

**T.C.**  
**EGE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**DASATİNİB İLE İNDÜKLENMİŞ KML HÜCRE**  
**DİZİSİ(K562) APOPİTOZUNUN JAK-STAT YOLAĞI**  
**ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Uzmanlık Tezi**

**Dr. Ceyda Tunakan Dalgıç**

**Tez Danışmanı**

**Prof. Dr. Güray Saydam**

**İZMİR-2014**

## ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimimin başlangıcından itibaren hoşgörüsüyle hep yanımda olduğunu hissettiren , iyi bir çalışma ortamı sunan ve deneyimleri ile eğitim hayatıma birçok katkıları olan İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Fehmi AKÇİÇEK'e, bilgi ve tecrübeleriyle daha doğru bir bakış açısı kazandıran İç Hastalıkları Anabilim Dalının tüm öğretim üyelerine, tez çalışmamın belirlenmesi ve sonuçlanması sürecinde her türlü desteği esirgemeyen tez danışmanım Hematoloji Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Güray SAYDAM'a, deneylerin yapımı esnasında, verilerin yazım aşamasında ve değerlendirilmesinde desteğini esirgemeyen Tıbbi Biyoloji AB Araştırma Görevlisi Dr. Burçin Tezcanlı Kaymaz'a, beraber çalışmaktan keyif aldığım, iyi ve kötü günlerimde yanımda olan tüm çalışma arkadaşlarıma, uzmanlık eğitimim süresinde sabır ve desteğini esirgemeyen sevgili eşim Uzm. Dr. Onur Dalgıç'a ve yaşam kaynağım olan bitanecik kızım Neşe Eda Dalgıç'a sonsuz teşekkürler.

Dr.Ceyda Tunakan Dalgıç

İZMİR,2014

# İÇİNDEKİLER

|                                                                                    |          |
|------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| Kısaltmalar Dizini .....                                                           | vi       |
| Tablolar ve Şekiller Dizini .....                                                  | ix       |
| Özet .....                                                                         | xi       |
| İngilizce Özet (abstract).....                                                     | xiii     |
| <b>1. GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>                                                      | <b>1</b> |
| <b>2. GENEL BİLGİLER .....</b>                                                     | <b>5</b> |
| 2.1. Tanım , Etiyoloji ve Epidemiyoloji .....                                      | 5        |
| 2.2. Patogenez.....                                                                | 6        |
| 2.2.1. KML Moleküler Genetiği .....                                                | 7        |
| 2.2.1.1. c-ABL Onkogeni .....                                                      | 7        |
| 2.2.1.2. BCR Geni ve Proteini.....                                                 | 8        |
| 2.2.1.3. Bcr-Abl Füzyon Geni , Füzyon Proteini .....                               | 9        |
| 2.2.1.4. Ph(-) KML ve Varyant Ph Patogenezi .....                                  | 11       |
| 2.2.2. KML'nin Hücrel Biyolojisi ve BCR-ABL Aracılı Malign<br>Transformasyon ..... | 12       |
| 2.2.2.1 Tirozin Kinaz Aktivitesi ve Kontrolü.....                                  | 13       |
| 2.2.2.2 Lösemik Klonun Proliferasyonu.....                                         | 13       |
| 2.2.2.3 Kendini Yenileme (Self-Renewal) .....                                      | 14       |
| 2.2.2.4 Apoptozise Direnç Ve Apoptoz İnhibisyonu .....                             | 14       |
| 2.2.2.5 Hücrel Adezyonun Bozulması .....                                           | 15       |
| 2.2.2.6 Genetik İstabilite .....                                                   | 15       |
| 2.2.2.7 Sinyal Yolaklarının Aktivasyonu .....                                      | 15       |
| 2.3. KML Tanısı ve Klinik Bulgular .....                                           | 16       |
| 2.4. KML Ayırıcı Tanısı .....                                                      | 20       |
| 2.5. KML'de Prognoz.....                                                           | 22       |
| 2.6. KML Tedavisi .....                                                            | 23       |
| 2.6.1. KML Tedavisinin Tarihsel Gelişimi .....                                     | 23       |
| 2.6.2. Genel Bakış .....                                                           | 24       |
| 2.6.3. KML'de Tedavi Yönetimi.....                                                 | 25       |
| 2.6.3.1 Tedaviye Yanıt Tanımları .....                                             | 27       |
| 2.6.3.2 Tedavi Yanıtının Değerlendirilmesi.....                                    | 28       |
| 2.6.3.3 Tedavi Yanıtının İzlenmesi .....                                           | 32       |

|                                                                                       |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.6.4. İmatinib İntoleransı, İmatinibe Direnç Yan Etkiler ve Kullanım Alanları...     | 32        |
| 2.6.4.1. İkinci kuşak TKİ(dasatinib,nilotinib) yan etkiler ve kullanım alanları ..... | 39        |
| 2.6.5 Allojeneik Hematopoietik Kök Hücre Nakli.....                                   | 41        |
| 2.7 KML Tedavisiyle İlgili Bazı Önemli Çalışmalar .....                               | 44        |
| 2.7.1. İmatinib .....                                                                 | 44        |
| 2.7.2. İkinci Kuşak Tirozin Kinaz İnhibitörleri.....                                  | 46        |
| 2.7.2.1. Nilotinib .....                                                              | 46        |
| 2.7.2.2. Dasatinib.....                                                               | 48        |
| 2.8. Yeni Tedavi Yaklaşımları.....                                                    | 49        |
| 2.9. Lösemik Dönüşümde Rol Oynayan Sinyal İleti Mekanizmaları.....                    | 51        |
| 2.9.1. MAP Kinaz ve Ras/Raf/MEK/ERK Sinyal İletim Yolu .....                          | 51        |
| 2.9.2. PI-3 Kinaz/Protein Kinaz B Sinyal İletim Yolu.....                             | 52        |
| 2.9.3. Myc Sinyal İletim Yolu.....                                                    | 52        |
| 2.9.4. Jak/Stat Sinyal İletim Yolu .....                                              | 53        |
| <b>3. MATERYAL VE METOD .....</b>                                                     | <b>55</b> |
| 3.1. Lösemik Hücre Hattı Ve Hücre Kültürü .....                                       | 55        |
| 3.1.1. K562 KML hücre hattının özellikleri.....                                       | 55        |
| 3.1.2. K562 hücre hattında kullanılan besiyeri ve kültür işlemleri .....              | 56        |
| 3.1.3. Dondurulmuş hücre hattının çözülmesi.....                                      | 56        |
| 3.1.4. Hücre hattının pasajlanması .....                                              | 56        |
| 3.1.5. Hücre sayımı ve canlılığın değerlendirilmesi.....                              | 57        |
| 3.2.Sitotoksisite Çalışmaları.....                                                    | 57        |
| 3.3. PCR ile STAT 5A ve 5B transkript düzeylerinin saptanması .....                   | 58        |
| 3.3.1.K562 hücrelerinde STAT Ekspresyonlarının Belirlenmesi.....                      | 58        |
| 3.3.2. Total RNA İzolasyonu.....                                                      | 58        |
| 3.3.3.cDNA Reaksiyonu.....                                                            | 59        |
| 3.3.4. STAT Ekspresyonlarının Belirlenmesi .....                                      | 59        |
| 3.3.5. STAT5A, STAT5B mRNA Ekspresyon Değerlerinin Belirlenmesi.....                  | 60        |
| 3.4. STAT 5A ve 5B ekspresyonlarının protein düzeyinde saptanması.....                | 62        |
| 3.4.1.I-Blot Dry Blotting Sistem ile Western Blotlama .....                           | 62        |
| 3.4.2.WesternBreeze Chromogenic İmmunodetection Protokol Uygulaması ..                | 63        |
| 3.4.3. Protein Ekstraksiyonu.....                                                     | 64        |

|                                                                                                              |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.4.4. Bradford Metoduna Göre Protein Tayini .....                                                           | 64        |
| 3.5.Apoptozisin saptanması.....                                                                              | 65        |
| 3.5.1. Cell Death Detection Kit .....                                                                        | 65        |
| 3.6.İstatistiksel Değerlendirme .....                                                                        | 66        |
| <b>4. SONUÇLAR.....</b>                                                                                      | <b>67</b> |
| 4.1.Sitotoksitenin değerlendirilmesi .....                                                                   | 67        |
| 4.1.1.XTT metodu ile sitotoksitenin değerlendirilmesi .....                                                  | 67        |
| 4.2.STAT ve G6PDH Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi Amacıyla G6PDH<br>Standart Eğrisinin Oluşturulması..... | 68        |
| 4.3.STAT Gen Ekspresyonlarının Kantitasyonu .....                                                            | 68        |
| 4.4.Western Blot Analizi Sonuçları.....                                                                      | 70        |
| 4.5.Cell death detection kit ile apoptoz ölçülmesi.....                                                      | 71        |
| <b>5. TARTIŞMA.....</b>                                                                                      | <b>72</b> |
| <b>6. KAYNAKLAR.....</b>                                                                                     | <b>81</b> |

## KISALTMALAR

|                       |                                                                                                   |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| μ-bcr                 | : Micro breakpoint cluster region                                                                 |
| Abl                   | : Abelson geni                                                                                    |
| AHKHN                 | : Allojeneik Hematopoietik Kök Hücre Nakli                                                        |
| AKT (protein kinaz B) | : Serin-treonin spesifik protein kinase                                                           |
| ALL                   | : Akut lenfoblastik lösemi                                                                        |
| AML                   | : Akut myeloid lösemi                                                                             |
| A-MuLV                | : Abelson Mürin Lösemi Virüsünün                                                                  |
| Arg                   | : Abl ile ilgili gen                                                                              |
| ATP                   | : Adenosin trifosfat                                                                              |
| BAP-1                 | : Bcr-associated protein-1                                                                        |
| bcr                   | : Breakpoint cluster region                                                                       |
| BU                    | : Busulfan                                                                                        |
| CIS                   | : Cytokin inducible SH-2 containing protein                                                       |
| CTCAE                 | : Common Terminology Criteria for Adverse Events                                                  |
| CY                    | : Siklofosfamid                                                                                   |
| DASISION              | : Dasatinib versus İmatinib Study in Treatment Naive CML-CP Patients                              |
| DSÖ                   | : Dünya Sağlık Örgütü                                                                             |
| EBMT                  | : European Group for Bone Marrow Transplantation                                                  |
| ELN                   | : European Leukemia Net                                                                           |
| ENESTnd               | : Evaluating Nilotinib Efficacy and Safety in Clinical Trials of Newly Diagnosed Ph+ CML Patients |
| EPO                   | : Eritropoetin                                                                                    |
| ERK                   | : Extracelluler signal regulated kinase                                                           |
| FDA                   | : Food and Drug Administration                                                                    |
| FISH                  | : Floresans in situ hibridizasyon                                                                 |
| G- CSF                | : Granulosit koloni stimule edici faktör                                                          |
| G6PDH                 | : Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz                                                                    |
| GAP                   | : GTPaz-aktive edici protein                                                                      |
| GDP                   | : Guanidin difosfat                                                                               |
| GEF                   | : Guanidin exchange faktör                                                                        |
| GH                    | : Growth hormon                                                                                   |

|         |                                                                      |
|---------|----------------------------------------------------------------------|
| GİST    | : Gastrointestinal Stromal Tümör                                     |
| GM- CSF | : Granulosit- makrofaj koloni stimule edici faktör                   |
| GTP     | : Guanidin trifosfat                                                 |
| GVHH    | : Graft Versus Host Hastalığı                                        |
| HTERT   | : The human telomerase reverse transcriptase                         |
| HU      | : Hidroksiüre                                                        |
| HY      | : Hematolojik yanıt                                                  |
| IFN     | : İnterferon                                                         |
| IL      | : İnterlökin                                                         |
| IRIS    | : International Randomized Study of Interferon and STI571            |
| ISGF3   | : İnterferon stimulated gen factor3                                  |
| JKN     | : c-JUN N-terminal kinase                                            |
| KML     | : Kronik myeloid lösemi                                              |
| KMML    | : Kronik Myelomonositik Lösemi                                       |
| LIF     | : Leukemia inhibitory factor                                         |
| MAPK    | : Mitojen actived protein kinase                                     |
| M-bcr   | : Major breakpoint cluster region                                    |
| m-bcr   | : Minör breakpoint cluster region                                    |
| MDACC   | : MD Anderson Cancer Center                                          |
| MDS     | : Myelodisplastik sendromlar                                         |
| MMY     | : Major moleküler yanıt                                              |
| MPN     | : Myeloproliferatif neoplaziler                                      |
| MPN     | : Myeloproliferatif neoplazi                                         |
| MRNA    | : Messenger RNA                                                      |
| MTOR    | : Mammalian target of rapamycin                                      |
| MY      | : Moleküler yanıt                                                    |
| Myc     | : Myelositomatozis                                                   |
| ODN     | : Antisense oligonucleotids                                          |
| PACE    | : Ponatinib Ph+ ALL and CML Evaluation                               |
| PDGF    | : Platelet derived growth factor – trombosit kaynaklı büyüme faktörü |
| Ph      | : Philadelphia kromozomu                                             |
| PI3K    | : Fosfatidil Inositol 3 Kinaz                                        |

|          |                                                                                  |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------|
| PIAS     | : Protein inhibitors of activated STATs- aktive STAT'ların protein inhibitörleri |
| PV       | : Polisitemi vera                                                                |
| RT- PCR  | : Ters transkriptaz polimerize zincir reaksiyonu                                 |
| RT-Q-PCR | : Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction                               |
| SAPK     | : Stres activated protein kinase                                                 |
| SFK      | : SRC family of protein tyrosine kinase                                          |
| SOCS     | : Suppresors of cytokin signaling- sitokin sinyalleşme supresörleri              |
| START-C  | : Src/Abl Tirozin Kinaz Inhibition Activity Research Trial C                     |
| STAT     | : Signal Transducers and Activators of Transcription                             |
| SY       | : Sitogenetik yanıt                                                              |
| TBI      | : Total Body Irradiation                                                         |
| THY      | : Tam hematolojik yanıt                                                          |
| TKI      | : Tirozin Kinaz İnhibitörü                                                       |
| TOPS     | : Tirozin Kinaz Inhibitor Optimization and Selectivity                           |
| WHO      | : World Health Organisation                                                      |

## **TABLolar ve ŞEKİLLER DİZİNİ**

- Şekil 1. Philadelphia kromozomunun Şematik görünümü
- Şekil 2. Bcr ve Abl genlerindeki kırılma noktaları ve Bcr/Abl füzyon proteinleri
- Şekil 3. Lösemik proliferasyon
- Şekil 4. Tirozin kinaz inhibitörlerine dirençte ortak mekanizmalar
- Şekil 5. Mitojenik sinyal yolakları
- Şekil 6. JAK/STAT Sinyal İletim Yolağı
- Şekil 7. Cell Death Detection ELISA Kit
- Şekil 8. STAT5A ve STAT5B hedef genlerinin m(RNA) kopya sayılarını belirlemede kullanılacak olan G6PDH referans geninin standart eğrisi
- Şekil 9. STAT5A ve STAT5B protein düzeylerinin WesternBreeze® Chromogenic Kit– Anti-Rabbit” kit ile değerlendirilmesi
- Tablo 1. Akselere Faz Kriterleri
- Tablo 2. Blastik Faz Tanı Kriterleri
- Tablo 3. KML Risk Skorlamaları
- Tablo 4. Kronik evre KML tedavisinde birinci, ikinci ve daha sonraki basamaklardaki tedavi  nerileri
- Tablo 5. Hızlanmış Evre ve Blastik Evre KML hastalarında tedavi  nerileri
- Tablo 6. Birinci kuşak TKI (herhangi bir TKI) tedavisine yanıt tanımları
- Tablo7. İmatinibe yanıtız durumda ikinci kuşak tedaviye yanıt tanımları
- Tablo 8. İmatinib direnç mekanizmaları
- Tablo 9. TKI’lerine direnç ile ilişkili mutasyonlar
- Tablo 10. İkinci kuşak TKI’lerinde mutasyonlara duyarlılık durumları
- Tablo11. İkinci kuşak TKI seçimi
- Tablo 12. Kronik Miyeloid Lösemide Allojenik Hematopoetik Kök Hücre Nakli EBMT Risk Skoru
- Tablo 13. Kronik Miyeloid Lösemide Allojenik Hematopoetik Kök Hücre Nakli Endikasyonları
- Tablo 14. Tirozin kinaz inhibitörleri
- Tablo 15. PVDF membranlar için çözelti hazırlama

- Resim 1. FISH tekniği kullanılarak saptanan bcr/abl kromozomu pozitifliği saptanan metafazdaki hücreler
- Resim 2. Periferik kan: granülositlerde sola kayma ile belirgin lökositoz
- Resim 3. Bir adet küçük,hipolobüle megakaryosit,kemik iliği aspiratı.
- Resim 4. Dasatinib ile kompleks yapan ABL kinaz bölgesinin kristal yapısı
- Grafik 1. KML hücre hattı K562 için dasatinibin IC50 dozu
- Grafik 2a. STAT5A gen ekspresyonunun zamana bağlı değişimi.
- Grafik 2b. STAT5B gen ekspresyonunun zamana bağlı değişimi
- Grafik 3. KML-K562 hücre modelinde dasatinib uygulaması sonrası STAT5A gen ekspresyonları
- Grafik 4. KML-K562 hücre modelinde dasatinib uygulaması sonrası STAT5B gen ekspresyonları
- Grafik 5. Dasatinib uygulanmış ve uygulanmamış KML-K562 hücrelerinin apoptoz analizleri

## ÖZET

### **Dasatinib ile İndüklenmiş KML Hücre Dizisi(K562) Apoptozunun JAK-STAT Yolağı Üzerine Etkisinin Araştırılması**

Dr. Ceyda Tunakan Dalgıç

Ege Üniversitesi Tıp fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Bornova/ İZMİR

**ANAHTAR KELİMELEER:** STAT, Dasatinib, KML, Apoptoz

**AMAÇ :** JAK/STAT sinyal yolağında görevli STAT5A ve S5B genleri sinyal iletiminde ve malinite de ekspresyonu artan genlerin aktivasyonunda görevli nükleer transkripsiyon faktörleridir ve hematolojik hastalıklarda aktifleşerek lösemi gelişiminde rol alırlar. Dasatinib, BCR-ABL, SRC ailesi (SRC, LCK, YES, FYN),c-KIT,EPHA2 ve PDGFR kinazları inhibe ederek ve SRC kinaz ailesini (LYN, HCK) kapsayan iletim yollarını aktive ederek, BCR-ABL kinaz bölgesi mutasyonlarının ve MDR geninin fazla eksprese olmasından kaynaklanan imatinib direncini kırar. Bu çalışmanın amacı, potansiyel hedef olan JAK/STAT yolağı elemanlarından STAT5A ve STAT5B'nin dasatinib uygulaması sonrasında mRNA düzeyindeki transkripsiyon değişimini ve lösemi hücrelerinin apoptotik durumunu KML hücre modeli K-562 hücreleri üzerinden incelemektir.

**YÖNTEM-GEREÇ:** Dasatinib' in K-562 hücreleri üzerinde sitotoksik etki oluşturduğu IC<sub>50</sub> dozu XTT yöntemiyle belirlenmiş, belirlenen doz uygulandıktan 24-96. saatler için hücrelerin apoptotik durumu “Cell Death Detection kit” ile spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. Hedef genlerin ekspresyon seviyeleri dasatinib uygulamasını takiben eş zamanlı olarak qRT-PCR ile saptanmıştır. Protein ekspresyon analizleri ‘WesternBreeze Chromogenic Kit-Anti-Rabbit’ kitin uygulama esaslarına dayanarak western blot analizi ile belirlenmiştir.İstatistik analizler GraphPad prism metodu ile anlamlılık düzeyi p<0.05 kullanılarak değerlendirilmiştir.

**BULGULAR:** Dasatinib' in  $IC_{50}$  dozu, 48. saat için 3.3 nM olarak belirlenmiştir. Dasatinib uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerin apoptotik durumu kıyaslandığında; muamele grubu hücrelerde 96. saatte 4.5 katlık anlamlı bir apoptoz indüksiyonu saptanmıştır ( $p<0.0001$ ). Hedef genlere ait mRNA ekspresyon seviyeleri kıyaslandığında, STAT5A ekspresyonu 96. saatte 1.5 katlık (%33.2 oranında) anlamlı bir azalma sergilemişken ( $p=0.02$ ); aynı saatte STAT5B ekspresyonunda, 4.47 katlık (%77.6 oranında) azalma belirlenmiştir ( $p<0.001$ ). STAT5A ve STAT5B protein ekspresyon seviyeleri 96.saatte anlamlı olarak baskılanmıştır ve bu sonuçlar mRNA ekspresyon sonuçları ile korele saptanmıştır.

**SONUÇ:** Dasatinib ile indüklenmiş lösemi hücre apoptozunun olası nedenlerinden biri de, JAK/STAT sinyal yolağı elemanlarından; transkripsiyon faktörü olan ve lösemide artmış ekspresyon sergileyen STAT5A ve -5B ekspresyon seviyelerinin anlamlı derecede azalmış olması olabilir. Bu nedenle STAT5A ve S5B, KML patogenezinin aydınlatılmasında önemli birer terapötik moleküler hedef durumundadır.

## ABSTRACT

### Investigating The Role of JAK/STAT Pathway upon Dasatinib Induced Apoptosis for CML Cell Model K562

Dr. Ceyda Tunakan Dalgıç

Ege University Faculty of Medicine Department of Internal Medicine Bornova / IZMİR

**KEY WORDS:** STAT, Dasatinib, CML, Apoptosis

**AIM:** :STAT5A and STAT5B genes; members of JAK-STAT signaling pathway; are nuclear transcription factors that are responsible for activating the genes that exhibit increased expression in hematological malignancies and signal transduction. Dasatinib prevents the gained imatinib resistance, responsible for MDR genes' overexpression and BCR-ABL kinase region mutations by activating signalling ways of SRC kinase family (LYN, HCK) and by inhibiting BCR-ABL, SRC kinase family (SRC, LCK, YES, FYN),c-KIT,EPHA2,PDGFR kinases.

The aim of this study is to investigate the apoptotic case of leukemic cells and to evaluate the transcriptional changes of STAT5A and STAT5B that are the members of JAK-STAT pathway following dasatinib treatment on CML model cell line K562.

**METHODS:** The cytotoxic effective dose  $IC_{50}$  of dasatinib upon K562 cells was determined via XTT method. The apoptotic case of the cells was assessed spectrophotometrically by 'Cell Death Detecton Kit' after applying of  $IC_{50}$  dose between 24–96 hours. Target genes' expression levels were also determined by real time qRT-PCR following dasatinib treatment for the same time interval. Protein expression analyses were performed by Western Blot analysis according to 'WesternBreeze Chromogenic Kit-Anti-Rabbit' kit manuel instructions. Statistical analyses were done by GraphPad prism software with a significance of  $p<0.05$

**RESULTS:** The  $IC_{50}$  dose of dasatinib was determined as 3.3 nM for 48<sup>th</sup> hour. When we compared the apoptosis rate of dasatinib treated/untreated cells'; a 4.5 fold apoptosis

induction was assessed at 96<sup>th</sup> hour in dasatinib applied group ( $p < 0.0001$ ). When we compared target genes' mRNA expression levels, while STAT5A expression was decreased 1.5 fold (by %33.2 inhibition) at 96<sup>th</sup> hour ( $p = 0.02$ ), STAT5B exhibited a 4.47 fold downregulation (by %77.6 inhibition) for the same hour ( $p < 0.001$ ). STAT5A and STAT5B protein expression levels were significantly suppressed at 96<sup>th</sup> hour and these protein expression results were in the same line with mRNA expression results.

**CONCLUSION:** One possible reason of dasatinib induced leukemic cell apoptosis might be due to significant decrease in STAT5A and STAT5B expression levels that are transcription factors and exhibit upregulated expression in leukemia. Therefore, STAT5A and STAT5B are important molecular targets in the research of CML pathogenesis.

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ:

KML; malign hematopoetik pluripotent kök hücrenin klonal proliferasyonu ile karakterize bir hastalık olup, vakaların %95'inde Ph kromozomu (9,22)(q34;q11) translokasyonu sonucu oluşan füzyon transkripti Bcr/Abl lösemik fenotipin gelişmesinden sorumludur. Bu füzyon gen; kontrolsüz tirozin kinaz enzim aktivitesi gösteren Bcr/Abl proteinini kodlar. 22 kromozomdaki ( q11 bölgesi) BCR (breakpoint cluster region) geni parçası kromozom 9 daki (q34 bölgesi) ABL (Abelson) geni ile birleşir.sonuçta oluşan resiprokal translokasyon,elonge kromozom 9 ve kısalmış kromozom 22 ile sonuçlanan Ph kromozomu oluşur.

BCR-ABL proteini IL 3 beta ( c) reseptör subuniti ile etkileşir. BCR-ABL transkripti sürekli aktiftir ve diğer hücrel mesajcı proteinler tarafından aktivasyona ihtiyaç duymaz. BCR-ABL proteinin protein kaskadlarını aktive eder, hücre döngüsünü kontrol eder,DNA tamirini inhibe eder.

Tirozin kinaz inhibitörleri,ilk keşfedilen imatinib mesilat , BCR-ABL proteinini inhibe eder.

Bcr/Abl'de Abl kısmının Src-homolog 1 (SH1) bölümü ATP'nin bağlandığı kısım olduğundan malign transformasyonda ana role sahip, öncelikli moleküler hedeftir. İmatinib; Abl tirozin kinaz üzerindeki ATP bağlanma bölgesini bloke ederek, substrat proteinlerin fosforilasyonunu ve lösemik gelişimi indükleyen sinyal ileti yollarının aktivasyonunu engeller.

Hematopoietik hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında sitokinler reseptörlerine bağlanır ve downstream kaskadları aktive ederler, Bu reseptörlerin en büyük özelliği, kendilerine ait "reseptör tirozin kinaz" aktivitelerinin bulunmaması ve diğer tirozin kinazları kullanmalarıdır. *Src* ya da *Jak* grubu tirozin kinaz aktivasyonu gerçekleşir . Jak aktivasyonunu takiben STAT fosforilasyonu gerçekleşir ve homoheterodimer formunu alan STATlar nükleusa göç edip, DNA'ya bağlanır ve gen aktivasyonunu başlatır. Normal hematopoez, sitokinlerin ve reseptörlerin önemli rol oynadığı bir dizi sinyal yolağına sahiptir. Bu yolaklarda ortaya çıkabilecek anormallikler, malign transformasyon, azalmış apoptozis ve kontrolsüz proliferasyonla sonuçlanmaktadır. Bu nedenle sinyal ileti sistemleri, lösemi tedavisinde uygun bir hedef haline gelmiştir.

JAK-STAT yolağı hücre dışındaki kimyasal sinyalleri,hücre membranından ileterek hücre çekirdeğinde DNA üzerindeki gen promotorlarına iletir.bu durum da DNA transkripsiyonu ve hücre aktifleşmesiyle sonuçlanır.

JAK-STAT sistemi üç komponentten oluşur. Bunlar; 1.Reseptör 2.Janus Kinaz(JAK) 3. Signal Transducer and Activator of Transcription ( STAT )

JAK-STAT sistemi reseptörü interferon,interlökin,büyüme faktörleri ve diğer kimyasal sinyaller tarafından uyarılır.bu uyarı JAK kinaz fonksiyonunu aktive eder,kendini otofosforile eder.JAK tirozin kinaz aktivitesi içerir, tirozin rezidülerinin fosforile eder,fosfotirozin bağlayıcı SH2 domaini içeren proteinlerle etkileşim için alanlar oluşturur.Bu SH2 domainleri STAT bağlanma alanları oluşturur.

STAT proteinin fosforile reseptöre bağlanır,JAK tarafından STAT da fosforile olur, ve bir diğer fosforile STAT proteinine bağlanır ( dimer oluşturur) ve hücre nükleusuna transloke olur.Nükleusta DNA ve gen transkripsiyonunu uyarır.STAT lar ayrıca reseptör tirozin kinazlar tarafından direkt olarak fosforile olabilir,EGF reseptöründe olduğu gibi, veya non-reseptör tirozin kinazlar tarafından fosforile olabilir, c-SRC kinaz da olduğu gibi.

JAK/STAT,Raf/MEK/Erk, PI3K/Akt; lösemik gelişimi indüklemedeki rolleri, hücre siklusunu düzenleme ve apoptozdaki önemleri belirlenmiş olan başlıca sinyal ileti yolaklarıdır. Bcr/Abl füzyon geni sonucunda tirozin kinaz aktivitesi ile Ras,Raf, PI3K, JNK/SAPK, Crkl ve bu çalışmada esas üzerinde durulacak olan Stat 5 aktivasyonu ile, apoptozis inhibe olmakta ve proliferasyon uyarılmaktadır.

