

T.C
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
HEMATOLOJİ BİLİM DALI

İMATİNİB KULLANAN KRONİK MİYELOİD LÖSEMİ
HASTALARINDA LMO2 PROTEİNİ İLE SİTOGENETİK
VE MOLEKÜLER YANIT ARASINDAKİ İLİŞKİ

YANDAL UZMANLIK TEZİ
Uzman Dr. M. Hilmi ATAY

SAMSUN-2012

T.C
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
HEMATOLOJİ BİLİM DALI

İMATİNİB KULLANAN KRONİK MİYELOİD LÖSEMİ
HASTALARINDA LMO2 PROTEİNİ İLE SİTOGENETİK
VE MOLEKÜLER YANIT ARASINDAKİ İLİŞKİ

YANDAL UZMANLIK TEZİ

Uzman Dr. M.HİLMİ ATAY

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. DÜZGÜN ÖZATLI

SAMSUN-2012

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İÇİNDEKİLER	I-II
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ	III-IV
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 Kronik Miyeloid Lösemi	2
2.1. Tanım	2
2.1.2. Tarihçe	2
2.1.3. Epidemiyoloji	2
2.1.4. Etyoloji	2
2.1.5. Patogenez	2
2.1.5.1. Moleküler patoloji	3
2.1.5.2. Bcr - Abl ve sinyal İletimi	4
2.1.6. Klinik bulgular	5
2.1.7. Laboratuvar	5
2.1.7.1. Kan	5
2.1.7.2. Kemik iliği	5
2.1.7.3. Sitogenetik	5
2.1.7.4. Moleküler	6
2.1.7.5. Biyokimya	6
2.1.8. Ayırıcı Tanı	6
2.1.9. Tedavi	7
2.1.9.1. Lökoferez ve hidroksiüre	7

2.1.9.2. Tirozin kinaz inhibitörleri	7
2.1.9.2.1. İmatinib	8
2.1.9.2.2. Dasatinib ve Nilotinib	10
2.1.9.3. İmatinib tedavisi alanlarda takip	10
2.1.9.4. Diğer tedaviler	11
2.1.10. Prognoz	11
2.1.11. Akselere ve blastik Faz	11
2.1.11.1. Klinik özellikler	12
2.1.11.2. Laboratuvar özellikler	12
2.1.11.3. Tedavi	12
2.2. Lım Domain Only-2 (LMO2)	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM	14
4. BULGULAR	18
5. TARTIŞMA	21
6.KAYNAKLAR	24

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo I. İmatinib tedavi yanıtını değerlendirme	8
Tablo II. İmatinib tedavisi alanlarda aylara göre yanıt değerlendirilmesi	9
Tablo III. Tirozin kinaz inhibitörlerine bağlı yan etkiler ve tedavisi	10
Tablo IV. İmatinib alanlarda yanıt takibi	11
Tablo V. Hastaların tanı anındaki parametre değerleri	18
Tablo VI. Sokal risk skoruna göre LMO2 boyanma oranları	19
Tablo VII. 6. ayda sitogenetik yanıt alınan ve alınmayan hastaların LMO2 ile boyanma oranları	19
Tablo VIII. 12. ayda sitogenetik yanıt alınan ve alınmayan hastaların LMO2 ile boyanma oranları	20
Tablo IX. 18. ayda majör moleküler yanıt alınan ve alınmayan hastaların LMO2 ile boyanma oranları	20

.

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1. Philadelphia kromozomu	3
Şekil 2. BCR-ABL'nin etkilediği sinyal iletim yolları	4
Şekil 3. BCR-ABL'nin etki mekanizması ve imatinib tarafından inhibisyonu	7
Şekil 4. LMO2 komplekslerinin sistematik modelleri	13
Şekil 5. Miyeloid seride LMO2 primer antikor x400 avidin straptavidin peroksidaz yönden DAB kromogen	17
Şekil 6. Miyeloid öncül hücrelerde LMO2 primer antikor x 400 avidin straptavidin peroksidaz yönden DAB kromogen	17
Şekil 7. Hastaların sokal risk skoruna göre oranları	19

ÖZET

Kronik miyeloid lösemi (KML), miyeloid hücre elemanlarının artmış proliferasyonu ve kemik iliğinde hiperselülarite ile karakterize klonal bir kök hücre hastalığıdır. Hastaların % 95'inde Philadelphia (Ph) kromozomu bulunur. KML'nin tedavisinde tirozin kinaz inhibitörleri kullanılır. Tedavi yanıtı hematolojik, sitogenetik ve moleküler yanıtla göre değerlendirilir. LMO2 proteini bir transkripsiyon faktördür. Bu çalışmanın amacı imatinib kullanan KML hastalarında LMO2 ile sitogenetik ve moleküler yanıt arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.

Çalışmaya toplam 32 KML hastası alındı. Hastaların yarısı erkek ,yarısı kadındı. Ortalama yaş $46,88 \pm 15,568$ (21-85) idi. Ortalama izlem süresi 29,4 (12-58) idi. Hastaların tamamı kronik fazda idi. Başlangıç tedavilerinde imatinib başlandı. Tedavi yanıtları ELN (European Leukemia.net) kriterlerine göre değerlendirildi. Hastaların tanı anında alınan kemik iliği biyopsi metaryali LMO2 antikoru ile yapılan immünohistokimyasal çalışmada 20 (%62,5) hastada pozitif, 12 (%37,5) hastada negatif boyandı. İmatinib kullanan KML hastalarının altıncı , onikinci aydaki sitogenetik ve onsekizinci aydaki moleküler yanıtları ile LMO2 proteinin artışı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki yoktu.

Bu çalışma imatinib kullanan KML hastalarında LMO2 ile sitogenetik ve moleküler yanıt arasındaki ilişkiyi araştıran ilk çalışmadır. Yayınlanan çalışmalarda LMO2 protein artışı ile ilgili çelişkili durumları açıklığa kavuşturmak için geniş vaka serili yayınlara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: KML, LMO2, sitogenetik yanıt, moleküler yanıt

ABSTRACT

Chronic myeloid leukemia (CML) is a clonal stem cell disorder which is characterized by increased proliferation of myeloid cells and hyperplasia of bone marrow. Philadelphia chromosome is found 95 % of patients. Tyrosine kinase inhibitors are used in the treatment of CML. Treatment response is evaluated according to hematologic, cytogenetic and molecular response. LIM Domain Only2 (LMO2) protein is transcription factor. The purpose of this study is to investigate the relationship between LMO2 and cytogenetic, molecular response in CML patients on imatinib.

A total of 32 patients were included in the study. Half of the patients were included in the study. Half of the patients were female. The average age was $46.88 \pm 15,566$ (21-85). The average follow-up period was 29,4(12-58) months. All patients were in chronic phase. Imatinib was used in initial treatment. Treatment responses were evaluated according to criteria of the ELN. 20(62,5) of bone marrow biopsy specimens had been taken from patients at diagnosis were a positive staining with immunohistochemical staining of antibody LMO2 and negative staining in 12(37,5). CML patients on imatinib had not a statistically significant relationship between the increase in protein LMO2 with cytogenetic response of sixth, twelfth month and molecular response of eighteenth month

This study is the first study which investigates the relationship between LMO2 and the cytogenetic, molecular response in CML patients on imatinib. Broad case serial studies are needed to clarify of contradictory situations of LMO2 protein increase in published studies.

Key Word: CML, LMO2, cytogenetic response, molecular response

GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik myelositer lösemi (KML) bir kök hücre hastalığıdır. Anormal klonal bir şekilde myeloid öncü hücreler çoğalır . KML kronik, akselere ve blastik olmak üzere üç faza ayrılır. Genellikle hastaların büyük çoğunlu tanı sırasında kronik fazdadır. Hastalığın takibi sırasında bazı hastalar akseler veya blastik faza geçebilir.

İlk defa Nowell ve Hungerford 1960 yılında KML hastasında kullandıkları yeni bir teknikle anormal bir G kromozomu buldular. Bu kromozoma bulunduğu şehrin adı olan Philadelphia'yı verdiler . 1970'ler de Janet Rowley 9 ile 22'inci kromozom arasındaki translokasyonun t(9,22) olduğunu gösterdi. 1980'ler 22. kromozomun üzerindeki BCR (breakpoint cluster region) gen ile 9.kromozomdaki ABL(abelson leukemia virüs) gen arasında translokasyon olduğu ve bcr-abl füzyon onkogeni kodladığı bildirildi. 1990'ların başlarında ise bu onkogeni inhibe eden tirozin kinaz inhibitörü olan imatinib bulundu . Son yıllarda sekonder tirozin kinazlar olan dasatinib ve nilotinib tedavide birincil veya ikincil ilaç olarak kullanılmaya başlandı.

KML hastalarının tedaviye yanıt iki yöntemle takip edilir. Kemik iliği aspirasyon metaryalinden konvansiyonel yöntemle Philadelphia kromozomunun oranın tespit edilmesi. İkinci yöntem kandan bu anormal genin ürünü olan bcr/ abl protein düzeyinin PCR tekniğiyle ölçülmesidir.

LIM domain only-2 (LMO2) bir transkriptik faktördür. LMO2 hematopoetik kök hücrenin gelişiminde, embriyogenezis, anjiogenezis ve eritropoeziste düzenleyici görevi vardır. Fonksiyonlarını hücrenin çekirdeğinde gösterir . LMO2 geni 11p13 kromozomunda lokalizedir ve buradan LMO2 proteini salgılanır. Kemik iliğinde eritrosit ve myelosit seri hücrelerinin öncü hücrelerinden daha fazla salgılanır. Matür hücrelerde tespit edilmez . LMO2 ilk olarak akut T hücreli lösemi hastalarında çalışılmıştır . Diffüz büyük hücreli lenfoma, B hücreli lösemi, akut myeloid lösemi, kronik myeloid lösemi ve pankreas kanserinde prognostik önemi araştırılmıştır.

KML hastalarında tirozin kinaz inhibitörü kullananlarda sitogenetik ve moleküler yanıt hastalar arasında farklılık göstermektedir. Yanıt cevabını etkileyen bir çok faktör suçlanmaktadır. Bu sebeble imatinib kullanan kronik myeloid lösemi hastalarımızda LMO2 protein ifadesinin sitogenetik ve moleküler yanıtla olan ilişkisini araştırmak için bu çalışmayı planladık.

KRONİK MYELOİD LÖSEMI

2.1.1.Tanım

Kronik myelosid lösemi (KML), farklılaşmanın bütün evrelerindeki miyeloid hücre elemanlarının artmış proliferasyonu ve kemik iliğinde hiperselülarite ile karakterize klonal bir kök hücre hastalığıdır [1]. Hastaların % 95'inde 9 kromozom ile 22 kromozom arasında translokasyon görülür. Bu kromozoma Philadelphia (Ph) kromozomu denir.

2.1.2.Tarihçe

1878'de Neumann kemik iliği sadece normal kan hücreleri değil lösemik hücrelerinde yapıldığı yer olduğunu bildirdi ve myelogene leukemia ifadesini kullandı(2). Nowell ve Hungerford KML hastalarında 21. veya 22. kromozomun uzun kolundaki kaybın olduğunu bildirdiler(3). Rowley ilk defa bu hastalarda 9 ile 22 kromozom arasındaki translokasyonu gösterdi. Bu translokasyonun keşfi hastalığın moleküler temelini oluşturmasına zemin hazırladı. Oluşan gen sentez edilen ürününlerin trozin kinaz aktifleyerek malign transformasyona neden olduğu gösterildi(4). 1996 yılında yayınlanan araştırmada imatinibin trozin kinaz aktivitesini inhibe ettiği bildirildi (5).

2.1.3. Epidemiyoloji

KML hematolojik malignitelerin % 15'ini oluşturur. Amerika Birleşik Devletlerinde yılda erkeklerin 100.000 'de 2'sinde , kadınların 100.000 1.1'inde görülür (6). Tamı sırasında ortalama yaş 45-50'dir. Erkek/kadın oranı; 2 /1,2'dir (7) .

2.1.4. Etyoloji

Yüksek doz iyonize radyasyon alanlar dışında KML'nin nedeni bilinmemektedir. Örnek olarak Japonya'da atom bombasına maruz kalanlarda, İngiltere'de ankilozan spondilit için radyoterapi verilenlerde KML sık izlenmiştir (7, 8) .

2.1.5. Patogenez

KML tek multipotent hematopoetik kök hücrenin malign transformasyonu sonucu oluşur. Birkaç örnek verilecek olursa :

1. Kronik faz KML eritrosit, nötrofil, eozinofil, bazofil ve trombosit yapımıyla ilgilidir (10).
2. Ph kromozomu (22q-) eritroblast, nötrofil, eozinofil, bazofil, lenfositler, makrofaj ve megakaryositlerde bulunur (11) .
3. Farklı KML hastalarında yapılan moleküler çalışmada 22 kromozomda değişik kırılma bölgeleri gösterilirken, aynı bireyde benzer kırılma bölgeleri gösterilmiştir (12).

