



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KRONİK MİYELOİD LÖSEMİDE TEDAVİ DİRENCİ İLE İLİŞKİLİ
GEN EKSPRESYON PROFİLİ VE TELOMER UZUNLUĞU
ARASINDAKİ İLİŞKİ**

BETÜL KOÇKAN
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
PROF. DR. MUSTAFA AKKİPRİK
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL- 2025



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KRONİK MİYELOİD LÖSEMİDE TEDAVİ DİRENCİ İLE İLİŞKİLİ
GEN EKSPRESYON PROFİLİ VE TELOMER UZUNLUĞU
ARASINDAKİ İLİŞKİ**

BETÜL KOÇKAN
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
PROF. DR. MUSTAFA AKKİPRİK
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL- 2025

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 çalışması ile elde edilmemiş 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 KOÇKAN

TEŞEKKÜR

Eğitim dönemimin her sürecine bilimsel tecrübesi, doğru yönlendirmeleri, örnek kişiliği, ilgi ve anlayışı ile destek olan sayın danışman hocam Prof. Dr. Mustafa AKKİPRİK'e,

Öğrenciliğim boyunca kıymetli bilgilerinden istifade ettiğim sayın hocam Prof. Dr. Ayşe ÖZER'e,

Eğitim sürecime değer katan sayın hocalarım Prof. Dr. Ahmet İlter GÜNEY'e, Prof. Dr. Fatih EREN'e ve Dr. Öğr. Üyesi Can ERZİK'e,

Çalışma örneklerini ve hastaların klinik verilerini temin etmemde verdiği destekten dolayı Prof. Dr. Tayfur TOPTAŞ'a,

Tezimin deney aşamasında ve istatistiksel analizlerde akademik tecrübesi ve güven veren desteğiyle yol gösteren Dr. Öğr. Üyesi Gökçe Güllü AMURAN'a,

Tezimle ilgili sorduğum sorulara her zaman içtenlikle cevap veren Dr. Öğr. Üyesi İrem Peker EYÜBOĞLU'na, deneylerim boyunca desteğini esirgemeyen Arş. Gör. Büşra POLAT'a, laboratuvar ortamını güzelleştiren Tıbbi Biyolog Serap SEVİL ŞAHİN'e,

Gönüllü olarak çalışmaya katılmayı kabul eden tüm hasta ve kontrol grubundaki katılımcılara, Dürüstlük, erdem, fedakârlık, sevgi ve anlayış kavramlarını yaşamlarıyla bana öğreten, eğitim sürecimin esas kahramanları olan anneme ve babama, sevgili ablama, tez yazma sürecime neşe katan minik yeğenim Berat'a,

Varlıkları ile beni motive eden ve sevgileri ile kalbimi dolduran dostlarıma, üzerimde emeği olan tüm sevdiklerime sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından Kronik Miyeloid Lösemide Tedavi Direnci ile İlişkili Gen Ekspresyon Profili ve Telomer Uzunluğu arasındaki ilişki başlıklı ve SAG-C-DRP-250919-0293 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR LİSTESİ	i
ŞEKİL LİSTESİ	iv
TABLO LİSTESİ.....	vi
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. KML ve Tarihçesi.....	5
4.2. KML Epidemiyolojisi.....	5
4.3. KML Biyolojisi	6
4.3.1. KML'nin Moleküler Patogenezi	6
4.3.2 KML’de Mutasyonlar	7
4.3.3. KML’de Ek Kromozomal Anomaliler (ACA)	9
4.4. KML Belirtileri.....	12
4.5. KML’de Tanı	12
4.5.1. Avrupa Lösemi Ağı (ELN) ve Tanı Kriterleri.....	12
4.5.2. KML Tanısında İlk İşlemler	13
4.5.3. KML’de Prognostik Faktörler	14
4.5.4. KML Tanısında PCR Yöntemi	14
4.5.5. KML Tanısında Sanger Dizileme.....	15
4.5.6. KML Tanısında Yeni Nesil Dizileme (NGS).....	16
4.5.7. KML Tanısında FISH Yöntemi.....	16
4.5.8. KML Tanısında Kemik İliği Aspirasyonu.....	17
4.6. KML’de Tedavi ve Seçenekler.....	18
4.6.1. KML’de Moleküler Yanıt Tanımlamaları	18
4.6.2. Kemoterapi	20
4.6.3. İnterferon Alfa	21
4.6.4. Allojenik Kök Hücre Nakli	21
4.6.5. İmmünoterapi	21
4.6.6. Tirozin Kinaz İnhibitörleri (TKİ)	22
4.6.6.1. Birinci ve İkinci Basamak TKİ Tedavisi.....	22
4.6.6.2. Üçüncü Basamak TKİ Tedavisi.....	26
4.7. KML’de Tedavi Direnci	27

4.7.1. KML’de Dirençle İlişkili Gen Ekspresyon Profili	32
4.7.1.1. Twist-1	37
4.7.1.2. HMGA2	38
4.7.1.3. EZH2	39
4.7.1.4. FAM83B	41
4.7.1.5. SALL4	42
4.7.1.6. PAK1	43
4.7.1.7. TET2	45
4.7.1.8. DNMT1	46
4.8. Telomer.....	48
4.9. KML’de Telomer Uzunluğu ve Ölçümü	50
5. GEREÇ ve YÖNTEM	55
5.1. Gereç.....	55
5.1.1. Cihazlar.....	55
5.1.2. Kimyasal Maddeler.....	56
5.1.3. Sarf Malzemeler	56
5.1.4. Kitler.....	57
5.2. Yöntem	57
5.2.1. Hasta ve Kontrol Örneklerinin Toplanması.....	58
5.2.2. RNA İzolasyonu	59
5.2.3. cDNA Sentezi	60
5.2.4. Real Time PCR Yöntemiyle Gen Ekspresyon Analizi.....	61
5.2.5. DNA İzolasyonu	63
5.2.6. Real Time PCR Yöntemiyle Telomer Uzunluğu Ölçümü.....	63
5.2.7. İstatistiksel Analiz	65
6. BULGULAR	67
6.1. KML Hastalarının ve Kontrol Grubunun Özelliklerinin Belirlenmesi.....	67
6.2. Gen Panelindeki Genlerin Ekspresyon Profili.....	71
6.3. Telomer Uzunluğu Ölçüm Sonuçları.....	73
6.4. Verilerin İstatistiksel Analizi.....	76
6.4.1. KML Hastalarının ve Kontrol Grubundaki Bireylerin Telomer Uzunluklarının Karşılaştırılması	77
6.4.2. KML Hastalarının Telomer Uzunluklarının Yaş Eşleştirilmiş Kontroller İle Karşılaştırılması.....	79
6.4.3. Tedavi Dirençli Grup İle Kontrol Grubu Arasında Telomer Uzunluğunun Karşılaştırılması	79

6.4.4. Tedavi Duyarlı Grup İle Kontrol Grubu Arasında Telomer Uzunluğunun Karşılaştırılması	81
6.4.5. Tedavi Dirençli Grup İle Yaşa Göre Eşleştirilmiş Kontrol Grubu Arasında Telomer Uzunluğunun Karşılaştırılması	82
6.4.6. Tedavi Duyarlı Grup İle Yaşa Göre Eşleştirilmiş Kontrol Grubu Arasında Telomer Uzunluğunun Karşılaştırılması	83
6.4.7. Tedavi Dirençli ve Tedavi Duyarlı Grup Arasında Telomer Uzunluğunun Karşılaştırılması	84
6.4.8. Tedavi Dirençli ve Tedavi Duyarlı Hastaların Gen Ekspresyonlarının Karşılaştırılması	85
6.4.9. Gen Ekspresyonlarının Birbiri İle İlişkisi	90
6.4.10. Tedavi Duyarlı ve Tedavi Dirençli Hastalarda Korelasyon Durumu	95
6.4.11. Tüm Sonuçların Lojistik Regresyon Analizi	98
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	100
8. KAYNAKLAR	110
9. BİLİMSEL FAALİYETLER	122

KISALTMALAR LİSTESİ

Δ	:	Delta
36B4	:	Ribozomal protein lateral sap alt birimi P0
ABL	:	Abelson
ACA	:	Ek kromozomal anomali (Additional chromosomal abnormalities)
ACE-27	:	Yetişkin eşlik eden hastalık değerlendirme – 27 (Adult Comorbidity Evaluation – 27)
AML	:	Akut miyeloid lösemi
ALT	:	Alternatif telomer uzaması
BCR	:	Kırılma noktası küme bölgesi proteini (Breakpoint cluster region)
BMM	:	Kemik iliği monosit (Bone marrow monocyte)
CCI	:	Charlson Komorbidite İndeksi
cDNA	:	Tamamlayıcı DNA
Ct	:	Döngü eşik değeri
CCyR	:	Tam sitogenetik yanıt
DMR	:	Derin moleküler yanıt
DNMT-1	:	DNA Metiltransferaz 1
DSÖ	:	Dünya Sağlık Örgütü (World health organization)
EDTA	:	Etilen diamin tetra asetik asit
ELN	:	Avrupa lösemi ağı (European leukemiaNet)
ELTS	:	EUTOS'un uzun vadeli hayatta kalma oranı
EMA	:	Avrupa ilaç ajansı (European medicines agency)
EtOH	:	Etanol
EZH2	:	Zeste homolog 2'nin geliştiricisi
FAM83B	:	Sıra benzerliği olan insan ailesi 83 üye B
FISH	:	Floresan insitu hibridizasyon
GEP	:	Gen ekspresyon profili

GUSB	:	Glukuronidaz beta
HMGA2	:	Yüksek hareketlilik grubu AT kancası 2
HSC	:	Hematopoietik kök hücre
hTERT	:	Telomeraz ters transkriptaz
IRIS	:	Uluslararası rastgele interferon ve STI571 çalışması
IS	:	Uluslararası ölçek
KML	:	Kronik miyeloid lösemi
LSC	:	Lösemik kök hücre
LTL	:	Lökosit telomere uzunluğu
MMR	:	Majör moleküler yanıt
NCCN	:	Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı (National comprehensive cancer network)
NGS	:	Yeni nesil sekanslama
OS	:	Genel sağkalım (Overall survival)
Ph	:	Philadelphia kromozomu
PAK1	:	p21-aktifleştirilmiş kinaz 1
POT1	:	Protection of telomeres 1
RT-PCR	:	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SALL4	:	Spalt benzeri protein 4
SDI	:	Sosyo demografik indeks
SPSS	:	Sosyal bilimler için istatistik paketi
T/S	:	Telomer geni/tek kopya geni
TERC	:	Telomerazın RNA bileşeni
TET2	:	Tet metilsitozin dioksijenaz 2
TFR	:	Tedavisiz remisyon
TKİ	:	Tirozin kinaz inhibitörü
TL	:	Telomer uzunluğu
TRF	:	Telomerik tekraralama faktörü

TWIST1 : Twist ile ilgili protein 1

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa Numarası

Şekil 1.	Philadelphia kromozomunun oluşumu	7
Şekil 2.	Blastik faz mutasyonları	9
Şekil 3.	KML'de TKİ direncinin moleküler mekanizmaları	29
Şekil 4.	Kinaz alanı nokta mutasyonları	30
Şekil 5.	TKİ direnç mutasyonları ve yapıları	31
Şekil 6.	KML'de eşlik eden hastalıkların genel sağ kalımı üzerindeki etkisi.....	34
Şekil 7.	İş akışı.....	59
Şekil 8.	EZH2 geni için RT PCR erime sıcaklığı eğrisi.....	73
Şekil 9.	Telomer için RT PCR erime sıcaklığı eğrisi.....	75
Şekil 10.	34b4 için RT PCR erime sıcaklığı eğrisi.....	75
Şekil 11.	Yaştan bağımsız KML ve kontrol arasındaki telomer uzunluğu grafiği.....	80
Şekil 12.	Yaşa göre eşleştirilmiş KML ve kontrol T/S RATIO değerleri.....	81
Şekil 13.	Tedavi dirençli grup ile kontrol grubunun telomer uzunluğu grafiği.....	82
Şekil 14.	Tedavi duyarlı grup ile kontrol grubunun telomer uzunluğu grafiği.....	83
Şekil 15.	Tedavi dirençliler ile yaş uyumlu kontrollerin TL ölçüm grafiği.....	84
Şekil 16.	Tedavi duyarlılar ile yaş uyumlu kontrollerin TL ölçüm grafiği.....	85
Şekil 17.	Tedavi dirençli ve tedavi duyarlı grubun TL ölçüm grafiği.....	86
Şekil 18.	T/S Ratio değeri için ROC eğrisi analizi.....	86
Şekil 19.	TET2 gen ekspresyon seviyesi grafiği.....	89
Şekil 20.	TET2 geni ROC eğrisi analizi.....	89
Şekil 21.	DNMT1 gen ekspresyon seviyesi grafiği.....	91
Şekil 22.	DNMT1 geni ROC eğrisi analizi.....	91
Şekil 23.	HMGA2 ile EZH2 arasındaki güçlü pozitif korelasyon.....	94
Şekil 24.	PAK1 ile EZH2 arasındaki güçlü pozitif korelasyon.....	95
Şekil 25.	SALL4 ile PAK1 arasındaki güçlü pozitif korelasyon.....	95

Şekil 26.	SALL4 ile TET2 arasındaki çok güçlü pozitif korelasyon.....	96
Şekil 27.	PAK1 ile TET2 arasındaki güçlü pozitif korelasyon.....	96
Şekil 28.	Lojistik regresyon ROC eğrisi.....	101
Şekil 29.	Lojistik regresyon ROC eğrisine ilişkin nokta diyagramı.....	101

TABLO LİSTESİ

Sayfa Numarası

Tablo 1.	Yüksek riskli ek kromozomal anomaliler.....	9
Tablo 2.	KML’de blast faza transformasyonla ilişkili değişiklikler.....	10
Tablo 3.	KML tanısı konulurken yapılan ilk işlemler.....	13
Tablo 4.	KML’de risk skorunun (ELTS skoru) değerlendirilmesi	14
Tablo 5.	KML’de izleme yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları	16
Tablo 6.	KML’de sitogenetik ve moleküler yanıt tanımları.....	19
Tablo 7.	KML tedavisinde kilometre taşları	20
Tablo 8.	Tirozin kinaz inhibitörleri.....	22
Tablo 9.	İkinci ve üçüncü nesil TKİ’lerine dirençli mutasyonlar.....	32
Tablo 10.	KML’de tedavi direnciyle ilişkili olduğu düşünülen genler.....	49
Tablo 11.	KML’de TL ölçüm teknikleri.....	55
Tablo 12.	Çalışmada kullanılan cihazlar.....	56
Tablo 13.	Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler.....	57
Tablo 14.	Çalışmada kullanılan sarf malzemeler.....	57
Tablo 15.	Çalışmada kullanılan kitler.....	58
Tablo 16.	2x RT Master Karışımı içeriği.....	61
Tablo 17.	cDNA sentezi ısı döngü cihazı koşulları.....	62
Tablo 18.	KML hastalarında gen ekspresyon analizi RT PCR primerleri.....	63
Tablo 19.	Gen ekspresyon analizi için RT PCR Bileşenleri.....	64
Tablo 20.	Telomer uzunluğu ölçümü için kullanılan primerler.....	65
Tablo 21.	Telomer uzunluğu ölçümü için RT PCR bileşenleri.....	66
Tablo 22.	Telomer uzunluğu ölçümü için RT PCR programı.....	66
Tablo 23.	KML hastalarının demografik özellikleri, tanı ve ilaç bilgisi.....	69
Tablo 24.	Hastaların BCR::ABL1 (IS) değerleri, TKİ direnci ve mutasyon bilgisi.....	71

Tablo 25.	Gen panelindeki genlerin ΔCt değerleri.....	73
Tablo 26.	KML hastalarının Ct, ΔCt ve $2^{-\Delta Ct}$ değerleri.....	74
Tablo 27.	Kontrollerin Ct, ΔCt ve $2^{-\Delta Ct}$ değerleri.....	77
Tablo 28.	KML grubu ve kontrol grubunda telomer uzunluğu analizi ΔCt 'leri.....	78
Tablo 29.	KML grubu ve kontrol grubunda $2^{-\Delta Ct}$ değer analizi.....	79
Tablo 30.	Tedavi dirençli grup ile kontrol grubunun ΔCt medyan farkı.....	81
Tablo 31.	Tedavi dirençli grup ile kontrol grubunun telomer uzunluğu analizi.....	82
Tablo 32.	Tedavi duyarlı grup ile kontrol grubunun ΔCt medyan farkı.....	83
Tablo 33.	Tedavi dirençli ve tedavi duyarlı hastaların ΔCt analizi.....	87
Tablo 34.	TET2 geninin tedavi dirençli ve duyarlı gruplardaki ekspresyon verileri.....	88
Tablo 35.	DNMT1 geninin tedavi dirençli ve duyarlılarda ekspresyon verileri.....	90
Tablo 36.	Paneldeki genlerin korelasyon analizi verileri.....	92
Tablo 37.	Korelasyon türleri.....	93
Tablo 38.	Duyarlı ve dirençli hastalarda korelasyon analizi verileri.....	97

1. ÖZET

Tezin başlığı : Kronik Miyeloid Lösemide Tedavi Direnci İle İlişkili Gen Ekspresyon Profili ve Telomer Uzunluğu Arasındaki İlişki

Öğrencinin Adı Soyadı : Betül Koçkan

Danışmanın Adı Soyadı : Prof. Dr. Mustafa Akkiprik

Programın Adı : Tıbbi Biyoloji ve Genetik Doktora Programı

Amaç Kronik miyeloid lösemide tedavi direnciyle muhtemel ilişkili genlerden bir panel oluşturup, bu genlerin birbiriyle ve TKİ direnci ile korelasyon durumunu ve KML hastalarında tedavi direnci ile telomer uzunluğu arasında ilişki olup olmadığını tespit etmek amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Hasta ve kontrol grubundan kan örnekleri alınarak RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve DNA izolasyonu yapılmıştır. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile gen ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir ve telomer uzunluğu ölçümü gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: TKİ tedavisine dirençli hastalarda, TKİ tedavisine duyarlı hastalara kıyasla TET2 ve DNMT1 genlerinin ekspresyon seviyelerinin daha düşük olduğu saptanmıştır. Panelde yer alan TWIST-1, HMGA2, EZH2, FAM83B, SALL4 ve PAK1 genlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir ekspresyon farklılığı saptanmamıştır. Yaş uyumlu sağlıklı kontrollerin telomerlerine göre TKİ tedavisine dirençli ve duyarlı olan hastaların telomerlerinin daha uzun olduğu belirlenmiştir. Tedaviye dirençli ve duyarlı KML hastalarının telomer uzunlukları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir.

Sonuç: TET2 geni, KML’de TKİ direncinde önemli bir biyobelirteç olabilir. Gen ekspresyon profili analizleri ve telomer uzunluğu ölçümü, KML’de tedavi sürecinin doğru yönlendirilebilmesi ve yeni hedefli ilaç tasarımları için önem taşır.

Anahtar Kelimeler: Kronik miyeloid lösemi, tirozin kinaz inhibitörü direnci, telomer uzunluğu, TET2, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

2. SUMMARY

Title of Thesis: The Relationship Between Gene Expression Profile and Telomere Length Associated with Treatment Resistance in Chronic Myeloid Leukemia

Student Name, Surname: Betül Koçkan

Supervisor Name : Prof. Dr. Mustafa Akkiprik

Program Name : Medical Biology and Genetics PhD Program

Objective: This study aimed to establish a panel of genes that are likely to be associated with treatment resistance in chronic myeloid leukemia, to determine the correlation between these genes and TKI resistance, and to determine whether there is a relationship between treatment resistance and telomere length in CML patients.

Materials and Methods: Blood samples were taken from the patient and control groups, and RNA isolation, cDNA synthesis, and DNA isolation were performed. Gene expression levels were determined by real-time polymerase chain reaction and telomere length measurement was performed.

Results: It was determined that the expression levels of TET2 and DNMT1 genes were lower in patients resistant to TKI treatment compared to patients sensitive to TKI treatment. No statistically significant expression difference was detected in the TWIST-1, HMGA2, EZH2, FAM83B, SALL4, and PAK1 genes included in the panel. It was determined that the telomeres of patients resistant and sensitive to TKI treatment were longer compared to the telomeres of age-matched healthy controls. There was no significant difference between the telomere lengths of treatment-resistant and treatment-sensitive CML patients.

Conclusion: TET2 gene may be an important biomarker of TKI resistance in CML. Gene expression profile analyses and telomere length measurement are important for the correct direction of the treatment process in CML and for new targeted drug designs.

Keywords: Chronic myeloid leukemia, tyrosine kinase inhibitor resistance, telomere length, TET2, real-time polymerase chain reaction

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Kronik miyeloid lösemi (KML), t(9;22)(q34;q11) translokasyonu ile karakterize edilen bir hematopoietik kök hücre (HSC) bozukluğudur. Translokasyon sonucu patojenik BCR-ABL1 onkogeni meydana gelir, onkogen etkisiyle tirozin kinaz yolağı sürekli aktive olur ve mutant hematopoietik kök hücrelerin proliferasyonuna etki eder. KML'nin üç fazı vardır: kronik faz, akselere faz ve blastik faz. Tirozin kinaz inhibitörleri (TKİ) sayesinde KML hastaları, bu hastalığa sahip olmayan kişilerle benzer bir yaşam beklentisine sahiptir ve KML hastalarının blast fazına ilerlemesi artık çok nadirdir. KML hastalarının küçük bir kısmında BCR-ABL1 nokta mutasyonları nedeniyle TKİ'ye direnç vardır. TKİ direnci olan KML hastalarının, BCR-ABL1 mutasyonu türüne bağlı olarak ikinci veya üçüncü nesil TKİ ile tedavi edilmesi gerekmektedir (Rinaldi ve Winston, 2023).

Sitogenetik ve moleküler analizlerdeki ilerlemeler, KML'nin tanısı, prognozu, tedavisi ve izlenmesi için büyük önem taşımaktadır. KML hastalarının sosyodemografik profiline bakıldığında, erkeklerde tanı oranının kadınlara göre yüksek olduğu ve tanının genellikle 60-70 yaş aralığında konulduğu görülmektedir (Sampaio ve ark., 2021).

KML hastalığının ilerlemesinde temel fonksiyonel değişiklikler; yüksek proliferasyon oranı, azalmış apoptoz, diferansiyasyonun bloke edilmesi ve kemoterapötik ajanlara karşı güçlü dirençtir. Hastalıkla ilgili yapılan analizlerde çeşitli genlerin aşırı ekspresyonu veya aşağı düzenlenmesi gibi aday genlerin karmaşık etkileşiminin hastalığın ilerlemesinde ve ilaç direncinin gelişiminde önemli bir rol oynadığı sonucuna varılmıştır. Hastalığın ilerlemesi ve TKİ direnci ile ilişkisi olduğu varsayılan genlerin göreceli ekspresyon profilleri, kantitatif gerçek zamanlı (qRT) PCR ile analiz edilebilir (Chandran ve ark., 2019). Yapılan çalışmalar, KML'de ilerleme, prognozu değerlendirme ve yeni terapötik hedefleri belirlemede belirteç olarak araştırılabilir belirlen gen yolaklarının olduğunu göstermektedir (Mascarenhas ve ark., 2014).

Telomer kompleksi, tekrarlayan DNA dizilerinden ve ilişkili proteinlerden oluşur, ökaryotik kromozomların sonunda bulunur. Telomerler her hücre bölünmesiyle kısalır ve böylece somatik hücrelerin proliferatif kapasitesini yansıtır ve kısıtlar. Kritik derecede kısa telomerler genetik instabilite ve replikatif yaşlanmayla ilişkilidir. KML'de BCR-ABL 1 pozitif hematopoietik kök ve progenitör hücreler, periferik kan miyeloid hücrelerinde önemli ölçüde kısalmış telomerlere yol açar (Wenn ve ark., 2015).

KML hastalarının periferik kan hücrelerindeki telomer uzunluğunun (TL), hastalık evresi, prognostik skorlar, tedaviye yanıt ve hastalığın ilerlemesiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Bouillon ve ark., 2018). Kısa telomer varlığı, KML’de hastalığın ilerlemesi, kötü prognoz, yüksek Hasford skoru ve sitogenetik sapmalarla ilişkilendirilmiştir (Caocci ve ark., 2016).

KML hastalığı, tirozin kinaz inhibitörleri ile tedavi edilmektedir ancak hastalık boyunca meydana gelen ek genetik aberasyonlar sebebi ile ilaca karşı direnç oluşmaktadır. Mevcut çalışmalarda, KML’de bazı genlerin ekspresyon seviyelerinin düştüğü, bazı genlerin ekspresyon seviyelerinin ise artış gösterdiği tespit edilmiştir (Chandran ve ark., 2019). Buradan yola çıkarak, ekspresyon seviyesinde farklılık gösterdiği öngörülen genlerden bir gen paneli oluşturmak amaçlanmıştır. Paneldeki genlerin ekspresyon seviyeleri ile kullanılan tirozin kinaz inhibitörünün türü, dozu ve süresi, yüzdelik uluslararası ölçek (IS) değeri, hastalık evresi, tedaviye yanıt durumu ve telomer uzunluğu arasında bir ilişki olup olmadığını tespit etmek üzere deneyler planlanmıştır. KML’de özellikle hastalığın ilk evresi olan kronik fazda telomer kısalmasının hızlıca geliştiği ve telomer boyutundaki kısalma ile hastalığın ileri evreleri olan akselere faz ve blastik faza geçme süresinin korele olduğu bilgisi literatürde yer almaktadır (Wenn ve ark., 2015). Bu çalışmada, telomer uzunluğu ölçümünün, KML prognozu için kullanılabilecek bir parametre olabileceği düşüncesi ile KML hastaları ve hastalarla yaş uyumlu sağlıklı kontrol grubunda telomer uzunluğu ölçümü yapmak amaçlanmıştır.

KML hastalarından ve hastalarla yaş uyumlu sağlıklı kontrol grubundan alınan numunelerdeki periferik kan lökositleri kullanılarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time PCR) yöntemiyle, gen ekspresyon paneli genlerinin (TWIST-1, HMGA2, EZH2, FAM83B, SALL4, PAK1, TET2, DNMT1) ölçüm değerlerini ve telomer uzunluğu ölçüm değerlerini saptamak amacıyla iş akışı oluşturulmuştur. Elde edilen verilerin, bağımsız bir prognostik ve/veya öngörücü biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılamayacağını araştırmak üzere deneyler dizayn edilmiştir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. KML ve Tarihçesi

Kronik miyelodi lösemi (KML), keşfedilen ilk lösemidir. Tarih 1840 yılını ve takip eden yılları gösterdiğinde hepatosplenomegali, ateş, lökositoz ve Alfred Velpeau tarafından "koyu kan" olarak tanımlanan alışılmadık bir kan görünümü ve kıvamı gibi çok benzer bulgular gösteren bireyler üzerinde yapılan otopsiler yoluyla David Craigie, John Hughes Bennet ve Rudolph Virchow tarafından KML tanımlanmıştır (Sampaio ve ark., 2021).

KML'nin patogenezinde merkezi olay, kromozom 9'daki abelson murine leukemia (ABL1) geninin kromozom 22'deki breakpoint cluster region (BCR) geniyle füzyonudur. Bu yeniden düzenleme "Philadelphia kromozomu" (Ph) olarak bilinir. Bu durum RAS, RAF, JUN kinaz, MYC ve STAT gibi sinyal yolları aracılığıyla KML hücrelerinin büyümesini ve hayatta kalmasını destekleyen, sürekli olarak aktif bir tirozin kinaz olan BCR::ABL1 adlı bir onkoproteinin ekspresyonuyla sonuçlanır (Jabbour ve Kantarjian, 2022). Bu keşfin tarihçesine bakacak olursak; 1960 yılında, iki sitogenetik bilim insanı olan David Hungerford ve Peter Nowell, lösemnin belirli kromozomal anormalliklerle bağlantılı olup olmadığını belirlemek için bir araya geldiler. Bu, onkolojik bir hastalık ile kromozomal anormallik arasında bir ilişkinin ilk kez kurulduğu zamandı. İki KML hastasında, Philadelphia kromozomu adını verdikleri küçük bir kromozomun varlığını tespit ettiler ve daha sonra Janet Rowley, 1973 yılında bunun kromozom 9 ve 22'deki uzun kollar arasında dengeli bir karşılıklı translokasyon olduğunu kanıtlayarak t (9; 22)(q34; q11) keşfini geliştirdi (Sampaio ve ark., 2021).

4.2. KML Epidemiyolojisi

Batı ülkelerinde KML tanısı sırasındaki ortalama yaş, EUTOS ve SIMPLICITY kayıtlarından tahmin edildiği üzere yaklaşık 56 ila 57'dir. 70 yaşından büyük hastalar, toplam hastaların %20'den fazlasını oluşturmaktadır. Daha genç nüfusa sahip gelişmekte olan ülkelere ortalama yaş 50'den azdır. 100.000 nüfus başına yıllık insidans yaşa göre değişir ve ilgili nüfusların yaşına bağlı olarak 1 ile 2 arasında değişir (Hehlmann, 2020). KML hastasının yaşı, temel tedavi kararında önemli bir rol oynar. 50 yaşın altındaki hastaların yaklaşık 30 yıldan fazla yaşaması beklenir. Bu nedenle, kalıcı tam moleküler remisyona başlatılması potansiyel olarak TKİ tedavisinin kesilmesiyle sonuçlanabilir. İkinci nesil TKİ'ler, imatinib ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha yüksek bir tam moleküler remisyona oranı sağlar. Tedavinin kesilmesinin daha az önemli olduğu yaşlı hastalarda, bakımın olası kesilmesi sorunu daha az önemli bir konuma sahiptir (Ciftçiler ve Haznedaroğlu, 2021).

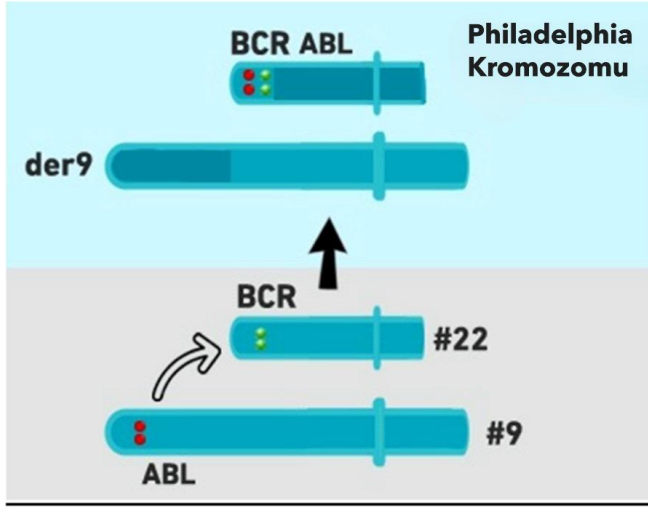
4.3. KML Biyolojisi

4.3.1. KML'nin Moleküler Patogenezi

Bir neoplazm olan KML'nin patogenezinde Philadelphia kromozomu esas rol oynar. Resiprokal translokasyon sonucunda, 9. ve 22. kromozomlarda yer alan genlerin füzyonu ile oluşur. İkinci en küçük ve en kapsamlı dizilenmiş insan kromozomu olan 22 numaralı kromozom, 51 milyon baz çiftini kapsar ve 500-600 gen içerir. 9 numaralı kromozom, mesane kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde önemli ölçüde bulunur ve genetik değişikliklerden ve kontrolsüz hücre büyümesinden sorumludur. 22. kromozomdaki BCR geni, kendi bölümünün parçalarını 9. kromozomdaki ABL geniyle değiştirerek uzun bir kromozom ve ekstra kısa bir kromozom oluşturur (Pinnenti ve ark., 2024). Bu yapı, Şekil 1'de gösterilmiştir.

Genellikle hatalı kromozom 22 olarak bilinen Philadelphia kromozomu, yetişkin kronik miyeloid lösemi hastalarının %95'inde, akut lenfoblastik lösemi vakalarının %15'inde gözlemlenmiştir. BCR-ABL füzyon proteini, mutant bir c-Abl tirozin kinaz proteini kodlar. Bu translokasyon genellikle ortalama 50 yaşında teşhis edilir ve genç bireylerde görülmesi oldukça nadirdir (El-Tanani ve ark., 2024).

Ph kromozomunda bulunan BCR-ABL1 hibrit geni, KML lökomogenezinde rol oynayan onkoprotein 210 kD'yi (p210) sentezler. p210 BCR-ABL1 proteini, tirozin kinaz yolunu sürekli olarak aktive eder ve bu da JAK/STAT, PI3K/AKT, RAF, MYC ve RAS/MEK gibi düzenlenmemiş aşağı akış onkojenik yolların sinyal iletiminde artışa neden olur. Bu yollar hücre büyümesinde, hücre sağ kalımında ve apoptoz inhibisyonunda rol oynar. Bu nedenle, BCR-ABL1 translokasyonuna sahip hematopoietik kök hücreler büyüme faktörlerine karşı gelişmiş tepkileri nedeniyle proliferatif bir avantaja sahiptir (Rinaldi ve Winston, 2023). Bu neoplastik süreç tarafından oluşturulan diğer hücresel etkiler arasında, reaktif oksijen türlerinin sayısında artış, DNA ipliğinin onarımında kırılma ve hasar, tipik hücre döngüsünün kontrol eksikliği, hücre adezyonunun düzensizliği, apoptoz ve otofaji inhibisyonu yer alır. Bu değişiklikler başlangıçta mutasyona uğramış bölgeyi daha fazla mutasyona karşı daha duyarlı hale getirerek hastalığın ilerlemesini kolaylaştırır. Bu anlamda, çalışmalar KML hastalığının çoğunlukla Ph kromozomu ile temsil edilen tek bir mutasyondan başladığını ve hastalık ilerledikçe ek kromozomal anomali oranlarının daha yüksek (%30-%70) hale geldiğini göstermektedir (Sampaio ve ark., 2021).



Şekil 1. Philadelphia kromozomunun oluşumu (El-Tanani ev ark., 2024'ten yararlanılarak hazırlanmıştır.)

22. kromozomun BCR geniyle ilişkili kırılma noktalarına göre Ph kromozomunun üç farklı varyasyonu vardır; P190, P210 ve P230. Bunların özelliklerine bakıldığında, p190 mutasyonları Ph pozitif hastalarda daha yaygındır ve p230 kümeleri nötrofilik KML ile ilişkilidir (Pinnenti ve ark., 2024). İlgi çekici bir nokta olarak, KML hastalarının %5-10'u Philadelphia kromozomuna sahip değildir, ancak hastaların tanımlanabilir BCR-ABL1 onkogenleri mevcuttur. Bu durumdaki KML hastalarında BCR-ABL1 genleri Philadelphia kromozomunun dışından kaynaklanır (Rinaldi ve Winston, 2023). KML patobiyolojisi, Philadelphia kromozomunun gizemli, değişebilir varyantları ve ek sitogenetik anomaliler nedeniyle karmaşık hale gelebilir (Ciftçiler ve Haznedaroğlu, 2021).

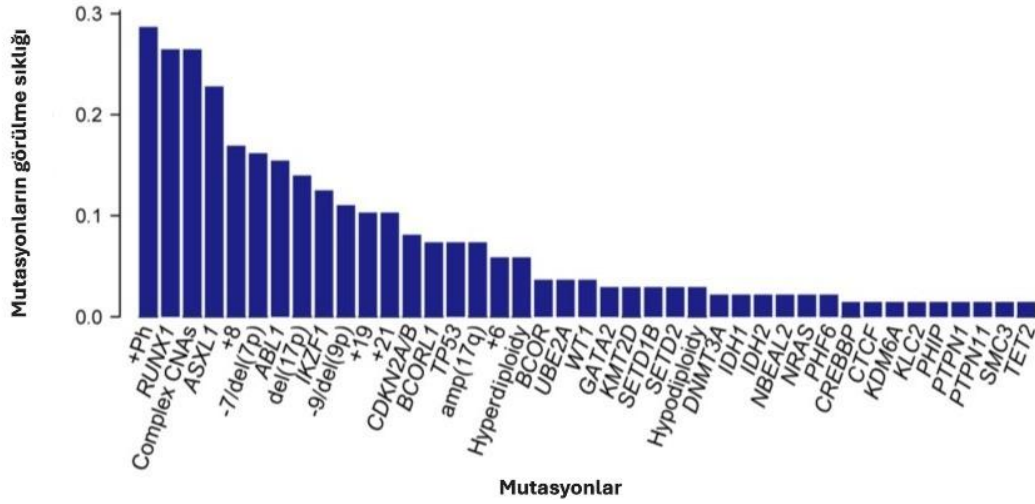
4.3.2 KML'de Mutasyonlar

BCR-ABL kinaz alanındaki (KD) mutasyonlar, klonal BCR-ABL lösemi hücrelerinin yeniden aktivasyonu ile yakından ilişkili en sık görülen olaylardır ve blast fazdaki hastaların yaklaşık %70-80'inde meydana geldiği bildirilmiştir. Özellikle, düşük trombosit sayıları, klonal sitogenetik evrim ve 6-tyoguanine daha önce maruz kalma, KD mutasyon tespiti ile ilişkilidir ancak imatinib tedavi yanıtı, olaysız sağkalım (EFS) veya genel sağ kalımla (OS) ilişkili değildir. ABL'nin ATP bağlayıcı halkası (P-halkası) içinde yer alan mutasyonlar (Y253F ve E255K gibi) kanserojenite artışı ve dönüşüm potansiyelini temsil eder, hastalığın daha kısa sürede ilerlemesi ve hastalarda daha kısa hayatta kalma süresi gibi kötü sonuçlarla ilişkilidir. BCR-ABL kinaz alanı mutasyonlarına ek olarak, MYC, RUNX1, IKZF1, PP2A, PTEN, p53 ve GATA-2 genleri de dahil olmak üzere diğer genetik kusurlar da kronik miyeloid lösemisinin ilerlemesiyle ilişkilidir (Wang ve ark., 2021).

BCR-ABL1, KML patolojisinin temel itici gücüdür. BCR-ABL1'den bağımsız yollar, lösemik kök hücrelerin tedavi direncinde ve kalıcılığında önemli roller oynar. Dizileme teknolojisindeki ilerlemeler sayesinde, BCR-ABL1'e ek olarak sık görülen moleküler sapmalar yalnızca ileri hastalıkta değil, aynı zamanda kronik faz KML'de de tanımlanmıştır. Bu tür mutasyonlar, KML patogenezinde önemli yardımcı faktörler olarak kabul edilebilir ve potansiyel olarak terapötik stratejileri etkileyebilir. Kronik faz KML'de de tanımlanan moleküler sapmalar genellikle ASXL1, DNMT3A ve TET2 gibi epigenetik düzenleyicileri etkilemektedir (Rinke ve ark., 2020).

Yeni nesil dizilemenin kullanımı, yakın zamanda KML'de ilaç direncini potansiyel olarak yönlendiren lösemi ilişkili genlerdeki genomik anormallikleri ortaya çıkarmıştır. Bu genomik anormallikler, missense, frameshift, nonsense ve RNA splice değiştiren varyantları; bilinen ve yeni gen füzyonlarını ve spesifik submikroskopik gen delesyonlarını içerir. Bazı durumlarda, ortak füzyon partnerleri KMT2A ve RUNX1'i içeren gen füzyonları sitogenetik olarak gizli veya submikroskopiktir. Bazı varyantlar faz ilerlemesiyle ilişkilendirilirken, diğerleri kronik fazda tanı sırasında daha sık görülür. Tanı sırasında hastaların yaklaşık %15 ila %25'inde, zayıf tedavi sonucuyla ilişkili ek genomik anomaliler vardır. Tanı sırasında en sık mutasyona uğrayan gen, yaklaşık %9 hasta sıklığıyla ASXL1'dir. Gen füzyonları ve delesyonları blast fazda tanı anına göre daha sık tespit edilir. Ek genomik anomalilerin sayısı tedavi başarısızlığını etkiler; bireysel hastalarda tespit edilen varyant sayısı ne kadar yüksekse, tedavi başarısızlığı riskinin de o kadar yüksek olacağı düşünülür (Branford ve ark., 2024).

Yeni nesil dizilemenin (NGS) dışında Sanger dizilemesi, SNP array gibi çeşitli teknolojiler kullanılarak kronik faz KML'deki ek sitogenetik ve genetik anomaliler analiz edilebilir. Örneğin kronik fazda sürücü mutasyonlar ASXL1, TET2, KMT2D, PTPN11, RUNX1 ve WT1'dir (Ochi, 2023). İleri seviye olan blastik fazda sürücü mutasyonlar Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. Blastik faz mutasyonları (Ochi, 2023’den yararlanılarak hazırlanmıştır.)

4.3.3. KML’de Ek Kromozomal Anomaliler (ACA)

Ph kromozomu genellikle metafazların %100’ünde, sıklıkla tek anormallik olarak bulunur. Hastaların %10 ila %15’inde, genellikle Ph pozitif hücrelerde birlikte görülen, trizomi 8, izokromozom 17, 22q’dan ek materyal kaybı veya çift Ph veya diğerlerini içeren ek kromozomal anomaliler (ACA’lar) vardır (Jabbour ve Kantarjian, 2024). Yüksek riskli ACA’lar TKİ’lere daha zayıf yanıt ve daha yüksek ilerleme riski verir. 2013 ELN önerileri ACA’yı bir uyarı işareti olarak değerlendirirken, 2020 ELN önerileri ACA’yı hastaların tedavisi için yüksek riskli bir işaret seviyesine yükseltmiştir (Hehlmann, 2020). Tablo 1’de yüksek riskli ek kromozomal anomaliler (ACA) verilmiştir; Tablo 2’de KML’de en yaygın görülen genetik, kromozomal, telomer biyolojisi ve epigenetik modifikasyon değişiklikleri listelenmiştir.

Tablo 1. Yüksek riskli ek kromozomal anomaliler (Hehlmann, 2020’den yararlanılarak hazırlanmıştır.)

KML’de Yüksek riskli ACA örnekleri
+8, +19, +21, +27, +Ph
i(17q) ve -7/7q-
3q26.2 ve 11q23
Karmaşık anormal karyotipler

Tablo 2. KML’de blast faza transformasyonla ilişkili değişiklikler (Wang ve ark., 2021’den yararlanılarak hazırlanmıştır.)

	Adaylar	Değişiklikler	Özellikler	Fonksiyonlar ve Mekanizmalar
Genetik Olay	BCR-ABL kinaz domain	Mutasyon	Y253F, E255K	Kanserojen potansiyeli artırır, otofosforilasyonu ve tirozin fosforilasyonunu güçlendirir
			T315I	imatinibe duyarlılığı azaltır
Genetik Olay	p53	Kayıp	-	Apoptozis bozukluğu, genetik olarak kusurlu hücreleri ortadan kaldıramaz
Genetik Olay	IKZF1	Delesyon	-	Pre-B hücre farklılaşmasını etkiler
Genetik Olay	MYC	Yukarı düzenleme	-	Mitokondriyal genom instabilitesi, hücre büyümesini engeller, BCR-ABL ekspresyonunu artırır, miR-150’yi baskılar, imatinib duyarlılığını azaltır
Genetik Olay	RUNX1	Mutasyon	H78Q, D171G, R174Q, R139G, G381fs-ter570, R174Q, V91fs-ter94	BCR-ABL ekspresyonu gösteren farelerin ölümcül CML-BP benzeri veya CML-AP benzeri hastalıklar geliştirmesini sağlar
Genetik Olay	GATA-2	Mutasyon	-	BCR-ABL ekspresyonlu BM hematopoietik kök/progenitör hücrelerinin miyelomonositik farklılaşmasını etkiler
Genetik Olay	UBE2A	Mutasyon	-	Miyeloid hücre farklılaşmasını ortadan kaldırır
Genetik Olay	PP2A	İnaktivasyon	-	PP2A aktivitesinin yeniden sağlanması, BCR-ABL’nin in vitro lösemik potansiyelini azaltır
Genetik Olay	β -Katenin yolu	Aktivasyon	-	Hücresinin kendini yenileme yeteneğini artırır, DNMT1 transkripsiyonunu destekler, promotör bölgesinin hipermetilasyonu yoluyla PTPRG’yi susturur
Genetik Olay	CBL, CBLB, IDH1/2, ASXL1, TET2	-	-	İleri seviye KML’de aksesuar karyotip anormallikleri

Tablo 2. KML 'de blast faza transformasyonla ilişkili değişiklikler (devamı)				
Genetik Olay	CEBPA	İnaktivasyon	-	Miyeloid hücre farklılaşmasını ortadan kaldırır
Genetik Olay	SOCS2, CD52	Yukarı düzenleme	-	BP popülasyonunda daha yüksek frekans
Genetik Olay	MPO, PRAME, HLA antijenleri, JunB, Fos ve FosB	Aşağı düzenleme	-	
Ek Kromozomal Anomali	-	Sayısal Değişiklikler	+8, +21, i (17q), 3q26.2 yeniden düzenleme, +Ph, -7/ 7q-, +19	Blast faz popülasyonunda daha yüksek frekans
		Yapısal Değişiklikler	t (1;21); t (3;21); t (7;11)	Blast faz popülasyonunda daha yüksek frekans; füzyon proteininin oluşumu
Telomer Biyolojisi	Telomer uzunluğu	Kısalma	-	Blast faz popülasyonunda daha yüksek frekans ve telomer uzunluğu daha kısadır, hızlandırılmış telomer kısalması hücre büyüme avantajları sağlar
	Telomeraz aktivitesi	Azalma		BCR-ABL ekspresyonlu hücrelerin genişlemesini sınırlar ve çoğalmayı durdurur, in vitro apoptozun morfolojik özelliklerine sahiptir
Epigenetik Modifikasyon	Methylated CpG	Yukarı düzenleme	HIC1, MEG3 promoter, miR-147 promoter	Blast faz popülasyonunda daha yüksek frekans ve KML blastik faz dönüşümüne aracılık eder
		Aşağı düzenleme	EPB41L3, PRDX2, PLCL1, TUSC1, BCL11B, NDRG2	
	Histon Modifikasyonu	Artırılmış	RBP2	

4.4. KML Belirtileri

KML hastalarının çoğu, özellikle erken evrelerde asemptomatiktir. Hastalarda, lökositoz ve bazofili ortaya çıkaran tıbbi bir muayeneden sonra genellikle KML olduğundan şüphelenilir. KML, aşırı lökosit üretimi ile karakterize yavaş ilerleyen bir hastalıktır. Vakaların %95'inde diferansiyel sayımda sola kaymış nötrofil ve bazofili ile 100.000'den fazla lökosit (tipik olarak 4000 ila 10.000/μl arasında değişir) görülür. Bu durum, diğer kötü huylu veya iyi huylu hematolojik hastalıklarda nadiren görülür. Bazofili, artmış trombositler, azalmış nötrofil fonksiyonu ve artmış lökosit konsantrasyonları KML'nin belirtileridir. Kemik iliği muayenesi, %75'ten fazla hücresellığe sahip hiperselüler bir iliği ve 10:1 ila 30:1 arasında granülosit-eritroit oranını ortaya koyar. Kemik iliğinde hipolobe çekirdekler ve mikromegakaryositler ile megakaryositopoietik aktivitede artış sıklıkla görülür. Ayrıca hastalarda gözlenmlenen megakaryosit kümelenmesi yüksek Sokal skoruyla ilişkilidir. Dalak boyutu, Sokal skoru veELTS skoru gibi KML prognoz skorlarının bir bileşeni olduğu için ölçülmelidir. Hastalık ilerledikçe yorgunluk, iştahsızlık, uyuşukluk, kilo kaybı, sık baş ağrıları ve gece terlemeleri gibi kişiselleştirilmiş belirtiler gelişebilir. Nadiren de olsa ortaya çıkabilen diğer semptomlar düşük dereceli ateş, kanama, tromboz, gut artriti, priapizm ve mide ülseridir. Erken tanı, stromaya tutunma, eksik hücre yüzey sinyallerini olgunlaştırma, geç progenitör hücreleri farklılaştırma veya apoptozu indüklemeye gibi stratejiler yoluyla Ph-pozitif hücreleri normalleştirerek veya azaltarak ilerleme seviyesini düşürebilir ve sağkalım oranlarını iyileştirebilir (Rinaldi ve Winston, 2023; Pinnenti ve ark., 2024).