Memeli hücrelerinde yedi STAT proteini tanımlanmıştır. Bunlar; STAT1,STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b ve STAT6 olarak adlandırılmaktadır. STAT5 aktivitesinin kontrolsüz işleyişi malign transformasyonda rol oynamaktadır. STAT proteinleri iki mekanizma aracılığıyla karsinogenezde etkili olur. Bunlardan biri STAT'ın sürekli aktivasyonudur. Diğer değişim ise proteinin c-ucunun mutasyona uğramasıdır.

Devamlı olarak aktif olan STAT proteini antiapoptotik yolları uyararak malign süreçte etkili olabilir. IL-6 ile devamlı STAT aracılı sinyal iletimi ile uyarılan hedef genlerin (örneğin; c-myc, siklin D1 ve Bcl-xL) hücre döngüsünün kontrolünü sağlayarak ve/veya apoptozisi önleyerek karsinogenez sürecinde etkili oldukları öne sürülmektedir. Ayrıca, STAT aracılı sinyal iletiminin malign sürecin gelişiminde MAP kinaz yolunun

aktivasyonu ile etkileşebileceği düşünülmektedir. Bcr-Abl kimerik proteini hematopoietik hücrelerde büyüme faktöründen bağımsız olarak çoğalma ve transformasyonu indükler. Bu onkoprotein JAK/STAT yolunun sürekli aktif olmasına yol açar. İmatinib mesilat ile tetiklenen apoptozis STAT5 aktivitesinin inhibisyonu ve Bcl-xL ekspresyonunun azalması ile korelasyon göstermiştir. Buna göre, Bcr-Abl ile ilişkili apoptozis direncinde STAT5 aktivitesinin rolü vardır.

İmatinib; erken evre KML ve ilacı “first line” tedavi olarak kullananların %75’inde komplet sitogenetik yanıt sağlarken, ileri faz KML ve Ph(+) ALL’de tedaviye refrakterlik daha sıktır ve indüklediği remisyonlar erken relapslarla sonuçlanarak kısa ömürlü olmaya meyillidir. Abl kinaz domain’indeki nokta mutasyonlar, Bcr/Abl gen ampfikasyonu, Bcr/Abl m(RNA) overekspresyonu ve P-glikoprotein aracılığıyla ilacın hücre dışına fazla atılımı gibi mekanizmalar, Bcr/Abl’nin reaktivasyonuna yol açarak bu duruma neden olur. Bu durum imatinib direnci olarak karşımıza çıkmaktadır.

İmatinib direnci mekanizmaları;

#### 1. Bcr-Abl bağımlı direnç mekanizmaları

Bcr-Abl duplikasyonu , Bcr-Abl mutasyonu , T315I mutasyonu ve P-loop mutasyondur.

#### 2. Bcr-Abl bağımsız direnç mekanizmaları

P-glikoproteinler tarafından oluşturulan ilaç effluxu(dışarı atımı) ,organik katyon transporter 1 tarafından yapılan ilaç alımı ve alternatif sinyal yolağı aktivasyonudur.

KML şu an TKİ ( tirozin kinaz inhibitörleri) ile tedavi edilmektedir .Bu direnci yenmek için ikinci kuşak tirozin kinaz inhibitörleri geliştirilmiştir. FDA tarafından onaylanan dört tane —ikinci-jenerasyon TKİ vardır. Bu ilaçlar; imatinib (Glivec,2001), dasatinib (Sprycel), ponatinib (Iclusig) ve bosutinib (Bosulif) dir. Bu ilaçlar %95 e varan oranlarda uzun dönem survey sağlamaktadırlar.

Dasatinib, BMS-345825 ,oral kullanılabilen bir multi-BCR-ABL ve SRC tirozin kinaz ailesi inihibitorüdür. KML de( imatinib tedavisi sonrasında) ve Ph kromozom pozitif ALL de kullanımı onaylanmıştır. Bu ilaçlar BCR-ABL tirozin kinaza farklı

mekanizmalarla bağlanır ve daha kolay tutunurlar ve bu nedenle İmatinab mesilat tedavisine dirençli birçok hastada etkili olurlar.

Dasatinib Src kinaz ailesi inhibitörü olduğundan Src kinaz aktivasyonu ile ilişkili direncin üstesinden gelebilir.BCR-ABL ye imatinib ile aynı konformasyonda bağlanmadığından T315I mutasyonu haricindeki tüm BCR-ABL mutasyonlarını inhibe edebilir.ayrıca dasatinib,imatinib gibi çoklu ilaç p-glikoprotein efflux pompası için substrat değildir.bu nedenle imatinib ve nilotinib kullanımı ile başarı sağlanamayan hastalarda etkili olabilir.

Dasatinib nanomolar konsantrasyonlarda belirtilen kinazları inhibe etmektedir:BCR-ABL,Src ailesi( SRC,LCK,YES,FYN),c-KIT,EPHA2 ve PDGFR Çalışmalarda dasatinibin ,ABL kinazın multiple konformasyonuna bağlanabileceği ön görülmüştür.Çalışmalara göre,dasatinib,Src kinaz ailesini (LYN,HCK) kapsayan alternatif yolları aktive ederek, BCR-ABL kinaz bölgesi mutasyonlarının ve multi-drug rezistans geninin fazla exprese olmasından kaynaklanan imatinib direncinin üstesinden gelmektedir.Dasatinibin,JAK kinazsinyal yolağı üzerinden etkisi daha önce gösterilmemiştir. Bizim çalışmamızda hedeflenen ;Dasatinibin KML (K562) hücre hattında JAK-STAT yolağı üzerinden apoptozise etkisinin araştırılmasıdır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### KRONİK MYELOİD LÖSEMİ

#### 2.1. Tanım,Etyoloji,Epidemiyoloji:

Kronik Myeloid Lösemi (KML); olgunlaşmakta olan ve olgun granülositlerin, diferensiasyonları normal kalmak şartıyla düzensiz üretimi ve kontrolsüz proliferasyonu ile karakterize myeloproliferatif bir hastalıktır (1). KML; 2008 WHO sınıflamasına göre; Polisitemia Vera, Esansiyel Trombositoz, Primer Myelofibroz, Kronik Nötrofilik Lösemi, Kronik Eozinofilik Lösemi ve Mast Hücre Hastalığı ile birlikte “Klasik Myeloproliferatif Neoplaziler ” arasında yer alır (2).

#### Myeloid Neoplazilerde 2008 WHO Sınıflaması

1. Akut myeloid lösemi
2. Myelodisplastik sendromlar (MDS)
3. **Myeloproliferatif neoplaziler (MPN)**
  - 3.1 Kronik myeloid lösemi, BCR-ABL pozitif KML
  - 3.2 Polisitemia vera
  - 3.3 Esansiyel trombositemi
  - 3.4 Primer myelofibrozis
  - 3.5 Kronik nötrofilik lösemi
  - 3.6 Kronik eozinofilik lösemi, başka yerde sınıflanmamış
  - 3.7 Hipereozinofilik sendrom
  - 3.8 Mast hücreli lösemi
  - 3.9 MPH, sınıflandırılmamış
4. MDS/MPN
  - 4.1 Kronik myelomonositik lösemi
  - 4.2 Juvenil myelomonositik lösemi
  - 4.3 Atipik kronik myeloid lösemi, BCR-ABL negatif KML
  - 4.4 MDS/MPH, sınıflandırılmamış
5. Eozinofili ve PDGFRA, PDGFRB, veya FGFR1 anormalliği ile ilişkili myeloid maligniteler

KML; erişkin lösemilerinin yaklaşık % 15-20’ sini oluşturur. Yıllık insidansı 100.000’ de 1-2 olup, erkeklerde kadınlara göre biraz daha fazladır (1,3 / 1). En sık

yaşamın 5 ve 6. dekatlarında görülmekte olup, medyan görülme yaşı 53' tür. KML insidansı yaşla birlikte artış gösterir. Hastaların % 30 kadarı 60 yaş ve üzerinde olup, % 10 kadarı 20 yaş ve altındadır (çocuklarda daha da az- %3) (3).

Tek ve iyi tanımlanmış risk faktörü iyanize radyasyona maruziyettir,örneğin Hiroşima ve Nagazaki'deki atom bombası patlaması sonrası görülme sıklığı artmıştır.(7) . Hastalık gelişme riskinin maruziyetten sonraki 5-12. yıl arasında pik yaptığı gözlenmiştir.

Lösemi ayrıca gebelik ile az ilişkilidir,10000 de 1 gebe kadını etkilemektedir.(8,9)

Genellikle etyolojide suçlanmış bir ajan yoktur ve vakaların çoğu sporadik vakalar şeklindedir. Bilinen ailesel predispozisyon olmayıp, alkilleyici ajanlar gibi sitotoksik ilaçlara maruz kalma ile net bir ilişkisi bulunamamıştır ve viral bir etyolojinin direkt kanıtı yoktur. Sigaranın blastik krize ilerlemeyi hızlandırdığı ve KML'de sağkalım üzerine olumsuz etkisi olduğu gösterilmiştir.(4)

Abl1 kinaz inhibitörlerinin sağkalım üzerindeki dramatik etkisiyle, batılı ülkelerde KML prevalansı düzenli olarak artmaktadır. 2009 yılı verilerine göre ABD' de 22.475 KML hastası bulunmakta olup, bu sayının 2040 yılında > 250.000 olacağı tahmin edilmektedir (5).

KML klinik olarak kemik iliğinde myeloid serinin aşırı proliferasyonu ile karakterizedir. Karakteristik olarak klinik evreleri bifazik veya trifazik olup çoğu hasta kronik fazda başvurmaktadır. Bu faz 3-6 yıl sürmekte ve hastalık doğal seyri sonucunda daha ilerlemiş fazlar olan akselere veya blastik faza progrese olmaktadır (6).

Hastalar tanı anında genellikle asemptomatiktir,laboratuvar testlerinde tesadüfen saptanan yükselmiş lökosit sayısı ile başvururlar.bu durumda KML lökomoid reaksiyondan ayrılmalıdır.KML semptomları, splenomegali,sol üst kadran ağrısı,halsizlik ,eklem ve kalça ağrıları,hafif dereceli ateş,enfeksiyonlara yatkınlık,anemi,trombositopeni veya trombositozdur.(10,11)

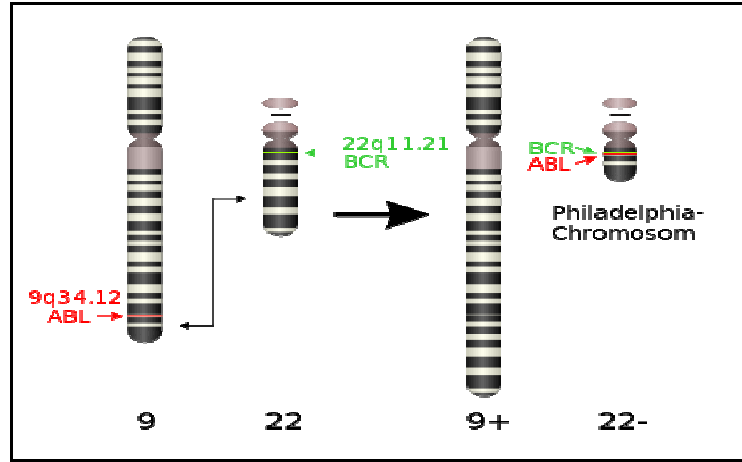
## **2.2.Patogenezi:**

KML; spesifik kromozomal anomalinin saptandığı ilk hastalık olup, bu nedenle ve tipik klinik gelişimi nedeniyle, moleküler düzeyde en iyi tanımlanmış lösemi tipidir.

Bu kromozomal anomali 1960 yılında iki bilim adamı; Pennsylvania Üniversitesi'nden Peter Nowell ve Fox Chase Kanseri Merkezi'nden David Hungerford tarafından ilk kez keşfedilmiş ve tarif edilmiştir.(13)

Kromozom bantlama yöntemlerinin gelişmesi ile 1973 yılında Dr. Janet Rowley tarafından kromozom 9'daki Abl protoonkogeninin 22.kromozomdaki Bcr geni yakınına resiprokal translokasyonu gösterilmiştir; t(9;22)(q34;q11).Bu yeni belirleyici keşfedildiği şehrin onuruna Philedelphia kromozomu (Ph) olarak adlandırılmıştır (7).(12)

Bu translokasyon KML hastalarında %95 sensitiftir,fakat spesifik değildir çünkü eriksin ALL hastalarının %25-30 unda ve pediatrik ALL hastalarının %2-10 unda ve bazı AML hastalarında Ph kromozomu pozitifdir.(14)



Şekil 1.Philadelphia kromozomunun şematik görünümü

## 2.2.1.KML Moleküler Genetiği:

### 2.2.1.1. c-ABL Onkogeni:

Abl geni, Abelson Mürin Lösemi Virüsünün ( A-MuLV ) transformasyon geni olan v-abl onkogeninin insandaki homologudur. Tirozin kinaz protoonkogenlerinin Src ailesine üyedir. 9q34.1'de lokalize olan c-abl geni, 230 kb uzunluğunda olup, 11 ekson içermektedir. (15)

Normal Abl proteini, çekirdekte, hücre siklusunun G1 fazında tutulmasını sağlayarak hücre büyümesinin negatif düzenleyicisi olarak rol alır. Ayrıca hücrelerin genotoksik ve oksidatif stres ortamına verdiği cevabı, p53 ya da bunun fonksiyonel homoloğu olan p73 aracılığıyla apoptozisi indükleyerek kontrol eder.

Sitoplazmik Abl ise integrin ve PDGF (platelet-derived growth factor) sinyalizasyonunda rol alır (16)

#### 2.2.1.2. BCR Geni ve Proteini:

KML'deki kromozomal kırılma noktaları ilk kez 1984 yılında Prakash ve Yunis tarafından 22q11.21 ve 9q34.1 subbantlarında saptanmış olup, aynı yıl Groffen ve ark. 21 KML hastasının 19'unun DNA'sında 22.kromozomun kırık noktasının 5,8 kb'lık bir bölgeye sınırlı olduğunu göstermişlerdir. Ph(+) KML'ye spesifik kromozomal kırık bölgesi olarak tanımladıkları bu bölgeye **“breakpoint cluster region- bcr”** adını vermişlerdir (17)

Sonraki yıllarda moleküler yapısı daha ayrıntılı olarak ortaya konulan Bcr geni, 1271 aminoasitten oluşmakta olup, 23 ekson içermektedir.

Gen ürünü olan protein 160kd ağırlığında olup, birkaç işlevsel bölgeye sahiptir ve p160<sup>bcr</sup> olarak adlandırılır.

BCR serin/threonin kinaz aktivitesi gösteren **“coiled-coil” bölgesi** içerir. Bu bölge Bcr'nin otofosforilasyonunu ve BAP-1'in (Bcr-associated protein-1) fosforilasyonunu sağlar (18,19)

Bcr'deki **Rho-GEF bölgesi** ; Rho proteinleri için guanidin exchange faktörü olarak (GEF) fonksiyon görmektedir. G proteinlerinde guanidin trifosfat'ın (GTP) guanidin difosfat'a (GDP) dönüşümünü sağlayarak transkripsiyon faktörlerinin ve kinaz aktivasyonunun uyarılmasına neden olmaktadır (20)

Bcr'nin C-terminal ucu ise, Rac ve Cdc42 proteinleri için GTPaz-aktive edici protein (GAP) fonksiyonu olan bir bölgeye sahiptir. **GAP bölgesi** GTP hidrolizini uyararak, merkezi Rho-GEF bölgesinin aksine, tirozin kinaz aktivitesinin inhibisyonuna neden olur.(21)

### 2.2.1.3. Bcr-Abl Füzyon Geni , Füzyon Proteini:

9q34 kromozomunda yer alan Abl geninde kırılma noktası, 300 kD'luk bir bölgenin 5' ucundaki herhangi bir kısmında meydana gelebilir. Kırılma noktalarının sabit olduğu Abl geninin aksine Bcr geni üzerindeki kırılmalar farklı noktalarda oluşabilir ve başlıca üç tanımlanmış bölgede yer alır.

KML'li hastaların %95'inde ve ALL hastalarının yaklaşık 1/3'ünde Bcr genindeki kırılma, **M-bcr (major breakpoint cluster region)** olarak adlandırılan 5,8 kb'luk gen bölgesi üzerinde olur. M-bcr bölgesinde tarihsel olarak b1'den b5'e kadar ifade edilen ancak güncel olarak e12-e16 olarak adlandırılan 5 ekson bulunur.

M-bcr'ye ait ekson 13 (b2) ile Abl'ye ait ekson 2 (a2)'nin birleşmesi (b2a2) ve/veya M-bcr'ye ait ekson 14 (b3) ile Abl'ye ait ekson 2 (a2)'nin birleşmesi (b3a2) sonucu ortaya çıkan füzyon m(RNA) 8,5 kb uzunluğundadır ve 210 kd. ağırlığında füzyon proteinini kodlar (15,16). Bu protein ürünü, normal Abl proteinin tirozin kinaz katalitik aktivitesinden enzimatik bir bölüm içerir. Normalde Abl için sıkı bir şekilde düzenlenmiş olan tirozin kinaz aktivitesi, Bcr dizisi eklendiğinde kontrolsüz hale geçer. Bcr'nin eklenmesiyle ayrıca Abl'nin DNA proteini bağlama aktivitesi ve sito iskeletsel aktin mikrofilamentlerine bağlanması da artmaktadır. Kontrolsüz tirozin kinaz aktivitesi KML'nin patogenezinde temel rolü oluşturur (22,4,23)

KML'li olguların % 90'ında, erişkin yaş ALL olgularının % 25-30'unda, çocukluk çağı ALL'ler ve AML olgularının %6'sında t(9,22)(q34.1,q11.7) translokasyonu saptanmaktadır(6).

Üç önemli klinik varyantı mevcuttur.Bunlar; p190,p210 ve p230 isoformlarıdır.

p190 ALL ile ilişkili,p210 genellikle KML ile ilişkili,bazen ALL ile ilişkili, p230 ise kronik nötrofilik lösemi ile ilişkilidir. (24)

BCR-ABL tarafından kodlanan mutant tirozin kinaz sürekli aktive olan bir protein ile sonuçlanır ,bu durum kontrolsüz hücre bölünmesi(kanser) ne sebep olur.

Tirozin kinaz inhibitörleri KML,renal hücreli karsinom(RCC) VE gastrointestinal stromal tümör (GİST) gibi kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır.(25)

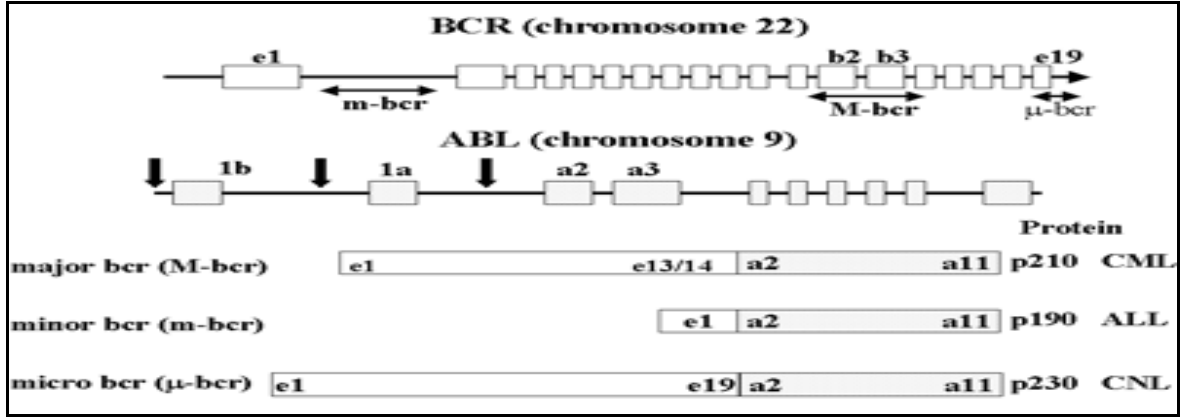
BCR-ABL proteini IL-3 reseptör beta subüniti ile etkileşir. ABL nin hücre döngüsü kontrol proteinleri ve enzimlerinin aktive etme özelliğinde kaynaklı olarak füzyon proteini BCR-ABL, hızlanmış hücre bölünmesi, DNA tamirinin inhibisyonu, genomik instabilite ve KML de görülen blastik kriz ile ilgilidir.(25)

### **Diğer Kırılma Noktaları ve Füzyon Proteinleri**

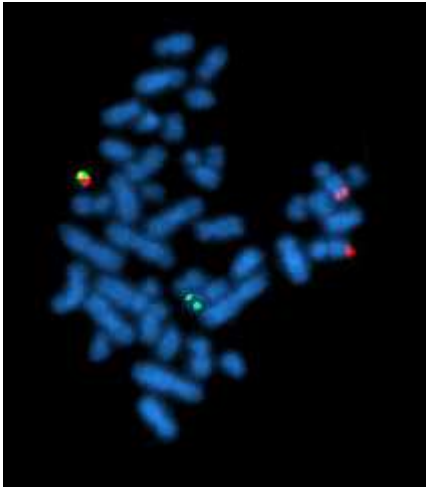
Ph(+) ALL’li erişkinlerin %50’sinde, çocukların %80’inde ve nadiren KML ve AML vakalarında Bcr’deki kırılma, M-bcr’nin 5’ ucunda yer alan **m-bcr (minör breakpoint cluster region)** olarak adlandırılan bölgede oluşur. “m-bcr” geninin ilk eksonu (e1) ile Abl’nin ekson 2 (a2)’si arasındaki translokasyon sonucu oluşan (e1a2) füzyon proteini 190 kd ağırlığında olup, p210<sup>bcr/abl</sup>’ye göre daha fazla tirozin kinaz aktivitesine sahiptir ve daha çok akut lösemilerde gözlenir. P190<sup>bcr/abl</sup>’nin ALL’de baskın olarak görülmesi, myeloid öncüllerden çok lenfoid öncüllerdeki metabolik yolların seçici olarak bozulduğunu düşündürür. Nadiren p190<sup>bcr/abl</sup> saptanan kronik faz KML’lerin çoğunluğu KMML fenotipi göstermektedir (26)

Bcr geni üzerinde çok daha nadir gözlenen 3. kırılma bölgesi ilk defa 1990 yılında Saglio ve ark. tarafından gösterilen **μ-bcr (micro breakpoint cluster region)** bölgesidir. Buradaki kırık noktaları ekson 18 (c3) ve ekson 19 (c4) üzerinde bulunmakta olup, Abl geninin ekson 2 (a2) arasındaki füzyon sonucu (e19a2) 230 kd’luk p230<sup>bcr/abl</sup> füzyon proteini oluşur. Nötrofilik KML de denilen daha hafif ve yavaş seyirli KML formu ile birlikte olan bu füzyon proteini varlığında daha az splenomegali, daha nadir blastik transformasyon gözlenir.(27)

Son yıllarda daha nadir görülen başka **atipik bcr-abl transkriptleri** de rapor edilmiştir. (e13a2, e14a2, e1a2, e19a2, e6a2, e2a2, e8a2, e15a2, e1a3, e14a3 gibi). Bcr-abl füzyon tipleri ile lösemi fenotipi arasında kesin bir ilişki kurulamazken, bcr kısmının büyüklüğünün fenotipin akut yada kronik olmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir.(28,29)



**Şekil 2.** Bcr ve Abl genlerindeki kırılma noktaları ve Bcr/Abl füzyon proteinleri (www.cincinnatichildrens.org)



**Resim 1.** FISH tekniği kullanılarak saptanan bcr/abl kromozomu pozitifliği saptanan metafazdaki hücreler.

#### 2.2.1.4. Ph(-) KML ve Varyant Ph Patogenezi:

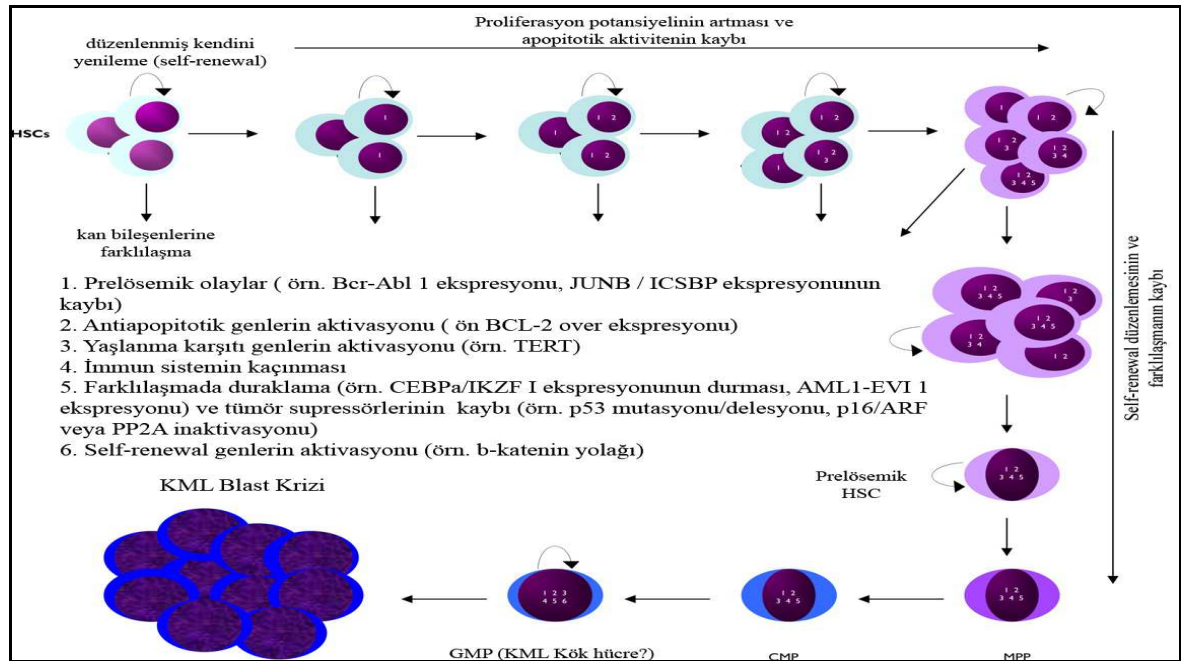
Ph kromozomu bulunan olguların %2-10'unda bir yada daha çok kromozomun olaya karıştığı kompleks translokasyonlar sonucu oluşan varyant Ph kromozomu yer alır. Varyant translokasyon 9q34 ve 22q11 dışında en sık 1p36, 3p21, 5q13, 6p21, 9q22, 11q13, 12p13, 17p13, 17q25, 19q13, 21q22, 22q12 ve 22q13 genomik bölgelerinde görülür. Y kromozomu hariç tüm kromozomların varyant Ph translokasyonlarının oluşumuna katıldığı rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalarda Ph yada varyant Ph kromozomu taşıyan KML hastalarında prognoz açısından bir farklılık görülmediği bildirilmektedir.(30)

KML'nin klinik özelliklerini gösteren bazı hastaların sitogenetik analizlerinde Ph kromozomu saptanmaz. Medical Research Council tarafından yapılan büyük bir prospektif çalışmada bu duruma hastaların yaklaşık %15'inde rastlanmaktadır .(31) Buna rağmen bu hastaların yarısında t(9,22) translokasyonunu maskeleyen kompleks kromozomal düzenlenmeler bulunmakta ve başka bir alt grupta ise karyotipik olarak Ph(-) iken metafaz/interfaz FISH analizleri ve RT/PCR ile Bcr/Abl füzyon geninin kanıtı saptanabilmektedir. Bu grupta yer alan Ph(-) hastaların klinik bulgular bakımından Ph(+) hastalardan belirgin bir farkı bulunmamaktadır.