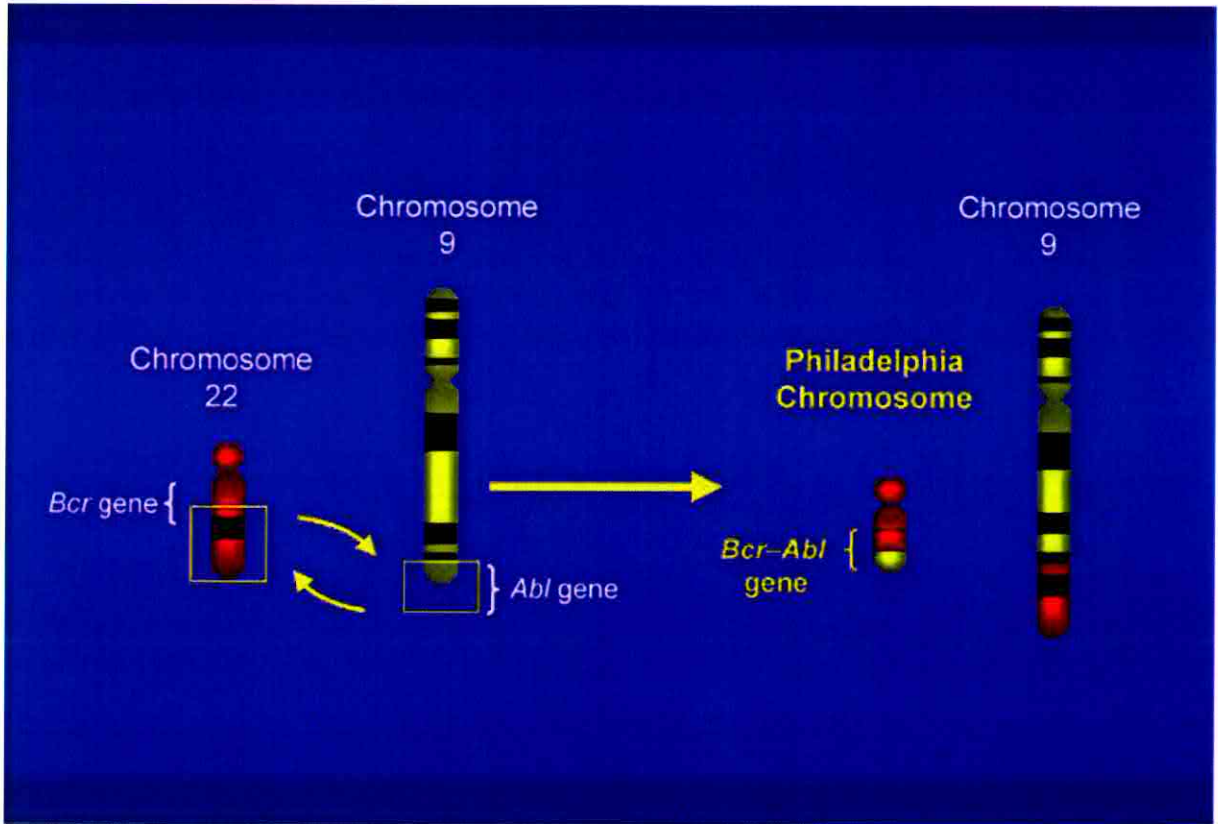
KML hastalarında öncü hücreler incelendiğinde normal hücrelerden farklılık gösterir. Lösemik CFU- GM(colony-forming unit- granulocyte-monocyte) normal hücrelere göre CD44 adezyon reseptörü seviyesi yüksektir (13). Aynı şekilde lösemik CD34+ hücrelerde P glikoprotein aşırı salgılanır ve çoklu ilaç dirençinde önemlidir (14).

Lösemik progenitör hücreler kültüre edildiğinde normal hücelere göre yaşamları kısadır (15). Antiproliferatif etkisi olan TNF- alfa'nın lösemik öncü hücelere etkisi normal öncü hücelere göre azdır (16).

2.1.5.1. Moleküler patoloji

Rowley 1973'de 22. kromozomdan kopan parçanın 9. kromozomun uzun koluna diğer taraftan 9. kromozomdan aynı boyutta kopan parçanın 22. kromozoma transforme olduğunu gördü ve bunun dengeli bir translokasyon olduğunu bildirdi (4). Bu kırılmanın 9. kromozomun uzun kolunda 34. bandda, 22. kromozomun uzun kolunun 11. bandda olduğu tespit edildi. Klasik Ph kromozomu t(9,22) (q34;q11) adlandırıldı (Şekil1).

KML'de 9. kromozomun ABL geninde ve 22. kromozomun BCR geninde mutasyon oluşur (17). Yeni gen 22.kromozomdaki BCR genin 5' kısmı ile 9. kromozomdaki 3' kısmının translokasyonu sonucu oluşur (18). Oluşan Ph genomik DNA'dan mesenger Bcr-Abl mRNA oluşur. Translasyonla p210 proteini oluşur. Bu protein trozin fosfoprotein kinaz yapısındadır. Hücrelerdeki trozin yapılarını fosforiler (19). Oluşan ürünü trozin protein kinaz'ın düzenli olan enzimatik aktivitesini bozar ve malign transformasyon neden olur (19,20).



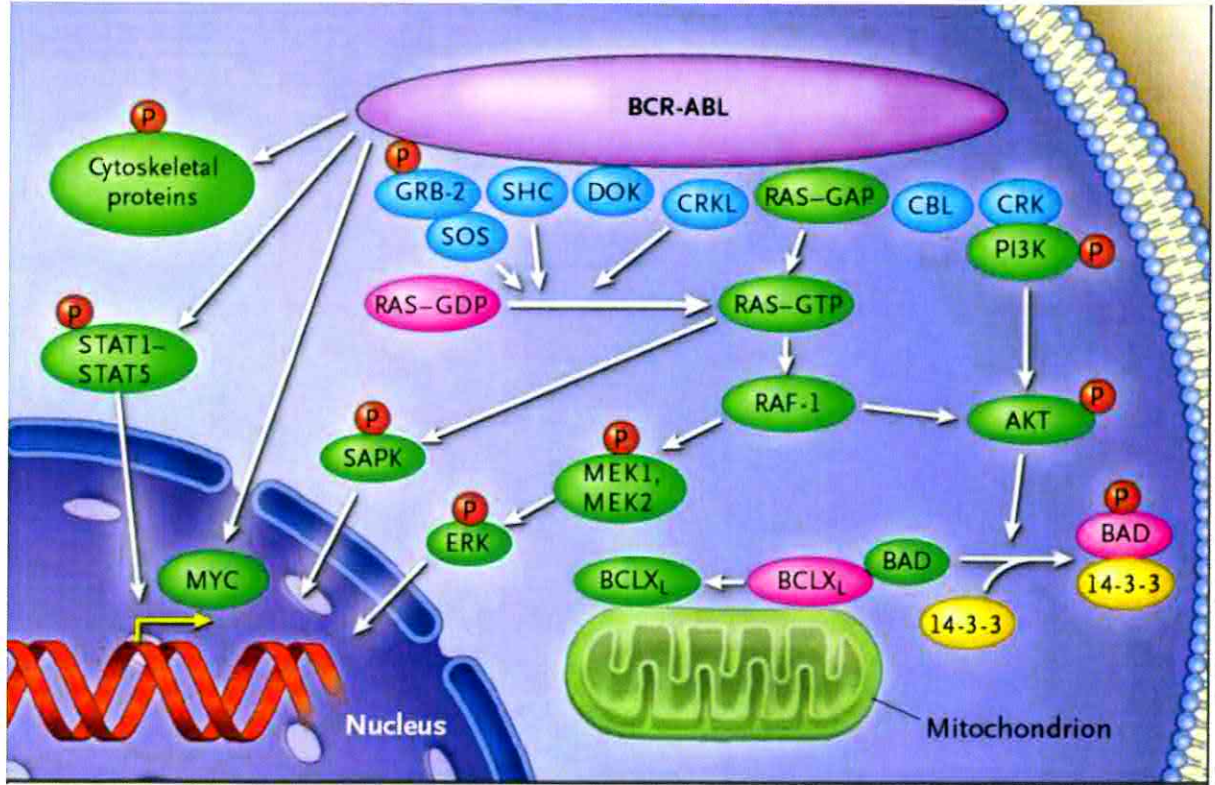
Şekil 1. Philadelphia kromozomu. Lydon ve ark'dan alınmıştır [21].

22. kromozomdaki kırılmalar dar aralıkta olur. Bu kromozom kırılmaları kendi aralarında majör (M- bcr), minör (m- bcr), mikro (μ -bcr) olarak adlandırılır. Üç farklı kırılma bölgesinden sırayla p210, p190, p230 füzyon proteini oluşur (22). KML hastalarının

büyük bir kısmında p210 proteini tespit edilir. Ayrıca P190 proteinide eksprese edildiği bulunmuştur. İkisinin birlikte bulunduğu hastalarda klinik ve biyolojik olarak anlamının ne olduğu bilinmemektedir (23). Bcr bölgelerindeki 5'kırlma bölgesi bazofili ile 3' kırlma bölgesi ise trombositozla ilişkili olduğu bulunmuştur (24) .

2.1.5.2. Bcr-Abl ve sinyal İletimi

Sinyal ileti sistemi sitoplazmada yer alır. Sinyal iletiminde yirminin üzerinde hücresel protein görev alır (25).Kompleks bir olaydır (Şekil 2). Fosfatidilinozitol 3' kinaz P210 protein proteini ile ilişkili olarak KML hücrelerinde proliferasyona neden olur. P110 ise kml hücrelerin büyümelerini inhibe eder (26). Raf proteini ise BCR-ABL aracılığıylaKML hücrelerin büyümesini ve büyüme faktörüne bağlı olarak normal hematopoetik öncülerinin proliferasyonunu artırır (27). CRKL sinyal sisteminde yer alan adaptör bir moleküldür. BCR/ ABL ile adeziv proteinler olan paxilin bağlanır. Paxilin sırasıyla vinculin, talin bağlanır. Bu kompleks adezyonla ilgilidir ve KML hücrelerinde adezyon bozukluğunu açıklar (28). P210 proteini Janus associated kinase (JAK) ve signal transducers and activators of transcription (STAT5) aracılığıyla hücrelerin proliferasyonu artırır (29). BCR/ ABL KML hastalarında apoptozisi inhibe ettiği net olarak gösterilmiştir. Bazı yayınlarda apoptozisi bcl-2 aracılığıyla inhibe ettiği gösterilmiştir (30).



Şekil 2. BCR-ABL'nin etkilediği sinyal iletim yolları. Goldman ve ark'dan adapte edilmiştir (25).

2.1.6. Klinik bulgular

Hastaların % 70'i tanı anında semptomatiktir. En sık görülen şikayetler kolay yorulma, eksersiz toleransının azalması, iştahsızlık, karında rahatsızlık, erken doyma (dalak büyüklüğü ile ilişkili), kilo kaybı, aşırı terlemedir (31,32,33). Semptomlar spesifik olmayan ve yavaş bir şekilde ortaya çıkar. Fizik muayenede solukluk ve splenomegali bulunabilir.

Nadir olarak beyaz küre artışına bağlı tinnutus ya da stupor, ürik asit artışına bağlı akut gut artriti (34,35), splenik infarkta bağlı sol üst kadran ve omuz ağrısı, aşırı histamin yüksekliğine bağlı akne ürtiker (36), ateşle birlikte göğüs, kol, bacak ve yüzde ortaya çıkan makulonoduler lezyonlar (Sweet sendromu) (37) klinik ile başvuran hastalar bildirilmiştir.

2.1.7. Laboratuvar bulguları

2.1.7.1. Kan

Hemoglobin konsantrasyonu çoğu hastada tanı sırasında azalmıştır. Retikülosit sayısı normal veya hafifçe artmıştır. Nadiren hemoliz görülür (31,38). Total lökosit sayısı tanı sırasında genellikle 25.000 / μ L dir. Hastaların yarısında beyaz küre 100.000 / μ L üzerindedir (31,32). Granülosit serinin öncü hücreleri (myelosit, metamyelosit, band) kanda artmış olarak bulunur. Eozinofil oranı artmaz. Bazofil oranı genellikle artmıştır. Ayrıcı tanıda bazofil artması önemlidir. Bazofil oranı kronik fazda % 10-15'i geçmez. Total lenfosit sayısı artmıştır (39). T-helper ve T-supresor hücrelerde artış izlenir. B hücrelerde artış izlenmez (40). NK hücrelerde sayısı ve hücre aktivitesi bozuktur (41) .

Platelet sayısı hastaların yaklaşık yarısında tanı sırasında yüksektir. Ortalama yaklaşık 400.000 hücre / μ L dir. Nadiren 1.000.000 üzerine çıkar. Trombosit yüksekliğine bağlı trombohemorajik komplikasyon sık görülmez. Trombositler nadiren tanı sırasında normal değerlerin altında olabilir. Bu bulgu hastanın akselere faza ilerlediğinin işaretidir (42).

2.1.7.2. Kemik iliği

Kemik iliği anlamlı derecede hiperselüler, hematopoetik doku % 75-90 ve yağ dokusu anlamlı derecede azdır (43). Granülosit /eritrosit oranı artmıştır. Oran 10/1 ila 30/1 arasında olabilir (normal oran 2/1 ila 4/1 arasında). Eritrosit üretimi azalmıştır. Megakaryositler normal veya hafifçe artmış olabilir. Eozinofil ve bazofil artmış olabilir. Kolajen Tip III yanı retikulin fibrozis, KML hastaların yarısında tanı sırasında bulunur (44) .

2.1.7.3. Sitogenetik

Tanı alan KML hastaların % 95'inde kemik iliği ve çekirdekli kan hücrelerinde Ph pozitifdir. Ph kromozomu eritroblastlarda, granülositlerde, monositlerde, megakaryositlerde, T ve B öncül hücrelerde bulunur. Olgun B ve T lenfositlerde bulunmaz (45,46). Hastaların 70'inde klasik Ph kromozomu görülürken , % 20'sinde Y kromozomu kaybı, ilave 8 kromozom, 22 kromozomun uzun kolunda kayıp gibi ilave kromozom anomaliler görülür. Bu varyasyonların kronik faz üzerindeki etkisi henüz gösterilmemiştir. Hastaların % 5'inde variant Ph kromozom translokasyonu görülür (47).

