcı ya da metabolize edici proteinleri kodlayan genlerdeki bireyler arası farmakogenetik farklılıklar da tedaviye yanıtın düzeyini etkileyebilmektedir. SLC22A1 geninde protein fonksiyonunu etkileyen tek nükleotid polimorfizmleri (SNP:single nucleotide polymorphism) olduğunu [134] ve bu SNP'lerin tedavi sonucunu etkilediğini gösteren çalışmaların yanı sıra [83, 135-138], bu durumun varlığını kanıtlayamayan çalışmalar da mevcuttur [139, 140]. SLC22A1 geninin promoter bölgesinde, kodlayan dizisinde, 5'-UTR ve 3'-UTR bölgelerinde ya da intronlarında 1000'den fazla mutasyon tanımlanmıştır [141]. 2003 yılında yapılan bir çalışmada, SLC22A1 genindeki yanlış anlamlı mutasyon sonucu oluşan 2 adet varyant OCT1'in, referans OCT1'e göre daha az fonksiyon gösterdiği saptanmıştır [142].

Unutulmaması gereken bir nokta da, farklı etnik popülasyonlardaki OCT1 varyantlarının çeşitliliğinin, görülme sıklığının ve ilaç farmakokinetiği üzerine

etkilerinin aynı olmadığıdır [143]. Gen ekspresyon profili ırksal farklılıklar gösterebilmektedir. Literatürdeki çalışmaların farklı popülasyonlarda yapıyor olması da birbirinden tutarsız sonuçlar elde edilmesinin diğer bir nedeni olabilir.

Imatinib direncinin oluşumunda varsayılan mekanizmalardan biri de, vücutta imatinibe cevapsız primitif sessiz kök hücrelerin bulunması ve bu hücrelerin yeni lösemik hücre popülasyonları oluşturabilmesidir [144, 145]. Bu da OCT-1 proteini ekspresyonundan bağımsız bir direnç geliştirme mekanizması olup, karıştırıcı faktör olarak karşımıza çıkabilmektedir.

Çalışmamızın bazı güçlü ve zayıf yönleri bulunmaktadır. Örneklemimiz KML tanısı olan 101 gönüllü hastadan oluşmaktadır, bu sayı literatürdeki diğer KML ekspresyon çalışmalarıyla kıyas edildiğinde çok daha fazladır ve çalışmamızın en önemli güçlü yönünü oluşturmaktadır. Çalışmamız retrospektif bir çalışmadır, hastaların tüm tedavi süreçleri geriye dönük olarak incelenmiş ve tedaviye yanıt gruplaması bu şekilde yapılmıştır. Hastaların tedavi öncesi dönemden itibaren izlendiği prospektif çalışmalar uzun bir takip sürecini gerektiren daha güçlü çalışmalardır. Çalışmamızdaki ekspresyon analizleri kesitsel bir şekilde her hasta için yalnızca bir defa yapılmıştır, SLC22A1 gen ekspresyonunun dinamik olduğu göz önünde bulundurulduğunda, bu durum da çalışmamızın zayıf yönlerinden birini oluşturmaktadır. Çalışmamıza sadece KML tanılı hastalar dahil edilmiştir, sağlıklı kontrol grubunun bulunmaması da zayıf yönlerden sayılabilir.

Sonuç olarak, ilaca dirençli bir fenotipin oluşması multifaktöriyel bir hadise olup tek bir mekanizmaya bağımlı değildir [146]. Kronik miyeloid löseminin tanı, tedavi ve takibine dair genetik, moleküler ve farmakokinetik düzeydeki çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Bu çalışmaların sunduğu ve sunacağı bilgiler, hem prognostik belirteçlerin hem de yeni ilaç hedeflerinin gelişmesine katkı sunacaktır.

KAYNAKLAR

1. THD. *Kronik Myeloid Lösemi Tanı ve Tedavi Kılavuzu* (internette) 2016, Erişim 20.12.2016, <http://www.thd.org.tr/thdData/Books/69/bolum-i-kronik-miyeloid-losemi-kml.pdf>
2. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000; **96**(10): 3343-3356.
3. Tuğlu MM, Melli M. İmatinib: etki mekanizması ve direnç geliştirme mekanizmaları. *Ankara Univ Tıp Fak* 2012; **65**(02): 077-082.
4. Heisterkamp N, Groffen J, Stephenson JR, Spurr NK, Goodfellow PN, Solomon E ve ark. Chromosomal localization of human cellular homologues of two viral oncogenes. *Nature* 1982; **299**(5885): 747-749.
5. Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M. Chronic myeloid leukaemia. *The Lancet* 2007; **370**(9584): 342-350.
6. Bernards A, Rubin CM, Westbrook CA, Paskind M, Baltimore D. The first intron in the human c-abl gene is at least 200 kilobases long and is a target for translocations in chronic myelogenous leukemia. *Mol Cell Biol* 1987; **7**(9): 3231-3236.
7. Corm S, Roche L, Micol JB, Coiteux V, Bossard N, Nicolini FE ve ark. Changes in the dynamics of the excess mortality rate in chronic phase-chronic myeloid leukemia over 1990-2007: a population study. *Blood* 2011; **118**(16): 4331-4337.
8. Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst* 1960; **25**(1): 85-109.
9. Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973; **243**: 290-293.
10. Sawyers CL, McLaughlin J, Goga A, Havlik M, Witte O. The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth. *Cell* 1994; **77**(1): 121-131.
11. Kipreos ET, Wangt JY. Cell cycle-regulated binding of c-Abl tyrosine kinase to DNA. *Science* 1992; **256**(5055): 382.
12. Yuan, ZM, Shioya H, Ishiko T, Sun X, Gu J, Huang YY ve ark. p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature* 1999; **399**(6738): 814-817.