Ancak hastaların yaklaşık 1/3'ünde Bcr/Abl füzyonunun hiçbir moleküler kanıtı bulunmaz. Bu gruptaki Ph(-) hastalar ise belirgin klinik farklılıklar göstermekte ve kısalmış sağkalım, tedaviye yanıtızsızlık, bazofili eksikliği ve sıklıkla trombositopeni ile birliktelik göstermektedir. Bu tablo KML'den daha çok myelodisplastik sendromlara benzer özellikler taşımaktadır.(32)

Hematologlar ve hematopatologlar arasında KML tanısı konulabilmesi için Bcr/Abl füzyon geni varlığının saptanması gerekliliği genel bir eğilim olmasına rağmen, WHO sınıflandırmasında bu hastalar atipik KML olarak yerlerini alırlar .(33)

## 2.2.2. KML 'nin Hücresel Biyolojisi ve BCR-ABL Aracılı Malign Transformasyon



Şekil 3. Lösemik proliferasyon. (www.bloodjournal.hematologylibrary.org)

### 2.2.2.1 Tirozin Kinaz Aktivitesi ve Kontrolü:

Bcr/Abl'nin fare kemik iliğine transplantasyonu ile alternatif lösemi modeli oluşturulur. Bu modeldeki alıcı farede KML benzeri myeloproliferatif hastalık ve Ph(+)ALL'ye benzer B lenfoid lösemi oluşması, bu hastalıklarda Bcr/Abl'nin esas neden olduğunu gösterir.(34,35)

Bcr/Abl transgeni ekilerek yapılan çalışmalarla, Bcr geçmişi olmayan farede, Bcr/Abl aracılı lenfoid lökomogenez gelişmesi, normal Bcr gen ürününe ihtiyaç olmadığını göstermektedir.(36,37)

Bcr/Abl'de SH1 kısmı onkogenik dönüşümde başlıca rolü oynamasından dolayı moleküler bir hedeftir. ATP, tirozin kinaz kısmına (SH1) bağlanır. Bu hedefe yönelik geliştirilen en başarılı sentetik inhibitör, ATP'ye bağlanarak etkiyen daha önceden STI571 (İsviçre, Novartis firması ürünü Glivec ya da Gleevec) isimlendirilen 2-fenilaminoprimidin, imatinib mesilat olmuştur. Direnç veya intolerans varlığında doğru ikincil kuşak tirozin kinaz inhibitörünü seçmek için BCR-ABL mutasyonları test edilmelidir.(38)

Yeni direnç şekilleri;ABL kinaz bölgesindeki missense mutasyonlar,BCR-ABL nin over-ekspresyonu,transmembran plazma proteinlerinin artmış üretimi,Src-kinaz ailesi gibi downstream yolların aktivasyonudur.ayrıca çoğu ilaç ATP'nin kompetitif inhibitörleridir.(39)

### 2.2.2.2 Lösemik Klonun Proliferasyonu:

Tanı anında hastaların %90-100'ünde Ph(+) kemik iliği metafazları saptanır. KML'li hastaların kemik iliklerinde normal kök hücreler varlığını sürdürür .(40) KML kemik iliğinde bir kök hücre hastalığıdır,olgun granülositlerin( nötrofil,eosinofil ve bazofiller) in çoğalması ile karakterizedir ve kemik iliğinde bunların prekürsörleri bulunmaktadır.(45)

Hastalığın erken evresinde tanı konulan bazı hastalarda rezidüel Ph(-) hematopoezis sergilenmektedir . (41)

KML'nin uzun bir latent periyoda sahip olduğu düşünülürse kemik iliğindeki Ph (+) hücre üstünlüğünün öneminin oldukça düşük olduğu anlaşılır.

KML'de, Ph(+) myeloid progenitörler, artmış proliferasyona da bağılı olarak, kemik iliğı ve kanda geniş bir alana yayılmışlardır .(42) KML'deki anormal füzyon proteini olan Bcr/Abl primer mitojenik aktiviteye sahiptir ve büyüme faktörlerinin yokluğunda bile hematopoetik hücre hatlarında, hücre siklusuna girişı stimüle edebilir.(43)

KML öncül hücreleri; kendini yenileme ve farklılaşma potansiyeli arasında farklılaşma lehine bozulan bir dengeye ve bozulmuş bir maturasyonla sonlanan bir anormalliğe sahiptir (44)

#### **2.2.2.3 Kendini Yenileme (Self-Renewal):**

Normal hematopoetik kök hücrelere kendini yenileme özelliğı sağlayan  $\beta$ -katenin fonksiyonunun artması KML'de hastalık progresyonunda Wnt yolağının aberan aktivasyonunun kilit bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Ek çalışmalar, Hedgehod sinyal yolağının da KML hücrelerine kendini yenileme özelliğı kazandırmada katkısı olduğunu ileri sürer. KML'nin akselere fazı ve blastik krizinde, kemik iliğı granülosit/makrofaj öncülleri in vitro olarak kendini yenileme özelliğı kazanırlar ve artmış ekspresyon, nükleer lokalizasyon ve  $\beta$ -katenin fonksiyonu sergilerler.(46,47,48)

#### **2.2.2.4 Apoptozise Direnç Ve Apoptoz İnhibisyonu:**

Normal hücrelerde **Bcl-xL**; pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin, Bax geninin ve Bak geninin fonksiyonlarını inhibe eder. DNA hasarı Bcl-xL'in non-enzimatik deamidasyonunu tetikler ve Bax/Bak aktivitesi üzerindeki kontrolünü azaltarak apoptozise neden olur. Ancak KML'li ve Polisitemia Vera'lı hastaların myeloid hücrelerinde Bcl-XL'in deamidasyon yolağı inhibe olmuştur ve bu durum DNA hasarına karşı kör bir apoptotik cevapla sonuçlanır .

Bcr/Abl'nin antiapoptotik aktivitesi halen iyi anlaşılamamıştır. Bcr/Abl, apoptozisi Mitokondiyal Sitokrom C salınımı ve kaspaz aktivasyonunun yukarı akışı ile bloke eder.(49,50)

#### 2.2.2.5 Hücresel Adezyonun Bozulması:

Primitif Ph(+) hematopoetik öncüller  $\beta$ -1 integrin fonksiyonundaki bir defekte bağlı olarak kemik iliği stromasına ve fibronektine azalmış yapışma özelliği gösterirler. İFN-alfa tedavisi, Bcr/Abl'ye karşı oluşturulmuş antisens oligodeoksinükleotidler ve Bcr/Abl'nin tirozin kinaz aktivitesinin inhibisyonu bu yapışma özelliğini artırır ve proliferasyonun adezyon-bağımlı inhibisyonunu normal şekliyle yeniden oluşturur.(51,52)

Bcr/Abl F-aktin proteinine bağlanır. Tirozin fosforilasyonunu ve sitoskeletsel yapı ile ilgili proteinlerin aktivasyonunu indükler. Bu yolların aktivasyonu integrinlerin hücre adezyonu ve morfolojisinin yanısıra, hücre siklusunun ilerlemesine, hücrenin yaşamının devamına ve gen ekspresyonunu etkilemesine neden olurlar. Bu grupta GTP-bağlayan protein Ras, adaptör protein Crkl ve p62Dok, iskelet proteinleri Hef-1 ve Cas, Cbl proto-onkoprotein ve fokal adezyon proteinleri olan Paxillin, Vinculin, Tensin ve fokal adezyon kinaz (FAK) bulunur.(53,54)

#### 2.2.2.6 Genetik İnstabilite :

KML'deki malign klon genetik olarak stabil değildir ve kronik fazdan blastik faza geçişte bazı genetik anormallikler kazanılır. Blastik fazda en yaygın görülen kromozomal değişiklikler, ikinci bir Ph kromozomu, kromozom 8' in trizomisi (+8), kromozom 17' in uzun kolunun izokromozomu i(17q)' dur. Daha az yaygın olarak kromozom19 ve kromozom21' in trizomileri (+19, +21) görülmektedir. Vakaların %20'sinde p53 geninde değişiklik gözlenmiştir .(55)

Bcr/Abl'nin indüklediği varsayılan genetik instabilitenin mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Bcr/Abl ekspresyonu, hematopoetik öncüllerde serbest oksijen radikallerinin üretimini uyarır ve serbest oksijen radikallerinin DNA hasar düzeyini ve çift sarmal DNA kırıklarını artırdığı belirtilmektedir .(56,57)

#### 2.2.2.7 Sinyal Yolaklarının Aktivasyonu:

Bcr/Abl temel olarak aktif bir tirozin kinaz olup, hematopoetik hücrelerdeki çok sayıda hücresel proteinin tirozin fosforilasyonunu indükler. Sonuç olarak çeşitli hücre içi sinyal ileti yolları aktive olur. Bu yolların bazıları IL-3 gibi hematopoetik sitokinlerle indüklenen sinyalizasyon ile birleşir (58,59). KML hücrelerinde anormal IL-3 transkriptleri

eksprese edilmesine rağmen, IL-3 geni inaktive edilmiş farelerde KML indüksiyonu yine mümkün olmuştur. Bu da KML gelişimi için IL-3'ün gerekli olmadığını öne sürer (60,61).

Bcr/Abl karıştığı anahtar yollar Ras, mitojen-aktivatör protein (MAP) kinazlar, “signal transducers and activators of transcription” (STAT), fosfatidilinositol 3- kinaz (PI3K) ve Myc'dir. Etkileşimlerin birçoğu tirozin fosforilasyonu aracılığıyla ve GRB- 2, DOK, CRK, CRK benzeri protein (CRK like protein; CRKL), SRC homoloji içeren protein (SHC) ve casitas-B-lineage lymphoma protein (CBL) gibi adaptör proteinlerin Bcr-Abl'ye bağlanması ile sağlanır(62). Src kinazların da Ph(+) ALL ve KML blastik fazda tedavi hedefi olabileceğini ancak kronik faz KML'de etkin olmayacağı gösterilmiştir(54). STAT 5 transkripsiyon faktörü için mutant olan donörden yapılan transplantasyon ile alıcı farede KML geliştirilememesi, STAT 5'in KML patogeneğinde önemli bir faktör olduğunu doğrular (63).

### **2.3 KML Tanısı ve Klinik Bulgular:**

Kronik myeloid lösemi (KML), kronik granulositik lösemi olarak da adlandırılır. KML, primitif pluripotent kök hücrenin klonal bir hastalığıdır. Kemik iliğinde aşırı miyeloid hiperplazi, çevre kanında olgun miyeloid hücrelerden oluşan yüksek lökosit sayısı (bazofili ile birlikte) ve splenomegali ile karakterizedir. Akut lösemide varolan patolojik tablonun aksine, lösemi hücreleri farklılaşma yeteneklerini kaybetmemişlerdir.

KML, myeloproliferatif hastalıklar grubu içinde sınıflandırılır. Diğer myeloproliferatif hastalıklar polisitemia vera (PV), myelofibrozis (AMM), ve esansiyel trombositemi (ET)'dir. KML, uc fazlı bir hastalıktır. KML klinikopatolojik seyri; kronik faz, akselere faz, ve blastik faz olarak adlandırılır KML klinik bulguları değişkenlik gösterir. Tanı sırasında vakaların %30'u asemptomatik olabilir. KML hastalarını %10'u akselere fazda, %10'u da blastik fazda teşhis edilmektedir. Kromozom anomalisinin gelişmesi ile klinik bulguların ortaya çıkması arasında yaklaşık 6 yıl vardır. Görülebilen KML semptomları; anemi semptomları (halsizlik, çabuk yorulma, efor intoleransı, fonksiyonel kapasitede azalma gibi), splenomegaliye bağlı semptomlar (karında şişlik ve ağrı, dalağın mideye basısı sonucu çabuk doyma, hipermetabolik duruma bağlı semptomlar (ateş, iştahsızlık, kilo kaybı, gut), trombosit disfonksiyonuna bağlı semptomlar (hemoraji, ekimoz, hematoma, tromboembolik olaylar, retinal hemoraji), hiperlokositoz ve

hiperviskositeye bağlı bulgular (tinnitus, stupor, gorme bozukluğu, nefes darlığı, priapizm ve serebrovaskuler olaylar) şeklinde kendini gosterebilmektedir.

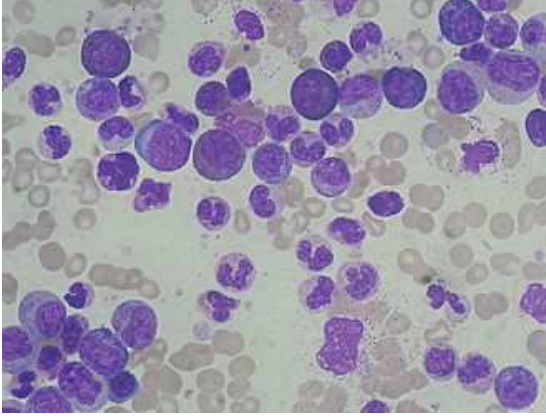
KML blastik fazda kilo kaybı, terleme ve kemik ağrısı vardır. KML hastalarının fizik muayenesinde %50-90 splenomegali, %10-20 hepatomegali vardır. KML seyrinde ekstrameduler hematopoez odakları, cilt altı lezyonlar, lenfadenopati (LAP) gelişimi nadirdir. KML patobiyolojik seyri sırasında ileri evrelerde veya lenfoblastik donuşunde LAP gorulebilir. Sternal hassasiyet, lokostaz varlığında olabilir.

#### **KML-laboratuvar özellikler:**

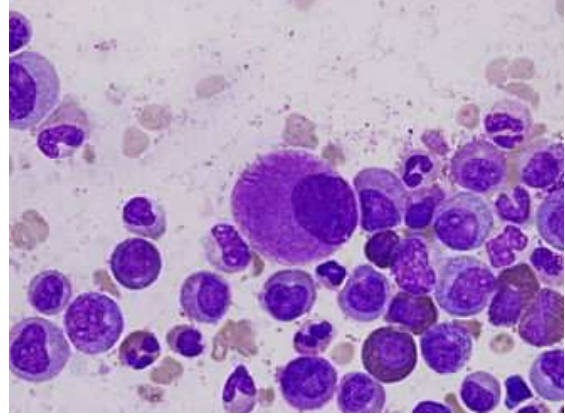
KML hastalarının laboratuvar incelemelerinde; Beyaz Kure (BK) değerleri yükselmiştir. Lokositoz: Ortalama 100.000/ mm<sup>3</sup> üzerinde (20-500 bin/mm<sup>3</sup>). Trombosit vakaların yarısında artmıştır. 100 bin/mm<sup>3</sup> altında trombosit değerlerine rastlanması kronik fazda nadirdir. Periferik yaymada trombosit şekil bozuklukları gorulebilir. Hastaların dortte birinde periferde megakaryosit fragmanları gorulebilir. Trombosit fonksiyon bozukluğu gorulebilir. Hastaların çoğunda normositer normokrom anemi vardır. Bazofil sayısı belirgin şekilde artmıştır ve prognostik oneme sahiptir. Lokosit alkalin fosfataz duzeyleri düşüktür. Periferik yaymada myeloid serinin tüm hücreleri gorulur. Özellikle myelosit, metamyelosit, comak ve parçalı artmıştır. Kronik fazda blast ve promyelosit %10'u gecmez. Eozinofillerde de artış vardır. LDH, urik asid, histamin ve Vitamin B12 duzeyleri yüksektir. Kemik iliği hipersellulerdir Kemik iliğinde myeloid seriye ait hücreler belirgin şekilde artmıştır. Myeloblastdan notrofile kadar tüm seri elemanları artmıştır. Maturasyon ve morfoloji normaldir. Kronik fazda myeloblastlar %5'i gecmez Megakaryositler sayıca artmıştır. Karyotip analizinde Ph\* kromozomu tespit edilir. PCR, FISH gibi tekniklerle BCR/ABL kimerik geni tespit edilir. KML ayırıcı tanısında klinik ve laboratuvar bulgularla AMM, ET, PV başta olmak üzere diğer myeloproliferatif hastalıklar ve lokomoid reaksiyon düşünölmelidir. (64,65)

KML günümüzde TKİ(tirozin kinaz inhibitörler) ile tedavi edilmektedir. Bunlar, imatinib, dasatinib, nilotinib, ponatinib ve bosutinibdir.

İmatinib 2001 de keşfedilmiştir.



**Resim 2.** Periferik kan: granülositlerde sola kayma ile belirgin lökositoz.



**Resim 3.** Bir adet küçük,hipolobüle megakaryosit, kemik iliği aspiratında görülmekte. KML için tipiktir.

KML den şüphelenilen hastalarda Ph kromozomu saptanamayanlar, Ph negatif KML olarak adlandırılırlar.bu hastalar aslında t(9,22) yi baskılayacak şekilde kompleks kromozomal anomaliler içermektedirler.(66) BCR-ABL füzyon proteini saptanamayan küçük bir grup hastanın undiferansiye miyelodisplastik/myeloproliferatif bozukluk olarak sınıflandırılması daha uygundur çünkü bu grup hastalık KML den farklı davranmaktadır.(67)

KML klinik ve laboratuvar olarak üç faza ayrılmaktadır; kronik faz,akselere faz ve akut lösemi gibi davranan blastik faz. Blastik fazda yeni kromozomal anomaliler eklenebilir.(64) Bazı hastalar henüz tanı anında akselere veya blastik fazda olabilirler.(65)

### **Kronik Faz**

Tanı anında hastaların % 85 ini oluşturur.Kronik fazın ne kadar süreceği hastalığın ne kadar erken teşhis edildiği ve tedavinin ne zaman başlandığı ile ilişkilidir.(65)

### **Akselere Faz**

Bu faz için kullanılan kriterler; M.D. Anderson kanser merkezi (68) Sokal ve arkadaşları tarafından,(73) ve Dünya Sağlık Örgütü(WHO) (67)(70) araştırmacıları tarafından hazırlananlardır. En sık kullanılan WHO kriterleridir.

### WHO KRİTERLERİ:

- Periferik kan lökositlerinin ve/veya çekirdekli kemik iliği hücrelerinin %10-19'unun blast olması
- Periferik kandaki bazofillerin  $\geq$ %20
- Tedavi ile ilişkisiz kalıcı trombositopeni  $< 100.000/\text{mm}^3$  veya tedaviye yanıtızsız kalıcı trombositoz  $> 1 \times 10^6/\text{mm}^3$
- Tedaviye yanıtızsız ve giderek artan dalak boyutu ve lökosit sayısı
- Sitogenetik olarak klonal dönüşüm olması

### ELN 2013 KRİTERLERİ:

- Periferik kan lökositlerinin ve/veya çekirdekli kemik iliği hücrelerinin %15-29'unun blast olması veya blastları ile beraber promiyelositlerin kan ve kemik iliğinde  $>$ %30 olması veya kanda bazofillerin  $>$ %20 olması
- Tedavi ile ilgisi olmayan persistan trombositopeni ( $<100.000/\text{mm}^3$ )
- Ph+ hücrelerde klonal kromozomal anormallikler

**Tablo 1.** Akselere faz kriterleri. (Kriterlerden 1 veya daha fazlasının bulunması tanısaldır.)(WHO ve ELN 2013 ün tanımladığı şekilde)(210)

### Blastik Faz

Hızlı progresyon ve kısa survey ile KML nin akut lösemi gibi davranan formudur.(69)

### WHO KRİTERLERİ:

- Periferik kan lökositlerinin veya kemik iliğindeki çekirdekli hücrelerinin  $\geq$ %20'sinin blast olması
- Ekstramedüller blastik proliferasyon,dalak dışında
- Kİ biyopsisinde gruplar halinde blastların olması

## ELN 2013 KRİTERLERİ:

- Periferik kan lökositlerinin veya kemik iliğindeki çekirdekli hücrelerinin  $\geq 30\%$ 'sinin blast olması
- Ekstramedüller blastik proliferasyon, dalak dışında

**Tablo 2.** Blastik faz kriterleri. (Kriterlerden 1 veya daha fazlasının bulunması tanısaldır.)(WHO ve ELN 2013 ün tanımladığı şekilde)(210)

ELN kriterlerleri TKİ ile yapılmış olan büyük çalışmalarda kullanılan esas kriterlerdir.

Blastik krizdeki KML'nin başlıca 2 formu bulunur : lenfoid ve myeloid. (71,72)

Myeloid blast krizi hastaların yaklaşık % 70'inde görülür ve standart AML indüksiyon rejimlerine iyi yanıt vermez (76). Kemoterapi ile birlikte veya tek başına TKİ kullanıldığında yanıt iyidir.(73,74,75).

Lenfoid blast krizi B lenfosit fenotipinde olup vakaların yaklaşık %30'unu oluşturur. ALL tedavisi için kullanılan kemoterapi rejimlerine yanıt alınır. İmatinib ile kombinasyon halinde veya tek başına uygulanabilir.

### 2.4. KML Ayırıcı Tanısı:

KML ile klinik olarak benzerlik gösteren bazı hastalıklar mevcut olup, tedavi yaklaşımından önce KML'nin bu hastalıklarla ayırıcı tanısının yapılması önem taşımaktadır.

#### -Lökomoid Reaksiyon:

Genellikle infeksiyonlara cevap olarak gelişen, nötrofili ve sola kaymanın baskın olduğu yüksek lökosit sayımı ile karakterizedir. Periferik kanda lökosit sayısı 50.000/ $\mu$ l'ye ulaşabilir ve KML'yi taklit edebilir. Fakat açık bir infeksiyon kanıtının bulunması, daha çok olgun hücrelerin (band ve segment) görülmesi, bazofillerin artmaması, nötrofillerdeki toksik granülasyon, yüksek LAP skoru ve sitogenetik analizin normal olmasıyla KML'den ayırt edilebilir.

### **-Kronik Myelomonositik Lösemi (KMML):**

Olgun monositik hücrelerin ve bazen displastik nötrofillerin aşırı üretimi ile karakterize, sıklıkla anemi ve trombositopeninin eşlik ettiği myeloproliferatif bir hastalıktır. KML'den farklı olarak kemik iliği morfolojisinde displastik değişiklikler en az iki ya da üç myeloid seride gözlemlenir ve genetik testlerde Ph kromozomu ve ürünleri saptanmaz.

### **-Atipik KML:**

Displazi ve myeloid proliferasyonun aynı anda mevcut olması, yüksek nötrofil sayısı ile beraber anemi ve/veya trombositopeninin de bulunması ile karakterizedir. Kemik iliğinde blast artışı olmadan, granülositik proliferasyona bağlı hiperselülerite saptanır, monositoz yoktur. KML'den nötrofillerin yanısıra eritroid ve megakaryositik seride de saptanabilen displazi ile ayrılır.

### **-Kronik Eozinofilik Lösemi:**

Kemik iliğinde normal morfolojideki eozinofillerin aşırı üretimi, kanda proliferasyonu ve end organ hasarı ile sonuçlanan organ infiltrasyonları gelişimi ile karakterizedir. Bcr/Abl gen füzyonu veya Ph kromozomu saptanmaz.

### **-Kronik Nötrofilik Lösemi:**

Kanda ve kemik iliğinde artmış olgun granülositik proliferasyon ve hepatosplenomegali ile sonuçlanan organ infiltrasyonu ile karakterizedir. Sıklıkla nötrofillerde toksik granülasyon, nüklear hipersegmentasyon ve artmış LAP skoru gözlenir. Bcr/Abl gen füzyonu veya Ph kromozomu saptanmaz.

### **-Diğer Myeloproliferatif Hastalıklar:**

Polisitemia Vera, Esansiyel Trombositoz ve Primer Myelofibroz gibi diğer myeloproliferatif hastalıklar da klinik gelişim ve başlangıçtaki periferik kan bulguları açısından KML ile benzerlik gösterse de kemik iliği değerlendirmesi ile ayırım yapılabilir. KML'deki küçük megakaryositlerin aksine bu hastalıklarda büyük atipik megakaryositler gözlenir. Sitogenetik inceleme ile Ph kromozomunun ve RT/PCR ile yüksek düzeyde Bcr/Abl transkriptlerinin saptanması da yol göstericidir.

### -Diğer Ph(+) Maligniteler:

Ph+ akut lösemilerin KML-blastik krizden ayrılması zordur. Ancak KML'de Ph kromozomu nötrofillerde ve lenfoblastlarda saptanabilirken, Ph(+) ALL'de söz konusu klon lenfoid hücrelerle sınırlıdır. Ph kromozomu nadir olarak Multipl Myelom ve B hücreli NHL'de de bildirilmiştir (76,77).

### 2.5. KML'de Prognoz:

KML'li hastalarda prognoz üzerine en güçlü belirleyici, tanı anındaki hastalık evresidir. Tanı anında kronik fazda olan hastalarda tedavi ile hastalığın kontrolü uzun yıllar sağlanabilirken, akselere faz ya da blastik krizdeki hastalarda kötü prognoz beklenir. Tirozin kinaz inhibitörlerine direnç ile ilişkili Bcr/Abl T315I mutasyonu varlığı da kötü prognozla ilişkili bulunmuştur. (78)

### -KML Risk Skorlamaları:

Sokal risk skorunun 12 aylık imatinib tedavisinden sonra TSY sağlanan hastalarda hiçbir prognostik anlam olmadığı saptanmıştır.(79,80)

**Tablo 3.** KML Risk Skorlamaları (KML tanı/tedavi kılavuzu 2013,THD)(ELN 2013)

| I-Sokal risk skoru Hesaplanması 1984                                                                                                                                                                                                                                             | Risk Sınıflandırması   |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| $0.0116 \times [\text{yaş (yıl)} - 43.4] + 0.0345 \times (\text{dalak} - 7.51) + 0.188 \times [(\text{trombosit sayısı}/700)^2 - 0.563] + 0.0887 \times (\text{blast} - 2.10)$                                                                                                   | Düşük risk < 0.8       |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Orta risk 0.8-1.2      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Yüksek risk > 1.2      |
| II-Euro, Hasford risk skorlaması (modifiye Sokal) 1998                                                                                                                                                                                                                           | Risk Sınıflandırması   |
| $\text{Yaş} \geq 50 \text{ ise } 0.666 + (0.042 \times \text{dalak boyutu}) + \text{trombosit sayısı} > 1500 \times 10^9/\text{L ise } 1.0956 + (0.0584 \times \text{blast} + \text{bazofil sayısı} > \%3 \text{ ise } 0.20399 + (0.0413 \times \text{eozinofiller}) \times 100$ | Düşük risk $\leq 780$  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Orta risk 781-1480     |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Yüksek risk >1480      |
| <b>III-EUTOS 2011</b> dalak boyutu x 4 + bazofil sayısı x 7                                                                                                                                                                                                                      | Düşük risk <87 ve altı |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Yüksek risk >87        |

(ELN 2013)

**Not:** Dalak büyüklüğü kot kavsinden en uzak nokta (cm) olarak alınır, blast, bazofil ve eozinofiller periferik kandaki yüzdelerdir. Tüm bu faktörler herhangi bir tedavi başlanmasından önceki değerlerdir (81)

Sokal ve Euro risk skoru hesaplaması için [http://www.leukemia-net.org/content/leukemias/cml/cml\\_score/index\\_eng.html](http://www.leukemia-net.org/content/leukemias/cml/cml_score/index_eng.html). EUTOS risk skoru hesaplaması için [http://www.leukemia-net.org/content/leukemias/cml/eutos\\_score/index\\_eng.html](http://www.leukemia-net.org/content/leukemias/cml/eutos_score/index_eng.html). adreslerine başvurulabilir.(ELN 2013)(210)

## 2.6.KML Tedavisi:

### 2.6.1.KML Tedavisi Tarihsel Gelişimi:

Tarihsel olarak KML tedavisi ampirik temele oturtulmuş olup, 1800' lü yılların sonlarına kadar temel tedavi Fowler solüsyonu olmuştur. Fowler solüsyonu **1700'** lerin ortalarında Dr. Thomas Fowler tarafından geliştirilmiş olup, muhtemel aktif bileşeni olan potasyum arsenid sonraki yıllarda da arsenikli preparatların KML'de denenmesine neden olmuştur (83,84,85).

**1960** yılında Peter Nowell ve David Hungerford, KML hastalarında, kromozomal delesyon olarak düşünülen akrosentrik kromozom varlığı ile G-grubu kromozomal anormalliği tanımlamışlardır. Bu durum tarihte bir kromozomal anormalliğin spesifik bir maligniteyle bağlantısının kurulmasının ilk örneğidir (86). Kromozom bantlama yöntemlerinin gelişmesi ile **1973** yılında Dr. Janet Rowley tarafından kromozom 9'daki Abl protoonkogenin 22.kromozomdaki Bcr geni yakınına resiprokal translokasyonu gösterilmiştir. Bu yeni belirleyici keşfedildiği şehrin onuruna Philedelphia kromozomu (Ph) olarak adlandırılmıştır (82). **1982'**de De Klein ve ark. tarafından 9. kromozomdan 22. kromozoma transloke olan kısmın Abl geni olduğu ve bu genin KML patogenezinde rol aldığı belirlenmiştir.. KML'deki kromozomal kırılma noktaları ilk kez **1984** yılında Prakash ve Yunis tarafından 22q11.21 ve 9q34.1 subbantlarında saptanmış olup, aynı yıl Groffen ve ark. 22.kromozomun kırık noktasının 5,8 kb'lık bir bölgeye sınırlı olduğunu göstermişlerdir. Ph(+) KML'ye spesifik kromozomal kırık bölgesi olarak tanımladıkları bu bölgeye "breakpoint cluster region- bcr" adını vermişlerdir (85).**1985'**te Shitivelma ve ark. Bcr'nin bir gen olduğunu ve abl onkogeninin buraya transloke olduğunu bildirmişlerdir. Aynı yıl Kanapka ve ark. Bcr/Abl füzyon proteininin tirozin kinaz aktivitesi olduğunu ve onkogeneizde kilit rolü oynadığını belirtmişlerdir. ALL'de t(9,22) translokasyonu varlığı ilk kez **1986'**da Erikson ve ark. tarafından ortaya konulmuştur. **1993'**te Melo J. ve ark. tarafından RT/PCR ile Bcr/Abl ve Abl/Bcr füzyon genlerinin ekspresyon yaptığı gösterilmiştir (87).