2.1.7.4. Moleküler

KML hastaların çok az kısmında sitogenetik çalışmayla Ph kromozomu gösterilemez. Ph kromozomunda salgılanan ürün olan p210protein PCR yöntemiyle değerlendirilir (48). PCR yöntemi pozitif hücreye yaklaşık 500.000 ila 1.000.000 hücre arasından ulaşabilir. Son derece hasas bir testir (49).

FISH (Fluresans in situ hibridizasyon) testi Bcr/ abl füzyonunu tespit etmede PCR yöntemine göre daha sensitif ve hızlı bir testir (50). Ayrıca FISH yöntemi sitogenetige göre de daha hızlı ve sensitif bir testir. Bir örnekteki yaklaşık 500 metafaz hücrelerini inceleyebilir. Füzyon sinyali, nükleer büyüklüğü ve ABL'nin genomik bağlı olarak pozitif ve negatif sonuç verebilir (51).

2.1.7.5. Biyokimya

Ürik asit tanısı sırasında yüksek olarak bulunur (52). Vitamin B12 ve bu vitamini bağlayan transkobalamin artmıştır (53). Kandaki histamin seviyesi bazofil sayısını artışına bağlı olarak artmıştır(54). KML'de LDH yüksektir (55). Beyaz kürenin yıkımına bağlı pseudohiperkalemi, hücreleri oksijen tüketimine bağlı hipoksemi ve aşırı glukoz kullanımına bağlı pseudohipoglisemi görülür (56).

2.1.8. Ayırıcı tanı

KML diğer myeloproliferatif hastalıklarla karışabilir. Polisitemia Vera'da kırmızı hücre kitlesi ve hemoglobin konsantrasyonu artmıştır. Ayrıca klinik olarak plethore bulunur. Ayrıca beyaz küre sayısı genellikle 30.000 μ/L altındadır. Aylara yıllara bağlı olarak değişiklik göstermez. KML ise 30.000 μ/L üstündedir. Haftalar ve aylara bağlı olarak artış gösterir. Myelofibrozis periferik yaymada göz yaşı hücreleri, kırmızı hücrelerde şekil ve büyüklüklerde değişiklik, kanda çekirdekli kırmızı hücrelerin görülür. Beyaz küre sayısını genellikle 30.000 μ/L altındadır ve aylara ve yıllara bağlı olarak değişmez. Esansiyel trombositozusta platelet sayısı 450.000 μ/L üzerindedir. Beyaz küre sayısı ise genellikle 20.000 μ/L altındadır. KML hastalarının yarıdan fazlasında platelet 450.000 'de iken beyaz küre sayısı 20.000 μ/L üzerindedir.

Ph kromozomu primer myelofibroziste , polisitemi ve esansiyel trombositozda bulunmaz. Nadir olarak az bir hastada esansiyel trombositozda Bcr/ abl kemik iliği ve kanda pozitif bulunur (57,58).

Reaktif lökositozda nötrofil sayısı genellikle 30.000 ila 100.000 arasındadır. İnflamatuvar hastalıklar (örneğin pankreatitis), kanser (örneğin kolon ca), infeksiyon (örneğin pnömoni) gibi durumlarda görülür. Genellikle periferik kanda granülositik seri öncü hücreleri azlığı, bazofili artışı izlenmemesi, splenomegalinin olmamasıyla ve sitogenetik veya moleküler çalışmada Ph veya bcr /abl'nin tespit edilemesiyle KML'den ayrılır.

2.1.9. Tedavi

Trozin kinaz inhibitörleri son yıllarda bütün KML hastalarında başlangıç tedavisi olarak kullanılmaktadır. Anlamli beyaz küre yüksekliğinde hidroksiüre ile birlikte kombine kullanılabilir.

2.1.9.1. Lökoferez ve hidroksiüre

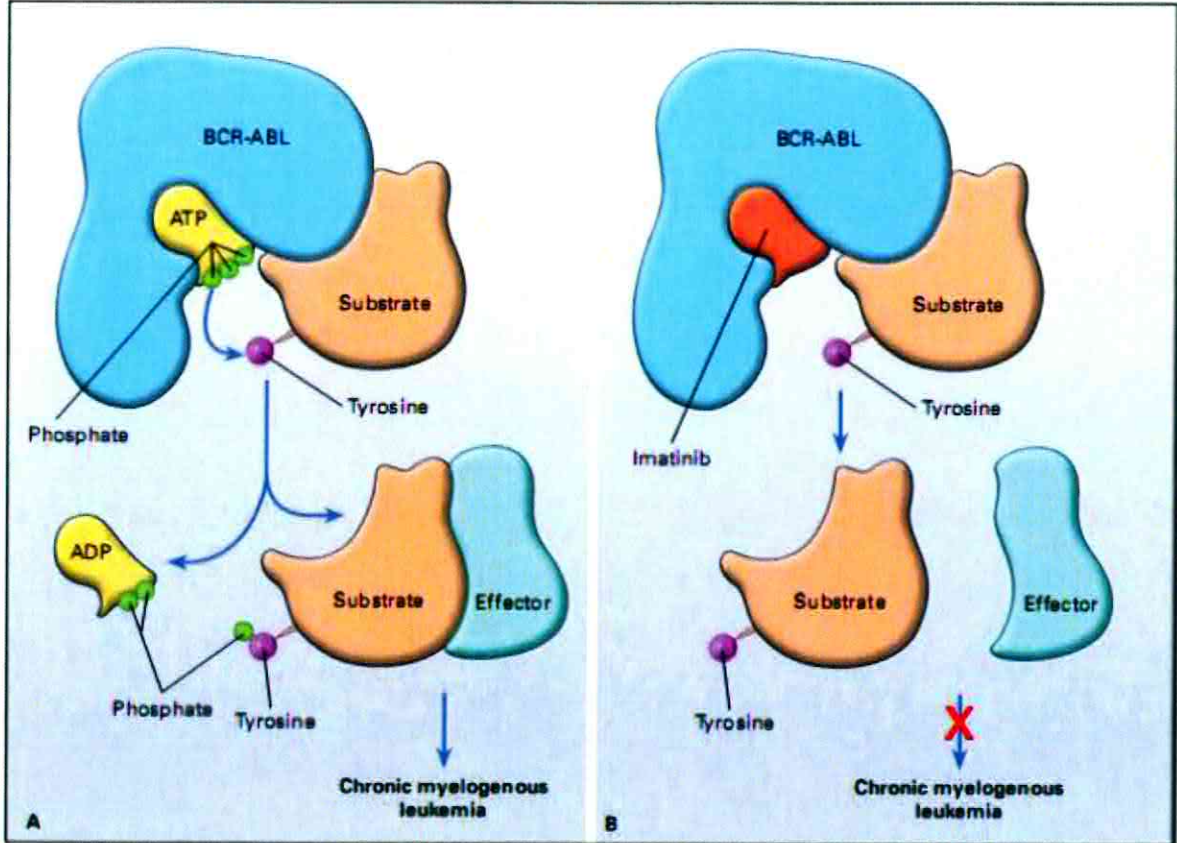
KML hastalarında geçici bir durum sağlar. Hiperlökositoz semptomları olanlarda (örneğin stupor, tinnitüs, papilödem gibi) kullanılabilir. Erken hamilelik döneminde olanlarda diğer tedavilerin fetüse zarar vermemesi için lökoferez kullanılabilir (59, 60).

Hidroksiüre beyaz küre yüksekliğinde 1 ila 6 gr arasında kullanılabilir. Beyaz küre 20.000 μ/L altına indiğinde 1 ila 2 gr inilir. Beyaz küre 5000 μ/L altına indiğinde hidroksiüre kesilir (61).

2.1.9.2. Tirozin Kinaz İnhibitörleri

2.1.9.2.1 İmatinib

İmatinib mesylate bir tirozin kinaz inhibitörüdür. İmatinib fosfatın substrata BCR-ABL bağımlı transferini bozar (Şekil 3). Yeni tanı KML hastalarında imatinib 400 mg/gün başlanır. İmatinib'in KML hastalarında hematolojik, sitogenetik ve moleküler cevap elde etme oranı yüksektir.



Şekil 3. BCR-ABL'nin etki mekanizması ve imatinib tarafından inhibisyonu (62)

İmatinibin amacı (9,22) taşıyan lösemik hücreleri en düşük seviye azaltmak ve normal hematopezi restore etmektir. İmatinib yanıtını değerlendirmek için hematolojik, sitogenetik ve moleküler yanıtlara bakılır(**Tablo I**)(69) .

Tablo I. İmatinib tedavi yanıtını değerlendirme

Hematolojik Yanıt	Beyaz küre sayının $\leq 10.000 \mu / L$, platelet sayısı $< 450.000 \mu / L$, kanda matür olmayan myeloid hücrelerin bulunmaması, lösemi ile ilgili bütün semptom ve bulguların (palpabil splenomegali dahil) kaybolması ve en az dört hafta bu durumun devam etmesi
Parsiyel Sitogenetik Yanıt	Kemik iliğindeki hücrelerin analizi sonucu hücrelerin %35'inden azında Ph kromozomu bulunması
Tam Sitogenetik Yanıt	Kemik iliği hücrelerin sitogenetik analizi sonucu hücrelerde Ph kromozomu bulunmaması
Major Moleküler Yanıt	Kan hücrelerinde BCR-ABL /ABL oranının % 0.05 (tedavi öncesi baz değere göre 3 log azalması)
Tam Moleküler Yanıt	Kan hücrelerinde BCR-ABL tespit edilememesi (genellikle nested RT-PCR yöntemiyle)

İmatinib kullananlarda 5 yıllık takip sonucunda hastaların %75'inde fazlasında tam sitogenetik yanıt, %50'sinden fazlasında majör moleküler yanıt elde edilmiştir. 5 yıllık süreçte hastaların hastaların yakalşık %25'i beklenen cevap alınmaması veya toksisite yüzünden ilaçı bırakmıştır (63) .

Myelosüpresyon imatinib kullanan KML hastalarında önemli bir yan etkidir. Kan hücreleri düzeline kadar ilaç kesilir. Ciddi nötropenilerde G-CSF veya GM-CSF başlanabilir (64). Yorgunluk, ödem, bulantı, diyare, kas krampı ve kızarıklık görülebilir. Karaciğer enzim yüksekliği sık görülmez. Periorbital ödem görülebilir. İmatinib kullananlarda spermatogenez üzerinde etki bildirilmemiştir. Doğurkan kadınlarda fetüs üzerine teratojenik riski bulunmaktadır (65). Hastaların yaklaşık %15'inde cilt reaksiyonu izlenir (66). Orta derecedeki reaksiyonlarda ilaç kesilir. Steroid başlanır. Lezyonlar geçtikten sonra düşük dozda tekrar imatinib başlanır (67). Daha hafif vakalarda beraberinde antihistaminik başlanır (68).

İmatinib tedavisinin yanıt takibi 2009 yılında yayınlanan Avrupa lösemi kriterlerine tablo II 'de özetlenmiştir (69).

Tablo II. İmatinib tedavisi alanlarda aylara göre yanıt değerlendirilmesi

Zaman	Başarısızlık	Suboptimal	Optimal
3.ay	THY yok	TSY yok (Ph+>%95)	THY
6.ay	TSY yok (Ph+ >%95)	PSY dan daha az yanıt (Ph+>%35)	En az PSY (Ph+ ≤ %35)
12.ay	PSY yanıtta daha az yanıt (Ph+> %35)	PSY	TSY
18.ay	TSY' dan daha az yanıt	MMY daha az yanıt	MMY
Herhangibir zamanda	THY kaybı TSY kaybı Mutasyonlar KKA	MMY kaybı Mutasyonlar	Stabil olması ve MMY iyileşmesi

THY : Tam hematolojik yanıt, TSY: Tam sitogenetik yanıt, PSY: Parsiyel sitogenetik yanıt, MMY: Major moleküler yanıt, KKA: Klonal kromazomal anomali

Hasta imatinib kullanımı altında kemik iliğinden yapılan sitogenetik değerlendirmede Ph kromozomu pozitif hücreler azalıyor ise veya TSY var ise ve PCR ile değerlendirmede bcr-abl azalıyor ise ilaç kullanmaya devam edilmelidir. Eğer takip periyotlarında THY kaybı, TSY kaybı, yeni genetik kromozom anomalisi tespit edilmesi, yapılan ardışık PCR çalışmalarında bcr-abl/ abl oranının bir logaritma veya daha fazla artışı durumunda yanıt kaybı olarak kabul edilir (69,70) .

İmatinib tedavisi altında sekonder kromozomal değişiklikler görülebilir. Yapılan bir çalışmada Ph kromozomu negatifleşen hastalarda ortalama 18 ayda sekonder kromozomal değişiklik izlenmiş ve en sık -Y ve +8 tespit edilmiş (71). Bu kromozomal değişiklikler kronik ve akselere fazda yaşam süresi için bağımsız bir faktör olabileceği bildirildi(72) .

İmatinib tedavisi alanların bir kısmında direnç gelişmektedir.Bunlardan bazıları imatinib altında bcr-abl artışı(73), P-glikoprotein aracılığıyla ilacın dışa atılımının artması (74), ilaç metabolizmasında değişiklikler(75), bcr -abl bağımsız sinyal karekterinde değişiklikler(76) sayılabilir.Ph kromozonun duplikasyonu ve izodisentrik kromozomlarda imatinib rezistansı geliştirdiği bildirilmiştir (76,77).