4.5. KML'de Tanı

4.5.1. Avrupa Lösemi Ağı (ELN) ve Tanı Kriterleri

Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı (NCCN) ve Avrupa Lösemi Ağı (ELN), KML'yi tedavi etmek ve yönetmek için kanıta dayalı yönergeler ve öneriler geliştiren önde gelen uluslararası komitelerdir. ELN, KML yönetimiyle ilgili yönergeyi en son 2020'de güncellemiştir. ELN KML paneli, KML yönetimiyle ilgili en son verilerle ilgili soruları tartışmak üzere periyodik olarak bir araya gelen Avrupa, Amerika Birleşik Devletleri ve Asya-Pasifik bölgesinden uzmanlardan oluşur. NCCN KML komitesi, her NCCN üye kurumundan KML uzmanlarından oluşur. NCCN yönergeleri kanıta dayalıdır ve yazarların güncel tedavi yaklaşımları ve literatür analizi hakkındaki görüşlerini yansıtır (Özdemir ve ark., 2022).

Hem NCCN hem de ELN kılavuzlarına göre, ilk değerlendirme dalağın palpasyonu, diferansiyel, standart biyokimyasal profil ve hepatit B serolojisi içeren fiziksel muayeneden

oluşmalıdır. Karaciğer boyutunu bilmek, elektrokardiyogram yapmak, altta yatan komorbiditeleri belgelemek de önemlidir. Philadelphia (Ph) kromozomunu doğrulamak amacıyla sitogenetik değerlendirme için kemik iliği aspirasyonu ve başlangıçta BCR::ABL1 transkriptlerini ve transkript tiplerini belirlemek amacıyla kantitatif ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) önerilir (Özdemir ve ark., 2022). Avrupa Lösemi Ağı (ELN) önerilerine göre, 36-48 aylık tedavide BCR::ABL1 transkripti (Uluslararası Ölçek) $\leq 0,1$ olarak tanımlanan majör moleküler yanıt (MMR) elde edilmezse tedavi değişikliği düşünülebilir. Tedavi başarısızlığında BCR::ABL1 kinaz alanının mutasyon analizi ve alternatif TKİ'ler veya allojenik hematopoietik hücre nakline (HCT) tedavi geçişi önerilmektedir (Choi, 2023).

4.5.2. KML Tanısında İlk İşlemler

KML şüphesinde tanı konulması için ilk aşamada yapılan analizler Tablo 3'de listelenmiştir.

Tablo 3. KML tanısı konulurken yapılan ilk işlemler (Hehlmann, 2020'den yararlanılarak hazırlanmıştır.)

Mikroskopta diferansiyel ile tam kan sayımı (CBC)
İlik sitolojisi
Sitogenetik
BCR-ABL1 transkriptlerinin tespiti ve tanımlanması için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)
Dalak boyutuna özel dikkat gösterilerek yapılan fizik muayene
Elektrokardiyogram
Hepatit serolojisi ile standart biyokimya

4.5.3. KML’de Prognostik Faktörler

TKİ döneminde KML için tercih edilen risk skoru, KML sebepli ölümü tahmin etme doğruluğu Sokal skoruna göre daha yüksek olan EUTOS uzun dönem sağkalım (ELTS) skorudur. ELTS, KML’ye özgü ölüm dikkate alınarak uzun vadeli sağ kalım için EUTOS skorlamasıdır. Bu skorlamada yaş (yıl olarak); dalak boyutu (palpasyonla sol kosta kenarın altında cm olarak); kan blastlarının yüzdesi; 109/L başına trombositler kullanılır (Hehlmann, 2020). Tablo 4’de bu skorlamaya dair detaylar yer almaktadır. ELTS skorunu hesaplamak için bu bağlantıyı ziyaret ediniz http://www.leukemia-net.org/content/leukemias/cml/elts_score/index_eng.html (European Leukemia Net, 2025).

Tablo 4. KML’de risk skorunun (ELTS skoru) değerlendirilmesi (Hehlmann, 2020’den yararlanılarak hazırlanmıştır.)

Skor	Hesaplama	Risk gruplarının tanımı
ELTS	$0.0025 \times (\text{yaş}/10)^3$	Düşük risk: < 1.5680
	$+0.0615 \times \text{dalak boyutu}$	Orta düzey risk: $1.5680 - 2.2185$
	$+0.1052 \times \text{kan blast}$	Yüksek risk: > 2.2185
	$+0,4104 \times (\text{trombosit sayısı}/1000) - 0,5$	

KML prognozunda skorlamalara ek olarak bazı genetik anomaliler de yönlendirici niteliktedir. Yüksek riskli ek kromozomal anomaliler bunlardan biridir. Tirozin kinaz inhibitörlerine daha zayıf yanıt verilmesine ve hastalığa akselere faz, blast fazı gibi kronik faza göre daha ileri seviyelere ilerleme riski verir (Hehlmann, 2020).

4.5.4. KML Tanısında PCR Yöntemi

Ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), BCR ve ABL1 arasındaki birleşim bağlantısının etrafındaki bölgeyi çoğaltır. PCR testi, BCR:ABL1 transkriptinin varlığı hakkında bilgi sağlayan nitel (QPCR) veya BCR::ABL1 transkriptlerinin miktarını değerlendiren nicel olabilir. QPCR, KML’yi teşhis etmek için yararlıdır; nicel PCR, rezidüel hastalığı izlemek için

idealdir. Eş zamanlı periferik kan ve kemik iliği QPCR çalışmaları yüksek düzeyde uyum göstermektedir. PCR ile yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçlar ortaya çıkabilir. Yanlış negatif sonuçlar düşük kaliteli RNA'dan veya reaksiyonun başarısızlığından kaynaklanabilir; yanlış pozitif sonuçlar kontaminasyondan kaynaklanabilir. Bazı örneklerde 0,5–1 log fark, test prosedürlerine, örnek işleme ve laboratuvar deneyimine bağlı olarak ortaya çıkabilir (Jabbour ve Kantarjian, 2024).

Gerçek zamanlı kantitatif PCR (Real Time Quantitative PCR), periferik kanda BCR-ABL kantitasyonunda hızlı, doğru, kesin ve hassas bir yöntemdir. Deneyin temel gücü, tek seferlik analizlerden ziyade, nüksetmenin tahmini ve tedavi yanıtının izlenmesi için seri ölçümlerdedir. Normal BCR mRNA, RNA bozunmasını kontrol etmek için kantitatif olarak belirlenir ve sonuçlar BCR-ABL/BCR yüzdesi olarak bildirilir. KML'de minimal rezidüel hastalık ve tedavi yanıtının izlenmesi için de tercih edilen bir yöntemdir (Branford ve ark., 1999).

Damlacık dijital PCR (ddPCR), BCR:ABL1 için oldukça hassas ve spesifiktir ve bazı laboratuvarlarda BCR:ABL1 transkriptlerinin tespiti için kullanılır. Bununla birlikte, ddPCR çoğunlukla tedavi gerektirmeyen remisyon (TFR) ortamında moleküler yanıtların (MR) değerlendirilmesinde faydalıdır (Jabbour ve Kantarjian, 2024).

BCR::ABL1 için izleme yöntemleri topluca ele alındığında, ilk zamanlar kullanılan ters transkripsiyon-PCR'den (RT-PCR) kantitatif RT-PCR'ye (qRT-PCR) ve daha yakın zamanda dijital PCR'ye evrildiği söylenebilir. ABL kinaz bölgesi mutasyonlarını ve tirozin kinaz inhibitörü direncini belirlemek ve sonraki tedavi seçimine rehberlik etmek için BCR::ABL kinaz bölgesinin doğrudan dizilenmesi (10%-20% duyarlılıkta Sanger dizilenmesi) veya yeni nesil dizileme (NGS) ile analiz edilebilir (Zhang ve ark., 2024).

4.5.5. KML Tanısında Sanger Dizileme

Sanger dizileme yöntemi ile tüm BCR::ABL1 kinaz alan bölgesi herhangi bir nükleotid değişimi açısından taranabilir. Birinci basamak tedavi olan imatinibe ve diğer TKİ'lere dirençle ilişkili çok sayıda mutasyon olduğundan, kinaz alan mutasyon testi için altın standart haline gelmiştir. Sanger dizileme yöntemiyle BCR::ABL1 transkriptlerinin mutasyon taraması hızlı ve kolaydır ancak tekniğin zayıf duyarlılığı (%10 ile %20 arasında değişir) sebebiyle yalnızca majör veya baskın mutant klonları belirlenebilmektedir. Bu yüzden son yıllarda mutant transkriptleri tespit sınırını %1 ila %5'e çıkaran hedefli yeni nesil dizileme yönteminin (NGS) kullanımı gündeme gelmiştir (Soverini, 2023).

4.5.6. KML Tanısında Yeni Nesil Dizileme (NGS)

Yeni nesil dizileme (NGS), KML’de tanıyı daha iyi versiyona getirebileceği düşünülen bir tekniktir. BCR-ABL1 kinaz alanı (KD) mutasyonları, ilk basamak tedavi olan imatinib tedavisinin başarısız olduğu hastaların %50'sinde gözlenen, özellikle TKİ'lere karşı KML'de gelişen bir direnç mekanizmasıdır. 2. ve 3. Nesil TKİ'lere karşı da dirençle ilişkili mutasyonlar vardır. NGS, BCR-ABL1 transkript varyantlarını %1 seviyesine kadar tespit edebilir ve TKİ dirençli mutasyonları tespit edebilir. Ancak yeni nesil dizileme yöntemi, yüksek maliyetler ve uzun çalışma süresi gibi bazı dezavantajlara sahiptir. Yeni nesil dizileme analizinin, KML'nin son evresi olan blastik faza dönüşmesinden önce tedavi optimizasyonuna olanak sağlayarak, TKİ tedavisine yanıt vermeyen hastalarda yararlı olabileceği düşünülmektedir (Sampaio ve ark., 2021). KML’de izleme yöntemlerinin birbirlerine göre kullanım avantajları ve dezavantajları Tablo 5’de özetlenmiştir.

Tablo 5. KML’de izleme yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları (Zhang ve ark., 2024’den yararlanılarak hazırlanmıştır.)

Yöntem	Avantaj	Dezavantaj
qRT-PCR (Kantitatif Ters Transkripsiyon-PCR)	Hassas, yaygın olarak kullanılır, BCR::ABL transkriptlerini tespit etmek için altın standarttır	Dizi uzunluğundan ve teknik koşullardan etkilenir
ddPCR (Damlacık Dijital PCR)	qRT-PCR'den daha doğru, hassas ve güçlü	Büyük ölçekte kullanımı zor
NGS (Yeni Nesil Dizileme)	Kinaz alanı mutasyonları için yüksek hassasiyet ve doğruluk	Pahalıdır ve tespit edilen bazı düşük seviyeli mutasyonların önemi belirsizdir

4.5.7. KML Tanısında FISH Yöntemi

Floresan in situ hibridizasyon (FISH), spesifik bir test olarak hematolojik malignitelerde yaygın olarak kullanılır. Geleneksel sitogenetiğin aksine, klinik karar verme için gereken spesifik

genomik anormallikleri hızla belirler. FISH, özellikle sitogenetik negatif olduğunda veya metafaz hücresi elde edilemediğinde tanı için BCR-ABL'yi tespit etmek için kullanılır. FISH çalışmalarının rutin sitogenetikle birleştirilmesiyle, BCR-ABL füzyon geni, delesyonlar, gizli translokasyonlar ve kompleks varyant translokasyonlar hakkında detaylı veri elde etmek mümkündür. Günümüzde pek çok tıp merkezi, TKİ tedavisi sırasında BCR-ABL'nin rutin takibi için FISH'i, genellikle konvansiyonel sitogenetik ile birlikte ve özellikle kantitatif PCR takibinin mümkün olmadığı durumlarda kullanmaktadır (Bennour ve ark., 2016).

FISH analizi, BCR ve ABL1 genlerine özgü büyük genomik problemlerin eş-lokalizasyonuna dayanır. FISH analizi ile eş zamanlı kemik iliği ve kan örneklerinin karşılaştırılması yüksek uyum göstermektedir. FISH çalışmaları, kullanılan problemlere bağlı olarak %1-5 arasında yanlış pozitif aralığına sahip olabilir. Ph varyantlı hastaların tedaviye yanıtı ve prognozu Ph pozitif KML'ye benzerdir. Hastaların yaklaşık %2-5'i sitogenetik çalışmalarla Ph pozitifliği olmadan KML'nin morfolojik bir resmiyle ortaya çıkar. FISH ve PCR çalışmaları Ph pozitif BCR::ABL1 yeniden düzenlenmiş KML'yi belgeliyorsa, bu tür hastaların TKİ tedavisinde yanıtı ve sonucu Ph pozitif KML'li hastalarla benzerdir (Jabbour ve Kantarjian, 2024). KML'de, ACA/Ph+ (Ph pozitif hücrelerde ek kromozomal anormallikler) araştırmak için tanıda kemik iliği sitogenetiği önemlidir; bu klonal sitogenetik evrim olarak da bilinir. Eğer kemik iliği değerlendirmesi mümkün değilse, periferik kan örneklerinde BCR ve ABL1 genleri için ikili problemlerle FISH analizi, KML tanısı için uygun bir yöntemdir (Özdemir ve ark., 2022).

4.5.8. KML Tanısında Kemik İliği Aspirasyonu

Kemik iliği aspirasyonu, KML'den şüphelenilen tüm hastalar için endikedir, yapılması zorunludur; çünkü tanıyı doğrulayacaktır, blast ve bazofil yüzdeleri açısından evreleme için gereken bilgileri sağlayacaktır. Temel sitogenetik analiz, özellikle i(17)(q10)-7/del7q ve 3q26.2 yeniden düzenlemeleri olmak üzere ek kromozomal anomalilerin tespit edilmesini sağlayacaktır, bunlar nispeten zayıf bir prognozla ilişkilidir. BCR:ABL1'in tipik translokasyonları, e13a2 veya e14a2 transkriptleriyle sonuçlanarak p210 onkoproteinlerini üretir. Hastaların yaklaşık %1'inde e1a2/a3 transkripti olabilir ve bu da daha kısa p190 onkoproteinleriyle sonuçlanır. Bu hastaların prognozu daha kötü olabilir. Hastaların yaklaşık %2-5'inde p210 BCR::ABL1'in e13a3 veya e14a3 varyantları veya e19a2 transkriptleri (p230) (nadir; yavaş ilerleyen KML seyri) vardır ve bunlar rutin problemlerle yanlış negatif PCR sonucu verebilir. Tanı sırasında test edilmezse, bu durum hastanın TKİ tedavisinde tam moleküler

yanıtta (MR'da) olabileceği yönünde yanlış bir izlenime yol açabilir (Jabbour ve Kantarjian, 2024).

Kemik iliği aspirasyonu ayrıca promiyelosit, miyelosit ve eozinofil yüzdelерinin analiz edilmesine de olanak verir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kriterlerine göre, BM'de %10-19 oranında blast bulunması, akselere faz KML'de karakteristik bir özelliktir. Avrupa Lösemi Ağı (ELN) kriterlerine göre, blast fazda %15-29 oranında blast bulunması veya blastlar artı promiyelositler > %30 olması, blastlar < %30 olması durumu akselere faz KML karakteristiğı olarak kabul edilir (Sampaio ve ark., 2021).

4.6. KML'de Tedavi ve Seçenekler

KML, bir zamanlar kötü prognoza sahipti (ortanca sağ kalım, 3-6 yıld) ve tedavi edilemez bir hastalık olarak kabul edilmekteydi, artık kronik faz hastalarının büyük kısmında yaşam beklentisini önemli ölçüde normalleştiren BCR::ABL1 tirozin kinaz inhibitörlerini (TKİ'ler) içeren çeşitli klinik araçlarla yönetilmektedir (Kantarjian ve ark., 2025).

KML tedavisinin birincil amacı, normal bir popülasyonunkine eşit olacak şekilde sağkalımı iyileştirmektir. İkincil amaç, tedavinin kesilmesine ve potansiyel olarak tedavisiz remisyon (TFR) durumuna izin verebilecek kalıcı bir derin moleküler yanıt (DMR) elde etmektir (Senapati ve ark., 2023).

4.6.1. KML'de Moleküler Yanıt Tanımlamaları

Kronik miyeloid lösemide tanı için uluslararası bir ölçeğın (IS) geliştirilmesi, laboratuvarlar arasında transkript düzeylerinin standardizasyonunu sağlamıştır. %100'lük bir IS değeri, yeni teşhis konmuş KML hastalarının büyük bir uluslararası kohortundaki transkriptlerin medyan düzeyine karşılık gelir ve tam mematolojik yanıt (CHR) ve tam sitogenetik yanıt (CCR) sırasıyla %10 ve %1'lik IS değeriinde elde edilir (Braun ve ark., 2020).

KML tedavisinde moleküler yanıt, BCR-ABL1 transkriptlerinin ABL1 transkriptlerine göre veya diğer uluslararası kabul almış kontrol transkriptlerine (örneğin, beta glukuronidaz, GUSB, hastalığın başlangıcında, hastalık relaps ettikten sonra veya hastalığın seviyesi kronik fazdan akselere veya blastik faza ilerlediğinde yüksek BCR-ABL1 seviyelerini test eder) oranı olarak uluslararası ölçeğe (IS) göre değerlendirilmelidir. Moleküler yanıt, %1, %0,1, %0,01, %0,0032 ve %0,001'in sırasıyla IRIS (Uluslararası İnterferon ve STI571 Randomize Çalışması) çalışmasında kullanılan standartlaştırılmış başlangıç seviyesinin 2, 3, 4, 4,5 ve 5 logaritmik azalmaya karşılık geldiğı bir log ölçeğinde BCR-ABL1 % olarak ifade edilip raporlanmalıdır

(Hochhaus ve ark., 2020). Bu değerlendirmeler yapılırken kullanılan yanıt tanımlamaları Tablo 6'da yer almaktadır.

Tablo 6. KML'de sitogenetik ve moleküler yanıt tanımları (Hochhaus ve ark., 2020'den yararlanılarak hazırlanmıştır.)

Yanıt Tanımı	IS'de BCR-ABL1 transkript düzeyi
CCyR (Tam Sitogenetik Remisyon)	$\% \leq 1$
MR3 (MMR: Majör Moleküler Remisyon)	$\leq \%0.1$
MR4	$\leq \%0.01$
MR4.5	$\leq \%0.0032$
MR5	$\leq \%0.001$

Kronik miyeloid lösemi tedavisinde tirozin kinaz inhibitörlerine karşı suboptimal yanıtın veya tedavi direncinin doğru zamanda tanınabilmesi için düzenli tedavi izlemesi yapılmalıdır. Tanımlamalar esnasında "tam moleküler yanıt" kavramı yerine kontrol gen transkriptlerinin sayısı belirtilerek "moleküler olarak tespit edilemeyen lösemi" kavramı kullanılmalıdır. Tam sitogenetik remisyonun (CCR) IS'de $\%0,1$ BCR-ABL1'e eşdeğer olduğu gösterilmiştir. MR4 ve MR4.5 seviyelerinde derin moleküler remisyon varlığı prognostik değer taşır, bu seviyelerdeki hastalığın ilerlemesi nadir olarak gerçekleşir. Bu hastalar operasyonel olarak iyileşebilir ve daha fazla tedaviye ihtiyaç duymayabilir (Hehlmann, 2020; Hochhaus ve ark., 2020). Uluslararası ölçekte (IS) BCR-ABL1 olarak ifade edilen KML tedavisi kilometre taşları Tablo 7'de özetlenmiştir.

Tedavinin 3., 6. ve 12. aylarında BCR-ABL1 transkript seviyelerinin IS ile izlenmesi sayesinde mevcut tedavinin devam ettirilmesi (optimal yanıt), değiştirilmesi (başarısızlık/direnç) veya hastanın özelliklerine, eşlik eden hastalıklara ve toleransa (uyarı) bağlı olarak devam ettirilmesi veya değiştirilmesi için dikkatlice değerlendirilmesi gerekip gerekmediği belirlenmektedir. TFR (tedavisiz remisyon) KML yönetiminin yeni ve önemli bir hedefidir. Hastaların önemli bir kısmı, mevcut TKİ'ler ile IS'de MR4 ve MR4.5'in BCR-ABL1 seviyeleri olarak tanımlanan

derin moleküler remisyona ulaşacaktır. MMR elde edilen hastalarda sağkalım %100'dür. Bu hastalarda progresyon sık görülmez (Hehlmann, 2020; Hochhaus ve ark., 2020).

Tablo 7. KML tedavisinde kilometre taşları (Hehlmann, 2020'den yararlanılarak hazırlanmıştır.)

Zaman	Optimal	Uyarı	Tedavi Başarısızlığı
Bazal	-	Yüksek risk ek kromozomal anomali, yüksek risk ELTS skoru	-
3. ay	$\leq\%10$	$>\%10$	$>\%10$ 1-3 ay içinde doğrulanırsa
6. ay	$\leq\%1$	$>\%1-10$	$>\%10$
12. ay	$\leq\%0.1$	$>\%0.1-1$	$>\%1$
Herhangi bir zaman	$\leq\%0.1$	$>\%0.1-1$, MMR kaybı*	$>\%1$, direnç mutasyonları, yüksek riskli ek kromozomal anomaliler

*MMR kaybı durumu, TFR'deki (tedavisiz remisyon) hastalar için başarısızlık anlamına gelir.

4.6.2. Kemoterapi

KML tedavisinde birçok tedavi seçeneği bulunmaktadır. Busulfan, KML için kullanılan en eski kemoterapilerden biridir. Geçmişte, busulfan lökosit sayısı $30 \times 10^9 /L$ 'nin altına düşene kadar uygulanmaktaydı. Tüm kemoterapilerde olduğu gibi, busulfanın da ciddi yan etkileri vardır. Bu yan etkiler arasında aplazi, pulmoner fibroz ve ciddi enfeksiyon bulunur. Kısa süreli hidroksiüre tedavisi, TKİ uygulamasından önce lökosit ve/veya trombosit seviyelerini düşürmek amacıyla

yüksek lökosit veya yüksek trombosit sayısına sahip KML hastalarına verilebilir. Hidroksiüre kullanımına bir diğer alternatif aferezdir, ancak bu nadiren kullanılır çünkü aferezden sonra lökositlerdeki azalma geçicidir. Günümüzde KML için kemoterapiler çoğunlukla TKİ'ler gibi daha etkili tedaviler lehine terk edilmiştir (Rinaldi ve Winston, 2023).

4.6.3. İnterferon Alfa

TKİ döneminden önce, IFN α kullanımı birinci basamak tedavi olarak baskındı. TKİ'lerin ortaya çıkmasından bu yana, IFN α birinci basamak tedavi olarak kullanılmamıştır çünkü TKİ'ler daha iyi sağ kalım ve daha iyi bir moleküler yanıt sağlar. Ancak, son zamanlarda yapılan birkaç çalışma, pegile edilmiş IFN α 'nın (PEG-IFN α) imatinib ile kombinasyonunun daha hızlı ve daha güçlü bir moleküler yanıt sağladığını göstermiştir (Rinaldi ve Winston, 2023).

4.6.4. Allojenik Kök Hücre Nakli

KML tedavisinde allojenik kök hücre naklinin (Allo-SCT) başlangıç tedavisi olarak kullanılması artık yaygın değildir, bunu yerini TKİ tedavisi almıştır. Allojenik kök hücre nakli, en az iki TKİ ile tedaviye yanıt vermeyen kronik fazdaki KML hastaları için düşünülebilir. Avrupa Tıbbi Onkoloji Derneği (ESMO) kılavuzlarına göre, kinaz alan bölgesinde T3151 mutasyonu olan kronik evre KML hastalarına ponatinib denemesinden sonra kök hücre nakli önerilmektedir. KML'nin son evresi olan blast kriz fazına dönüşüm riski yüksek olan hastalar kök hücre nakli için adaydır, çünkü blast kriz fazındaki kök hücre nakli ile tedavi başarısı zayıftır (Rinaldi ve Winston, 2023). Uzman görüşlerine göre, hastada ikinci basamak TKİ direnci durumunda uyumlu bir donör arayışı mümkün olan en erken zamanda başlatılmalıdır. Allo-SCT'yi gerçekleştirmek için ayrılan süre henüz belirlenmemiştir ve karar hastanın bireysel fayda-risk değerlendirmesine göre verilmelidir. Relapse olmayan mortalite oranı ve greft versus host hastalığı gibi çoklu transplantasyonla ilişkili riskler ve yüksek riskli ek kromozomal anomalilerin varlığı, hasta değerlendirmesinde dikkate alınması gereken faktörlerdir (Alves ve ark., 2021).

4.6.5. İmmünoterapi

BCR-ABL1, proteinase-3 ve WT-1 gibi KML'ye özgü antijenlere karşı bağışıklık tepkileri KML hastalarında tespit edilebilir ve bu da bağışıklık kontrolüne karşı duyarlılığı gösterir. Donör lenfosit infüzyonları, allojenik kök hücre nakli sonrasında relaps KML hastalarında uzun süreli remisyonları sağlayabilir. T hücresi bazlı immünoterapi kullanımıyla, KML'ye özgü bağışıklık tepkileri güçlendirilebilir ve hastaların uzun süreli TFR'ye ve hatta tam iyileşmeye ulaşma oranı artırılabilir (Alves ve ark., 2021).

4.6.6. Tirozin Kinaz İnhibitörleri (TKİ)

Tirozin kinaz inhibitörleri (TKİ'ler), BCR::ABL'nin adenosin trifosfat (ATP) bağlayıcı alanına bağlanır ve substratların fosforilasyonunu inhibe eder. Bu sayede BCR::ABL'nin lösemojenik sinyallemesini bloke eder. TKİ'ler, KML hastalarının ortalama yaşam beklentisini genel nüfusa yaklaşmasını sağladıkları için moleküler hedefli tedavi başarısına en güzel örneklerdendir (Yoshimaru ve Minami, 2023). Bir KML hastası için TKİ seçerken, birinci basamak bir TKİ'nin kullanımı için belirli kontrendikasyonlar olduğundan, eşlik eden hastalıklar dikkate alınmalıdır. Önceki veya eş zamanlı arteriovasküler hastalık, birinci basamak nilotinib ve üçüncü basamak ponatinib tedavisinde son derece kontrendikedir. Klinik anlamda imatinib veya bosutinib için güçlü bir kontrendikasyon bildirilmemiştir. Ancak, imatinib şiddetli böbrek yetmezliği olan hastalarda kesilmelidir. Plevral efüzyon, farklı serilerde %16-20 oranında dasatinib ile ilişkilidir. Dasatinib ile plevral efüzyon geliştirme risk faktörleri arasında hastanın ileri yaşı, günde iki kez 140 mg doz kullanımı, önceki veya eş zamanlı kalp/akciğer hastalığı veya otoimmün hastalıklar, hipertansiyon, hiperkolesterolemi ve ileri faz KML yer alır. Birincil bakımda solunum yetmezliği ve daha önce geçirilmiş veya eş zamanlı plöro-pulmoner bozukluklar dasatinib için güçlü kontrendikasyonlardır (Ciftçiler ve Haznedaroğlu, 2021). Tablo 8'de TKİ'lerinin türleri ve kaçınıcı nesil oldukları bilgisi yer almaktadır.

Tablo 8. Tirozin kinaz inhibitörleri (Vener ve ark., 2020'dan yararlanılarak hazırlanmıştır.)

Birinci Nesil TKİ (1GTKİ)	İkinci Nesil TKİ (2GTKİ)	Üçüncü Nesil TKİ (3GTKİ)
İmatinib	Nilotinib, Dasatinib, Bosutinib, Radotinib	Ponatinib

4.6.6.1. Birinci ve İkinci Basamak TKİ Tedavisi

KML'de birinci basamak tedavisi olarak kullanılan, FDA (Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi) ve EMA (Avrupa İlaç Ajansı) tarafından onaylanmış dört TKİ vardır; imatinib (Glivec®, Novartis veya jenerik), dasatinib (Sprycel®, Bristol-Myers Squibb), nilotinib (Tasigna®, Novartis) ve bosutinib (Bosulif®, Pfizer); ticari olarak temin edilebilmektedirler. Beşinci olarak radotinib (Supect®, Dae Wong Pharmaceuticals) yalnızca Güney Kore'de onaylanmış bir birinci basamak TKİ'dir. Gebelikte yeni tanı konulan KML vakaları hariç, birinci basamak KML tedavisi TKİ'dir (Hochhaus ve ark., 2020; Jabbour ve Kantarjian, 2024).

İmatinib mesilat, 2001 yılında FDA tarafından KML tedavisi için onaylanmıştır, BCR-ABL'yi hedef alan ilk küçük moleküldür, birinci nesil tirozin kinaz inhibitörüdür. Uluslararası kılavuzlarda önerildiği gibi kronik faz KML için birinci basamak tedavi seçeneğidir. BCR-

ABL'nin ATP bağlanma bölgesini bloke eder ve ayrıca, lösemi ile ilişkili sinyal iletim yollarının anormal aktivasyonunu spesifik olarak engeller. Çalışmalar, imatinib'in mikromolar konsantrasyonlarda çeşitli BCR-ABL reseptörlerinin, trombosit kaynaklı büyüme faktörünün (PDGFR), C-kit reseptörlerinin ve ARG tirozin kinazlarının otofosforilasyonunu etkili bir şekilde baskılayabileceğini göstermiştir (Pan ve ark., 2022).

İmatinibin standart dozu günde bir kez 400 mg'dır. Kronik fazda 400 mg doz tolere edilemiyorsa ve tedavi yanıtı optimumsa 300 mg'lık doz kullanılabilir. Akselere faz hastalarında günde iki kez 400 mg'lık doz kullanılabilir, ancak daha ileri faza geçme potansiyeli olan hastalarda ikinci nesil TKİ'ye (2GTKI) geçiş önerilir (Hochhaus ve ark., 2020). İmatinib, blast faz KML'de ve Ph + akut lenfositik lösemi (ALL) tedavisi için ideal değildir ve %50-70'lik bir etki oranı vardır; blast faz KML hastalarının yaklaşık %60'ı ve ALL hastalarının neredeyse tamamı tedaviden sonraki haftalar veya aylar içinde nüks eder (Pan ve ark., 2022).

İmatinib tedavisini takiben, 3 ve 6 aydaki erken moleküler yanıt oranları ($BCR-ABL1 \leq \%10$ IS) %60 ile %80 arasında değişmektedir. İmatinib kullanımı için kesin bir kontrendikasyon bildirilmemiştir ve düşük kardiyak ejeksiyon fraksiyonu ve düşük glomerüler filtrasyon hızı olan hastalar ilgili organ toksisitesi açısından yaşamı tehdit eden hiçbir komplikasyon ortaya çıkmamıştır. Zayıf toleransın en sık görülen nedenleri erken sıvı tutulumu, periferik ödem, gastrointestinal semptomlar ile anormal sindirim sistemi, kas krampları, eklem ağrısı, fosfat azalması, cilt döküntüsü ve yorgunluktur. Bu olumsuz olaylar genellikle zamanla veya kısa bir ilaç tatilinden sonra düzelir. MMR'ye ulaşan hastalarda doz azaltımı düşünülebilir (Hochhaus ve ark., 2020; Pan ve ark., 2022). Birinci basamak tedavi için bir diğer strateji olarak, daha yüksek dozda imatinib kullanımı veya TKİ'yi IFN-a gibi ek bir ajanla birleştirme söylenebilir (Jabbour ve Kantarjian, 2022).

İmatinib ile sürekli tedavi edilen KML hastalarının yaklaşık %90'ı, KML'si olmayan kişilerle benzer bir sağ kalım oranına sahiptir. Bununla birlikte, hastaların kalan %10'u, moleküler bir yanıt elde edememe sonucu imatinibe direnç gösterir; bu hastalar genellikle dasatinib veya nilotinib gibi ikinci nesil bir TKİ ile tedavi edilebilir (Rinaldi ve Winston, 2023).

Gleevec'in patenti sona erdikten sonra imatinib jenerikleri yakın zamanda piyasaya sunulmuştur (Jabbour ve Kantarjian, 2022). Birinci basamak tedavinin seçimi için ek olarak dikkat edilmesi gereken faktörler; tedavinin amacı (sağkalım veya tedavisiz remisyon), KML risk kategorisi, hastada eşlik eden hastalıklar, TKİ maliyeti ve hasta için karşılanabilirliğidir. Birinci basamak KML tedavisinde tedavinin son noktası olarak genel sağ kalım (OS) düşünüldüğünde, bir

TKİ'nin tedavi değeri veya maliyet-faydası önem kazanır. Bu amaçla, jenerikler (jenerik imatinib) en iyi tedavi değerini sağlar. (Senapati ve ark., 2023). Yapılan çoğu araştırmada, jeneriklerin hem yeni teşhis konan hastalarda hem de imatinibden geçişten sonra etkinlik ve güvenlik açısından imatinibe benzer sonuçlar verdiği gösterilmiştir. Farklı ülkelerde farklı jeneriklerin mevcut olduğu gerçeğine dayanarak, etkinlik ve toksisite ile ilgili bazı çelişkili bulguların üretici değişkenliğinden kaynaklandığı söylenebilir. Jeneriklerin satışa sunulması, markalı imatinibin küresel olarak fiyatını düşürmüştür; bu, imatinibin daha uygun fiyatlı ve erişilebilir olmasını sağlamıştır. Avrupa Lösemi Ağı'nın 2020 önerilerine göre jenerik imatinib, kronik faz KML hastalarında en uygun maliyetli birinci basamak tedavi seçeneği olarak kabul edilmiştir (Erçalışkan ve ark., 2021).

İkinci nesil TKİ'ler (2G-TKI'ler: nilotinib, dasatinib, bosutinib, radotinib) ikinci basamak KML tedavisinde kullanıldığında, sonuçlar imatinibe göre daha hızlı yanıt verdiklerini ve semptomların hafifletilmesiyle sonuçlanan daha yüksek potansiyeli göstermiştir; bu, 2G-TKI'lerin birinci basamak tedavi olarak da kullanılmasını sağlamıştır. Randomize çalışmaların 5 ve 10 yıllık verilerine göre 2G-TKI ile sağkalım, birinci basamak imatinib ile benzer bulunmuştur. Ancak 2G-TKI'ye bağlı yüksek yan etki oranları (örneğin dasatinib ile tedavi edilen KML hastalarının %25'inden fazlasında plevral efüzyonlar ve nilotinib ile tedavi edilen KML hastalarında 10 yılda %25'e kadar doğrusal artışla ciddi vasküler olaylar) 2G-TKI'nin birinci basamak tedavide kullanılmasına karşı bir argüman sunmaktadır. Hastaların ikinci basamak tedavisi için ilaç seçimi 2G-TKI'nin komorbiditeleri ve yan etkileri göz önünde bulundurularak dikkatlice yapılmalıdır. İmatinib'e karşı başarısızlık durumunda, tedavi değişikliği yapmak zorunludur ve BCR-ABL1 kinaz alanı mutasyonlarının varlığı ve türü araştırılarak yapılmalıdır. 2G-TKI'nin tedaviye yanıt kriterleri, birinci basamak tedaviyle aynıdır (Hehlmann, 2020).

Nilotinib, günde iki kez 150 mg veya günde iki kez 200 mg dozda uygulandığında imatinib ile gözlemlenenden yaklaşık 25 kat daha güçlü şekilde BCR-ABL'yi inhibe eden bir 2GTKI'dir. Bu ilacın yan etkilerini gösteren çalışmalar, toplam bilirubin, akut pankreatit, diyabet, kardiyovasküler olaylar ve özellikle bir tür "metabolik sendromun" gelişmesinde artışlar olduğunu bildirmiştir. Bu nedenle nilotinib tedavisi için seçilen hastaların kardiyovasküler risk faktörleri açısından sürekli izlenmesi ve değerlendirilmesi gerekmektedir (Sampaio ve ark., 2021). Kinaz alanında F317L/V/I/C, T315A, V299L mutasyonları varlığında Nilotinib önerilir (Hochhaus ve ark., 2020).

Dasatinib, PDGFR ve KIT'e ek olarak, tirozin kinazın Src ailesinin birkaç üyesini inhibe ettiği için "çift inhibitör" olarak adlandırılan bir 2GTKI'dir. 3-6 saatlik yarı ömre sahiptir ve imatinib'den yaklaşık 325 kat daha güçlüdür; imatinib'e ve diğer ikinci ve üçüncü nesil TKİ'lere karşı direnç olduğu zaman kullanılması önerilmektedir. İmatinibe dirençli BCR-ABL1 mutasyonları olan Y253H, E255V/K, F359V/I/C'e karşı etkilidir. Ancak dasatinibin pleuro-pulmoner toksisitesi vardır, bu yüzden daha önce pleuro-pulmoner hastalık geçirmiş olmak güçlü bir kontrendikasyondur. Kronik fazdaki hastaların 100 mg/gün dozdan 50 mg/gün doza düşürülmesi toksisiteyi azaltabilir (Hehlmann, 2020; Sampaio ve ark., 2021).

Bosutinib, güçlü bir çift SRC/ABL kinaz inhibitörü olan 2GTKI'dir. İlk olarak, önceki TKİ tedavisine karşı direnç ve/veya intolerans geliştikten sonra kronik faz KML hastalarını tedavi etmek için günlük 500 mg doz olarak onaylanmıştır. Yakın zamanda kronik faz KML hastalarının birinci basamak tedavisi olarak günlük 400 mg doz şeklinde onaylanmıştır (Jabbour ve Kantarjian, 2024). Çalışmalar, bosutinibin T315I veya V299L ABL kinaz alanı mutasyonu barındırmayan dirençli KML'nin tüm hastalık evrelerinde tedavisinde etkili olduğunu göstermektedir. Diğer TKİ'lerden inhibitör potansiyeli açısından ayıran temel faktör, PDGFR veya KIT'i bloke etmemesidir. Önceki TKİ'lere kıyasla nispeten daha düşük bir toksisiteye sahiptir; yan etkileri genellikle gastrointestinal bozukluklardır, hastaların yaklaşık %20'sinde döküntü gibi cilt belirtilerine ve eklem ağrısına yol açtığı belirlenmiştir. Ek olarak, bosutinibin imatinibe benzer şekilde güvenli bir kardiyovasküler profile sahip olduğu gösterilmiştir (Sampaio ve ark., 2021). NCCN veya ELN'de bosutinib için kontrendikasyon olarak herhangi bir komorbidite bildirilmemiştir (Özdemir ve ark., 2022).

Radotinib, ELN kılavuzuna göre yalnızca Güney Kore'de onaylanmıştır, NCCN kılavuzunda yer almamaktadır (Özdemir ve ark., 2022). Radotinib, yeni teşhis konmuş KML hastaları ve en az bir TKİ'ye dirençli olanlar için endikedir. BCR-ABL kinazını inhibe etmenin yanı sıra daha yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında PDGFR α , PDGFR β , ckit ve SRC gibi diğer kinazları da inhibe eder. Ancak bu ilaç, T315I'ye karşı tutarlı bir etkinlik göstermez (Sampaio ve ark., 2021). Radotinib, dasatinib, nilotinib ve bosutinib randomize çalışmalarda imatinibe karşı test edilmiştir, hiçbir zaman birbirlerine karşı test edilmemişlerdir. Bu denemelerin sonuçları, bu TKİ'lerin birinci basamak ortamında onaylanması için temel oluşturmuştur (Hochhaus ve ark., 2020).

4.6.6.2. Üçüncü Basamak TKİ Tedavisi

12 ay veya sonrasında BCR::ABL1 transkriptlerinin (IS) %1'den fazla olması olarak tanımlanan direnç, KML direncinin ve TKİ tedavisinin değiştirilmesi gerekliliğinin açık bir göstergesidir. Bir hastada ikinci/sonraki tedavide (veya birinci basamak tedavi olarak) ikinci nesil TKİ'ye karşı direnç geliştirdiğinde, bir yönlendirici mutasyon olmadığı sürece başka bir ikinci nesil TKİ'ye geçiş endike değildir, çünkü düşük sitogenetik/MR oranları verir. Bu tür hastalarda üçüncü nesil TKİ'ye geçmek daha iyidir (Jabbour ve Kantarjian, 2024).

Üçüncü nesil tirozin kinaz inhibitörü (3GTKI) olan ponatinib, T315I mutasyonlu KML'ye karşı aktivite gösteren ilk TKİ'dir. Son derece etkili bir ABL1 inhibitörüdür, ABL1'e yüksek afiniteli bağlanma ve tüm kinaz alanı nokta mutasyonlarına karşı etkin olma özelliklerine sahiptir (Braun ve ark., 2020). Ponatinib, ikinci nesil bir TKİ'ye dirençli hastalarda en iyi TKİ olarak günlük standart 45 mg dozda tercih edilmelidir (Jabbour ve Kantarjian, 2024). Ponatinib'in yaygın olarak döküntü ve hipertansiyon yan etkisi vardır; pankreatit, hepatik toksisite gibi izlenmesi gereken toksisiteleri vardır, arterio-oklüzif ve vazo-oklüzif olaylar, refrakter hipertansiyon gibi önlenmesi gereken toksisiteleri vardır (Senapati ve ark., 2023).

KML tedavisi için bir sonraki üçüncü nesil TKİ, 2021'de FDA tarafından onaylanan asciminib olmuştur. Asciminib, ABL1'in miristoil cebine bağlanmayı ve aşırı kinaz aktivitesini allosterik olarak inhibe etmeyi içeren yeni bir mekanizmaya sahiptir. Asciminib, daha önce $\geq$ 2GTKI'ye maruz kalmış veya T315I mutasyonu olan kronik faz KML hastaları için uygundur (Senapati ve ark., 2023). Klinik öncesi çalışmalar, asciminibin T315I dahil olmak üzere birçok BCR-ABL1 nokta mutasyonuna karşı aktivite gösteren güçlü ve oldukça seçici bir ABL1 inhibitörü olduğunu göstermiştir (Braun ve ark., 2020). ABL1 TKİ'leri tamamen BCR:ABL1'e özgü değildir, bu sebeple hedef dışı etkileriyle birden fazla tirozin kinazı inhibe ederler. Bu mekanizma, tedavinin kesilmesine neden olabilecek istenmeyen olayların (advers olay, AE) gelişmesine yol açar. Asciminib'in yapısı gereği, hedef dışı kinaz inhibisyonundan kaynaklanan AE'lere neden olma olasılığı daha düşüktür (Ureshino ve Kimura, 2024).

Olverembatinib (HQP1351), hücre hatlarında hem wild tip (vahşi tip) BCR::ABL1'i hem de T315I mutasyonlu BCR::ABL1'i inhibe etme potansiyelini gösteren yeni bir üçüncü nesil TKİ'dir; T315I mutasyonlu kronik faz KML'de veya akselere faz KML'de TKİ dirençli KML'li yetişkinlerin tedavisi için 2021'de Çin'de onaylanmıştır (Senapati ve ark., 2023). Olverembatinib'in farmakokinetik profili, alternatif gün dozlamaya uyumludur. Yapılan klinik çalışmalarda, olverembatinibin, ponatinib veya asciminib direnci veya intoleransı olanlar dahil

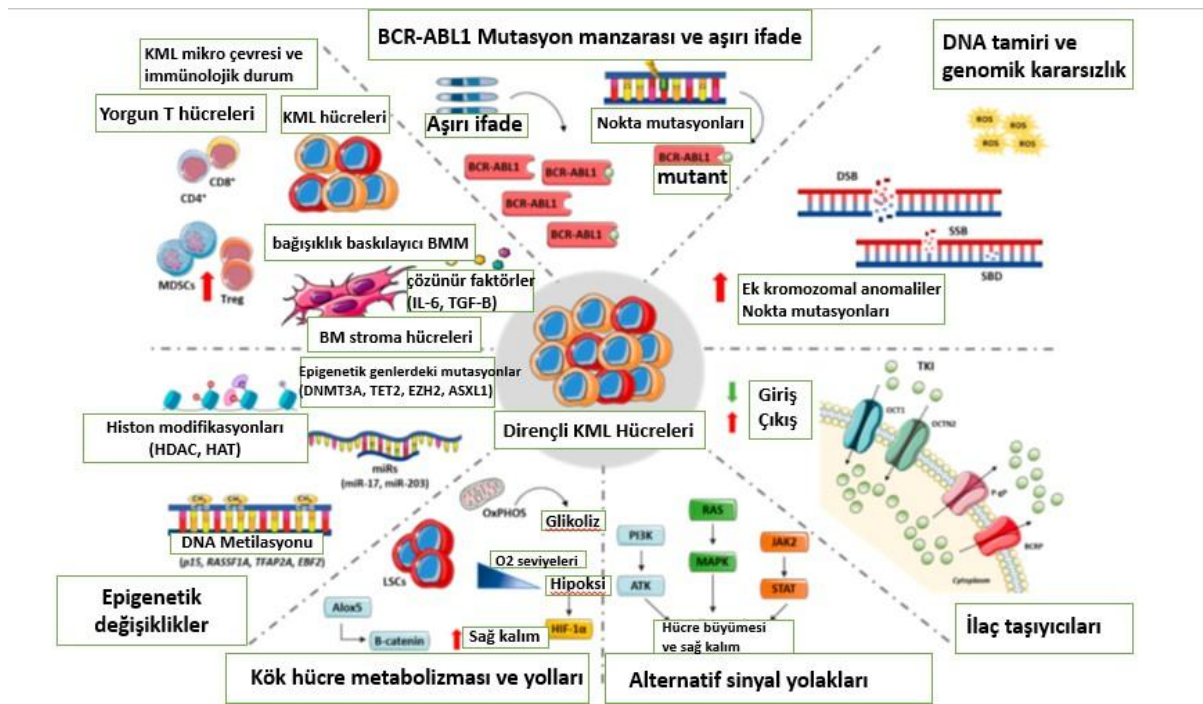
olmak üzere, yoğun şekilde önceden tedavi görmüş KML hastalarında güçlü antilösemik etkiler gösterdiği ve iyi tolere edildiği saptanmıştır, günlük dozu 40 mg olarak kullanılmaktadır (Kantarjian ve ark., 2025).