**2001** yılında Druker ve ark. tirozin kinaz aktivitesinin inhibisyonunun KML tedavisinde etkili olacağı düşüncesinden yola çıkarak, bir tirozin kinaz inhibitörü (STI571) geliştirmişler ve bunun standart kemoterapinin yetersiz olduğu KML hastalarında önemli antilösemik aktivite gösterdiğini ve iyi tolere edildiğini saptamışlardır. STI571 (İmatinib),

Mayıs 2001’de IFN’a cevapsız KML’de ve Şubat 2002’de KIT gen mutasyonu ilişkili Gastrointestinal Stromal Tümörlerde kullanıma girmiştir. **2003**’te Azam ve ark. tarafından imatinib direncine neden olan mutasyonlar olduğu belirtilmiş, aynı yıl Goldman ve ark. tarafından bu dirence neden olan 19 nokta mutasyonu ortaya konulmuştur. **2007** yılında imatinib direnci nedeniyle ikinci kuşak tirozin kinaz inhibitörleri olan Dasatinib ve Nilotinib, FDA’nın onayı ile kullanıma girmiştir (87).

İmatinib hala ilk basamak tedavidir. Nilotinib ve dasatinib de FDA tarafından 2010 yılında ilk basamakta onaylanmışlardır. Nilotinib (AMN-107), dasatinib (BMS-345825), bosutinib (SKI-606) and ponatinib (AP-24534) imatinib rezistan ve intoleran hastaların tedavisinde onaylanmışlardır.(88) Ayrıca klinik kullanıma giren birinci ve ikinci kuşak tirozin kinaz inhibitörleri dışında Bafetinib (INNO-406) da üretilmiştir.

### 2.6.2. Genel Bakış

KML tedavisinde genel eğilim olarak öncelikle lökosit sayısı azaltılmalı ve daha sonra da küratif tedaviye geçilmelidir. Hücre azaltılmasına yönelik yaklaşım lökosit sayısının kontrolü yanısıra, splenomegalinin neden olduğu semptom ve bulguların giderilmesi ve metabolik komplikasyonların düzeltilmesini içerir. Lökosit sayısı çok yüksek KML hastalarında lökostaz/hipervizkozite sendromu bulguları varsa lökoferez uygulanabilir (89).

KML tedavisinde başlangıçta hastalığın biyolojik seyrini değiştirmeyen sitotoksik tedaviler (başlıca hidroksiüre ve busulfan) kullanılmıştır. **Busulfan** yavaş etkili alkileştirici bir ajan olup, en önemli toksik etkisi kemik iliği depresyonudur. Busulfan ile tedavide uzun süreli kemik iliği hipoplazisi gelişme riski olup hidroksiürenin busulfana göre üstün olduğu gösterilmiştir. **Hidroksiüre (HU)** en sık kullanılan sitotoksik ajan olup, bir ribonükleotid redüktaz inhibitörüdür. Ortalama 2 gün içinde lökosit sayısını hızlıca düşürür ve megaloblastik eritropoezle seyreden hematopoezin reversibl supresyonu dışında ciddi yan etkisi yoktur. İlaç kesildikten sonra aplazi düzelir. Günümüzde HU, lökostatik komplikasyonları önlemek amacıyla myeloid hiperplaziyi azaltmak için ya da allojeneik kök hücre nakli (AHKHN) öncesi transplantasyon sonrası komplikasyonları artırmadığı için güvenle kullanılabilir. Ph kromozomunu negatifleştirmez (89,90).

1980’li yılların ortalarından itibaren, İmatinib öncesi dönemde, biyolojik yanıt düzenleyici ilaçlar ( **İnterferon** ve **İnterferon/ ARA-C kombinasyonu**) sitogenetik remisyon sağlama amaçlı olarak kullanılmış ve 10 yıldan uzun bir süre ilk tedavi seçeneği olmuştur. Randomize kontrollü çalışmalar IFN’ nun konvansiyonel tedavi ile karşılaştırıldığında sağkalımı uzattığını göstermiştir. IFN, hastaların %80 inde hematolojik, %50 sinde de sitogenetik cevabı indüklemiştir. Sağkalımda önemli uzama sadece sitogenetik cevabı olan hastalarda görülmüştür (91).

1998 yılında spesifik Bcr/Abl tirozin kinaz inhibitörü **imatinib mesilat** bir ilaç olarak klinik uygulamaya girdikten sonra KML tedavisinde “İmatinib Dönemi” başlamıştır. Randomize faz III IRIS çalışmasında imatinib mesilat ile interferon- $\alpha$ /ara-C kombinasyonu, yeni tanı alan KML hastalarında karşılaştırılmıştır. Bu çalışmaya alınan 1106 yeni tanı KML hastasında, majör sitogenetik yanıt oranı ilk yıl sonunda imatinib alan hastalarda % 83 olarak saptanmış ve imatinib mesilat, KML tedavisinde standart hale gelmiştir. 60 aylık izlemde imatinib alan hastalarda %92 majör sitogenetik ve %87 tam sitogenetik yanıtı ulaşılmıştır. İmatinib kullanan hastalarda hesaplanan %89 oranındaki 5 yıllık sağkalım daha önce yapılmış tüm prospektif çalışmalardan daha yüksektir. **Dasatinib** (Sprycel, BMS-355825) ve **Nilotinib** (AMN107) imatinib direncinin daha net anlaşılmasıyla geliştirilmiş daha potent yeni tirozin kinaz inhibitörü molekülleridir. İmatinib tedavisine dirençli hastalarda HLA uygun kardeş vericisi olanlarda allojenik kök hücre nakli yapılır. Günümüzdeki tek küratif tedavi genç hastalarda %100 HLA-uygun verici varlığında allojeneik hematopoietik kök hücre naklidir (**AHKHN**). Ancak kür şansına karşılık, kısa ve uzun dönemde artmış mortalite/morbidite ile birlikte olduğundan, güncel olarak bazı durumlar dışında başlangıç tedavisi olarak önerilmemekte ve genellikle TKI’lere direnç yada intolerans gelişmesi durumunda tercih edilmektedir (92). AHKHN komplikasyonları graft versus host hastalığı, infeksiyonlar, kemoterapi toksisitesi, venookluzif hastalık gibi komplikasyonlardan ileri gelir. Allojeneik nakil sonrası KML nükseden hastalarda donör lenfosit infüzyonu ile tekrar remisyon sağlanabilmektedir.

### 2.6.3. KML’de Tedavi Yönetimi

Yeni tanı kronik faz KML hastalarında, güncel olarak iki temel tedavi yaklaşımı Bcr/Abl Tirozin Kinaz İnhibitörleri (TKI) ve allojeneik hematopoietik kök hücre nakli (AHKHN) olup, THD’nin KML için tedavi önerileri aşağıda gösterilmiştir.

THD tarafından 2013 yılı KML kılavuzunda tedavi önerileri 2013 yılı ELN kılavuzuna göre belirlenmiştir.(93,94,95,96)

**Tablo4.** Kronik evre KML tedavisinde birinci,ikinci ve daha sonraki basamaklardaki tedavi önerileri (ELN 2013 kılavuzundan yararlanılarak hazırlanmıştır).

(KML tanı/tedavi kılavuzu 2013,THD)(ELN 2013)(210)

|                                                                                                                                                          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Birinci basamak:</b>                                                                                                                                  |
| İmatinib (400 mg/gün) veya nilotinib** veya dasatinib**<br>Başlangıçta uyarı (yüksek risk, KKA/Ph+) olan hastalara ve kardeşlerine<br>HLA doku grubu bak |
| <b>İkinci basamak, ilk TKI'ye intolerans:</b>                                                                                                            |
| İlk kuşakta denenmemiş TKI'dan herhangi biri (nilotinib veya dasatinib)                                                                                  |
| <b>İkinci basamak, imatinibe yanıtız:</b>                                                                                                                |
| Dasatinib veya nilotinib veya bosutinib¶ veya ponatinib§<br>Hasta ve kardeşlerine HLA doku grubu bak                                                     |
| <b>İkinci kuşak, nilotinibe yanıtız**:</b>                                                                                                               |
| Dasatinib veya bosutinib¶ veya ponatinib§<br>Hasta ve kardeşlerine HLA doku grubu bak; akraba dışı kök hücre ara ve allo-HKHN düşün                      |
| <b>İkinci kuşak, dasatinibe yanıtız**:</b>                                                                                                               |
| Nilotinib veya bosutinib¶ veya ponatinib§<br>Hasta ve kardeşlerine HLA doku grubu bak; akraba dışı kök hücre vericisi<br>ara ve allo-HKHN düşün          |
| <b>Üçüncü kuşak, 2 TKI'ye yanıtız ve/veya intolerans:</b>                                                                                                |
| Kalan TKI lerden herhangi biri; uygun hastalarda allo-HKHN önerilir.                                                                                     |
| <b>Herhangi bir basamak tedavide T315I mutasyonu saptanması:</b>                                                                                         |
| Ponatinib§<br>Hasta ve kardeşlerine HLA doku grubu bak; akraba dışı kök hücre vericisi ara ve allo-HKHN düşün                                            |

\*\*Randomize karşılaştırmalı çalışmalarda nilotinib (ENESTnd) ve dasatinib (DASISION)'in kronik evrede ilk seçenek tedavide imatinib'e göre daha erken ve daha yüksek oranda sitogenetik ve moleküler yanıtlar oluşturduğu gösterilmiştir (93,94). Bu verilerin ardından kronik evrede ilk seçenek tedavi için ruhsatlandırıldıkları ülkelerde nilotinib 2x300 mg/gün, dasatinib ise 100 mg/gün dozunda kullanılmaktadır. İlk seçenek tedavide ülkemizde de ruhsatlanmış olmalarına rağmen henüz geri ödeme almamışlardır. Bosutinib ve şponatinib henüz ülkemizde ruhsatlanmamışlardır.

Not-1 : Kronik evrede (ikinci basamak) dasatinib dozu 100 mg/gün, nilotinib dozu 2 x 400 mg/gün'dür. Blastik evrede nilotinib kullanım endikasyonu yoktur. Hızlanmış ve blastik evrede dasatinib dozu 140 mg/gün'dür (95,96).

Not-2 : Dasatinib ve nilotinibi kaldıramayan hastalarda hastaya göre allo-HKHN, hidroksiüre, interferon, sitozin arabinozid tercih edilebilir.(Çalışma grubunun ortak görüşü)

**Tablo5.** Hızlanmış Evre ve Blastik Evre KML hastalarında tedavi önerileri (ELN 2013 kılavuzundan yararlanılarak hazırlanmıştır). (KML tanı/tedavi kılavuzu 2013,THD)

|                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TKI almamış yeni tanı Hızlanmış evre ve Blastik evre hastalar                         | İmatinib 600-800 mg/gün veya dasatinib 70 mg günde iki defa veya 140 mg günde bir defa Allo-HKHN için verici taraması Blastik evredeki tüm hastalara ve hızlanmış evrede olup uygun yanıt sağlayamayan tüm hastalara allo-HKHN önerilir.<br>Hastalığı kontrol altına almak için allo-HKHN öncesi kemoterapi gerekebilir. |
| Kronik evreden Hızlanmış evre ve Blastik evreye ilerleyen daha önce TKI alan hastalar | Progresyondan önce kullanılmamış herhangi bir TKI (ponatinib§; T315I mutasyonu varsa) ardından tüm hastalarda allo-HKHN<br>Hastaları allo-HKHN'ye hazırlamak için sıklıkla kemoterapi gereklidir*.                                                                                                                       |

\*Genellikle bu hastalarda tek başına TKI kullanılması allo-HKHN öncesinde remisyon sağlamaya yetmeyeceği için sitotoksik kemoterapi uygulanması gereklidir. Kontrolsüz, dirençli blastik evre varlığında allo-HKHN önerilmemektedir.§Ponatinib henüz ülkemizde ruhsatlanmamıştır.

#### 2.6.3.1 Tedaviye Yanıt Tanımları:

KML tedavisine yanıt; hematolojik yanıt, sitogenetik yanıt ve moleküler yanıt (gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT/PCR) ile veya alternatif olarak floresans in situ hibridizasyon (FISH) ile saptanır) olarak incelenmektedir.

##### -Tam hematolojik yanıt

- Lökosit sayısı < 10.000/μL
- Periferik kanda bazofil < %5
- Periferik kanda miyeloblast, promiyelosit, miyelosit görülmemesi
- Trombosit sayısı < 450.000/μL
- Dalağın ele gelmemesi

##### -Sitogenetik Yanıt

- Tam sitogenetik yanıt : Ph + metafazın olmaması
- Parsiyel sitogenetik yanıt : Ph + metafaz %1- %35
- Minör sitogenetik yanıt: Ph + metafaz %36 - %65
- Minimal sitogenetik yanıt: Ph + metafaz %66 - %95
- Sitogenetik yanıtsızlık: > %95 Ph + metafaz

Konvansiyonel sitogenetik incelemede en az 20 metafaz değerlendirilmelidir.

Kemik iliğinde metafaz elde edilemediğinde tam sitogenetik yanıt tanımı en az 200 çekirdek skorlaması ile yapılmış interfaz FISH çalışmasına dayanabilir.

Majör sitogenetik yanıt tam ve parsiyel sitogenetik yanıtı içerir (Ph + metafaz %0 - %35). Konvansiyonel sitogenetik inceleme; Ph' dışındaki kromozom anomalilerini de saptar. Sitogenetik yanıt FISH ile değerlendirildiğinde laboratuvarın raporunda belirtilen yanlış pozitiflik oranı dikkate alınmalıdır.

#### **-Moleküler Yanıt**

- Majör moleküler yanıt (MMY, MY<sup>3.0</sup> veya daha derin yanıt): BCR-ABL1/ABL1 oranının uluslararası ölçeğe göre  $\leq$  % 0,1 olması
- MY<sup>4.0</sup> aşağıdakilerden biridir;
  - (i) Tespit edilebilen hastalık, BCR-ABL1 uluslararası ölçeğe göre  $\leq$  %0.01
  - (ii) Tespit edilemeyen hastalık, cDNA >10.000 ABL1 kopya
- MY<sup>4.5</sup> aşağıdakilerden biridir;
  - (i) Tespit edilebilen hastalık, BCR-ABL1 uluslararası ölçeğe göre  $\leq$  %0.0032
  - (ii) Tespit edilemeyen hastalık, cDNA >32.000 ABL1 kopya
- Tam moleküler yanıt (TMY) kavramı “moleküler olarak tespit edilemeyen lösemi” ile değiştirilmiştir ve RT-PCR veya “nested” PCR yöntemi kullanıldığında BCR-ABL1 saptanmamasıdır.

#### **2.6.3.2 Tedavi Yanıtının Değerlendirilmesi:**

2009 yılında yayınlanan ELN kılavuzunda yanıt değerlendirmesi optimal yanıt, suboptimal yanıt, yanıtsız ve uyarı olarak sınıflandırılmışken, 2013 yılındaki kılavuzda optimal yanıt, uyarı ve yanıtsız olarak üçe ayrılmıştır.(101)(Tablo-6)

**Hematolojik değerlendirme:** Tanı sonrasında tam hematolojik yanıt sağlanana kadar 15 günde bir, daha sonra en az 3 ayda bir veya gerek olduğunda yapılmalıdır.

**Sitogenetik değerlendirme:** Tanıda, 3. ve 6. ayda, tam sitogenetik yanıt elde edilmesine kadar 6 ayda bir, TSY elde edilmesini takiben 12 ayda bir (düzenli moleküler izlem yapılamıyorsa);

- Tedaviye yanıtsızlık (primer veya sekonder direnç durumunda) her zaman

- Açıklanamayan anemi, lökopeni, trombositopeni gelişiminde her zaman yapılmalıdır.

**RT-QPCR ile moleküler izlem:** MMY (MY<sup>3.0</sup> veya daha derin yanıt) elde edilmesi ve doğrulanmasına kadar 3 ayda bir, daha sonra 3-6 ayda bir yapılmalıdır.

Uyarı durumunda, hasta daha yakından izlenmeli ve eğer gerekirse moleküler ve sitogenetik testler daha sık (<3 ay) yapılmalıdır.

**Moleküler mutasyon analizi:** Yanıtsızlık durumunda ve diğer tirozin kinaz inhibitörleri veya başka tedavilere geçmeden önce daima bakılmalıdır.

Hızlanmış ve blastik evrede başvuran hastalarda mutasyon analizi çalışılması önerilir (Çalışma grubunun ortak görüşü).(KMLtanı/tedavi kılavuzu 2013,THD)

**Tablo 6.** Birinci kuşak TKI (herhangi bir TKI) tedavisine yanıt tanımları (97)

(KML Tanı/Tedavi Kılavuzu 2013,THD)(ELN 2013)(210)

|                                  | Optimal                         | Uyarı                                  | Yanıtsız                                                                        |
|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Başlangıç                        | -                               | Yüksek risk veya KKA/Ph+               | -                                                                               |
| 3 ay                             | BCR-ABL1≤%10<br>ve/veya Ph+≤%35 | BCR-ABL1>%10<br>ve/veya<br>Ph+ %36-95  | THY yok ve-veya<br>Ph+ >%95                                                     |
| 6 ay                             | BCR-ABL1≤%1 ve/veya<br>Ph+ 0    | BCR-ABL1 %1-10<br>ve/veya<br>Ph+ %1-35 | BCR-ABL1 >%10<br>ve/veya<br>Ph+ > %35                                           |
| 12 ay                            | BCR-ABL1≤%0.1                   | BCR-ABL1>%0.1-1                        | BCR-ABL1>%1<br>ve/veya<br>Ph+ >0                                                |
| Tedavinin herhangi bir döneminde | BCR-ABL1≤%0.1                   | KKA/Ph-<br>(-7 veya 7q-)               | THY kaybı<br>TSY kaybı<br>Teyit edilmiş<br>MMY* kaybı<br>Mutasyonlar<br>KKA/Ph+ |

\*ardışık iki testten birinde BCR-ABL1 düzeyinin ≥ %1 olması

Tanımlamalar KE, HE ve BE hastaları için aynı şekilde geçerlidir ve birinci kuşak tedaviye intolerans gelişmesi nedeniyle ikinci kuşak tedaviye geçilen durumlarda da uygulanabilir. Hem moleküler yöntemler hem de sitogenetik incelemeler ile yanıt değerlendirilebilir, eğer mümkünse ikisinin birlikte yapılması önerilir. Cut-off değerleri optimal ile uyarı bölümünü ayırmada ve uyarı ile yanıtız bölümünü ayırmada kullanılabilir. Moleküler ve sitogenetik sonuçların sınır değerlere yakın olduğu durumlarda sonuçlarda dalgalanmalar olabileceği için böyle durumlarda testlerin tekrarlanması önerilir. 12. aydan sonra MMY sağlanabildiyse her 3-6 ayda bir gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile yanıt değerlendirilmesi yapılır. Sitogenetik inceleme ise standardize moleküler inceleme yöntemlerinin yapılamadığı durumlarda veya yanıtızlık durumunda yapılmalıdır. MMY (MY<sup>3.0</sup> veya daha derin yanıt) tedavi başarısıve sağkalım sağlayabilmekteyken, ancak daha derin yanıt olması durumlarında tedaviye devam edilmemesi (TKI tedavisinin kesilmesi) düşünülebilir.

MMY, BCR-ABL1 ≤ %0.1 = MY3.0 veya daha derin yanıt; KKA/Ph<sup>+</sup> , Ph<sup>+</sup> hücrelerde klonal kromozom anomali; KKA/Ph<sup>-</sup> , Ph<sup>-</sup> hücrelerde klonal kromozomal anomali.

Yeni tanı kronik evre KML hastalarında herhangi bir TKI tedavisi başlanması sonrasında, 3. ayda BCR-ABL1≤%10 olan hastalar ile BCR-ABL1>%10 olanlar karşılaştırıldığında, BCR-ABL1>%10 olmanın kötü prognostik önemi olduğu gösterilmiştir(102,103,104). Ancak tek bir BCR-ABL1 ölçümüne göre karar vermek doğru olmayabilir ve yanıtızlık kararı vermeden önce iki kez BCR-ABL1 ölçümü (3. ayve 6. ay) ve gerekirse ek incelemeler (konvansiyonel sitogenetik,mutasyon analizi) yapılmalı, ondan sonra tedavinin değiştirilmesi düşünölmelidir. Ancak 6. ayda BCR-ABL1 >%10 olması durumunda tedavi değişikliği yapılmasının, uzun süreli genel ve olaysız sağkalım açısından avantaj sağlayacağını gösteren prospektif randomize kontrollö bir çalışma halen bulunmamaktadır.(KML tanı/tedavi kılavuzu 2013,THD) (97,98,99,100)

**Tablo 7.** İmatinibe yanıtızsız durumunda ikinci kuşak tedaviyeyanıt tanımları(97)

(KML Tanı/Tedavi Kılavuzu 2013,THD) (ELN 2013)(210)

|                                  | Optimal                       | Uyarı                                                                                          | Yanıtızsız                                                                                     |
|----------------------------------|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Başlangıç                        | -                             | THY yok veya imatinib altında THY kaybı veya Birinci kuşak TKI'ya SY olmaması veya Yüksek risk | -                                                                                              |
| 3 ay                             | BCR-ABL1≤%10 ve/veya Ph+<%65  | BCR-ABL1>%10 ve/veya Ph+ %65-95                                                                | THY yok veya Ph+ >%95 veya yeni mutasyonlar                                                    |
| 6 ay                             | BCR-ABL1≤%10 ve/veya Ph+ <%35 | Ph+ %35-65                                                                                     | BCR-ABL1 >%10 ve/veya Ph+ > %65 ve/veya yeni mutasyonlar                                       |
| 12 ay                            | BCR-ABL1<%1 ve/veya Ph+ 0     | BCR-ABL1 %1-10 ve/veya Ph+ %1-35                                                               | BCR-ABL1 >%10 ve/veya Ph+ >%35 ve/veya yeni mutasyonlar                                        |
| Tedavinin herhangi bir döneminde | BCR-ABL1≤% 0.1                | KKA/Ph-(-7 veya 7q-) veya BCR-ABL1 > %0.1                                                      | THY kaybı veya TSY kaybı veya KSY kaybı veya yeni mutasyonlar Teyit edilmiş MMY* kaybı KKA/Ph+ |

Bu tanımlar dasatinib ve nilotinib ile ilgili verilere dayanmaktadır.(101-114)

MMY, BCR-ABL1 ≤ %0.1 = MY3.0 veya daha derin yanıt; KKA/Ph+ , Ph+ hücrelerde klonal kromozom anomali; KKA/Ph- , Ph- hücrelerde klonal kromozomal anomali.

\*ardışık iki testten birinde BCR-ABL1 düzeyinin ≥ %1 olması

Günümüzde herhangi bir TKI tedavisine yanıtı bulunan bir KML hastasında, yanıt devam ettiği sürece mevcut tedavinin uygun dozda sürdürülmesi önerilmektedir. MY4.5 veya daha derin yanıt elde edilmiş olan hastalarda imatinib tedavisi kesildiğinde, takipte

(1-4 yıl) hastaların yaklaşık %40'ının mevcut yanıtlarını korudukları gösterilmiştir.(115-118) TKI tedavisinin sürdürülmesinin mümkün olmadığı durumlarda (örn. gebelik), eğer hasta en az 2 yıl süre ile optimal yanıtla ise, TKI tedavisine ara vermek mümkün olabilir ancak ara verme süresince yakın ve etkin moleküler takip (örn. aylık) önerilmektedir.(97)

### 2.6.3.3 Tedavi Yanıtının İzlenmesi

**Hematolojik değerlendirme:** Tanı sonrasında tam hematolojik yanıt sağlanana kadar 15 günde bir, daha sonra en az 3 ayda bir veya gerek olduğunda yapılmalıdır.

**Sitogenetik değerlendirme:** Tanıda, 3. ve 6. ayda, tam sitogenetik yanıt elde edilmesine kadar 6 ayda bir, TSY elde edilmesini takiben 12 ayda bir (düzenli moleküler izlem yapılamıyorsa)

- Tedaviye yanıtsızlık (primer veya sekonder direnç durumunda her zaman)
- Açıklanamayan anemi, lökopeni, trombositopeni gelişiminde her zaman yapılmalıdır.

RT-QPCR ile moleküler izlem: MMY (MY3.0 veya daha derin yanıt) elde edilmesi ve doğrulanmasına kadar 3 ayda bir, daha sonra 3-6 ayda bir yapılmalıdır.

Uyarı durumunda, hasta daha yakından izlenmeli ve eğer gerekirse moleküler ve sitogenetik testler daha sık (<3 ay) yapılmalıdır.

**Moleküler mutasyon analizi:** Yanıtsızlık durumunda ve diğer tirozin kinaz inhibitörleri veya daima bakılmalıdır.

Hızlanmış ve blastik evrede başvuran hastalarda mutasyon analizi çalışılması önerilir (Çalışma grubunun ortak görüşü).(119)

### 2.6.4. İmatinib İntoleransı, İmatinibe Direnç, Yan Etkiler ve Kullanım Alanları

1998 yılında spesifik Bcr/Abl tirozin kinaz inhibitörü İmatinib mesilat (STI571) klinik uygulamaya girdikten sonra KML tedavisinde imatinib dönemi başlamıştır. İmatinib, 400 mg/gün dozunda özellikle kronik fazda hematolojik, sitogenetik, moleküler remisyon (Bcr/Abl füzyon transkriptinin kaybolması) sağlayabilmektedir. İmatinib, oral olarak çok iyi tolere edilir. Tedavi, mevcut verilere göre yaşam boyu verilmelidir. Ödem,

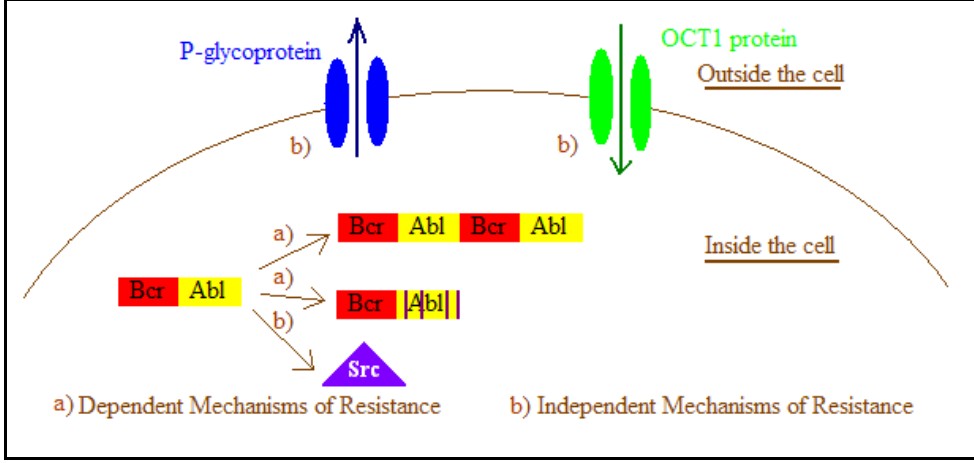
cilt döküntüleri, sitopeniler gibi yan etkileri vardır. İlaça bağlı yan etkiler nedeniyle tedavinin sonlandırılması hastaların %5'inden daha azında görülmüştür. En sık gözlenen yan etkiler; kas iskelet şikayetleri ile ödemdir. Bulantı, kusma, ishal, makülopapüler cilt döküntüsü, halsizlik ve baş ağrısı diğer sık gözlenen yan etkilerdir. Doza bağımlı hepatotoksisite ve mielosupresyon görülebilir. Bu yan etkiler sıklıkla tedavinin ilk 2-4 haftası içinde ortaya çıkar. Sıvı retansiyonu tüm çalışmaların ortak bulgusu olmuştur. Periorbital ve pretibial gibi vücudun herhangi bir bölgesinde subkutan ödem olarak kendini gösterebilir. Bazı hastalarda plevral efüzyon, assit, kilo alımı görülebilir. Karaciğer fonksiyon testlerindeki bozukluk sıklıkla hafif transaminaz yüksekliği şeklinde görülür. Genellikle tedaviye 1-2 hafta ara verilmesi ile düzelir. Myelosupresyon kemik iliği toksisitesini gösterebilir ya da imatinibin antilösemik etkisine bağlı olabilir. Kronik fazdaki hastalarda düşük kan değerleri tedaviye birkaç gün ara verildikten sonra sıklıkla düzelir ancak ileri evre hastalarda düzelme daha uzun sürede olur. (74,75).(120,121)

**İntolerans** – İntoleransın evrensel bir tanımı yoktur. Genel olarak ,uygun doz azaltılmasına ve optimal semptomatik tedaviye rağmen grade 3-4 non hematolojik toksisite gelişmiş ise imatinib intoleransı düşünülmelidir.