Mutasyon gelişmeside bir diğer imatinib direnci gelişen durumdur. Mutasyon gelişen hastaların %40'ında bcr-abl'nın abl kısmında mutasyon gelişmiştir. Bu hastalarda sitogenetik ve hematolojik yanıt elde edilemez. abl mutasyonları primer ve sekonder direnç gelişimine katkıda bulunurlar (78). abl-atp fosfat bağlayan P kolunda gelişen mutasyonlarda kötü prognoz belirteçidir (79).

bcr-abl yolundan bağımsız olarak diğer sinyal ileti sistemlerine bağlı olarak imatinibe direnç gelişir. Heat shock protein 70 (80), SRC (81), GRB2 (82) sayılabilir.

Hastaların gen profillerinin çıkarılmasıyla başlangıçta hastanın durumuna göre imatinib klinik yararı tahmin edilebilir (83). Hastalarda realps veya rezistans durumunda imatinibin dozunu arttırmak veya nilotinib veya dasatinibe geçmektir (84) .

2.1.9.2.2. Dasatinib ve Nilotinib

Dasatinib ve nilotinib ikinci jenerasyon tirozin kinaz inhibitörleridir. İmatinib intoleransında ve direncinde kullanılır.

Dasatinib imatinibe göre 325 kat daha güçlüdür(85). Hem SRC hemde ABL kinazı inhibe eder (86).Dasatinib 100 mg /gün kronik KML hastalarında kullanılır (87). Ayrıca imatinibten farklı olarak beyin bariyerinden geçer (88). Dasatinibin en önemli yan etkisi sitopenidir. Bu ilave olarak sıvı birikmesi, diyare ve deride kızarıklık görülebilir.

Nilotinib imatinibten 30 kat potanttir (89). Dozu 2x400 mgr/ gün 'dür. Yan etkileri nötropeni , hiperbilirubinemi ve EKG'de QT intervalinde uzamadır (90). Trozin kinazlara bağlı yan etkiler ve tedavisi tablo 3'te özetlenmiştir (93).

Tablo III. Tirozin kinaz inhibitörlerine bağlı yan etkiler ve tedavisi

Yan Etki	İmatinib	Nilotinib	Dasatinib	Tedavi
Sıvı Birikmesi	++	+	+	Diüretik,doz ayarlaması
Bulantı, kusma	++	+	+	İmatinib küçük lokma ile, nilotinib boş mide ile alınmalı
Plevral effüzyon	+	+	++	Diüretik, doz ayarlaması, glukokortikoid
Myalji	+++	+	+	Tonik su, Mg +
QT uzaması	+	+	+	K+,Mg+ idamesi, EKG takibi
AST, ALT yüksekliği	+	++	+	Grade 3 ve 4 doz kesilmesi, doz ayarlaması
Kızarıklık,kaşıntı	+	++	+	Topikal steroid
Anemi	+	+	+	
Nötropeni	+	+	+	Doz ayarlaması, ilaın kesilmesi, growth faktör
Trombositopeni	+	+	+	Doz ayarlaması, ilaın kesilmesi

2.1.9.3. İmatinib Tedavisi Alanlarda Takip

İmatinib alanların en az ayda bir tam kan bakılması ve tam sitogenetik yanıt alınana kadar altı ayda bir kemik iliği örneği alınıp sitogenetik inceleme yapılmalıdır. Diğer klonal anomaliler için yılda bir kemik iliği örneğinden sitogenetik çalışılmalıdır (91). RT-PCR ise kandan 3 ayda bir tekrar edilmeli. Eğer 1 log artış olduğunda bir ay sonra PCR tekrarlanmalı ve artış devam ediyorsa yanıt kaybı olarak değerlendirmelidir. Eğer KML hastasının üçüncü ayda hematolojik yanıt, 6. ayda parsiyel sitogenetik yanıt, 12. ayda tam sitogenetik yanıt elde edilemediğinde diğer tedavi seçenekleri düşünülmelidir (92). İmatinib alanlarda tablo IV özetlenmiştir (69).

Tablo IV. İmatinib alanlarda yanıt takibi

Örnek	Sıklık
Tam Kan Sayımı	Tam hematolojik yanıt alınana kadar iki haftada bir daha sonra üç ayda bir
Sitogenetik	Tanıda, 6. ayda komplet sitogenetik yanıt alınana kadar 6 ayda bir, eğer moleküler yanıt testi yoksa senede bir yapılmalı
Moleküler	Major moleküler yanıt kadar üç ayda bir, daha sonra altı ayda bir
Mutasyon Analizi	Başarısızlıkta, suboptimal cevapta ikinci tirozin kinaz geçişten önce

2.1.9.4. Diğer Tedaviler.

İnterferon alfa imatinib kullanmadan önce KML hastalarında kullanılan önemli ilaçlardan biriydi. Tirozin kinazı inhibitörlerini tolere edemeyen KML hastalarında kullanılabilir. Nadir olarak akselere veya kronik fazı ileri safhaların dayanılmaz ağrıları olan ve diğer gastrointestinal organlara zarar veren dalak büyüklüklerinde uygulanır. Kısa zamanda geçici palyatif rahatlama sağlar (93). Tedaviye cevapsız trombositopenisi olanlarda, karında aşırı rahatsızlık olanlarda, hiperkatabolik ve portal hipertansiyonu olanlarda splenektomi uygulanabilir. Ameliyat sonrası enfeksiyon, trombus ve hemoraji görülebilir (94). İmatinibin kullanımında sonra allojenik transplant azalmıştır. Tirozin kinaz inhibitörlerine karşı direnç, intolerans olduğunda ve tedaviye rağmen akselere veya blastik faza gidiş var ise uygun olan KML hastalarında allojenik nakil düşünülür.

2.1.10. Prognoz

KML hastalarında prognozu değerlendirmek için çeşitli skorlama yöntemleri geliştirilmiştir. Busulfan ve IFN kullanımını sırasında kullanılan Sokal skorunda yaş, dalak büyüklüğü, trombosit sayısı ve myeloblast oranına bakılır. Hasford skorunda yaş, dalak büyüklüğü, blast sayısı, bazofil, eozinofil, platelet sayısına bakılır (95). KML hastalarında tanı anında iyi Hasford skoru olanlarda hematolojik ve sitogenetik yanıt oranı diğer hastalara göre yüksektir (96).

2.1.11. Akselere ve Blastik Faz

Kronik faz KML hastasında hematolojik yanıtta bozulma, dalak boyutunda artış, blast ve bazofil sayısında artış ve ekstramedüller tümör oluşumu var ise kronik fazdan akselere faza dönüşüm vardır. Blast sayısı ≥ 10 , trombosit sayısı ≤ 100.000 , bazofil sayısı $\geq \% 20$ ve Ph kromozomu ile birlikte yeni klonal sitogenetik anomali izlenir (97). Blastik krizde ise hasta akut lösemiye dönüşmüştür. Blast sayısı $\geq \%20$ üzerindedir.

KML hastaların kronik fazdan akselere faza daha sonra blastik faza ve direkt blastik faza geçişlerinde çeşitli moleküler değişiklikler gözlenir. Maturasyon aresti, genomik izlemde yetersizlik, DNA onarımında yetersizlik, mutasyon fenotipin gelişmesi, telomer kısalığı, tümör süpresor fonksiyonların kaybı ve bilinmeyen faktörler sayılabilir (98, 99). Hastaların

%65'inde double Ph kromozom, trozomi 8, izochromosom 17p en sık görülen sekonder kromozomal değişikliklerdir (100).

2.1.11.1. Klinik Özellikler

Kronik fazdan akselere faza geçişlerden bir takım klinik belirtiler oluşur. Bu belirtiler sebebi açıklanamayan ateş , kemik ağrısı, halsizlik, gece terlemesi, atralji , dalağın büyümesinden dolayı sol üst kadranda ağrıdır. Bu belirtiler haftalar içinde ortaya çıkar. Lokalize ve diffüz lenfadenopati görülebilir (97). Aynı belirtiler blastik fazda görülebilir.

2.1.11.2. Laboratuvar Özellikler

Anemi derinleşir. Poikilositoz, anizositoz ve anizokromi görülür. Çekirdekli eritrositler periferde artmış izlenir. Beyaz küre sayısı düşebilir. Akselere fazda blast %10'nu, blastik fazda blast sayı %20'yi geçer. Bazofil sayısı total lökosit sayısının % 20 'sini geçer. Trombosit 100.000/mm³ altına düşer. Büyük plateletler ve mikromegakaryositler gözlenir (100, 101,102) .

2.1.11.3. Tedavi

Akselere ve blastik fazda eğer uygun dđnor var ise optimal tedavi kemik iliği naklidir. Son yıllarda kullanılan tirozin kinaz inhibitörleri ile daha iyi sonuçlar alınmaktadır. İmatinib, nilotinib ve dasatinib kullanımı allojenik kemik iliği nakli için akselere fazda köprü görevi görür (103) .

KML'de blastik fazda hücrelerde myeloid fenotipte ise akut myeloid lösemideki gibi idarubicin veya daunorubicin, yüksek doz cytosine arabinoside ve bazende etoposide kullanılır (104). Bu tedavilerle ortalama yaşam süresi altı aydır. Lenfosit fenotibi KML blastik kriz hastalarının % 30'unda görülür. Tdt ve CD 10 pozitif olan hastalarda vincritin ve prednol kombine kemoterapi verilenlerde cevap daha iyi olduğunu söyleyen yayımlar vardır. Fakat bazı klinisyenler de novo erişkin ALL hastarında verilen yoğun kemoterapilerin yüksek remisyon oranları ve uzun süreli remisyon sağladığını savunmaktadır (105) .

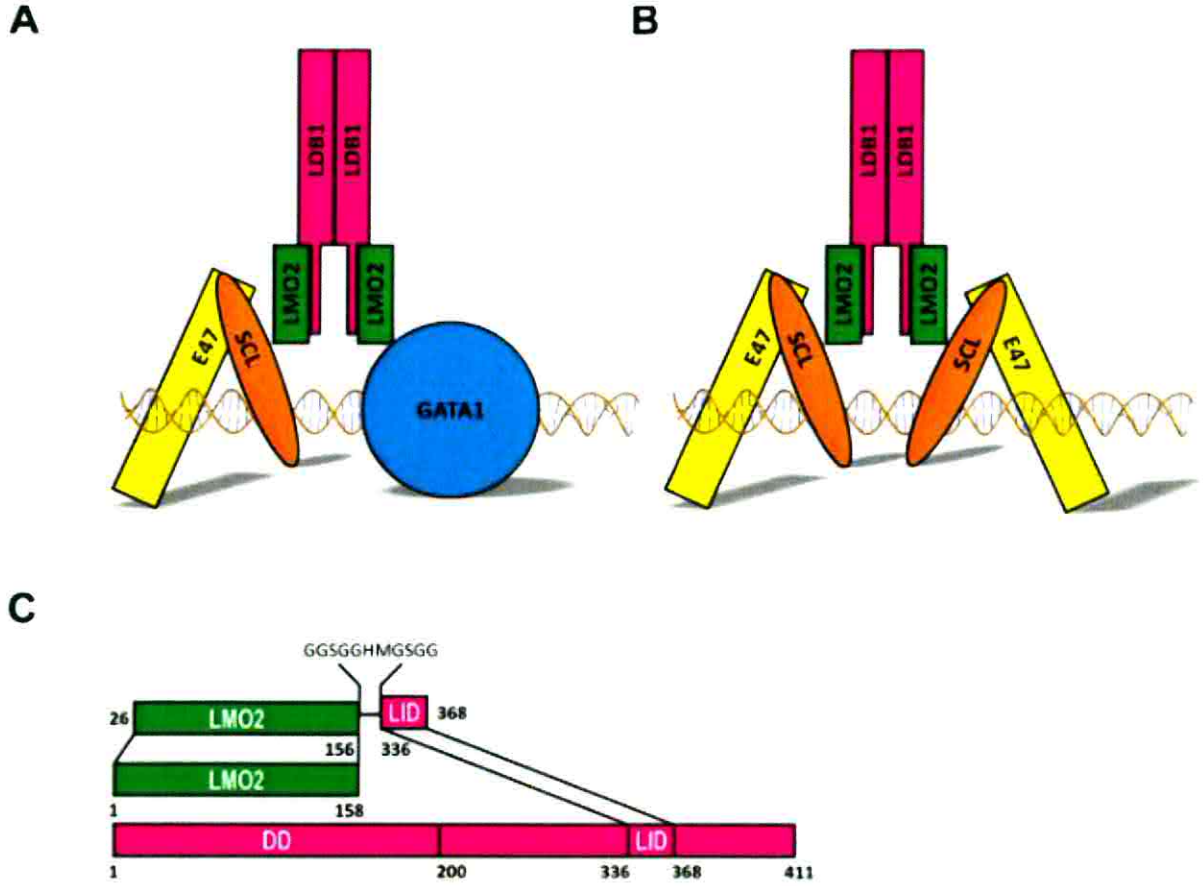
KML blastik fazdaki hastalarda nakile uygun ve dđnor var ise allojenik transplant düşünölmelidir. Özellikle transplant öncesi imatinib kullanan ve majör sitogenetik yanıt elde edilen hastalarda transplant sonuçları daha iyi elde edilmiştir.

2.2. LIM DOMAIN ONLY-2 (LMO2)

Lim domain only-2 (LMO2) önemli bir regölatör proteindir. Lim adını homeodomain protein yapısında olan Lin11, Isı-1 ve MEC-3 proteinlerden alır. Homeodomain yapısındaki proteinler homeobox geninden salgılanır. DNA'ya bağlanırlar. Fonksiyonlarını nükleusta yapar. Bunun için only kelimesi ilave edilmiştir. Ardışık iki lim domain zincirinden oluştuğunda LMO2 diye adlandırılmıştır (106).

LMO2, Lim domain only protein ailesine ait bir proteindir. Bu proteini kodlayan LMO2 geni

11p13 kromozomda bulunur. Lim domainleri yapısında sistein-histidin, çinko zincirleri bulunur (Şekil 4C)(107, 108).