4.7. KML’de Tedavi Direnci

Kronik faz KML’li ve optimum moleküler yanıt elde etmiş ve sürdürmüş çoğu hasta için tedavi yönetimi kolaydır; hastalarda optimum moleküler hedeflere ulaşılmasını ve sürdürülmesini sağlamak, ilaç yan etkilerini yönetmek, ilaç uyumunu izlemek ve ilaç kaynaklı organ toksisitelerini en aza indirmek için dikkatli olmak gerekir. Ancak tedavi yanıtının uç noktalarında yönetim daha karmaşık hale gelir. Birkaç yıl boyunca derin moleküler yanıt (DMR) elde eden ve sürdüren hastalar, tedavi gerektirmeyen remisyon (TFR) için aday olarak kabul edilir, ancak tedavi gerektirmeyen remisyon aşamasına geçmek için kapsamlı bir şekilde hastanın uygunluğunu incelemek ve hastaya gerekli eğitimi vermek gerekir. Ayrıca, tedavi sonlandırıldıktan sonra sık izlem ve moleküler nüksetmeyi araştıran yüksek derecede dikkatli bir tutum esastır (Hughes ve Shanmuganathan, 2022).

Tedavi yanıtı spektrumunun diğer ucunda, en az 2 tane tirozin kinaz inhibitörüne veya sadece 1 tane ikinci nesil TKİ’ye (2G-TKI: nilotinib, dasatinib, bosutinib, radotinib) yönelik tedavi başarısızlığı olması, optimal yanıtların en üst düzeye çıkarılması ve ayrıca hastalığın ilerlemesinin ve TKİ kaynaklı toksisitenin önlenmesi hedefi vardır. Bir veya daha fazla 2G-TKI’ye yönelik tedavi başarısızlığı, spesifik ABL1 kinaz alanı (KD) mutasyonlarının ortaya çıktığı durumlarda başka bir 2G-TKI’ye geçilerek kurtarılabilir. Dolayısıyla tedavi yönetimini belirleyen önemli bir unsur, tedavi direncidir. KML tedavisinde birincil direnç, tedavinin erken evrelerinde TKİ’ye karşı hematolojik, sitogenetik veya moleküler yanıt eksikliğini ifade etmektedir; ikincil direnç ise bir hastada belirli bir terapötik yanıt derecesine ulaştıktan sonra gelişen yanıt kaybını ifade etmektedir (Hughes ve Shanmuganathan, 2022; Sun ve ark., 2024). Bazı hastalar tam hematolojik yanıtı (CHR: periferik kan sayımlarının normalleşmesi ve splenomegali ve KML ile ilişkili semptomların çözülmesi), tam sitogenetik yanıtı (CCyR: 20 kemik iliği hücresinin analizine dayalı %0 Ph+ metafaz) ve majör moleküler yanıtı (MMR: BCR::ABL1’in IS değerinin %0,1 olması) kaybeder, bu duruma birincil direnç denir. Bazı hastalar tedavi yanıtını kaybeder ki bu duruma ikincil direnç denir. Bazı hastalar ise TKİ tedavisinde kullandıkları ilacın türüne göre intolerans yaşamaktadır (Yoshimaru ve Minami, 2023).

En son Avrupa Lösemi Ağı (ELN) tedavi kılavuzları ve Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı (NCCN) KML Klinik Uygulama Kılavuzlarına göre klinik yanıtlar, "en iyi", "başarısızlık" ve "uyarı" şeklindedir. TKİ direnci açısından ELN 2020 önerilerindeki başarısızlık tanımına atıfta bulunarak KML tedavi yanıtının değerlendirilmesinde şu durumlar meydana geldiğinde "başarısızlık" tanımlanmaktadır; BCR-ABL IS, 1-3 ay içinde %10'dan fazla, TKİ tedavisinin 6. ayında %10'dan fazla, 12 aylık tedavide %1'den fazla veya 12 aylık tedaviden sonra herhangi bir zamanda %1'den fazla olursa, direnç mutasyonları varsa ve yüksek riskli ek kromozom anomalilerinin (ACA) ortaya çıkması durumunda. İkinci basamak tedavi için de aynı tanımlar önerilmektedir (Sun ve ark., 2024). Oldukça kompleks bir süreç olan KML tedavi direnci gelişim mekanizmaları Şekil 3'de özetlenmiştir.

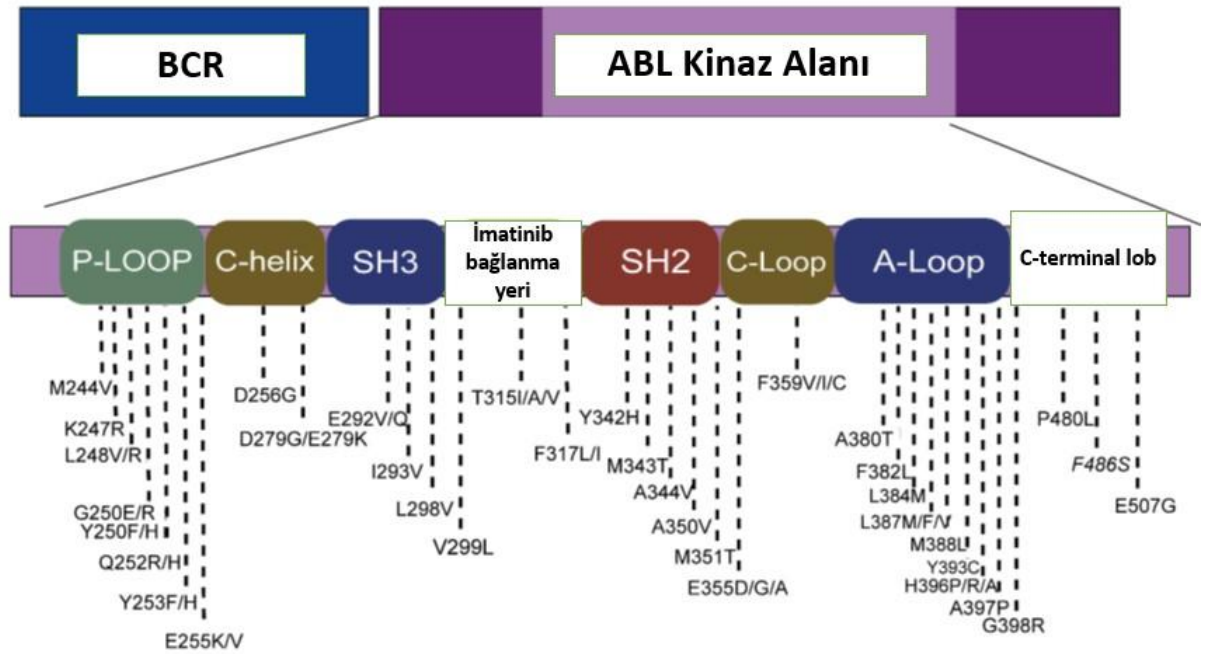


Şekil 3. KML'de TKİ direncinin moleküler mekanizmaları (Alves ve ark., 2021'den yararlanılarak hazırlanmıştır.)

TKİ direnci, ABL kinaz alanıyla ilişkili olup olmadıklarına bağlı olarak ABL'ye bağımlı ve bağımsız mekanizmalar tarafından yönlendirilebilir. Her iki mekanizma da klinik direnci tetikleyebilir, ancak ikincil direnç genellikle BCR-ABL mutasyonları, gen amplifikasyonu veya artmış ifade gibi ABL'ye bağımlı yolları içerir. ABL'den bağımsız direnç daha yaygın olarak birincil dirençte görülür, örneğin genomik olarak dengesiz, durgun lösemi kök hücreleri veya oral biyoyararlanımdaki farklılıklar, serum proteinlerinin imatinibe yüksek afinitesi ve hücresel giriş/çıkış taşıyıcıları nedeniyle imatinib kan konsantrasyonlarındaki bireysel farklılıklar gibi (Sun ve ark., 2024). KML'de TKİ direncinden sorumlu moleküler mekanizmalar şu şekilde

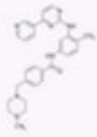
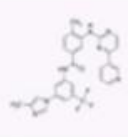
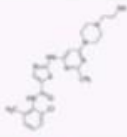
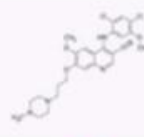
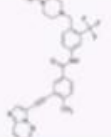
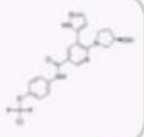
özetlenebilir: BCR-ABL1 mutasyonları ve BCR-ABL1 aşırı ekspresyonu; DNA hasarı onarımı ve genomik instabilitede değişiklik (ek kromozomal anomalileri ve nokta mutasyonlarının artışı); ilaç taşıyıcılarının aktivitesindeki değişiklikler; alternatif sinyal yollarının aktivasyonu (örn. PI3K/AKT, JAK/STAT ve RAS/MAPK); lösemi kök hücre metabolizmasında ve yollarındaki değişiklikler (örn. metabolik kayma, Hipoksi/HIF-1 α ve Alox5/ β -katenin); epigenetik değişiklikler (epigenetik düzenleyici genlerdeki mutasyonlar ve bazı genlerde artan metilasyon); mikro RNA'ların (örn. miR-17 ve miR-203) değişen ifadesi; mikroçevre ve immünolojik durumdaki değişiklikler. Bu mekanizmalar KML hastalarında direnç sebebiyle tedavi değişikliğine gidilmesini tetikler (Alves ve ark., 2021).

BCR::ABL1 kinaz alanı mutasyonları, TKİ direncinin en önemli mekanizması olmaya devam etmektedir. Genomik mutasyonlar ve dizi yeniden düzenlemeleri, tedavi yanıtını etkileyebilecek ve ilaç direncine ve hastalığın ilerlemesine katkıda bulunabilecek mekanizmalardır (Yoshimaru ve Minami, 2023). Şekil 4'de bu mutasyonlar gösterilmektedir.



Şekil 4. Kinaz alanı nokta mutasyonları (Sun ve ark., 2024'den yararlanılarak hazırlanmıştır.)

TKİ direnç mutasyonları ve yapıları Şekil 5'de özetlenmiştir, ABL1'in TKİ ile komplekslenmiş kimyasal yapı ve yayınlanmış X-ışını kristalografik yapısı gösterilmiştir. Mutasyonların belirli bir TKİ'ye karşı güçlü dirençle ilişkili olduğu kalıntılar kırmızıyla gösterilirken, daha düşük direnç dereceleriyle ilişkili olanlar turuncuyla listelenmiştir (Braun ve ark., 2020).

İNHİBİTÖR	Imatinib	Nilotinib	Dasatinib	Bosutinib	Ponatinib	Asciminib
KİMYASAL YAPI						
KRİSTAL YAPI						
BAĞLAYICI KONFOR-MASYON	İNAKTİF	İNAKTİF	AKTİF	İKİSİ BİRDEN	İNAKTİF	ABL MİRİSTOİL CEBİ
DİRENÇ	Y253 Q252 E255 F317 T315 M351 M244 M355 L248 F359 G250 H396	T315 L248 Y253 E255 F359	T315 V299 F317	T315 V299 L248 G250 E255 F317	T315 E255	A337 W464 P465 V468 I502

Şekil 5. TKİ direnç mutasyonları ve yapıları (Braun ve ark., 2020'den yararlanılarak hazırlanmıştır.)

BCR::ABL1 kinaz alanı mutasyon testi ile belirlenen mutasyonlar, imatinibe direnç geliştikten sonra tedavide kullanılacak ikinci nesil tirozin kinaz inhibitörlerinden (2G TKI) birini veya üçüncü nesil tirozin kinaz inhibitörlerinden ponatinib seçimini etkiler; böylece klinik karar vermeyi destekler. Tedavi başarısızlığı durumunda, tedavi değişikliği zorunludur ve BCR::ABL1 kinaz alan mutasyon testinin temel amacı, etkili olma olasılığı düşük tirozin kinaz inhibitörlerini dışlamaya yardımcı olmaktır (Soverini, 2023). İkinci ve üçüncü nesil tirozin kinaz inhibitörlerine karşı dirençle güçlü bir şekilde ilişkilendirilen mutasyonlar ve mutasyon varlığı durumunda seçilmemesi gereken TKİ'ler Tablo 9'da listelenmiştir.

Tablo 9'da, tespit edildiğinde bir veya daha fazla 2G TKİ veya ponatinibi karar algoritmasından hariç tutmayı gerektiren mutasyonların listesi yer almaktadır. V299L, T315A, T315L ve T315M dışındaki tüm mutasyonlar imatinibe de dirençlidir. Asciminib, in vitro veya in vivo verilere dayalı bazı mutasyonlar için parantez içinde yer almaktadır. Bu liste, asciminib direnç mutasyonları tamamen açıklığa kavuşturulduğunda büyüyecektir. Tablo 9'da listelenenlerin dışındaki mutasyonların varlığında tedavi seçerken, KML hastasının eşlik eden hastalıkları, risk

faktörleri ve terapötik son noktalarıyla ilgili klinik değerlendirmelerin de göz önünde tutulması gerekir (Soverini, 2023).

Tablo 9. İkinci ve üçüncü nesil TKİ'lerine dirençli mutasyonlar (Soverini, 2023'den yararlanılarak hazırlanmıştır.)

Mutasyon	Kontrendike TKİ(ler)
Y253H	Nilotinib
E255K	Nilotinib, bosutinib
E255V	Nilotinib
V299L	Dasatinib, bosutinib
T315I	Dasatinib, nilotinib, bosutinib
T315A	Dasatinib
T315L	Ponatinib (asciminib?)
T315M	Ponatinib (asciminib?)
F317L	Dasatinib
F317V	Dasatinib
F317I	Dasatinib
F317C	Dasatinib
F359V	Nilotinib (asciminib)
F359I	Nilotinib (asciminib)
F359C	Nilotinib (asciminib)

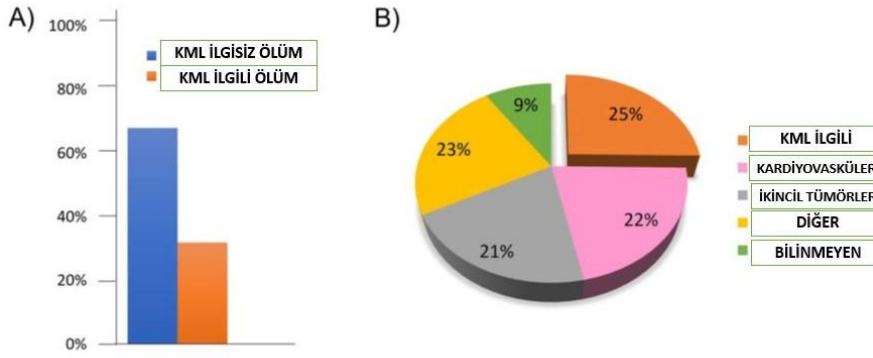
Mutasyona göre ilaç seçimi özetlenecek olursa, hastanın Y253H, E255K/V veya F359C/V mutasyonları varsa dasatinib veya bosutinibi tercih edilebilir. Alternatif olarak, V299L ve F317L mutasyonlarının varlığında nilotinib tercih edilebilir. Bu mutasyonların olmadığı hastalarda, seçim önceden var olan koşullara, toksisite profillerine ve maliyete göre

yapılmalıdır. Kılavuz mutasyonları olmayan veya T315I mutasyonu olan ikinci nesil TKİ'ye dirençli hastalarda, üçüncü nesil TKİ ve allo-HSCT tedavisinin dikkate alınması endikedir (Jabbour ve Kantarjian, 2024).

4.7.1. KML’de Dirençle İlişkili Gen Ekpresyon Profili

KML'nin görülme sıklığı dünyanın yüksek sosyo-demografik indeks (SDI) bölgelerinde belirgin şekilde düşmüştür ancak düşük ve düşük-orta SDI ülkelerinde durumun böyle olmadığına dair üzücü kanıtlar bulunmaktadır. KML hastaları artık KML'den ziyade, eş zamanlı hastalıklardan vaefat etmektedir, Yetişkin Eş Zamanlı Hastalık Değerlendirmesi-27 (ACE-27) puanı tanı sırasında risk değerlendirmesinde yardımcı olabilir, komorbidite yükünü değerlendiren bir endekstir. Charlson Komorbidite İndeksi (CCI), komorbiditesi olan kanser hastaları için genel sağ kalım tahmininde kullanılır. Yüksek CCI ve ACE-27'li hastaların TKİ tedavisi sırasında istenmeyen ilaç reaksiyonlarının gelişimine dair izlenmesi gerekir. Ayrıca hastanın yaşam tarzı, yaşı, cinsiyeti, tedaviye uyumu ve eşlik eden hastalıklar sosyal ve finansal destek gibi kritik risk faktörleri de tedavi süreci kapsamındadır (Shahrin ve ark., 2022).

Şekil 6’da çeşitli TKİ tedavisi gören KML hastalarında ölüm nedeninin çoğunlukla KML dışındaki nedenlerle ilişkili olduğu gösterilmektedir. Şeklin B’deki pasta grafiği, KML ile ilgisi olmayan ölüm nedenlerini göstermektedir. KML ilerlemesinden veya nakil komplikasyonlarından kaynaklanan KML ile ilişkili ölüm, ölüm nedenlerinin dörtte birini oluşturmaktadır. Diğer ölüm nedenleri arasında sepsis, terminal böbrek yetmezliği, beyin kanaması ve zatürre yer almaktadır. Kardiyovasküler hastalıklar, kalp yetmezliği, miyokard enfarktüsü, serebral felç ve kalp aritmilerini kapsamaktadır. İkincil tümörler prostat, kolon, meme, akciğer ve mesane kanserlerini içermektedir (Shahrin ve ark., 2022). KML'nin hastalık ilerlemesinden sorumlu moleküler mekanizmalar kesin değildir. KML'de hastalık evrimiyle ilişkili temel işlevsel değişiklikler şöyle sıralanabilir; yüksek proliferasyon oranı, azalmış apoptoz, diferansiyasyonun blok edilmesi ve kemoterapötik ajanlara, TKİ'lere karşı güçlü dirençtir (Chandran ve ark., 2019).



Şekil 6. KML’de eşlik eden hastalıkların genel sağ kalımı üzerindeki etkisi (Shahrin ve ark., 2022’den yararlanılarak hazırlanmıştır.)

TKİ’lere karşı direnç hem BCR-ABL1’e bağımlı hem de BCR-ABL1’den bağımsız yollarla ortaya çıkar, BCR-ABL1’e bağımlı mekanizmalar TKİ bağlanmasını önleyen ABL kinaz alanındaki mutasyonlar, BCR-ABL1 onkogeninin amplifikasyonu, BCR-ABL1 mRNA’sının yüksek ekspresyon seviyeleridir; BCR-ABL1’den bağımsız mekanizmalar ise ilaç akış pompalarının yukarı regülasyonu, ilaç akış taşıyıcılarının aşağı regülasyonu, Lyn aşırı ekspresyonu (Src ailesi kinaz proteini), sinyal transdüktörü ve transkripsiyon aktivatörü 3 yolu, fosfotidilinositol-3 kinaz/protein kinaz B/memeli rapamisin hedefi yolu ve fibrosarkom/mitogenle aktive olan protein kinaz/hücre dışı reseptör kinaz yolu gibi hayatta kalma yollarının aktivasyonudur. Son mekanizmalar çoğunlukla KML lösemik kök hücrelerinin (LSC’ler) TKİ’lere olan direncini açıklar (Yurttaş ve Eşkazan, 2020).

Sokal ve Hasford skorları imatinib öncesi dönemde geliştirilmiştir, TKİ tedavisinin sonuçlarını zayıf bir şekilde tahmin edebilmektedir, EUTOS skoru ise daha güvenilir bir tahmin sağlamaktadır. Ancak bazı çalışmalarda bu üç skorlama sisteminin de imatinib tedavisine karşı tam sitogenetik yanıt ve sağkalım durumunu özellikle avrupa dışı popülasyonlarda tahmin etmede doğru bir şekilde çalışmadığı ifade edilmektedir. Şu anda, sonucu daha iyi tahmin etmek için "daha derin ve daha erken yanıt" kuralını kullanmak daha revaçtadır, ancak bu yaklaşımın dezavantajı yalnızca tedaviye başladıktan sonra geç tahmine izin vermesidir. Birincil imatinib direncinin farklı genetik faktörlerle ilişkili olduğu bilinmektedir, TKİ direnciyle ilişkili genlerde çeşitli polimorfizmler ve mutasyonlar bildirilmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda genlerle ilgili parametrelerin dirençle ilişkilendirilmesine yönelik yaklaşımlar olmuştur, örneğin TKİ uygulamasından önce birincil KML hastalarında tüm ekzom dizilimi ile optimal yanıt verenler/vermeyenler için tipik genetik varyantlar belirlenmiştir; ekzom, transkriptom ve miRNA analizi ile TKİ etkinliği arasındaki ilişki araştırılmıştır (Lavrov ve ark.,

2019). KML'deki primer imatinib direncini tahmin edici belirteçlerinin, sekonder imatinib direncindekilerden farklı olduğunu vurgulayan çalışmalar da vardır (Zhang ve ark., 2009).

KML hastalarında gen ifadesi değişiklikleri ve hastalığın ilerlemesi üzerindeki etkileri üzerine yapılan çalışmalar mevcuttur. Örneğin kemoterapötik ajanlara karşı proliferasyon, apoptoz, farklılaşma ve dirençle ilişkili genlerin göreceli ifade profillerini analiz etmek için yapılan bir çalışmada anlamlı sonuçlar bulunmuştur; c-MYC, ABCB1, BCL-2'nin aşırı ekspresyonu ve BAD, C/EBP α - β 'nin aşağı regülasyonu gibi çeşitli aday genlerin karmaşık etkileşiminin, KML'de hastalık evriminde ve ilaç direncinin gelişiminde önemli bir rol oynadığı sonucuna varılmıştır (Chandran ve ark., 2019). Bir çalışmada, kök hücrelerin kendini yenilemesinde ve bakımında rol oynayan BMI-1 geninin, normal bireylerin örnekleriyle karşılaştırıldığında KML hastalarındaki ekspresyon seviyesinin arttığı gözlenmiştir; dolayısıyla bu genin KML ilerlemesini tahmin etmek için önerilebileceği ifade edilmiştir (Cosset ve ark., 2011).

Başka bir çalışmada, imatinib direnciyle ilişkili farklı şekilde ifade edilen bazı genlerin Bcr-Abl kinaz aktivitesinden bağımsız olarak canlılığı ve büyümeyi koruyan alternatif yolların aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir (Tipping ve ark., 2003). Farklı bir çalışmada, cDNA mikrodizi eksoresyon profili kullanımı ile, imatinib direnciyle ilişkili genlerin tanımlanmasına odaklanılmıştır; hücre adezyonunda (TNC ve SCAM-1), ilaç metabolizmasında (siklooksijenaz 1), protein tirozin kinazlarında ve fosfatazlarda (BTK ve PTPN22) yer alan genlerden bir gen seti oluşturularak BCR-ABL'den bağımsız mekanizmalarla ve %80 doğrulukla sitogenetik yanıtı ayırt edebilen bir tahmin modeline yer verilmiştir (Villuendas ve ark., 2006).

Polikomb baskılayıcı kompleksler (PRC'ler), histon modifikasyonlarını katalize eden, transkripsiyon mekanizmasında değişikliklere neden olan ve gen baskılanmasıyla sonuçlanan çoklu protein kompleksleridir. KML'de blast faza geçişe yol açan moleküler olayları açıklamak için yapılan bir çalışmada omik yaklaşımla, PRC1 ve PRC2 yollarında tekrarlayan mutasyonlar bulunmuştur; mutasyon, transkripsiyon ve epigenetik veri kümeleri entegre edilerek, blast faz öncüllerinin PRC tarafından yönlendirilen epigenetik yeniden programlamaya maruz kaldığı sonucuna varılmıştır. Özetle, PRC2 enzimi EZH2 tarafından blast faza özgü hipermetilasyon hücre farklılaşmasını engellerken, PRC1 katalitik proteini BMI1 hücre ölümünü engeller (Shahrin ve ark., 2022). Bir diğer çalışma sonucunda, KML tanısı sırasında sağlıklı gönüllülerle karşılaştırıldığında hastalarda SEPT5, RUNX1, MIER1, KPNA6 ve FLT3 genlerinin aşırı ifade edildiği; PAN3, TOB1 ve ITCH gen ifade seviyelerinin azaldığı saptanmıştır. KML'li dirençli hastalarda yanıt veren hastalara kıyasla TOB1'in azalmış ifadesi de gözlemlenmiştir ki bu

durumun, apoptozun düzensizliği ve dirence yol açan sinyal yolu ile ilişkili olabileceği ifade edilmiştir. Çalışmada KML direnciyle ilişkili olarak yeni tanımlanan genlerin çoğunun sağlıklı hücrelerde nükleer faktör κ B (NF- κ B), AKT, interferon ve interlökin-4 (IL-4) düzenlemesiyle ilişkili olduğu vurgulanmıştır (Mascarenhas ve ark., 2014).

Başka bir çalışmada, hücre kültür koşulları altında hem normal hem de KML progenitör hücrelerindeki genomik değişiklikler analiz edilmiştir; hücre döngüsü, steroid biyosentezi ve kromozom ayırımında yer alan birkaç genin yukarı düzenlendiğini, buna karşın transkripsiyon düzenlemesi ve apoptozda yer alan genlerin aşağı düzenlendiği saptanmıştır ve bu değişikliklerin hücre kültürüne imatinib eklenmesinden bağımsız olarak aynı olduğu belirlenmiştir, ayrıca KML ilkel hücreleri tarafından tercihen ifade edilen ve hücre zarı proteinlerini kodlayan PIEZO2, RXFP1 ve MAMDC2 genlerinin KML kök hücreleri için biyobelirteç olarak kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır (Avilés-Vázquez ve ark., 2017).

Birincil ve ikincil KML direnci üzerine yoğunlaşan bir çalışmada, bazı genlerin blast fazını kronik faz hastalığından ayırdığı, bazı genlerin yeni teşhis edilen KML'yi, ABL1 kinaz alanı mutasyonları olmayan TKİ dirençli KML'den ayırdığı, PTGS1 (prostaglandin-endoperoksit sentaz 1) geninin imatinibe yanıt verenleri birincil imatinib dirençli KML'den ayırdığı; ABL1 kinaz alanı mutasyonu olmayan ikincil imatinib direncini, imatinibe yanıt veren vakalardan ayıran 11 tane genin belirlendiği sonucu yer almaktadır (Zhang ve ark., 2009). KML'de bağışıklık durumunun değerlendirilmesine odaklanan bir çalışmada, KML grubunda TCR ζ geni ekspresyonunun sağlıklı birey ve tam remisyondaki KML gruplarına göre önemli ölçüde düşük olduğu, KML grubunda Fc ϵ RI γ ve ASF/SF-2 genlerinin önemli ölçüde daha yüksek eksprese edildiği bulunmuştur; TCR ζ 3'-UTR alternatif eklenmesinin özelliklerinin, KML için yeni bir immünolojik belirteç olabileceği vurgusu yapılmıştır (Zha ve ark., 2012).

KML kök hücrelerinde dipeptit türlerinin birikmesinin moleküler mekanizmalarını araştıran bir çalışmanın sonuçları, uzun vadeli kök hücrelerin, kısa vadeli kök hücrelerin, sağlıklı kontrolden ve KML'den etkilenen farelerden alınan progenitör hücrelerin transkriptom dizilemesi verilerine göre, bir dipeptit taşıyıcısı olan SLC15A2 ekspresyon seviyesinin yalnızca KML kök hücrelerinde yükseldiği; dipeptit türlerinin KML kök hücrelerinde SLC15A2 aracılığıyla biriktiğini gösterdiğini vurgulamaktadır (Kim ve ark., 2016). Bir çalışmada, İnterferon düzenleyici faktör-8 (IRF8) genindeki mutasyonların ve ifade kaybının immün yetmezlik ve KML ile ilişkili olduğu ifade edilmektedir (Tamura ve ark., 2015). Farklı bir çalışmada, gen sinyal dönüştürücüsü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) 5A'nın ve runt ilişkili transkripsiyon

faktörü 3'ün (RUNX3) ekspresyon artışının TKİ'lere karşı dirence neden olabileceği; normal miyeloid hücrelerde sitokin tarafından aktive edilen STAT5 proteininin, KML hastalarında sitokinler olmadan bile aktive edildiği ifadesi yer almaktadır (Putri ve ark., 2019).

KML'de hastalığın ilerlemesi veya TKİ direncinin potansiyel biyobelirteçleri olarak hizmet edebilecek farklı şekilde ifade edilen genlere örnek olarak, lösemik hücrelerde HECT E3 ubiquitin ligaz HERC1'in aşağı regülasyonu, TKİ dirençli KML hücrelerinde FAM167A'nın indüklediği kanonik olmayan NF-κB yolunun aktivasyonu ve imatinib dirençli hastaların plazmasında ekzomal proteinler RPL13 ve RPL14'ün yukarı regülasyonu söylenebilir. Sessiz kök hücreler KML tedavisinde kullanılan TKİ'lere dirençlidir ve bu nedenle hastalığın ilerlemesi ve blast faza dönüşmesi için risk oluşturur. MS4A3 transmembran proteini KML progenitör hücrelerinde aşağı regüle edilerek hücre diferansiyasyonu önlenir; MS4A3'ün tedavide hedefli olarak verilmesi, farklılaşmayı indüklemenin ve dolayısıyla sessiz kök hücreleri ortadan kaldırmanın bir yolu olabilir (Shahrin ve ark., 2022).

Bir çalışmada, belirlenen 12 genin imatinib-duyarlı hastaları, BCR-ABL1 mutasyonları olmayan sekonder imatinib-dirençli KML'den ayırdığı; LYN, JAK2, PTPN22 ve CEBPA aşağı regülasyon durumunun blast faz örneklerinde de görüldüğü; sekonder imatinib direncinin bazı özelliklerinin blast faza dönüşümle örtüştüğü sonucuna varılmıştır. Farklı bir çalışmada, sekiz genin (IGFBP2, SRSF11, BAX, CDKN1B, BNIP3L, FZD7, PRSS57 ve RPS28) önceki KML TKİ direnci ve hastalık ilerlemesi çalışmalarının bulgularıyla kesiştiği; tanı örneklerinden elde edilen gen ekspresyon bilgilerinin, 24 ayda majör moleküler yanıt (MMR), 5 yılda MR4.5 ve meme kanseri dönüşümü dahil olmak üzere uzun vadedeki olayları tahmin edebileceği vurgulanmaktadır (Krishnan ve ark., 2022).

HDAC1 ve 2'nin düzenlenmesi, KML hücrelerinin hayatta kalmasının sürdürülmesinde esastır. HDAC1'lerin yukarı düzenlenmesi nedeniyle HAT'ler ve HDAC'ler arasındaki normal dengenin değişmesi, apoptozla ilişkili histon olmayan proteinler p53 ve Ku70'in anormal asetilasyon durumuna yol açar ve bu da BCR-ABL'den bağımsız imatinib direncini teşvik eder. Buna göre, tedavide TKİ'lere ek olarak HDACi AR-42 kullanımı, KML hücrelerinin imatinibe duyarlılığını artırabilir ve imatinib dirençli hücrelerde yukarı düzenlenen HDAC1 ekspresyonunu düzenleyerek imatinib direncini tersine çevirebilir. Ayrıca, KML ilerlemesiyle ilişkili olan ve hücre hatlarında ve ileri evre KML'li hastalarda gözlemlenen düşük protein tirozin fosfataz reseptör olmayan tip 6 (PTPN6) ekspresyon seviyesi, doğrudan bağlanma yoluyla HDAC1 tarafından düzenlenmesinden kaynaklanır. Ayrıca, TKi-HDACi

kombinasyonları TKİ direncinden sorumlu lösemik kök hücreleri ortadan kaldırma potansiyeline sahiptir (Lernoux ve ark., 2020).

Survivin, apoptozis düzensizliği ile hücre döngüsü ilerlemesi arasındaki arayüzde görevli bir apoptoz protein inhibitörüdür. KML'de yüksek survivin seviyeleri, hastalığın ileri evreleri ve tedavi direnci ile ilişkilendirilmiştir. KML'de survivin ile ilişkili maligniteyi etkisiz hale getirmek için tasarlanmış terapötik müdahaleler mevcuttur (Bernardo ve ark., 2020).

BCR-ABL1 transkriptinin ekspresyon seviyesi, BCR-ABL1 aracılı genetik instabilite, transkripsiyonu değiştiren proteinler, KML hastalarında değişen telomer uzunluğu ve hastalarda tespit edilen farklı gen ekspresyon seviyeleri dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar, KML'de hastalık ilerlemesinin nedeni olarak gösterilmiştir, ancak bu mekanizmalar doğrudan TKİ direncine bağlanmamıştır (Yurttaş ve Eşkazan, 2020). Bu tarz durumları inceleyen çalışmaların sonuçları literatür verileriyle birleştirildiğinde, KML'nin evrimini ve prognozunu değerlendirmek ve yeni terapötik hedefleri belirlemek için spesifik gen yolaklarının belirteç olabileceği düşünülmektedir.

4.7.1.1. Twist-1

Twist-1 (7p21), hücre çoğalmasında rol oynayan, ARF-p53'e bağlı yolağı ve dolayısıyla apoptozu inhibe eden heliks loop heliks (bHLH) ailesinin bir transkripsiyon faktörüdür, ayrıca miyeloid serilerle ilişkili transkripsiyon faktörlerini artırarak HSC'lerin miyeloid soya doğru farklılaşmasında rol oynar. BCR-ABL1, PI3K/Akt, JAK2, RAS/RAF ve B-katenin yollarını aktive eder; bu yollar TWIST-1'i aktive eder, BCR-ABL ve TWIST-1 arasında bu tarz bir moleküler ilişki olma ihtimali vardır (Heidari ve ark., 2018).

Embriyogenez, farklılaşmamış hücre çoğalması ve hücre sağ kalımında rol oynayan bir transkripsiyon faktörü olan Twist-1 ile ilgili olarak, KML hücre hatlarında genom çapında mikrodizi analizi yapılan bir çalışmada, diğer kanserlerde, olgunlaşmamış hücrelerde ve ilaç direnci olan hastalarda TWIST-1'in ekspresyon seviyesinin yükseldiği (Tipping ve ark., 2003); TWIST-1'in solid tümörlerde bildirildiği gibi KML'de de ilaç direncine katkıda bulunan seçici büyüme avantajı sağlayan bir sağ kalım faktörü görevi görebileceği ifade edilmiştir (Cosset ve ark., 2011).

Twist1 ve KML ilişkisini araştıran bir çalışmada hastalardan alınan KML hücrelerinde ve hücre hatlarında ekspresyon analizi yapılmıştır ve özellikle farklı bir tespit edilebilir TKİ direnç mekanizması olmayan sitogenetik dirençli KML hastalarında Twist1, direnç için öngörücü bir

belirteç olarak tanımlanmıştır. TKİ dirençli TWIST-1'i aşırı ifade eden hücrelerin, lösemik Ph+ kök hücrelerinden ortaya çıkabileceği; TWIST-1 aşırı ifadesinin BCR-ABL protein seviyelerinden bağımsız olduğu belirtilmiştir. Çalışma, TWIST-1'in KML hastalarında tanı anında ve ilerleme sırasında ve henüz bilinmeyen bir mekanizma aracılığıyla doğuştan imatinib dirençli hücrelerde düzensizleştiğini; BCR-ABL izleme ile TWIST-1'in KML tanısı anında ve rezidüel hastalık takibi sırasında TKİ direncinin erken tespiti için güçlü bir biyobelirteç olabileceğini göstermektedir (Cosset ve ark., 2011). Farklı bir çalışma, TWIST-1'in akut miyeloid lösemi (AML) ve kronik miyeloid lösemi (KML) hastalarının kemik iliği mononükleer hücrelerinde aşırı ekspresyon gösterdiği sonucuna ulaşıldığını; işlev kazanımı ve işlev kaybı analizleri ile TWIST-1'in AML ve KML hücre hatlarının hücre büyümesini, koloni oluşumunu ve ilaç direncini desteklediğini gösterdiğini belirtmektedir (Wang ve ark., 2015).

Twist1'in ilaç direnci üzerindeki etkilerini araştırmak için yapılan bir çalışmada K562 ve KCL-22 hücreleri imatinib direnci için modellenmiştir; bu modellenen hücrelerde Twist1 ekspresyonunun tekrar arttığı ve PI3K/AKT sinyal yolunun daha da aktive olduğu görülmüştür, Twist1 ekspresyonunun sessizleşmesinden sonra, imatinib dirençli KML hücrelerinin imatinibe karşı daha duyarlı hale geldiği ve PI3K/AKT sinyal yolunun inhibe edildiği ve p-AKT proteininin ekspresyon seviyesinin önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır. Çalışmada ayrıca imatinibin, PI3K/AKT sinyal yolunun aktivasyonu LY3023414 inhibitörü tarafından engellendikten sonra imatinib dirençli KML hücrelerinin büyümesi üzerindeki inhibitör etkisini artırdığı görülmüştür. Çalışmanın sonucu olarak, Twist1 ve PI3K/AKT sinyal yolunun, imatinibe dirençli KML hücrelerinin oluşumu sırasında aşırı aktive edildiği vurgulanmaktadır (Yuan ve ark., 2020).

4.7.1.2. HMGA2

Yüksek hareketlilik grubu proteini A2 (HMGA2), AT kancaları ve asidik bir kuyruk adı verilen üç DNA bağlayıcı alanla karakterize edilen küçük bir nükleer kromatin ilişkili proteindir. HMGA2'nin DNA'nın küçük oluğundaki AT açısından zengin kısımlara bağlanması, çeşitli transkripsiyon faktörlerinin işe dahil olmasını etkileyen DNA'nın konformasyonel değişikliklerini indükler. HMGA2 geni, çoğunlukla mezenkimal kökenli iyi huylu tümörlerde sıklıkla yeniden düzenlenen bir bölge olan 12q13-15'te bulunur, HMGA2 mimari bir protein olarak çeşitli genlerin transkripsiyonunu etkiler. HMGA2 embriyogenez sırasında yüksek oranda ifade edilir ancak bölünmeyen yetişkin hücrelerde neredeyse hiç tespit edilemez (Meyer ve ark., 2007).

HMGA2 geni, kromatin yeniden şekillenmesinde ve transkripsiyon düzenlemesinde rol oynayan HMGA protein ailesinin bir üyesini kodlar; solid tümörlerin birçoğunda aşırı eksprese edilir ve yukarı regülasyonunun potansiyel olarak tümör ilerlemesi ve kötü prognozla ilişkili olduğu düşünülmektedir (Marquis ve ark., 2018). HMGA2'nin yeniden ekspresyonu, ağız boşluğunun skuamöz hücreli karsinomları, meme kanseri, pankreas kanseri ve genellikle yüksek derecede kötü huylu bir fenotip ile ilişkili olan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri gibi çeşitli malignitelerinde tespit edilmiştir (Meyer ve ark., 2007). HMGA2'nin ekspresyonu, hTERT ekspresyonunu düzenleyerek, gelişmiş telomeraz aktivitelerine ve artan telomer uzunluğuna sahip hücrelerle sonuçlanır. HMGA2 ekspresyonunun, tümör oluşumu için telomer bakımının gerekli olması nedeniyle birçok insan kanserinde yukarı regüle edildiği bildirilmektedir (Li ve ark., 2011).

HMGA2'nin KML'de hastalık ilerlemesine katkısını inceleyen bir çalışmada, HMGA2 ifadesinin yukarı regülasyonunun, kronik fazdan blast faza doğru ilerlerken biriken lösemik hücrelerin farklılaşmamış fenotipi ile ilişkili olduğu; KML'nin blast faza ilerlemesinin genellikle artan BCR-ABL ekspresyonu ve genetik ve kromozomal anormalliklerin birikimiyle birlikte görüldüğü ve Philadelphia pozitif hücrelerde genetik bir dengesizlik olduğunu gösterdiği, bu genetik dengesizliğin nedensel olarak yüksek HMGA2 ekspresyon seviyeleriyle bağlantılı olabileceği vurgulanmıştır (Meyer ve ark., 2007). HMGA2'nin yüksek seviyelerde yeniden ekspresyonunun çeşitli kötü huylu tümörlerde görümesi, kısmen belirli hücre çoğalma genlerinin transkripsiyon aktivasyonundaki rollerinden kaynaklanıyor olabilir (Ozturk ve ark., 2014). HMGA2'nin anormal ekspresyonu HOXA9'a bağlı lösemogenez ve miyeloid lösemi fenotipini artırabilir (Tan ve ark., 2018).

4.7.1.3. EZH2

Epigenetik düzensizliğin miyeloid malignitelerin patogenezindeki önemi büyüktür. Zeste homolog 2'nin güçlendiricisi (EZH2), H3K27'nin trimetilasyonu yoluyla gen susturulmasından sorumlu olan Polikomb baskılayıcı kompleks 2'nin (PRC2) katalitik çekirdek bileşenidir (Rinke ve ark., 2020). Polycomb grubu proteinleri, normal ve kanser kök hücrelerinin çok yönlü düzenleyicileridir ve kök hücrelerin kendini yenileme ve ileriye yönelik kararlarının transkripsiyonel düzenlenmesinde rol oynarlar, histon modifikasyonları yoluyla gen susturulmasını teşvik ederler. Bir histon metiltransferaz olan EZH2, H3K27me3 katalizasyonu ile Polycomb grubu proteinlerinin toplanmasına ve baskılayıcı bir kromatin durumunun oluşumuna katkıda bulunur (Nishioka ve ark., 2016); EZH2 hiperaktivitesi, lösemik kök hücre

genişlemesini, sağ kalımını ve TKİ direncini desteklemek için miyeloid farklılaşmayı engeller (Yung ve ark., 2021). Lösemi kök hücrelerinde EZH2 düzensizliği, H3K27me3 hedeflerinin yeniden programlanmasıyla lösemi kök hücrelerinin apoptozdan korunmasına ve TKİ direncine neden olur. EZH2, KML lösemi kök hücrelerinde aşırı eksprese edilir (Patel ve ark., 2017).

EZH2 aşırı ekspresyonu, birçok agresif kanserde kötü prognozla ilişkilidir, lösemi hücrelerinde tirozin kinaz inhibitörü imatinibe karşı dirençle ilişkilendirilmiştir (Nishioka ve ark., 2016). İn vitro çalışmaların sonucunda EZH2 inhibitörü EPZ-6438'in tümör baskılayıcı p16'yı yukarı düzenleyerek hücre hatlarında lösemik hücreleri tükettiği gözlenmiştir (Yung ve ark., 2021).

Hücre hattı analizine dayanan bir çalışma, BCR/ABL'nin STAT5 sinyalizasyon yoluyla EZH2 ekspresyonunu pozitif olarak düzenlediğini ve lösemi hücrelerinin hayatta kalmasını desteklediğini; EZH2'nin KML hücrelerini yok etmek için umut verici bir moleküler hedef olabileceğini ve EZH2 inhibisyonunun kemoterapötik ajanların anti-lösemik etkisini arttırmak için yararlı olabileceği sonucunu ifade etmektedir (Nishioka ve ark., 2016).

EZH2'nin terapötik bir hedef olarak bir diğer ilginç yönü, birincil hedefin belirgin hastalığı tedavi etmek değil de, tedaviye iyi yanıt veren KML hastalarında spesifik inhibitörlerin uygulanmasıyla kalan lösemik kök hücreleri ortadan kaldırmak olduğudur. Önceki çalışmalar, KML lösemik kök hücrelerinin "onkogen bağımlısı" olmadığı ve nüksetmeyi veya direnci yönlendirmek için bir rezervuar görevi gördüğü sonucuna varmıştır; bu nedenle tedavide yalnızca TKİ kullanarak BCR-ABL1 kinaz aktivitesini hedeflemek lösemik kök hücreleri ortadan kaldırmaz, dolayısıyla kombine tedavi stratejileri gerekir. EZH2 aşırı ekspresyonu KML lösemik kök hücreleri için karakteristiktir; kombine TKİ ve EZH2 inhibisyonu, lösemi gelişimini geciktirebilir, sağ kalımı uzatabilir ve H3K27me3 hedeflerinin yukarı regülasyonu yoluyla lösemik kök hücre yükünü azaltabilir. EZH2 inhibisyonu ile birleştirilen TKİ tedavisi, kalıntı hastalık yükünün üstesinden gelerek hastaların uzun vadeli tedavisiz remisyonu (TFR) sürdürmelerine olanak tanıyabilir (Rinke ve ark., 2020).