Ciddi semptomlar geliştiğinde , imatinibe kısa süreli ara verildiğinde hastaların büyük çoğunluğu birkaç gün içinde hızla düzelmektedir .Çoğunlukla yan etkiler tekrarlamadan aynı doz ilaç tekrar başlanabilir. İmatinib ile tedavi edilen hastaların %5'ten daha azında uzun dönem tedavinin tolere edilmesi mümkün olmamaktadır.GİS şikayetleri,yorgunluk, baş ağrısı,raş , periferik ödem ve periorbital ödem imatinibin başlıca yan etkileridir. Hastalar remisyona girdikten sonra myelosupresyon nadirdir. Fakat başlangıç tedavisi döneminde Kİ normal hematopoezi sağlamak için yeterince toparlanana kadar nötropeni , trombositopeni ve anemi oluşabilir.Ciddi rekürren raş veya hepatotoksisite gibi bazı yan etkiler kalıcı olarak tedaviyi bırakmayı gerektirebilir.(122,123,124)

## **Direnç**

İlaç direnci BCR-ABL ye etkili yeni tirozin kinaz inhibitörleri gelişimde esas nedendir.İmatinib kullanmaya başlamadan saptanan direnç,tedaviye primer rezistans olarak tanımlanırken,tedavi altında daha önce görülen gelişim yavaşlayan ve tedaviden gördüğü fayda azalan hastalarda saptanan direnç tedaviye sekonder rezistans olarak tanımlanır.



**Şekil 4.** Tirozin kinaz inhibitörlerine dirençte ortak mekanizmalar

Genel tanımlamada, imatinib direnci BCR-ABL bağımlı ve bağımsız olarak tanımlanır.

BCR-ABL bağımlı mekanizmalar; BCR-ABL geninin over-ekspresyonu ve amplifikasyonu ve imatinib bağlanma bölgesi ile ilişkili BCR-ABL nokta mutasyonlarıdır.

BCR-ABL bağımsız mekanizmalar; hücre içindeki imatinib konsantrasyonu ile ilgilidir, örneğin; ilaç influx ve effluxu, ve SRC kinaz ailesi gibi BCR-ABL den bağımsız sinyal ileti yollarıdır.(125,126)

**Tablo 8.** İmatinib direnç mekanizmaları (137)

| Kinaz bölgesi mutasyonları                                                                                  | Mutasyondan bağımsız                                                       | Duplikasyonlar                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| 1.T315I<br>2.P-LOOP<br>-M244V<br>-G250E<br>-Y253F/H<br>-E255K/V<br>2.M351T<br>3.F359V<br>4.SH2,SH3<br>5.Cap | 1.PI3/Akt<br>2.MDR-1,Pgp<br>3.HIF-1alfa<br>4.Aberran seramid metabolizması | 1.Abl sekansında amplifikasyon |

**Bcr/Abl bağımlı direnç mekanizmaları** başlıca olarak ATP bağlayan domainde (P-loop) veya Bcr/Abl onkoprotein'in aktivasyon lupunda noktasal mutasyonlar, Bcr/Abl füzyon geninde genomik amplifikasyon, Bcr/Abl yazımında düzensizlik, çoklu direnç proteinlerinin düzensizliği nedeni ile imatinibin hücre dışına atılması ve imatinib'in hücrel biyo-kullanılabilirliğinin azalmasına dayanmaktadır. Bcr/Abl'de kinaz bölgesi mutasyonları, kazanılmış imatinib direnci olan hastaların %50-60'ını oluşturur.

En sık gözlenen ve en yüksek derecede in vitro ve klinik direnç ile ilişkili olan mutantlar; imatinib bağlanma bölgesinde bulunan Y253H, F317L, T315I ve ATP bağlama bölgesinde bulunan E255K'dir. T315I mutasyonunda ikinci kuşak tirozin kinaz inhibitörleri olan dasatinib ve nilotinib de tedavide etkili değildir. Bu mutasyonda allojeneik kök hücre transplantasyonu önerilmekte ve yeni tirozin kinaz inhibitörleri üzerinde çalışılmaktadır. Y253H, E255K mutasyonlarında ise dasatinib nilotinib'den daha etkili, F317L mutasyonunda ise nilotinib dasatinib'den daha etkili olduğu bildirilmektedir. Genel olarak P-loop mutasyonları azalmış sağkalım ile birlikte dir.(138,139)

**Bcr/Abl'den bağımsız mekanizmalar** ise taşıyıcı proteinlerde (OCT 1, MDR 1) ve farmakolojik bariyerlerde (CYP3A 4/5 indükleyiciler) olan değişiklikler, NF-kappa B, SHP-1, p53, RB, p16 mutasyonları, EVI ve myc aşırı ekspresyonu, kromozomal değişiklikler, ek Ph kromozomu kazanımı, src ilişkili Lyn/Hck kinazların aşırı ekspresyonu gibi bazı sekonder genetik değişikliklere bağlıdır (130,131)

### **Bcr-Abl bağımlı direnç mekanizmaları:**

#### **Bcr-Abl duplikasyonu**

İlk imatinib direci bir onkogen amplifikasyonu oluşumunun tanımlanması ile bulunmuştur.imatinib dozunun artırılması bu tip direncin üstesinden gelebilir,ancak ciddi yan etkiler ve intoleransa dikkat etmek gerekir.(125,126)

#### **Bcr-Abl mutasyonu**

Nokta mutasyonları BCR-ABL kinaz bölgesindeki aminoasit değişikliklerine yol açabilir ve imatinibin tirozin kinaza bağlanmasını bozabilir.(125)

En önemli mutasyonlar T315I ve P-loop mutasyonlarıdır.ayrıca kinazın diğer tarafındaki mutasyonlar da tanımlanmıştır;örneğin, c-helix,SH2 bölgesi,substrat bağlanma bölgesi,aktivasyon loop u ve c-terminal bölgesi.bunların bazıları klinik anlam ifade etmektedir fakat P-loop ve T315I kadar önem arzetmezler.(126)

### **-T315I mutasyonu**

T315I mutasyonu ponatinib hariç diğer tirozin kinaz inhibitörlerinin hepsine direnç gösteren tek mutasyondur.ABL geninin 944.pozisyonunda sitozinden timine baz çifti değişimi ile gerçekleşir (ABL proteininin kodon 315 alanı) ve threonin aminoasidi izolösin ile pozisyon değiştirir,buna T315I denmektedir. (126)

İmatininbe dirençli ileri faz KML hastalarının 6 ile 9 unda birinde mu mutasyon saptanmıştır.Ponatinib ( Iclusig) 2013 yılında ikinci jenerasyon TKİ olarak onaylanmıştır ve T315I mutasyonunda tek etkil ilaçtır.(127,128)

### **-P-loop mutasyonları**

BCR-ABL iki loop içerir,ATP-bağlayan P-loop ve aktivasyon loop u.bu mutasyonlar durumunda kinaz bölgesi imatinib bağlanması için gereken inaktif konformasyonu sağlayamaz.P-loop bölgesi mutasyonları,tüm mutasyonlar arasında %36-48 ile en sık görülendir.P-loop bölgesi içeren BCR-ABL imatinibe 70-100 kat daha az hassastır.(125)

### **Bcr-Abl bağımsız direnç mekanizmaları:**

Bu mekanizmaların klinik direnç nedeni olduğu net olarak belirlenemiştir.(126)

### **P-glikoprotein tarafından ilaç dışarı atımı(efflux)**

P-glikoproteini inhibe eden bazı ajanlar tarafından imatinib aktivitesi restore edilmiştir.(126)

### **Organik katyon transporter 1(OCT1) tarafından ilaç içeri alımı**

İmatinin hücre içine alımı OCT1 e bağımlıdır.OCT1 ilacın intraselluler biyoyararlanımını azaltarak imatinib direncinde belirgin bir rol oynamaktadır.(129)

OCT1 aktivitesi düşük olan hastaların imatinib cevabı doz bağımlıdır.(125)

### **Alternatif sinyal yolağı aktivasyonu**

En önemlisi SRC kinaz ailesidir.

SRC kinaz,BCR-ABL yi aktif konformasyonda tutar ve bu durumda imatinib bağlanamaz.ayrıca SRC kinaz ların BCR-ABL bağımsız mekanizmalarda da rol aldıkları gösterilmektedir.

## Çözümler

İmatinib dirençli veya intoleran hastalarda stratejiler ilaç dozunun artırmak veya ikinci kuşak tirozin kinaz inhibitörleridir.doç artırımına cevap kısa süreli olmaktadır.(125)

Bu durumda BCR-ABL mutasyonun ne olduğu saptanmalıdır.ikinci kuşak tirozin kinaz inhibitörlerinin hangi tip durumlarda kullanılması gerektiğine göre karar verilmelidir.(127)

Ayrıca iki farklı sinyal yolagının hedefleyen ajanın kullanılması da CML hastalarında cevabı artırır ve yaşam süresinin uzatır.(130)

**Tablo 9.** TKI'lerine direnç ile ilişkili mutasyonlar (www.bloodjournal.hematologylibrary.org)

|                     |                 | Imatinib<br>(nM) | Nilotinib<br>(nM) | Dasatinib<br>(nM) |
|---------------------|-----------------|------------------|-------------------|-------------------|
|                     | Native BCR-ABL1 | 260              | 13                | 0.8               |
| P-loop              | M244V           | 2000             | 38                | 1.3               |
|                     | G250E           | 1350             | 48                | 1.8               |
|                     | Q252H           | 1325             | 70                | 3.4               |
|                     | Y253H           | >6400            | 450               | 1.3               |
|                     | Y253F           | 3475             | 125               | 1.4               |
|                     | E255K           | 5200             | 200               | 5.6               |
|                     | E255V           | >6400            | 430               | 11                |
|                     | V299L           | 540              | NA                | 18                |
| ATP<br>binding site | F311L           | 480              | 23                | 1.3               |
|                     | T315I           | >6400            | >2000             | >200              |
|                     | T315A           | 971              | 61                | 125               |
|                     | F317L           | 1050             | 50                | 7.4               |
|                     | F317V           | 350              | NA                | 53                |
| Catalytic<br>domain | M351T           | 880              | 15                | 1.1               |
|                     | E355G           | 2300             | NA                | 1.8               |
|                     | F359V           | 1825             | 175               | 2.2               |
|                     | V379I           | 1630             | 51                | 0.8               |
| A-loop              | L387M           | 1000             | 49                | 2                 |
|                     | H396R           | 1750             | 41                | 1.3               |
|                     | H396P           | 850              | 41                | 0.6               |

High sensitivity

Intermediate sensitivity

High insensitivity

## **İmatinib için kontrendikasyonlar ve dikkat edilmesi gerekenler:**

Tek kontrendikasyon imatinibe karşı hipersensitivitedir.(131)

Dikkat edilmesi gerekenler; yaşlılardaki gibi hepatik fonksiyonlarda azalma,kalp yetmezliği veya sol ventriküler disfonksiyon riski,hamilelik(fetal toksisite),sıvı retansiyonu,çocuklar ve adolesanlarda gelişme geriliğidir.(132,135,136)

En sık yan etkiler:halsizlik,diyare,bacaklarda ağrı,sıvı retansiyonu,görme bozuklukları,kaşıntı,enfeksiyonlara yatkınlık,kanama,tat kaybı,kilo alımı,nötropeni-trombositopeni-anemi ve ödemdir.(133,134)

## **Kullanım alanları**

İmatinib KML,GİST ve diğer birçok malignitede kullanılmaktadır.2002 yılında FDA imatinibi GİST de onaylamıştır.2012 yılında imatinib postoperatif KIT pozitif tümörlerde rekürrensi önlemede onaylanmıştır.ayrıca KIT pozitif rezeke edilemeyen tümörlerde de onaylanmıştır.

## **Diğer kullanım alanları**

ALL (Ph pozitif), PDGFR gen yeniden düzenlemeleri ile ilişkili MDS ve MPH da,D816V c-KIT mutasyonu olmayan agresif sistemik mastositozda,hipereosinofilik sendromda ve FIP1L1-PDGFR $\alpha$  füzyon kinaz (CHIC2 allel delesyonu) olan kronik eosinofilik lösemide,dermatofibrosarkoma protuberansta kullanımı FDA tarafından onaylanmıştır.2013 yılında Ph+ALL de pediatrik kullanımı onaylanmıştır.

## **Deneyssel olarak**

Pulmoner hipertansiyonda imatinib etkilşi olabilir.düz kas hipertrofisi ve hiperplazisini geriletir.sistemik sklerozda pulmoner fibrozisi azalttığı test edilmiştir.PDGF-Rbeta yı inhibe eder.diabeti olan ve olmayan farelerde ateroskleroza geciktirir.

#### 2.6.4.1.İkinci Kuşak TKİ Yan Etkiler ve Kullanım Alanları

**Tablo 10.** İkinci kuşak TKİ'lerinde mutasyonlara duyarlılık durumları

| <b>Mutasyon Durumuna Göre:</b>               |                                |
|----------------------------------------------|--------------------------------|
| Nilotinibe duyarlılığı az olan mutasyonlar : | Y253H, E255K/V, F359V/C        |
| Dasatinibe duyarlılığı az olan mutasyonlar : | F317L, F317I/V/C, T315A, V299L |
| Nilotinib ve dasatinibe dirençli mutasyon :  | T315I                          |

(KML Tanı ve Tedavi Kılavuzu,THD,2013)

#### **Nilotinib:**

FDA tarafından Ph+KML hastalarında akselere faz ve kronik faz tedavisinde onaylanmış ikinci kuşak tirozin kinaz inhibitörüdür.

NCCN ayrıca nilotinibi GİST (evre 2A) tedavisine hasta imatinib veya sunitinib tedavisinden fayda görmeyen ilerleyen hastalığa sahip ise önermektedir.

Nilotinib QT aralığını uzatır,ani ölümler bildirilmiştir.hipokalemisi ,hipomagne semisi ve uzun QT sendromu olan hastalarda kullanılmamalıdır.QT aralığını uzatan ilaçlar ve CYP3A4 inhibitörlerinde uzak durulmalıdır.

Nilotinib oldukça iyi bir tolerabilite profiline sahiptir. En yaygın grade 3/4 yan etkiler; trombositopeni (%20-33), nötropeni (%13-31), bilirubin yüksekliği (%7) ve serum lipaz yüksekliğidir (%5-15). Diğer sık yan etkileri döküntü, kaşıntı, baş ağrısı, bulantı ve yorgunluktur.Gıdalar nilotinib'in biyoyararlılığını artırırlar, bu nedenle ilacı almadan iki saat önce ve bir saat sonraya kadar gıda alınmamalıdır. Greyfurt ve suyu da karaciğer sitokrom enzimlerinin inhibisyonu ile kan nilotinib düzeyini arttırabileceğinden, birlikte alımından kaçınılmalıdır (87,88).(140,141)

BCR-ABL, KIT, LCK, EPHA3, EPHA8, DDR1, DDR2, PDGFRB, MAPK11 ve ZAK yollarından etkilidir. Nilotinib,imatinib rezistan hücrelerde BCR-ABL ye 30 kat daha güçlü ve imatinib duyarlı hücrelerde 5-7 kat daha güçlü bağlanır.(142,143)

**Dasatinib:**

Dasatinib (BMS-35482 ) oral multi –BCR-ABL ve SRC ailesi tirozin kinaz inhibitörüdür.KML de birinci basamak tedavide ve Ph+ALL de onaylanmıştır.bunların dışında ileri evre prostat kanseri dahil birçok kanserde kullanılmaktadır.Dasatinibin esas hedefleri BCR-ABL, SRC,c-KİT,ephrlin reseptörleri ve diğer birçok kinazdır;ancak EGFR ve Her2 gibi erbB kinazları etkilemez.

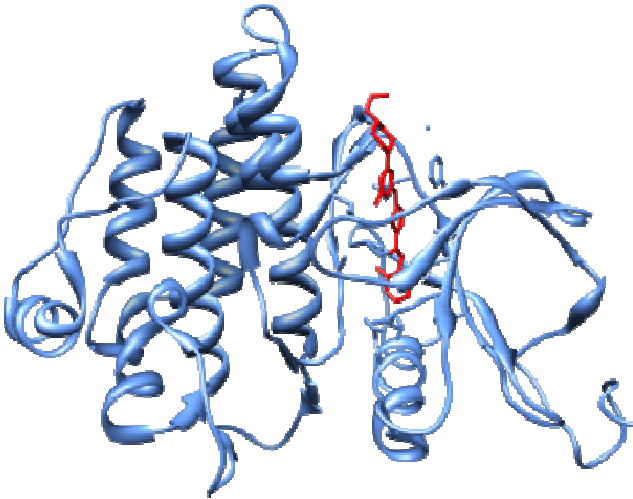
T315I mutasyonu dışındaki tüm BCR-ABL genotiplerine etkilidir.

**Toksisite:**

Nötropeni ve mielosupresyon en sık yan etkilerdir.Plevral effüzyon görülebilir,ayrıca daire,periferik ödem ve başağrısı gelişebilir. Bir kısım hastada karaciğer fonksiyon testi anormallikleri görülmüştür. Nadiren pulmoner arteriyel hipertansiyon gelişebilir.(144)

**Yan etkiler:**

2011 yılında FDA tarafından dasatinibin nadir fakat ciddi bir yan etkisi açıklanmıştır; pulmoner arteriyel hipertansiyon.(PAH) Bazı hastalar dasatinib 1 yıllık kullanımından sonra da PAH geliştirebilirler.(144)(145)



**Resim 4.** Dasatinib ile kompleks yapan (kırmızı) ABL kinaz bölgesinin (mavi) kristal yapısı (146)

İn vitro veriler dasatinibin kardiyak ventriküler repolarizasyonu (QT aralığı) uzatma potansiyeli olduğunu göstermektedir. Hipokalemi veya hipomagnezemili, konjenital uzun

QT sendromlu, antiaritmik ilaçlar alan veya QT uzamasına yol açan başka tıbbi ürünler alan ya da kümülatif yüksek doz antrasiklin tedavisi gören hastalarda Dasatinib dikkatle kullanılmalıdır. Dasatinib bir CYP3A4 substratı olup, sitokrom enzim sistemini inhibe eden ya da indükleyen ilaçlarla birlikte kullanımı plazma konsantrasyonlarında değişikliğe neden olabilir.

**Tablo 11.** İkinci kuşak TKİ seçimi (KML tanı/tedavi kılavuzu 2013,THD)

| <b>Eslik Eden Hastalıklara Göre:</b>                                                        |                 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| Hipertansiyon, akciğer hastalıkları :                                                       | Nilotinib düşün |
| Ağır diyabetes mellitus, pankreatit öyküsü :                                                | Dasatinib düşün |
| QT uzaması olan hastalarda hem nilotinib hem de dasatinib kullanımı özel dikkat gerektirir. |                 |

**Not:** Nilotinib ve dasatinib'i doğrudan karşılaştıran bir çalışma yoktur. Veriler bu iki TKİ'nin kullanıldığı farklı çalışmalarda izlenen yan etkiler, mutasyon-TKİ direnci ilişkisini yansıtan yayınlar ile uzman görüşlerinin bulunduğu derlemelerden elde edilmiş öneriler niteliğindedir.

### 2.6.5 Allojeneik Hematopoietik Kök Hücre Nakli (AHKHN):

KML'de bilinen tek küratif tedavi olan AHKHN bu hastalığın tedavisinde yaklaşık otuz yıldır uygulanmaktadır. Hematolojik malignitelerde ilk başarılı ikiz kardeşlerden hematopoietik kök hücre nakli, 1957-1959 yıllarında ED. Thomas ve arkadaşları tarafından uygulanmıştır. İlk dökümanate edilmiş başarılı allojeneik kemik iliği nakli ise, 1965 yılında bir akut lenfoblastik lösemi hastasına kardeşinden yapılmıştır.(147,148) Allojeneik kök hücre nakli için ideal olan akraba donör olmakla beraber, kök hücre nakli ihtiyacı olan hastaların yaklaşık %30'u için akraba donör bulunabilmektedir. İhtiyacı olan diğer hastalar için akraba dışı gönüllü donör bulunması amacıyla ulusal ve uluslararası kök hücre donör bankalarından araştırma yapılabilir.(147) Allojeneik kök hücre naklinde, hazırlama rejimi verilmesindeki temel amaç, altta yatan hastalığı tümüyle ortadan kaldırmak ve donör hücrelerinin kemik iliğine yerleşmesi için yeterli immün baskılanmanın sağlanmasıdır. Verilen hazırlama rejimi şekline göre daha iyi tümör/hastalık eradikasyonu sağlanırken, işleme bağlı mortalite riskini de arttırmakta, daha hafif olan hazırlama rejimlerinde

toksisite azalırken, hastalık relapsı önemli bir sorun olarak baş göstermektedir. Yaşlı hastalarda olası mortalite/morbiditeyi azaltmak amacıyla düşük yoğunluklu dozda myeloablatif olmayan (non-myeloablatif) transplantasyon alternatifi tercih edilir. Hazırlama rejimi sonrasında, donörden G-CSF yada GM-CSF ile indüklenerek aferez ile toplanmış olan kök hücreler (CD34+) santral ven yoluyla hastaya infüze edilir ve yaklaşık 2-4 hafta sonra engraftman gelişmesi beklenir. Donörden gelen T hücrelerinin , hasta dokusu antijenleri ile immün reaksiyon oluşturması ile oluşan GVHH ve infeksiyonlar AHKHN sonrasında gelişen en önemli sorunlardır .(147) KML’de AHKHN sonucuna etkili faktörler Gratwohl (EBMT) risk skorlaması olarak adlandırılan bir skorlama ile tanımlanmıştır. Bu sistem ile KML tanılı hastalarda nakilden sonraki yaşam, mortalite veya nüks olasılığı önceden hesaplanabilmektedir.

İkinci nesil TKI’ne 3-6 ay içinde sitogenetik yanıt olmayan olguların daha sonra yanıt verme olasılığı çok düşüktür ve donörleri varsa gecikmeden AHKHN yapılmalıdır. T315I mutasyonu olan olgular ikinci kuşak TKI’lerine dirençli kabul edildiğinden donörleri varsa en uygun seçenek AHKHN’dır. Yeni nesil TKI’lerle ikinci sıra tedavide elde edilen yanıtlar KML’de AHKHN’nin yerinin yeniden tanımlanmasına yol açmıştır.

ELN ve EBMT’nin KML için HKHN endikasyon kılavuzları dikkate alınarak çalışma grubu ortak görüşü ile oluşturulmuş güncel endikasyonlar tabloda gösterilmiştir.(149,150)

### EBMT Risk Skoru (151)

**Tablo 12.** Kronik Miyeloid Lösemide Allojeneik Hematopoetik Kök Hücre Nakli EBMT Risk Skoru (KML tanı/tedavi kılavuzu 2013,THD)

| Risk Faktörü                | Skor ve tanım                                     |
|-----------------------------|---------------------------------------------------|
| Hastalık evresi             | Kronik : 0, Akselere : 1, Blastik : 2             |
| Yaş                         | <20 yaş : 0, 20-40 : 1, >40 yaş : 2               |
| Tanıdan sonraki süre        | ≤1yıl : 0, 1 yıl üstü : 1                         |
| Donör tipi                  | HLA uygun : 0, diğerleri: 1                       |
| Alıcı-verici cinsiyet uyumu | alıcı Erkek, verici Kadın: 1; diğer durumlarda: 0 |

**Tablo 13.** Kronik Miyeloid Lösemide Allojeneik Hematopoetik Kök Hücre Nakli Endikasyonları (KML tanı/tedavi kılavuzu 2013,THD)

- Genç (< 20 yas) olgularda, akselere veya blastik evrede tanı konan hastalar ile imatinib tedavisi için uyarı faktörleri olan hastalarda başlangıçta donör aranması önerilir.
- İmatinibe yanıtı olmayan veya suboptimal yanıtı olan hastalarda erken dönemde donör araştırması yapılması önerilir.
- Kronik evredeki olgularda HKHN, EBMT risk skoruna ve 2. kuşak TKI tedavisine yanıt durumuna göre planlanır.
- İmatinibe yanıtı olmayan ve 2. kuşak TKI tedavisine dirençli ABL mutasyonu olmayan hastalarda; 2. kuşak TKI başlanmalı,

Bu olgular arasında

1. EBMT skoru 0-5 ve 2. kuşak TKI tedavisi sırasında; yanıtı olmayan, yetersiz yanıt veya 2. Kuşak TKI'lerine intolerans varsa HKHN en uygun seçenektir.
  2. Ek kromozom anomalisi, imatinib ile en azından minör SY elde edilememiş olması, tanıda Sokal risk skoru yüksekliği, imatinibe hematolojik yanıt kaybı varlığında ikinci kuşak TKI yanıt olasılığı düşük olduğundan bu olguların ilk 3 ve 6. aydaki sitogenetik yanıtları açısından yakından izlenmesi ve gereğinde allo-HKHN'ye yönlendirilmeleri önerilir.
- İmatinibe yanıtı olmayan ve 2. kuşak TKI tedavisine dirençli ABL mutasyonu olan hastalar doğrudan allo-HKHN'e yönlendirilir.
  - Tanı sırasında akselere/blastik evredeki veya İmatinib veya 2. kuşak TKI tedavisi sırasında akselere/blastik evreye ilerleyen olgular EBMT skoruna bakılmaksızın allo-HKHN'ye yönlendirilmelidir.
  - Tanıda ileri evrede olan hastalar mümkün olduğunca erken HKHN'e yönlendirilmelidir. HKHN hazırlığı sırasında imatinib veya yoğun tedavi± imatinib verilebilir ve en iyi yanıt elde edilmesinden hemen sonra HKHN'ye yönlendirilmelidir.

Not. Bu öneriler ELN ve EBMT'nin KML için HKHN endikasyon kılavuzları dikkate alınarak çalışma grubu ortak görüşü ile hazırlanmıştır. EBMT rehberine göre kronik evrede ilk seçenek tedavi olarak allo-HKHN, EBMT risk skoru 0-2 arasındaki genç olgularda, hasta özellikle tercih ediyor ise veya TKI'elde edilmesinin zor olduğu bölgelere sınırlanarak uygulanabileceği belirtilmektedir.

## 2.7 KML Tedavisiyle İlgili Bazı Önemli Çalışmalar

### 2.7.1. İmatinib:

İmatinib Food and Drug Administration (FDA) tarafından Mayıs 2001’de IFN tedavisine refrakter KML tedavisi, Şubat 2002’de GİST ve Şubat 2003’te primer KML tedavisi için onaylanarak kullanıma girmiştir.

İmatinib’in ilk Faz 1 çalışması ilk olarak Druker ve arkadaşları tarafından Haziran 1998’de kronik faz KML hastalarında gerçekleştirilmiştir. Bcr/Abl tirozin kinazın major substratı olan CRK oncogene like protein (CRKL)’nin fosforilasyonunu inhibe eden minimum doz 400 mg/gün olarak belirtilmiştir.

Kronik faz KML hastaları için güncel olarak imatinib başlama dozu 400 mg/gün’dür. Akselere ve blastik fazda 600 mg/gün dozuyla daha iyi yanıtlar alınmasıyla başlangıç tedavide de daha yüksek dozların uygulanması gündeme gelmiş ve bununla ilgili non-randomize faz 2 çalışmalar yapılmıştır. Yüksek doz imatinib tedavisi alanların yaklaşık üçte birinde 400-600 mg’a doz azaltımı gerekse de genel olarak iyi tolere edilmiş ve standart doza göre daha sık saptanan myelosupresyon, eritropoetin ve G-CSF kullanımıyla kontrol edilebilmiştir .(152,153)

Erken Faz KML’de başlangıçta imatinib kullanılmasının önemi hakkındaki en geniş kapsamlı çalışma IRIS (International Randomised study of IFN versus STI571) çalışmasıdır.