13. Lewis JM, Schwartz MA. Integrins regulate the association and phosphorylation of paxillin by c-Abl. *J Biol Chem* 1998; **273**(23): 14225-14230.
14. Constance JE, Woessner DW, Matissek KJ, Mossalam M, Carol S. Enhanced and selective killing of chronic myelogenous leukemia cells with an engineered BCR-ABL binding protein and imatinib. *Mol Pharmaceut* 2012; **9**(11): 3318-3329.
15. Steelman L, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* 2004; **18**(2): 189-218.
16. Van Etten RA. Mechanisms of transformation by the BCR-ABL oncogene: new perspectives in the post-imatinib era. *Leukemia res* 2004; **28**: 21-28.
17. Bedi A, Zehnbaauer BA, Barber JP, Sharkis SJ, Jones RJ. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. *Blood* 1994; **83**(8): 2038-2044.
18. Gordon MY, Dowding CR, Riley GP, Goldman JM, Greaves MF. Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature* 1987; **328**: 342-344.
19. Puil L, Liu J, Gish G, Mbamalu G, Bowtell D, Pelicci PG ve ark. Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *EMBO J* 1994; **13**(4): 764.
20. Verfaillie CM, Hurley R, Lundell BI, Zhao C, Bhatia R. Integrin-Mediated Regulation of Hematopoiesis: Do BCR/ABL-Induced Defects in Integrin Function Underlie the Abnormal Circulation and Proliferation of CML Progenitors? *Acta Haematol-Basel* 1997; **97**(1-2): 40-52.
21. Bhatia R, Wayner RA, McGlave PB, Verfaillie CM. Interferon-alpha restores normal adhesion of chronic myelogenous leukemia hematopoietic progenitors to bone marrow stroma by correcting impaired beta 1 integrin receptor function. *J Clin Invest* 1994; **94**(1): 384.
22. Bedi A, Barber JP, Bedi GC, El-Deiry WS, Sidransky D, Vala MS ve ark. BCR-ABL-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents. *Blood* 1995; **86**(3): 1148-1158.

23. Corso A, Lazzarino M, Morra E, Merante S, Astori C, Bernasconi P ve ark. Chronic myelogenous leukemia and exposure to ionizing radiation-a retrospective study of 443 patients. *Ann Hematol* 1995; **70**(2): 79-82.
24. Tanaka K, Takechi M, Hong J, Shigeta C, Oguma N, Kamada N ve ark. 9; 22 translocation and bcr rearrangements in chronic myelocytic leukemia patients among atomic bomb survivors. *J Radiat Res* 1989; **30**(4): 352-358.
25. Deininger MWN, Bose S, Gora-Tybor J, Yan XH, Goldman JM, Melo JV. Selective induction of leukemia-associated fusion genes by high-dose ionizing radiation. *Cancer res* 1998; **58**(3): 421-425.
26. Kozubek S, Lukasova E, Ryznar L, Kozubek M, Liskova A, Govorun RD ve ark. Distribution of ABL and BCR genes in cell nuclei of normal and irradiated lymphocytes. *Blood* 1997; **89**(12): 4537-4545.
27. Neves H, Ramos C, Silva MG, Parreira A, Parreira L. The Nuclear Topography of ABL, BCR, PML, and RAR Genes: Evidence for Gene Proximity in Specific Phases of the Cell Cycle and Stages of Hematopoietic Differentiation. *Blood* 1999; **93**(4): 1197-1207.
28. Biernaix C, Sels A, Huez G, Stryckmans P. Very low level of major BCR-ABL expression in blood of some healthy individuals. *Bone Marrow Transpl* 1996; **17**: S45-7.
29. Bose S, Deininger M, Tybor JG, Goldman JM, Melo JV. The presence of typical and atypical BCR-ABL fusion genes in leukocytes of normal individuals: biologic significance and implications for the assessment of minimal residual disease. *Blood* 1998; **92**(9): 3362-3367.
30. Posthuma E, Falkenburg JHF, Apperley JF, Gratwohl A, Roosnek E, Hertenstein B ve ark. HLA-B8 and HLA-A3 coexpressed with HLA-B8 are associated with a reduced risk of the development of chronic myeloid leukemia. *Blood* 1999; **93**(11): 3863-3865.
31. Sokal JE, Baccarani M, Russo D, Tura S. Staging and prognosis in chronic myelogenous leukemia. *Semin Hematol* 1988; **25**(1): 49-61.
32. Hasford J, Pfirrmann M, Hehlmann R, Allan NC, Baccarani M, Nelemans JCK ve ark. A New Prognostic Score for Survival of Patients With Chronic Myeloid Leukemia Treated With Interferon AlfaWriting Committee for the Collaborative