KML'de EZH2'nin onkojenik rolünü araştıran bir çalışmada, KML hücre hatları EZH2 inhibitörleri ile tedavi edilmiştir, CELF2 geni, EZH2 inhibitörünün yaptığı etkiye aracılık eden bir gen olarak tanımlanmıştır. CELF2, mRNA splicingde ve mRNA poliadenilasyonunun düzenlenmesinde rol oynayan bir RNA bağlayıcı proteindir, birçok kanserde tümör baskılayıcı olarak da tanımlanmıştır. CELF2 aşırı ekspresyonu üzerine, KML hücre hatlarında hücre büyümesinin, canlılığının ve koloni oluşumunun azaldığı, splicing manzarasında EZH2 aracılı değişikliklerle kısmen örtüşen bir değişiklik olduğu, MYC sinyalizasyonunun aşağı

regülasyonu gözlemlenmiştir. Ayrıca bu bulgular bir KML hasta örnek kohortunda başarıyla doğrulanmıştır ve CELF2'nin EZH2 tarafından düzenlenen tümör baskılayıcı rolünü doğrulamıştır. Buna dayanarak, EZH2, mRNA splicingini düzenler ve KML'de splicing faktörlerinin transkripsiyonel baskılanması yoluyla onkojenik işlevinin bir kısmını uygular (Brunmeir ve ark., 2025).

4.7.1.4. FAM83B

Dizi benzerliği olan aile 83 üye B (FAM83B), epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) sinyal yolunda yer alan bir proto-onkogendir ve hem EGFR'nin kendisini hem de aşağı akış RAS/MAPK ve PI3K/AKT/TOR sinyal kaskadlarını aktive eder, hücre popülasyonu çoğalmasında rol oynar. FAM83B, TKİ'ye karşı terapötik dirençle ilişkilendirilen bir proto-onkogendir (Singh ve ark., 2018).

Normal ve kanser hücreleri arasında farklı şekilde ifade edilen ve CRAF/MAPK aktivasyonuna katılan proteinler tanımlanıp inhibe edilirse, tümör hücrelerini seçici olarak öldürebilecek ve hastaların ömrünü uzatabilecek potansiyel hedefler belirlenebilir. FAM83B, normal dokulara göre birçok kanserde önemli ölçüde yükseldiği ve EGFR aracılı sinyalizasyon ve RAS aracılı dönüşümde yer aldığı için böyle bir hedef olarak hizmet edebilir. FAM83B'nin MAPK aktivasyonundaki rolüne ek olarak, FAM83B ifade eden hücrelerde gelişmiş EGFR ve PI3K-AKT aktivasyonu da gözlemlenmiştir (Cipriano ve ark., 2012).

FAM83B'nin onkojenik dönüşüme etkisini araştıran bir çalışmada, hücre hattı analiziyle FAM83B ablasyonunun tümör kaynaklı hücrelerin çoğalmasını ve kötü huylu fenotipini inhibe ettiği ve FAM83B'nin EGFR/RAS/MAPK sinyalizasyonunda önemli bir aracı olarak gösterildiği ifade edilmektedir. İnsan tümör örneklerinin analiziyle, FAM83B ekspresyonunun kanserde önemli ölçüde yüksek olduğu ve belirli kanser alt tipleri, artan tümör derecesi ve azalan genel sağ kalımla ilişkili olduğu ortaya konmuştur. Özetle bu sonuçlar FAM83B'nin bir onkogen olduğunu ve potansiyel terapötik müdahale için yeni bir hedef olabileceğini göstermektedir (Cipriano ve ark., 2012). Farklı bir çalışmada, FAM83B ekspresyonu uzun süreli EGFR fosforilasyonu ile sonuçlanmıştır; bunun TKİ direncine makul bir şekilde katkıda bulunabileceği; bu bilginin doğrulandığı takdirde mevcut TKİ'lere karşı direnci aşmak için ilaç tasarımına yardımcı olabileceği ileri sürülmektedir (Grant, 2012).

4.7.1.5. SALL4

Kromozom 20q13'e haritalanan SALL4 (Spalt benzeri (SALL) gen ailesinin üyesi) geni, bir transkripsiyon faktörü kodlayan embriyonik bir kök hücre genidir; insan çinko parmak transkripsiyon faktörü SALL proteinini kodlar, bu protein NANOG ve OCT4 ile etkileşime girerek embriyonik kök hücrelerdeki pluripotent ve kendini yenileme özelliklerini düzenler. SALL4, DNA'ya bağlanan, kök hücre genlerinin transkripsiyonunu düzenleyen ve hem embriyonik hem de hematopoietik kök hücrelerin kendi kendini yenilemesini düzenleyen bir proteindir. Gelişim sırasında SALL4 gen ekspresyonu aşağı düzenlenerek kök hücre pluripotensini düzenler; ancak, kötü huylu hücrelerde anormal bir şekilde yeniden ifade edilir (Hupfeld ve ark., 2013; Farawela ve ark., 2019).

SALL4, hematopoietik farklılaşma esnasında CD34+ kök hücrelerde yüksek oranda ifade edilir ve CD34-progenitör hücrelerde kapatılır. SALL4, AML, KML, lenfoma, plazma hücreli miyelom ve akut lenfoblastik lösemide ve ayrıca meme, akciğer ve kolorektal solid tümörlerinde potansiyel bir onkojenik belirteç olarak gösterilmiştir. Yüksek SALL4 ekspresyonu pro-apoptotik genleri inhibe ederek, kemoterapiye dirençli genlerin ekspresyonunu artırarak ve daha fazla invazyon ve immünolojik tümör kaçış mekanizmalarına izin vererek agresif kötü huylu tümör davranışıyla ilişkilidir (Farawela ve ark., 2019).

Tirozin kinaz inhibitörü tedavi başarısına rağmen KML'de lösemik kök/progenitör hücreler derin moleküler remisyon durumunda bile tespit edilebilir seviyede kalır, süren kinaz inhibisyonuna rağmen bunların devam etmesini sağlayan mekanizmalar belirsizdir. Daha önce imatinibe uzun süreli maruz kalmanın, Akt/Erk 1/2 sinyalizasyonunun düzensizleşmesine, miR-181a'nın yukarı regülasyonuna, adezyon artışına ve yüksek imatinibe karşı dirençli yol açtığı gösterilmiştir. Bu durumun moleküler temelini analiz etmek isteyen çalışmada, uzun süreli imatinibe maruz bırakılan KML hücre modelinde gen ve protein ekspresyon analizi, kantitatif fosfoproteomik ve doğrudan miR-181a inhibisyonu uygulanmıştır. Bu hücreler, pluripotansiyel belirteçlerin (SOX2, SALL4) ve adezyon reseptörlerinin (CD44, VLA-4, CXCR4) yukarı düzenlenmesinin yanı sıra Hippo sinyalleme sisteminin aşağı düzenlenmesi ve transkripsiyon koaktivatörü YAP'ın yukarı düzenlenmesi sonucunun göstermiştir. Ayrıca miR-181a'nın inhibisyonu, SOX2 ve SALL4 transkripsiyonunun azalmasına, YAP aktivasyonunun azalmasına ve imatinibe karşı duyarlılığın artmasına neden olmuştur. Sonuç olarak imatinibe uzun süreli maruz kalmanın, kök hücre yenilenmesini düzenleyen Hippo/YAP sinyalinin düzensizleşmesine, kök hücre belirteçlerinin ekspresyonunun kazanılmasına yol açtığı ve YAP

aktivitesine yönelik deneysel müdahalenin TKİ'ye karşı kemo duyarlılığın geri kazanılmasına yardımcı olabileceği ifade edilmektedir (Chorzalska ve ark., 2017).

SALL4 geninin ekspresyon paternini araştıran bir çalışmada, kronik faz KML hastalarının kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek SALL4 ekspresyonu gösterdiği saptanmıştır, bunun önceki verilerle uyumlu olduğu bildirilmiştir. Çalışmada KML-MR4 (BCR-ABL1 ≤ 0.01) hastalarının düşük SALL4 gen ekspresyonu gösterdiği, bunun önceki bir çalışmada tam moleküler remisyondaki KML hastalarının kontrol grubuna göre daha düşük medyan SALL4 gen ekspresyonu gösterdiği bilgisiyle uyumlu olduğu ifade edilmektedir. Çalışmada, akselere ve blast faz KML hastalarında SALL4 gen ekspresyonunda artış saptanmadığı, ancak önceki çalışmalarda akselere ve blast faz KML hastalarında SALL4'ün kronik faz KML hastalarına kıyasla aşırı eksprese edildiği ifade edilmektedir (Farawela ve ark., 2019).

Farklı bir çalışma, KML'de SALL4 ekspresyonunun, kronik fazın aksine, blast fazdaki hasta örneklerinde ve tam remisyon elde etmiş KML hastalarında veya tirozin kinaz inhibitörüne dirençli hastalarda da tespit edildiğini belirtmektedir (Yang, 2018).

SALL4 ile TKİ direnci ilişkisini araştıran bir çalışmada, TKİ maruziyetinin, kök hücre transkripsiyon faktörü SALL4 ile birlikte direnç aracılı taşıyıcı ABCA3'ün (ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıma proteinleri ailesinin bir üyesi) artan ifadesini indüklediği tespit edilmiştir. Hücre içi, önceden aktive edilmiş bir ABCA3/SALL4 tabanlı direnç mekanizmasına sahip lösemik hücrelerde, TKİ bu koruyucu eğilimi sürdürür, güçlendirir ve nihayetinde bu tür hücrelerin kalıcılığına katkıda bulunur (Hupfeld ve ark., 2013). Farklı bir çalışma, analiz ettikleri blast faz KML grubunda SALL4 ekspresyonunun, kronik fazdaki ve tam remisyondaki KML hastalarına göre daha yüksek olduğunu belirtmektedir (Shen ve ark., 2012). Kronik miyeloid lösemi hastalarında SALL4 geninin ekspresyon analizini yapan bir diğer çalışma, incelenen KML grubunda SALL4 geninin pozitif ekspresyon gösterdiğini ve kontrol grubundan daha yüksek olduğunu saptamıştır (Chen ve ark., 2013).

4.7.1.6. PAK1

PAK1, Rho ailesi küçük GTPazları Cdc42 ve Rac1'in çeşitli sinyal yollarında alt akışta hareket eden serin/treonin kinazları PAK (p21-aktif kinaz) ailesinin bir üyesidir. Memeli hücrelerindeki PAK'lar yapısal benzerliklere göre grup I (PAK1, PAK2 ve PAK3) ve grup II (PAK4, PAK5 ve PAK6) olarak sınıflandırılır, grup üyeleri fonksiyonel farklılık gösterir. PAK ailesi üyeleri

hücre çoğalması ve hareketliliğinde, hücre dönüşümü ve tümör ilerlemesinde önemli roller oynar. PAK1, meme, yumurtalık, melanom, T hücreli lenfoma, karaciğer ve mesane kanserleri dahil olmak üzere çeşitli malignitelerde onkojenik dönüşümde rol oynar (Pandolfi ve ark., 2019). PAK'lar, kanser hücrelerinin büyümesini, hayatta kalmasını ve hareketliliğini kontrol eden onkojenik sinyal yollarındaki temel düğümlerdir, birçok insan kanserinde aktiviteleri artmıştır ve kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (Edlinger ve ark., 2017).

BCR/ABL1+ hücrelerinin genişlemesinde PAK1'in rolünü araştıran bir çalışma, PAK1 ve PAK2'nin BCR/ABL1+ hematopoietik malignitede kritik izoformlar olduğunu; hücre süspansiyonunda, PAK1 ve PAK2 eksikliği olan lösemik hücrelerin apoptoza uğradığını, her iki protein kaybının iyi tolere edildiğini saptamıştır (Edlinger ve ark., 2017).

BCR-ABL1 tirozin kinaz ve PAK1/2 serin/treonin kinazın eş zamanlı inhibisyonunun KML hücrelerine karşı sinerjik etki gösterdiğini vurgulayan bir çalışmada, PAK1 küçük molekül inhibitörü IPA-3 (p21 aktivelik kinaz inhibitörü III) tarafından inhibe edilmiştir, PAK2 spesifik kısa saç tokası RNA (shRNA) tarafından aşağı düzenlenmiştir ve BCR-ABL1 tirozin kinazı imatinib tarafından inhibe edilmiştir. Yeni tanı almış kronik faz KML hastalarının kemik iliğinden ve sağlıklı donörlerden izole edilen birincil kök/erken progenitör hücreler ve normal hematopoietik karşılıkları, KML-blast faz hücre hatları (K562 ve KCL-22) ve BCR-ABL1-dönüştürülmüş 32Dcl3 hücre hattı kullanılarak çalışma gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak PAK1 ve/veya PAK2 inhibisyonunun, normal hücreleri etkilemeden imatinibin KML hücrelerine karşı etkisini artırdığı belirtilmiştir. İmatinibin IPA-3 ile birlikte kullanılmasıyla lösemi hücrelerinin büyüme ve apoptoz inhibisyonunu artırdığı gözlemlenmiştir; imatinibin bir PAK1/2 inhibitörü ile birleştirilmesinin kronik faz KML hücrelerinin eradikasyonunu kolaylaştırdığı ifade edilmiştir (Flis ve ark., 2019).

KML'de PAK1-STAT5 biyolojik ekseninin düzenlenmesinin proliferasyon ve apoptoz üzerindeki etkisini analiz eden bir çalışmada, P210 (+) kronik miyeloid lösemide aşağı regüle edilmiş PAK1 gen ifadesinin hücre proliferasyonunun baskılanmasına ve STAT5'in fosforilasyonu yoluyla apoptozun teşvik edilmesine yol açabileceği, TKİ etkisini artırabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca p210+ KML hasta grubunda BCR-ABL ekspresyonu ile PAK1 ekspresyonu arasında pozitif bir korelasyon olduğu ve beyaz kan hücresi sayısı (WBC) ile PAK1 ekspresyonu arasında pozitif bir korelasyon olduğu, klinik semptomlardan ateş ve splenomegalinin PAK1 ekspresyonuyla ilişkili olabileceği, diğer semptomların PAK1 ekspresyonuyla hiçbir korelasyon göstermediği ifade edilmiştir (Yuanxin ve ark., 2019).

4.7.1.7. TET2

TET2, Tet metilsitozin dioksijenaz 2 (On-onbir-translokasyon-2 olarak da bilinir) geni, iki yüksek oranda korunmuş domain ile karakterize edilen proteinleri kodlayan bir aileye (TET1, TET2 ve TET3) aittir; karboksil-terminal domain, DNA demetilasyon sürecinde katalitik dioksijenaz aktivitesine sahiptir. TET2 genindeki değişikliklerin, miyelodisplastik sendromlar, miyeloproliferatif neoplazmlar veya akut miyeloid lösemi dahil olmak üzere çeşitli miyeloid malignitelerin patogenezinde önemli olduğu bildirilmiştir. Çerçeve kayması, anlamsız ve yanlış anlamlı dahil olmak üzere birkaç TET2 işlev kaybı mutasyonu tanımlanmıştır; TET2 mutasyonları KML'nin akselere faza ve blast faza ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir. TET2, normal miyelopoez için önemlidir, bu genin enzimatik aktivitesinin bozulması miyeloid tümör oluşumunu destekler. Kronik miyeloid lösemi ilerlemesi sırasında TET2 gen ekspresyonunun azaldığı saptanmıştır (Albano ve ark., 2011).

KML lösemik kök hücrelerinde (LSC) mikroRNA (miRNA) ekspresyon profilini araştıran bir çalışmada, KML LSC'lerinde gözlemlenen miR-29a-3p ve miR-660-5p'nin yukarı regülasyonunun, ilgili hedefleri TET2 ve EPAS1'in aşağı regülasyonuna yol açarak KML LSC'lerine in vitro TKİ direnci kazandırdığı ve TET2 susturulmasının hücreleri imatinib kaynaklı apoptozdan koruyabildiği saptanmıştır. Ayrıca KML LSC'lerinde miR-494-3p'nin aşağı regülasyonunun, c-MYC yukarı regülasyonuna yol açarak TKİ kaynaklı apoptozu azaltabildiği saptanmıştır. Özetle, KML LSC'lerinde anormal miRNA ekspresyonunun, içsel TKİ direncine katkıda bulunabileceği ve tedavide KML LSC'lerini etkili bir şekilde ortadan kaldırmak için anormal şekilde düzenlenen miRNA'ların hedeflenebileceği ifade edilmektedir (Salati ve ark., 2017).

Wnt sinyalizasyonu KML patogenezinde ve ilerlemesinde önemli bir rol oynar. sFRP1, Wnt sinyal yolunun baskılanmasında rol oynar ve KML ilerlemesi sırasında promotör hipermetilasyonu tarafından epigenetik olarak susturulduğu kanıtlanmıştır. KML'de DNA metilasyonunu araştıran bir çalışma, sFRP1 ekspresyonu ile hücrel metilasyon kalıplarının sürdürülmesinden sorumlu olan DNMT3A, TET1, TET2 ve TET3 proteinleri arasındaki ilişkiyi ve ayrıca bu proteinlerle ilişkili olduğu bilinen miRNA'lar miR144-3p ve miR-767-5p arasındaki ilişkiyi analiz etmeyi amaçlamıştır. sFRP1'i stabil şekilde eksprese eden KML hücre hatları K562 ve K562S, miR144-3p ve miR-767-5p ekspresyonundaki değişiklikleri karşılaştırmak için kullanılmıştır. DNMT3A, TET1, TET2 ve TET3 protein düzeyleri Western blot ile analiz edilmiştir; sonuç olarak K562S hücrelerinde miR-144-3p ve miR-767-5p ekspresyonunun DNMT3A ve TET1 protein düzeyleriyle birlikte azaldığı ve TET2 proteininin

ise arttığı saptanmıştır. Çalışma, sFRP1 proteininin yeniden ekspresyonunun lösemik hücre hattı K562'deki genel metilasyon modellerinde önemli rol oynayan faktörlerin ekspresyonunu değiştirdiğini belirtmektedir (Demirkiran ve ark., 2024).

4.7.1.8. DNMT1

DNMT1 ve DNMT3A'yı içeren DNMT ailesi, DNA metilasyonunda görev alan DNA metiltransferaz genleridir. DNA metilasyonu ve histon deasetilasyonu kanserlerin oluşumunda ve ilerlemesinde rol oynar. KML hastalarında mRNA ekspresyonunu ve protein seviyelerini analiz eden bir çalışmada; DNMT1, DNMT3A, HDAC1, HOTAIR, EZH2 ve LSD1 ekspresyon seviyelerinin akselere faz ve blast krizde, kronik faz ve sağlıklı donörlere göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (Li ve Luo, 2018).

Farklı bir çalışmada, KML hasta grubu ve normal kontrol grubunun kemik iliği mononükleer hücrelerinde veya periferik kanında DNMT mRNA ekspresyon düzeyleri SYBR green floresan kantitatif PCR ile analiz edilmiştir. DNMT1 mRNA ifadesinin kronik faz KML ve normal kontrol arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediği, ancak KML'nin ileri evreleri olan akselere ve blast fazda DNMT1 mRNA ifadesinin kronik faz KML ve normal kontrol ile karşılaştırıldığında belirgin şekilde arttığı, akselere ve blast faz arasında anlamlı bir ekspresyon farkı olmadığı saptanmıştır (Li ve ark., 2015).

DNMT genleri miyeloid lösemilerde anormal derecede aşırı ifade edilmektedir. DNMT1'i analiz eden bir çalışmada, insan KML kök hücrelerinden elde edilen gen ekspresyon profili verilerinde normal HSC'lere kıyasla DNMT1'in daha yüksek ekspresyonu gözlemlenmiştir, ayrıca KML hastalarının tedavi edilmemiş ve imatinib ile tedavi edilmiş kemik iliği hücrelerinden elde edilen verilerinde BCR-ABL inhibisyonunun DNMT1 ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir (Vicente-Dueñas ve ark., 2018).

Kronik miyeloid löseminin ilerlemesi sırasında, BCR-ABL füzyon geninin ABL1 promotörü önemli ölçüde hipermetile olur. KML'de DNA metiltransferazlar DNMT1, 3A ve 3B'nin ekspresyonu araştıran bir çalışmada, DNMT'lerin lösemi tipine ve evresine özgü bir şekilde önemli ölçüde aşırı ifade edildiği, yukarı düzenlenen DNMT'lerin anormal bölgesel hipermetilasyona neden olarak lösemi patogeneze katkıda bulunabileceği ifade edilmiştir. Çalışmada DNMT'lerin KML fazına bağlı ekspresyon gösterdiği belirtilmiştir; kronik fazda DNMT seviyeleri normal kemik iliği hücrelerindeki önemli ölçüde farklı değildir ancak,

akselere fazdaki KML hücreleri normal kemik iliği hücrelerinden daha yüksek seviyelerde DNMT1 ve 3A ifade etmiştir (Mizuno ve ark., 2001).

Tümör gelişim süreci, sitozin-guanin (CpG) adacıklarının metilasyonu ile ilişkilidir. Metilasyon, DNA metilasyon sistemleri ve polycomb grubu (PcG) proteinleri gibi çeşitli faktörleri gerektirmektedir. Sinyal iletiminin negatif düzenleyicisi olan Src homologu 2 domain içeren tirozin fosfataz 1 (SHP1) geninin metilasyon durumunu, çok sayıda hematolojik malignitede değişkenlik göstermiştir. DNA metiltransferaz 1 (DNMT1) ve zeste homolog 2'nin PcG protein kompleksi üyesi güçlendirici (EZH2), gen metilasyon sürecine katılır. KML'de SHP1 geninin metilasyon durumu ile DNMT1 ve EZH2 aktivitesi arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışmada; SHP1 gen metilasyonunun KML'nin ilerlemesiyle ilişkili olduğu, DNMT1 ve EZH2'nin SHP1 geninin promotör bölgesine bağlı olduğu ve SHP1 metilasyonunda yer aldığı saptanmıştır. Ayrıca DNMT1 ve EZH2, hastalığın ilerlemesiyle ilişkilendirilmiştir (Wang ve ark., 2016).

Tirozin fosfataz proteini PTPN6 (SHP-1 olarak da adlandırılır) sinyal iletiminde negatif düzenleyici rol oynayan bir tümör baskılayıcı gendir, tümör oluşumu ve büyümesiyle negatif korelasyona sahiptir. KML'de epigenetik regülasyonu araştıran bir çalışmada, KML hastaları ve sağlıklı gönüllüden alınan kemik iliği veya kan örnekleri incelenmiştir. KCL22 ve K562 hücreleri kültürlenmiş ve demetilasyon ilaçları ve histon deasetilaz inhibitörleri ile tedavi edilmiştir. Hücre hatlarında ve ileri evre KML'li hastalarda PTPN6'nın aşağı regüle edildiği, buna karşın DNMT1, DNMT3A, MECP2, MBD2 ve HDAC1'in yukarı regüle edildiği saptanmıştır. Ayrıca 5-azasitidin, desitabin, sodyum valproat ve LBH589 ile tedavinin PTPN6 ekspresyonunu artırdığı, ancak DNMT1, DNMT3A, MECP2, MBD2 ve HDAC1 ekspresyonunu azalttığı saptanmıştır (Zhang ve ark., 2017).

Bu verilere dayanarak KML'de tedavi direnciyle ilişkili olduğu düşünülen genler ve özellikleri Tablo 10'da özetlenmiştir. TKİ direncini oluşturan mekanizmaların belirlenmesi, tedaviye yanıtız veya uyumsuz hastalarda uygun ikinci veya üçüncü nesil TKİ seçimi ve yeni ilaç geliştirme süreçlerinde genlerin önemli rolü olduğu söylenebilir. Bu açıdan gen ekspresyon seviyeleri, tanıda moleküler yanıt tanımlamaları doğrultusunda, tedavi takibinde, tedavisiz remisyon sürecine geçişte yol gösterici olabilir.

Tablo 10. KML’de tedavi direnciyle ilişkili olduğu düşünülen genler

Gen adı	Fonksiyonu	KML’deki Ekspresyon Durumu
Twist-1	Transkripsiyon faktörü	Yükselir
HMGA2	Transkripsiyon faktörü	Blast faza geçişte yükselir
EZH2	Histon metiltransferaz	Kök hücrelerde yükselir
FAM83B	Proto-onkogen	Yükselir
SALL4	Kök hücre transkripsiyon faktörü	Hastalık ilerledikçe yükselir
PAK1	Serin/treonin kinaz	Yükselir
TET2	Tümör baskılayıcı	Hastalık ilerledikçe azalır
DNMT1	DNA metiltransferaz	Hastalık ilerledikçe yükselir

4.8. Telomer

Telomerler, insan kromozomlarının uçlarında yer alan TTAGGG dizi tekrarlarından oluşan, genom stabilitesini ve bütünlüğünü koruyan ve tekrarlanan hücre bölünmeleri esnasında hücreyi ilerleyici DNA kısalmasından koruyabilen ve böylece hücresel homeostazda önemli bir rol oynayan özelleşmiş nükleoprotein yapılarıdır (Caocci ve ark., 2016). Telomerler, bir hücrede replikasyon kapasitesini belirleyen bir "mitotik saat" rolü üstlenir; bir hücrenin telomer uzunluğu kritik derecede kısaldığında hücre yaşlanır. Her somatik hücre bölünmesinde telomerler uzunluk olarak azalır ve böylece yaşla birlikte telomerler giderek kısalır. Lökosit telomer uzunluğunun (LTL) daha kısa olması, daha erken ölüm oranı ve kardiyovasküler hastalık, diyabet ve azalmış bilişsel işlev gibi yaşla bağlantılı kronik hastalıklarla ilişkilidir. LTL, yaşlanmanın bir biyobelirtecidir (Gallicchio ve ark., 2018).

Sağlıklı bireylerde telomerlerin ortalama uzunluğu 5 ila 15 kb (kilobaz) arasında değişir ve bireyler arasında; aynı zamanda dokular, hücreler, kromozomlar ve kromozomların kolları arasında da farklılık gösterebilir. Telomerlerin ortalama uzunluğu (hücre, doku veya organ

gruplarından gelen telomerler) ve bireysel telomerlerin uzunluğu (her bir kromozom kolundaki telomerler) genomik DNA üzerinden değerlendirilebilir. İn vitro ve in vivo çalışmalar, telomer uzunluğu ile hücresel yaşlanma arasında negatif korelasyon olduğunu göstermektedir (Samassekou, 2013). Telomer kısalması, bölünen somatik hücrelerde gözlemlenmiştir ve telomerler kritik derecede kısaldığında hücre yaşlanmasına yol açar. Telomeraz enzimi, şablon olarak bir RNA alt birimi kullanarak telomerik tekrarlar ekleyen bir ribonükleoproteindir. Telomeraz ekspresyonu, hücre bölünmesi sırasında telomerik kısalmayı önler ve hücrelerin replikatif yaşlanmayı atlamaına olanak sağlar (Engelhardt ve ark., 2000).

Genetik ve çevresel faktörler, bireylerin yaşa bağlı telomer aşınmasında etkilidir denebilir. Sigara içme, hava kirliliği ve diğer kronik stres faktörlerinin genel popülasyonda daha kısa LTL veya hızlandırılmış LTL kısalmasıyla ilişkili olduğu ifade edilmiştir. Ek olarak, genotoksik etki gösteren kemoterapötik ajanların kanser hastalarında ve sağ kalanlarda telomerleri olumsuz etkilediği hipotezi sunulmuştur ancak kanser tedavisi ile telomer uzunluğundaki değişiklik arasındaki ilişkiyi gösteren literatür bulguları, genel olarak tutarsızdır. Çünkü çalışmaların bir kısmı tedaviden sonra telomerlerin kısaldığını ve diğerleri uzadığını veya aralarında hiçbir ilişki olmadığını ifade etmektedir (Gallicchio ve ark., 2018).

İnsan çekirdek telomeraz enzimi, katalitik bir protein alt birimi olan telomeraz ters transkriptaz (hTERT) ve kısa bir RNA şablonu içeren bir RNA parçasından (hTR) oluşur. İnsan hücrelerinde, ilerleyici telomer kısalması telomer başlığının kaybına yol açar ve bu da bir DNA hasar yanıtı tarafından tanınma, p53'ün aktivasyonu ve hücresel yaşlanmanın indüklenmesiyle sonuçlanır ve muhtemelen replikatif yaşam süreleri boyunca biriken mutasyonlara sahip premalign hücrelerin ilerlemesini engellemek için bir antitümör mekanizması olarak hizmet eder (Li ve ark., 2011).

İnsan telomerleri, hekzamer tekrarlarından (TTAGGG), telomerik tekrar içeren RNA'dan (TERRA) ve shelterin kompleksi adlı telomerle ilişkili proteinlerden oluşur. Tümör hücrelerinde telomer bakımı, telomeraz aktivitesi, telomerlerin alternatif uzatılması (ALT), TERRA ekspresyonu ve telomerle ilişkili proteinlerin aktivitesi ile sağlanabilir. Telomerlerin DNA hasar bölgeleri olarak tanınmasını engelleyen shelterin kompleksi altı proteinden oluşur: telomerik tekrar bağlayıcı faktörler 1 ve 2 (TRF1 ve TRF2), TRF1 ile etkileşime giren nükleer faktör 2 (TIN2), telomerlerin korunması (POT1), POT1 ve TIN2 ile etkileşime giren protein 1 (TPP1) ve en korunan telomer bütünleştirici protein: TRF2 ile etkileşime giren protein 1

(RAP1). Telomerleri korumadaki rolüne ek olarak, RAP1'in TERRA ekspresyonunu baskıladığı ve telomer uzunluğunu düzenlediği de bildirilmiştir (Deregowska ve ark., 2023).

4.9. KML'de Telomer Uzunluğu ve Ölçümü

Ökaryotik somatik hücre kromozomlarının uçlarındaki TTAGGG tekrarlarının hücre bölünmesi sonucunda kademeli kaybı, hücre yaşlanmasına ve nihayetinde hücreler krize sürüklenirse genetik istikrarsızlığa yol açar. Bu açıdan, telomer uzunluğu analizi hem hücresel replikasyon geçmişinin hem de tümör hücrelerinin klonal evrimini yönlendirebilecek bir sürecin belirteci olarak kullanılabilir (Drummond ve ark., 2004).

Tümör hücreleri, ardışık hücre bölünmeleri nedeniyle kaçınılmaz bir süreç olan telomer kısalmasını önlemek için telomer bakım mekanizmalarını kullanabilir. Çoğu tümör hücresinde, telomer uzunluğu (TL), telomerazın yeniden aktivasyonu ile korunurken, küçük bir kısmı telomerazdan bağımsız alternatif telomer uzaması (ALT) mekanizmasıyla ölümsüzlük kazanır (Gaspar ve ark., 2018).

ALT, tümörlerin %15'inde bulunan diğer telomer uzunluğu koruma mekanizmasıdır; heterojen telomer uzunlukları, promyelositik lösemi cisimcikleriyle ilişkili telomerik DNA ve shelterin proteinleri, çok sayıda çift sarmallı ve C açısından zengin telomerik halkalar, telomerlerde DNA hasarı yanıt odaklarının sayısının artması ve telomerik kardeş kromatid değişimlerinin sıklığının artması gibi fenotipleri sunar. Telomer kısalması, telomerik nükleer organizasyonun değişmesi genomik instabilite ve kanser ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir (Samassekou, 2013).

Telomer uzunluğu (TL) kalıtsal bir bileşene sahip olmasının yanı sıra yaşam tarzı, sağlık ve hastalık durumundan önemli ölçüde etkilenir, bu bağlamda telomer uzunluğunun hastalık riski için güvenilir bir klinik biyobelirteç olarak kullanılması ilgi çekicidir. Kardiyovasküler hastalıklar, kanserler, viral solunum yolu enfeksiyonları ve otoimmün bozukluklar için TL verileri önemlidir. TL ilişkili mevcut epidemiyolojik çalışmaların neredeyse tamamı, örneklerdeki ortalama telomer uzunluklarının ölçümlerine dayanmaktadır (Uppuluri ve ark., 2021).

Telomer araştırmalarında en sık kullanılan numunelerden biri dolaşımdaki tam kandır. Tam kan, venöz kan alımıyla kolay elde edilebilir, geçmişte ve günümüzde yapılan birçok epidemiyolojik ve popülasyon çalışmasında telomer uzunluğunun ölçülmesi için tam kan kullanılmıştır (Lin ve ark., 2019).

KML ilişkili birçok çalışma, hastalardan alınan lösemik hücre telomerlerinin sağlıklı bireylerden alınan lökositlerden daha kısa olduğunu bulmuştur; bu çalışmalar arasında KML hastalarından alınan lösemik hücreler ile yaşları eşleştirilmiş sağlıklı bireylerden alınan lökositler arasındaki telomer uzunluğu farkının bir kb'ye kadar çıkabildiği bildirilmiştir (Samassekou, 2013). KML'de daha kısa telomerler, hastalığın ilerlemesi, kötü prognoz, daha yüksek Hasford skoru ve sitogenetik anormalliklerin ortaya çıkması ile ilişkilendirilmiştir (Caocci ve ark., 2016).

KML'de telomer kısalmasını açıklayan mekanizmalar; lösemik hücrelerin yüksek çoğalma oranının telomer kısalması için belirgin itici güç olması, KML'nin farklı evrelerinde BCR-ABL1 etkisiyle telomer kısalması, artmış tirozin kinaz aktivitesi ile oksidatif hasar ve telomer kısalmasına yol açabilen reaktif oksijen türlerinin üretilmesi ve KML evrimi sırasında değişikliğe uğrayan shelterin proteinlerinin bozulması yoluyla telomere başlıklarının açılması şeklinde ifade edilebilir (Samassekou, 2013).

KML'deki telomer uzunluğu değişiklikleri için çift adımlı bir modelden bahsedilebilir; erken aşamalarda, Philadelphia pozitif (Ph⁺) progenitörlerin artan dönüşümü, telomer kısalmasına ve genetik instabiliteye yol açar, daha sonra, KML hücreleri telomerazın yukarı regülasyonu ve telomer uzunluğunun geri kazanılması yoluyla yaşlanma ve apoptozdan kurtulacaktır. Daha uzun telomerlere sahip KML kök hücreleri, tedavinin kesilmesinden sonra (TFR) bile muhtemelen çoğalma potansiyelini koruyabilir, daha uzun telomerlere sahip hastalar TKİ tedavisinden sonra nüksetmeye daha yatkın olabilir (Caocci ve ark., 2016).

KML hastalarının periferik kan hücrelerindeki telomer uzunluğunun (TL) hastalık evresi, prognostik skorlar, tedaviye yanıt ve hastalığın ilerlemesiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ancak, bireyler arasında genetik farklılıklar olması nedeniyle, TL bireyler arasında önemli ölçüde farklılık gösterir ve bu da bireysel hastalarda sağlam bir prognostik belirteç olarak kullanımını sınırlar. Bir literatür verisi, tanı anında KML hastalarında hematopoietik kök hücrelerin aksine lösemik kök hücre telomer kısalmasının hızlandığını ve telomer kısalma derecesinin lösemik klonun büyüklüğü ile korele olduğunu ifade etmektedir (Bouillon ve ark., 2018).

KML'de periferik kan lökosit telomer kısalmasını araştıran bir çalışma, örneklemeden sonraki 2 yıl içinde blast faza ilerleyen kronik faz hastalarının, 2 yıl sonra ilerleyenlere göre önemli ölçüde daha kısa periferik kan lökosit telomerlerine sahip olduğunu; kısa telomerlerin blast faza erken ilerlemeyi öngördüğünü ifade etmektedir. Ayrıca KML'deki telomer kısalmasının tanı

anında yüksek riskli hastalarda en fazla olduğunu ve hastalık ilerlemesi sırasında hızla meydana geldiğini belirtmektedir (Drummond ve ark., 2004). Bu bağlamda farklı bir çalışma, KML’de tanı anında gözlenen telomer kısalmasının, akselere faza kadar geçen sürenin azalmasıyla ilişkili olduğunu ifade etmektedir (Boulwood ve ark., 2000).

ELN kriterlerine göre, en uzun telomerlere sahip hastalar, daha kısa telomerlere sahip olanlara göre daha düşük bir klinik risk profiline sahiptir ve bu da telomerlerin hastalığın ilerlemesini dair prognozda önemli olduğunu göstermektedir. Telomer uzunluğu değerleri, 12 ve 18 ay sonra TKİ yanıtına ilişkin önemli bilgiler sağlayabilir. Bir çalışmada 144 günden uzun süredir imatinib alan kişiler, TKİ tedavisine yeni başlayanlara göre belirgin şekilde daha uzun telomerler sergilemiştir (Baliou ve ark., 2025).

KML’nin tirozin kinaz inhibitörleri ile başarılı bir şekilde tedavi edilmesi, kanda ve kemik iliğindeki Ph pozitif hücrelerin azalması nedeniyle telomer uzamasıyla ilişkilendirilmiştir. KML hastalarının telomerleri başarılı tedaviden sonra uzasa da, miyeloid bölmenin telomerleri sağlıklı bireylerdeki telomerlerden hala daha kısadır (Samassekou, 2013).

Farklı bir çalışma, tanı sırasında yaşa göre ayarlanmış daha uzun telomerlere sahip hastaların imatinib ile derin moleküler yanıt elde etme olasılıklarının, kısa telomerlere sahip olanlara göre daha yüksek olduğunu; uzun telomerlere sahip hastaların önemli ölçüde daha erken majör moleküler yanıt elde ettiklerini ve telomer uzunluğunun kronik faz KML tanısında ölçüldüğünde birinci basamak imatinib tedavisine karşı derin moleküler yanıt elde etme ihtimali olan KML hastalarının belirlenmesine katkı sağlayabilceğini vurgulamaktadır (Estrada ve ark., 2021). Bir diğer çalışma, TL’nin lösemik hücrelerde önemli ölçüde kısaldığını ve KML hastalarında tanı anında artık yaşa bağlı olmadığını öne sürmektedir (Wenn ve ark., 2015).

Birçok KML ve telomer ilişkisini inceleyen çalışmada, telomerlerin ortalama uzunluğu telomer kısıtlama parçası (TRF) veya akış sitometrisi (Flow-FISH) ile birleştirilmiş floresan in situ hibridizasyon (FISH) kullanarak değerlendirilmiştir. TRF için genomik DNA kullanılır ve bu teknik, telomerlerin fiziksel uzunluğunu kb cinsinden tahmin etme avantajına sahiptir; farklı çalışmalar arasında telomer uzunluklarının karşılaştırılmasına imkan tanır. Flow-FISH için sitolojik preparatlar kullanılır ve aynı preparat içindeki farklı hücre popülasyonlarının telomer uzunluklarının karşılaştırılması gerçekleştirilir (Samassekou, 2013). Tablo 11’de tekniklerin karşılaştırılması özetlenmiştir.

Bu TL ölçüm teknikleri, süreç içinde zorlayıcı ve zaman alıcı teknikler olarak değerlendirilmiştir. 2002'de R. M. Cawthon, Applied Biosystems Prism 7700 dizi tespit sistemini kullanarak TL ölçümü için gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tabanlı bir yöntemi detaylı olarak yayınlamıştır. Bu yöntem, bir örnek ile bir referans DNA örneği arasındaki telomer tekrar kopya sayısının tek gen kopya sayısına oranının ne kadar farklı olduğunu ölçer. Dünya çapında birçok laboratuvar, Roche LightCycler kullanılarak da bu yöntem gerçekleştirilebilmektedir (Gil ve Coetzer, 2004).

R. M. Cawthon, telomer biyolojisinin, birçok hastalığın ve yaşlanmanın moleküler patofizyolojisinde oynadıkları rollerin araştırılmasında kullanılmak üzere; basit, hızlı ve yüksek örnek verimi elde etmek için kolayca ölçeklenebilen bir teknik geliştirmiştir. Bu teknik, dikkatlice tasarlanmış bir çift oligonükleotid primerinin kullanılmasıyla, floresan tabanlı kapalı bir tüpte kantitatif PCR (QPCR) ile göreceli ortalama telomer uzunluklarının ölçülmesini sağlar. Telomer sinyali, T/S oranı oluşturmak için tek bir kopya geninden gelen sinyale normalize edilir (Cawthon, 2002).

Tablo 11. KML'de TL ölçüm teknikleri (Samassekou, 2013'den yararlanılarak hazırlanmıştır)

	Teknik	Materyal	Avantaj	Dezavantaj
Ortalama telomerlerin ölçümleri	TRF	DNA	Çalışmalar arasında karşılaştırma	Büyük miktarda DNA ve yoğun emek
	Flow FISH	İnterfaz hücreleri	Farklı hücre alt kümelerini ölçebilir	Sitolojik hazırlık gerektirir
Bireysel telomerlerin ölçümleri	3D Telomer	Metafaz	Tüm bireysel telomerleri tanımlayabilir	Metafazları gerektirir
	FISH	İnterfaz hücreleri	İnterfaz çekirdeklerindeki bireysel telomerlerin sayısını, yoğunluğunu ve konumunu değerlendirir	Bireysel telomerleri tanımlayamaz

Daha sonraki süreçte R. M. Cawthon, bir dizi reaksiyon kuyusundaki deneysel DNA örneklerindeki telomere (T) sinyallerini ve ayrı kuyulardaki tek kopya gen (S) sinyallerini, ortalama telomer uzunluğuna orantılı olan göreceli T/S oranlarını üretmek için bir referans DNA'ya kıyasla ölçen bu kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (QPCR) telomer uzunluğu

testinin multiplekslenmesi gerektiği, multiplekslemenin verimi artıracak ve maliyetleri düşürecek gerekçesiyle yeni bir monokrom multipleks kantitatif PCR yöntemi geliştirmiştir. Bu yöntemle primer konsantrasyonlarını sınırlama zorunluluğunun yarattığı sıkıntı ve beraberindeki zorluklar ortadan kaldırılmıştır (Cawthon, 2009).

R. M. Cawthon'ın tasarladığı yöntemde kullanılan cihaz ile dünya çapında yaygın olarak kullanılan LightCycler cihazı arasındaki reaktif farkı ve diğer içsel farklılıklar nedeniyle, tekniğin Roche LightCycler'a uygulanması için optimizasyon yapılmıştır. Gerçek zamanlı PCR kullanılarak TL ölçümü; hızlı ve basittir, birden fazla örneğin analizini PCR tabanlı olmayan tekniklerle karşılaştırıldığında daha kısa sürede gerçekleştirebilme fırsatı sağlamaktadır (Gil ve Coetzer, 2004).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereç

5.1.1. Cihazlar

Çalışma esnasında Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD laboratuvarlarında mevcut olan cihazlar kullanılmıştır, kullanılan cihazlara ait liste Tablo 12’de verilmiştir. Çalışma, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 03.05.2019 tarihinde 09.2019.506 protokol numarası ile onaylanmıştır.

Tablo 12. Çalışmada kullanılan cihazlar

CİHAZ ADI	MARKA
Mikrosantrifüj	IEC Micro-MB
Mikrosantrifüj	Heraeus Biofuge®
Otoklav	All American
Otomatik Mikropipetler	Gilson
Vorteks	Elektro-Mag
Isı Döngü Cihazı	Bio-Rad
Isı Bloğu	Techne DB-ZA
Derin Dondurucu -20°C	Arçelik
Derin Dondurucu -80°C	Thermo Fisher Scientific
Buzdolabı	Arçelik
LightCycler® 480 Real Time PCR Cihazı	Roche
Nano-400A Mikro UV Spektrofotometre	Allsheng

5.1.2. Kimyasal Maddeler

Periferik tam kandan DNA izolasyonu ve RNA izolasyonu işlemleri yapılırken kullanılan kimyasal maddeler Tablo 13’de yer almaktadır.

Tablo 13. Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler

Etanol	Carlo Erba
Fosfat Tamponlu Salin (PBS)	Sigma
Deiyonize Su	Roche
Kloroform	Carlo Erba
Poroteinaz K	Roche
İzopropanol	Merck
DNase	Sigma

5.1.3. Sarf Malzemeler

İzolasyon, sentez ve PCR işlemlerinde kullanılan sarf malzemeler Tablo 14’de gösterilmektedir.

Tablo 14. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler

Ependorf Tüp 1.5 ml ve 2.0 ml	Axygen
Real Time PCR Plate 96	Applied Biosystems
Pipet uçları (10µl, 20µl, 200µl, 1000µl)	Axygen

5.1.4. Kitler

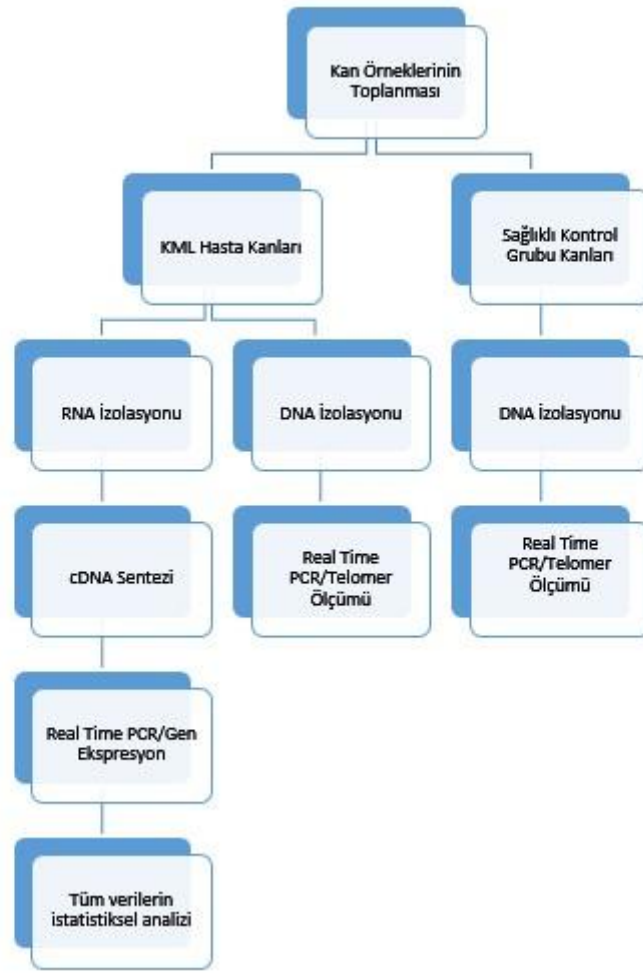
Periferik tam kan örnekleri ile çalışmak için kullanılan DNA izolasyon kiti, RNA izolasyon işlemleri için kullanılan kit, cDNA sentezi esnasında kullanılan kit ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu işlemi esnasında kullanılan kitlere ait bilgiler Tablo 15’de belirtilmektedir.

Tablo 15. Çalışmada kullanılan kitler

High Pure RNA Isolation Kit	Roche
Genomic DNA Purification Kit	Thermo Scientific
High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Scientific
qPCR Green Mix Hi-ROX	Enzo

5.2. Yöntem

Çalışmada yapılan işlemler Şekil 7’de özetlenmiştir.