Prospektif, çok merkezli, randomize Faz 3 **IRIS çalışması**nda İmatinib; IFN+ARA-C ile karşılaştırılmış (her kolda 553’er olgu) ve 18. ayda tam hematolojik yanıt (%95’e karşın %55), majör sitogenetik yanıt (%87’ye karşın %35), tam sitogenetik yanıt (%76’ya karşın %15) ve akselere veya blastik faza progresyonsuz yaşam olasılığı (%97’ye karşın %91) açısından anlamlı olarak üstün bulunmuştur (tüm parametrelerde  $p<0.001$ ).

İmatinib koluna alınan 553 hastanın yaklaşık % 72’sinin, 54 aylık takip sonunda imatinib kullanmayı sürdürdüğü anlaşılmıştır.

Beşinci yılda güncelleştirilen verilere göre % 97 tam HY , % 88 majör SY, % 82 tam SY elde edildiği, genel sağkalım olasılığının yaklaşık % 90 bulunduğu, progresyonsuz

sağkalım olasılığının % 84 , akselere veya blastik faz gelişmeden sağkalım olasılığının %93 olduğu bildirilmiştir.

Sitogenetik yanıtı hastaların çoğunluğunun 6.ayda majör SY, 12. ayda ise TSY elde ettikleri ifade edilmektedir.TMY oranı düşüktür (ilk yıl <% 4) fakat ilk yıldan sonra da artabilmektedir (1. yılda 3 log, 4. yılda 3,4 log azalma) (majör MY: 1. yılda % 46, 4.yılda % 75).

IRIS çalışmasında yanıtı veya yan etkiler nedeniyle bir koldan diğerine çapraz geçişlere izin verildiğinden İFN+ARA-C kolundaki hastaların önemli bir kısmı (% 65) imatinib koluna geçmiş ve genel yaşam süresine ilişkin analizlerde imatinib kolundan beklenen üstünlük gösterilememiştir. Buna karşılık bazı retrospektif karşılaştırmalarda imatinib'in İFN içeren tedavilere göre yaşamı uzattığı bildirilmiştir .(154,155)

Risk gruplarına göre değerlendirildiğinde; İmatinib tedavisi alan yüksek, orta ve düşük Sokal riskli olgularda 42 aylık verilere göre SY oranları sırasıyla %69, %80 ve %88 (p:0.002), majör MY oranları %38, %45 ,%66, sağkalım olasılıkları ise %84,%91,%94 (p<0.001) bulunmuştur. Buna karşılık tam SY elde edilen olgularda sağkalım olasılığının başlangıç Sokal risk skorundan etkilenmeksizin % 92 ve üzerinde (%92,%93,%97, p=0,30) olduğu anlaşılmıştır. Akselere ve blastik fazdaki olgularda kronik faza göre , geç kronik faz olarak adlandırılan olgularda da erken kronik faza göre daha düşük yanıt beklenir. IRIS çalışmasının ardından KML tanılı hastalarda imatinib tedavisinin sonucuna etkili olabilecek parametreler ile tedavi etkinliği ile prognoz arasındaki ilişki gözlenmiş ve tedavi etkinliği veya etkisizliği tanımları yapılmıştır. Bu bulgular ve tanımlar bugün için KML tedavisinde rehber niteliği taşımaya aday bazı kaynaklardaki tedavi önerilerine dayanak oluşturmaktadır .(156,157)

Yüksek Sokal skorlu KML hastalarında imatinib'in 400 mg/gün dozunun 800 mg/gün dozuyla karşılaştırıldığı ELN tarafından yapılan randomize çalışmada, bir yıl içinde tam sitogenetik yanıt oranlarında yüksek doz alan grupta önemsiz bir artış gözlenirken (%64'e %58) 3. ve 6. aylardaki sitogenetik yanıt veya herhangi bir zamandaki moleküler yanıt oranlarında farklılık saptanmamıştır.

Randomize Faz 3 Tirozin Kinaz Inhibitor Optimization and Selectivity (**TOPS**) çalışmasında, tüm Sokal skorlarından toplam 476 yeni tanı kronik faz KML hastasında 400

ve 800 mg günlük imatinib dozları uygulanmış ve yüksek doz alan grupta 3. ve 6. aylarda daha hızlı majör moleküler yanıt ve tam sitogenetik yanıt saptanırken, 12. ay oranlarında anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Yüksek doz imatinib ile daha uzun hastalıksız ve genel sağkalım konusunda bir yargıya varmak için erken olsa da 400-800 mg'ı karşılaştıran non-randomize çalışmaların mevcut verilerine göre uzun dönem sonuçları benzerdir. (158,159)

İmatinib dirençli hastalarda doz artırılmasının yararını araştırmak için, imatinibe dirençli ve direnç geliştiren 54 kronik faz KML hastasında 300 yada 400 mg imatinib dozu günde iki katına arttırıldığında hematolojik direnci olan hastaların %65'inde tam hematolojik yanıt ve sitogenetik direnci olan hastaların %56'sında tam sitogenetik yanıt elde edilmiştir. Ancak doz artırılmasının hastaların önemli kısmında yararlı olduğu görülürken, yanıtların sürdürülebilir olmamasının sorun teşkil ettiği görülmektedir.

## **2.7.2. İkinci Kuşak Tirozin Kinaz İnhibitörleri:**

Dasatinib ve Nilotinib FDA tarafından İmatinib'e dirençli yada intolerans gösteren hastalarda onaylanarak, yaygın olarak kullanıma girmiştir. Dasatinib ve Nilotinib'i kronik faz KML hastalarında başlangıç tedavisi olarak İmatinib ile karşılaştıran faz 3 çalışmalarda, ikinci kuşak TKI'lerin daha çabuk ve daha üstün tedavi yanıtları oluşturdukları belirlenmiştir. Ancak uzun vadeli üstünlükleri ve sağkalımdaki avantajları konusunda ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

### **2.7.2.1. Nilotinib:**

Bir aminoprimidin olan Nilotinib ARG, KIT, PDGFR- $\alpha$  ve PDGFR- $\beta$ 'yı inhibe eder. Ancak Src, fms-benzeri tirozin kinaz 3 (FLT-3), VEGF reseptör ve EGF reseptör kinazları etkilemez. Öncelikle hücre kültüründe ve mürin modellerinde T315I mutasyonu haricinde imatinib'e dirençli mutantlara etkili olduğu gösterilmiştir. Nilotinib'in az duyarlı olduğu diğer mutasyonlar; Y253H, E255V/K ve F359V/C'dir.

İmatinib'e dirençli 119 KML hastasında yapılan Faz 1 çalışmada, değişen dozlarda kullanılan Nilotinib'in KML'nin tüm fazlarında etkin olduğu gösterilmiştir.(160,161)

Nilotinib'in esas olarak kabul görmesi İmatinib dirençli ve intoleran tüm fazlardaki KML hastalarında yapılan Faz 2 çalışmaya dayanmaktadır. %71'i imatinib dirençli, %29'u imatinib intoleran olan toplam 321 kronik faz KML hastası arasında, temel tedavi ile THY elde edilemeyen 206 hastanın 158'inde (%77) nilotinib tedavisi sırasında THY sağlanabilmiştir. 186 hastada (%59) MSY ve %46'sında TSY elde edilmiştir. Hastaların büyük çoğunluğunda (%84) MSY >18 ay sürüdürülmüş ve MSY ulaşma süresi ortalama 2,8 ay ile belirgin kısalmıştır. 18 aylık sağkalım %91 bulunmuştur (162)

Aralık 2009'da ilk 12 aylık sonuçları bildirilen **ENESTnd** (Evaluating Nilotinib Efficacy and Safety in Clinical Trials of Newly Diagnosed Ph+ CML Patients) çalışmasında kronik fazdaki KML'li hastalarda ilk seçenek olarak nilotinib 2x300 mg veya 2x400 mg ve imatinib'in (1x400 mg) etkinliği karşılaştırılmaktadır. Temel hedef noktası olarak hastalarda elde edilecek MMY alınmıştır. Bu oran 15. ayda değerlendirilebilen vakalarda her iki nilotinib doz kolu için de %57 ve imatinib için %33 olarak bildirilmiştir ve nilotinib lehine anlamlı bir farklılık saptanmıştır. MMY standart tanım olan uluslararası skalaya göre <%0.1 dir. Nilotinib ile imatinib karşılaştırıldığında, bu değerin daha altındaki değerlerin nilotinib ile derinliğinin daha fazla olduğu bildirilmiştir. Ayrıca 12.ay sonunda hastalığın akselere faz veya blastik krize dönüşme oranı nilotinib 2x300 mg kullananlarda %0.7 ve nilotinib 2x400 mg kullananlarda ise %0.4 olarak bildirilmiştir. Bu oranlar, imatinib 1x400 mg kullanan hastalarda görülen %3.5 oranından belirgin bir şekilde düşüktür. 15 aylık veriler, daha önce yayınlanmış 12 aylık veriler olan nilotinib 2x300 mg ile %44, nilotinib 2x400 mg ile %43 ve imatinib 1x400 mg ile %22 olan MMY verilerine göre daha iyidir. Nilotinib 2x300 mg kullanan hastalarda en az yan etki gözlendiği ve hastaların çalışmaya devam ettikleri bildirilmiştir. ENESTnd verilerine göre nilotinib için imatinibe göre hem MMY, hem de TSY olarak belirgin bir şekilde daha iyidir. Nilotinib ile imatinibe göre daha hızlı bir şekilde TSY ve MMY elde edilmektedir. Bu özelliğin ilerki yıllarda nilotinib kullanan hastalarda da hastalığın seyrine olumlu bir şekilde yansıtacağı beklenmektedir. Etkileri nedeniyle nilotinib, Amerika Birleşik Devletleri'nde FDA tarafından öncelikli değerlendirmeye alınmış ve Ağustos 2010'da KML'li hastaların ilk seçenek tedavisinde onay almıştır. (163,164)

### 2.7.2.2. Dasatinib:

Tiyazolkarboksamid yapıda bir çift kinaz inhibitörü olan Dasatinib; Bcr/Abl tirozin kinaz aktivitesini inhibe ederken, benzer yapıdaki Src ailesi kinazlarını da inhibe eder. PDGFR, C-kit ve Ephrin-A reseptör kinaz'ı da güçlü şekilde inhibe eden Dasatinib, T315I ve muhtemelen F317L haricindeki in vitro dirençli Bcr/Abl mutantlarına İmatinib'den yaklaşık olarak 300 kat daha etkindir .(164,165,166,167)

Yapılan Faz 2 çalışmalar sonucunda İmatinib'e dirençli KML'de kullanımı kabul gören Dasatinib ile ilgili en geniş ve önemli çalışma **START-C** (Src/Abl Tirozin Kinaz Inhibition Activity Research Trial C) çalışmasıdır. 288 imatinib dirençli ve 99 imatinib intoleran olmak üzere toplam 387 hastaya günde iki kez 70 mg Dasatinib verilmiş ve medyan 15,2 aylık izlem süresinin sonunda THY %91, MSY %59 ve TSY %49 saptanmıştır. Yanıtlar uzun süreli olup, MSY gelişenlerin %97'sinde 18. ayda da yanıt durumu korunmuştur. Hastalıksız sağkalım oranı %90 iken, genel sağkalım %96 bulunmuştur.(168)

Bu Faz 3 çalışmada imatinib dirençli ve intoleran olan toplam 670 kronik faz KML hastasına dört farklı dozajda Dasatinib verilmiştir (1x100 mg, 2x50 mg, 1x140 mg, 2x70 mg). Günlük 1x100 mg dasatinib verilen hasta grubunda, 2x70 mg alan grupla kıyaslandığında MSY oranları benzer bulunurken, plevral effüzyonu da içeren grade 3/4 hematolojik ve non-hematolojik yan etki oranlarında azalma gözlenmiştir. Bu bulgulara dayanarak kronik faz KML'de 1x100 mg.dasatinib dozu 2006 yılında FDA tarafından onaylanmış olup, güncel olarak kullanılmaktadır. Akselere ve blastik faz KML'li hastalarında ise 2x70 mg ve 1x140 mg dozları kullanılmakta olup, günde tek doz uygulamasıyla ile benzer hematolojik ve sitogenetik yanıt oranları elde edilmiş ve sıvı retansiyonu yan etkisi daha az bulunmuştur.(169,170,171)

Daha önce imatinib ile hiç MSY elde edilememiş olan imatinib dirençli hastaların %55'i dasatinib ile MSY'a ulaşmıştır. T315I dışında imatinib direnci ile ilişkili Bcr/Abl mutasyonlarının bir türünü barındıran hastalarda THY ya da MSY'a ulaşılmıştır. 2.yılda MSY oranları herhangi bir baz çizgisi Bcr/Abl mutasyonu, P-loop mutasyonu olan ya da hiç mutasyonu olmayan hastalar arasında benzer (sırasıyla %63, %61 ve %62) bulunmuştur. Ancak in vitro olarak T315I dışında, Q252H, E255K/V, V299L, F317L mutasyonları da dasatinib'e daha az duyarlı olarak saptanmıştır.

Faz 3 **DASISION** çalışmasında, yeni tanı 519 KML hastası, Dasatinib 100 mg (n:259) ve İmatinib 400 mg (n:260) olarak randomize edilmiş olup, suboptimal yanıtı olan %5 hastada doz arttırımına gidilmiştir. TSY oranları Dasatinib için %83, İmatinib için %72 (p=0,0011) saptanmış olup, primer sonlanım noktası olan 12.aydaki TSY oranları Dasatinib için %77, İmatinib için %66 (p=0,0067) bulunmuştur. 12.aydaki MMY oranları Dasatinib lehine %46'ya %28 olup (p<0,001), herhangi bir zamanda MMY elde etme oranı Dasatinib'de İmatinib'e göre yaklaşık iki kat fazla olmuştur. MMY'a ulaşma süresi ortalama olarak Dasatinib'de 6,3 ay, İmatinib'de 9,2 ay olarak saptanmıştır. Yan etkiler açısından grad 3-4 anemi ve nötropeni oranları benzer olmakla birlikte, trombositopeni dasatinib kolunda daha sık (%19'a %10) gözlenmiştir.

## 2.8.Yeni Tedavi Yaklaşımları

**Aurora Kinaz İnhibitörleri** - T315I gibi daha direçli bcr-abl varyantlarına etkili tek başına veya kombinasyon olarak kullanılabilecek farklı yapıda ajanların geliştirilmesi için çabalar sürmektedir. MK-047'nin (önceden VX-680 olarak bilinmekteydi) kardiyak toksisite nedeniyle çalışması durdurulmuştur.Diğer aurora kinaz inhibitörleri ile çalışmalar mevcuttur.(172,173,174)

**Danuserib (PHA-759358)**- Aurara kinaz inhibitörüdür. Cortes franco ve arkadaşları imatinib dirençli ,imatinib intoleransı olan ve dasatinib veya nilotinibe yanıt alınamamış 23 hastayı değerlendirmiştir. İshal ,ateş, grade 3 senkop ve diğer toksisiteler hastaların yaklaşık %50'sinde görülmüştür. 14 hastanın 6'sında (%43) yanıt alınmıştır. Ponatinibe göre etkinliği daha azdır ve intravenöz kullanılması dezavantajdır.(175)

**Bosutinib (SKI606)** - Abl ve src yolaklarını etkileyen dual kinaz inhibitörüdür. Kit veya PDGF üzerine etkisi yoktur.[124] İmatinibe dirençli (%90) ve intoleransı olan Ph pozitif KML veya ALL tanılı 69 hastayla faz 1 -2 çalışma yapılmıştır. %84 tam hematolojik ,%52 major sitogenetik yanıt elde edilmiştir. T315I'ye karşı etkili değildir.[125] Faz 3 çalışmasında ise 48.haftaya kadar hastaların %81.4'ünde tam sitogenetik yanıt ,ortalama 8 haftada %82,6 tam sitogenetik yanıt ve 61.haftaya kadar %40,6 majör moleküler yanıt sağlanmıştır. Genel olarak hastaların %22,2'si tedaviye devam edememiştir.(176)

**Ponatinib (AP24534)** – T315I mutasyonuna da etki edebilen farklı özellikte 3. Kuşak tirozin kinaz inhibitörüdür.(Pan-BCR-ABL inhibitörüdür)T315I mutasyonu KML'deki ilaç

dirençlerinin %15-20'sinden sorumludur. ARIAD'ın yaptığı **PACE** (Ponatinib Ph+ ALL and CML Evaluation) çalışması ile Eylül 2010'dan beri hastalar toplanmaktadır. American Society of Hematology 'nin 2010 yılı toplantısında ilaca dirençli ve refrakter KML hastaları ile Ph pozitif ALL hastalarında ponatinibin etkisiyle ilgili faz 1 çalışma sonuçları açıklandı. Ponatinib ile tedavi edilen kronik fazdaki KML hastalarının %66'sında ve T315I mutasyonu olanların hepsinde major sitogenetik yanıt elde edilmiştir .(177)

Ponatinib, Aralık 2012 de rezistan ve intoleran KML hastalarının tedavisinde FDA onayı almıştır.

**Omeceaxatine** – Önceleri homoharringtonine olarak bilinmekteydi. Bcr-abl kinaz mutasyonundan bağımsız (Non BCR-ABL ajan) olarak etkili olduğu fareler üzerinde gösterilmiştir. T315I mutasyonu olan 66 hasta ile faz1/2 çalışma yapılmıştır. (CGX-635-CML-202) (178) Bu çalışma 2014 yılında halen devam etmektedir. (179) Eylül 2012 de FDA omacetaxini diğer ilaç tedavilerine dirençli KML tedavisinde onaylamıştır.

**Bafetinib:** Bu ilaç KML tdavisindeki yerini, T315I haricindeki imatinibe dirençli bazı mutasyonlara ve dasatinibe dirençli bazı mutasyonlara olan etkisi ile almıştır. Bafetinib,BCR/ABL ye karşı dasatinibden az fakat nilotinibden daha fazla afiniteye sahiptir.Sadece BCR/ABL ve SRC kinaz ailesi;Lck ve Lyn i hedef alır(180)

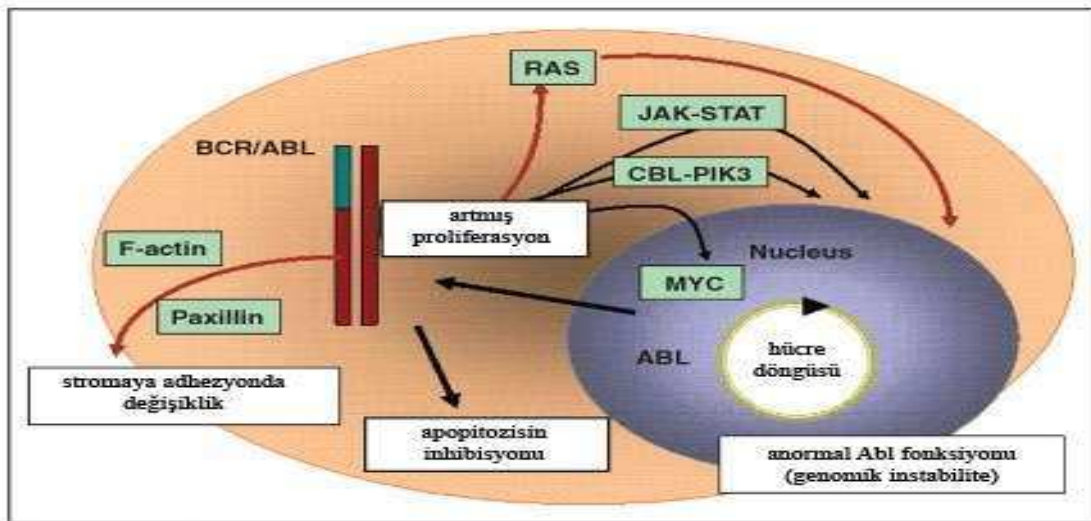
**Tablo 14.** Tirozin kinaz inhibitörleri (www.wikipedia.com dan alınmıştır.)

|                          |                       |                    |                        |                     |                      |                      |
|--------------------------|-----------------------|--------------------|------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| Tirozin kinaz inhibitörü | imatinib (STI571)     | nilotinib (AMN107) | dasatinib (BMS-345825) | bosutinib (SKI-606) | ponatinib (AP-24534) | bafetinib (INNO-406) |
| Kullanım alanı           | Birinci tercih tedavi | 2.kuşak            | 2.kuşak                | 2.kuşak             | 2.kuşak              | Faz 2 klinik çalışma |

## 2.9.Lösemik Dönüşümde Rol Oynayan Sinyal İleti Mekanizmaları

Sinyal iletiminde, ekstraselüler sinyali, intraselüler sinyal sistemine ileten/yansıtan membran reseptörleri oldukça önemli rol oynamaktadır. Aktivasyon ve hemen ardından gelen inhibisyon sürecinde en önemli olay fosforilasyon ve defosforilasyondur.

Paylaşılan reseptör altbirimlerinin rolü olabildiği gibi, ortak transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu da rol oynayabilmektedir. KML ve ALL etyopatolojisinde yer alan Bcr/Abl füzyon geni ve buna bağlı mitojenik sinyal yollarının aktivasyonu bugün için aydınlatılmış durumdadır. Bcr/Abl füzyon geni neticesinde tirozin kinaz aktivitesi ile Ras, Raf, PI3K, JNK/SAPK, Crkl ve STAT5 aktivasyonu ile, apoptozis inhibe olmakta ve proliferasyon uyarılmaktadır. Bcr/Abl füzyon proteini, üzerindeki tirozin rezidüleri sayesinde daimi bir fosforilasyona ve aktivasyona gitmekte ve Cbl, Crkl, Shc, Grb2 gibi adaptör proteinlerin devreye girmesine ve Ras, PI3K, paxillin ve talin gibi fokal adezyon moleküllerinin, diğer sinyal ileti sistemlerinin aktivasyonuna yol açmaktadır .(181)



Şekil 5. Mitojenik sinyal yolları

### 2.9.1. MAP Kinaz ve Ras/Raf/MEK/ERK Sinyal İletim Yolu:

MAP kinazlar, “Mitogen-activated protein kinases” süper ailesinde yer alırlar. Ökaryotik hücrelerin tümünde mevcut olan bu proteinler hücre membranından çekirdeğe bilgi aktarılmasında önem taşımaktadır. Bu sinyal iletimi kaskadları, embriyogenezis, yaşama, çoğalma, diferansiasyon ve apoptozis işlevlerinin düzenlenmesinde rol alır. MAP kinazlar üç ana gruba ayrılır.

1. p38 MAP kinaz ailesi,
2. “Extracellular signal regulated kinase (ERK)” ailesi,
3. “c-Jun NH2- terminal kinase (JNK)” ailesi.

İnsan tümörlerinin %30’unda Ras/Raf/MEK/ ERK yolunun aşırı aktivasyonu söz konusudur. Bu iletim yolu Ras aktivasyonu ile başlar ve sırasıyla Raf (= MAPKKK), MEK (= MAPKK) ve Erk (= MAPK) proteinleri ile kinaz kaskadı ilerler. Ras ve Raf protoonkogendir. Ras’ın aktivasyonu Ph (+) lösemilerin patogeneğinde önemlidir.(182,183,184,185)

### **2.9.2. PI-3 Kinaz/Protein Kinaz B Sinyal İletim Yolu:**

Fosfatidilinositol-3 (PI-3) kinaz enzim aktivitesi Ph pozitif hücrelerin çoğalması için gereklidir. Bcr/Abl füzyon proteini aktivatör moleküllerle birleşerek PI-3 kinazın aktivasyonuna neden olur. Bu yolda bir sonraki hedef molekül, bir serin-treonin kinaz olan Akt (Protein Kinaz B olarak da bilinir) dır. Serine/treonin kinaz Akt aktivitesi, hücresel yaşamın devamı için önemli bir yoldur.(182)

### **2.9.3. Myc Sinyal İletim Yolu:**

Transkripsiyon faktörleri özel DNA regülatör bölgelerine bağlanarak DNA replikasyonu ve hücre bölünmesi için gerekli genlerin transkripsiyonunu sağlar. Nükleer transkripsiyon faktörlerini etkileyen mutasyonlar sıklıkla malign transformasyona eşlik eder. Miyelositomatozis onkogeni (Myc) tüm ökaryotik hücrelerde ifadenirken büyüme uyarısı alan hücrelerde ifadenmeleri artar ve geçici yükselmenin arkasından miktarı hemen azalır. Birçok insan malignitesinde Myc onkogeninin ürünü olan onkoproteinin aşırı ifadenmesi gösterilmiştir ki bu da hedef genlerin sürekli transkripsiyonu ve onkojenik transformasyonuna neden olmaktadır.(186,187)

#### 2.9.4. Jak/Stat Sinyal İletim Yolu:

Sitokin dönüştürücü sinyallerin en iyi bilinen şekli bir enzim olan Janus Kinaz'lar (JAK) ve sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) olarak adlandırılan transkripsiyon faktörleridir.(188,189)

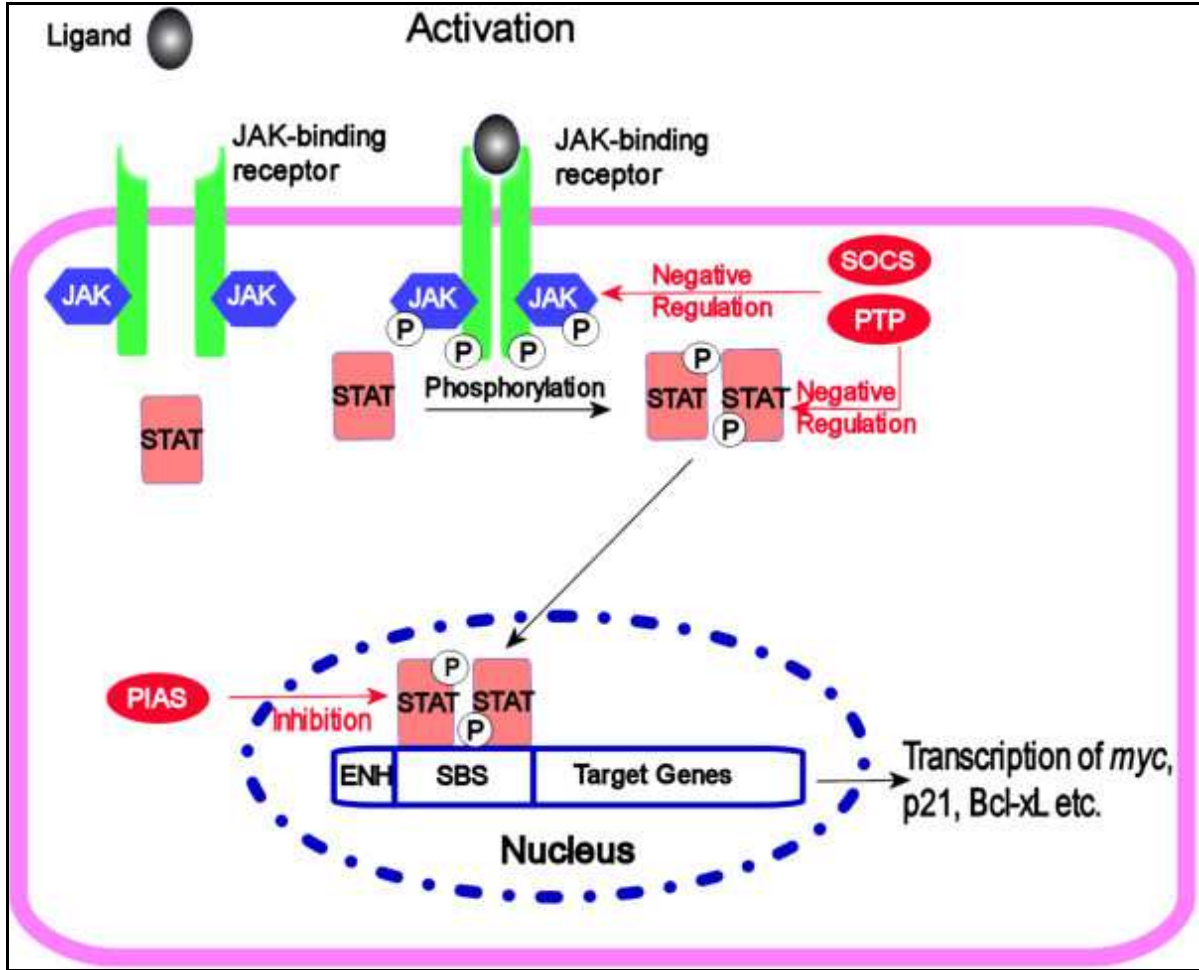
İnaktif JAK enzimleri Tip 1 ve Tip 2 sitokinlerinin sitoplazmik uçlarına tutunmuştur. Sitokin molekülünün bağlanması ile iki reseptör molekülü bir araya gelir, reseptör ilişkili JAK fosforilasyon yoluyla aktive olur, sonrasında reseptörlerin sitoplazmik bölgelerindeki tirozin rezidülerini fosforile ederler. Reseptörlerin bazı fosfotirozin alanları reseptörüne tutunan monomerik, sitozolik STAT proteinlerinin Src homolog 2 (SH2) uçları tarafından tanınır. Daha sonra STAT proteinleri reseptörle uyarılan JAK kinazlar tarafından fosforile edilirler. STAT proteinlerinin SH2 ucu başka bir STAT proteininin fosfotirozin rezidüsüne bağlanma yeteneğine sahiptir. Sonuç olarak iki STAT proteini birbirine bağlanır ve reseptörden ayrılırlar. STAT dimerleri nükleusa göç eder, sitokine cevap veren genin promotor alanlarındaki DNA sekanslarına bağlanır ve gen transkripsiyonunu aktive ederler.(57)(188) Değişik STAT proteinlerinin SH2 uçları seçici olarak fosfotirozin rezidülerine bağlanır ve farklı sitokin reseptörlerinin yanında yer alır.