- CML Prognostic Factors Project Group. *J Natl Cancer Inst* 1998; **90**(11): 850-859.
33. Hasford J, Baccarani M, Hoffmann V, Guilhot J, Saussele S, Rosti G ve ark. Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: the EUTOS score. *Blood* 2011; **118**(3): 686-692.
 34. Sweet K, Zhang L, Pinilla-Ibarz J. Biomarkers for determining the prognosis in chronic myelogenous leukemia. *J Hematol Oncol* 2013; **6**(1): 1.
 35. Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, Tura S, Gomez GA, Robertsoon JE ve ark. Prognostic discrimination in " good-risk" chronic granulocytic leukemia. *Blood* 1984; **63**(4): 789-799.
 36. Saglio G, Kim DW, Issaragrisil S, Le Coutre P Etienne G, Lobo C ve ark. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *New Engl J Med* 2010; **362**(24): 2251-2259.
 37. Fabarius A, Leitner A, Hochhaus A, Müller MC, Hanfstein B Haferlach C ve ark. Impact of ACA at diagnosis on prognosis of CML: long-term observation from 1151 patients of the randomized CML Study IV. *Blood* 2011; **118**(26): 6760-6768.
 38. Kim TD, Türkmen S, Schwarz M, Koca G, Nogai H, Bommer C ve ark. Impact of additional chromosomal aberrations and BCR-ABL kinase domain mutations on the response to nilotinib in Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 2010; **95**(4): 582-588.
 39. Cortes JE, Talpaz M, Giles F, O'Brien S, Rios MB, Shan J ve ark. Prognostic significance of cytogenetic clonal evolution in patients with chronic myelogenous leukemia on imatinib mesylate therapy. *Blood* 2003; **101**(10): 3794-3800.
 40. Albano F, Anelli L, Zagaria A, Coccaro N, Casieri P, Rossi AR ve ark. Non random distribution of genomic features in breakpoint regions involved in chronic myeloid leukemia cases with variant t (9; 22) or additional chromosomal rearrangements. *Mol Cancer* 2010; **9**(1): 120.
 41. El-Zimaity MM, Kantarjian H, Talpaz M, O'Brien S, Giles F, Manero GG ve ark. Results of imatinib mesylate therapy in chronic myelogenous leukaemia with variant Philadelphia chromosome. *Brit J Haematol* 2004; **125**(2): 187-195.

42. Shah BD, Zhang L, Bulkeley W, Moscinski L, Papenhausen P, Pinilla-Ibarz J. Outcome of complex variant Philadelphia positive chromosome translocations in the era of tyrosine kinase inhibitors. *Blood* 2011; **118**(21): 3788.
43. Tantiworawit A, Mourad YA, Barnet MJ, Broady R, Hogge DE, Nantel SH ve ark. Clonal evolution but not variant chromosomal translocations is an adverse prognostic marker for cytogenetic response and survival in CML patients treated with imatinib. *Blood* 2011; **118**(21): 1694.
44. Gorusu M, Benn P, Li Z, Fang Min. On the genesis and prognosis of variant translocations in chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet-Ny* 2007; **173**(2): 97-106.
45. Valencia A, Cervera J, Such E, Barragan E, Bolufer P, Fuster O ve ark. Complex variant t (9; 22) chromosome translocations in five cases of chronic myeloid leukemia. *Adv Hematol* 2009; **2009**: 187125.
46. White DL, Saunders VA, Dang P, Engler J, Zannettino ACW, ambareri AC ve ark. OCT-1-mediated influx is a key determinant of the intracellular uptake of imatinib but not nilotinib (AMN107): reduced OCT-1 activity is the cause of low in vitro sensitivity to imatinib. *Blood* 2006; **108**(2): 697-704.
47. White DL, Dang P, Engler J, Frede A, Zrim S, Osborn M ve ark. Functional activity of the OCT-1 protein is predictive of long-term outcome in patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia treated with imatinib. *J Clin Oncol* 2010; **28**(16): 2761-2767.
48. Larson RA, Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Riviere GJ, Krahnke T ve ark. Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study. *Blood* 2008; **111**(8): 4022-4028.
49. Faber E, Friedecky D, Micova K, Rozmanova S, Divoka M, Jarosova M ve ark. Imatinib trough plasma levels do not correlate with the response to therapy in patients with chronic myeloid leukemia in routine clinical setting. *Ann Hematol* 2012; **91**(6): 923-929.
50. Koren-Michowitz M, Volchek Y, Naparstek E, Gavish I, Levi I, Rowe JM ve ark. Imatinib plasma trough levels in chronic myeloid leukaemia: results of a multicentre study CSTI571AIL11TGLIVEC. *Hematol Oncol* 2012; **30**(4): 200-205.

51. Sohn SK, Oh SK, Kim BS, Ryoo HM, Chung JS, Joo YD ve ark. Trough plasma imatinib levels are correlated with optimal cytogenetic responses at 6 months after treatment with standard dose of imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *Leukemia Lymphoma* 2011; **52**(6): 1024-1029.
52. Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE, Gruber F, Lange T, Saglio G ve ark. Bcr-Abl kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood* 2011; **118**(5): 1208-1215.
53. Jabbour E, Kantarjian H, Jones D, Talpaz M, Bekele N, O'Brien S ve ark. Frequency and clinical significance of BCR-ABL mutations in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate. *Leukemia* 2006; **20**(10): 1767.
54. Soverini S, Colarossi S, Gnani A, Rosti G, Castagnetti F, Poerio A ve ark. GIMEMA working party on chronic myeloid leukemia contribution of ABL kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of Philadelphia-positive patients: By the GIMEMA working party on chronic myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2006; **12**(24): 7374-7379.
55. Tanaka R, Kimura S, Ashihara E, Yoshimura M, Takahashi N, Wakita H ve ark. Rapid automated detection of ABL kinase domain mutations in imatinib-resistant patients. *Cancer lett* 2011; **312**(2): 228-234.
56. Azam M, Latek RR, Daley GQ. Mechanisms of autoinhibition and STI-571/imatinib resistance revealed by mutagenesis of BCR-ABL. *Cell* 2003; **112**(6): 831-843.
57. NCCN. *Clinical Practice Guidelines in Oncology: Chronic myeloid leukemia Version 4.2018*. (İnternette) 2018, Erişim 10.01.2018, https://www.nccn.org/store/login/login.aspx?ReturnURL=https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/cml.pdf
58. Kalidas M, Kantarjian H, Talpaz M. Chronic myelogenous leukemia. *JAMA* 2001; **286**(8): 895-898.
59. Kurzrock R, Gutterman JU, Talpaz M. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *New Engl J Med* 1988; **319**(15): 990-998.
60. Saydam G, Haznedaroğlu IC, Temiz Y, Soysal T, Sucak G, Tombuloğlu M ve ark. Retrospective evaluation of patients treated with dasatinib for Philadelphia