Şekil 7. İş akışı

5.2.1. Hasta ve Kontrol Örneklerinin Toplanması

Hematoloji bölümünde takip edilen KML hastalarından kan örnekleri toplanmıştır. Kriter olarak; Kronik Miyeloid Lösemi tanısı alan ve tirozin kinaz inhibitörü tedavisine direnç gösteren hastalar ile kronik miyeloid lösemi tanısı alan ve tirozin kinaz inhibitörü tedavisine yanıt veren hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. Telomer uzunluğu ölçümü yapabilmek için hastaların yaşlarına uyumlu sağlıklı kontrol grubu (KML tanısı olmayan, hastalar ile yaşıt bireyler) çalışmaya dahil edilmiştir. Toplamda 16 tedavi dirençli KML hastasından, 27 tedavi yanıtı KML hastasından ve hastalarla yaş uyumlu sağlıklı bireyden kan örneği alınmıştır. Hasta örnekleri toplanırken yaş sınırlaması yapılmamıştır. Tüm hastaların ve kontrol grubundaki bireylerin demografik ve klinik verileri kayıt edilmiştir.

Örnek alımı esnasında tüm katılımcılara çalışmayı özetleyen “Bilgilendirme Formu” verilmiştir. Katılımcılar, çalışmaya gönüllü olarak katıldıklarını ifade eden “Onay Formu” ile

örnek verme işlemini gerçekleştirmiştir. Tüm hasta ve kontrol grubundan kan örnekleri alınırken 3.0 ml EDTA'lı tüpler kullanılmıştır. Kan örnekleri, örnek alındığı gün RNA izolasyonu yapılana kadar +4 °C'de tutulmuştur, işlem sonrası DNA izolasyonu yapılana kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Çalışma, Helsinki Deklarasyonu'na uygun prosedürle yapılmıştır.

5.2.2. RNA İzolasyonu

Tedavi dirençli ve tedavi yanıtı tüm hastaların kanları, kan örneklerinin toplandığı günlerde High Pure RNA Isolation Kit (ROCHE) kullanılarak izole edilmiştir. İşlem verimini artırmak için taze kandan izolasyon yapılmıştır. İşlem prosedürü şu şekildedir;

- 1) 1,5 ml reaksiyon tüpüne 1 ml 1X RBC Lizis tampon eklendi, üzerine 500 µl kan eklendi. 10 dakika boyunca nazıkçe çalkalandı. (+15 ila +25°C 8000xg'de santrifüj edildi)
- 2) Karışım 5 dakika 500xg'de santrifüj edildi.
- 3) Süpernatant uzaklaştırıldı, pellete 1 ml 1X RBC Lizis tampon eklendi, çözülene kadar nazıkçe alt üst edilerek karıştırıldı.
- 4) Karışımı içeren tüp 3 dakika 500xg'de santrifüj edildi.
- 5) Supernatant uzaklaştırıldı, pellete 200 µl PBS eklendi, çözülene kadar nazıkçe alt üst edilerek karıştırıldı.
- 6) Karışımı içeren tüpe 400 µl Lizis/Bağlanma Tamponu eklendi, 15 saniye vortekslendi, ardından karışım kolona alındı.
- 7) Kolonun olduğu tüp 8000xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı.
- 8) DNaz Karışımı hazırlandı (90 µl DNaz İnkübasyon tampon + 10 µl DNaz)
- 9) Kolona 100 µl DNaz Karışımı eklendi, 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 10) Kolona 500 µl Yıkama Tamponu I eklendi, 15 saniye 8000xg'de santrifüj edildi, supernatant uzaklaştırıldı.
- 11) Kolona 500 µl Yıkama Tamponu II eklendi, 15 saniye 8000xg'de santrifüj edildi, supernatant uzaklaştırıldı.
- 12) Kolona 200 µl Yıkama Tamponu II eklendi, 2 dakika 13000xg'de santrifüj edildi, supernatant uzaklaştırıldı.
- 13) Kolon toplama tüpüne alındı, 50 µl Elüsyon Tamponu eklendi, 1 dakika 8000xg'de santrifüj edildi.
- 14) Nano-400A Mikro UV Spektrofotometre cihazı ile her örnekten 1'er µl RNA lizati alınarak miktar ve kontaminasyon incelemesi yapıldı.

15) RNA lizatının olduğu tüp, cDNA Sentezi işlemine kadar -80°C’de saklandı.

5.2.3. cDNA Sentezi

Tedavi dirençli ve yanıtli tüm KML hastalarının kanlarından RNA izolasyonu işlemi yapıldıktan sonra, bu RNA örneklerinden High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit kullanılarak cDNA sentezi işlemi gerçekleştirilmiştir. Sentez esnasında takip edilen prosedür, işlem sırasına göre aşağıda verilmiştir.

- 1) Kit bileşenlerinin buz üzerinde erimesine izin verildi. Gerekli sayıda reaksiyonu hazırlamak için gereken bileşenlerin hacmi hesaplandı.
- 2) 2x RT Master Karışımı içeriği Tablo 16’da belirtildiği gibi hazırlandı.

Tablo 16 . 2x RT Master Karışımı içeriği

Bileşen	Hacim (1X için)
10X RT Tampon	2 µl
25X dNTP Karışımı (100 mM)	0.8 µl
10X RT Random Primers	2 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase	1 µl
Nuclease-free H ₂ O	4.2 µl
Toplam Hacim	10.0 µl

- 3) Her bir örnek için; hasta kodlarına göre hazırlanan mikrotüplere toplam 10 µl 2x RT Master Karışımı eklendi.
- 4) Tüplere, belirlenen hastaların 10 µl RNA örneği eklendi. Hazırlanan reaksiyon ısı döngü cihazına alındı.
- 5) Cihazda uygulanan program sıcaklık ve süre açısından Tablo 17’de belirtildiği gibi düzenlenmiştir.

Tablo 17 . cDNA sentezi ısı döngü cihazı koşulları

	Adım 1	Adım 2	Adım 3	Adım 4
Sıcaklık	25°C	37°C	85°C	4°C
Süre	10 dakika	120 dakika	5 dakika	Hold

Cihazda uygulanan program tammalandıktan sonra sentez ürünleri, PCR işlemine kadar -20°C’de saklandı.

5.2.4. Real Time PCR Yöntemiyle Gen Ekspresyon Analizi

Gerçek zamanlı (RT) PCR oldukça hassas bir yöntemdir, nadir transkriptlerin ve gen ekspresyonundaki küçük değişikliklerin kantifikasyonuna olanak sağlar. Ayrıca gerçekleştirilmesi kolaydır, gerekli doğruluğu sağlar, güvenilir ve hızlı kantifikasyon sonuçları üretir, bu açıdan avantajlıdır. Gerçek zamanlı PCR’de yeni sentezlenen PCR ürünleri için en basit tespit tekniği, küçük oluklu çift sarmallı DNA’ya bağlanan SYBR Green I floresan boyasının kullanımıdır. Hedef genin endojen bir standartla normalleştirilmesi önerilir. Bu nedenle, çoğunlukla referans genleri veya gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH, housekeeping), albümin, aktinler, tübülünler, siklofilin, 18S rRNA veya 28S rRNA uygulanabilir. Housekeeping genler (ev idaresi genleri), temel hücrenin hayatta kalması için gerekli olduklarından tüm çekirdekli hücre tiplerinde mevcuttur; bu genlerin mRNA sentezi, deneysel tedaviler altında bile, çeşitli dokularda istikrarlı ve güvenlidir (Pfaffl, 2001).

Gerçek zamanlı PCR için kantitatif son nokta eşik döngüsüdür (threshold cycle, Ct). Ct, raportör boyanın floresan sinyalinin belirlenmiş eşiği geçtiği PCR döngüsü olarak tanımlanır. Verileri Ct olarak sunarak, PCR’nin amplifikasyonun üstel fazında olduğundan emin olunur. Ct’nin sayısal değeri, reaksiyondaki ampikon miktarıyla ters orantılıdır; yani, Ct ne kadar düşükse, ampikon miktarı o kadar fazladır (Schmittgen ve Livak, 2008).

Bu çalışmada, tirozin kinaz inhibitörü (TKİ) tedavisine dirençli olan KML hastaları ile TKİ tedavisine yanıtı olan KML hastaları arasında gen ekspresyon seviye farklılıklarını analiz etmek için belirlenen genlere yönelik Real Time (Gerçek Zamanlı) PCR işlemi yapılmıştır. İşlem esnasında qPCR Green Mix Hi-ROX (Enzo) kullanılmıştır.

Gen ekspresyon paneli için belirlenen genler ve primerleri Tablo 18’de belirtilmiştir. Raportör olarak SYBR Green floresan boya kullanılarak yapılan çalışmalarda LightCycler® 480 Real Time PCR cihazı kullanılmıştır. Deneylerde referans (housekeeping) gen olarak Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) kullanılmıştır. Her örneğin hedef genlerindeki geçiş noktası (Ct) değerleri, aynı örneklerin GAPDH housekeeping geni Ct’sinin oranına göre normalize edilerek bağıl kantitasyon değerleri elde edilmiştir.

Tablo 18. KML hastalarında gen ekspresyon analizi RT PCR primerleri

Gen Adı	Forward Primer 5' – 3' Sekans	Revers Primer 5' – 3' Sekans
TWIST	CATGTCCGCGTCCCACTA	TTCTCTGGAAACAATGACATCTA GG
HMGA2	AGTCCCTCTAAAGCAGCTCAAA AG	GCCATTCCTAGGTCTGCCTC
EZH2	CATCATAGCTCCAGCTCCCG	CATCCCGGAAAGCGGTTTTG
FAM83 B	AGGCGAAGTTTCCCGTTATT	TCTTTGGGCTTTTCTGGTTG
SALL4	TGCAGCAGTTGGTGGAGAAC	TCGGTGGCAAATGAGACATTC
PAK1	GCTGTTCTGGATGTGTTGGA	TTCTGAAACTGGTGGCACTG
TET2	GAACGAGGCTGGCAAACA	CAACAGGAGCAAAGGCAAGT
DNMT1	GCCTCTCTCCGTTTGGTACA	CCTCTCCATCGGACTTGCTC
GAPDH	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA

Gen Ekspresyon Analizi için Real Time PCR İşlem Akışı;

- 1) Tablo 19’da detayları verilen bileşenlere göre bir ana karışım hazırlandı.
- 2) Her bir gen için (toplam 9 gen) ayrı tüpte 9 µl rekasiyon ana karışımı hazırlandı.
- 3) 96’lık plate kullanılarak her bir kuyucuğa 9 µl ana karışım eklendi.
- 4) Belirlenen kuyucuklara hastalara ait cDNA örnekleri 1’er µl ilave edildi, plate seal ile dikkatlice kapatıldı.

Tablo 19. Gen Ekspresyon Analizi İçin RT PCR Bileşenleri

Bileşen	1X
2X AMPIGENE qPCR Green Mix Hi-ROX	5 µl
Forward primer	0.4
Revers primer	0.4 µl
dH2O	3.2 µl
cDNA	1 µl
Toplam Hacim	10 µl

- 5) Plate 3000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi.
- 6) Plate, Roche LightCycler 480 II cihazına yerleştirildi, aşağıda belirtilen program ayarlandı. Pre –inkübasyon için; 1 döngü, 95°C ve 2 dakika, ardından amplifikasyon için; 40 döngü 95°C'de 5 dakika ve 59°C'de 20-30 saniye olacak şekilde program girişi yapıldı.
- 7) Rekasiyon ürünleri çalışma boyunca -20°C'de saklandı.

5.2.5. DNA İzolasyonu

KML hastaları ve sağlıklı kontrol grubunun kanlarından telomer uzunluk ölçümü işlemi yapmak için öncelikle DNA izolasyonu işlemi yapılmıştır. İzolasyonda, Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) kullanılmıştır. DNA izolasyon işlem basamakları şöyledir;

- 1) 200 µl kan numunesi ile 400 µl lizis solüsyonu karıştırıldı ve ara sıra tüpün ters çevrilmesiyle 65°C'de 10 dakika inkübe edildi.
- 2) Tüpe 600 µl kloroform eklendi, ters çevirerek (3-5 kez) nazikçe emülsifiye edildi ve numune 10.000 rpm'de 2 dakika santrifüjlendi.
- 3) 720 µl steril deiyonize su, 80 µl 10X konsantre Precipitation Solution (Çökeltme Solüsyonu) ile karıştırılarak 1X Çökeltme Solüsyonu hazırlandı.
- 4) DNA içeren üst sulu faz yeni bir tüpe aktarıldı ve tüpe 800 µl taze hazırlanmış Çökeltme Solüsyonu eklendi, oda sıcaklığında 1-2 dakika boyunca birkaç kez hafifçe karıştırılarak inkübe edildi. Ardından 2 dakika boyunca 10.000 rpm'de (~9400 x g) santrifüjlendi, süpernatant uzaklaştırıldı.
- 5) Pellet 100 µl NaCl çözeltisi içinde çözüldü, vortekslendi.
- 6) 300 µl %100 soğuk etanol eklendi, -20°C'de 10 dakika bekletilerek DNA'nın çökmesi sağlandı.
- 7) 10.000 rpm'de (~9400 x g), 3-4 dakika santrifüj edildi, süpernatant uzaklaştırıldı.
- 8) Pellet (DNA) 50 µl steril deiyonize su içinde nazikçe vorteksenerek çözüldü.
- 9) İzole edilen DNA örnekleri Real Time PCR işleminde kullanılabilecek kadar -20°C'de saklandı.

5.2.6. Real Time PCR Yöntemiyle Telomer Uzunluğu Ölçümü

Tüm KML hastaları ve yaş uyumlu sağlıklı kontrol grubu arasındaki telomer uzunluk farkını belirlemek için Real Time PCR Yöntemi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada qPCR Green Mix Hi-ROX (Enzo) prosedürü uygulanmıştır. Referans gen olarak, tek kopya gen 36B4 kullanılmıştır.

Asidik ribozomal fosfoprotein PO'yu kodlayan 36B4 geni, kromozom 12'de yer almaktadır (Cawthon, 2002). Çalışma primerleri Tablo 20'de listelenmiştir.

Tablo 20. Telomer uzunluğu ölçümü için kullanılan primerler

Gen Adı	Forward Primer 5' – 3' Sekans
Telomer Forward Primer 5' – 3' Sekans	CGGTTTGTGGTTGGGTTTGGGTTTGGGTTT GGGTTTGGGTT
Telomer Revers Primer 5' – 3' Sekans	GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTA C
36B4 Forward Primer 5' – 3' Sekans	CCCATCTATCATCAACGGGTACAA
36B4 Revers Primer 5' – 3' Sekans	CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC

qPCR Green Mix Hi-ROX (Enzo) prosedüre göre hazırlanan bileşenler ve miktarları Tablo 21'de listelenmiştir.

Tablo 21. Telomer uzunluğu ölçümü için RT PCR bileşenleri

Bileşen	1X
2X AMPIGENE qPCR Green Mix Hi-ROX	5 µl
Forward primer	0.4
Revers primer	0.4 µl
dH2O	3.2 µl
DNA	1 µl
Toplam Hacim	10 µl

Telomer uzunluğu ölçümü için işlem akışı;

1) Telomer ve referans gen için 9 µl rekasiyon ana karışımı hazırlandı. 96'lık plate kullanılarak her bir kuyucuğa 9 µl ana karışım eklendi.

2) Kuyucuk sıralaması yapıldı, KML hastalarına ve sağlıklı kontrol grubuna ait DNA örneklerinden 1' er µl ilişkili kuyucuğa aktarıldı, plate seal ile kapatıldı.

4) Plate 3000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi ve Roche LightCycler 480 II cihazına yerleştirildi. Cihazda kullanılan program Tablo 22'de gösterilmektedir.

Tablo 22. Telomer uzunluğu ölçümü için RT PCR programı

Program Adı	Döngü	Sıcaklık	Süre
Pre-inkübasyon	1	95°C	10 dakika
Amplifikasyon	40	95°C	15 saniye
-Primer Bağlanması		60°C	1 dakika
-Uzatma		72°C	30 saniye
Erime Eğrisi	1	95°C	5 saniye
		40°C	1 dakika
		97°C	-
Soğutma	1	40°C	10 saniye

5.2.7. İstatistiksel Analiz

Çalışmada, gen panelinde yer alan 8 genin TKİ dirençli ve duyarlı gruplar arasında analizini yapmak ve genlerin birbirleriyle ilişkilerini değerlendirebilmek için gen ekspresyon verilerinin detaylı incelemesi gerçekleştirilmiştir. TKİ tedavisine dirençli ve duyarlı gruplarda genlerin istatistiksel olarak anlamlı kabul edilebilecek verilerini belirlemek için SPSS sürüm 24, GraphPad Prism 6 ve MedCalc sürüm 23.2.1 kullanılmıştır. İstatistiksel değerlendirmelerde anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

Bu doğrultuda ilk olarak, Real Time PCR ile elde edilen Ct değerlerinden ΔCt değerleri hesaplanmıştır. ΔCt değerlerinin normal dağılıma uygun olup olmadığı kontrol edildi, normal dağılıma uymadığı için nonparametrik yöntem kullanılmıştır. Analizlerde Mann whitney u testi ve Wilcoxon testi de uygulanmıştır.

Tedavi dirençli ve duyarlı hasta gruplarında ekspresyon seviyesinde farklılık gösteren genlerin özgüllüğünü belirleyebilmek için ROC eğrisi analizi yapılmıştır. Genlerin birbirleriyle olan ilişkilerini tespit etmek için korelasyon analizleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlardan nicel bir

olasılık oranı verilmesi için lojistik regresyon analizi yapılmıştır. Lojistik regresyon modelinin veriye uyumu Hosmer ve Lemeshow testi ile incelenmiştir.

6. BULGULAR

6.1. KML Hastalarının ve Kontrol Grubunun Özelliklerinin Belirlenmesi

Çalışmada öncelikle Hematoloji Bölümünde takip edilen Kronik Miyeloid Lösemi hastalarından elde edilen periferik kan örnekleriyle KML hasta grubu oluşturulmuştur. Bu grup 43 KML hastası içermektedir. Daha sonra bu gruptaki hastaların yaşlarıyla uyumlu olan (yaşıt veya ± 2 yaş) sağlıklı gönüllü katılımcıların periferik kan örnekleri toplanarak kontrol grubu oluşturulmuştur. KML hasta grubu, tirozin kinaz inhibitörü tedavisine verdiği yanıtı göre, kendi içinde 2 alt gruba ayrılmıştır; TKİ tedavisine dirençli grup ve TKİ tedavisine duyarlı grup. TKİ tedavisine dirençli grup 16 KML hastasından oluşmaktadır, duyarlı grup 27 KML hastasından oluşmaktadır. Hastaların demografik bilgileri (yaş ve cinsiyet), KML tanı tarihi, tanıdan itibaren kullandıkları TKİ türü ve dozu, son 3 BCR/ABL IS değeri, eğer yapıldıysa mutasyon analiz sonucu ve tedaviye dirençli/duyarlı olma durumlarına dair veriler toplanmıştır.

ELN Kriterlerine göre, tanıda ilk basamak tedavi, 1. nesil TKİ olan imatinibtir. BCR-ABL1 IS (uluslararası ölçek) değerinin Real Time PCR yöntemiyle 3, 6 ve 12. ayda ölçülmesi, ölçüm sonucuna göre mevcut tedaviye devam (optimal yanıt), mevcut tedavinin değiştirilmesi (başarısızlık/direnç) veya hastada mevcut tedavinin dikkatli bir şekilde devam edilmesine (uyarı) karar verilir. TKİ tedavisinde 3 aylık dönüm noktasından önce veya civarında, BCR::ABL1 transkriptleri [IS] $>10\%$ ise TKİ'yi değiştirmek düşünülebilir, bu değer dışındaki durumlarda KML hematolojik direncine dair net bir kanıt yoksa tedavi değiştirilmez. 6 aylık BCR::ABL1 transkriptleri (IS) $>10\%$ olan hastalarda imatinibden ikinci nesil bir TKİ'ne geçme ihtiyacı görülebilir. 12 ay veya sonrasında BCR::ABL1 transkriptleri (IS) $>1\%$ olarak tanımlanan direnç, KML direncinin ve TKİ tedavisini değiştirme ihtiyacının net göstergesidir. TKİ direncinin farklı sebepleri de vardır. Bunlardan biri, kullanılan TKİ'ne karşı hastanın tedavi uyumunun düşük olması durumudur. Durum değerlendirilirken hastaların ilaçlarını hangi dozda ve ne sıklıkla aldığı sorgulanmalıdır. Hastanın komorbite, yaş, toksisite, mutasyon durumu, ek kromozomal anomali gibi faktörlerine göre 2. nesil/3. nesil TKİ tedavisine geçilir (Jabbour ve Kantarjian, 2024).

Yukarıda bahsedilen ELN Kriterlerine göre değerlendirilen hastalardan 16 tanesi TKİ tedavisine dirençli, 27 tanesi ise duyarlıdır. TKİ tedavisine duyarlı hastalarda 2. nesil ve 3. nesil TKİ tedavisine geçilmemiştir. İstisna olarak kod numarası 13 olan KML hastası 2. nesil tirozin kinaz inhibitörü kullanmaktadır, sebebi 1. nesil TKİ tedavisini düzenli kullanmaması ve tedavi uyumsuzluğudur. Diğer 2. nesil TKİ kullanan hastalar, IS değerleri sebebiyle dirençli olduğu

belirlenen ve tedavi değişikliği yapılan hastalardır. Çalışmada yer alan dirençli/duyarlı tüm KML hastalarına ait veriler Tablo 23 ve Tablo 24’de yer almaktadır. Tablonun ‘mutasyon’ kısmında 2 hastaya ait (kod numarası 2 ve 28 olan hastalar) önceden tespit edilen mutasyon türü bilgisi yer almaktadır. Tablonun mutasyon kısmında ‘-’ işareti olan hastalar mutasyon analizi yapılmış ancak herhangi bir kinaz alanı mutasyonu tespit edilmemiş olan hastalardır. Mutasyon kısmı boş olan hastalar, kinaz alanı için herhangi bir mutasyon analizi yapılmamış olan hastalardır.

Tablo 23 : KML hastalarının demografik özellikleri, tanı ve ilaç bilgisi

Kod	Yaş	Cinsiyet	Tanı Tarihi	İlk Tedavi (Hangi ilaç/doz/süre)	2.Nesil TKİ (Mevcut İlaç)
1	50	K	2018	İmatinib/400 mg/10 ay	Tasigna/2x400 mg/6 yıl
2	48	E	2014	İmatinib/400 mg/7 ay	Dasatinib/2x50 mg/10 yıl
3	59	E	2015	İmatinib/1x400 mg/10 yıl	-
4	31	K	2011	İmatinib/1x400mg/14 yıl	-
5	59	E	2015	İmatis/1x400 mg/10 yıl	-
6	61	K	2016	İmavec/1x400 mg/9 YIL	-
7	48	E	2015	İmatinib/1x400 mg/10 yıl	-
8	47	K	2009	Glivec/5 yıl İmatenil/1x300 mg/11 yıl	-
9	36	K	2019	Hydrea 3 ay/ İmatinib 1x400 mg/6 yıl	-
10	36	E	2017	Hydrea 1 ay/ İmatinib 1x400 mg/8 yıl	-
11	63	E	2019	İmatinib/1x400 mg/6 yıl	-
12	59	E	2018	İmatinib/1x400 mg/7 yıl	-
13	48	K	2016	İmavec/1 yıl	Nilotinib/2x200 mg/8 yıl
14	50	K	2019	Hydrea 1 ay/Glivec 1x400 mg/6 yıl	-
15	57	E	2015	İmatinib/1x400 mg/10 yıl	-
16	60	K	2015	İmatinib/2 yıl	Nilotinib/4 yıl/ Dasatinib/1x100 mg/5 yıl
17	65	E	2019	Hydrea 3 ay/ İmatinib 1x400 mg/6 yıl	-
18	56	E	2012	İmavec/1x400 mg/13 YIL	-
19	61	E	2011	İmatinib/1x400 mg/14 yıl	-
20	39	E	2009	Glivec/1x400 mg/16 YIL	-
21	51	E	2005	İmatinib/1x400 mg/20 yıl	-
22	59	K	2003	Hydrea+IFN/1yıl İmatis/1x300mg/21yıl	-
23	60	K	2006	Glivec/6 yıl İmatis/1x400 mg/13 yıl	-
24	57	K	2016	İmatinib/1x400 mg/6 ay	Nilotinib (Tasigna 2x200 mg)/ 8 yıl
25	59	K	2007	İmatinib/1x400 mg/18 YIL	-
26	55	K	2009	İmatinib/1x400 mg/16 YIL	-
27	63	E	2013	İmatinib/1x400 mg/12 YIL	-
28	58	K	2004	Hydrea 1 yıl, İmatinib/3 yıl	Nilotinib 5yıl/ Dasatinib/2x50 mg/7 yıl
29	70	K	2001	Hydrea+IFN 2 yıl, İmatinib/5 yıl	Nilotinib 6yıl/ Dasatinib/1 yıl/Tasigna/2x200 mg/10 yıl

Tablo 23 : KML hastalarının demografik özellikleri, tanı ve ilaç bilgisi (devamı)					
30	47	E	2008	İmatinib/1x400 mg/17 YIL	-
31	60	E	2014	İmatinib/1x400 mg/11 YIL	-
32	67	K	2007	İmatinib/1x400 mg/18 YIL	-
33	62	E	2006	İmavec/1x400 mg/19 YIL	-
34	47	E	2012	İmatinib/1x400 mg/1 YIL	Nilotinib 5yıl, Sprycel/2x50 mg/7 yıl
35	66	K	2004	İmatinib/1x400 mg/1 YIL	Dasatinib/10 yıl, Nilotinib/2x200 mg/6 yıl
36	55	E	2000	Hydrea/8 yıl, İmatinib/1x400 mg/1 YIL	Dasatinib/5 yıl, Ponatinib/1 yıl, Bosutinib/1x500 mg/5 yıl
37	57	E	2010	Glivec/1 ay	Sprycel/1 yıl, Tasigna/2x200 mg/13 yıl
38	41	E	2012	İmatinib/1x400 mg/2 YIL	Nilotinib/2x200 mg/7 Yıl (4 yıl ilaç kullanmamış)
39	55	E	2009	Nilotinib 1 yıl	Sprycel/2x50 mg/6 yıl, son 6 yıldır ilaç kullanmıyor
40	52	K	2014	İmatinib	Dasatinib 8 ay/Nilotinib 2 yıl/Ponatinib/Bosutinib/1x500 mg/2 yıl
41	58	E	2010	Glivec/3 yıl	Tasigna 2x400 mg/11 yıl
42	63	K	2001	Glivec/2 yıl	Tasigna 2x400 mg/2 yıl/Sprycel/1x50 mg/10 yıl
43	66	K	2017	Hydrea/2 ay, İmavec/3 yıl	Sprycel/1x50 mg/5 yıl

Tabloda BCR::ABL1 transkriptlerinin (IS) değerleri ‘BCR/ABL IS’ olarak gösterilmiştir. ‘BCR/ABL IS 1’ olan değer, çalışma için hastadan kan örneği alındığı vakit ölçülen IS değerini yansıtmaktadır. ‘BCR/ABL IS 2’ olan değer; çalışma için hastadan kan örneği alınımından 1 önce ölçülen (genellikle 3 ay önce) değeri ifade etmektedir. ‘BCR/ABL IS 3’ olan değer; çalışma için hastadan kan örneği alınımından 2 önce ölçülen (genellikle 6 ay önce) değeri ifade etmektedir. ‘BCR/ABL IS’ kısmında ‘saptanamadı’ olarak ifade edilen durum, BCR-ABL füzyon gen transkriptinin saptanmadığını ve kontrol amplikasyonun yeterli olmadığından düşük düzey pozitif ekarte edilemediğini; optimal sonuç için yeni materyal ile tekrar numune istendiğini yansıtmaktadır. KML hastalarının yaş aralığına bakıldığında 31-70 arasındaki bireylerden oluştuğu görülmektedir.

Çalışmaya dahil edilen kontrol grubu, KML tanısı olmayan, farklı bir kanser tanısı olmayan, KML hasta grubu ile yaş uyumlu olan (yaşıt veya +/-2 yaş) gönüllü bireylerden oluşmaktadır. Kontrol grubunun hasta grubuyla yaş uyumlu olmasının sebebi, telomer uzunluğu analizini gerçekleştirebilmektir. Kontrol grubu oluşturulurken cinsiyet ayrımı yapılmamıştır. Kontrol grubu için esas özellik olan yaş durumuna bakıldığında, yaş aralığı 33-72 arasındadır. Kontrol grubu için alınan periferik kan örneğinden DNA izolasyonu yapılmıştır, ardından Real Time PCR yöntemiyle telomer uzunluğu ölçülmüştür. Bu ölçüm sonuçları, KML hastaları ile kıyaslanırken KML hastası ve kontrol grubu bireyi yaşa göre tek tek eşleştirilmiştir.

Tablo 24: Hastaların BCR::ABL1 (IS) değ erleri, TKİ direnci ve mutasyon bilgisi

Kod	Tedavi Yanıtı	BCR/ABL IS 1	BCR/ABL IS 2	BCR/ABL IS 3	Mutasyon
1	DİRENÇ	SAPTANAMADI	0,0046	0,0709	
2	DİRENÇ	3,0448	0,9185	0,05	M351T (2015)
3	DUYARLI	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	
4	DUYARLI	NEGATİF	SAPTANAMADI	0,0016	
5	DUYARLI	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	
6	DUYARLI	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	
7	DUYARLI	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	
8	DUYARLI	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	-
9	DUYARLI	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	
10	DUYARLI	0,0112	0,0135	0,0076	
11	DUYARLI	NEGATİF	SAPTANAMADI	NEGATİF	
12	DUYARLI	NEGATİF	0,0019	NEGATİF	
13	DUYARLI	0,0143	0,0214	0,0013	
14	DUYARLI	SAPTANAMADI	NEGATİF	0,0017	
15	DUYARLI	NEGATİF	0,002	NEGATİF	
16	DİRENÇ	-	0,1793	NEGATİF	-
17	DUYARLI	0,0417	0,00264	NEGATİF	
18	DUYARLI	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	
19	DUYARLI	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	
20	DUYARLI	SAPTANAMADI	SAPTANAMADI	0,0452	
21	DUYARLI	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	
22	DUYARLI	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	-
23	DUYARLI	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	
24	DİRENÇ	SAPTANAMADI	SAPTANAMADI	NEGATİF	
25	DUYARLI	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	
26	DUYARLI	SAPTANAMADI	0,0112	NEGATİF	
27	DUYARLI	SAPTANAMADI	NEGATİF	NEGATİF	
28	DİRENÇ	SAPTANAMADI	NEGATİF	NEGATİF	F359V
29	DİRENÇ	0,0119	0,0072	0,0071	
30	DUYARLI	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	
31	DUYARLI	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	
32	DUYARLI	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	
33	DUYARLI	SAPTANAMADI	NEGATİF	NEGATİF	
34	DİRENÇ	0,0021	0,0017	SAPTANAMADI	
35	DİRENÇ	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	
36	DİRENÇ	0,0144	0,01352	0,0362	
37	DİRENÇ	SAPTANAMADI	NEGATİF	NEGATİF	
38	DİRENÇ	0,0312	0,0291	0,0928	-
39	DİRENÇ	NEGATİF	NEGATİF	0,0012	
40	DİRENÇ	0,0036	NEGATİF	14,6644	-
41	DİRENÇ	NEGATİF	NEGATİF	0,0019	-

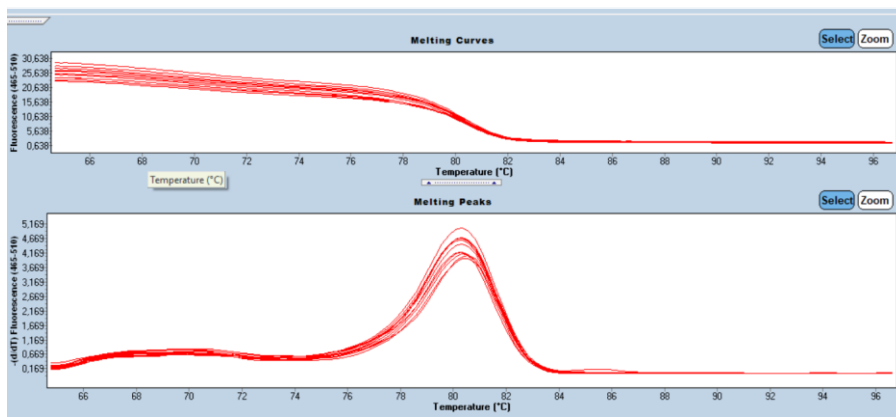
Tablo 24: Hastaların BCR::ABL1 (IS) değerleri, TKİ direnci ve mutasyon bilgisi (devamı)					
42	DİRENÇ	0,0062	NEGATİF	0,0023	
43	DİRENÇ	0,0035	NEGATİF	0,0017	

6.2. Gen Panelindeki Genlerin Ekspresyon Profili

Çalışmada literatür taraması yapıldıktan sonra KML’de TKİ tedavisi direnciyle ilişkili olduğu belirlenen genler seçilerek bir panel oluşturulmuştur. Oluşturulan bu gen panelinde HMGA2, EZH2, FAM83B, SALL4, PAK1, TET2, DNMT1 ve Twist-1 olmak üzere 8 gen yer almaktadır. Bu genlerin ekspresyon profilini oluşturmak için KML hastalarından periferik kan örneği alınıp RNA izolasyonu yapılmıştır, spektrofotometre ile konsantrasyon değerlendirilmesi yapılmıştır. Ardından cDNA sentezi yapılmıştır ve sonraki aşamada Real Time PCR yöntemiyle genlerin ekspresyonu incelenmiştir, böylece gen ekspresyon profili oluşturulmuştur. Paneldeki genlerin ekspresyon seviyesi tedavi dirençli grup ile tedavi duyarlı grup arasında kıyaslanmıştır.

Real Time PCR yöntemi için kullanılan LightCycler 480 sisteminde hedef gen (paneldeki tüm genler) ve referans gen (GAPDH) ekspresyonu, çift zincirli DNA’ya bağlanan floresan boya olan SYBR Green ile belirlenmektedir. Her reaksiyonda floresan ışımının ölçülmesiyle amplifikasyonu gerçekleşen örneğin belirlenmesi sağlanmaktadır. Hedef DNA molekülü örnekte ne kadar çok temsil ediliyorsa o kadar erken ışıma vermektedir. Sistem kantitasyonu Cp değeri kullanılarak yapılmıştır.

43 KML hastasına dair gen ekspresyon profili oluşturmak için panelde yer alan genler, Real Time PCR yöntemiyle analiz edilmiştir, örnek olarak EZH2 geni için erime sıcaklığı eğrisi Şekil 8’de gösterilmektedir.



Şekil 8. EZH2 geni için RT PCR erime sıcaklığı eğrisi

Örneklerin erime sıcaklığı eğrileri tek bir noktada pik vermiştir, bu; Real Time PCR işleminin başarılı ve spesifik olduğunu yansıtmaktadır.

KML hastaları için, gen ekspresyon paneli genlerinin her birinin Ct değerinden, referans gen olarak kullanılan GAPDH geninin Ct değeri çıkarılarak Δ Ct değeri hesaplanmıştır. Tablo 25’de gen ekspresyon paneli genlerinin Δ Ct değerleri listelenmiştir. Tabloda ‘Direnç’ kısmında tedaviye direnç gösteren KML hastaları için ‘Dirençli:1’ ifadesi; tedaviye duyarlı olan KML hastaları için ‘Duyarlı:0’ ifadesi kullanılmıştır.

Tablo 25. Gen panelindeki genlerin Δ Ct değerleri

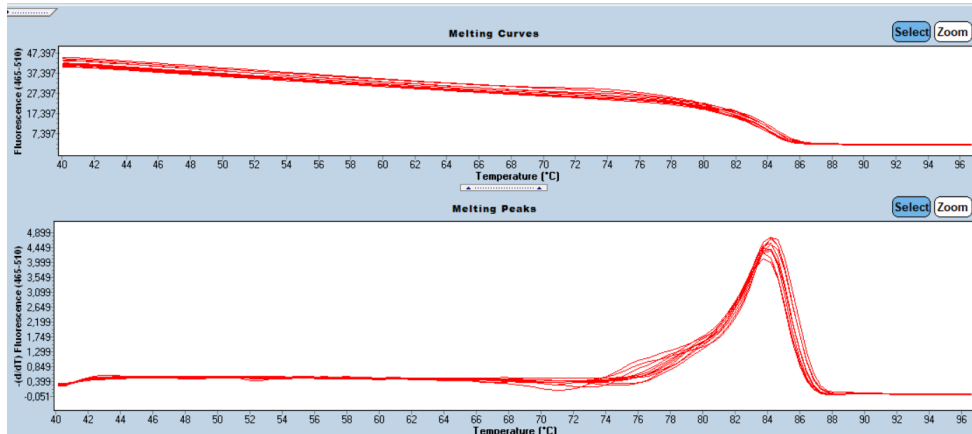
No	DİRENÇ	Δ Ct HMGA2	Δ Ct EZH2	Δ Ct FAM83B	Δ Ct SALL4	Δ Ct PAK1	Δ Ct TET2	Δ Ct DNMT1	Δ Ct TWIST
1	1	0,7	0,27	1,27	-2,82	2,3	-2,3	2,1	3,79
2	1	6,25	4,23	5	5,35	8,22	8,38	6,14	7,52
3	0	3,79	-0,82	1,93	-1,62	2,84	-1,53	1,36	3,92
4	0	4,37	2,25	16,77	-2,36	5,58	-2,82	2,24	13,22
5	0	7,92	3,13	2,08	-0,85	5,88	-1,36	4,84	10,84
6	0	8,21	1,95	1,93	4,04	16,43	6,01	3,25	3,82
7	0	7,56	5,7	4,09	1,47	6,05	-0,1	1,79	10,98
8	0	4,73	2,79	-0,24	-1,93	4,87	-1,43	1,56	7,93
9	0	6,46	2,23	0,31	-2,1	3,94	-1,63	3,32	6,23
10	0	16,56	3,18	16,56	4,34	11,9	7,39	3,78	10,99
11	0	9,2	4,01	16,71	4,6	11,05	5,24	3,25	13,21
12	0	5,32	3,14	16,81	4,66	8,27	8,74	3,19	10,24
13	0	12,29	2,24	13,44	2,99	9,75	5,43	3,66	17,47
14	0	5,74	1,67	12,45	0,02	7,83	-0,05	5,66	3,97
15	0	3,46	2,06	2,07	-0,65	4,08	-1,6	4,9	4,5
16	1	7,55	0,75	3,6	2,71	5,52	1,35	3,92	4,84
17	0	8,22	0,75	4,34	3,77	6,42	5,49	2,84	17,07
18	0	3,43	1,23	3,06	5,16	6,85	3,19	3,9	10,04
19	0	4,65	0,47	3,9	4,69	3,63	2,12	4,19	16,26
20	0	8,14	0,87	2,82	1,52	6,17	1,82	4,04	4,4
21	0	4,56	2,23	4,05	1,8	8,78	0,11	5,98	3,72
22	0	2,6	1,96	16,56	1,5	8,79	4,06	2,92	16,56
23	0	4,84	1	3,58	-0,03	4,67	0,04	3,38	10,9
24	1	2,63	1,57	2,21	2,53	9,08	3,59	4,62	13,72
25	0	4,42	1,33	9,46	0,96	3,83	1,76	3,16	6,03
26	0	1,57	0,51	6,48	-1,6	3,16	-1,09	2,09	4,19
27	0	1,64	0,59	0,71	-0,14	3,25	-0,94	2,78	11,65
28	1	3,42	0,58	16,08	1,91	3,81	5,4	5,47	16,08
29	1	0,24	0,79	16,51	-1,08	3,75	-0,59	3,77	7,07
30	0	2,57	0,02	15,14	2,96	2,58	1,96	2,12	4,52
31	0	2,17	0,8	1,25	-2,92	1,71	-1,76	0,95	2,77
32	0	7,63	-0,24	3,01	3,12	2,85	9,66	3,89	6,33
33	0	4,57	0,87	16,64	-1,02	3,46	0,52	2,82	9,15
34	1	5,92	1,2	13,28	2,82	8,91	5,85	5,98	3,91

Tablo 25. Gen panelindeki genlerin ΔC_t değerleri (devamı)									
35	1	7,44	1,27	4,34	3,45	6,14	5,73	5,34	3,27
36	1	4,87	1,66	5,52	2,7	8,62	7,25	6,19	17,3
37	1	6,26	2,3	9,74	4,35	7,16	5,06	4,51	17,67
38	1	3,12	1,15	6,99	3,93	4,9	3,1	4,9	17,35
39	1	4,46	1,03	4,35	3,86	16,53	13,14	3,27	16,53
40	1	2,65	0,05	3,76	2,09	3,96	9,82	3,6	13,55
41	1	2,45	0,01	2,52	4,52	7,68	10,94	3,8	16,14
42	1	2,46	-0,37	3,25	2,29	3,7	7,21	4,37	0,66
43	1	3,06	-4,35	12,01	2,29	7,01	7,01	3,74	12,01

6.3. Telomer Uzunluğu Ölçüm Sonuçları

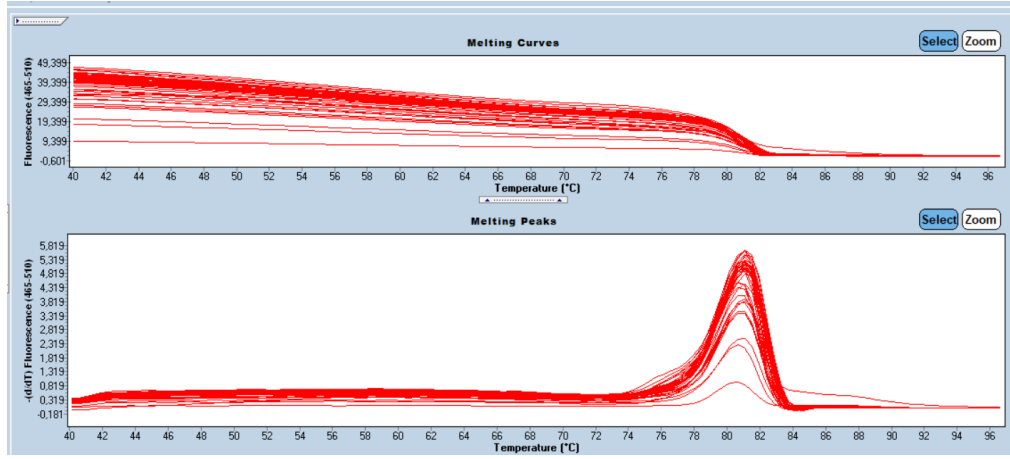
Çalışmaya dahil edilen toplam 43 KML hastasının ve hastalarla yaş uyumlu olan kontrol grubundaki bireylerin telomer uzunluğu ölçülmüştür. Telomer uzunluğu analizinde KML hasta grubundaki 16 tedavi dirençli hasta ile 27 tedavi duyarlı hasta arasında, yaş uyumlu kontrol grubuna göre kıyaslama yapılmıştır. KML hastalarının ve hastalarla yaş uyumlu (yaşıt veya ± 2 yaş) kontrol grubunun telomer uzunluğu Real Time PCR yöntemiyle analiz edilmiştir, erime sıcaklığı eğrisini yansıtan görseller Şekil 9'da ve Şekil 10'da yer almaktadır. Analizde ölçülen C_t değerleri, ΔC_t değerleri ve T/S Ratio ($2^{-\Delta C_t}$) değerleri Tablo 26'da yer almaktadır.

Formülasyon olarak, 43 KML hastanın her biri için ölçülen Telomer C_t değerinden, referans gen 36b4'ün C_t değeri çıkarılarak ΔC_t değeri hesaplanmıştır. Kontrol grubundaki her birey için ölçülen Telomer C_t değerinden, referans gen 36b4'ün C_t değeri çıkarılarak ΔC_t değeri hesaplanmıştır.



Şekil 9. Telomer için RT PCR erime sıcaklığı eğrisi

(Örneklerin erime sıcaklığı eğrileri tek bir noktada pik vermiştir, bu; Real Time PCR işleminin başarılı ve spesifik olduğunu yansıtmaktadır.)



Şekil 10. 34b4 için RT PCR erime sıcaklığı eğrisi

(Örneklerin erime sıcaklığı eğrileri tek bir noktada pik vermiştir, bu; Real Time PCR işleminin başarılı ve spesifik olduğunu yansıtmaktadır.)

Tablo 26. KML hastalarının Ct, ΔCt ve $2^{-\Delta Ct}$ değerleri

Hasta No	Yaş	Referans Gen	Ortalama Ct Referans Gen	Hedef Gen	Ortalama Ct Hedef Gen	ΔCt	TS RATIO $2^{-\Delta Ct}$
1	50	36b4	19,74	telomer	12,12	-7,62	196,72
2	48	36b4	20,79	telomer	12,1	-8,69	413,00
3	59	36b4	21,19	telomer	13,16	-8,03	261,38
4	31	36b4	21,87	telomer	12,34	-9,53	739,29
5	59	36b4	27	telomer	19,81	-7,19	146,02
6	61	36b4	21,87	telomer	13,06	-8,81	448,82
7	48	36b4	19,69	telomer	10,72	-8,97	501,46
8	47	36b4	23,61	telomer	14,23	-9,38	666,29
9	36	36b4	21,72	telomer	13,2	-8,52	367,09
10	36	36b4	22,07	telomer	13,71	-8,36	328,56
11	63	36b4	20,8	telomer	12,41	-8,39	335,46
12	59	36b4	23,79	telomer	13,9	-9,89	948,83
13	48	36b4	22,73	telomer	13,89	-8,84	458,25
14	50	36b4	23,69	telomer	14,86	-8,83	455,09
15	57	36b4	20,55	telomer	12,48	-8,07	268,73
16	60	36b4	22,7	telomer	14,19	-8,51	364,56
17	65	36b4	23,15	telomer	14,53	-8,62	393,44
18	56	36b4	24,62	telomer	16,19	-8,43	344,89
19	61	36b4	23,03	telomer	14,61	-8,42	342,51
20	39	36b4	21,85	telomer	12,81	-9,04	526,39
21	51	36b4	24,08	telomer	15,86	-8,22	298,17
22	59	36b4	20,87	telomer	12,16	-8,71	418,77
23	60	36b4	22,2	telomer	13,13	-9,07	537,45
24	57	36b4	23,43	telomer	14,74	-8,69	413,00
25	59	36b4	24,1	telomer	15,71	-8,39	335,46

Tablo 26. KML hastalarının Ct, ΔCt ve 2 ^{-ΔCt} değerleri (devamı)							
26	55	36b4	22,58	telomer	14,02	-8,56	377,41
27	63	36b4	22,49	telomer	13,67	-8,82	451,94
28	58	36b4	21,45	telomer	13,33	-8,12	278,20
29	47	36b4	21,94	telomer	13,13	-8,81	448,82
30	60	36b4	22,49	telomer	14,28	-8,21	296,11
31	67	36b4	22,61	telomer	14,11	-8,5	362,04
32	62	36b4	23,89	telomer	14,74	-9,15	568,10
33	47	36b4	22,1	telomer	13,76	-8,34	324,03
34	66	36b4	21,6	telomer	12,74	-8,86	464,65
35	55	36b4	21,74	telomer	14,59	-7,15	142,02
36	57	36b4	23,05	telomer	16,19	-6,86	116,16
37	41	36b4	22,68	telomer	13,97	-8,71	418,77
38	55	36b4	21,78	telomer	12,81	-8,97	501,46
39	52	36b4	22,04	telomer	13,82	-8,22	298,17
40	58	36b4	23,73	telomer	14,64	-9,09	544,96
41	70	36b4	23,81	telomer	15,15	-8,66	404,50
42	63	36b4	24,54	telomer	15,51	-9,03	522,76
43	66	36b4	22,31	telomer	13,56	-8,75	430,54

KML hastalarına yaş uyumlu (yaşıt veya +/- 2 yaş) olarak tek tek eşleştirilen kontrol grubundaki bireylerin telomer uzunlukları Real Time PCR yöntemiyle analiz edilmiştir, 36b4 geni referans gen olarak kullanılmıştır. Ölçülen Ct değerleri ve hesaplanan ΔCt değerleri ile 2^{-ΔCt} değerleri Tablo 27’de yer almaktadır.