Şekil 4. LMO2 komplekslerinin sistematik modelleri

LMO2 diğer transkripsiyon faktörleri ile ilgili olduğu bulunmuştur. Bu beşli kompleks GATA-1, TAL1/SCL, LDB, E2A ve LMO2'den oluşur(Şekil 4A)(109). Örnek olarak hayvan deneylerinde TAL1 transkripsiyon proteininin LMO2 ile birlikte aşırı eksprese olduğunda sinerji oluşturup onkolojik potansiyeli arttırdığı bulundu (110).

LMO2 proteini transgenik hayvanlar üzerinde çalışıldığında T hücre transformasyonunda etkili olduğu bulunmuştur (Şekil 4B)(111). LMO2 eksikliğinde embriyogenezis safhasında matür eritrosit yapılamadığından farelerin öldüğü tespit edildi (112). Daha sonra Yamada ve ark. erişkin hayvanlarda hematopoeziste LMO2'nin gerekli olduğu ve fonksiyonun lenfoid ve myeloid seriye öncesinde olduğunu bildirdi (113). Bu çalışmalara dayanarak hematopoetik kök hücre gelişiminde düzenleyici görevi olduğu, hücrelerin nükleusunda moleküller arasında köprü görevi gördüğü, proteinler arası ilişkiyi yönettiği ve hücrelerin farklılaşmasında gerekli olduğu bildirildi (106). Normal kemik iliğinde bütün hematopoetik serinin öncü hücrelerinde LMO2'nin aşırı eksprese edildiği fakat farklılaşmanın sonlarına doğru ekspresyonun azaldığı ve matür hücre oluştuğunda ekspresyon izlenmediği bildirildi (114).

İnsanlarda ilk defa T hücre kökenli lösemik hücrelerde çalışıldı. T(11;14)(p13;q11) tespit edilen akut T hücreli lösemi hastalarında aşırı eksprese edildiği ve önemli rol oynadığı bulundu (115). Germinal merkezli diffüz large hücreli lenfomalarda aşırı LMO2 eksprese edenlerde yaşam süresi daha iyi olduğu bildirildi (116).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamız Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi tıbbi araştırma etik komisyonu tarafından değerlendirilmiş olup 21.01.2012 tarih ve 2012/503 sayılı kararı ile yapılması uygun bulunarak onaylanmıştır.

Mayıs 2007- Ocak 2011 tarihleri arasında KML tanısı alan hastalar çalışmaya alındı. Bu hastaların dosyaları geriye dönük olarak incelendi. Tanı sırasında alınan kemik iliği biyopsiler patoloji bölümünde hematopatolog tarafından yeterli metaryal olup olmadığı incelendi. Klinik, labavatuvar ve kemik iliği biyopsi metaryalleri yeterli olan 32 hasta çalışmaya dahil edildi.

3.1. Hastalar

Hastalar yaş, cinsiyet, tanı tarihi, tanı anındaki beyaz küre sayısı, hemoglobin, trombosit, periferik yaymada blast oranı, splenomegali olup olmadığı, sokal skorları, kullandıkları tirozin kinaz inhibitörleri, hematolojik yanıt, sitogenetik yanıt ve majör moleküler yanıtları, kemik iliği biyopsilerin LMO2 ile pozitif veya negatif boyanma açısından sorgulandı. Hastaların tanı anındaki risk profillerini belirlemek için sokal risk skorlaması kullanıldı.

3.2. Hematolojik, sitogenetik ve moleküler yanıt değerlendirmesi ve takibi

Hastaların hematolojik, sitogenetik ve moleküler yanıtları European Leukemia.Net (ELN) 2010'da yayınlanan klavuzuna göre değerlendirildi.

3.2.1. Hematolojik yanıt kriterleri:

Hematolojik yanıt beyaz küre < 10.000 ve trombosit < 450.000 , periferik yaymada immatür granülosit olmaması, %5 den daha az bazofil olması ve dalağın palpe edilememesi olarak tanımlandı. Hematolojik yanıt elde edilene kadar iki haftada bir, daha sonra üç ayda bir takip yapıldı

3.2.2. Sitogenetik yanıt kriterleri:

Sitogenetik yanıt için kemik iliği aspirasyonda tanı anında, altıncı ayda ve tam sitogenetik yanıt elde edilene kadar altı ayda bir yapıldı. Daha sonra yılda bir kemik iliğinden sitogenetik bakıldı. Sitogenetik yanıt: tam sitogenetik (%0) Ph + metafaz, kısmi sitogenetik (% 1-35) Ph + metafaz, minör sitogenetik (%36-65) Ph + metafaz, minimal sitogenetik (%66-95) Ph + metafaz, sitogenetik yanıt yok \geq %95 Ph + metafaz olarak sınıflandırıldı.

3.2.3. Moleküler yanıt kriterleri

Quantitative veya nested PCR yöntemiyle bcr-abl mRNA'nın ardışık alınan iki örnekte tespit edilememesine tam moleküler yanıt kabul edildi. Major moleküler yanıt ise BCR-ABL: ABL \leq 0,1% uluslararası ölçekte (bcr-abl transkript düzeyinde 3-log azalma) olarak kabul

edildi. Periferik kan örnekleri PCR yöntemiyle çalışıldı. Major moleküler yanıt elde edilene kadar üç ayda bir, daha sonra altı ayda bir moleküler cevaba bakıldı.

3.3. Hastaları izlemde kullanılan laboratuvar yöntemleri

3.3.1 Sitogenetik İnceleme

Hastalardan aspire kemik iliğinden 0,3-0,5 ml alındı ve % 20 fetal bovin serum, 2 Mm L- glutamin ve penisilin (100 U/ml)/streptomisin (100 µg/ml) içeren RPMI 1640 bazal medyumda süspanse edildi. Hafif karıştırıldıktan sonra 37 °C'deki etüvle inkübe edildi. Kültürün 70. saatinde 0,01 ml (10 µg/ml) colcemid ilave edilerek etüvde 2 saatkadar bekletildi. Hücrelere 20 dakika kadar 0,075 M KCL muamele edildikten sonra 1/3 glasiyel asetik asit/ metanol fiksatifinde tıkanı. Fiksasyon işlemi üç kere tekrarlandı. Kromozomlar GTG bantlama tekniğiyle bantlandı ve 20-25 metafaz elde edildi. Kromomal anormallikler 'International System For Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) 1995'e göre rapor edildi.

3.3.2 Moleküler İnceleme

1,5 ml'lik eppendorf tüpüne 1 ml RBC lizis buffer solüsyonu alındı, üzerine 500 µL kan eklendi, elde karıştırıldı. 10 dk karıştırıcıda oda sıcaklığında bekletildi, 2500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi, dipte bir lökosit çökeltisi elde edildi. O çökeltiye dokunmadan üsteki berrak sıvı pipetle toplandı ve atıldı. Lökosit çökeltisi üzerine tekrar 1 ml RBC buffer eklendi, parmakla vurularak çökelti çözüldü. 2500 rpm' de 3 dk santrifüj edildi. Tekrar üsteki sıvı pipetle atıldı, kalan lökosit çökeltisinin üzerine 200 µL pbs (fosfat buffer salin) eklendi ve çökelti süspanse hale getirildi. Böylece 200 µL lökosit süspansiyonu elde edilmiş oldu.

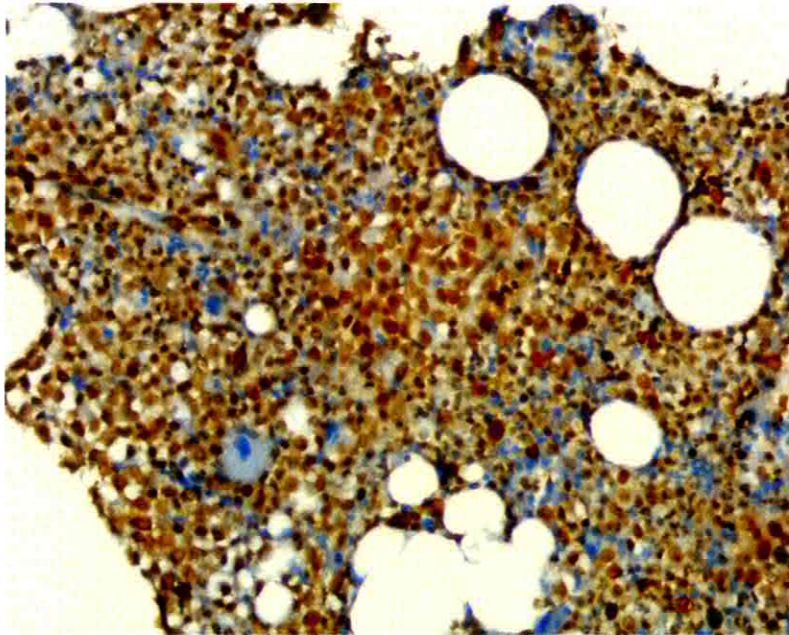
Lökosit süspansiyonu üzerine lysis-binding buffer eklendi ve karıştırıldı. Bu karışım filtreli ve toplama kabı olan başka bir tüpe alındı, 10.000 rpm'de 15 sn santrifüj edildi. Alttaki toplama tüpündeki sıvı döküldü, aynı tüp filtreli tüpe tekrar takıldı. Eppendorf tüpünde 90 µL DNAaz buffer ile 10 µL DNAaz I karışımı hazırlandı ve bu karışım filtreli tüpe eklendi. 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Sonra 500 µL wash-buffer eklendi, 10.000 rpm'de 15 sn santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı döküldü ve tüp tekrar filtreli tüpe takıldı. Sonra 500 µL wash-buffer eklendi ve 10.000 rpm'de 15 sn santrifüj edildi. Altta biriken sıvı döküldü, tüp tekrar filtreli tüpe takıldı. Aynı solüsyondan 200 µL tekrar eklendi. 2 dk maksimum hızda santrifüj edildi, toplama tüpü sıvı ile beraber atıldı. Filtreli tüpe steril 1,5 ml'lik eppendorf tüpü takıldı, 100 µL elution buffer eklendi ve 10.000 rpm'de 1dk santrifüj yapıldı. Filtreli tüp atıldı ve eppendorf tüpünde RNA hazır hale getirildi.

Kitin içinden çıkan üç standart için pozitif kontrol ve hastalar için birer 0,2 ml'lik PCR tüpleri alındı. Bu çalışmalar buz üzerinde yapıldı (+4 dereceye ulaşmak için). Hepsinden 10'ar µL tüplere alındı. Thermocyclerda 65 ° C'de 10 dk kadar bekletildi. cDNA karışım miski hazırlandı (water=4,355 µL, RT buffer=4 µL, Random primer=0,22 µL, Dntp miks=0,4 µL, RNAaz inhibitör= 0,4 µL). Bu mikstden her bir 0,2'lik tüpe 10 µL eklendi, pipetle karıştırıldı ve tekrar thermocyclera götürüldü. PCRprotokolü uygulandı(60 dk-37 °C, 10 dk-65 ° C, 10 dk-4°C). Bu aşamadan sonracDNA elde edilmiş oldu.

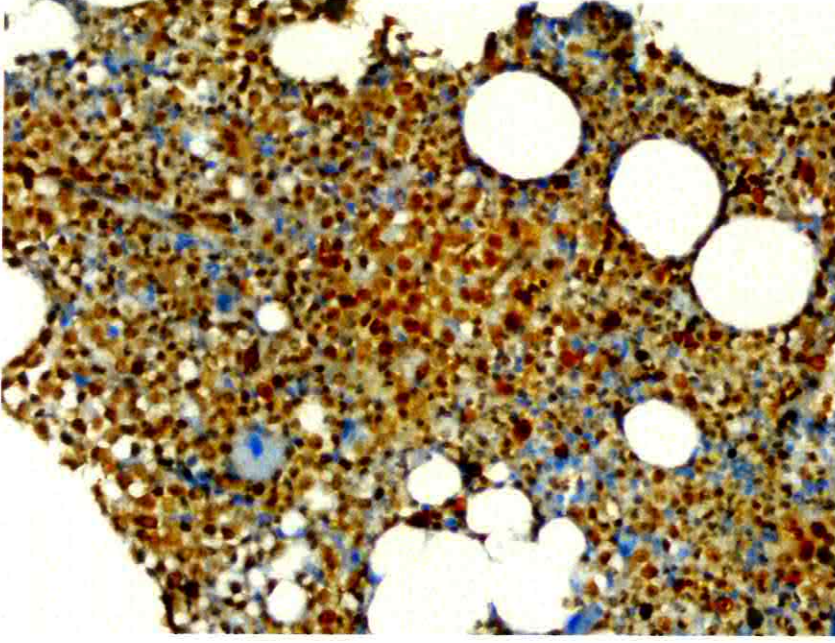
LC için 2 farklı mikst hazırlandı; biri G6PDH miski ve diğeri BCR-ABL miski. Her bir örnek için iki tane LC kapiller tüpü alındı. 5 µL c DNA, ilaveten 15 µL G6PDH ve BCR-ABL alındı. Real Time PCR yöntemiyle çalışan LC cihazına yüklendi çalışma bittikten sonra quantifikasyon analizi yapıldı. Analiz sonrası BCR-ABL değeri olanlar pozitif, olmayanlar negatif kabul edildi. Pozitif olanlara sonuçlar verilirken BCR-ABL değeri G6PDH değerine bölündü. Parametrik verilerin değerlendirilmesinde ortalama ± standart sapma hesaplandı (sd) ve değişkenler bu esasa göre verildi.