- positive leukemias: Turkish experience of 16 months. *UHOD-Uluslar Hematol* 2009; **19**: 195-204.
61. Björkholm M, Ohm L, Eloranta S, Derolf A, Hultcrantz M, Sjöberg J ve ark. Success story of targeted therapy in chronic myeloid leukemia: a population-based study of patients diagnosed in Sweden from 1973 to 2008. *J Clin Oncol* 2011; **29**(18): 2514-2520.
 62. Kantarjian H, O'Brien S, Jabbour E, Garcia-Manero G, Quintas-Cadama A, Shan J ve ark. Improved survival in chronic myeloid leukemia since the introduction of imatinib therapy: a single-institution historical experience. *Blood* 2012; **119**(9): 1981-1987.
 63. Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperley J ve ark. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol* 2009; **27**(35): 6041-51.
 64. Pavlů J, Szydło RM, Goldman JM, Apperley JF. Three decades of transplantation for chronic myeloid leukemia: what have we learned? *Blood* 2011; **117**(3): 755-763.
 65. Talpaz M, Hehlmann R, Quintas-Cardama A, Mercer J, Cortes J. Re-emergence of interferon- α in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2013; **27**(4): 803-812.
 66. Kujawski LA, Talpaz M. The role of interferon-alpha in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007; **18**(5-6): 459-471.
 67. Baccarani M, Castagnetti F, Gugliotta G, Palandri F, Rosti G. Treatment recommendations for chronic myeloid leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis* [serial online] 2014; **6**(1): e.2014005. Erişim 05.01.2018, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24455114>.
 68. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S ve ark. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 1996; **2**(5): 561-566.
 69. Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* 2000; **289**(5486): 1938-1942.

70. Eechoute K, Sparreboom A, Burger H, Franke RM, Schiavon G, Verweij J ve ark. Drug transporters and imatinib treatment: implications for clinical practice. *Clin Cancer Res* 2011; **17**(3): 406-415.
71. Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Müller M, Druker BJ ve ark. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer res* 1996; **56**(1): 100-104.
72. Dewar AL, Cambareri AC, Zannettino ACW, Miller BL, Doherty KV, Hughes TP ve ark. Macrophage colony-stimulating factor receptor c-fms is a novel target of imatinib. *Blood*, 2005; **105**(8): 3127-3132.
73. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F ve ark. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *New Engl J Med* 2003; **348**(11): 994-1004.
74. Deininger M, O'Brien S, Guilhot F, Goldman JM, Hochhaus A, Hughes TP ve ark. International Randomized Study of Interferon vs STI571 (IRIS) 8-Year Follow up: sustained survival and low risk for progression or events in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) treated with imatinib. *Blood* 2009; **114**(22): 1126-1126.
75. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien S, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N ve ark. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *New Engl J Med* 2006; **355**(23): 2408-2417.
76. Hochhaus A, O'Brien S, Guilhot F, Druker BJ, Branford S, Foroni L ve ark. Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2009; **23**(6): 1054-1061.
77. Marin D, Milojkovic D, Olavarria E, Khorashad JS, Lavallade H, Reid AG ve ark. European LeukemiaNet criteria for failure or suboptimal response reliably identify patients with CML in early chronic phase treated with imatinib whose eventual outcome is poor. *Blood* 2008; **112**(12): 4437-4444.
78. Guilhot F. Sustained durability of responses plus high rates of cytogenetic responses result in long-term benefit for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia (CML-CP) treated with imatinib (IM) therapy: update from the IRIS Study. *Blood* 2004; **104**(11): 21.