Tablo 27. Kontrollerin Ct, ΔCt ve 2^{-ΔCt} değerleri

Kontrol kod	Yaş	Referans Gen	Ortalama Ct Referans Gen	Hedef Gen	Ortalama Ct Hedef Gen	ΔCt	TS RATIO 2 ^{-ΔCt}
S15	51	36b4	21,71	telomer	15,54	-6,17	72
k4	47	36b4	24,94	telomer	15,87	-9,07	537,45
H62	60	36b4	23,14	telomer	17,03	-6,11	69,07
k13	33	36b4	29,42	telomer	19,99	-9,43	689,78
S24	58	36b4	22,68	telomer	16,68	-6,00	64,00
S3	62	36b4	23,04	telomer	16,84	-6,20	73,52
k9	49	36b4	30,43	telomer	19,16	-11,27	2469,49
k4	47	36b4	24,94	telomer	15,87	-9,07	537,45
k8	34	36b4	19,69	telomer	11,16	-8,53	369,65
k6	35	36b4	23,67	telomer	14,42	-9,25	608,87
S19	63	36b4	21,5	telomer	15,7	-5,80	55,72
T17	57	36b4	21,22	telomer	15,95	-5,27	38,59
k9	49	36b4	30,43	telomer	19,16	-11,27	2469,49

Tablo 27. Kontrollerin Ct, Δ Ct ve 2 ⁻ Δ Ct değerleri (devamı)							
k9	49	36b4	30,43	telomer	19,16	-11,27	2469,49
T17	57	36b4	21,22	telomer	15,95	-5,27	38,59
H62	60	36b4	23,14	telomer	17,03	-6,11	69,07
T18	65	36b4	23,63	telomer	17,02	-6,61	97,68
S13	55	36b4	22,82	telomer	16,75	-6,07	67,18
S11	62	36b4	23,71	telomer	16,87	-6,84	114,56
k2	41	36b4	21,22	telomer	11,47	-9,75	861,08
k10	52	36b4	28,56	telomer	19,16	-9,4	675,59
H62	60	36b4	23,14	telomer	17,03	-6,11	69,07
H62	60	36b4	23,14	telomer	17,03	-6,11	69,07
S5	57	36b4	22,04	telomer	16,84	-5,20	36,76
S24	58	36b4	22,68	telomer	16,68	-6,00	64,00
S13	55	36b4	22,82	telomer	16,75	-6,07	67,18
S19	63	36b4	21,5	telomer	15,7	-5,80	55,72
S24	58	36b4	22,68	telomer	16,68	-6,00	64,00
k4	47	36b4	24,94	telomer	15,87	-9,07	537,45
H62	60	36b4	23,14	telomer	17,03	-6,11	69,07
S25	67	36b4	23,19	telomer	16,7	-6,49	89,88
S11	62	36b4	23,71	telomer	16,87	-6,84	114,56
k5	46	36b4	22,3	telomer	13,91	-8,39	335,46
T18	65	36b4	23,63	telomer	17,02	-6,61	97,68
S13	55	36b4	22,82	telomer	16,75	-6,07	67,18
T17	57	36b4	21,22	telomer	15,95	-5,27	38,59
k12	41	36b4	20,59	telomer	11,12	-9,47	709,18
S13	55	36b4	22,82	telomer	16,75	-6,07	67,18
S6	52	36b4	22,59	telomer	16,73	-5,86	58,08
S24	58	36b4	22,68	telomer	16,68	-6,00	64,00
T16	72	36b4	23,03	telomer	16,95	-6,08	67,65
S19	63	36b4	21,5	telomer	15,7	-5,80	55,72
T6	68	36b4	21,03	telomer	16,16	-4,87	29,24

6.4. Verilerin İstatistiksel Analizi

Gen panelinde yer alan 8 genin ekspresyon profili ve telomer uzunluğu verilerinin istatistiksel olarak anlamlı bir değer gösterip göstermediği analiz edilmiştir. KML hastalarında TKİ tedavisine dirençli grup ile TKİ tedavisine duyarlı grup arasındaki farkı istatistiksel olarak analiz etmek amacıyla SPSS sürüm 24, GraphPad Prism 6 ve MedCalc sürüm 23.2.1 kullanılmıştır, istatistiksel değerlendirmede anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. Bu doğrultuda ilk olarak Δ Ct değerlerinin normal dağılıma uygun olup olmadığı kontrol edildi,

normal dağılıma uymadığı için nonparametrik yöntem kullanıldı. Analizlerde Mann whitney u testi ve Wilcoxon testi de uygulanmıştır.

6.4.1. KML Hastalarının ve Kontrol Grubundaki Bireylerin Telomer Uzunluklarının Karşılaştırılması

KML hastalarının ve sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubundaki bireylerin ΔC_t değerlerinin normal dağılıma uygun olup olmadığı kontrol edilmiştir ve normal dağılıma uymadığı için nonparametrik yöntem kullanılmıştır. Yaş eşleştirilmemiş analizlerde Mann whitney u test kullanılmıştır. Veriler Tablo 28’de yer almaktadır.

Tablo 28. KML grubu ve kontrol grubunda telomer uzunluğu analizi ΔC_t ’leri

Medyanlar arasındaki fark	
KML medyanı	-8,660
Kontrol medyanı	-6,110

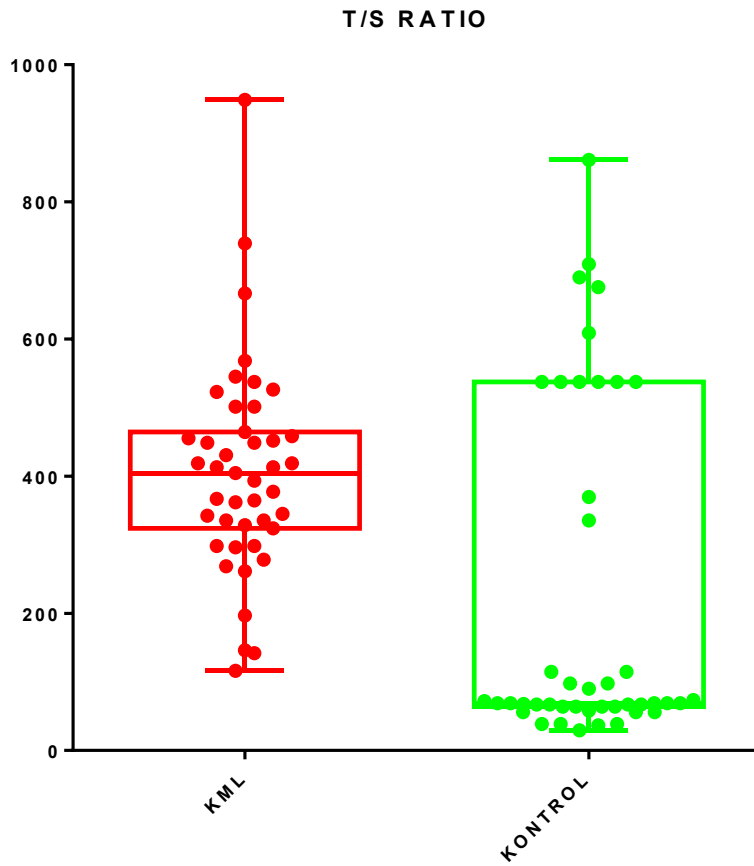
Her örnek için ΔC_t değeri ile belirlenen normalize edilmiş TL (Telomer Uzunluğu) ölçülmüştür. ΔC_t değeri, sağlıklı kontrollerle KML hasta örneklerinin herhangi bir normalizasyonu olmaksızın her bireyin normalize edilmiş telomer uzunluğunu yansıtır.

Verilere göre ΔC_t değerleri arasında anlamlı fark olduğu bulunmuştur. $2^{-\Delta C_t}$ değerleri (T/S Ratio) ile farkın yönü incelenmiştir. Nonparametrik datada medyan ve medyanın standart sapması ve persentillerin kullanılmasıyla hesaplamalar yapılmıştır. Tablo 29’deki verilere göre yaştan bağımsız olarak KML hastalarının telomerleri kontrol grubundaki bireylerin telomerlerinden daha uzun olarak saptanmıştır ($p < 0,0001$ gruplar arası anlamlı farkı belirtir), Şekil 11’de yaştan bağımsız olarak hesaplanan KML grubu ve kontrol grubu arasındaki Telomer uzunluğu grafiği yer almaktadır; grafik medyan yayılımını göstermektedir.

Telomer uzunluğu analizinde, Şekil 11’deki grafiğe göre, medyan yayılımına bakıldığında KML hastalarının ve kontrol grubunun medyan çizgisi baz alınarak kontrol grubunun telomer uzunluğu medyan çizgisinin daha aşağıda olduğu; dolayısıyla KML hastalarının telomer uzunluğunun kontrol grubundaki bireylerin telomer uzunluğundan daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Tablo 29. KML grubu ve kontrol grubunda $2^{-\Delta Ct}$ değeri analizi

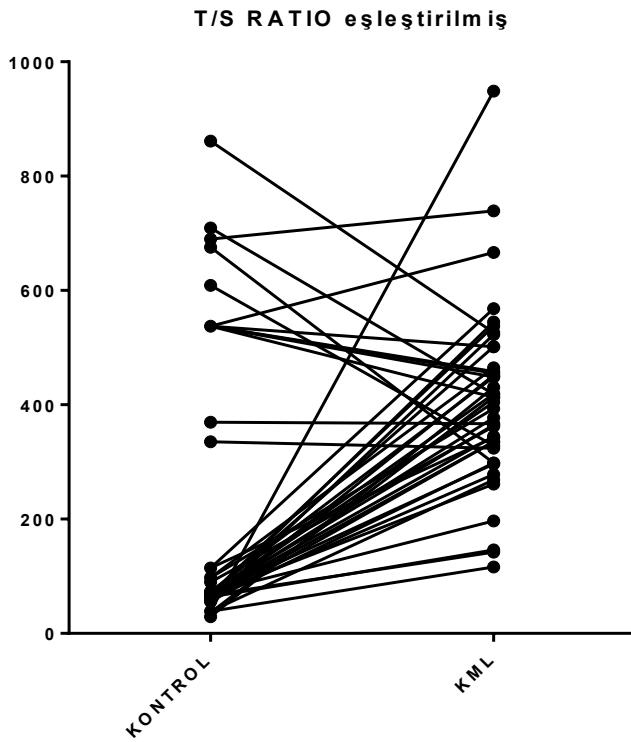
TS Ratio	KML	KONTROL
Değerlerin sayısı	43	43
Minimum	116,2	29,24
25% Percentile (Yüzdelik)	324,0	64,00
Medyan	404,5	69,07
75% Percentile (Yüzdelik)	464,7	537,5
Maximum	948,8	861,1



Şekil 11. Yaştan bağımsız KML ve kontrol arasındaki telomer uzunluğu grafiği

6.4.2. KML Hastalarının Telomer Uzunluklarının Yaş Eşleştirilmiş Kontroller İle Karşılaştırılması

KML hastalarının ve hastalarla yaş uyumlu sağlıklı kontrol grubu bireylerinin ΔCt değerleri normal dağılıma uymadığı için Wilcoxon testi kullanılmıştır. Nonparametrik datada medyan ve standart sapması, percentile (yüzdelik) ve çeyrekler arası açıklık (Interquartile Range) kullanılmıştır. Analiz sonucunda yaşa göre eşleştirilmiş KML hasta ve kontrol grubu telomer ΔCt değerleri arasında anlamlı fark olduğu belirlenmiştir ($< 0,0001$). Yaşa göre eşleştirilmiş KML grubu ve kontrol grubunun T/S RATIO ($2^{-\Delta Ct}$) değerleri Şekil 12’de grafik olarak sunulmaktadır.



Şekil 12. Yaşa göre eşleştirilmiş KML ve kontrol T/S RATIO değerleri

Medyan değerlerine göre KML grubu telomerlerinin yaş eşleştirilmiş kontrol grubu telomerlerinden daha uzun olduğu görülmektedir.

6.4.3. Tedavi Dirençli Grup İle Kontrol Grubu Arasında Telomer Uzunluğunun Karşılaştırılması

Telomer Ct değerinden referans gen (36B4) Ct değeri çıkarılarak hesaplanan ΔCt değerleri hem KML TKİ tedavisine dirençli grup için hem de kontrol grubu örnekleri için hesaplanmıştır ($P=0,0014$), medyanlar arasındaki fark Tablo 30’da verilmiştir.

Tablo 30. Tedavi dirençli grup ile kontrol grubunun ΔCt medyan farkı

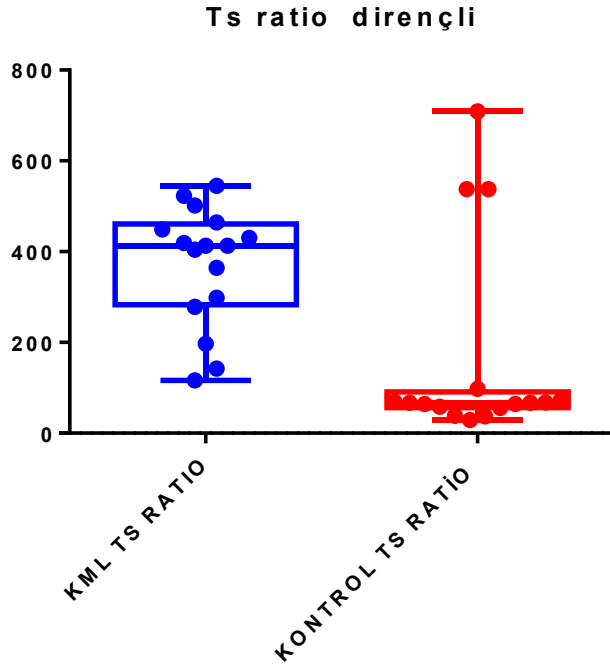
Tedavi Dirençli KML ΔCt medyanı	-8,690
Kontrol ΔCt medyanı	-6,070

Telomer uzunluğuna ait sayısal değerler Tablo 31’de verilmiştir.

Tablo 31. Tedavi dirençli grup ile kontrol grubunun telomer uzunluğu analizi

	KML T/S RATIO	KONTROL T/S RATIO
Değerlerin Sayısı	16	16
Minimum	116,2	29,24
25% Percentile	283,2	56,31
Medyan	413,0	67,18
75% Percentile	460,7	91,26
Maximum	545,0	709,2

Verilerin analiz sonucuna göre, TKİ dirençli KML hastalarının telomerleri kontrol grubu telomerlerinden daha uzundur, Şekil 13’de grafik ile sunulmaktadır.



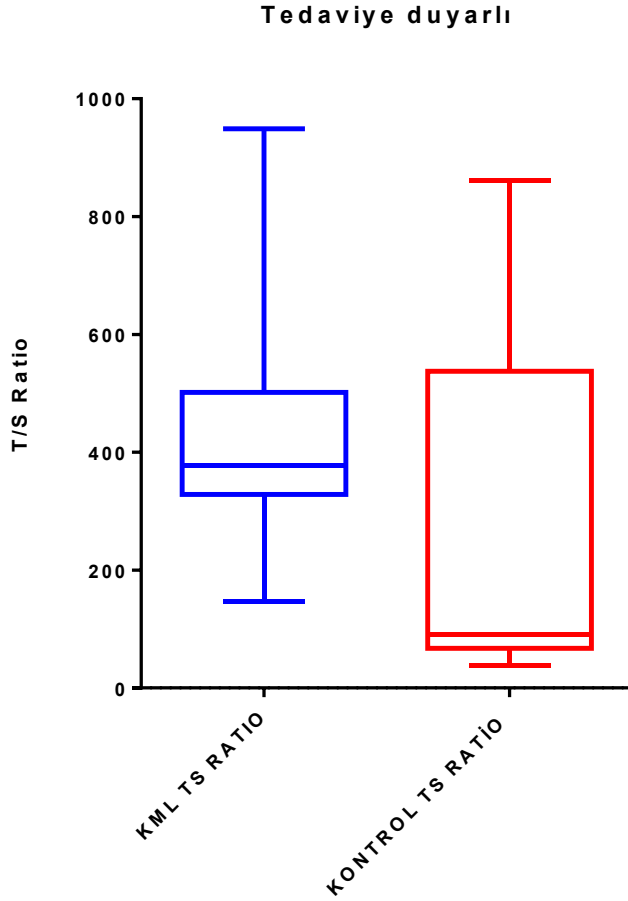
Şekil 13. Tedavi dirençli grup ile kontrol grubunun telomer uzunluğu grafiği

6.4.4. Tedavi Duyarlı Grup İle Kontrol Grubu Arasında Telomer Uzunluğunun Karşılaştırılması

ΔCt değerleri hem KML TKİ tedavisine duyarlı grup için hem de kontrol grubu örnekleri için hesaplanmıştır ($P=0,0072$), medyanlar arasındaki fark Tablo 32’de verilmiştir, Şekil 14’de grafik ile gösterilmiştir.

Tablo 32. Tedavi duyarlı grup ile kontrol grubunun ΔCt medyan farkı

Tedavi Duyarlı KML ΔCt medyanı	-8,560
Kontrol ΔCt medyanı	-6,490



Şekil 14. Tedavi duyarlı grup ile kontrol grubunun telomer uzunluğu grafiği

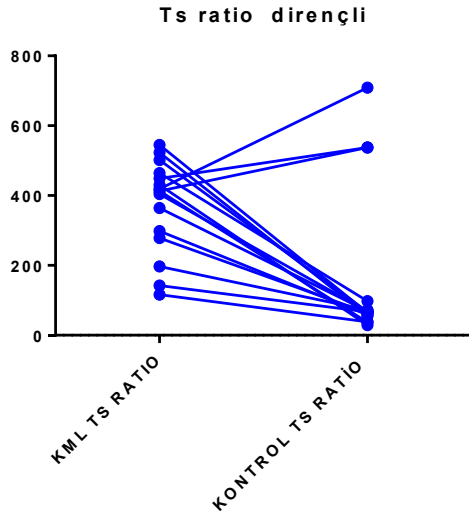
Yukarıdaki grafik, TKİ tedavisine duyarlı olan KML hastalarının telomerlerinin, kontrol örneklerinin telomerlerine göre daha uzun olduğunu yansıtmaktadır.

Sonuç olarak, çalışmaya dahil edilen 16 TKİ dirençli KML hastası ile 27 TKİ duyarlı KML hastasından oluşturulan dirençli ve duyarlı hasta grubunun ikisinde de telomer uzunluğu, sağlıklı kontrollere göre daha uzun olarak saptanmıştır. Elde edilen bu verinin, TKİ dirençli ve duyarlı KML hasta grubu ile yaşa göre eşleştirilmiş kontrol grubu arasında da aynı şekilde olup olmadığı kontrol edilmiştir.

6.4.5. Tedavi Dirençli Grup İle Yaşa Göre Eşleştirilmiş Kontrol Grubu Arasında Telomer Uzunluğunun Karşılaştırılması

TKİ tedavisine dirençli grup ile yaş uyumuna göre eşleştirilmiş kontrol grubu örneklerinin ΔC_t değerleri kullanılarak T/S Ratio değerleri analiz edilip kıyaslanmıştır. Sonuç olarak TKİ

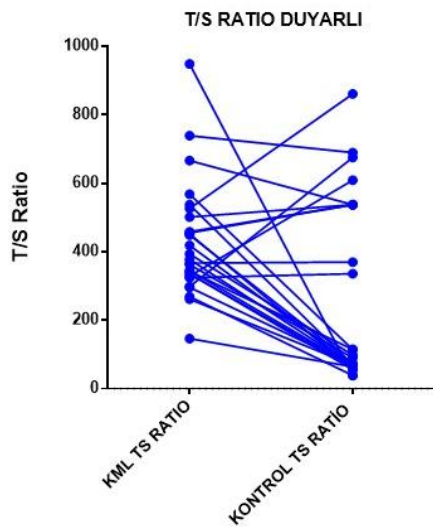
tedavisine direçli KML hastlarının yaşı eşleştirilmiş kontrollere göre telomerlerinin daha uzun olduğu saptanmıştır (P= 0,0004). Bu veri, Şekil 15’de grafikte sunulmaktadır.



Şekil 15. Tedavi dirençliler ile yaş uyumlu kontrollerin TL ölçüm grafiğı

6.4.6. Tedavi Duyarlı Grup İle Yaşı Göre Eşleştirilmiş Kontrol Grubu Arasında Telomer Uzunluğunun Karşılaştırılması

TKİ tedavisine duyarlı hasta grubu ile yaş uyumuna göre eşleştirilmiş kontrol grubu örneklerinin ΔCt değerleri kullanılarak T/S Ratio değerleri kıyaslanmıştır. Sonuç olarak TKİ tedavisine duyarlı olan KML hastlarının yaşı eşleştirilmiş kontrollere göre telomerlerinin daha uzun olduğu saptanmıştır (P=0,0002). Bu veri, Şekil 16’da grafikte sunulmaktadır.



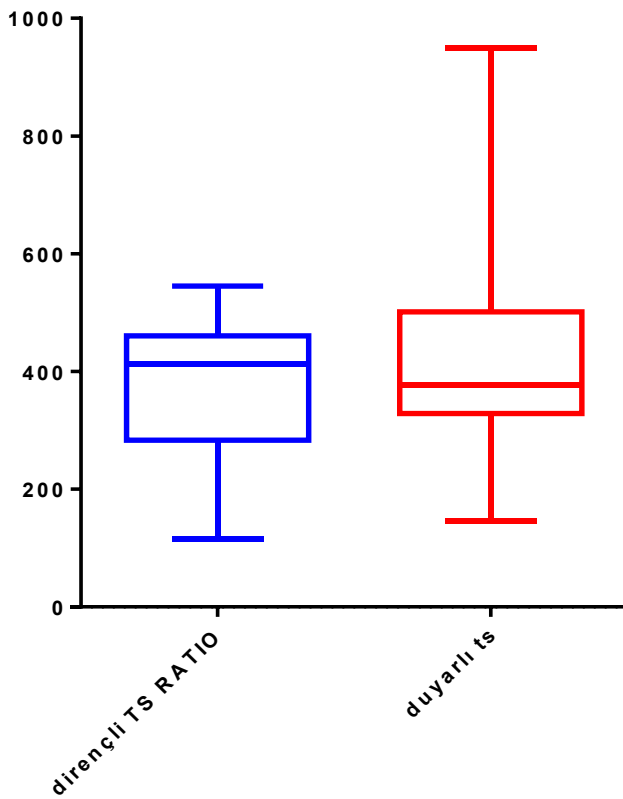
Şekil 16. Tedavi duyarlılar ile yaş uyumlu kontrollerin TL ölçüm grafiğı

6.4.7. Tedavi Dirençli ve Tedavi Duyarlı Grup Arasında Telomer Uzunluğunun Karşılaştırılması

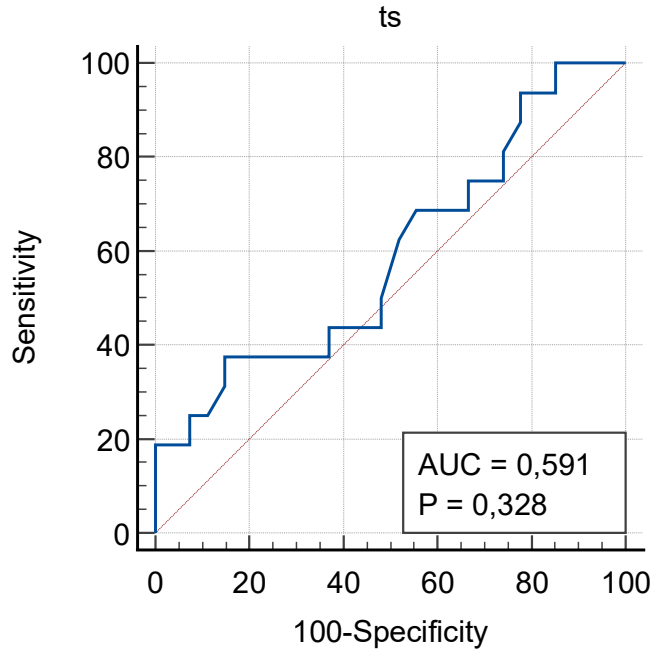
KML hastalarının TKİ dirençli grubu ile TKİ duyarlı grubu telomer uzunluğu açısından ΔCt değerleri kullanılarak kendi aralarında kıyaslanmıştır. Tedaviye dirençli ve duyarlı KML hastalarının telomer uzunlukları arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). (Şekil 17)

T/S Ratio değeri ile analizin dirençli/duyarlı hastalar arasındaki farkı belirlemede duyarlı olup olmadığı ROC eğrisi ile analiz edilmiştir ($p>0,05$), Şekil 18’de grafik ile gösterilmiştir. Sonuç olarak bu, iyi bir ayırma yöntemi değildir.

Çalışmanın sonuçlarına göre, Telomer Uzunluğu (TL) ile TKİ tedavi direnci doğrudan ilişkili değildir.



Şekil 17. Tedavi dirençli ve tedavi duyarlı grubun TL ölçüm grafiği



Şekil 18. T/S Ratio değeri için ROC eğrisi analizi

6.4.8. Tedavi Dirençli ve Tedavi Duyarlı Hastaların Gen Ekspresyonlarının Karşılaştırılması

Gen panelinde yer alan ve KML’de TKİ tedavi direnci ile muhtemel ilişkili 8 genin (HMGA2, EZH2, FAM83B, SALL4, PAK1, TET2, DNMT1 ve Twist-1) ekspresyon değerleri KML dirençli ve duyarlı hasta grubunda karşılaştırılıp analiz edilmiştir. Genlerin her biri için ΔC_t değerleri hesaplanırken, $\Delta C_t = C_t (\text{hedef gen}) - C_t (\text{GAPDH})$ formülüne göre hesaplama yapılmıştır. Daha sonra ΔC_t değerleri kullanılarak $2^{-\Delta C_t}$ hesaplanmıştır ve grafik oluşturulmuştur.

ΔC_t değerlerinin tedaviye dirençli ve duyarlı gruplar arasında dağılımına bakıldığında, istatistiksel olarak anlamlı kabul edilen gen ekspresyon farklılığı TET2 ve DNMT1 genlerinde saptanmıştır. Diğer 6 gende istatistiksel olarak anlamlı bir ekspresyon farklılığı saptanmamıştır. Bu veriler Tablo 33’de gösterilmektedir.

Tedavi dirençli KML hastalarında, tedavi duyarlı KML hastalarına göre TET2 ve DNMT1 gen ekspresyonlarının baskılandığı saptanmıştır. TET2 için medyan, standart sapma, minimum, maksimum, çeyrekler arası aralık verileri Tablo 34’de detaylarıyla gösterilmektedir.

Tablo 33. Tedavi dirençli ve tedavi duyarlı hastaların ΔCt analizi

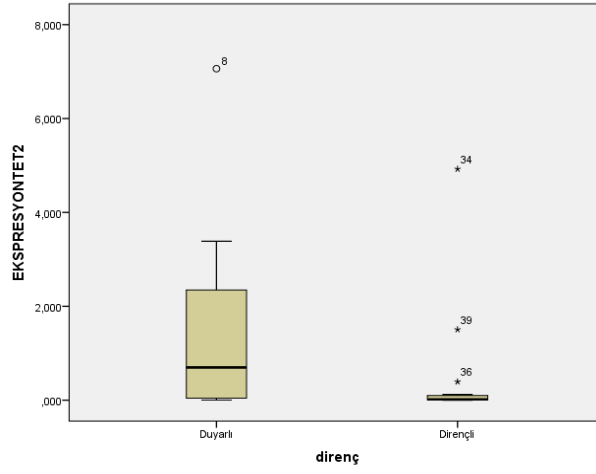
TEST İSTATİSTİKLERİ a								
	ΔCt HMGA2	ΔCt EZH1	ΔCt FAM8B	ΔCt SALL4	ΔCt PAK1	ΔCt TET2	ΔCt DNMT1	ΔCt TWIST-1
Mann-Whitney U	143,000	145,500	199,500	154,000	184,000	106,000	95,000	177,000
Wilcoxon W	279,000	281,500	577,500	532,000	562,000	484,000	473,000	555,000
Z	-1,834	-1,772	-,415	-1,558	-,804	-2,764	-3,041	-,980
Asymp. Sig. (2-tailed)	,067	,076	,678	,119	,421	,006	,002	,327
a. Gruplama Değişkeni: Direnç								

Tablo 34. TET2 geninin tedavi dirençli ve duyarlı gruplardaki ekspresyon verileri

EKSPRESYON TET2 Duyarlı	Medyan	,69737183300
	Standart sapma	1,646111218000
	Minimum	,001236090
	Maksimum	7,061623970
	I.R. (Çeyrekler arası aralık)	2,540391004
EKSPRESYON TET2 Dirençli	Medyan	,01808888500
	Standart sapma	1,251930816000
	Minimum	,000110781
	Maksimum	4,924577653
	I.R. (Çeyrekler arası aralık)	,104338901

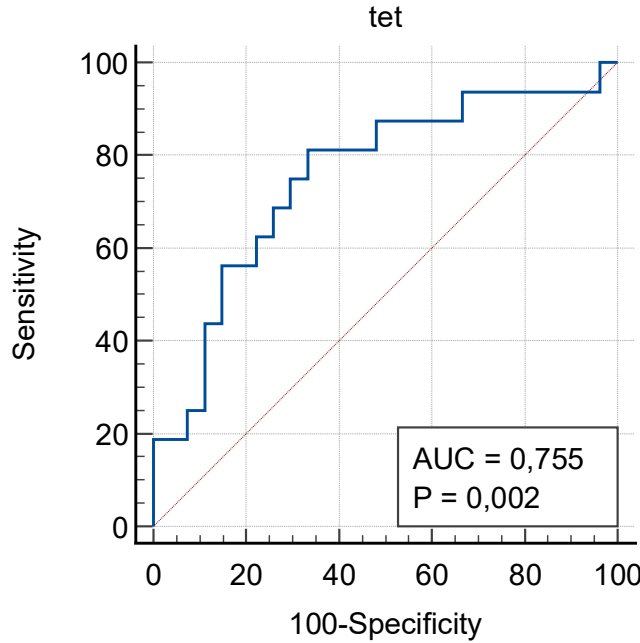
Tedavi dirençli KML hastalarında, tedavi duyarlı KML hastalarına göre TET2 gen ekspresyon seviyesinin daha düşük olduğu görülmektedir. Medyan (ortanca) değerlerine göre tedavi dirençli ve tedavi duyarlı gruptaki ekspresyon seviyeleri değerlendirildiğinde, TET2 medyan değeri duyarlı grupta 0,697371833 iken dirençli grupta 0,018088885 olarak saptanmıştır. Yani

medyan değerleri oranlandığında tedavi dirençli gruba göre, tedavi duyarlı grupta TET2 geni yaklaşık 38,5 kat daha yüksek eksprese olduğu gözlenmiştir. TET2 geninin tedavi dirençli ve tedavi duyarlı grup arasındaki ekspresyon seviye farklılığı Şekil 19'da gösterilmektedir.



Şekil 19. TET2 gen ekspresyon seviyesi grafiği

Daha sonra, TET2 gen ekspresyonunun duyarlı dirençli ayırma gücünü (özgüllük) belirleyebilmek için ROC eğrisi analizi yapılmıştır. ROC auc değeri 0,755 ($p=0,002$), TET2 geninin duyarlı dirençli ayırma gücünü iyi bir belirteç adayını göstermektedir. Şekil 20'de ROC eğrisi analizi grafiği yer almaktadır.



Şekil 20. TET2 geni ROC eğrisi analizi

Çalışmada tedavi dirençli KML hastaları ile tedavi duyarlı KML hastaları arasında istatistiksel olarak anlamlı ekspresyon farklılığı gösteren bir diğer gen DNMT1 geniydi. Gene ait sayısal ekspresyon verileri Tablo 35’de yer almaktadır.

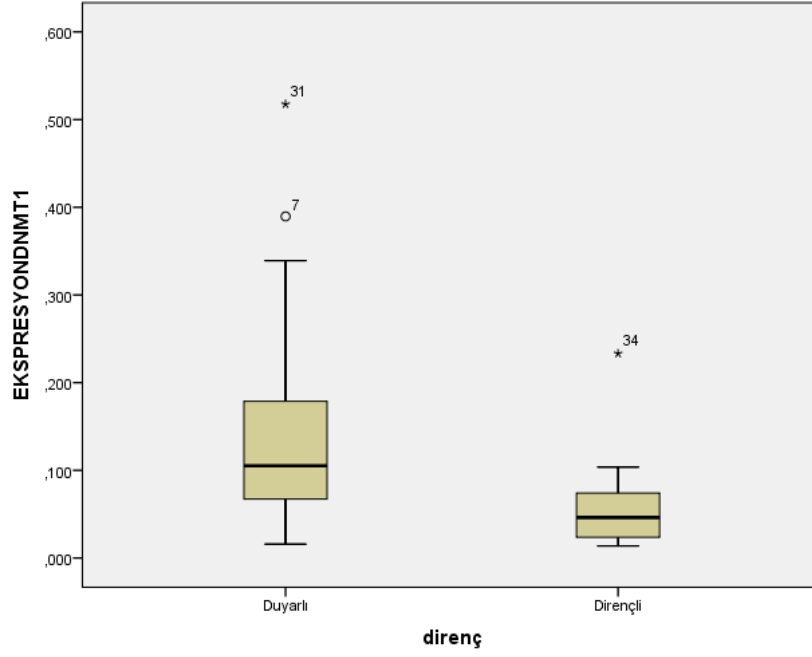
Tedavi dirençli KML hastalarında, tedavi duyarlı KML hastalarına göre DNMT1 gen ekspresyon seviyesinin daha düşük olduğu görülmektedir. Medyan (ortanca) değerlerine göre tedavi dirençli ve tedavi duyarlı gruptaki ekspresyon seviyeleri değerlendirildiğinde, DNMT1 medyan değeri duyarlı grupta 0,105112052 iken dirençli grupta 0,046125154 olarak saptanmıştır. Medyan değerleri oranlandığında tedavi dirençli gruba göre, tedavi duyarlı grupta DNMT1 geni yaklaşık 2,27 kat daha yüksek eksprese olduğu gözlenmiştir.

Tablo 35. DNMT1 geninin tedavi dirençli ve duyarlılarda ekspresyon verileri

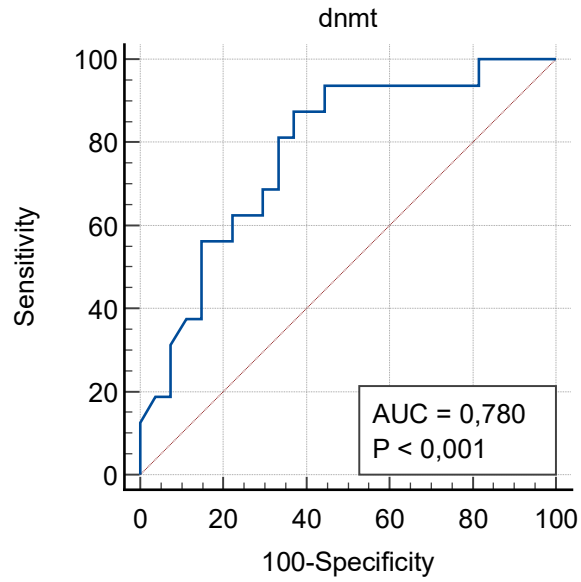
EKSPRESYON DNMT1 Duyarlı	Medyan	,10511205200
	Standart sapma	,121030543000
	Minimum	,015843117
	Maksimum	,517632462
	I.R. (Çeyrekler arası aralık)	,144700487
EKSPRESYON DNMT1 Dirençli	Medyan	,04612515400
	Standart sapma	,053737485000
	Minimum	,013696964
	Maksimum	,233258248
	I.R. (Çeyrekler arası aralık)	,051364117

DNMT1 geninin tedavi dirençli ve tedavi duyarlı grup arasındaki ekspresyon seviye farklılığı Şekil 21’de grafik olarak gösterilmektedir. DNMT1 gen ekspresyonunun duyarlı dirençli ayırma gücünü (özgüllük) belirleyebilmek için ROC eğrisi analizi yapılmıştır. ROC auc değeri 0,78 ($p<0,001$), DNMT1 geninin duyarlı dirençli ayırımında iyi bir belirteç adayı olduğunu göstermektedir. Şekil 22’de DNMT1 genine ait ROC eğrisi analizi grafiği yer almaktadır.

Bu veriler, TKİ tedavisine karşı dirençli olan KML hastalarında TET2 ve DNMT1 genlerinin ekspresyonlarının TKİ tedavisine karşı duyarlı olan KML hastalarına göre baskılanmış olduğunu göstermektedir.



Şekil 21. DNMT1 gen ekspresyon seviyesi grafiği



Şekil 22. DNMT1 geni ROC eğrisi analizi

6.4.9. Gen Ekspresyonlarının Birbiri İle İlişkisi

Panelde yer alan genlerin ekspresyon profili oluşturulurken, ekspresyon analizlerinden sonra korelasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Spearman korelasyon analizi ile paneldeki tüm genlerin verileri değerlendirilmiştir, detaylar Tablo 36’da yer almaktadır.

Tablo 36. Paneldeki genlerin Korelasyon analizi verileri

Korelasyonlar										
			EKSP	EKSP	EKSP	EKSP	EKSP	EKSP	EKSP	
			HMGA2	EZH2	SALL4	PAK1	TET2	FAM83B	DNMT1	TWIST-1
Spearman n's rho	EKSPHMGA2	Korelasyon Katsayısı	1,000	,531**	,373*	,498**	,241	,112	,220	,102
		Sig. (2-tailed)	.	,000	,014	,001	,119	,473	,156	,517
		N	43	42	43	43	43	43	43	43
	EKSPEZH2	Korelasyon Katsayısı	,531**	1,000	,131	,632**	-,038	,264	,147	,199
		Sig. (2-tailed)	,000	.	,409	,000	,812	,092	,353	,207
		N	42	42	42	42	42	42	42	42
	EKSPSALL4	Korelasyon Katsayısı	,373*	,131	1,000	,554**	,797**	,286	,424**	,371*
		Sig. (2-tailed)	,014	,409	.	,000	,000	,063	,005	,014
		N	43	42	43	43	43	43	43	43
	EKSPPAK1	Korelasyon Katsayısı	,498**	,632**	,554**	1,000	,530**	,316*	,383*	,349*
		Sig. (2-tailed)	,001	,000	,000	.	,000	,039	,011	,022
		N	43	42	43	43	43	43	43	43
	EKSPTET2	Korelasyon Katsayısı	,241	-,038	,797**	,530**	1,000	,310*	,382*	,344*
		Sig. (2-tailed)	,119	,812	,000	,000	.	,043	,012	,024
		N	43	42	43	43	43	43	43	43
	EKSPFAM83B	Korelasyon Katsayısı	,112	,264	,286	,316*	,310*	1,000	,099	,335*
		Sig. (2-tailed)	,473	,092	,063	,039	,043	.	,527	,028
		N	43	42	43	43	43	43	43	43
	EKSPDNMT1	Korelasyon Katsayısı	,220	,147	,424**	,383*	,382*	,099	1,000	,066
		Sig. (2-tailed)	,156	,353	,005	,011	,012	,527	.	,673
		N	43	42	43	43	43	43	43	43
	EKSPTWIST-1	Korelasyon Katsayısı	,102	,199	,371*	,349*	,344*	,335*	,066	1,000
		Sig. (2-tailed)	,517	,207	,014	,022	,024	,028	,673	.
		N	43	42	43	43	43	43	43	43

** . Korelasyon 0,01 düzeyinde (2-tailed) anlamlıdır. * . Korelasyon 0,05 düzeyinde (2-tailed) anlamlıdır.

Spearman korelasyon analizinde korelasyon türü, korelasyon kat sayısına göre farklı seviyelerde (çok güçlü, güçlü, orta ve zayıf derece negatif/pozitif) saptanabilmektedir. Tablo 37’de bu durum özetlenmiştir.

Tablo 37. Korelasyon türleri

Değer Aralığı	Korelasyon Türü
-1.0 ile -0.7 arası	Çok Güçlü Negatif Korelasyon
-0.7 ile -0.5 arası	Güçlü Negatif Korelasyon
-0.5 ile -0.3 arası	Orta Derecede Negatif Korelasyon
-0.3 ile 0 arası	Zayıf Negatif Korelasyon
0 ile 0.3 arası	Zayıf Pozitif Korelasyon
0.3 ile 0.5 arası	Orta Derecede Pozitif Korelasyon
0.5 ile 0.7 arası	Güçlü Pozitif Korelasyon
0.7 ile 1.0 arası	Çok Güçlü Pozitif Korelasyon

Bu kriterlere göre korelasyon analizinden gen ekspresyon profiline dair çıkarımlar yapılmıştır, aşağıda özetlenmektedir.

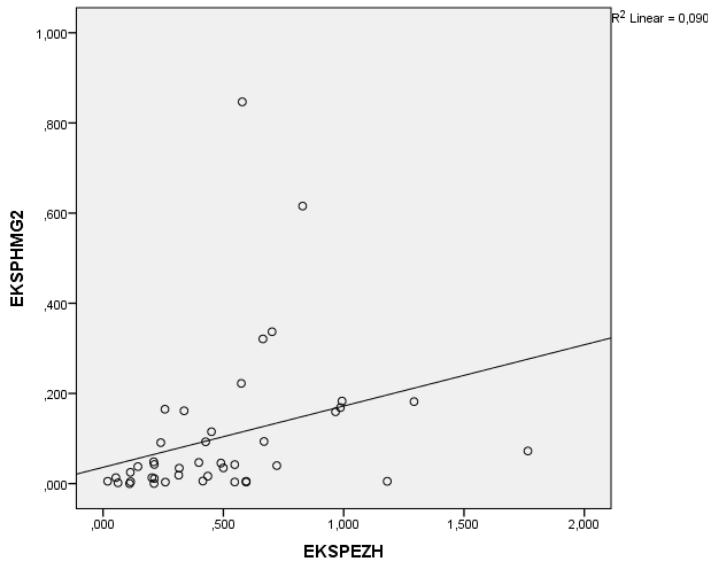
HMGA2 gen ekspresyonu ile EZH2 gen ekspresyonu arasında güçlü pozitif korelasyon (korelasyon kat sayısı 0,531 ve $p < 0,0001$) vardır. HMGA2 gen ekspresyonu ile SALL4 ve PAK1 gen ekspresyonları arasında orta derecede pozitif korelasyon vardır (sırasıyla korelasyon katsayıları 0,373 ve 0,498 ve sırasıyla $p = 0,014$ ve $p = 0,001$). HMGA2 gen ekspresyonu ile TET2, FAM83B, DNMT1 ve TWIST-1 arasında zayıf pozitif korelasyon vardır.

EZH2 gen ekspresyonu ile PAK1 gen ekspresyonu arasında güçlü pozitif korelasyon vardır (korelasyon kat sayısı 0,632 ve $p < 0,0001$). EZH2 gen ekspresyonu ile SALL4, FAM83B, DNMT1 ve TWIST-1 arasında zayıf pozitif korelasyon vardır; TET2 gen ekspresyonu arasında zayıf negatif korelasyon vardır.

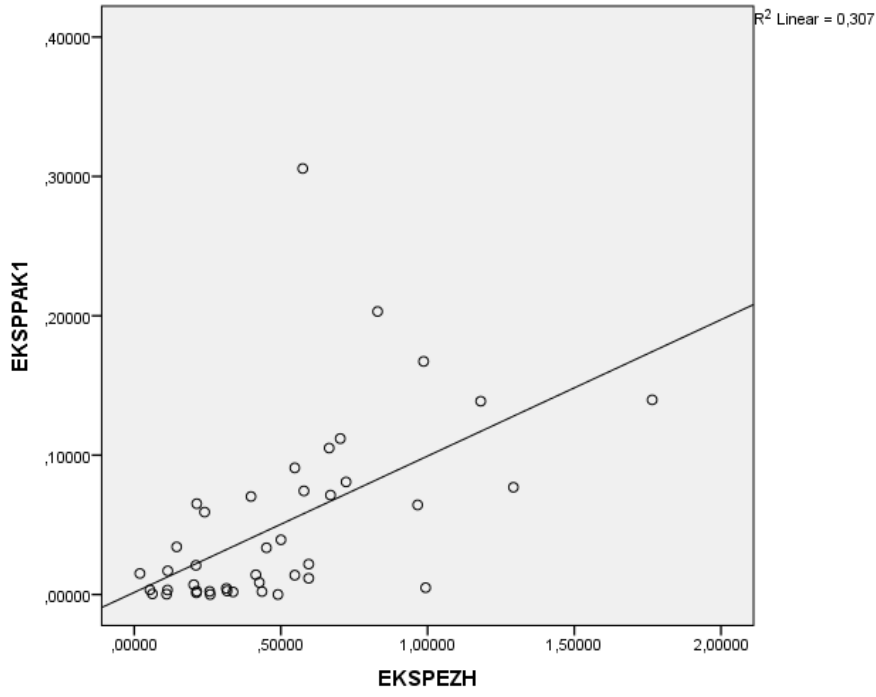
SALL4 gen ekspresyonu ile TET2 gen ekspresyonu arasında çok güçlü pozitif korelasyon vardır (korelasyon kat sayısı 0,797 ve $p<0,0001$). SALL4 gen ekspresyonu ile PAK1 gen ekspresyonu arasında güçlü pozitif korelasyon vardır (korelasyon kat sayısı 0,554 ve $p<0,0001$). SALL4 gen ekspresyonu ile DNMT1 ve TWİST-1 gen ekspresyonları arasında orta derecede pozitif korelasyon vardır; EZH2 gen ekspresyonu arasında zayıf pozitif korelasyon vardır. PAK1 gen ekspresyonu ile TET2 gen ekspresyonu arasında güçlü pozitif korelasyon vardır (korelasyon kat sayısı 0,530 ve $p<0,0001$). PAK1 gen ekspresyonu ile FAM83B, DNMT1 ve TWİST-1 gen ekspresyonları arasında orta derece pozitif korelasyon vardır.