3.4.Patolojik inceleme

Olgulara ait trefin biyopsi materyalleri 4-6 saatlik dekalsifikasyon işlemini takiben Gooding –stemaed solüsyonu 24 saatlik %10'luk tamponlanmış nötral formalinde tespit edildi. Tespit edilen dokular gecelik rutin doku takip işleminden geçirilerek parafin blokları hazırlandı (Leica Asp). Parafin bloklardan elde edilen 4-6 mµ'lik kesitlere hemotoksilen eozilen, giemza, gümüş ile histokimyasal ve LMO2 ile primer antikor ile (Santa Cruz Biotechnology, California, USA. Clone 1A9-1, Lot#L1007) immunohistokimyasal çalışma yapıldı. Antikor 1/50 dilue edilerek kullanıldı.Ventana Benchmarc XT otomatik sisitem kullanıldı. Hazırlanan preparatlar çift kör olarak uzman patolog tarafından incelendi. Miyeloid seri hücrelerinin % 30'un üzerinde boyanması pozitif olarak kabul edildi. Eritroit seri ve megakaryositik seri boyanması dışlandı. LMO2 için timüs dokusu pozitif kontrol ve non-immun seum negatif kontrol olarak kullanıldı.



Şekil 5. Miyeloid seride LMO2 primer antikor x 400 avidin straptavidin peroksidaz yönden DAB kromogen



Şekil 6. Miyeloid öncül hücrelerde LMO2 primer antikor x 400 avidin straptavidin peroksidaz yönden DAB kromogen

3.5 İstatiksel Analiz

Çalışmamızda splenomegali, beyaz küre, trombosit ve blast sayısı dağılımları için mann whitney U testi, dağılımları düzenli olmadığından yaş ve hemoglobin için student t testi uygulandı. 6. ve 12. ay sitogenetik yanıtlar ve 18. aydaki majör moleküler yanıt hesaplamalarında Fisher'in kesin testi ve sokal risk skorlaması için eğişimde kıkare testi uygulandı. $P < 0,05$ değerler anlamlı olarak kabul edildi.

SONUÇLAR

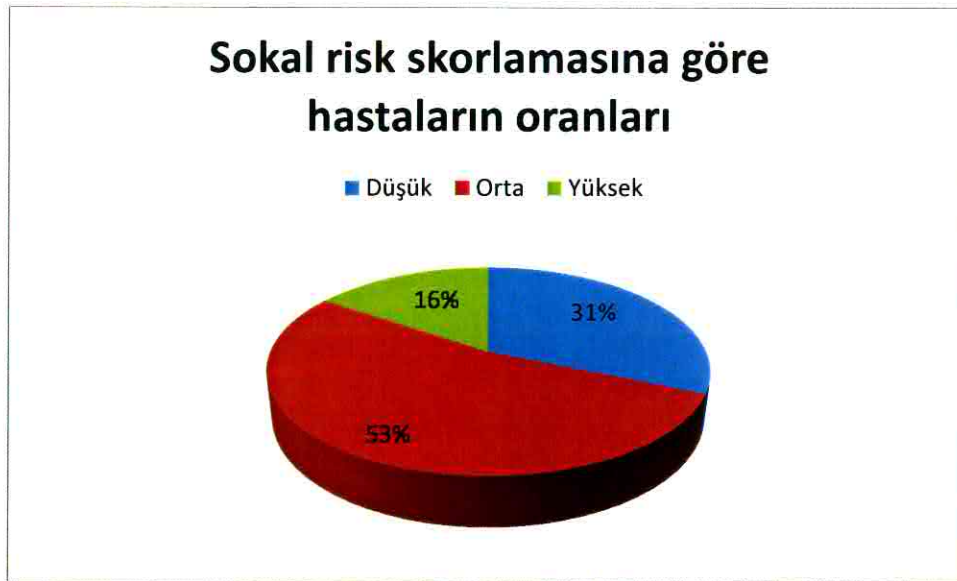
Çalışmaya toplam 32 KML hastası alındı. Hastaların 16'sı (% 50) erkek , 16'i (% 50) kadındı. Hastaların ortalama yaşı $46,88 \pm 15,568$ (21-85) idi. Ortalama izlem süresi 29,4 (12-58) idi. Hastaların tanı anındaki parametre değerleri **tablo V** de özetlenmiştir.

Tablo V. Hastaların tanı anındaki parametre değerleri

Parametre	Minimum	Maximum	Ortalama	Standart Sapma(±)
Yaş	21	85	46,88	15,568
Splenomegali (kotaltı cm)	0	12	3,53	3,193
Beyaz Küre ($\times 10^3 \mu\text{l}$)	14600	378000	111687,50	95213,528
Trombosit ($\times 10^3 \mu\text{l}$)	112000	2140000	527656,25	403470,957
Bazofil (%)	3	30	6,56	4,600
Hemoglobin (gr/dl)	7,0	14,6	11,322	2,0144
Blast (%)	1	10	2,69	2,250

Tanı anında 32 hastanın tamamı kronik fazda idi. Hastaların tümü başlangıç tedavisinde tirozin kinaz inhibitörü olan imatinib kullandı. Hastaların tamamında üçüncü ayda hematolojik cevap elde edildi.

Tanı anında hesaplanan Sokal risk skorlamasına göre en fazla hasta % 53 ile orta risk grubundaydı (Şekil 7).



Şekil 7. Hastaların sokal risk skoruna göre oranları

Hastaların tanı anında alınan kemik iliği biyopsi metaryali LMO2 antikoru ile yapılan immünohistokimyasal çalışmada 20 (%62,5) hastada pozitif, 12 (%37,5) negatif boyandı.

Beyaz küre sayısı ($p=0,059$) , trombosit sayısı ($p=0,697$) , hemoglobin değeri ($p= 0,715$) , blast oranı ($p=0,630$) , ve bazofil oranı ($p= 0,637$) ile LMO2 arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı.

Hastalar sokal skoruna göre düşük, orta, yüksek olarak sınıflandırıldığında hastaların pozitif boyanma oranları sırasıyla % 50,0, 70,6 ve % 60,0 bulundu. Oranlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p= 0,544$) (Tablo VI)

Tablo VI. Sokal risk skoruna göre LMO2 boyanma oranları

Sokal Risk		LMO2		Toplam
		Negatif	Pozitif	
Düşük	Sayı	5	5	10
	%	50,0	50,0	100,0
Orta	Sayı	5	12	17
	%	29,4	70,6	100,0
Yüksek	Sayı	2	3	5
	%	40,0	60,0	100,0
Toplam	Sayı	12	20	32
	%	37,5	62,5	100,0

ELN optimal yanıt kriterlerine göre 6. ayda parsiyel sitogenetik yanıt alınan ve alınmayan hastaların LMO2 proteini ile boyanıp boyanmaması arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p= 0,271$) (Tablo VII)

Tablo VII. 6. ayda sitogenetik yanıt alınan ve alınmayan hastaların LMO2 ile boyanma oranları

Sitogenetik Yanıt(6.ay)		LMO2		Toplam
		Negatif	Pozitif	
Yok	Sayı	0	4	4
	%	0	100,0	100,0
Var	Sayı	12	16	28
	%	42,9	57,1	100,0
Toplam	Sayı	12	20	32
	%	37,5	62,5	100,0

ELN optimal yanıt kriterlerine göre 12. ayda tam sitogenetik yanıt alınan ve alınmayan hastaların pozitif boyanma oranları sırasıyla % 58,3 ve % 60 bulundu. Oranlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p= 0,999$) (Tablo VIII) . Hastalarımızdan üç tanesinde 6. ayın sonunda primer direnç geliştiğinde nilotinibe geçildi. Bu sebeble 12. aydaki sitogenetik

yanıt değerlendirmesine almadık. Bu hastalardan birinde üçüncü ay sonunda tam sitogenetik yanıt, bir hastada parsiyel sitogenetik yanıt alındı, bir hastada cevap alınamadı ve dasatinibe geçildi. Bir hastada o tarihlerde elimizde ikinci jenerasyon tirozin kinaz inhibitörü olmadığından parsiyel sitogenetik yanıt alınmamasına rağmen imatinibe devam edildi.

Tablo VIII. 12. Ayda sitogenetik yanıt alınan ve alınmayan hastaların LMO2 ile boyanma oranları

Sitogenetik Yanıt (12. Ay)	LMO2		Toplam	
	Negatif	Pozitif		
Yok	Sayı	2	3	5
	%	40,0	60,0	100,0
Var	Sayı	10	14	24
	%	41,7	58,3	100,0
Toplam	Sayı	12	17	29
	%	41,4	58,6	100,0

ELN optimal yanıt kriterlerine göre 18. ayda majör moleküler yanıt alınan ve alınmayan hastaların LMO2 ile boyanıp boyanmaması arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p=0,485$) (Tablo IX). Çalışmamız tamamlandığında üç hastamız takibinin onikinci ayın idi ve majör moleküler yanıt elde edilememişti. Üç hastamız takibinin onbeşinci ayında idi. Bir tanesinde majör moleküler yanıt elde edilmişti. Dört hastamızda imatinibe bağlı direnç ve üç hastamızda imatinibe bağlı ilaç toleransı nedeniyle ikinci jenerasyon tirozin kinaz inhibitörüne geçilmişti. İlaç intolerans olan hastaların iki tanesinde majör moleküler yanıt elde edilmişti. Toplam onüç hasta 18. aydaki majör moleküler yanıt hesaplamasına dahil edilmedi.

Tablo IX. 18. Ayda majör moleküler yanıt alınan ve alınmayan hastaların LMO2 ile boyanma oranları

Major Moleküler Yanıt 18. ay	LMO2		Toplam	
	Negatif	Pozitif		
Yok	Sayı	0	2	2
	%	0	100,0	100,0
Var	Sayı	8	9	17
	%	47,1	52,9	100,0
Total	Sayı	8	11	19
	%	42,1	57,9	100,0

TARTIŞMA

LMO2 hematopoezide tüm öncü hücrelerin gelişiminde rol alır (113). İşlevini hücrelerin nükleusunda gerçekleştirir. LMO2 eritrosit ve miyeloid öncül hücrelerde bulunurken eritrositler ve nötrofil gibi olgun hücrelerde bulunmaz (106). LMO2 ile ilgili ilk çalışma T hücreli lösemi hastalarında yapılmıştır. Özellikle t(11;14)(p13;q11) ve t(7;11)(q35;p13) translokasyonu olan hastalarda onkojenik faktör olduğu gösterilmiştir (115).

Bcr/abl KML hastalarında tirozin kinaz aktivitesini artırarak hücre içinde sinyal iletiminde artışa neden olur. Bunun sonucu olarak hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşması artar. Kemik iliği ve periferik kandan yapılan hücre kültürü çalışmalarında eritrosit, megakaryositik ve granülositik serinin öncü hücrelerindeki tirozin kinaza bağlı onkojenik aktivitenin imatinib tarafında inhibe edildiği tespit edilmiştir (116) .

LMO2 T hücreli lösemi hastalarında oncojenik aktivitesi olduğu bilinmektedir. Büyük ihtimalle LMO2 proteini KML hastalarında sinyal ileti sisiteminde artışa neden olmaktadır. Bu sinerjik aktivite artışının imatinib veya diğer tirozin kinazlar tarafından inhibe edilip edilmediği henüz araştırmalarda test edilmemiştir. Bu varsayım ileriki yıllarda araştırılacak konulardan biri olacağı düşünülmektedir.

KML hastalarında imatinibe bağlı tedavi yanıtı farklılık göstermektedir. Bir kısım hastada sitogenetik ve moleküler yanıt tedaviye rağmen elde edilememektedir. KML hastalarının tedavisinde devrim yapan IRIS çalışmasında 8 yıllık takipte hastaların %55'nin imatinib kullanmaya devam ettiği bildirilmiştir. Diğer hastalar tedaviyi bırakmıştır. Bu hastaların % 16'sı yanıt alınmadığından, % 6'sı ilaça bağlı yan etki yüzünden, % 3'ü transplanta ihtiyaç duyulduğundan, % 3'ü öldüğünden ve % 17'si diğer nedenlerden dolayı tedaviyi bıraktığı tespit edilmiştir (118). Bu nedenle hematolojik, sitogenetik ve moleküler yanıtı etkileyen faktörleri bulmak için çalışmalar halen devam etmektedir. Tedavi yanıtını etkileyen sebeblereden biride transkripsiyon faktörleridir. LMO2'de bir transkripsiyon faktörüdür. LMO2'nin etkisi lenfoid ve myeloid malignensilerde araştırılmıştır. Fakat literatürde KML hastalarında LM02 ile sitogenetik ve moleküler yanıt arasındaki ilişkiyi gösterecek çalışma bulunmamaktadır.

Hematolojik lenfoid malignensilerden olan akut lenfoblastik lösemi hastalarında yapılan çalışmada LMO2 proteinin prognostik önemi olup olmadığına bakılmış. 247 B hücreli akut lenfoblastik lösemi (ALL) hastasında tedavi öncesi alınan kemik iliği örneğinde PCR yöntemiyle LMO2 çalışılmış. Sonuçta LMO2 protein artışı olan normal karyotipili genç hastalarda ortalama yaşamın daha iyi olduğu bildirilmiştir (119). Cobanoğlu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise immunohistokimyasal yöntemle tedavi öncesi 22 B hücreli ALL ve 57 Akut miyelositer lösemi (AML) hastasının kemik iliği biyopsilerinde LMO2 proteini çalışılmış. B hücreli ALL ve AML hastalarında LMO2 proteini artışının ortalama yaşam süresini etkilemediğini bildirdiler (122). Fakat her iki çalışma incelendiğinde LMO2'nin tedavi yanıtı üzerine etkisi çalışılmadığı görülmektedir. Literatürde LMO2'nin akut myeloid malignenesilerde tedavi üzerine etkisi Meng ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada bildirilmektedir. 51 AML hastasında remisyona girmeyenlerin % 51'inde LMO2 proteinin aşırı exprese ettiğini bildirdiler (123).