79. Hochhaus A, La Rosee P. Imatinib therapy in chronic myelogenous leukemia: strategies to avoid and overcome resistance. *Leukemia* 2004; **18**(8): 1321.
80. Mauro MJ. Defining and managing imatinib resistance. *ASH Education Program Book*, [serial online] 2006, **2006**(1): 219-225. Erişim: 15.09.2016
<http://asheducationbook.hematologylibrary.org/content/2006/1/219.full>
81. Goldman JM. Initial treatment for patients with CML. *ASH Education Program Book*, [serial online] 2009, **2009**(1): 453-460. Erişim: 25.09.2016
<http://asheducationbook.hematologylibrary.org/content/2009/1/453.abstract>
82. Quintás-Cardama A, Kantarjian HM, Cortes JE. Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer Control* 2009; **16**(2): 122.
83. Kim DH, Sriharsha L, Xu W, Kamel-Reid S, Liu X, Siminovitch K ve ark. Clinical relevance of a pharmacogenetic approach using multiple candidate genes to predict response and resistance to imatinib therapy in chronic myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2009; **15**(14): 4750-4758.
84. Marin D, Bazeos A, Mahon FX, Eliasson L, Milojkovic D, Bua M ve ark. Adherence is the critical factor for achieving molecular responses in patients with chronic myeloid leukemia who achieve complete cytogenetic responses on imatinib. *J Clin Oncol* 2010; **28**(14): 2381-2388.
85. van Erp NP, Gelderblom H, Karlsson MO, Li J, Zhao M, Ouwerkerk J ve ark. Influence of CYP3A4 inhibition on the steady-state pharmacokinetics of imatinib. *Clin Cancer Res* 2007; **13**(24): 7394-7400.
86. Haouala A, Widmer N, Duchosal MA, Montemurro M, Buclin T, Decosterd L. Drug interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, dasatinib, and nilotinib. *Blood* 2011; **117**(8): e75-87.
87. White DL, Saunders VA, Dang P, Engler J, Venables A, Zrim S ve ark. Most CML patients who have a suboptimal response to imatinib have low OCT-1 activity: higher doses of imatinib may overcome the negative impact of low OCT-1 activity. *Blood* 2007; **110**(12): 4064-4072.
88. Singh O, Chan JY, Lin K, Heng CCT, Chowbay B. SLC22A1-ABCB1 haplotype profiles predict imatinib pharmacokinetics in Asian patients with chronic myeloid leukemia. *Plos One* 2012; **7**(12): e51771.

89. Branford S, Rudzki Z, Lynch K, Hughes T. Pre-Imatinib Factors Can Be Used To Define the Risk of BCR-ABL Mutations for Patients with CML in Chronic Phase and Identify a Minority Who Should Have Regular Mutation Screening. *Blood* 2005; **106**(11): 1079.
90. le Coutre P, Schwarz M, Kim TD. New developments in tyrosine kinase inhibitor therapy for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2010; **16**(6): 1771-1780.
91. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN ve ark. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 2001; **293**(5531): 876-880.
92. Weisberg E, Manley PW, Breitenstein W, Brügger J, Cowan-Jacob S, Ray A ve ark. Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer cell* 2005; **7**(2): 129-141.
93. Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, Donato N, Nicoll J, Paquette R ve ark. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome–positive leukemias. *New Engl J Med* 2006; **354**(24): 2531-2541.
94. Jabbour E, Jones D, Kantarjian HM, O'Brien S, Tam C, Koller C ve ark. Long-term outcome of patients with chronic myeloid leukemia treated with second-generation tyrosine kinase inhibitors after imatinib failure is predicted by the in vitro sensitivity of BCR-ABL kinase domain mutations. *Blood* 2009; **114**(10): 2037-2043.
95. Shah NP, Tran C, Lee FY, Chen P, Norris D, Sawyers CL. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science* 2004; **305**(5682): 399-401.
96. Doan V, Wang A, Prescott H. Bosutinib for the treatment of chronic myeloid leukemia. *Am J Health-Syst Ph* 2015; **72**(6): 439-447.
97. Redaelli S, Piazza R, Rostagno R, Magistroni V, Perini P, Marega M ve ark. Activity of bosutinib, dasatinib, and nilotinib against 18 imatinib-resistant BCR/ABL mutants. *J Clin Oncol* 2009; **27**(3): 469-471.
98. Ramirez P, DiPersio JF. Therapy options in imatinib failures. *Oncologist* 2008; **13**(4): 424-434.
99. Melo JV, Chuah C. Novel agents in CML therapy: tyrosine kinase inhibitors and beyond. *ASH Education Program Book* [serial online] 2008, **2008**(1): 427-435.

- Erişim 06.07.2017,
<http://asheducationbook.hematologylibrary.org/content/2008/1/427.abstract>
100. O'Hare T, Walters DK, Stoffregen EP, Sherbenou DW, Heinrich MC Deininger MWN ve ark. Combined Abl inhibitor therapy for minimizing drug resistance in chronic myeloid leukemia: Src/Abl inhibitors are compatible with imatinib. *Clin Cancer Res* 2005; **11**(19): 6987-6993.
 101. O'Hare T, Shakespeare WC, Zhu X, Eide CA, Rivera VM, Wang F ve ark. AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. *Cancer cell* 2009; **16**(5): 401-412.
 102. Jain P, Kantarjian H, Cortes J. Chronic myeloid leukemia: overview of new agents and comparative analysis. *Curr Treat Options Oncol* 2013; **14**(2): 127-143.
 103. Redaelli S, Mologni L, Rostagno R, Piazza R, Magistroni V, Ceccon M ve ark. Three novel patient-derived BCR/ABL mutants show different sensitivity to second and third generation tyrosine kinase inhibitors. *Am J Hematol* 2012; **87**(11):E125-128.
 104. Rohrbacher M, Hasford J. Epidemiology of chronic myeloid leukaemia (CML). *Best Pract Res Cl Ha* 2009; **22**(3): 295-302.
 105. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF ve ark. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* 2013; **122**(6): 872-884.
 106. Saussele S, Lauseker M, Gratwohl A, Beelen DW, Bunjes D, Schwedtfeger R ve ark. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo SCT) for chronic myeloid leukemia in the imatinib era: evaluation of its impact within a subgroup of the randomized German CML Study IV. *Blood* 2010; **115**(10): 1880-1885.
 107. Hughes T. ABL kinase inhibitor therapy for CML: baseline assessments and response monitoring. *ASH Education Program Book* [serial online] 2006, **2006**(1): 211-218. Erişim: 12.05.2016,
<http://asheducationbook.hematologylibrary.org/content/2006/1/211.abstract>
 108. White D, Saunders V, Lyons AB, Branford S, Grigg A, To LB ve ark. In vitro sensitivity to imatinib-induced inhibition of ABL kinase activity is predictive of