JAK/STAT yolağının çok sayıda negatif regülasyon mekanizmaları belirlenmiştir. Sitokin Sinyali Baskılayıcısı (SOCS) olarak bilinen proteinler STAT yolağı inhibitörleridir. Bunlar SH2 ucu bulundurmalarıyla ayırt edilirler ve SOCS kutusu (SOCS box) denilen 40 aminoasitlik C terminali ile ilişkilidirler. İlginç olarak inhibitör aktiviteleri için SOCS box'lerden ziyade SOCS'un en terminal uçları gereklidir. SOCS-1 knock out fareler IFN-gamma aktivitesinin fazlalığı nedeniyle üç haftada ölürlür. SOCS protein ekspresyonu JAK/STAT yolağını aktive eden aynı sitokin tarafından uyarılır. Sonuç olarak bu durumlar negatif feed back inhibisyonu ile düzenlenir.(189)

Memelilerde, JAK1, JAK2, JAK3 ve tirozin Kinaz 2 (Tyk2) olmak üzere 4 tip JAK bulunmaktadır. Sitokinlerin ilgili reseptöre bağlanması ile JAK aktive olur ve aktivasyon uygun STAT molekülünün ilişkili promotor bölgeye bağlanması ile devam eder.

STAT protein ailesinin yedi üyesi bulunur: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B ve STAT6. Özellikle STAT3 ve STAT5, kontrolsüz çoğalan, apoptoza uğramayan, immun sistemden kaçan ve anjiogenezi uyaran tümör hücrelerinde yüksek

oranda ifadelenirler . Devamlı olarak aktif olan STAT proteinleri antiapoptotik yolları uyararak karsinogeneizde etkili olur.(190,191)



193 numaralı kaynaktan alınmıştır.

JAK-STAT yolagının negatif regülasyonufosfo-tirozin fosfatazlar(PTP), SOCS ailesi proteinleri ve PIAS proteinleri (kırmızı ile gösterilmiştir) aracılığı ile sağlanmaktadır.

**Şekil 6.** JAK/STAT Sinyal İletim Yolağı: Bu yolak, ekstrasellüler polipeptidlerden alınan sinyalleri nukleusta bulunan hedef genlerin promoterlerine iletmekle görevlidir. JAK/STAT sinyalleşmesi, immunité fonksiyonlarını, gelişim, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve apoptozis gibi pek çok hücresel fonksiyonu düzenler. Yolağın primer elemanları, sessiz transkripsiyon faktörleri olan STAT proteinleridir. STAT' lar aktivasyon öncesinde fosforile değillerdir ancak sitoplazmada dimerleştikten sonra aktive olarak fosforile forma geçerler. Aktif paralel STAT dimerleri, nukleusa girerek özgül DNA hedeflerine bağlanırlar. STAT' ların aktivasyonu, nukleer protein tirozin fosfatazların STAT' ları defosforile etmesiyle sonlanır ve defosforile STAT tekrar sitoplazmaya geri döner.

### 3. MATERİYAL VE METOD

Çalışmamızda; K562 kronik myelositer lösemi hücre hattında, ikinci kuşak bir tirozin kinaz inhibitörü olan Dasatinib'in apoptozisi JAK/STAT sinyal ileti yolağı üzerinden indükleyip indüklenmediğinin gösterilmesi hedeflenmiş olup, bu amaçla trypan blue ve XTT metodu ile sitotoksitenin analizi ve IC50 dozlarının tespit edilmesi, daha sonra qRT-PCR yöntemi ile m(RNA) transkriptleri ve hedef genlerin ekspresyon seviyeleri saptanması, cell death detection kit yöntemi ile spektrofotometrik olarak 24-96 saatler içerisinde apoptozis oranlarının belirlenmesi ve Western Blot metodu ile protein miktarının saptanması gerçekleştirilmiştir. Bütün bu aşamalardan sonra elde edilen sonuçlar, istatistiksel değerlendirme sonucunda, tablolar ve grafikler olarak ifade edilecektir.

#### 3.1. Lösemik Hücre Hattı Ve Hücre Kültürü

##### 3.1.1. K562 KML hücre hattının özellikleri:

K562 hücreleri kronik miyeloid löseminin blastik kriz evresinden kaynaklanan miyeloid seri hücre dizileridir. ( **kronik miyeloid lösemi hücre dizisi K-562 [(Human Caucasian Chronic Myelogenous Leukemia) – ECACC (European Collection of Cell Cultures), Morphology: Lymphoblast, Katalog no: 89121407, Lot no: 06/A/015]] kullanılmıştır.**)

Glutasyon sistemi, oksidatif stres, eritroid farklılaşma ve anti-kanser tedavilerinin geliştirilmesi ile ilgili çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Elektron mikroskopunda bakıldığında K562 hücreleri kolay bağıntılı, düzgün şekilli, kısa mikrovillüslü, farklılaşmış lösemik hücrelerine benzer şekilde görülebilir. Giemsa ile hazırlanmış preparatlarda K562 hücreleri yaklaşık 20 µM çapında iki ya da daha fazla parçalı nükleuslu farklılaşmamış blast hücreleri olarak tanımlanabilir. Kültür mediumunda süspansiyon olarak büyüyen K562 hücrelerinin iki kat artma süreleri ortalama 12 saattir.

K562 hücrelerinde, normal kromozom sayısının yaklaşık 1,5 katı kromozom bulunur. Bundan dolayı bu hücre serisinde bcr/abl füzyon geni ekspresyonu nedeniyle apoptozise karşı direnç vardır. Hücre kültüründe kolayca çoğaltılabilen K562 hücrelerinin sitotoksite ve apoptozis çalışmaları için kullanımı yaygındır. Kültürde spontan olarak

apoptozise gitmeyen K562 hücrelerinde farklı maddelerle apoptozisi indüklemek başarılı sonuçlar elde edilmesini sağlar.

### **3.1.2. K562 hücre hattında kullanılan besiyeri ve kültür işlemleri:**

Çalışmamızda; KML hücre hattı olan k562, 37 C’de ve %5 CO<sub>2</sub>’li humidifiye edilmiş inkübatörde, stabil %1 L-glutamin içeren RPMI-1640 besiyerine (Kibutz Beit Haemeh, 25115, Israel), %10 ısı ile inaktive edilmiş fetal sığır serumu (Life Technologist) ve 10.000 ünite/ml penisilin eklenerek çoğaltıldı. Hücre kültür işlemleri ultraviyole ile sterilize edilen Laminar Hood (Nu Aire, USA) içerisinde gerçekleştirildi.

### **3.1.3. Dondurulmuş hücre hattının çözülmesi:**

Kriyotüpler içinde -80 C’de %10 dimetilsülfoksit (DMSO) ile dondurulmuş olan hücre hattı, azot tankından çıkartıldıktan sonra 37 C’de çözüldü. İşlem öncesinde Hood 30 dakika ultraviyole ile sterilize edildi ve ardından içi alkol ile temizlendi. Çözülen hücrelerin üzerine 10 ml besiyeri eklendikten sonra 1000 devir/dk.’da 10 dakika santrifüf uygulandı. 37 C’de DMSO’nun hücreler üzerine olan toksik etkisi, hücre canlılığının azalmasına neden olacağından, bu işlemler mümkün olduğunca seri şekilde yapıldı. Santrifüj sonrasında üstte kalan süpernatant atılarak, kalan hücre çökeltisi üzerine taze besiyeri eklenerek homojenize edildi. Daha sonra, toksik maddelerin uzaklaştırılması için tekrar santrifüj işlemi yapıldı. Yine süpernatant atıldıktan sonra, hücre çökeltisi 10-15 ml’lik taze besiyeri eklenerek homojenize edilip, 50 ml’lik flasklara steril olarak aktarıldı.

### **3.1.4. Hücre hattının pasajlanması:**

Hazırlanan flasklar inkübatöre yerleştirildikten sonra, hücre hattının canlılığını koruması ve devamlılığın sağlanması amacıyla ikilenme zamanına (doubling time) uygun olarak pasajlama işlemi yapıldı. Bu süre k562 hücre hattı için 48 saat olarak belirlenmiş olup, pasajlama işlemi için öncelikle flask içindeki hücreler besiyeri ile birlikte 50 ml’lik falcon tüplere aktarıldı. 1000 devir/dk’da 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atılarak, hücre çökeltisi üzerine besiyeri eklenerek yavaşça vortekslendi ya da pipetleme yapıldı. Her pasaj sırasında yaklaşık 2 milyon hücre/10 ml. besiyerinde olacak şekilde flasklara aktarım yapıldı. Pasaj yapılan hücreleri içeren flasklar inkübatöre yerleştirilerek çoğalmaya bırakıldı.

### 3.1.5. Hücre sayımı ve canlılığın değerlendirilmesi:

Hücre sayısı; besiyerinin mililitresi (ml) başına ya da tutunulmuş yüzeyin santimetre küpü (cm<sup>3</sup>) başına düşen hücre sayısı olarak belirtilebilir. Hücre sayısına göre yapılan işlemlere bağlı olarak hücre kültürünün durumunu izlemek mümkün olur. Hücre sayımı otomatik sayım cihazı (Cellometer) ile yapılabileceği gibi, bizim çalışmamızda Hemositometre (sayma odacığı) metodu kullanılmıştır. En sık kullanılan Neubauer hemositometresi iki eşdeğer bölgeye sahiptir ve lamel doğru pozisyonunda ise sayma odacığının derinliği 0,1 mm'dir. Hücre süspansiyonu odacığa mikropipetler yardımıyla yerleştirilir ve mevcut hücre sayısına göre hücreler karelerin üçlü çizgilerle çevrelenmiş olduğu merkezi bölgelerde sayılabilir. Sol ve üst üçlü çizgilerdeki hücreler sayıma dahil edilir. Bu bölmelerin alanı 1 mm<sup>2</sup>'dir. Böylece hacmi 0,1 mm<sup>3</sup> olur. Bu alandaki tüm hücreler sayılırsa N: 0,1 mm<sup>3</sup>'teki mevcut hücre sayısı ve 1 ml yani 1 cm<sup>3</sup>'teki hücre sayısı:  $2N \times 10^4$  olur.

Hücre süspansiyonu trypan blue gibi bir canlılık boyası ile dilüe edildiğinde, canlı hücreler boyayı metabolize edip hücre dışına attıklarından beyaz, küçük, yuvarlak ve refraktil olarak görünürler. Ölü hücreler ise membranları boyaya geçirgen olduğundan şiş, büyük ve koyu mavi hale gelirler. Bu özellikler doğrultusunda hücreler, inverted mikroskop kullanılarak, canlılık, çoğalma ve enfeksiyon yönünden değerlendirilmiştir.

### 3.2.Sitotoksosite Çalışmaları

K562 hücrelerinde dasatinib'in sitotoksitesinin değerlendirilmesi ve IC50 dozlarının saptanması için öncelikli olarak Tripan mavisi metodu uygulanmış, akabinde hücreler; kontrol, 24, 48 ve 72. saatlerde XTT (2,3-bis [2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt) solüsyonu kullanılarak spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. Reaktifler 50/1 XTT ajanı (Labelling reagent)/Aktivasyon ajanı (electron coupling reagent) olacak şekilde karıştırılarak XTT solüsyonu hazırlanmıştır.

XTT suda çözünen bir tetrazolium tuzudur. Canlı hücrelerin mitokondrilerindeki dehidrogenaz enzimi ile parçalandığında çözülebilir formazana dönüşmektedir. Formazandan kaynaklanan turuncu renk reaksiyonu, spektrofotometrik olarak okunup, kantite edilmektedir. Boyanın yoğunluğu, metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile

orantılıdır. Kuyucuklardaki aktif hücrelerin sayılarının çokluğu ise, mitokondriyal enzimlerin aktivitesinin çokluğu ile doğru orantılıdır.

Çalışmalar için deneylerde 96 kuyucuklu mikrolateler kullanılmıştır. Tripan mavisi ile canlılığı doğrulanan lösemi hücre hatları, 96 kuyucuklu mikrolatelerde  $3 \times 10^3$  hücre/ml olacak şekilde düzenlenmiştir. Her ölçüm aşaması (kontrol, 24, 48, 72 ve 96. saat) için ayrı bir mikrolate hazırlanmıştır. Her bir kuyucuğa 100 µl hücre süspansiyonu ve kontrol dışındaki kuyucuklara belli konsantrasyonlarda ilaç eklenmiştir. Toplam hacim, besiyeri ile 200 µl' ye tamamlanmış olup negatif kontrol olarak hücre ve etken madde içermeyen 200 µl besiyeri kullanılmıştır. Mikrolateler nemli, 37 °C'de ve %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edilmektedir. 24, 48, 72 ve 96. saatlerde birer mikrolate alınarak her kuyucuğa 20 µl XTT solüsyonu eklenmiş ve dört saat daha inkübe edilmiştir. 492 referans aralığında ve 630 nanometre dalga boyunda her bir kuyucuğun absorbans değeri, negatif kontrol sıfır absorbans olarak kullanılıp spektrofotometrede (ELISA) okutulmuş ve sitotoksosite yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Sitotoksosite} = 1 - (\text{Ölçülen optik dansite değeri} / \text{kontrol değeri}) \times 100$$

### **3.3. PCR ile STAT 5A ve 5B transkript düzeylerinin saptanması**

#### **3.3.1.K562 hücrelerinde STAT Ekspresyonlarının Belirlenmesi:**

K 562 hücre hatlarında gözlenen STAT5A ve STAT5B mRNA ekspresyon düzeyleri belirlenecektir. Bu amaçla hücrelerden total RNA izolasyonunu takiben cDNA reaksiyonu ve gen ekspresyon analizi çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

#### **3.3.2. Total RNA İzolasyonu:**

- Süspanse halde bulunan hücrelerden 1'er ml alınıp, hücreler çöktürüldükten sonra 200 µl serum fizyolojik içinde süspanse edilir.
- Üzerlerine 400 µl Lysis Binding Buffer eklenir. Karışım pipetle iyice resüspanse edildikten sonra, cam lifli filtreli tüpe aktarılır.
- 10.000 rpm' de 15 saniye santrifüj edildikten sonra, filtrenin altına geçen süpernatant atılır.
- 90 µl DNase Incubation Buffer + 10 µl DNase' dan oluşan karışım hazırlanır ve tamamı filtreli tüpe aktararak 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır.

- İnkübasyonu tamamlanmış hücrelerin üzerine 500 µl Wash Buffer I eklenip, 10.000 rpm’ de 15 saniye santrifüj sonrasında süpernatant atılır.
- 500 µl Wash Buffer II eklenip, 10.000 rpm’ de 15 saniye santrifüj sonrasında süpernatant atılır.
- Hücrelerin üzerine 200 µl Wash Buffer II eklenip, 13.000 rpm’ de 2 dakika santrifüj sonrası filtre yeni bir Eppendorf tüpe aktarılır.
- 50 µl Elution Buffer eklenip, 10.000 rpm’ de 1 dakika santrifüj edildikten sonra tüpte kalan çözelti total RNA’ mızı oluşturur.

### **3.3.3.cDNA Reaksiyonu:**

İzole edilen total RNA’ ların RT-PCR (revers transkriptaz - PCR) ile komplementer DNA’ ya (cDNA) çevrilmeleri için, FirstStrand cDNA Synthesis kit protokolüne göre thermal cycler’ da PCR’ ları gerçekleştirilmiştir. Bunun için 10 µl total RNA önce 65°C’ de 10 dakika denatüre edilmiştir. Sonra, cDNA reaksiyonu için aşağıdaki reaksiyon karışımı hazırlanır:

Reaksiyon Karışımı

PCR seviyesindeki su: 4,4 µl

5x Reaksiyon Tamponu:4,0 µl

Random Primer:0,2 µl

dNTP:0,4 µl

AMV Reverse transkriptaz: 0,4 µl

RNase İnhibitör:0,6 µl

Bu şekilde hazırlanan karışıma 10 µl denatüre edilmiş total RNA eklendikten sonra örnekler 37°C’ de 1 saat, 65°C’ de 10 dakika ve 4°C’ de 5 dakika duracak şekilde programlanan thermal cycler cihazına yerleştirilir. Amplifikasyon süresinin sonunda cDNA elde edilir. cDNA reaksiyonu sonrasında mRNA seviyesindeki STAT gen ekspresyonlarının LightCyler cihazıyla belirlenmesi aşamasına geçilir.

### **3.3.4. STAT Ekspresyonlarının Belirlenmesi:**

Elde edilen cDNA’ lardan STAT5A ve STAT5B ekspresyonları belirlenir. Bu amaçla, hedef STAT genlerine özgül olarak dizayn edip sentez ettirilen primer ve proplar (TibMolBiol, Germany), Fast Start DNA Master Hybridisation Probes (Roche Applied Science, Germany) ve G6PDH House Keeping Gene Seti (Roche Applied Science,

Germany)kitlerinin özellikleri doğrultusunda geliştirilen reaksiyon protokolleri, gerçek-zamanlı bir PCR cihazı olan LightCycler'e (Roche Applied Science, Germany) uyarlanır. G6PDH cDNA' larını kullanmamızdaki amaç, çalışma sonrasında kopya sayısı bilinen standartlar ile bir standard eğrinin çizilmesi ve bu eğriye göre kopya sayılarını bilmediğimiz örneklerin hedef gen konsantrasyonlarını belirlemektir. Rölatif kantitasyon değeri, hedef gen kopya sayısının house keeping gen kopya sayısına bölünerek elde edilir.

### **3.3.5. STAT5A, STAT5B mRNA Ekspresyon Değerlerinin Belirlenmesi**

STAT5A ve STAT5B mRNA ekspresyonunun LightCycler' da rölatif olarak belirlenebilmesi amacıyla, buna uygun bir protokolü hazırlanmıştır. Oluşturulan PCR bu reaksiyon protokolüne göre;

Hedef (STAT5A/STAT5B)Referans (G6PDH)

PCR seviyesindeki su: 2.3 µl PCR seviyesindeki su: 4.3 µl

MgCl<sub>2</sub>: 1.2 µlMgCl<sub>2</sub>: 1.2 µl

İleri primer: 1 µlPrimer-Probe Karışımı: 1 µl

Geri primer: 1 µlEnzim: 1 µl

FL: 0.5 µlcDNA: 2.5 µl

LC-Red 640: 0.5 µl

Enzim: 1 µl

cDNA: 2.5 µl

STAT5A (NM-003152) genine ait primer – prob dizileri aşağıda verilmektedir.

STAT5A İleri Primer: 5'-GAAGCTGAACGTGCACATGAATC- 3'

STAT5A Geri Primer: 5'-GTAGGGACAGAGTCTTCACCTGG -3'

STAT5A Fluorescein: 5'- ACAGGACTGTGAACTTCTCCTCTGTCACGG-FL

STAT5A LC Red 640: 5'-CTCTGCACCCCGCCGGTCAG -p

STAT5B (NM-012447) genine ait primer – prob dizileri aşağıda verilmektedir.

STAT5B İleri Primer: 5'-AGTTTGATTCTCAGGAAAGAATGT -3'

STAT5B Geri Primer: 5'- TCCATCAACAGCTTTAGCAGT-3'

STAT5B Fluorescein: 5'-TTGGGAGACTTGAATTACCTTATCTACGT -FL

STAT5B LC Red 640: 5'- TTCCTGATCGGCCAAAAGATGAA-p

LightCycler' da STAT' ların ekspresyon tayini için oluşturulan PCR termal profil:

### **1-DENATÜRASYON**

| <b><u>PARAMETRE</u></b>      | <b><u>DEĞER</u></b> |
|------------------------------|---------------------|
| Döngü Sayısı                 | 1                   |
| Analiz Modu                  | Yok                 |
| 1.Segment                    |                     |
| Hedef Isı (°C)               | 95                  |
| İnkübasyon Zamanı [sn]       | 120                 |
| Isı Geçiş Oranı (°C/sn)      | 20,0                |
| İkinci Hedef Isı (°C)        | 0                   |
| Basamak Büyüklüğü (°C)       | 0,0                 |
| Basamak Geciktirmesi (Döngü) | 0                   |
| Okuma Modu                   | Yok                 |

### **2-AMPLİFİKASYON**

| <b><u>PARAMETRE</u></b>      | <b><u>DEĞER</u></b> |           |           |
|------------------------------|---------------------|-----------|-----------|
| Döngü Sayısı                 | 50                  |           |           |
| Analiz Modu                  | <b>Kantitasyon</b>  |           |           |
|                              | 1.Segment           | 2.Segment | 3.Segment |
| Hedef Isı (°C)               | 95                  | 56        | 72        |
| İnkübasyon Zamanı [sn]       | 10                  | 10        | 5         |
| Isı Geçiş Oranı (°C/sn)      | 20,0                | 20,0      | 20,0      |
| İkinci Hedef Isı (°C)        | 0                   | 0         | 0         |
| BasamakBüyüklüğü (°C)        | 0,0                 | 0,0       | 0,0       |
| Basamak Geciktirmesi (Döngü) | 0                   | 0         | 0         |
| Okuma Modu                   | Yok                 | Tek       | Yok       |

### **3-SOĞUMA**

| <b><u>PARAMETRE</u></b>      | <b><u>DEĞER</u></b> |
|------------------------------|---------------------|
| Döngü Sayısı                 | 1                   |
| Analiz Modu                  | Yok                 |
| 1.Segment                    |                     |
| Hedef Isı (°C)               | 40                  |
| İnkübasyon Zamanı [sn]       | 30                  |
| Isı Geçiş Oranı (°C/sn)      | 20,0                |
| İkinci Hedef Isı (°C)        | 0                   |
| Basamak Büyüklüğü (°C)       | 0,0                 |
| Basamak Geciktirmesi (Döngü) | 0                   |
| Okuma Modu                   | Yok                 |

### **3.4. STAT 5A ve 5B ekspresyonlarının protein düzeyinde saptanması**

Kontrol ve dasatinib uygulanan hücrelerden 5. gün sonunda “Proteojet Mammalian Cell Lysis Reagent, Fermentas” protokolü gereğince, protein izole edilir ve Bradford metoduna göre protein tayini gerçekleştirilir. Örneklerden 40 µg/ml yüklenip, %8 SDS-PAGE’ de yürütüldükten sonra, “iBlot® Transfer Stack, PVDF Regular” kiti ile “I-Blot Transfer cihazıyla” kuru transfer yapılır. Blotlama, primer antikorla muamele (STAT5A ve STAT5B, Santa Cruz), sekonder antikorla muamele ve renk reaktifi “WesternBreeze® Chromogenic Kit–Anti-Rabbit” kit manueli gereğince uygulanır, Western Blot analizlerinde hücrelerden protein ekstraksiyonunu takiben Bradford metoduna göre protein tayini gerçekleştirilir ve protein seviyesinde STAT5A – STAT5B baskılaması doğrulanır.

#### **3.4.1.I-Blot Dry Blotting Sistem ile Western Blotlama:**

- Iblot transfer stack PVDF yada Nitrocellulose (NC) kitinde yer alan Anot Stack kutudan çıkartılır ve üzerinde yer alan jelatin açılır.
- Distile su içerisinde yer alan jel dikkatlice ve düzgün bir şekilde PVDF/NC membran içeren Anot stack üzerine yerleştirilir.
- Kit içerisinde yer alan filtre kağıdı distile su ile ıslatılır.İslatılan filtre kağıdını jel üzerine dikkatlice yerleştirilir.
- Kit içerisinde yer alan Katot Stack kutudan çıkartılır ve üzerinde yer alan jelatin açılır.Bakır yüzey yukarı/jelimsi yüzey ıslak filtre kağıdına bakacak şekilde filtre kağıdının üzerine yerleştirilir
- Kit içerisinde yer alan sünger, Iblot cihazının kapağının sağ tarafındaki elektrota denk gelecek şekilde yerleştirilir,kapak kapatılır,program P3 seçilir ve 8 dk çalıştırılır.
- İşlem tamamlandıktan sonra sırasıyla,sünger,katot stack,filtrre kağıdı ve jel uzaklaştırılır.

**Tablo 15.** PVDF membranlar için çözelti hazırlama

| <b>Solusyon</b>       | <b>PVDF membran için</b>      | <b>Volüm</b> |
|-----------------------|-------------------------------|--------------|
| Bloklama solusyonu    | Ultra filtre su               | 5 ml         |
|                       | Bloklayıcı/çözücü(Part A)     | 2 ml         |
|                       | Bloklayıcı/çözücü(Part B)     | 3 ml         |
|                       | Total volüm                   | 10 ml        |
| Primer antikor çözücü | Ultra filtre edilmiş su       | 7 ml         |
|                       | Bloklayıcı/çözücü(Part A)     | 2 ml         |
|                       | Bloklayıcı/çözücü(Part B)     | 1 ml         |
|                       | Total volüm                   | 10 ml.       |
| Antikor yıkama        | Ultra filtre edilmiş su       | 150 ml       |
|                       | Antikor yıkama sokusyonu(16X) | 10 ml        |
|                       | Total volüm                   | 160 ml       |

### **3.4.2. Western Brezze Chromogenic İmmunodetection Protokol Uygulaması**

- Membran özel plastik kap içinde 10 ml Bloklama solusyonu içine yerleştirilir. 30 dk boyunca 1 döngü/dk olacak şekilde sallayıcıda enkübe edilir. Takip eden işlemler aşağıdaki sırayla gerçekleştirilir:
- Membran, 5 dk boyunca 20 ml su ile yıkanır ve işlem bir kez daha tekrar edilir.
- 1 saat boyunca Primer Antikor solusyonu ile enkübe edilir.
- 5 dk boyunca 20 ml Antikor Yıkama ile yıkanır, işlem üç kez tekrar edilir.
- 30 dk boyunca 10 ml Sekonder Antikor Solusyonu ile enkübe edilir.
- 5 dk boyunca 20 ml Antikor Yıkama ile yıkanır, işlem üç kez tekrar edilir.
- 2 dk boyunca 20 ml su ile membran yıkanır, işlem iki kez tekrarlanır.
- Ardından membran üzerinde mor renkli bandlar oluşana kadar 5 ml Kromojenik Substrat ile enkübe edilir. Mor renkli bandların oluşumu 1 ile 60 dk arasında gerçekleşir.
- 2 dk boyunca 20 ml su ile yıkanır ve işlem kez tekrar edilir.
- Son olarak membran filtre kağıdına yerleştirilerek infrared ışıktaki veya ılık oda havasında kurutulur.

### 3.4.3. Protein Ekstraksiyonu:

K562 hücrelerinden protein izole etmek için kullanılan metodlardan en etkin olanı ProteoJET Mammalian Cell Lysis Reagent (Fermentas) ile gerçekleştirilendir.

- K 562 hücre hattındaki hücreler  $15 \times 10^6$ /ml olacak şekilde toplanır.
- 2.000 rpm' de 5 dakika santrifüj sonrasında medium uzaklaştırılır ve pellet 1 ml PBS ile yıkanır.
- Tekrar 2.000 rpm' de 5 dakika santrifüj işleminden sonra süpernatant uzaklaştırılır.
- Hücre pelletleri 20:1 oranında lizis reaktifi ile karıştırılır, karışımın içine 7x proteaz inhibitörü kokteyli eklenir.
- Hücreler ile reaktifler vortekslenerek iyice resüspanse edildikten sonra 10 dakika süreyle oda ısısında shaker üzerinde inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyon sonrasında 20.000 g' de 15 dakika santrifüj sonrasında süpernatant toplanarak temiz Eppendorf tüplere bölünür. Bu aşamadan sonra örnekler protein tayini için hazır durumdadır.
- Kullanılmayacak örnekler  $-86^{\circ}\text{C}$ ' de, çalışmaya alınana kadar saklanır.