Bir diğer hematolojik lenfoid malignensilerden olan diffüz büyük B hücreli lenfoma (DBBHL) hastalarında Natkunam ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada R-CHOP (Ritüksimab-Siklofosfamid, Adriablastina, Vincristin, Prednol) veya CHOP kemoterapisi alan hastaların tanı anındaki doku biyopsilerinde immunohistokimyasal yöntemle LMO2 proteini araştırılmış. Sonuç olarak LMO2 protein artışı olanlarda ortalama yaşam süresi ve hastaliksız yaşam süresinin anlamlı derecede daha iyi olduğunu bildirilmiştir. Ritüksimab ilavesinin anlamlı bir değişik yapmadığı ve her iki tedavi kolunda aynı sonuçların alındığı tespit edilmiştir (121).

Sonmez ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada tanı anında yapılan kemik iliği biyopsi metaryallerine immunohistokimyasal yöntemle LMO2 proteini çalışılmış. İmatinible tedavi edilen KML hastalarında LMO2 aşırı eksprese edenlerde hematolojik remisyona ve ortalama yaşam süresinin daha iyi olduğu bildirmişlerdir (124). Bu çalışmada sitogenetik ve moleküler yanıt ile LMO2 proteini ilişkisi araştırılmamıştır.

Çalışmamızda sitogenetik ve moleküler yanıtları değerlendirirken ELN kriterlerini esas aldık. Bu kriterlere göre optimal yanıt 6. ayda parsiyel sitogenetik yanıt , 12. ayda tam sitogenetik ve 18. ayda majör moleküler yanıt elde edilmesidir. LMO2 proteini ile altıncı, onikinci ayda sitogenetik yanıt ve onsekizinci ayda majör moleküler yanıt arasında anlamlı ilişki bulamadık. KML hastalarında yapılan çalışmalarda sitogenetik ve majör moleküler yanıt ile LMO2 arasında ilişki araştırılmadığında sonuçlarımızı literatürle karşılaştıramadık. Bu nedenle bu çalışmamız imatinib kullanan KML hastalarında sitogenetik ve moleküler yanıt ile LMO2 protein arasındaki ilişkiyi inceleyen literatürdeki ilk çalışmadır.

Literatürde çalışmamıza benzer nitelikte olan Liu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada diğer transkriptik faktör olan JunB tedavi öncesi ve sonrası PCR yöntemiyle düzeyi ölçüldüğünde tedavi sonrası JunB artışı olan hastalarda 6. ayda sitogenetik ve moleküler yanıtın daha iyi olduğu gösterildi (125).

Sonuç olarak; LMO2, KML hastalarında öncül hücrelerde bulunan proteindir. Lenfoid ve myeloid malignensi hastalarında yapılan çalışmaların bazılarında LMO2 protein artışı olan hastalarda ortalama yaşam sürelerinin daha iyi olduğu bildirilmiştir. Birkaç yayında ilişki olmadığı bildirilmektedir. Biz de myeloid malignensi sınıfından olan KML hastalarında sitogenetik ve moleküler yanıt ile LMO2 protein arasında ilişkiye baktık. Anlamlı bir ilişki bulamadık. Yayınlanan çalışmalarda LMO2 protein artışı ile ilgili çelişkili durumu açıklığa kavuşturmak için geniş serili yayınlara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Fialkow, P.J., R.J. Jacobson, and T. Papayannopoulou, Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. *Am J Med*, 1977; 63(1): 125-30
2. Neumann E: Ueber myelogene leukemia. *Berl Klin Wochenschr* 1878; 15:69
3. Nowell PC, Hungerford DA: A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *J Natl Cancer Inst* 1960; 25:85-109
4. Rowley JD: A new consistent abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining. *Nature* 1973; 243:290-93
5. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, et al: Effect of selective inhibitor of the ABL tyrosin kinase in the growth of BCR-ABL positive cells. *Nat Med* 1996 ;2:561-66
6. Readelli A, Bell C, Casagrande j, et al: Clinical and epidemiologic burden of chronic myelogenous leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther* 2004;4:85-96
7. Wetzler, M., Byrd JC, Bloomfield CD. Acute and Chronic Myeloid Leukemia. In: Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Jameson JL (eds). *Harrison's Principles of Medicine*. Sixteenth ed: McGraw-Hill. 2005: 631-41.
8. Ichimaru M, Ichimaru T, Belsky JL : Incidence of leukemia in atomic bomb survivors belonging to a fixed cohort in Hiroshima and Naagasaki 1950- 1971, *J Radiat Res* 1978; 19: 262-82
9. Court Brown WM, Doll R, Adult leukemia. *Br Med* 1960;1:1753-59
10. Spiers ASD, Bain BJ, Turner JE: The peripheral blood in chronic granulocytic leukemia: A study of 50 untreated Philadelphia positive cases. *Scand J Haematol* 1977;18: 25-38
11. Sandberg AA: The leukemias: The Philadelphia chromosome .in *The Chromosomes in Human Cancer and Leukemia*. 1990; 2nd ed, 183
12. Leibowitz D, Schaefer-Regon K, Popenoe DW, et al: Variable breakpoints on the Philadelphia chromosome in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1985;66:243-45
13. Ghaffari S, Dougherty GJ, Lansdorp PM, et al: Differentiation associated changes in CD44 isoform expression during normal hematopoiesis and their alteration in chronic myeloid leukemia . *Blood* 1995; 86: 2976- 85
14. Turkina AG, Baryshnikov AY, Sedyakhina NP et al: Studies of P glycoprotein in chronic myelogenous leukemia patients. Expression , activity and correlations with CD34 antigen. *Br J Haematol* 1996; 92:88-96

15. Agarwal R, Doren S, Hick B, Dunber CE: Long term culture of chronic myelogenous leukemia marrow cell on stem cell factor-deficient stroma favors benign progenitors. *Blood* 1995; 85: 1306-12
16. Murohashi I, Endho K, Nishida S, et al: Differential effects of TGF-Beta 1 on normal and leukemic human hematopoietic cell proliferation. *Exp Hematol* 1995; 23:970-77
17. Daley GQ, Beu Neriah Y: Implicating the bcr/abl gene in the pathogenesis of Philadelphia chromosome positive human leukemia. *Adv Cancer Res* 1991; 57:151-84
18. Heisterkamp N, Groffen J, Stephenson JR, et al: Localization of the c-abl oncogene adjacent to a translocation breakpoint in chronic myelocytic leukemia. *Nature* 1983;306: 239-42
19. Ben-Neriah Y, D Ben-Neriah Y, Daley GQ, Mes-Masson A-M, et al : The chronic myelogenous leukemia –specific p210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science* 1985; 233: 212
20. Shtivelman E, Gale RP, Dreazen O, et al: Bcr-abl RNA in patients with chronic granulocytic leukemia. *Blood* 1987 ; 69,971-73
21. Lydon, N.B. and B.J. Druker, Lessons learned from the development of imatinib. *Leuk Res*, 2004;1: 29-38.
22. Verscharen CF, Kantarjan HM, Hirsch – Ginsberg C, et al: The breakpoint cluster region site in patients with Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia. Clinical , laboratory, and prognostic correlations. *Cancer* 1995;76: 992-97
23. Saglio G, Pane F, Gottardi E, et al: Consistent amounts of acute leukemia associated p190 bcr/abl transcripts are expressed by chronic myelogenous leukemia patients at diagnosis. *Blood* 1996; 87: 1075-80
24. Rozman C, Urbano- Ispizua A, Cervantes M, et al: Analysis of the clinical relevance of the breakpoint location within M-BCR and the type of chimeric m RNA in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* 1995; 9: 1104-7
25. Goldman, J.M. and J.V. Melo, Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med*, 2003; 349(15): 1451-64
26. Skorski T, Kanakaraj P, Nieborowska –Skorska M, et al: Phosphatidylinositol 3- kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome positive cells. *Blood* 1995;86:726-36
27. Skorski T, Nieborowska Skorska M, Szczlik C, et al: C-RAF-1 serine/ threonine kinase is required in BCR/ ABL dependent and normal hematopoiesis. *Cancer Res*1995 ; 55:2275-8
28. Saglia R, Sattler M, Pisick E, et al: P210 BCR/ABL induce formation of complexes containing focal adhesion proteins and the protooncogene product p120-cbl. *Exp Hematol* 1996; 24:310

29. Chai SK, Nichols GL, Rothman P: Constitutive activation of JAKs and STATs in BCR-abl expressing cell lines and peripheral blood cells derived from leukemic patients. *J Immunol* 1997;159: 4720-8
30. Gotoh A, Broxmeyer HE: The function of BCR/ ABL and related proto-onkogenes. *Curr Opin Hematol* 1997; 4:3-11
31. Thompson RB, Stainsby D: The clinical ve haematological features of chronic granulocytic leukaemia in chronic phase in *Chronic Granulocytic Leukaemia* , 1982 ;137
32. Cortes JE, Talpaz M, Kantarkian H : Chronic myelogenous leukemia: A review. *Am j Med* 1996; 100:555-70
33. Goldman JM: Chronic myeloid leukomia. *Curr Opin Hematol* 1997; 4: 277-85
34. Rowe JM, Lichtman MA : Hyperleukocytosis and leukostasis: Common features of childhood chronic myelogenous leukomia *Blood* 1984; 63:1230-4
35. Lichtman MA, Rome JM: Hyperleukocytic leukemias: rheological, clinical, and therapeutic considerations. *Blood* 1982; 60: 279-83
36. Brydon j, Lucky PA, Duffy T: Acne urticaria associated with chronic myeleogenous leukema. *Cancer* 1985; 56: 2083-6
37. Lopez JLB, Fonseca E, Mausio F: Sweet's syndrome during the chorinic phase of chronic myeloidleukomia. *Acta Haematol* 1990; 84:207
38. Arbaje YM, Betran G: Chronic myelogenous leukomia conlicated by autoimmune hemolytic anemia. *Am j Med* 1990; 88:197-9
39. Velardi A, Rambotti P, Cernetti C, et all: Monoclonal antibody defined T-cell phenotypes and phytohemagglutinin reactivity of E- rosette forming circulating lyphocytes from untreated chronic myelocyte leukomia patients. *Cancer* 1984; 53:913-6
40. Dowding C, Th'ng KH, Goldman JM, Galton DAG : Increased T –lymphocytes numbers in chronic granulocytes in the spleen chronic granulocytic leukomia before treatment. *Exp Hematol* 1984; 12:811-15
41. Fujimiya Y, Chang WC, Bakke A, et all: Natural killer cell immunodeficiency in patients with chronic myelogenous leukomia, *Cancer Immunol Immunother* 1987; 24:213-20
42. Mason JE, DeVita VT, Canellos GP: Thrombocytosis in chronic granülocytic leukomia: Incidence ve clinical significance. *Blood* 1974; 44:483-7
43. Lorand-Metze I, Vassalo J, Souza CA: Histological and cytological heterogeneity of bone marrow in Philadelphia –positive chronic myelogenous leukomia at diagnosis. *Br j Haematol* 1987;67: 45-9

44. Dezmezian R, k antarjian HM, Keating MJ, et al: The relevance of reticulin stain-measured fibrosis at diagnosis in chronic myelogenous leukomia. *Cancer* 1987; 59 :1739-43
45. Kearney L, Orchard KH, Hibbin JA, Goldman JM: T- cell cytogenetics in chronic granulocytic leukaemia . *Lancet* 1981; 1:858
46. Bartam CR, Raghavachar A, Anger B, et al: T lymphocytes lack rearrangement of the bcr gene in Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1967; 69:1682-5
47. Heim S, Billstrom R, Kristoffersson U, et al: Variant Ph translocations in chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1985;18:215-27
48. Lange W, Snyder DS, Castro R, et al: Detection by enzymatic amplification of bcr-abl mRNA peripheral blood and bone marrow cells of patient with chronic myelogenous leukomia . *Blood* 1989;73:1735-41
49. Stoc W, Westbrook CA, Peterson B, et al: Value of moleküler monitoring during the treatment of chronic myeloid leukomia: A Cancer and Leukomia Group B study. *J Clin Oncol* 1997;15:26-36
50. Dewald GW, Schad CR, Christensen ER, et al: The application of in situ flourescent hybridization to detect M bcr/ abl fusion in variant Ph chromosomes in CML and ALL. *Cancer Genetik Cytogenet* 1993;71:7-14
51. Chase A, Grand F, Zhang JG, et al: Factors influencing the false positive and negative rates of BCR-ABL fluorecence in situ hybridization. *Genes Chromosomes CANCER* 1997;18:246-53
52. Krackoff IH: Studies o ürik acid biosynthesis in chronic leukomias. *Arthritis Rheum* 1965; 8:772-9
53. Rosner F, Schreiber ZA : Serum vitamin B12 and vitamin B12 binding capacity in chronic myelogenous leukomia and other disorders. *Am J Med Sci* 1972; 263: 473-80
54. Agis H, Speer WR, Herndlhofer S, et al: Clinical and prognostic significance of histamine monitoring in patients with CML during treatment with imatinib (STI571) . *Ann Oncol* 2007; 18:1834-41
55. Gomez GA, Sokal JE, Walsh D: Prognostic features at diagnosis of chronic myelocytic leukomia. *Cancer* 1981; 47:2740-7
56. Bellevue R, Dosik H, Spergel G, Gussoff BD: Pseudohyperkalemia and extreme leukocytosis . *J Lab Clin Med* 1975; 85:660
57. Hsu H-C, Tan L-Y, Au L-C, et al : Detection of bcr/abl gene expression at a low level in blood cells of some patients with essantial thrombocythemia. *J lab Clin Med* 2004; 143:125-9