- molecular response in patients with de novo CML. *Blood* 2005; **106**(7): 2520-2526.
109. Crossman LC, Druker BJ, Deininger MW. hOCT 1 and resistance to imatinib. *Blood* 2005; **106**(3): 1133-1134.
 110. Thomas J, Wang L, Clark RE, Pirmohamed M. Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. *Blood* 2004; **104**(12): 3739-3745.
 111. Koepsell H, Endou H. The SLC22 drug transporter family. *Pflug Arch* 2004; **447**(5): 666-676.
 112. Jonker JW, Schinkel AH. Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). *J Pharmacol Exp Ther* 2004; **308**(1): 2-9.
 113. Koepsell H, Schmitt B, Gorboulev V. Organic Cation transporters. İçinde *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*. Vol 150. Springer: 2003. pp. 36-90.
 114. Koehler M, Wissinger B, Gorboulev V, Koepsell H, Schmid M. The two human organic cation transporter genes SLC22A1 and SLC22A2 are located on chromosome 6q26. *Cytogenet Genome Res* 1997; **79**(3-4): 198-200.
 115. Gründemann D, Schömig E. Gene structures of the human non-neuronal monoamine transporters EMT and OCT2. *Hum Genet* 2000; **106**(6): 627-635.
 116. Hayer M, Bönisch H, Brüss M. Molecular cloning, functional characterization and genomic organization of four alternatively spliced isoforms of the human organic cation transporter 1 (hOCT1/SLC22A1). *Ann Hum Genet* 1999; **63**(6): 473-482.
 117. Wang L, Giannoudis A, Lane S, Williamson P, Pirmohamed M, Clark RE. Expression of the uptake drug transporter hOCT1 is an important clinical determinant of the response to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Clin Pharmacol Ther* 2008; **83**(2): 258-264.
 118. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method. *Nat Protoc* 2008; **3**(6): 1101.
 119. Florean C, Schnekenburger M, Grandjenette C, Dicato M, Diederich M. Epigenomics of leukemia: from mechanisms to therapeutic applications. *Epigenomics-UK* 2011; **3**(5): 581-609.

120. Gugliotta G, Castagnetti F, Palandri F, Baccarani M, Rosti G. Imatinib in chronic myeloid leukemia elderly patients. *Agin-US* 2011; **3**(12): 1125.
121. Dulucq S, Krajcinovic M. The pharmacogenetics of imatinib. *Genome Med* 2010; **2**(11): 85.
122. Nardinelli L, Sanabani SS, Didone A, Ferreira PB, Serpa M, Novaes MMY. Pretherapeutic expression of the hOCT1 gene predicts a complete molecular response to imatinib mesylate in chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Acta Haematol-Basel* 2012; **127**(4): 228-234.
123. de Lima LT, Vivona D, Bueno CT, Hirata RDC, Hirata MH, Luchessi AD ve ark. Reduced ABCG2 and increased SLC22A1 mRNA expression are associated with imatinib response in chronic myeloid leukemia. *Med Oncol* 2014; **31**(3): 851.
124. da Cunha Vasconcelos F, Scheiner MAM, Moellman-Coelho A, Mencalha AL, Renault IZ Rumjanek VM ve ark. Low ABCB1 and high OCT1 levels play a favorable role in the molecular response to imatinib in CML patients in the community clinical practice. *Leukemia res* 2016; **51**: 3-10.
125. Zhang WW, Cortes JE, Yao H, Zang L, Reedy NG Jabbour E ve ark. Predictors of primary imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia are distinct from those in secondary imatinib resistance. *J Clin Oncol* 2009; **27**(22): 3642-3649.
126. Razga F, Racil Z, Polakova KM, Buresova L, Klamova H, Zackova D . The predictive value of human organic cation transporter 1 and ABCB1 expression levels in different cell populations of patients with de novo chronic myelogenous leukemia. *Int J Hematol* 2011; **94**(3): 303.
127. Hayer-Zillgen M, Brüss M, Bönisch H. Expression and pharmacological profile of the human organic cation transporters hOCT1, hOCT2 and hOCT3. *Brit J Pharmacol* 2002; **136**(6): 829-836.
128. Grinfeld J, Gerrard G, Alikian M, Alonso-Dominguez J, Ale S, Valganon M ve ark. A common novel splice variant of SLC22A1 (OCT1) is associated with impaired responses to imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia. *Brit J Haematol* 2013; **163**(5): 631-639.
129. Gromicho M, Dinis J, Magalhaes M, Fernandes AR, Tavares P Lares A ve ark. Development of imatinib and dasatinib resistance: dynamics of expression of