TET2 gen ekspresyonu ile FAM83B, DNMT1 ve TWİST-1 gen ekspresyonları arasında orta derece pozitif korelasyon vardır. FAM83B gen ekspresyonu ile TWİST-1 gen ekspresyonu arasında orta derecede pozitif korelasyon vardır; DNMT1 gen ekspresyonu arasında zayıf pozitif korelasyon vardır. DNMT1 gen ekspresyonu ile TWİST-1 gen ekspresyonu arasında zayıf pozitif korelasyon vardır (korelasyon kat sayısı 0,066 ve $p=0,673$).

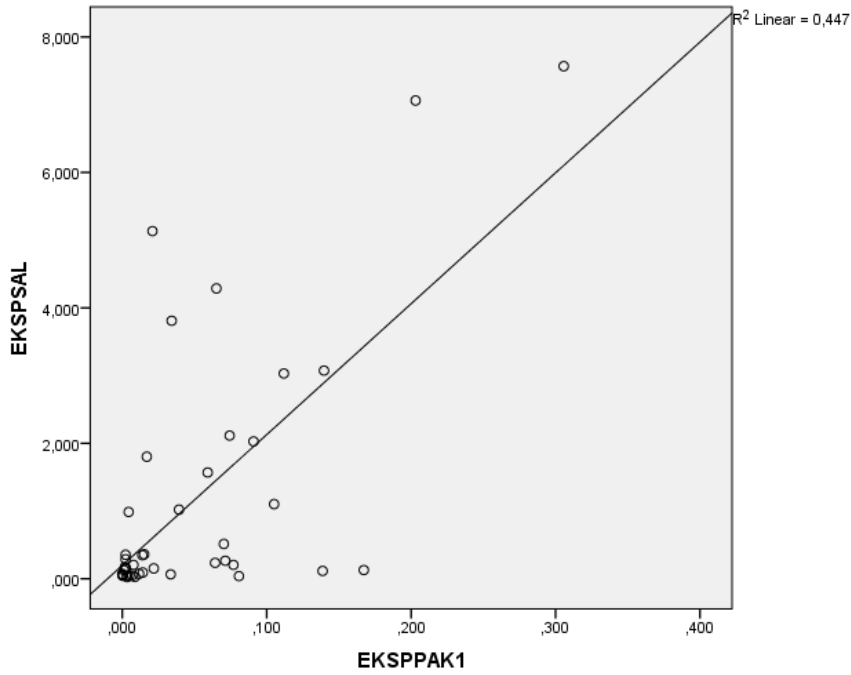
Bu korelasyon sonuçlarında özellikle genler arasında saptanan çok güçlü pozitif korelasyona ve güçlü pozitif korelasyonlara odaklanılmıştır. Korelasyon türleri belirlenirken, korelasyon kat sayısı ve p değerleri baz alınmıştır, bu değerlerin uyum sağladığı korelasyon türüne göre isimlendirme yapılmıştır. 1 adet çok güçlü pozitif korelasyon ve 4 adet güçlü pozitif korelasyona dair grafikler Şekil 23, 24, 25, 26 ve 27’de sunulmaktadır.



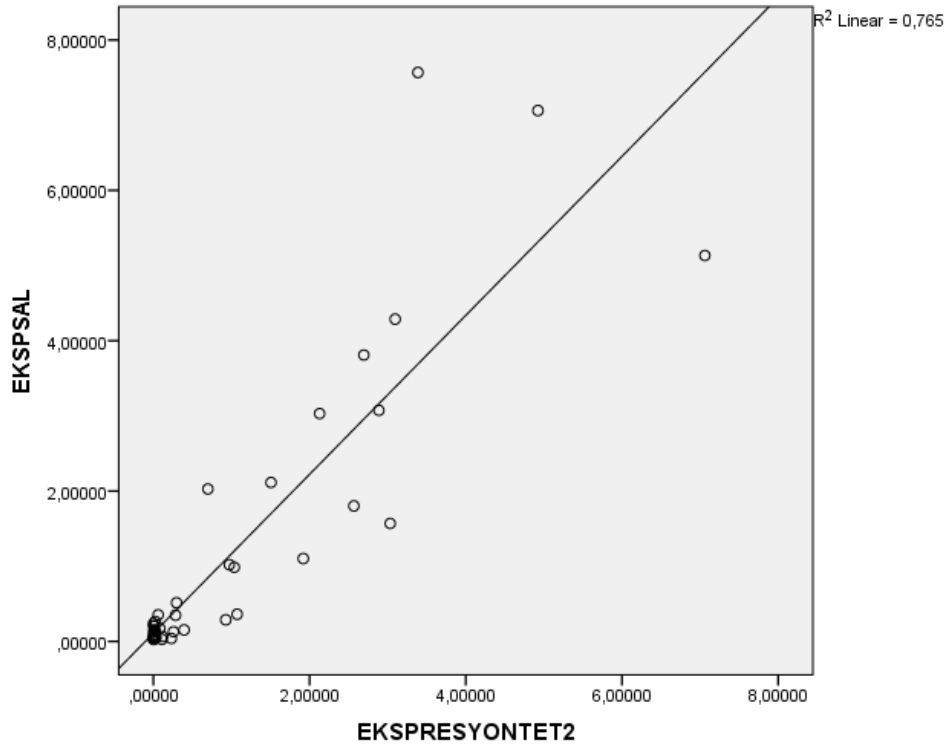
Şekil 23. HMGA2 ile EZH2 arasındaki güçlü pozitif korelasyon



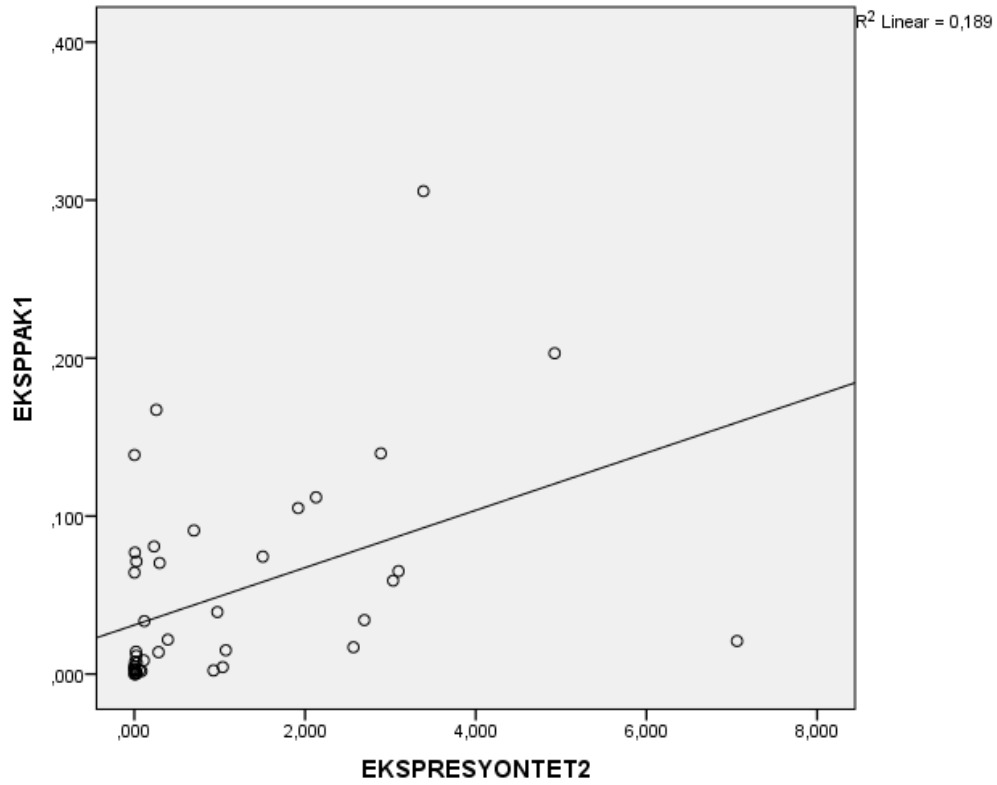
Şekil 24. PAK1 ile EZH2 arasındaki güçlü pozitif korelasyon



Şekil 25. SALL4 ile PAK1 arasındaki güçlü pozitif korelasyon



Şekil 26. SALL4 ile TET2 arasındaki çok güçlü pozitif korelasyon



Şekil 27. PAK1 ile TET2 arasındaki güçlü pozitif korelasyon

6.4.10. Tedavi Duyarlı ve Tedavi Dirençli Hastalarda Korelasyon Durumu

Aşağıdaki tabloda TKİ tedavisine duyarlı ve dirençli KML hastalarının gen ekspresyon korelasyonları ayrı ayrı yer almaktadır. Korelasyon analizi yapılırken, dirençli ve duyarlı hastaların verileri arasında korelasyonun bozulduğu noktalara odaklanılmıştır. Paneldeki tüm genlerin korelasyonlarına dair sayısal veriler Tablo 38’de detaylı olarak yer almaktadır.

Tablo 38. Duyarlı ve dirençli hastalarda korelasyon analizi verileri

Korelasyonlar

				EKSP	EKSP	EKSP	EKSP	EKSP	EKSP	EKSP	EKSP
				HMGA2	EZH2	SALL4	PAK1	TET2	FAM83B	DNMT1	TWIST-1
Spearman's rho	Direnç	EKSPPHMG2	Korelasyon Katsayısı	1,000	,464*	,425*	,615**	,501**	,136	,385*	,302
			Sig. (2-tailed)		,015	,027	,001	,008	,499	,047	,126
			N	27	27	27	27	27	27	27	27
		EKSPEZH2	Korelasyon Katsayısı	,464*	1,000	,074	,690**	,011	,274	,168	,289
			Sig. (2-tailed)	,015		,715	,000	,957	,167	,401	,144
			N	27	27	27	27	27	27	27	27
		EKSPSALL4	Korelasyon Katsayısı	,425*	,074	1,000	,540**	,891**	,363	,442*	,324
			Sig. (2-tailed)	,027	,715		,004	,000	,063	,021	,099
			N	27	27	27	27	27	27	27	27
		EKSPPAK1	Korelasyon Katsayısı	,615**	,690**	,540**	1,000	,502**	,358	,432*	,313
			Sig. (2-tailed)	,001	,000	,004		,008	,067	,024	,112
			N	27	27	27	27	27	27	27	27
		EKSPTET2	Korelasyon Katsayısı	,501**	,011	,891**	,502**	1,000	,435*	,292	,325
			Sig. (2-tailed)	,008	,957	,000	,008		,023	,139	,098
			N	27	27	27	27	27	27	27	27
		EKSPFAM83B	Korelasyon Katsayısı	,136	,274	,363	,358	,435*	1,000	,016	,415*
			Sig. (2-tailed)	,499	,167	,063	,067	,023		,937	,031
			N	27	27	27	27	27	27	27	27
		EKSPDNMT1	Korelasyon Katsayısı	,385*	,168	,442*	,432*	,292	,016	1,000	-,002
			Sig. (2-tailed)								

Tablo 38. Duyarlı ve dirençli hastalarda korelasyon analizi verileri (devamı)

		Sig. tailed)	(2-,047	,401	,021	,024	,139	,937	.	,994
	N	27	27	27	27	27	27	27	27	27
EKSPTWIST-1	Korelasyon Katsayısı	,302	,289	,324	,313	,325	,415*	-,002	1,000	
	Sig. tailed)	(2-,126	,144	,099	,112	,098	,031	,994	.	
	N	27	27	27	27	27	27	27	27	27
Dirençli EKSPHGA2	Korelasyon Katsayısı	1,000	,586*	,543*	,415	,094	,221	,526*	,094	
	Sig. tailed)	(2-,	,022	,030	,110	,729	,412	,036	,729	
	N	16	15	16	16	16	16	16	16	16
EKSPEZH2	Korelasyon Katsayısı	,586*	1,000	,471	,611*	-,039	,371	,629*	,346	
	Sig. tailed)	(2-,022	.	,076	,016	,889	,173	,012	,206	
	N	15	15	15	15	15	15	15	15	15
EKSPSALL4	Korelasyon Katsayısı	,543*	,471	1,000	,620*	,408	-,025	,377	,393	
	Sig. tailed)	(2-,030	,076	.	,010	,117	,927	,150	,132	
	N	16	15	16	16	16	16	16	16	16
EKSPPAK1	Korelasyon Katsayısı	,415	,611*	,620*	1,000	,482	,029	,329	,415	
	Sig. tailed)	(2-,110	,016	,010	.	,058	,914	,213	,110	
	N	16	15	16	16	16	16	16	16	16
EKSPTET2	Korelasyon Katsayısı	,094	-,039	,408	,482	1,000	-,079	,047	,215	
	Sig. tailed)	(2-,729	,889	,117	,058	.	,770	,863	,425	
	N	16	15	16	16	16	16	16	16	16
EKSPPFAM83B	Korelasyon Katsayısı	,221	,371	-,025	,029	-,079	1,000	,338	,250	
	Sig. tailed)	(2-,412	,173	,927	,914	,770	.	,200	,350	
	N	16	15	16	16	16	16	16	16	16
EKSPDNMT1	Korelasyon Katsayısı	,526*	,629*	,377	,329	,047	,338	1,000	,112	
	Sig. tailed)	(2-,036	,012	,150	,213	,863	,200	.	,680	
	N	16	15	16	16	16	16	16	16	16
EKSPTWIST-1	Korelasyon Katsayısı	,094	,346	,393	,415	,215	,250	,112	1,000	

Tablo 38. Duyarlı ve dirençli hastalarda korelasyon analizi verileri (devamı)								
Sig. tailed)	(2-,729	,206	,132	,110	,425	,350	,680	.
N	16	15	16	16	16	16	16	16

Tablo için: **. Korelasyon 0,01 düzeyinde (2-tailed) anlamlıdır.

*. Korelasyon 0,05 düzeyinde (2-tailed) anlamlıdır.

Korelasyon analiz verileri değerlendirildiğinde görülmüştür ki, TKİ tedavisine duyarlı KML hastalarında HMGA2 geni ile EZH2, SALL4, PAK1 ve DNMT1 genleri arasında korelasyon vardır ama tedaviye dirençli KML hastalarında HMGA2 geninin EZH2 ve SALL4 genleri ile korelasyonu, tedaviye duyarlı KML hastalarından daha yüksekken; PAK1 ve TET2 geninin HMGA2 ile korelasyonu bozulmuştur.

EZH2 geni ile PAK1 geni arasında tedaviye dirençli ve duyarlı hastalarda benzer korelasyon durumu vardır. EZH2 geni ile TET2 geni arasında tedaviye dirençli hastalarda pozitif zayıf korelasyon varken, duyarlı hastalarda negatif zayıf korelasyon vardır; korelasyon bozulmuştur. EZH2 geni ile DNMT1 geni arasında tedaviye dirençli hastalarda güçlü pozitif korelasyon varken, duyarlı hastalarda zayıf pozitif korelasyon vardır; korelasyon bozulmuştur.

SALL4 geni ile PAK1 ve DNMT1 genleri arasında tedaviye dirençli ve duyarlı hastalarda sırasıyla güçlü ve orta derecede korelasyon vardır, korelasyonları uyumludur. Ancak SALL4 geni ile TET2 geni arasında tedaviye duyarlı hastalarda çok güçlü pozitif korelasyon varken tedaviye dirençli hastalarda orta derecede pozitif korelasyon vardır; aralarındaki korelasyon bozulmuştur.

PAK1 geni ile TET2 geni arasında tedaviye duyarlı hastalarda güçlü pozitif korelasyon varken tedaviye dirençli hastalarda orta derecede pozitif korelasyon vardır; aralarındaki korelasyon bozulmuştur. PAK1 geni ile DNMT1 geni arasında tedaviye dirençli ve duyarlı hastalarda orta derecede korelasyon vardır, korelasyonları uyumludur. PAK1 geni ile FAM83B geni arasında tedaviye duyarlı hastalarda orta derecede pozitif korelasyon varken, tedaviye dirençli hastalarda zayıf pozitif korelasyon vardır; aralarındaki korelasyon bozulmuştur.

TET2 geni ile FAM83B geni arasında tedaviye duyarlı hastalarda orta derecede pozitif korelasyon varken, tedaviye dirençli hastalarda zayıf pozitif korelasyon vardır; aralarındaki korelasyon bozulmuştur. TET2 geni ile DNMT1 geni korelasyonları tedavi dirençli ve duyarlı

grupta uyumludur. TET2 geni ile TWİST-1 geni arasında tedaviye duyarlı hastalarda orta derecede pozitif korelasyon varken, tedaviye dirençli hastalarda zayıf pozitif korelasyon vardır; aralarındaki korelasyon bozulmuştur.

FAM83B geni ile DNMT1 geni arasında tedaviye duyarlı hastalarda zayıf pozitif korelasyon varken, tedaviye dirençli hastalarda orta derecede pozitif korelasyon vardır; aralarındaki korelasyon bozulmuştur. FAM83B geni ile TWİST-1 geni arasında tedaviye duyarlı hastalarda orta derecede pozitif korelasyon varken, tedaviye dirençli hastalarda zayıf pozitif korelasyon vardır; aralarındaki korelasyon bozulmuştur.

DNMT1 geni ile TWİST-1 geni arasında tedaviye duyarlı hastalarda zayıf negatif korelasyon varken, tedaviye dirençli hastalarda zayıf pozitif korelasyon vardır; aralarındaki korelasyon bozulmuştur.

TWİST-1 geni ile HMGA2 geni arasında tedaviye duyarlı hastalarda orta derecede pozitif korelasyon varken, tedaviye dirençli hastalarda zayıf pozitif korelasyon vardır; aralarındaki korelasyon bozulmuştur.

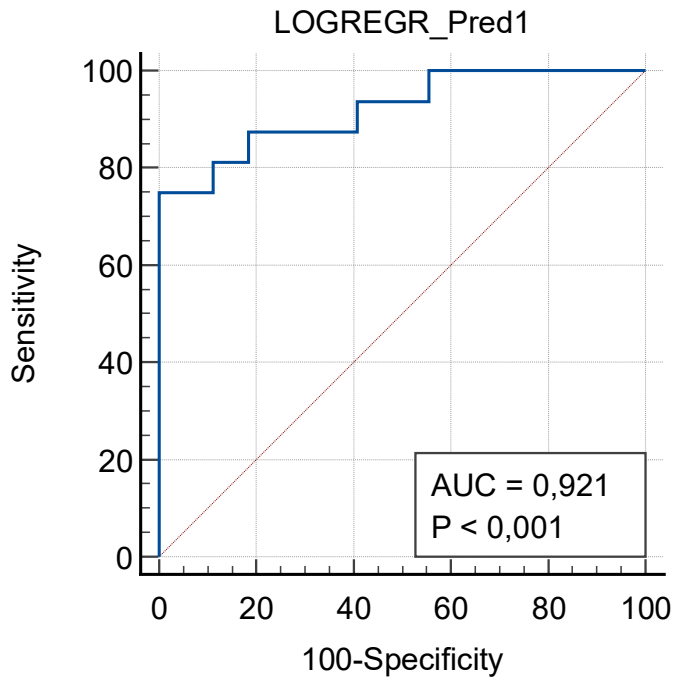
Korelasyon analizi verilerine göre, özellikle gen ekspresyon seviyesi farklılık gösteren TET2 ve DNMT1 genlerinin bir çok genle korelasyonunun bozulduğu görülmektedir. Dolayısıyla KML hastalarındaki TKİ tedavi direncinde TET2 ve DNMT1 genlerinin bir rolü vardır denebilir.

6.4.11. Tüm Sonuçların Lojistik Regresyon Analizi

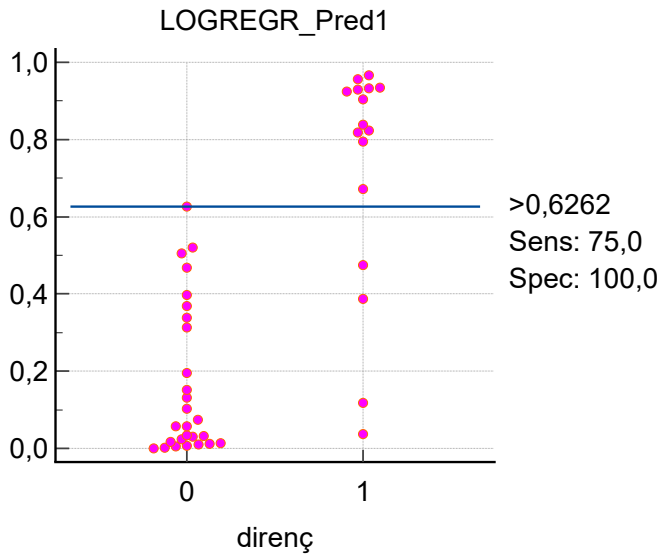
Elde edilen sonuçların matematiğe yansıtılması ve bir olasılık oranı verilmesi için lojistik regresyon analizi yapılmıştır. Lojistik regresyon modelinin veriye uyumu Hosmer ve Lemeshow testi ile incelenmiştir ($p=0,4784$), sonucun 0,05 değerinden büyük olması model ve veri arası uyumun yeterli seviyede olduğunu göstermektedir (Çokluk, 2010). Elde edilen lojistik regresyon modeli aşağıda formülleştirilmiştir.

$$\text{Logit (p-direnç)} = -0,03092 + (\Delta\text{CtTET} * 0,35376) + (\Delta\text{CtDNMT} * 1,09121) - (\Delta\text{CtHMG} * 0,66172)$$

Lojistik regresyon sonuçları ROC eğrisi ile incelendiğinde elde edilen panelin $\text{AUC}=0,921$ değerine sahip olduğu, (%95 güven aralığı (CI), 0,797-0,981) ve panelin $>0,6262$ eşik değeri için duyarlılık ve özgüllüğünün sırasıyla %75 ve 100% olduğu tespit edilmiştir. Şekil 28’de ROC eğrisi ve Şekil 29’da ROC eğrisine ilişkin nokta diyagramı verilmiştir. Diyagramın eşik değeri olan $>0,6262$ için dirençli ve duyarlı hastaların ayrımı izlenmektedir.



Şekil 28. Lojistik regresyon ROC eğrisi



Şekil 29. Lojistik regresyon ROC eğrisine ilişkin nokta diyagramı

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kronik miyeloid lösemi (KML), ABL1 proto-onkogeninin sürekli aktif BCR genine füzyonundan sonra gelişen BCR::ABL1 onkogeni tarafından tanımlanan, Philadelphia kromozomunun varlığıyla karakterize edilen bir miyeloproliferatif neoplazmdır. KML'nin 3 fazı vardır, sırasıyla; kronik faz, akselere faz ve blastik fazı. KML hastalarının yaklaşık %90'ı yavaş ilerleyen kronik fazdadır. KML'de en ileri evre, KML hastalarının yaklaşık %1 ila %2'sinde görülen blastik fazdır. 2000 yılından günümüze dek, BCR::ABL1'i hedef alan imatinib gibi birinci nesil tirozin kinaz inhibitörleri (TKİ) ve bosutinib, dasatinib ve nilotinib gibi ikinci nesil TKİ'ler, KML ilişkili ölüm oranını yılda %10 ila %20'den, yılda %1 ila %2'ye getirerek KML hastalarının genel yaş eşleştirilmiş bir popülasyondakine benzer sağkalım oranlarına sahip olmasını sağlamıştır (Jabbour ve Kantarjian, 2025).

Lösemiler hakkında araştırmalar yapan uluslararası bir kuruluş olan ELN (European LeukemiaNet), kriterlerini en son 2020 yılında güncellemiştir, bu kriterlere göre KML'de birinci basamak tedavi, bir tirozin kinaz inhibitörüdür (TKİ; imatinib veya jenerik, dasatinib, nilotinib ve bosutinib birinci basamak inhibitörlerdir). Jenerik imatinib, kronik fazda KML'de maliyet açısından etkili ilk tedavi olarak belirtilmektedir. Tanı anında hastada risk durumu, yeni EUTOS uzun vadeli sağkalım (ELTS) puanı ile değerlendirilme yapılması önerilmektedir. Tedavi yanıtının izlenmesi kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu ile yapılmalıdır. KML hastalarında intolerans durumu iyileştirilemediğinde veya moleküler dönüm noktalarına ulaşamadığında (3., 6. ve 12. aylarda ölçülen optimal BCR-ABL1 IS değerleri) tedavi değişikliği önerilmektedir. 3 ayda %10'dan fazla BCR-ABL1 saptanması tedavi başarısızlığını gösterir. Allojenik transplantasyon, özellikle ileri evre KML için bir terapötik seçenek olmaya devam etmektedir (Hochhaus ve ark., 2020).

KML tedavisinde imatinibe karşı başarısızlık durumunda tedavi değişikliği yapmak zorunludur; BCR-ABL1 kinaz alanı mutasyonlarının varlığı, komorbiditeler ve ilaç yan etkileri göz önünde bulundurularak ilaç seçimi yapılmalıdır. İkinci nesil TKİ'ler (nilotinib, dasatinib, bosutinib, radotinib) KML tedavisinde kullanıldığında, imatinibe göre daha hızlı yanıt verme ve semptomları hafifletme başarısıyla, birinci basamak tedavi olarak da kullanılmaktadır (Hehlmann, 2020). Üçüncü nesil tirozin kinaz inhibitörü olan ponatinib, ikinci nesil bir TKİ'ye dirençli hastalarda kullanılmaktadır, tüm kinaz alanı nokta mutasyonlarına karşı etkindir (Braun ve ark., 2020). Bir diğer üçüncü nesil tirozin kinaz inhibitörü asciminib, daha önce ikinci nesil

bir TKİ'ye maruz kalmış veya T315I mutasyonu olan kronik faz KML hastaları için uygundur (Senapati ve ark., 2023).

Hastalarda tedaviye yanıtın sürdürülmesi için ilaca uyum önemlidir. Tüm TKİ'ler, plevral efüzyon (dasatinib), miyokard enfarktüsü, felç ve periferik arter hastalığı (nilotinib, ponatinib) gibi arterio-oklüzif olaylar, gastrointestinal rahatsızlık (bosutinib) veya pankreatit ile amilaz ve lipaz artışı (ponatinib, asciminib, nilotinib) gibi ek ajana özgü yan etkilerle birlikte miyelosupresyon gibi hematolojik toksisite ile ilişkilidir. Dolayısıyla hasta için bir TKİ seçerken bu yan etkiler dikkate alınmalıdır (Jabbour ve Kantarjian, 2025).

ELN 2020 önerilerine göre KML tedavi yanıtının değerlendirilmesinde BCR-ABL IS'in, 1-3 ay içinde %10'dan fazla, TKİ tedavisinin 6. ayında %10'dan fazla, 12 aylık tedavide %1'den fazla veya 12 aylık tedaviden sonra herhangi bir zamanda %1'den fazla olması, direnç mutasyonlarının varlığı ve yüksek riskli ek kromozom anormalliklerinin (ACA) ortaya çıkması durumunda tedavide "başarısızlık" tanımlanır, ikinci basamak tedavi için de aynı tanımlar önerilmektedir (Sun ve ark., 2024).

KML'de tedavi yönetimini belirleyen önemli bir unsur, tedavi direncidir. BCR-ABL1 mutasyonları ve BCR-ABL1 aşırı ekspresyonu, DNA hasarı onarımı ve genomik instabilitede değişiklikler (ek kromozomal anomaliler ve nokta mutasyonlarının artışı), ilaç taşıyıcılarının aktivitesindeki değişiklikler, alternatif sinyal yollarının aktivasyonu (örn. PI3K/AKT, JAK/STAT ve RAS/MAPK), lösemi kök hücre metabolizmasında ve yollarındaki değişiklikler, epigenetik değişiklikler, bazı mikro RNA'ların ekspresyon değişimi, mikroçevre ve immünolojik durumdaki değişiklikler KML'de TKİ direncinden sorumlu moleküler mekanizmalardır (Alves ve ark., 2021). KML hastalarında gen ifadesi değişiklikleri ve hastalığın ilerlemesi üzerindeki etkileri üzerine yapılan çalışmalar mevcuttur, son zamanlarda genlerle ilgili parametrelerin dirençle ilişkilendirilmesine yönelik yaklaşımlar vardır ve bu kapsamda KML'de tedavi direnci ile ilişkilendirilen birtakım genler literatürde mevcuttur (Lavrov ve ark., 2019).

Telomerler, kromozom uçlarında yer alan, TTAGGG dizi tekrarlarından oluşan, genom stabilitesini ve bütünlüğünü koruyan, hücre bölünmeleri esnasında hücreyi ilerleyici DNA kısalmasından koruyabilen nükleoprotein yapılarıdır. KML'de telomer durumunu araştıran birçok çalışma hastalardan alınan lösemik lökosit telomerlerinin, sağlıklı bireylerden alınan lökositlerden daha kısa olduğunu ortaya koymaktadır (Caocci ve ark., 2016).

KML hastalarında telomer uzunluğunun (TL) hastalık evresi, prognostik skorlar, tedaviye yanıt ve hastalığın ilerlemesiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Bouillon ve ark., 2018). Günümüzde telomer uzunluğu genomik DNA üzerinden, gerçek zamanlı PCR yöntemi kullanılarak hızlı ve basit bir şekilde ölçülebilmektedir (Gil ve Coetzer, 2004).

Bu çalışmada öncelikle, KML’de tedavi direnci ile ilişkili olan genler ve tedavi direnci ile muhtemel ilişkili olan genler literatür verilerinde incelenmiştir. Önceki çalışmaların büyük çoğunluğunda 2 yaklaşım görülmüştür; birinci olarak direnç-gen ilişkisini seçilen tek bir gen üzerinden analiz eden çalışmalar (hastalardan alınan periferik kan örneği üzerinden veya hücre kültürü üzerinden yapılan analizler) ve ikinci olarak transkriptomik yöntemle karşılaştırmalar yapıp çok sayıda genin dirençle ilişki ihtimalini analiz eden çalışmalar. KML risk değerlendirmesinde genetik ve epigenetik faktörlerin fazla ve kompleks olması, gen ifadesine dayalı biyobelirteç belirlemenin mümkün ancak zorlu olduğunu göstermektedir.

Çalışmada KML’de tedavi direnci ile ilişkisine (ve muhtemel ilişkisine) dair önceki çalışmalarda kanıt olan 8 gen seçilerek bir panel oluşturulmuştur ve bu paneldeki genlerin ekspresyon profili oluşturulmuştur. Gen panelinde HMGA2, EZH2, FAM83B, SALL4, PAK1, TET2, DNMT1 ve Twist-1 genleri yer almaktadır. Bu genlerin ekspresyon profilini oluşturmak için 43 KML hastasından periferik kan örneği alınıp RNA izolasyonu, ardından cDNA sentezi yapılmıştır ve sonraki aşamada Real Time PCR yöntemiyle genlerin ekspresyonu incelenmiştir. Genlerin her biri için ΔC_t değerleri, $\Delta C_t = C_t (\text{hedef gen}) - C_t (\text{GAPDH})$ formülüne göre belirlenmiştir. ΔC_t değerleri kullanılarak $2^{-\Delta C_t}$ hesaplanmıştır. Genlerin ekspresyon seviyeleri, tedavi dirençli grup (16 hasta) ile tedavi duyarlı grup (27 hasta) arasında kıyaslanarak gen ekspresyon profili oluşturulmuştur.

Gen ekspresyon profili analizinde ΔC_t değerlerinin TKİ tedavisine dirençli ve duyarlı hasta grupları arasındaki dağılımına bakıldığında, istatistiksel olarak anlamlı kabul edilen gen ekspresyon farklılığı TET2 ve DNMT1 genlerinde saptanmıştır. Diğer 6 gende istatistiksel olarak anlamlı bir ekspresyon farklılığı saptanmamıştır. Tedavi dirençli KML hastalarında, tedavi duyarlı KML hastalarına göre TET2 ve DNMT1 gen ekspresyonlarının baskılandığı, gen ekspresyon seviyelerinin daha düşük olduğu saptanmıştır.

Bu 2 genin detaylı veri analizinde medyan değerleri oranlandığında, tedavi dirençli gruba göre, tedavi duyarlı grupta TET2 geninin yaklaşık 38,5 kat daha yüksek eksprese olduğu görülmüştür; tedavi dirençli gruba göre, tedavi duyarlı grupta DNMT1 geninin yaklaşık 2,27 kat daha yüksek eksprese olduğu görülmüştür. TET2 ve DNMT1 gen ekspresyonlarının duyarlı

dirençli ayırma gücünü (özgüllük) belirleyebilmek için ROC eğrisi analizi yapılmıştır, veriler bu 2 genin duyarlı dirençli ayırımında iyi bir belirteç adayı olduğunu göstermektedir.

Ayrıca panelde yer alan genlerin ekspresyon profilini oluşturmak için korelasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. İlk olarak paneldeki genlerin ekspresyonlarının birbiri ile ilişkisi analiz edilmiştir. Korelasyon analizi sonuçlarında özellikle genler arasında saptanan çok güçlü pozitif korelasyona ve güçlü pozitif korelasyonlara odaklanılmıştır. 1 adet çok güçlü pozitif korelasyon ve 4 adet güçlü pozitif korelasyon tespit edilmiştir. SALL4 gen ekspresyonu ile TET2 gen ekspresyonu arasındaki çok güçlü pozitif korelasyon olduğu saptanmıştır. HMGA2 gen ekspresyonu ile EZH2 gen ekspresyonu arasında, PAK1 gen ekspresyonu ile EZH2 gen ekspresyonu arasında, SALL4 gen ekspresyonu ile PAK1 gen ekspresyonu arasında ve PAK1 gen ekspresyonu ile TET2 gen ekspresyonu arasında güçlü pozitif korelasyon olduğu saptanmıştır. İkinci olarak, TKİ tedavisine duyarlı ve dirençli KML hastalarının gen ekspresyon korelasyonları ayrı ayrı incelenmiştir. İncelemede, dirençli ve duyarlı hastaların verileri arasında korelasyonun bozulduğu noktalara odaklanılmıştır.

Analiz sonucuna göre, PAK1 ile HMGA2 arasında, TET2 ile HMGA2 arasında, EZH2 ile TET2 arasında, EZH2 ile DNMT1 arasında, SALL4 ile TET2 arasında, PAK1 ile TET2 arasında, PAK1 ile FAM83B arasında, TET2 ile FAM83B arasında, TET2 ile TWİST-1 arasında, FAM83B ile DNMT1 arasında, FAM83B ile TWİST-1 arasında, DNMT1 ile TWİST-1 arasında ve TWİST-1 ile HMGA2 arasında korelasyonun bozulduğu saptanmıştır. Korelasyon bozulması en çok TET2 geninde meydana gelmiştir. Korelasyon analizi verilerine göre, özellikle gen ekspresyon seviyesi farklılık gösteren TET2 ve DNMT1 genlerinin bir çok genle korelasyonunun bozulduğu, dolayısıyla KML hastalarındaki TKİ tedavi direncinde TET2 ve DNMT1 genlerinin bir rolü olabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

KML TET2 ilişkisine dair çalışmaların büyük çoğunluğu TET2 geninde görülen mutasyonlarla ilgilidir, TET2 mutasyonlarının KML'nin akselere faza ve blast faza ilerlemesi ile ilişkilendirildiği bilinmektedir, KML'de TET2 ekspresyon seviyesini yansıtan çalışmalar ise çok nadirdir.

TET2, tümör baskılayıcı özelliktedir, normal miyelopoez için önemlidir, bu genin enzimatik aktivitesinin bozulması miyeloid tümör oluşumunu destekler. KML'deki TET2 durumuna bakıldığında, bir çalışmada TET2 ekspresyonu tanı anında ve sitogenetik anomali meydana gelip hastalık ilerlediği zamanda ölçülmüştür; normal bireye kıyasla KML hastasında TET2 ekspresyon seviyesinin tanı anında ve hastalık ilerlediğinde azaldığı gösterilmiştir. (Albano ve

ark., 2011). Bu sonuç, bu çalışmadaki dirençli hastalarda TET2 ekspresyon seviyesi azalmasıyla uyumlu görülmektedir.

Salati ve arkadaşlarının KML lösemik kök hücrelerinde (LSC) miRNA ekspresyon profilini araştırdıkları bir çalışmada, KML LSC'lerinde gözlemlenen miR-29a-3p ve miR-660-5p'nin yukarı regülasyonunun, ilgili hedeflerinden biri olan TET2'nin aşağı regülasyonuna yol açarak KML LSC'lerine in vitro TKİ direnci kazandırdığı sonucu yer almaktadır. Ayrıca TET2 geni susturulmasının, hücreleri imatinib kaynaklı apoptozdan koruyabildiği saptanmıştır. Bu çalışma, TET2'nin mutasyonların yanı sıra düzensiz gen ekspresyonu yoluyla da miyeloid malignitelerin patogenezinde rol oynayabileceğini göstermiştir ve TET2 anormal regülasyonuna etki eden hedefli tedaviler için bir gerekçe sunmaktadır (Salati ve ark., 2017). Bahsedilen veriler, bu çalışmadaki dirençli hastalarda TET2 ekspresyon seviyesi azalmasıyla uyumlu görülmektedir.

Liu ve arkadaşlarının yaptığı güncel bir çalışmada, tüm ekzom dizileme analiziyle telomer uzunluğu ile ilişkili genler ve bunların biyomedikal etkileri araştırılmıştır. Bu araştırma lökosit telomer uzunluğu ile biyolojik işlevleri telomer bakımı ve cap (başlık) eklenmesiyle ilişkilendirilen genlere odaklanmıştır. TET2, ekzom çapında anlamlı lökosit telomer uzunluğu ile ilişkilendirilmiştir. TET2'nin miyeloid lösemi, lenfomalar ve monosit lösemi dahil olmak üzere hematopoietik sistem kanserleri, solid kanserler, yaşa bağlı hastalıklar, kan testleri ve kardiyovasküler özellikler ile anlamlı ilişkileri olduğu belirtilmiştir (Liu ve ark., 2024).

TET2 geni ile ilgili bahsedilen literatür verileri, bu çalışmada tedavi duyarlı KML hastalarına göre tedavi dirençli KML hastarında daha düşük seviyede tespit edilen TET2 gen ekspresyon durumu ve korelasyon analizinde en fazla korelasyon bozulmasının yaşandığı gen olması bulgusu ile uyumludur. TET2 geninin, KML'de tanı anında, tedavi takibinde ve tedavi direncinde önemli bir belirteç olma ihtimali yüksektir. TET2 gen ekspresyon seviyesi, prognozun belirlenmesi, tedavi direncinin değerlendirilmesi, TKİ seçimi ve yeni hedefli ilaç tasarımlarında göz önünde bulundurulmalıdır.

Bu çalışmada TET2 geninin SALL4 geni ile arasında çok güçlü pozitif korelasyon saptanmıştır. Yüksek SALL4 ekspresyonu pro-apoptotik genleri inhibe ederek, kemoterapiye dirençli genlerin ekspresyonunu artırarak ve daha fazla invazyon ve immünolojik tümör kaçış mekanizmalarına izin vererek agresif kötü huylu tümör davranışıyla ilişkilidir. Önceki çalışmalarda akselere ve blast faz KML hastalarında SALL4'ün kronik faz KML hastalarına kıyasla aşırı eksprese edildiği ifade edilmektedir (Farawela ve ark., 2019). Bu çalışmada, TKİ

dirençli ve duyarlı hastalarda SALL4 geninde istatistiksel olarak anlamlı bir ekspresyon değişimi saptanmamıştır; hastaların kronik faz KML hastası olmaları bu durumla ilişkilendirilebilir. TET2 ekspresyonunun tanı anında, tedavi boyunca ve özellikle mutasyon, ek kromozomal anomali vb sebebi ile hastalık ilerlemesi yaşandığında ölçülmesi ve bu verilerin karşılaştırılması daha istikrarlı bir sonuca ulaşmayı sağlayacaktır.

DNMT1, bir DNA metiltransferazdır, KML’de hastalık ilerledikçe ekspresyon seviyesinin yükseldiği; kronik faz ve sağlıklı kontrollere göre akselere faz ve blastik fazda DNMT1’in daha yüksek ekspresyona edildiği saptanmıştır (Li ve Luo, 2018). Farklı bir çalışma KML kronik fazda ölçülen DNMT1 seviyesinin, normal kemik iliği hücrelerinden önemli ölçüde farklı olmadığını ifade etmektedir (Mizuno ve ark., 2001). DNMT1’i analiz eden bir diğer çalışmada, normal HSC'lere kıyasla insan KML kök hücrelerinden elde edilen gen ekspresyon profil verilerinde DNMT1'in daha yüksek ekspresyonu gözlemlenmiştir. Ayrıca KML hastalarının tedavi edilmemiş ve imatinib ile tedavi edilmiş kemik iliği hücrelerinden elde edilen verilerinde BCR-ABL inhibisyonunun DNMT1 ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir (Vicente-Dueñas ve ark., 2018). Bu veri, mevcut çalışmadaki DNMT1’in tedavi dirençli KML hastalarında, tedavi duyarlı KML hastalarına göre gen ekspresyon seviyesinin daha düşük olduğu bulgusu ile ilişkilendirilebilir. İmatinib ve ardından 2. nesil TKİ tedavisi alan hastalarda BCR-ABL inhibisyonunun DNMT1 ekspresyonunu azaltmış olabileceği söylenebilir. Ayrıca çalışmadaki hastaların hiçbiri ileri evre KML hastası değildir.

Çalışmada, korelasyon analizi verilerine göre DNMT1’in FAM83B, EZH2 VE TWIST-1 genleri ile korelasyonunun bozulduğu; SALL4, PAK1 ve TET2 genleri ile orta derecede pozitif korelasyonu olduğu saptanmıştır. Ayrıca TET2 geni ile DNMT1 geni korelasyonları tedavi dirençli ve duyarlı grupta uyumlu olarak saptanmıştır. Çalışmada bu genlerden yalnızca TET2 ekspresyon seviyesi için anlamlı farklılık (azalma) gözlenmiştir, diğer genlerde anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Dolayısıyla DNMT1 ve TET2 ekspresyonları arasında, hastalığın başlangıcıyla beraber tümör baskılayıcı TET2 özelliğinin azaldığı, hastaların kronik fazda olması ve uzun süredir imatinib ve ardından TKİ tedavisi almaları ile BCR-ABL seviyesinin azalması ve bu durumun DNMT1 ekspresyonunu azalttığı şeklinde bir hipotez kurulabilir.

TET2 ve DNMT1 dışında gen panelinde yer alan diğer 6 genin KML’deki durumuna bakıldığında literatür verilerine göre; TWIST-1 transkripsiyon faktörü fonksiyonundadır, KML’de ekspresyon seviyesi yükselir, özellikle KML hastalarında tanı anında, hastalık ilerlemesi sırasında ve imatinib dirençli hücre modellemelerinde yüksek ekspresyon seviyesi

ile ilişkilendirilmiştir (Cosset ve ark., 2011; Wang ve ark., 2015; Yuan ve ark., 2020). Bu çalışmada TWIST-1 geninde anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Ek olarak TWIST1'in korelasyon analizinde transkripsiyon faktörü SALL4 ile orta derecede pozitif korelasyonu saptanmıştır, bu 2 gen de çalışmada istatistiksel anlamlı ekspresyon farklılığı göstermemiştir.

HMGA2, transkripsiyon faktörü görevi üstlenir, hastalığın son evresi olan blastik faza geçişte yükselir, HMGA2 ifadesinin yukarı regülasyonunun, kronik fazdan blast faza doğru ilerlerken biriken lösemik hücrelerin farklılaşmamış fenotipi ile ilişkili olduğu ifade edilmektedir (Meyer ve ark., 2007). Bu çalışmada HMGA2 geninde anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Ek olarak HMGA2'nin korelasyon analizinde transkripsiyon faktörü SALL4 ile orta derecede pozitif korelasyonu saptanmıştır, bu 2 gen de çalışmada istatistiksel anlamlı ekspresyon farklılığı göstermemiştir.