58. Lucia E, Martino B, Mammi C, et al: The incidence of JAK2 V617F mutation in bcr/ abl negativ chronic myeloproliferatif disorders. Assessment by two different detection methods . Leuk Lyphoma 2008; 49 (10):1907-15
59. Lichtman MA, Rowe JM : Hyperleukocytic leukemias : Rheological , clinical and therapeutic considerations. Blood 1982; 60:279-83
60. Bazatbashi MS, Smith MR, Karanes C, et al: Successful management of Ph chromosome chronic myelogenous leukomia with leukapheresis during pregnancy. Am J Heamatol 1991; 38:235-7
61. Kennedy BJ: The evolution of hidroxyurea therapy in chronic myelogenous leukemia .Semin Oncol 1992; 19(9): 21-6
62. Savage, D.G. and K.H. Antman, Imatinib mesylate--a new oral targeted therapy. N Engl J Med, 2002; 346(9): 683-93
63. De Lavallade H, Apperley JK, Khorashad JS, et al: İmatinib for newly diagnosed patients with chronic myeloid leukomia. İncidence of susutained responses in an intention to treat analysis. JCO Oncol 2008; 26: 3358-63
64. Marin D, Markel S, Foot N, et al: Granulocyte colony –stimulating factor revers cytopenia and may permit cytogenetic responses in patients with chronic myeloid leukomia treated with imatinib mesylate. Haematologica 2003; 88:227-9
65. Hensly ML, Ford JM: İmatinib treatment : Specific issues related to safety , fertility and pregnancy . Semin Hematol 2003; 40:21-5
66. Sanchez- Gonzalez B, Pascual –Ramirez JC, Fernandez –Abellian P, et al:Severe skin reaction to imatinib in case of Philadelphia- positivr acut lymphoblastic leukomia. Blood 2003; 101:2446
67. Rule SAJ, O’Brien SG, Crossman LC: Managing cutaneous reactions to imatinib therapy . Blood 2002;100:3434
68. Nelson RP Jr, Cornetta K, Ward KE. et all. Desensitization to imatinib in patients with leukomia. Ann Allergy Asthma Immunol 2006; 97: 216-22
69. Baccarani M, Cortes J, Pane F, et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. J Clin Oncol. 2009;27(35) :6041-51
69. NCCN Practice Guidelines in Oncology v.3. 2008. Available at:[www.nccn.org / professionsals / physician_gls/](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/).
70. Kantarjian H, Talpaz M, O’Brien S, et al: Prediction of initial cytogenetic response for subsequent majör and complete cytogenetic response to imatinib mesylate therapy in patients with hiladelphia chromosome –positive chronic myelogenous leukemia . Cancer 2003; 97(9): 2225-8

71. Jabbour E, Kantarjian HM, Abruzzo LV et al: Chromosomal abnormalities in Philadelphia chromosome negative metaphases appearing during imatinib mesylate therapy in patient with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Blood* 2007; 110: 2991-5
72. Cortes JE, Talpaz M, Giles F, et al: Prognostic significance of cytogenetic clonal evolution in patient with chronic myelogenous leukemia on imatinib mesylate therapy. *Blood* 2003; 101 : 3794-800
71. Campbell LJ, Patsouris C, Rayeroux KC, et al : BCR –ABL amplification in chronic myelocytic leukemia blast crisis following imatinib mesylate administration. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; 139: 30-3
72. Illmer T, Schaich M, Platzbecker U, et al: P-glycoprotein mediated drug efflux is a resistance mechanism of chronic myelogenous leukemia cell to treatment with imatinib mesylate. *Leukemia* 2004;18: 401-8
73. Weisberg E, Griffin JD : Resistance to imatinib (Glivec) : Update on clinical mechanism. *Drug Resist Updat* 2003;6: 231-8
74. Donat NJ , Wu JY, Stapley J, et al : BCR/ ABL amplification in chronic myelocytic leukemia blast crisis following imatinib mesylate administration . *Cancer Genet Cytogenet* 2002 ;139 :30
75. White DL, Saunders VA, Dang P, et al: OCT-1 mediated influx is a key determinant of the intracellular uptake of imatinib but not nilotinib (AMN107) : Reduced OCT-1 activity is cause of low in vitro sensitivity to imatinib . *Blood* 2006;108: 697-704
76. Ossard –Receveur A, Brenheim A, Clause B, et al: Duplication of the Ph-chromosome as a possible mechanism of resistance to imatinib mesylate in patient with chronic myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;163: 189-90
77. Szych CM, Liesveld JL, Iqbal MA, et al: Isodicentric Philadelphia chromosome in imatinib mesylate (glivec) resistant patients. *Cancer Genet Cytogenet* 2007;174 : 132-7
78. Soverini S, Colarossi S, Gnani A, et al: Contribution of ABL kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of Philadelphia positive patients. By the GIMEMA working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res* 2006; 12:7374-9
79. Brandford S, Rudzki Z, Walsh S, et al : Detection of BCR-ABL mutations in patient with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance and mutations in the ATP phosphate-binding loop(P-loop) are associated with poor prognosis. *Blood* 2003;102, 267
80. Pocaly M, Lagarde V, Etienne G, et al: Overexpression of the heat –shock protein 70 is associated to imatinib resistance in chronic myeloid leukemia . *Leukemia* 2007; 21: 93-101
81. Hochhaus A, Erben P, Ernst T, Mueller MC : Resistance to targeted therapy in chronic myelogenous leukemia. *Semin Hematol* 2007; 44:15-24

82. Feller SM, Tuchscherer G, Voss J : High affinity molecular disruption of GRB2 protein complexes as a therapeutic strategy for chronic myelogenous leukemia . *Leuk lymphoma* 2003; 44:411-427
83. Ohno R, Namukara Y: Prediction of response to imatinib by cDNA microarray analysis. *Semin Hematol* 2003; 40: 42
84. Cortes J, Kantarjian H: Beyond disease escalation : Clinical options for relapse or resistance in chronic myelogenous leukemia . *J Natl Compr Canc Netw* 2008; 6(2):22
85. Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, et al: Dasatinib in imatinib resistant Philadelphia chromosome- positive leukemias. *N Engl J Med* 2006; 354: 2531-41
86. Martinelli G, Soverini S, Rosti G, Baccarani M : Dual tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2005; 19: 1872-9
87. Shah NP, Kantarjian HM, Kim DW, et al: Intermittent target inhibition with dasatinib 100 mg once Daily preserves efficacy and improves tolerability in imatinib –resistant and intolerant chronic phase chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2008;26: 3204-12
88. Porkka K, Konkensrva P, Lundan T, et al: Dasatinib crosses the blood brain barrier and is an efficient therapy for central nervous system Philadelphia chromosome positive leukemia. *Blood* 2008;112: 1005-12
89. Gelomovic M, Verstovsek S, Giles F, et al: AMN107 , a novel amino pyridine inhibitor of Bcr- abl, has in vitro activity against imatinib resistant chronic myeloid leukemia *Clin Cancer Res* 2005; 11:4941-7
90. Hazarika M, Jiang X, Liu Q, et al : Tasigna for chronic and accelerated phase Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia resistant to or intolerant of imatinib . *Clin Cancer Res* 2008 ;14: 5325-31
91. Druker BJ: Imatinib as paradigm of targeted therapies . *J Clin Oncol* 2003; 21: 239-245
92. Druker BJ: STI571 (Gleevec) as a paradigm for cancer therapy . *Trend Mol Med* 2002; 8: 14
93. Jabbour E, Deininger M, Hochhaus A. Management of adverse events associated with tyrosine kinase inhibitors in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2011;25:201-10
93. Wagner H, McKeough PG, Desforges J, Madoc Jones H: Splenic irradiation in the treatment of patient with chronic myelogenous leukemia or myelofibrosis and myeloid metaplasia . *Cancer* 1986; 58: 1204-7
94. Messa RA, Elliot MA, Tefferi A: Splenectomy in chronic myeloid leukemia and myelofibrosis with myeloid metaplasia . *Blood Rev* 2000;14:121-9

95. Hasford J, Pffirmann M, Hehlmann R, et al: Prognosis and prognostic factors for patients with chronic myeloid leukemia : Nontransplant therapy . *Semin Hematol* 2003;40:4-12
96. Usman M, Syed NN, Kaketopo GN, et al: Chronic phase Chronic myeloid leukemia : Response of imatinib mesylate and significance of Sokal score , age and disease duration in predicting in hematological and cytogenetic response . *J Assoc Physicians India* 2007;55:103-7
97. Giles FJ, Cortes JE, Kantarjian HM, O'Brien S :Accelerated and blastic phase of chronic myelogenous leukemia, *Hematol Oncol Clin North Am* 2004;18: 753-74
98. Mello JV, Barnes DJ: Chronic myeloid leukemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 441-53
99. Brazma D, Grace C, Howard J, et al: Genomic profile of chronic myelogenous leukemia. Imbalances associated with disease progression . *Gene Chromosomes Cancer* 2007; 46: 1039-50
100. Cortes J, O'Dwyer ME: Clonal evolution in chronic myelogenous leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2004;18:671-84
101. Spiers ASD: Metamorphosis of chronic granulocytic leukemia : Diagnosis, classification and management . *Br j Haematol* 1979; 49:1-7
102. Matsuo T, Tomonaga M, Kuriyama K, et al: Prognostic significance of the morphological dysplastic changes in chronic myelogenous leukemia . *Leu Res* 1986; 10:331-7
103. Shah NP : Advanced CML : Therapeutic options for patients accelerated and blast phases. *J Natl Compr Can Netw* . 2008; 6: 31
104. Barone S, Baer MR, Sait SNJ, et al: High dose cytosine arabinoside and idarubicin treatment of chronic myeloid leukemia in myeloid blast crisis. *Am J Hematol* 2001; 67: 119-24
105. Uike N, Takeichi N, Kimura N, et al: Dual arrangement of immunoglobulin and T cell receptor genes in blast crisis of CML. *Eur J Haematol* 1989;42:460-5
106. Bach I. The LIM domain: regulation by association. *Mech Dev* 2000; 91: 5-17
107. Dawid, I.B., Toyama, R., Taira, M. LIM domain proteins. *C. R.Acad. Sci. III* 1995;318: 295-306.
108. El Omari K, Hoosdally SJ, Tuladhar et al:Structure of the leukemia oncogene LMO2: implications for the assembly of a hematopoietic transcription factor complex. *Blood* 2011; 117: 2146-56

109. Wadman IA, Osada H, Gruetz GG et al. The LIM-only protein LMO2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *EMBO J* 1997; 16: 3145–3157
110. Larson, R.C., Lavenir, I., Larson, T.A., Baer, R., Warren, A.J., Wadman, I., Nottage, K., Rabbitts, T.H. Protein dimerization between Lmo2 (RBTN2) and Tal1 alters thymocyte development and potentiates T cell tumorigenesis in transgenic mice. *EMBO J*. 1996; 15:1021-1027
111. Larson, R.C., Osada, H., Larson, T.A., Lavenir, I., Rabbitts, T.H. The oncogenic LIM protein Rbtn2 causes thymic developmental aberrations that precede malignancy in transgenic mice. *Oncogene* 1995; 11: 853- 862
112. Warren, A.J., Colledge, W.H., Carlton, M.B., Evans, M.J., Smith, A.J., Rabbitts, T.H.,. The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein rbtn2 is essential for erythroid development. *Cell* 1994; 78: 45-57
113. Yamada, Y., Warren, A.W., Dobson, C., Forster, A., Pannell, R., Rabbitts, T.H. The T cell leukemia LIM protein Lmo2 is necessary for adult mouse hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 3890-3895
114. Dong WF, Billia F, Atkins HL, Iscove NN, Minden MD. Expression of rhombotin 2 in normal and leukaemic haemopoietic cells. *Br J Haematol* 1996; 93: 280–286.
115. Rabbitts TH. LMO T-cell translocation oncogenes typify genes activated by chromosomal translocations that alter transcription and developmental processes. *Genes Dev* 1998; 12: 2651–2657
116. Natkunam Y, Farinha P, Hsi ED et al. LMO2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy with and without rituximab. *J Clin Oncol* 2008; 26: 447–454.
117. Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 172-183
118. 1. Deininger M, O'Brien SG, et al. 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 (ASH Annual Meeting Abstract 1126)
- 119 Malumbres R, Fresquet V, Roman-Gomez J et al. LMO2 expression reflects the different stages of blast maturation and genetic features in B-cell acute lymphoblastic leukemia and predicts clinical outcome. *Haematologica*. 2011; 96 :980-6

120. Baecklund E, Backlin C, Mansouri M. LMO2 protein expression predicts survival in patients with rheumatoid arthritis and diffuse large B cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2011 ; 52:1146-9
121. Natkunam Y, Farinha P, Hsi ED., et al. LMO2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy with and without rituximab. *J Clin Oncol*. 2008;26:447-54.
122. Cobanoğlu U., Sonmez M., Ozbas H. M., Ergut N., Can G. The expression of LMO2 protein in acute B-cell and myeloid leukemia. *Hematology*. 2010; 15: 132-4
123. Meng YS, Wei R, Ai GW, Meng XQ, Zhang YX. Abnormal expression of transcription factors LYL1 and LMO2 and interaction between them in myeloid leukemia. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2009 ;89:890-3.
124. Sonmez M., Akagun T., Cobanoglu U et al. Effect of LMO2 protein expression on survival in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib mesylate. *Hematology* .2009 ;14: 220-3
125. Liu YC, Hsiao HH, Chang JG et al. Usefulness of quantitative assessment of JunB gene expression as a marker for monitoring chronic myeloid leukemia patients undergoing imatinib therapy. *Int J Hematol*. 2006 ;84:425-31.