- drug transporters ABCB1, ABCC1, ABCG2, MVP, and SLC22A1. *Leukemia Lymphoma* 2011; **52**(10): 1980-1990.
130. Eadie L, Hughes T, White D. Interaction of the efflux transporters ABCB1 and ABCG2 with imatinib, nilotinib, and dasatinib. *Clin Pharmacol Ther* 2014; **95**(3): 294-306.
 131. Gromicho M, Magalhaes M, Torres F, Dinis J, Fernandes AR, Rendeiro P ve ark. Instability of mRNA expression signatures of drug transporters in chronic myeloid leukemia patients resistant to imatinib. *Oncol Rep* 2013; **29**(2): 741-750.
 132. Kim YK, Lee SS, Jeong SH, Ahn JS, Yang DH, Lee JJ ve ark. OCT-1, ABCB1, and ABCG2 Expression in Imatinib-Resistant Chronic Myeloid Leukemia Treated with Dasatinib or Nilotinib. *Chonnam Med J* 2014; **50**(3): 102-111.
 133. Jelinek J, Gharibyan V, Estecio MRH, Kondo K, He R, Chung W ve ark. Aberrant DNA methylation is associated with disease progression, resistance to imatinib and shortened survival in chronic myelogenous leukemia. *Plos One* 2011; **6**(7): e22110.
 134. Ahlin G, Chen L, Lazorova L, Chen Y, Lanculescu AG, Davis RL ve ark. Genotype-dependent effects of inhibitors of the organic cation transporter, OCT1: predictions of metformin interactions. *Pharmacogenomics J* 2011; **11**(6): 400-411.
 135. Bazeos A, Marin D, Reid AG, Gerrard G, Milojkovic D, May PC ve ark. hOCT1 transcript levels and single nucleotide polymorphisms as predictive factors for response to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2010; **24**(6): 1243-1246.
 136. Maffioli M, Camos M, Gaya A, Hernandez-Boluda JC, Alvarez-Larran A, Domingo A ve ark. Correlation between genetic polymorphisms of the hOCT1 and MDR1 genes and the response to imatinib in patients newly diagnosed with chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Leukemia res* 2011; **35**(8): 1014-1019.
 137. Takahashi N, Wakita H, Scott SA, Nishii K, Masuko M, Sakai M ve ark. Correlation Between Imatinib Pharmacokinetics and Clinical Response in Japanese Patients With Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia. *Clin Pharmacol Ther* 2010; **88**(6): 809-813.

138. Ciarimboli G. Organic cation transporters. *Xenobiotica*, 2008. **38**(7-8): p. 936-971.
139. White D, Saunders VA, Dang P, Engler J, Hughes TP. OCT-1 activity measurement provides a superior imatinib response predictor than screening for single-nucleotide polymorphisms of OCT-1. *Leukemia* 2010; **24**(11): 1962-1966.
140. Yamakawa Y, Hamada A, Nakashima R, Yuki M, Hirayama C, Kawaguchi T ve ark. Association of genetic polymorphisms in the influx transporter SLCO1B3 and the efflux transporter ABCB1 with imatinib pharmacokinetics in patients with chronic myeloid leukemia. *Ther Drug Monit* 2011; **33**(2): 244-250.
141. Lozano E, Herraiz E, Briz O, Robledo VS, hernandez-Iglesias J, Gonzalez-Hernandez A ve ark. Role of the plasma membrane transporter of organic cations OCT1 and its genetic variants in modern liver pharmacology. *Biomed Res Int* 2013; **2013**: 692071.
142. Shu Y, Leabman MK, Feng B, Mangravite LM, Huang CC, Stryke D ve ark. Evolutionary conservation predicts function of variants of the human organic cation transporter, OCT1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**(10): 5902-5907.
143. Hu S, Franke RM, Filipski KK, Hu C, Orwick SJ, Brujin EA ve ark. Interaction of imatinib with human organic ion carriers. *Clin Cancer Res* 2008; **14**(10): 3141-3148.
144. Graham SM, Jorgensen HG, Allan E, Pearson C, Alcorn MJ, Richmond L ve ark. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood* 2002; **99**(1): 319-325.
145. Jiang X, Zhao Y, Smith C, Gasparetto M, Turhan A, Eaves A ve ark. Chronic myeloid leukemia stem cells possess multiple unique features of resistance to BCR-ABL targeted therapies. *Leukemia* 2007; **21**(5): 926.
146. Weisberg E, Griffin JD. Mechanism of resistance to the ABL tyrosine kinase inhibitor STI571 in BCR/ABL-transformed hematopoietic cell lines. *Blood* 2000; **95**(11): 3498-3505.



FORMLAR

GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

I-Araştırmayla İlgili Bilgi

- Araştırmanın adı: “Kronik Myelositik Lösemi Hastalarında Moleküler Monitörizasyon-Klinik Seyir İlişkisinin ve SLC22A1 mRNA Ekspresyonunun Araştırılması”
- Araştırmanın türü: Karşılaştırmalı çalışma
- Araştırmanın amacı: KML tanılı hastaların izlemi sırasında elde edilen sonuçların, hastalık seyri ile ilişkisini belirlemek ve tedaviye duyarlı ve dirençli hastalarda ilacın hücre içine alınmasında görevli SLC22A1 geninin etkinliğine bakıp tedaviye yanıt ile ilişkisini belirlemektir.
- Neler uygulanacağı: Bu proje kapsamında, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hematoloji/polikliniğinde takibi yapılan, yeni tanı konmuş veya Kronik Miyeloid Lösemi (KML) hastalarının takibi sürecinde rutin uygulama için alınan periferik kan örneklerinde genetik analiz yapılacaktır.
- Nasıl uygulanacağı: Dosyalardan yararlanılacak veriler için araştırmacı tarafından bir form doldurulacaktır. Genetik araştırma için ise çeşitli moleküler tetkikler kullanılacaktır.
- Hangi yöntemle gerçekleştirileceği: Araştırma formu araştırmacı tarafından doldurulacaktır. Moleküler açıdan Total RNA İzolasyonu, RNA Yoğunluğunun Ölçümü, cDNA Sentezi, Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) işlemleri uygulanacaktır.
- Çıkabilecek istenmeyen etkiler ve riskler: Yoktur
- Bilime ve tıbbı katkıları: Bu çalışmada elde edilecek verilerin değerlendirilmesi ile elde edilecek bilgiler tedaviye direncin öngörülebilmesine, tedavi seçeneklerinin daha doğru değerlendirilmesine ve hastaya uygun tedavi başlanmasına katkı sağlayacaktır.
- Süresi: 2 yıl
- Yaklaşık katılımcı sayısı: 100