EZH2 histon metiltransferazdır, kök hücrelerde yükselir. EZH2, KML lösemi kök hücrelerinde aşırı eksprese edilir, lösemi kök hücrelerinin apoptozdan korunmasına ve TKİ direncine neden olur (Patel ve ark., 2017; Nishioka ve ark., 2016). Bu çalışmada EZH2 geninde anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

FAM83B, proto-onkogendir, KML'de ekspresyon seviyesi yükselir. Önceki çalışmalar FAM83B ekspresyonunun kanserde önemli ölçüde yüksek olduğunu ifade etmektedir (Cipriano ve ark., 2012). KML ile FAM83B ilişkisini analiz eden çalışma sayısı çok kısıtlıdır, Grant ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada FAM83B ekspresyonunun TKİ direncine makul bir şekilde katkıda bulunabileceği bulgusu vardır (Grant, 2012). Bu çalışmada FAM83B geninde anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

SALL4, kök hücre transkripsiyon faktörü görevindedir, gelişim sırasında SALL4 gen ekspresyonu aşağı düzenlenerek kök hücre pluripotensini düzenler; malign tümörlerde anormal bir şekilde yeniden ifade edilir (Hupfeld ve ark., 2013). SALL4'ün kronik faz KML hastalarına kıyasla akselere ve blast faz KML hastalarında aşırı eksprese edildiği ifade edilmektedir (Farawela ve ark., 2019). Bu çalışmada SALL4 geninde anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

PAK1, serin/treonin kinaz fonksiyonu görür, çeşitli malignitelerde onkojenik dönüşümde rol oynar (Pandolfi ve ark., 2019). Flis ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, PAK1 inhibisyonunun, normal hücreleri etkilemeden imatinibin KML hücrelerine karşı etkisini artırdığını belirtmiştir (Flis ve ark., 2019). Bu çalışmada PAK1 geninde anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

Gen ekspresyon profil verileri özetlenecek olursa, panelde yer alan 6 gen literatür verilerinden farklı olarak anlamlı bir değişiklik göstermemiştir. Bu durum şu şekilde açıklanabilir; çalışma grubundaki hastalar en az 6 yıl, en çok 25 yıldır TKİ tedavisi alan hastalardır, kullanılan ilaçlar ve tedavi uyumu gibi bireysel farklılıklar gen ekspresyon seviyelerine etki edebilir. KML hastalarından periferik kan örneği çalışmada 1 kez alınmış ve analiz edilmiştir. Çalışma grubundaki hasta sayıları nispeten az olduğu için daha geniş çaplı bir çalışma grubunda ve KML tanı anında, direnç geliştiğinde, hastalık ilerlediğinde yani tedavi takibi sürecinde belli aralıklarla gen ekspresyon seviyeleri ölçüldüğünde daha geçerli sonuçlar elde edilecektir, bu sonuçlar ilgili genlerin prognostik belirteç olma ihtimali konusunda daha açıklayıcı olacaktır.

Çalışmada BCR/ABL kinaz alan mutasyon analizi sonucu olan 6 hasta vardır, 37 hasta için analiz sonucu yoktur. TKİ dirençli grupta olan bir hastada F359V mutasyonu, başka bir hastada M351T mutasyonu vardır. TKİ dirençli grupta olan 4 hastada mutasyon analizi yapılmış ancak herhangi bir mutasyon tespit edilmemiştir. Çalışmadaki hastaların ek kromozomal anomali taşıyıp taşımadığına dair önceden yapılmış bir çalışma sonucu yoktur. Mutasyonlar ve ek kromozomal anomaliler hastalar arasında bireysel farklılıklara ve dolayısıyla gen ekspresyon profili farklılığına yol açmaktadır. Bu durum da panelde yer alan 6 genin, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiş olmasına açıklama getirebilir.

Çalışmanın sonraki basamağında KML hastalarından ve hastalar ile yaş uyumlu sağlıklı kontrol grubu bireylerinden elde edilen genomik DNA örnekleri üzerinden Real Time PCR yöntemiyle telomer uzunluğu ölçülmüştür, telomer uzunlukları arasındaki fark incelenmiştir. Öncelikle yaştan bağımsız olarak yapılan analizde, KML hastalarının telomer uzunluğunun kontrol grubundaki bireylerin telomer uzunluğundan daha fazla olduğu saptanmıştır. Daha sonra, KML grubu telomerlerinin yaş eşleştirilmiş kontrol grubu telomerlerinden daha uzun olduğu saptanmıştır.

KML ilişkili birçok çalışma, hastalardan alınan lösemik hücre telomerlerinin sağlıklı bireylerden alınan lökositlerden daha kısa olduğunu göstermektedir (Samassekou, 2013). Bir çalışma, KML'deki telomer kısalmasının tanı anında yüksek riskli hastalarda en fazla olduğunu ve hastalık ilerlemesi sırasında kısalmanın hızla meydana geldiğini belirtmektedir (Drummond ve ark., 2004). KML'nin tirozin kinaz inhibitörleri ile başarılı bir şekilde tedavi edilmesi, kanda ve kemik iliğindeki Ph pozitif hücrelerin azalması nedeniyle telomer uzamasıyla ilişkilendirilmiştir. KML hastalarının telomerleri başarılı tedaviden sonra uzasa da, miyeloid

bölmenin telomerleri sağlıklı bireylerdeki telomerlerinden hala daha kısadır (Samassekou, 2013).

Bu çalışmada sağlıklı kontrollere kıyasla KML hastalarının yaş uyumlu ve yaştan bağımsız analizlerinde, telomerleri daha uzun bulunmuştur.

Brummendorf ve arkadaşları bir çalışmada ardışık ölçümleri olan 119 KML hastasında, imatinib tedavisinden öncesine kıyasla, imatinib tedavisinden sonra ölçülen ortalama periferik kan granülosit telomer uzunluğunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit etmiştir. Tedavi başlangıcından 144. güne kadar olan örneklerdeki telomer uzunluğunun, 144 günden uzun süre tedavi gören hastalardan alınan örneklerle karşılaştırıldığında anlamlı derecede daha kısa olduğu saptanmıştır. Tekrarlanan ölçümleri olan hastalarda, tedavi altındaki telomer uzunluğunda anlamlı bir artış gözlenmiştir. Ayrıca majör remisyonadaki medyan telomer uzunluğunun, tedaviye yanıt vermeyen KML hastalarıyla karşılaştırıldığında, anlamlı derecede daha uzun olduğu saptanmıştır; çalışma, imatinib tedavisiyle telomer uzunluğunda görülen artışın, KML'li hastaların periferik kanlarında Ph⁺ hücrelerden Ph⁻ hücrelere doğru bir kaymayı yansıttığını ifade etmektedir (Brummendorf ve ark., 2003). Bu da, daha uzun imatinib tedavi süresiyle telomer boyunda uzama olasılığını gösterir.

Drummond ve arkadaşlarının çalışmasında, imatinib ile tedavi edilen KML hastalarında tedaviye başladıktan sekiz ve altı ay sonra ortalama LTL'nin tedaviye yanıt vermeyenlerde daha kısa, ancak tedaviye yanıt verenlerde daha uzun olduğu sonucu elde edilmiştir (Drummond ve ark., 2004).

Başka bir çalışmada, tedavi gerektirmeyen remisyon (TFR) hastalarının, relaps geçirenlerle göre daha kısa telomerlere sahip olduğu; daha uzun telomere sahip KML hücrelerinin yaşlanmadan (senesens) kaçabilmesi ve tedavinin kesilmesinin ardından bölünebilmesi gerçeğine bağlanabileceği ifade edilmiştir (Tsatsakis ve ark., 2023).

Caocci ve arkadaşlarının çalışması, moleküler relaplara kıyasla TFR hastalarının önemli ölçüde daha kısa bağıl telomer uzunluğu (RTL) gösterdiğini; bu durumun, daha uzun telomerlere sahip olan durgun KML kök hücrelerinin bir şekilde yaşlanma mekanizmalarından kaçmayı ve imatinib tedavisinin kesilmesinden sonra bile proliferatif potansiyelini korumayı başardığını yansıttığını ifade etmektedir (Caocci ve ark., 2016).

Bu çalışmada, TKİ tedavisine dirençli ve duyarlı olan 2 hasta grubunda da telomerlerin, sağlıklı kontrol grubu telomerlerine göre daha uzun olduğunu belirlenmiştir. Hem TKİ tedavisine

dirençli KML hasta grubunda, hem de TKİ tedavisine duyarlı KML hasta grubunda yaş eşleştirilmiş kontrollere göre telomerlerin daha uzun olduğu saptanmıştır. Son olarak, tedaviye dirençli ve duyarlı KML hastalarının telomer uzunlukları arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Literatürde mevcut olan KML hastalarında telomer uzunluğu ölçümü çalışmalarında, tedavi dirençli/duyarlı detayına dair yeterli veri bulunamamıştır, çalışmalar genellikle hastalığın fazı, risk değeri, tedavi yanıtı gibi parametrelere odaklanmaktadır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, telomer uzunluğu (TL) ile TKİ tedavi direnci doğrudan ilişkili değildir. Literatür verileriyle sunulan örneklerden yola çıkarak, bu çalışmada tespit edilen yaş uyumlu kontrollere göre tedavi dirençli ve duyarlı hastalarda daha uzun telomer varlığı, hastaların en az 6 yıl, en çok 25 yıldır TKİ tedavisi almaları ve bu durumun telomer uzama mekanizmasına etki edebileceği ve bu uzun telomere sahip hastaların TKİ tedavisinden sonra relapsa daha yatkın olabileceği ile ilişkilendirilebilir.

Bu çalışmada hasta grubunun nispeten küçük olması, gen ekspresyon analizi ve telomer uzunluğu ölçümü için hastalardan 1 defa, tedavi başlangıcından sonraki süreçte örnek alınmış olması gibi kısıtlılıklardan bahsedilebilir. Daha büyük hasta gruplarıyla, ardışık ölçümlerle ve KML’de tanı, tedavi takip ve tedavisiz remisyonadaki durumların kıyaslanmasıyla kapsamlı ve yönlendirici veriler elde edilebilir.

8. KAYNAKLAR

- Albano, F., Anelli, L., Zagaria, A., Coccaro, N., Minervini, A., Russo Rossi, A., & Specchia, G. (2011). Decreased TET2 gene expression during chronic myeloid leukemia progression. *Leukemia Research*, 35(11), e220-2. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2011.07.013>
- Alves, R., Gonçalves A. C., Rutella, S., Almeida, A. M., De Las Rivas, J., Trougakos, I. P., & Sarmiento Riberio, A. B. (2021). Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia—From Molecular Mechanisms to Clinical Relevance. *Cancers (Basel)*, 13(19), 4820. <https://doi.org/10.3390/cancers13194820>
- Avilés-Vázquez, S., Chávez-González, A., Hidalgo-Miranda, A., Moreno-Lorenzana, D., Arriaga-Pizano, L., Sandoval-Esquivel M. Á., Ayala-Sánchez, M., Aguilar, R., Alfaro-Ruiz, L., & Mayani, H. (2017). Global gene expression profiles of hematopoietic stem and progenitor cells from patients with chronic myeloid leukemia: the effect of in vitro culture with or without imatinib. *Cancer Medicine*, 6(12), 2942–2956. <https://doi.org/10.1002/cam4.1187>
- Baccarani, M., Castagnetti, F., Gugliotta, G., Palandri, F., & Soverini, S. (2009). Response definitions and European Leukemianet Management recommendations. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 22, 331-34. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2009.10.001>
- Baliou, S., Pelagiadis, I., Apetroaei, M., Vakonaki, E., Arsene, E., Hatzidaki, E., Tzatzarakis, M. N., Ioannou, P., Tsatsakis, A., & Stiakaki, E. (2025). The Telomere Length Signature in Leukemias—From Molecular Mechanisms Underlying Telomere Shortening to Immunotherapeutic Options Against Telomerase. *Cancers*, 17, 1936. <https://doi.org/10.3390/cancers17121936>
- Bennour, A., Saad, A., & Sennana, H. (2016). Chronic myeloid leukemia: Relevance of cytogenetic and molecular assays. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 97, 263–274. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.08.020>
- Bernardo, P. S., Lemos, L. G. T., de Moraes, G. G., & Maia, R. C. (2020). Unraveling survivin expression in chronic myeloid leukemia: Molecular interactions and clinical implications. *Blood Reviews*, 43, 100671. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2020.100671>
- Bouillon, A. S., Ferreira, M. S. V., Awad, S. A., Richter, J., Hochhaus, A., Kunzmann, V., Dengler, J., Janssen, J., Ossenkoppele, G., Westerweel, P. E., Boekhorst, P. E. A., Mahon, F. X., Hansen, H. H., Isfort, S., Fioretos, T., Hummel, S., Schemionek, M., Wilop, S., Koschmieder, S., Sauße, S., Mustjoki, S., Beieri, F., & Brummendorf, T. H. (2018). Telomere shortening correlates with leukemic stem cell burden at diagnosis of chronic myeloid leukemia. *Blood Adv.*, 2(13), 1572-1579. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018017772>
- Boultonwood, J., Peniket, A., Watkins, F., Shepherd, P., McGale, P., Richards, S., Fidler, C., Littlewood, T. L., & Wainscoat, J. S. (2000). Telomere length shortening in chronic

- myelogenous leukemia is associated with reduced time to accelerated phase. *Blood*, 96(1), 358-61. <https://doi.org/10.1182/blood.V96.1.358>
- Branford, S., Fernandes, A., Shahrin, N., Maqsood, M., Shanmuganathan, N., & Wadham, C. (2024). Beyond BCR::ABL1—The Role of Genomic Analyses in the Management of CML. *J Natl Compr Canc Netw*, 22(1), e237335. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2023.7335>
- Braun, T. P., Eide, C. A., & Druker, B. J. (2020). Response and Resistance to BCR-ABL1-Targeted Therapies. *Cancer Cell*, 37(4), 530–542. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.03.006>
- Brummendorf, T. H., Ersoz, I., Hartmann, U., Balabanov, S., Wolke, H., Paschka, P., Lahaye, T., Berner, B., Bartolovic, K., Kreil, S., Berger, U., Gschaidmeier, H., Bokemeyer, C., Hehlmann, R., Dietz, K., Lansdorp, P. M., Kanz, L., & Hochhaus, A. (2003). Normalization of previously shortened telomere length under treatment with imatinib argues against a preexisting telomere length deficit in normal hematopoietic stem cells from patients with chronic myeloid leukemia. *Ann N Y Acad Sci*, 996:26-38. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb03229.x>
- Brunmeir, R., Ying L., Yan J., Hee, Y. T., Lin, B., Kaur, H., Leong, Q. Z., Teo, W. W., Choong, G., Jen, W. Y., Koh, L. P., Tan, L. K., Chan, E., Ooi, M., Yang, H., & Joo Chng, W. J. (2025). EZH2 modulates mRNA splicing and exerts part of its oncogenic function through repression of splicing factors in CML. *Leukemia*, 39, 650–662. <https://doi.org/10.1038/s41375-024-02509-y>
- Caocci, G., Greco, M., Delogu, G., Secchi, C., Martino, B., Labate, C., Abruzzese, E., Trawinska, M. M., Galimberti, S., Orru, F., Fozza, C., Gambacorti Passerini, C., Galimi, F., & La Nasa, G. (2016). Telomere length shortening is associated with treatment-free remission in chronic myeloid leukemia patients. *Journal of Hematology & Oncology*, 9:63. <https://doi.org/10.1186/s13045-016-0293-y>
- Cawthon, R. M. (2002). Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(10), e47. <https://doi.org/10.1093/nar/30.10.e47>
- Cawthon, R. M. (2009). Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Research*, 37(3), e21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn1027>
- Chandrana, R. K., Geethab, N., Sakthivela, K. M., Kumara, R. S., Krishnac, K. M. N. J., & Sreedharan, H. (2019). Differential gene expression changes and their implication on the disease progression in patients with Chronic Myeloid Leukemia. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 77, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2019.03.004>
- Chen, Q., Qian, J., Lin, J., Yang, J., Li, Y., Wang, C. Z., Chai, H. Y., Chen, X. X., Qian, Z., Ma, J. C., & Zhang, M. (2013). Expression of SALL4 gene in patients with acute and chronic myeloid leukemia. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 21(2), 315-9. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23628023/>

- Choi, E. (2023). Asciminib: the first-in-class allosteric inhibitor of BCR::ABL1 kinase. *Blood Res.*, 58, S29-S36. <https://doi.org/10.5045/br.2023.2023017>
- Chorzalska, A., Kim, J., Roder, K., Tepper, A., Ahsan, N., Rao, S. P., Olszewski, A. J., Yu, X., Terentyev, D., Morgan, J., Treaba, D. O., Zhao, T. C., Liang, O., Gruppuso, P. A., & Dubielecka, P. M. (2017). Long-Term Exposure to Imatinib Mesylate Downregulates Hippo Pathway and Activates YAP in a Model of Chronic Myelogenous Leukemia. *Stem Cells and Development*, 26(9), 656-677. <https://doi.org/10.1089/scd.2016.0262>
- Ciftçiler, R., & Haznedaroglu, I. C. (2021). Tailored tyrosine kinase inhibitor (TKI) treatment of chronic myeloid leukemia (CML) based on current evidence. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 25(24), 7787-7798. https://doi.org/10.26355/eurev_202112_27625
- Cipriano, R., Graham, J., Miskimen, K. L. S., Bryson, B. L. S., Bruntz, R. C., Scott, S. A., Brown, A., Stark, G. R., & Jackson, M. W. (2012). FAM83B mediates EGFR- and RAS-driven oncogenic transformation. *J Clin Invest*, 122(9), 3197–3210. <https://doi.org/10.1172/JCI60517>
- Cosset, E., Hamdan, G., Jeanpierre, S., Voeltzel, T., Sagorny, K., Hayette, S., Mahon, F. O., Dumontet, C., Puisieux, A., Nicolini, F. E., & Satta, R. M. (2011). Deregulation of TWIST-1 in the CD34 compartment represents a novel prognostic factor in chronic myeloid leukemia. *Blood*, 117(5), 1673-6. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-11-254680>
- Crossman, L. C., Mori, M., Hsieh, Y., Lange, T., Paschka, P., Harrington, C. A., Krohn, K., Niederwieser, D. W., Hehlmann, R., Hochhaus, A., Druker, B. J., & Deininger, M. W. N. (2005). In chronic myeloid leukemia white cells from cytogenetic responders and non-responders to imatinib have very similar gene expression signature. *Haematologica*, 90(4), 459-64. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15820940/>
- Çokluk, Ö. (2010). Lojistik regresyon analizi: kavram ve uygulama. Kuram ve Uygulamada Eğitim Bilimleri, 10(3), 1357-1407. https://scholar.google.co.uk/citations?view_op=view_citation&hl=bg&user=Qt4-SPEAAAAJ&citation_for_view=Qt4-SPEAAAAJ:g5m5HwL7SMYC
- Demirkiran, N., Aydin, B., Pehlivan, M., Yuce, Z., & Sercan, H. O. (2024). Study of the effect of sFRP1 protein on molecules involved in the regulation of DNA methylation in CML cell line. *Med Oncol*, 41(5), 109. <https://doi.org/10.1007/s12032-024-02336-2>
- Deregowska, A., Lewinska, A., Warzybok, A., Stoklosa, T., & Wnuk, M. (2023). Telomere loss is accompanied by decreased pool of shelterin proteins TRF2 and RAP1, elevated levels of TERRA and enhanced glycolysis in imatinib-resistant CML cells. *Toxicology in Vitro*, 90-105608. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2023.105608>
- Deręowska, A., Pępek, M., Solarska, I., Machnicki, M. M., Pruszczyk, K., Dudziński, M., Niesiołędzka-Krężel, J., Seferyńska, I., Sawicki, W., Wnuk, M., & Stokłosa, T. (2023). The interplay between telomeric complex members and BCR:ABL1 oncogenic tyrosine kinase in the maintenance of telomere length in chronic myeloid leukemia. *Journal of*

- Drummond, M. W., Lennard, A., Brûmmendorf, T. H., & Holyoake, T. (2004). Telomere Shortening Correlates with Prognostic Score at Diagnosis and Proceeds Rapidly during Progression of Chronic Myeloid Leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, 45 (9), 1775–1781. <https://doi.org/10.1080/10428190410001693542>
- Dueñas, C. V., González-Herrero, I., Sehgal, L., García-Ramírez, I., Rodríguez-Hernández, G., Pintado, B., Blanco, O., Criado, F. J. G., Cenador, M. B. G., Green, M. R., & Sánchez-García, I. (2018). Dnmt1 links BCR-ABLp210 to epigenetic tumor stem cell priming in myeloid leukemia. *Leukemia*, 33(1), 249–278. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0192-z>
- Edlinger, L., Berger-Becvar, A., Menzl, I., Hoermann, G., Greiner, G., Grundschober, E., Bago-Horvath, Z., Al-Zoughbi, W., Hoefler, G., Brostjan, C., Gille, L., Moriggl, R., Spittler, A., Sexl, V., & Hoelbl-Kovacic A. (2017). Expansion of BCR/ABL1+ cells requires PAK2 but not PAK1. *British Journal of Haematology*, 179(2), 229–241. <http://doi.org/10.1111/bjh.14833>
- El-Tanani, M., Nsairat, H., Matalka, I. I., Lee, Y. F., Rizzo, M., Aljabali, A. A., Mishra, V., Mishra, Y., Hromić-Jahjefendić, A., & Tambuwala, M. M. (2024). The impact of the BCR-ABL oncogene in the pathology and treatment of chronic myeloid leukemia. *Pathol Res Pract*, 254, 155161. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2024.155161>
- Engelhardt, M., Mackenzie, K., Drullinsky, P., Silver, R. T., & Moore, M. A. S. (2000). Telomerase Activity and Telomere Length in Acute and Chronic Leukemia, Pre-and Post-ex Vivo Culture. *Cancer Research*, 60, 610–617. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10676644/>
- Erçalışkan, A., Erdoğan, D. S., & Eşkazan, A. E. (2021). Current evidence on the efficacy and safety of generic imatinib in CML and the impact of generics on health care costs. *Blood Adv.*, 5(17), 3344–3353. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021004194>
- Estrada, N., Xicoy, B., Beier, F., Garcia, O., Morales, C., Boqué, C., Sagüés, M., Ferreira, M. S. V., Vallansot, R., Marcéi, S., Cabezón, M., Brûmmendorf, T. H., & Zamora, L. (2021). Influence of Telomere Length on the Achievement of Deep Molecular Response With Imatinib in Chronic Myeloid Leukemia Patients. *HemaSphere*, 5, 12(e657). <http://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000657>
- Farawela, H., Zawam, H., Al-Wakeel, H., El-Nagdy, M., El-Refaey, & Abdel-Rahman, F. (2019). Expression pattern and prognostic implication of SALL4 gene in myeloid leukemias: a case-control study. *Scand J Clin Lab Invest*, 79(1-2), 65–70. <https://doi.org/10.1080/00365513.2018.1555854>
- Flis S., Bratek, E., Chojnacki, T., Piskorek, M., & Skorski, T. (2019). Simultaneous Inhibition of BCR-ABL1 Tyrosine Kinase and PAK1/2 Serine/Threonine Kinase Exerts

- Synergistic Effect against Chronic Myeloid Leukemia Cells. *Cancers*, 11, 1544. <http://doi.org/10.3390/cancers11101544>
- Gallicchio, L., Gadalla, S. M., Murphy, J. D., & Simonds, N. I. (2018). The Effect of Cancer Treatments on Telomere Length: A Systematic Review of the Literature. *JNCI J Natl Cancer Inst.*, 110(10), 1048-1058. <https://doi.org/10.1093/jnci/djy189>
- Gaspar, T. B., Sá, A., Lopes, J. M., Sobrinho-Simões, M., Soares, P., & Vinagre, J. (2018). Telomere Maintenance Mechanisms in Cancer. *Genes*, 9(5), 241. <https://doi.org/10.3390/genes9050241>
- Gil, M. E. & Coetzer, T. L. (2004). Real-Time Quantitative PCR of Telomere Length. *Molecular Biotechnology*, 27, 169-172. <https://doi.org/10.1385/MB:27:2:169>
- Godley, L. A. (2007). HMGA2 levels in CML: Reflective of miRNA gene regulation in a hematopoietic tumor?. *Leukemia & Lymphoma*, 48(10), 1898-9. <https://doi.org/10.1080/10428190701644348>
- Grant, S. (2012). FAM83A and FAM83B: candidate oncogenes and TKI resistance mediators. *J Clin Invest*, 122(9), 3048–3051. <https://doi.org/10.1172/JCI64412>
- Hehlmann, R. (2020). Chronic Myeloid Leukemia in 2020. *Hemasphere*, 30, 4(5), e468. <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000468>
- Heidari, N., Vosoughi, T., Asl, M. J., Malehi, A. S., & Saki, N. (2018). How is the relationship between TWIST-1 and BCR-ABL1 gene expressions in chronic myeloid leukaemia patients. *Biomarkers*, 23(3), 271–276 <https://doi.org/10.1080/1354750X.2018.1423705>
- Hochhaus, A., Baccarani, M., Silver, R. T., Schiffer, C., Apperley, J. F., Cervantes, F., Clark, R. E., Cortes, J. E., Deininger, M. W., Guilhot, F., Hjorth-Hansen, H., Hughes, T. P., Janssen, J. J. W. M., Kantarjian, H. M., Kim, D. W., Larson, R. A., Lipton, J. H., Mahon, F. X., Mayer, J., & Hehlmann, R. (2020). European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 34, 966–984. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0776-2>
- Hughes, T. P., & Shanmuganathan, N. (2022). Management of TKI - resistant chronic phase CML. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2022(1), 129-137. <https://doi.org/10.1182/hematology.2022000328>
- Hupfeld, T., Chapuy, B., Schrader, V., Beutler, M., Veltkamp, C., Koch, R., Cameron, S., Aung, T., Haase, D., LaRosee, P., Truemper, L., & Wulf, G. (2013). Tyrosine kinase inhibition facilitates cooperation of transcription factor SALL4 and ABC transporter A3 towards intrinsic CML cell drug resistance. *Br J Haematol*, 161(2), 204–213. <https://doi.org/10.1111/bjh.12246>
- Jabbour, E., & Kantarjian, H. (2022). Chronic myeloid leukemia: 2022 update on diagnosis, therapy, and monitoring. *Am J Hematol*, 97(9), 1236-1256. <https://doi.org/10.1002/ajh.26642>

- Jabbour, E., & Kantarjian, H. (2024). Chronic myeloid leukemia: 2025 update on diagnosis, therapy, and monitoring. *Am J Hematol*, 99(11), 2191-2212. <https://doi.org/10.1002/ajh.27443>
- Jabbour, E., & Kantarjian, H. (2025). Chronic Myeloid Leukemia: A Review. *JAMA*, 333(18), 1618-1629. <https://doi.org/10.1001/jama.2025.0220>
- Kantarjian, H., Zhai, Y., Oehler, V. G., Jamy, O., Koller, P. B., Haddad, F. G., Sasaki, K., & Jabbour, E. J. (2025). Olverembatinib in chronic myeloid leukemia-Review of historical development, current status, and future research. *Cancer*, 131(8), e35832. <https://doi.org/10.1002/cncr.35832>
- Kim, J., Kim, S. J., & Naka, K. (2016). Transcriptome sequencing of hematopoietic stem cells and chronic myelogenous leukemia stem cells. *Genom Data*, 7, 57-9. <http://doi.org/10.1016/j.gdata.2015.11.017>
- Krishnan, V., Kim, D. D. H., Hughes, T. P., Branford, S., & Ong, S. T. (2022). Integrating genetic and epigenetic factors in chronic myeloid leukemia risk assessment: toward gene expression-based biomarkers. *Haematologica*, 107(2), 358-370. <https://doi.org/10.3324/haematol.2021.279317>
- Lavrov, A. V., Chelysheva, E. Y., Adilgereeva, E. P., Shukhov, O. A., Smirnikhina, S. A., Kochergin-Nikitsky, K. S., Yakushina, V. D., Tsaur, G. A., Mordanov, S. V., Turkina, A. G., & Kutsev, S. I. Exome, transcriptome and miRNA analysis don't reveal any molecular markers of TKI efficacy in primary CML patients. *BMC Med Genomics*, 12 (Suppl 2), 37. <https://doi.org/10.1186/s12920-019-0481-z>
- Lee, Y. S., & Dutta, A. (2007). The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev*, 21(9), 1025-30. <https://doi.org/10.1101/gad.1540407>
- Lernoux, M., Schneckeburger, M., Dicato, M., & Diederich, M. (2020). Epigenetic mechanisms underlying the therapeutic effects of HDAC inhibitors in chronic myeloid leukemia. *Biochem Pharmacol*, 173, 113698. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113698>
- Li, A. Y. J., Lin, H. H., Kuo, C. Y., Shih, H. M., Wang, C. C. C., Yen, Y., & Ann, D. K. (2011). High-Mobility Group A2 Protein Modulates hTERT Transcription To Promote Tumorigenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 31(13), 2605-17. <https://doi.org/10.1128/MCB.05447-11>
- Li, Y. H., Liu, X. D., Guo, X. F., Liu, X., Luo, J. M., Zhang, Y. X., & Li, Z.S. (2015). Expression and Clinical Significance of DNMT in Patients with Chronic Myeloid Leukemia. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 23(6), 1547-50. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26708868/>
- Li, Z., & Luo, J. (2018). Epigenetic regulation of HOTAIR in advanced chronic myeloid leukemia. *Cancer Management and Research*, 10, 5349–5362. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S166859>

- Lin, J., Smith D. L, Esteves, K., & Drury, S. (2019). Telomere length measurement by qPCR - Summary of critical factors and recommendations for assay design. *Psychoneuroendocrinology*, 99, 271-278. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.10.005>
- Liu, W. S., Wu, B. S., Yang, L., Chen, S. D., Zhang, Y. R., Deng, Y. T., Wu, X. R., He, X. Y., Yang, J., Feng, J. F., Cheng, W., Xu, Y. M., & Yu, J. T. (2024). Whole exome sequencing analyses reveal novel genes in telomere length and their biomedical implications. *GeroScience*, 46, 5365–5385. <https://doi.org/10.1007/s11357-024-01203-2>
- Marquis, M., Beaubois, C., Lavallée, V. P., Abrahamowicz, M., Danieli, C., Lemieux, S., Ahmad, I., Wei, A., Ting, S. B., Fleming, S., Schwarzer, A., Grimwade, D., Grey, W., Hills, R. K., Vyas, P., Russell, N., Sauvageau, G., & Hébert, J. (2018). High expression of HMGA2 independently predicts poor clinical outcomes in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J.*, 8(8), 68. <https://doi.org/10.1038/s41408-018-0103-6>
- Mascarenhas Cdo, C., Ferreira da Cunha, A., Brugnerotto, A. F., Gambero, S., de Almeida, M. H., Carazzolle, M. F., Pagnano, K. B., Traina, F., Costa, F. F., & de Souza, C. A. (2014). Identification of target genes using gene expression profile of granulocytes from patients with chronic myeloid leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors. *Leukemia & Lymphoma*, 55(8), 1861–1869. <https://doi.org/10.3109/10428194.2013.855311>
- Meyer, B., Krisponeit, D., Junghanss, C., Murua Escobar, H., & Bullerdiek, J. (2009). Quantitative expression analysis in peripheral blood of patients with chronic myeloid leukaemia: Correlation between HMGA2 expression and White blood cell count. *Leuk Lymphoma*, 48(10), 2008-2013. <https://doi.org/10.1080/10428190701559116>
- Mizuno, S. I., Chijiwa, T., Okamura, T., Akashi, K., Fukumaki, Y., Niho, Y., & Sasaki, H. (2001). Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. *The American Society of Hematology Blood*, 97(5), 1172-1179. <https://doi.org/10.1182/blood.V97.5.1172>
- Nishioka, C., Ikezoe, T., Yang, J., & Yokoyama, A. (2016). BCR/ABL increases EZH2 levels which regulates XIAP expression via miRNA-219 in chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia Research*, 45, 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2016.03.012>
- Ozturk, N., Singh, I., Mehta, A., Braun, T., & Barreto, G. (2014). HMGA proteins as modulators of chromatin structure during transcriptional activation. *Front Cell Dev Biol*, 2, 5. <https://doi.org/10.3389/fcell.2014.00005>
- Özdemir, Z. N., Kılıçaslan, N. A., Yılmaz, M., & Eşkazan A. E. (2023). Guidelines for the treatment of chronic myeloid leukemia from the NCCN and ELN: differences and similarities. *International Journal of Hematology*, 117, 3–15. <https://doi.org/10.1007/s12185-022-03446-1>

- Pan, Y., Zeng, S., Hao, R., Liang, M., Shen, Z., & Huang, W. (2022). The progress of small-molecules and degraders against BCR-ABL for the treatment of CML. *Eur J Med Chem*, 238, 114442. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114442>
- Pandolfi, A., Stanley, R., Yu, Y., Bartholdy, B., Pendurti, G., Gritsman, K., Boulwood, J., Chernoff, J., Verma, A., & Steidl, U. (2019). PAK1 is a therapeutic target in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood*, 126(9), 1118-27. <http://doi.org/10.1182/blood-2014-12-618801>
- Patel, B., O'Hare, T., & Deininger, M.W. (2017). Mechanisms of resistance to ABL kinase inhibition in CML and the development of next generation ABL kinase inhibitors. *Hematol Oncol Clin North Am*, 31(4), 589–612. <http://doi.org/10.1016/j.hoc.2017.04.007>
- Petraglia, F., Singh, A. A., Carafa, V., Nebbioso, A., Conte, M., Scisciola, L., Valente, S., Baldi, A., Mandoli, A., Petrizzi, V. B., Ingenito, C., de Falco, S., Cicatiello, V., Apicella, I., Janssen-Megens, E. M., Kim, B., Yi, G., Logie, C., Heath, S., Ruvo, M., Wierenga, A. T. J., Flicek, P., Yaspo, M. L., Della Valle, V., Y., Bernard, O., Tomassi, S., Novellino, E., Feoli, A., Sbardella, G., Gut, I., Vellenga, E., Stunnenberg, H. G., Mai, A., Martens, J. H. A., & Altucci, L. (2018). Combined HAT/EZH2 modulation leads to cancer-selective cell death. *Oncotarget*, 9(39), 25630-25646. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25428>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9), e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pinnenti, M., Sami, M. A., & Hassan, U. (2024). Enabling biomedical technologies for chronic myelogenous leukemia (CML) biomarkers detection. *Biomicrofluidics*, 18(1), 011501. <https://doi.org/10.1063/5.0172550>
- Putri, A., Rinaldi, I., Louisa, M., & Koesnoe, S. (2019). The Role of STAT5 in Tyrosine Kinase Inhibitor (IMATINIB) Resistance in CML Patients. *Acta Med Indones*, 51(4), 348-352. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32041920/>
- Rinaldi, I., & Winston, K. (2023). Chronic Myeloid Leukemia, from Pathophysiology to Treatment-Free Remission: A Narrative Literature Review. *Journal of Blood Medicine*, 14, 261–277. <https://doi.org/10.2147/JBM.S382090>
- Rinke, J., Chase, A., Cross N., & Hochhaus, A. (2020). EZH2 in Myeloid Malignancies. *Cells*, 9, 1639. <http://doi.org/10.3390/cells9071639>
- Rinke, J., Hochhaus, A., & Ernst, T. (2020). CML - Not only BCR-ABL1 matters. *Best Pract Res Clin Haematol*, 33(3), 101194. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2020.101194>
- Salati, S., Salvestrini, V., Carretta, C., Genovese, E., Rontauroli, S., Zini, R., Rossi, C., Ruberti S., Bianchi E., Barbieri G., Curti A., Castagnetti F., Gugliotta G., Rosti G., Bergamaschi M., Tafuri A., Tagliafico E., Lemoli R., & Manfredini R. (2017). Deregulated expression of miR-29a-3p, miR-494-3p and miR-660-5p affects sensitivity to tyrosine kinase

- inhibitors in CML leukemic stem cells. *Oncotarget*, 8(30), 49451-49469. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17706>
- Samassekou, O. (2013). Dynamic Length Changes of Telomeres and Their Nuclear Organization in Chronic Myeloid Leukemia. *Cancers*, 5, 1086-1102. <https://doi.org/10.3390/cancers5031086>
- Sampaio M. M., Santos, M. L. C, Marques, H. S, Gonçalves, V. L. S, Araújo, G. R. L., Lopes, L. W., Apolonio, J. S., Silva, C. S., Santos, L. K. S, Cuzzuol, B. R., Guimarães, Q. E. S., Santos, M. N., de Brito, B. B., da Silva, F. A. F., Oliveira, M. V., Souza, C. L, & de Melo, F. F. (2021). Chronic myeloid leukemia-from the Philadelphia chromosome to specific target drugs: A literature review. *World J Clin Oncol*, 12(2), 69-94. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33680875/>
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc.*, 3(6), 1101-8. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Senapati, J., Sasaki, K., Issa, G. C., Lipton, J. H., Radich, J. P., Jabbour, E., & Kantarjian, H. M. (2023). Management of chronic myeloid leukemia in 2023 – common ground and common sense. *Blood Cancer J.*, 13(1), 58. <https://doi.org/10.1038/s41408-023-00823-9>
- Shahrin, N. H., Wadham, C., & Branford, S. (2022). Defning Higher-Risk Chronic Myeloid Leukemia: Risk Scores, Genomic Landscape, and Prognostication. *Current Hematologic Malignancy Reports*, 17, 171–180. <https://doi.org/10.1007/s11899-022-00668-2>
- Shen, Q., Liu, S., Hu, J., Chen, S., Yang, L., Li, B., Wu, X., Ma, Y., Yang, J., Ma, Y., & Li, Y. (2012). The differential expression pattern of the BMI-1, SALL4 and ABCA3 genes in myeloid leukemia. *Cancer Cell Int.*, 12(1), 42. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-12-42>
- Singh, N., Tripathi, A. K., Sahu, D. K., Mishra, A., Linan, M., Argente, B., Varkey, J., Parida, N., Chowdhry, R., Shyam, H., Alam, N., Dixit, S., Shankar, P., Mishra, A., Agarwal, A., Yoo, C., Bhatt, M. L. B., & Kant, R. (2018). Differential genomics and transcriptomics between tyrosine kinase inhibitor-sensitive and -resistant BCR-ABL-dependent chronic myeloid leukemia. *Oncotarget*, 9(54), 30385-30418. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25752>
- Soverini, S. (2023). Resistance mutations in CML and how we approach them. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2023(1), 469-475. <https://doi.org/10.1182/hematology.2023000447>
- Sun, J., Hu, R., Han, M., Tan, Y., Xie M., Gao, S., & Hu, J. (2024). Mechanisms underlying therapeutic resistance of tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. *Int J Biol Sci*, 20(1), 175-181. <https://doi.org/10.7150/ijbs.86305>
- Szuriána, K., Csalab, I., Marosvária, D., Rajnaia, H., Dezsóá, K., Bödőrc, C., Piurkód, V., Matolcsya, A., & Reinigera, L. (2018). EZH2 is upregulated in the proliferation centers

- of CLL/SLL lymph nodes. *Exp Mol Pathol.*, 05(2), 161-165.
<https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2018.07.009>
- Tamura, T., Daisuke Kurotaki, D., & Koizumi, S. (2015). Regulation of myelopoiesis by the transcription factor IRF8. *Int J Hematol*, 101, 342–351. <https://doi.org/10.1007/s12185-015-1761-9>
- Tan, L., Xu, H., Chen, G., Wei, X., Yu, B., Ye, J., Xu, L., & Tan, H. (2017). Silencing of HMGA2 reverses retardance of cell differentiation in human myeloid leukaemia. *Br J Cancer*, 118(3), 405-415. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.403>
- Tipping, A. J., Deininger, M. W., Goldman J. M., & Melo, J. V. (2003). Comparative gene expression profile of chronic myeloid leukemia cells innately resistant to imatinib mesylate. *Experimental Hematology*, 31, 1073–1080.
<https://doi.org/10.1016/j.exphem.2003.08.006>
- Tsatsakis, A., Oikonomopoulou, T., Nikolouzakis, T. K., Vakonaki, E., Tzatzarakis, M., Flamourakis, M., Renieri, E., Fragkiadaki, P., Iliaki, E., Bachltzanak, M., Karzi, V., Katsikantami, I., Kakridonis, F., Hatzidaki, E., Tolia, M., Svistunov, A. A., Spandidos, D. A., Nikitovic, D., Tsiaoussis, J., & Berdiaki, A. (2023). Role of telomere length in human carcinogenesis. *International Journal of Oncology*, 63, 78.
<https://doi.org/10.3892/ijo.2023.5526>
- Uppuluri, L., Varapula, D., Young, E., Riethman, H., & Xiao, M. (2021). Single-molecule telomere length characterization by optical mapping in nano-channel array: Perspective and review on telomere length measurement. *Environ Toxicol Pharmacol.*, 82, 103562.
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103562>
- Ureshino, H., & Kimura, S. (2025). Efficacy and Safety of the First-in-Class STAMP-Inhibitor Asciminib in Patients With Chronic Myeloid Leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.*, 25(1), e57-e61. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2024.10.010>
- Vener, C., Banzi, R., Ambrogi, F., Ferrero, A., Saglio, G., Pravettoni G., & Sant, M. (2020). First-line imatinib vs second- and third-generation TKIs for chronic-phase CML: a systematic review and meta-analysis. *Blood Adv*, 4(12), 2723–2735.
<https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019001329>
- Vicente-Deuñas, C., González-Herrero, I., Sehgal, L. et al. (2019). Dnmt1 links BCR-ABLp210 to epigenetic tumor stem cell priming in myeloid leukemia. *Leukemia*, 33, 249–278. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0192-z>
- Villuendas, R., Steegmann, J. L., Polla'n, M., Tracey, L., Granda, A., Ferna'ndez-Ruiz, E., Casado, L. F., Martí'nez, J., Martí'nez, P., Lombardi'a, L., Villalo'n, L., Odriozola, J., & Piris, M. A. (2006). Identification of genes involved in imatinib resistance in CML: a gene-expression profiling approach. *Leukemia*, 20, 1047–1054.
<https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404197>
- Wang, J., Hua, L., Guo, M., Yang, L., Liu, X., Li, Y., Shang, X., & Lou, J. (2016). Notable roles of EZH2 and DNMT1 in epigenetic dormancy of the SHP1 gene during the

- progression of chronic myeloid leukaemia. *Oncology Letters*, 13, 4979-4985. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6050>
- Wang, L., Li, L., Chen, R., Huang, X., & Ye, X. (2021). Understanding and Monitoring Chronic Myeloid Leukemia Blast Crisis: How to Better Manage Patients. *Cancer Management and Research*, 13, 4987–5000. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S314343>
- Wang, N., Guo, D., Zhao, Y., Dong, C., Liu, X. Y., Yang, B., Wang, S., Wang, L., Liu, Q., Ren, Q., Lin, Y., & Ma, X. T. (2015). TWIST-1 promotes cell growth, drug resistance and progenitor clonogenic capacities in myeloid leukemia and is a novel poor prognostic factor in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*, 6, 20977-20992. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4007>
- Wenn, K., Tomala, L., Wilop, S., Vankann, L., Hasenbank, C., Frank, O., Hochhaus, A., Giles, F. J., Lange, T., Müller, M. C., Koschmieder, S., Beier, F., Ziegler, P., & Brümmendorf, T. H. (2015). Telomere length at diagnosis of chronic phase chronic myeloidleukemia (CML-CP) identifies a subgroup with favourable prognostic parameters and molecular response according to the ELN criteria after 12 months of treatment with nilotinib. *Leukemia*, 29, 2402–2404. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.245>
- Yang, J. (2018). SALL4 as a transcriptional and epigenetic regulator in normal and leukemic Hematopoiesis. *Biomarker Research*, 6, 1. <https://doi.org/10.1186/s40364-017-0115-6>
- Ye, Y., Zhoua, Y., Zhenga, Q., Tanga, S., Daib, Y., Zhoua, Y., Wang, M., Zhoua, J., Lua, X., Wang, L., & Yinga B. (2019). Pak1 gene functioned differentially in different BCR-ABL subtypes in leukemiagenesis and treatment response through STAT5 pathway. *Leukemia Research*, 79, 6–16. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2019.01.012>
- Yoshimaru, R., & Minami, Y. (2023). Genetic Landscape of Chronic Myeloid Leukemia and a Novel Targeted Drug for Overcoming Resistance. *Int. J. Mol. Sci.*, 24, 13806. <https://doi.org/10.3390/ijms241813806>
- Yuan, R., Chang, J., & He, J. (2020). Effects of Twist1 on drug resistance of chronic myeloid leukemia cells through the PI3K/AKT signaling pathway. *Cell Mol Biol*, 66(6), 81-85. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33040790/>
- Yung, Y., Lee, E., Chu, H. T., Yip, P. K., & Gill, H. (2021). Targeting, Abnormal Hematopoietic Stem Cells in Chronic Myeloid Leukemia and Philadelphia Chromosome-Negative Classical Myeloproliferative Neoplasms. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 659. <https://doi.org/10.3390/ijms22020659>
- Yurttaş, N. Ö., & Eşkazan, A. E. (2020). Novel therapeutic approaches in chronic myeloid leukemia. *Leukemia Research*, 91, 106337. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2020.106337>
- Zha, X., Yan, X., Shen, Q., Zhang, Y., Wu, X., Chen, S., Li, B., Yang, L., Geng, S., Weng, J., Du, X., & Li, Y. (2012). Alternative expression of TCR ζ related genes in patients with chronic myeloid leukemia. *J Hematol Oncol*, 5, 74. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-5-74>

- Zhang, W. W., Cortes, J. E., Yao, H., Zhang, L., Reddy, N. G., Jabbour, E., Kantarjian, H. M., & Jones, D. (2009). Predictors of Primary Imatinib Resistance in Chronic Myelogenous Leukemia Are Distinct From Those in Secondary Imatinib Resistance. *J Clin Oncol*, 27, 3642-3649. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.19.4076>
- Zhang, X., Yang, L., Liu, X., Nie, Z., Wang, X., Pan, X., Luo, J. (2017). Research on the epigenetic regulation mechanism of the PTPN6 gene in advanced chronic myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*, 178, 728–738. <https://doi.org/10.1111/bjh.14739>
- Zhang, Z., Zhou, X., Zhou, X., Cheng, Z., & Hu, Y. (2024). Exploration of treatment-free remission in CML, based on molecular monitoring. *Cancer Med.*, 13, e6849. <https://doi.org/10.1002/cam4.6849>

9. BİLİMSEL FAALİYETLER

Makale

Koçkan, B., Toptaş, T., Atagündüz, I., Tuğlular, A. T., Özer, A., Akkiprik, M. (2018). Molecular screening and the clinical impacts of BCR-ABL KD mutations in patients with imatinib-resistant chronic myeloid leukemia. *Oncol Lett.* 2018 Feb;15(2):2419-2424. <https://doi:10.3892/ol.2017.7606>

Bildiri (Poster veya Sözel)

Koçkan, B., Toptaş, T., Atagündüz, I., Tuğlular, A. T., Özer, A., Akkiprik, M. (2016, 24-26 Şubat). İmatinib Tedavisine Direnç Gösteren Kronik Miyeloid Lösemi Hastalarında Bcr-Abl Geni Kinaz Bölgesi Mutasyonlarının Belirlenmesi ve Klinikle İlişkisi [poster bildirimi]. II. Hematolojik Genetik Sempozyumu, İzmir, Türkiye

Proje

Akkiprik, M. Kronik Miyeloid Lösemide Tedavi Direnci ile İlişkili Gen Ekspresyon Profili ve Telomer Uzunluğu arasındaki İlişki. Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Komisyonu (SAG-C-DRP-250919-0293), 2019-2021 (Tez Projesi).