II-Gönüllünün Haklarıyla İlgili Bilgi

- Bu araştırmanın hastalığınızın tedavisi ile herhangi bir ilgisi yoktur.
- Araştırmaya katılmayı red etme hakkına sahipsiniz.
- İstedığınız anda araştırmacıya haber vererek çalışmadan çekilebilir ya da araştırmacı tarafından gerek görüldüğünde araştırma dışı bırakılabilirsiniz.
- Bu araştırmaya katılmayı kabul etmemeniz durumunda veya herhangi bir nedenle çalışma programından çıkarılmanız veya çıkmanız halinde, hastaneye başvurma nedeniniz / hastalığınızın tedavisinde bir aksama olmayacaktır.
- Bu araştırmaya katılmayı kabul etmeniz halinde araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmeyeceksiniz. Ayrıca size de bir ödeme yapılmayacaktır.
- Sizden alınmış olan kan örnekleri yalnızca “Kronik Myelositik Lösemi Hastalarında Moleküler Monitörizasyon-Klinik Seyir İlişkisinin ve SLC22A1 mRNA Ekspresyonunun Araştırılması” başlıklı bu çalışmada kullanılacaktır.
- Bu araştırmada kimlik bilgileriniz asla kaydedilmeyecektir.

İkinci bölüm: (Katılımcının/Hastanın Beyanı)

Sayın Dr. Betül Bozkurt Bulakçı tarafından İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Tıbbi Genetik Bilim Dalı’nda tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemin uygun olacağının bilincindeyim). Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Dr Betül Bozkurt Bulakçı'yı, 0555 2217921 no'lu telefon ve İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Tıbbi Genetik Bilim Dalı'ndan arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde "katılımcı" (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı-Soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı-Soyadı, İmzası

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin
Adı-Soyadı, İmzası, Görevi

HASTA TAKİP FORMU

Ad-Soyad:

Cinsiyet:

Yaş:

Tani Konma Tarihi:

Uygulanan Tedaviler:

TEDAVİ	DOZ	BAŞLANGIÇ	BİTİŞ
İmatinib			
Dasatinib			
Nilotinib			
Kİ nakli	-		-

TEDAVİYE YANITIN DĞERLENDİRİLMESİ:

HEMATOLOJİK YANIT	
Lökosit	
Trombosit	
Periferik kanda bazofil yüzdesi	
Periferik kanda myeloblast/ promyelosit/myelosit varlığı (+/-)	
Dalağın ele gelmesi (+/-)	

SİTOGENETİK YANIT	Ph + METAFAZ YÜZDESİ (%)
Tam	0
Parsiyel	1-35
Minör	36-65
Minimal	66-95
Yanıtsızlık	>95

MOLEKÜLER YANIT		
BCR-ABL mRNA varlığı (+/-)		TAM: -
BCR-ABL/ABL ORANI		MAJÖR: ≤%0.1

İMATİNİBE YANIT DÜZEYİ: Optimal Yanıt / Suboptimal Yanıt / Yanıtsız
KİNAZ DOMAIN MUTASYONU VARLIĞI:



ETİK KURUL KARARI

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**



Sayı : 1330

Tarih : 26.06.2015

Konu : Prof. Dr. Şükrü PALANDUZ

**Sayın Prof. Dr. Şükrü PALANDUZ
İç Hastalıkları Anabilim Dalı**

İlgi :İç Hastalıkları Anabilim Dalının 02/06/2015 gün ve 166307 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Dr. Betül Bozkurt BULAKÇI' nın yürüteceği 2015/1281 dosya numaralı "Kronik Miyelositik Lösemi Hastalarında Moleküler Monitörizasyon-Klinik Seyir ilişkisinin ve SLC22A1 mRNA Ekspresyonunun Araştırılması" başlıklı çalışma kurulumuzun 26/06/2015 tarih ve 12 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

KRONİK MYELOSİTİK LÖSEMİ HASTALARINDA MOLEKÜLER MONİTÖRİZASYON KLİNİK SEYİR İLİŞKİSİNİN VE SLC22A1 MRNA EKSPRESYONUNUN KARŞILAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

%**6**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**5**

İNT ERNET
KAYNAKLARI

%**3**

YAYINLAR

%**2**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	dspace.trakya.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
2	thd.org.tr İnternet Kaynağı	% 1
3	www.istanbulsaglik.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1
4	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1
5	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<% 1
6	Kim, Yeo-Kyeoung, Seung-Shin Lee, Sung-Hoon Jeong, Jae-Sook Ahn, Deok-Hwan Yang, Je-Jung Lee, Myung-Geun Shin, and Hyeoung-Joon Kim. "OCT-1, ABCB1, and ABCG2 Expression in Imatinib-Resistant Chronic Myeloid Leukemia Treated with Dasatinib or Nilotinib", Chonnam Medical Journal, 2014.	<% 1