### 3.4.4. Bradford Metoduna Göre Protein Tayini:

Protein tayini için seçilen metod Bradford tayin yöntemi olmuştur. Buna göre, sırasıyla 250 – 500 – 1000 – 1500 – 2000  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonlarındaki BSA (bovine serum albumin) standartları kullanılır. 200  $\mu\text{l}$  Bradford reaktifine 4  $\mu\text{l}$  protein lizatı ilave edilerek 10 dakika süreyle inkübasyona bırakılır. Süre sonunda tüm standartlardan 2  $\mu\text{l}$  örnek NanoDrop cihazına yüklenerek konsantrasyon değerleri elde edilir. Tüm örnekler 5× kez ölçülür, sapma gösteren değerler elimine edilir. Elde edilen değerlere göre BSA Standart grafiği çizdirilir. Bu aşamadan sonra, hücre hatlarına ait protein lizatları da benzer oranlarda Bradford reaktifi ile karıştırılarak cihaza yüklenir ve konsantrasyon değerleri  $\mu\text{g/ml}$  olacak şekilde belirlenir.

### **3.5.Apoptozisin saptanması**

#### **3.5.1. Cell Death Detection Kit:**

Apoptozis, membranın balonlaşması, sitoplazmanın kondensasyonu, endonukleazların aktivasyonu ile karakterizedir. Bu durum DNA'nın internukleosomal kesilmesi, histonlara sıkıca bağlı olan mono ve oligonukleosomların oluşması ile sonuçlanır. Nukleosomlardaki bu DNA kesilmeden korunur çünkü histonlara sıkıca bağlıdır. Cell Death Detection ELİSA kit, apoptotik hücreler için bir gösterge olan mono ve oligonukleosomlardaki histone ilişkili DNA fragmanlarının kantitatif olarak saptanması temeline dayanır. Bu kitin avantajları; yüksek sensitivite, hızlı performans (5-6 saate sonuç alınabilir.), radyoaktivite içermemesi, kolay uygulama, türlere göre kısıtlama olmaması, fonksiyonların test edilmiş olmasıdır. İçeriğinde bulunan anti-histon antikorları çeşitli türlerin (insan, fare, vb.) H1, H2A, H2B, H3 ve H4 histonları ile reaksiyona girerler. Anti-DNA POD antikorları tek ve çift zincirli DNA ya bağlanır. Sonuçta, ELİSA mono ve oligonukleosomların saptanmasına izin verir ve apoptotik hücre ölümünün ölçümü gerçekleşir.

Bu histon bağımlı mono ve oligonukleosomlar endonukleaz tarafından yıkımdan korunurlar. Bu edinilen DNA fragmanları agarose jelde ayrıştırma sonrasında DNA merdiveni olarak saptanmaktadır.

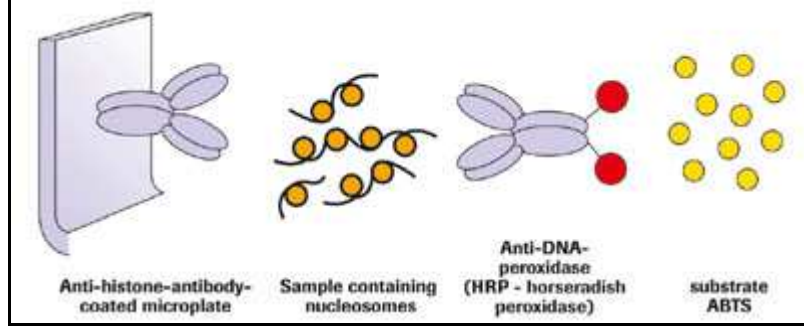
#### **A.Cell Death Detection Kit:**

İçerikleri: Anti-histone, anti-DNA-POD, kaplama solusyonu, yıkama solusyonu, inkubasyon solusyonu, substrat solusyonu, ABTS substrat tablet, mikrotitre modülleri, adhesif plate kaplayıcı folyolardan oluşmaktadır.

Prensip: Deney, DNA ve histonlara karşı fare monoklonal antikorlarının kullanılması prensibine, kantitatif 'sandviç enzim immunoassay' prensibine dayalıdır.

1. Anti-histon antikorları mikrotitre modülün duvarına yüzeye fiske edilirler ve duvardaki nonspesifik bağlantı alanları kapatıcı solusyon ile doyurulmuştur.
2. Örnekteki nukleosomların histon bileşenleri hareketsiz anti-histon antikorlarına bağlanırlar.

3. Anti-DNA peroxidaz nükleosomların DNA kısmı ile reaksiyona girer. Bağılanmamış peroxidaz(POD) konjugatlarının uzaklaştırılmasından sonra, immunkomplekte geriye kalan peroxidaz miktarı ölçümü, substrat ABTS ile fotometrik olarak kararlaştırılır.



**Şekil 7.** Cell Death Detection ELISA Kit ( ROCHE)

### 3.6.İstatistiksel Değerlendirme:

Hücrelerin dasatinib ile muamele edilmesini takiben hücrelerde oluşan 24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki mRNA seviyesinde meydana gelen gen ekspresyon değişiminin incelendiği deneyler üç kez kurulmuştur. Böylelikle sonuçlar istatistiksel olarak Student T Test ile (Graph Pad Prism Programı) değerlendirilmiştir. Testin anlamlılığı  $p < 0,05$  tir. Kontrol grubu ve dasatinib uygulanan hücrelerin kıyaslanması sonrasında mRNA seviyesinde belirlenen azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı saptanmıştır. Apoptotik durumun istatistiksel olarak değerlendirilmesi yine Student T Test ile (Graph Pad Prism Programı) gerçekleştirilmiştir ( $p < 0.05$ )

## 4.SONUÇLAR

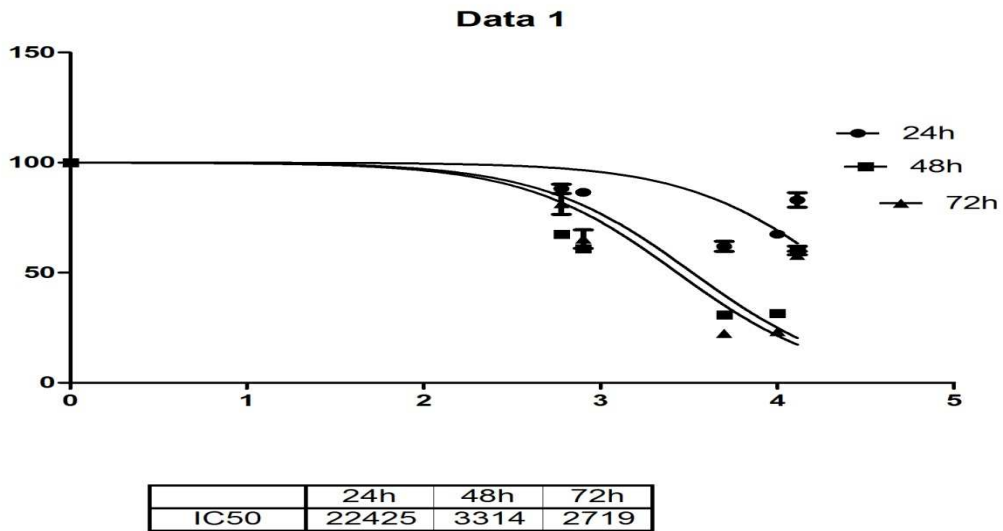
### 4.1.Sitotoksitenin değerlendirilmesi:

Dasatinib'in K562 kronik myelositer lösemi hücre dizisi üzerinde sitotoksitesi ve hücrelerin %50'sini öldüren doz olarak tarif edebileceğimiz IC<sub>50</sub> dozu, daha önce belirtildiği üzere önce Trypan blue, akabinde XTT metodu kullanılarak saptanmıştır. Dasatinib' in K-562 hücre dizisi üzerindeki doz ve zaman bağımlı sitotoksik etkisi XTT yöntemiyle belirlendi. IC<sub>50</sub> değeri, 48. Saat için 3.3 nM olarak hesaplandı.

#### 4.1.1.XTT metodu ile sitotoksitenin değerlendirilmesi:

Trypan blue metodu ile çalışılacak yaklaşık doz aralığı belirlendikten sonra, 1-10-100 µM-100-500 nM dozlarında dasatinib kullanılarak, k562 hücre dizisi 24, 48 ve 72 saat süreyle aynı ortamda enkübe edilerek hücre proliferasyonu ve sitotoksite analizi için XTT metoduyla değerlendirmeye tabi tutuldu. Deneyler bağımsız olarak 3 kez tekrarlandı.

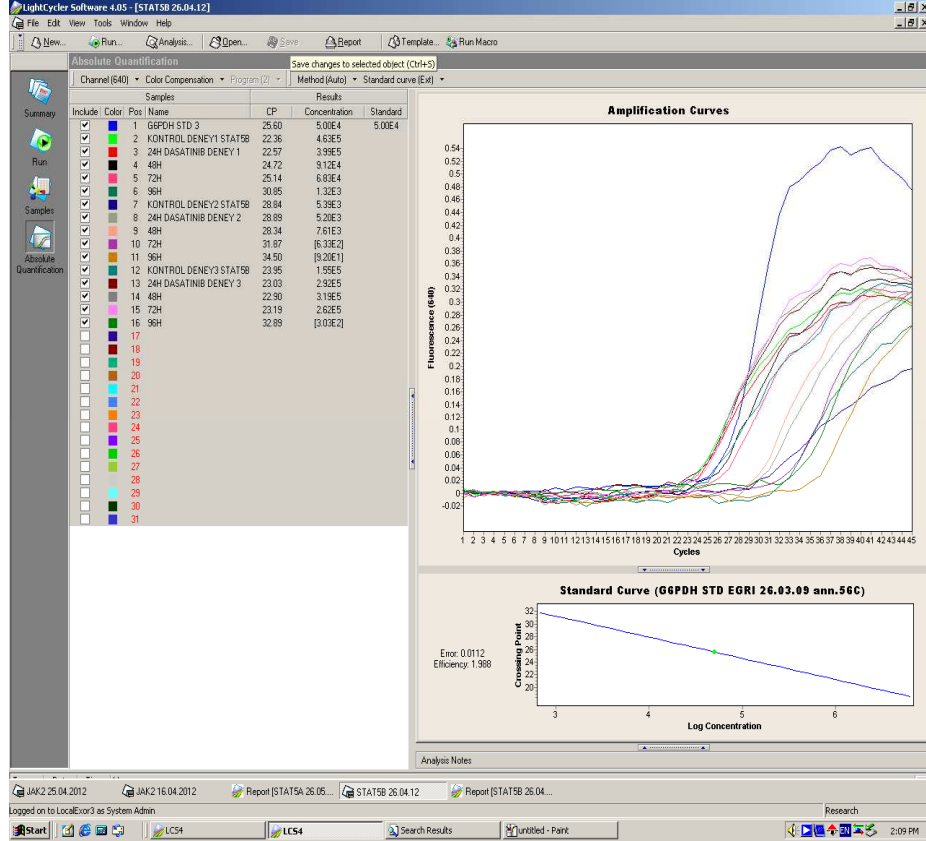
Deneylerden elde edilen verilere göre K562 hücre dizisinde proliferasyonun %50'sini baskılayan IC<sub>50</sub> dozu dasatinib için 3.3nM olarak belirlendi ve sonraki aşamalar bu IC<sub>50</sub> değeri baz alınarak yapıldı.



**Grafik 1.** KML hücre hattı K562 için dasatinibin IC<sub>50</sub> dozu 48.saatte 3.3Nm olarak saptandı.

## 4.2.STAT ve G6PDH Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi Amacıyla G6PDH Standart Eğrisinin Oluşturulması:

K562 KML hücre dizisinde STAT5A ve STAT5B hedef genlerinin m(RNA) kopya sayılarını belirlemede kullanılacak olan G6PDH referans geninin standart eğrisi aşağıdaki gibi çizdirilmiştir. Buna göre, oluşturulan standart eğri yüksek etkinliktedir ve tüm STAT m(RNA) çalışmaları için referans olarak kullanılabilir.



Şekil 8. STAT5A ve STAT5B hedef genlerinin m(RNA) kopya sayılarını belirlemede kullanılacak olan G6PDH referans geninin standart eğrisi

## 4.3.STAT Gen Ekspresyonlarının Kantitasyonu:

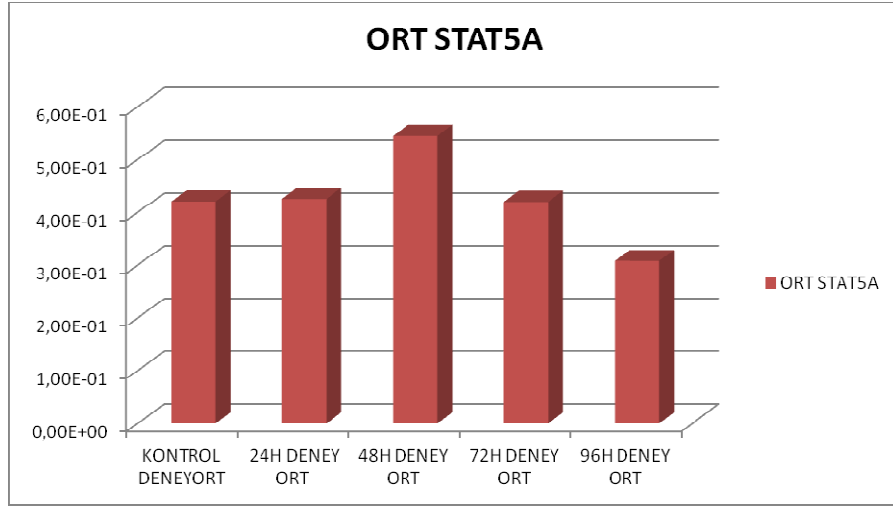
G6PDH standart eğrisinin çizdirilmesinden sonra, k562 hücre dizisindeki STAT5A ve STAT5B genlerinin ekspresyonları kantite edilmiştir. Hesaplamalar aşağıdaki formüle göre gerçekleştirilmiştir:

$$\text{Rölatif Ekspresyon Değeri} = \frac{\text{Hedef Gen m(RNA) kopya sayısı}}{\text{Referans Gen (G6PDH) m(RNA) kopya}}$$

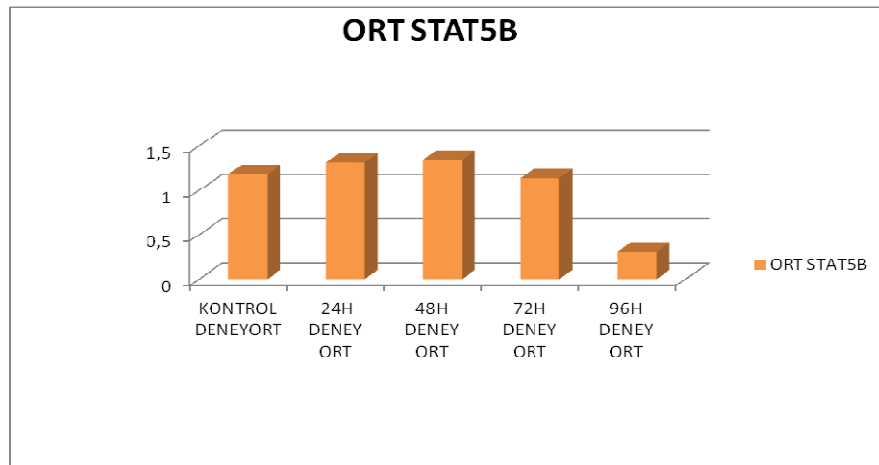
Gen ekspresyonları ilaç uygulanmayan kontrol grubunda %100 alınarak, yine IC50 dozunda dasatinib uygulanan hücrelerde STAT gen ekspresyonları hesaplanmıştır.

Hedef genlerin mRNAekspresyonlarını kıyasladığımızda, STAT5A ekspresyonu 96.saatte 1.5 kat azalırken (%33.2 oranında baskılanmıştır.)(p:0.02), STAT5B ekspresyonu 96.saatte 4.47 kat azalmıştır.(%77.6 oranında baskılanmıştır.) (p< 0.001).

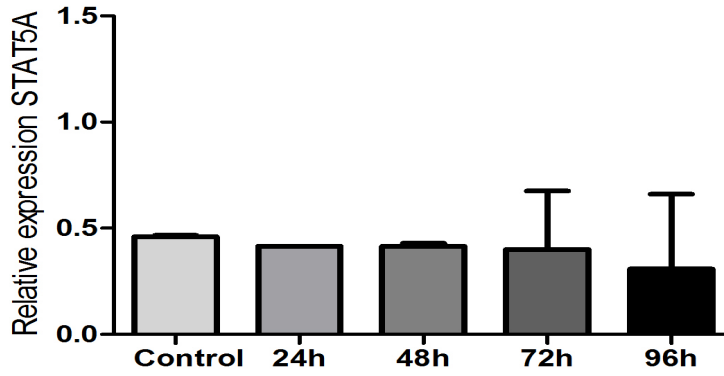
Tüm ekspresyonlar bağımsız üç ayrı deney ve PCR çalışması yapılarak incelendi ve ortak olarak STAT5A ve STAT5B ekspresyonlarının IC50 dozu olan 3.3 nM dasatinib ile her iki deneyde de zamana göre anlamlı düzeylerde baskılandığı saptandı.(Grafik 2a-2b) İlaç muamelesine bağlı olarak STAT ekspresyon değişimine ait veriler Grafik 3 ve 4’ te özetlenmiştir.



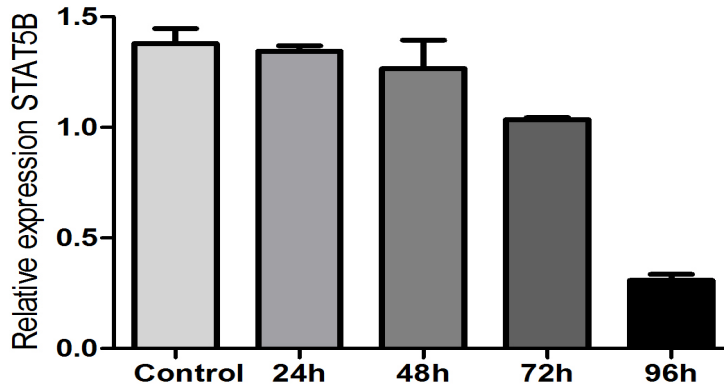
**Grafik 2a.** STAT5A gen ekspresyonunun zamana bağlı değişimi görülmektedir.



**Grafik 2b.** STAT5B gen ekspresyonunun zamana bağlı değişimi görülmektedir.



**Grafik 3.** KML-K562 hücre modelinde dasatinib uygulaması sonrası STAT5A gen ekspresyonları görülmektedir.

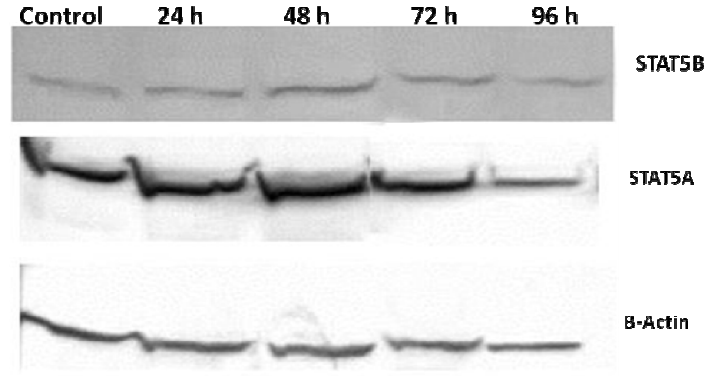


**Grafik 4.** KML-K562 hücre modelinde dasatinib uygulaması sonrası STAT5B gen ekspresyonları görülmektedir.

qRT-PCR uygulaması 3 kez tekrarlandı ve ortalama mRNA ekspresyonları referans gen düzeylerine göre hesaplandı. Dasatinib uygulamasını takiben STAT5A ve STAT5B ekspresyonlarının 96. saatte anlamlı olarak baskılanması gösterildi. İstatistik analizler Student's t test ile yapıldı.

#### 4.4. Western Blot Analizi Sonuçları:

Kontrol ve dasatinib uygulanan hücrelerden 5. gün sonunda “Proteojet Mammalian Cell Lysis Reagent, Fermentas” protokolü gereğince, protein izole edildi ve Bradford metoduna göre protein tayini gerçekleştirilebildi. Örneklerden 40 µg/ml yüklenip, %8 SDS-PAGE’ de yürütüldükten sonra, “iBlot® Transfer Stack, PVDF Regular” kiti ile “I-Blot Transfer cihazıyla” kuru transfer yapıldı. Blotlama, primer antikorla muamele (STAT5A ve STAT5B, Santa Cruz), sekonder antikorla muamele ve renk reaktifi “WesternBreeze® Chromogenic Kit–Anti-Rabbit” kit manüeli gereğince uygulandı ve protein seviyesinde STAT5A – STAT5B baskılanması doğrulandı.

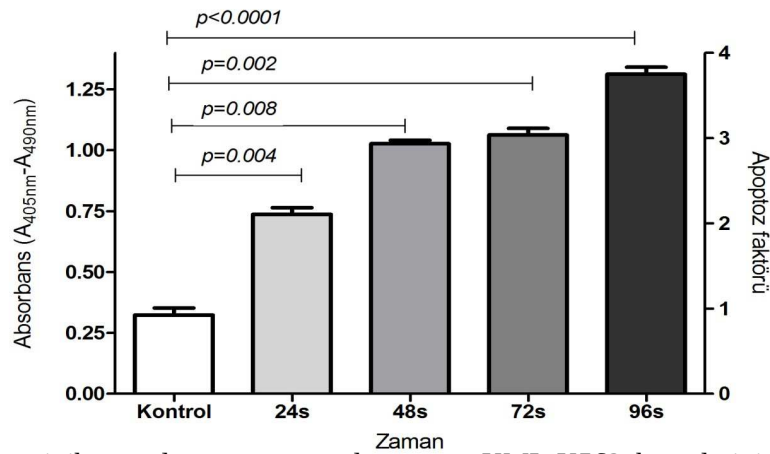


**Sekil 9.** STAT5A ve STAT5B protein düzeylerinin WesternBreeze® Chromogenic Kit–Anti-Rabbit” kit ile değerlendirilmesi.

Şekilde kontrol grubuna karşılık dasatinib uygulanmış hücrelerin protein ekspresyon sonuçları görülmektedir. STAT5A ve STAT5B ekspresyon düzeyleri 96. saatte kontrol grubuna göre belirgin olarak baskılanmıştır. Beta aktin kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Sonuçlar mRNA ekspresyonları ile uyumlu saptanmıştır.

#### 4.5. Cell Death Detection Kit ile Apoptoz Ölçülmesi

Dasatinib muamelesi sonrasında hücrelerin apoptotik durumu zamana bağlı olarak “Cell Death Detection kit” ile spektrofotometrik olarak ölçülüp belirlendi. Buna göre, 96. Saatte Dasatinib uygulaması sonrasında, kontrol grubuna göre 4.5 katlık apoptoz artışı saptandı. ( $p < 0.0001$ )



**Grafik 5.** Dasatinib uygulanmış ve uygulanmamış KML-K562 hücrelerinin apoptoz analizleri: Histon kompleksleri ile oluşan DNA fragmanlarının tespiti. Apoptoz oluşumu dasatinib uygulanmış hücrelerin sitoplazmalarında mono-oligo nukleosomların miktarı ölçülerek saptandı. İstatistiksel analizler Student’s T test ile yapıldı.

## 5.TARTIŞMA:

KML malign hematopoetik pluripotent kök hücrenin klonal proliferasyonu ile karakterize bir hastalık olup, vakaların %95'inde t(9,22)'den oluşan BCR/ABL füzyon gen ürünü kontrolsüz tirozin kinaz aktivitesine neden olarak lökomogeneziste merkezi bir rol oynar. Abl tirozin kinazın selektif bir inhibitörü olan İmatinib mesilat KML tedavisinde devrim niteliğinde bir tedavi ajanı olmasına rağmen, ilaca karşı gelişen direnç önemlidir. Bu direnci yenmek için ikinci kuşak tirozin kinaz inhibitörleri geliştirilmiştir.

Moleküler mekanizma olarak mutasyonlar dışında, BCR/ABL' nin bazı yan yolları kullanarak kendi fosforilasyonunu arttırdığı da saptanmıştır. Bu nedenle, ilaç direncinin üstesinden gelebilmek için BCR/ABL' nin alternatif ya da ek alt sinyal yollarını hedeflemek, klinik yanıtı iyileştirmede uygun bir yol olabilir.

Sinclair ve ark. tarafından 2013 te yayınlanan review de TKİ leri proliferasyon yapan matür hücreleri etkilerken ,lösemik kök hücreleri eradike edememektedir, bu nedenle tedavi devamına rağmen hastalık persiste etmektedir. Lösemik kök hücreleri etkileyecek alternatif yollar bulmak mutlaka gereklidir. BCR/ABL aktivitesi farklı sinyal yollarının düzenlenmesinden sorumludur. Bu yollar PI3K/AKT/MTOR, JAK-STAT ve otofaji sinyal yollarıdır. LSC hedefleyen terapötik çalışmalarda bu yolların kendisi ve TKİ ile kombinasyonu çekici hedefler olarak gösterilmişlerdir. (192)

JAK/STAT, Raf/MEK/Erk, PI3K/AKT; lösemik gelişimi indüklemedeki rolleri, hücre siklusunu düzenleme ve apoptozdaki önemleri belirlenmiş olan başlıca sinyal ileti yollarıdır. BCR/ABL füzyon geni sonucunda tirozin kinaz aktivitesi ile Ras, Raf, PI3K, JNK/SAPK, Crkl ve bu çalışmada esas üzerinde durulmuş olan STAT5 aktivasyonu ile, apoptozis inhibe olmakta ve proliferasyon uyarılmaktadır.

JAK-STAT yolu sitokin ve büyüme faktörlerinin extrasellüler sinyal transduksiyonunda rol oynarlar, bu sitokin ve büyüme faktörleri hematopoiez, immun regülasyon, fertilité, laktasyon, büyüme ve embriyogenezde rol oynarlar. JAK ailesi 4 sitoplazmik tirozin kinaz içerir; JAK1-3 VE TYK 2. İnsan hücrelerinde 7 STAT proteini tanımlanmıştır; STAT 1-6, STAT5a ve 5b'yi içerir. (193)

JAK-STAT yolağı interferon ile uyarılmış hücre içi sinyal iletimi çalışmaları sırasında ilk olarak keşfedilmiştir. (Janus Kinaz ve Signal transducer and activator of transcription -STAT) Sonrasında birçok sayıda sitokin,hormonve büyüme faktörlerinin JAK-STAT yolağını aktive ettikleri bulunmuştur.Janus kinazlar ,sitokin reseptörleri ile ilişkili tek tirozin kinaz sınıfıdır.

Sitokin, hücre yüzeyindeki reseptörüne bağlandıktan sonra oligomerizasyon gerçekleşir ve JAK proteinleri çapraz fosforilasyon ile aktive olur. Aktive JAK proteinleri reseptörü de fosforile ederek sitoplazmadaki inaktif STAT proteinlerinin reseptör ile etkileşmesine olanak sağlar. STAT proteinleri reseptörden ayrılarak hücre çekirdeğine gelirler ve DNA üzerinden etkileşerek etkileşerek hedef genlerin transkripsiyonunu uyarırlar.

Pozitif feedback yolağında, IFN , ISGF3'ü ( interferon stimulated gene factor 3) uyararak genleri aktive eder.JAK-STAT yolağını aktive eden birçok sitokin, örneğin IL6,IL4,LIF,G-CSF,aynı zamanda SOCS-JABs-SSIs vb. STAT yolağı inhibitorlerini artırır.(1) JAK-STAT yolağının negatif regülatörleri tirozin fosfatazlar (SHP 1 VE 2,CD45), PIAS (protein inhibitors of activated STATs), SOCS (supressor of sitokin signaling) proteinleri ve CIS (cytokin inducible SH2-containin protein) dir.JAK-STAT yolağının disregülasyonu hematolojik malignitelerde anahtar rol üstlenmektedir.(193)

STAT proteinleri iki mekanizma aracılığıyla karsinogeneze etkili olur. Bunlardan biri STAT'ın sürekli aktivasyonudur. Diğer değişim ise proteinin c-ucunun mutasyona uğramasıdır. Devamlı olarak aktif olan STAT proteini antiapoptotik yolları uyararak malign süreçte etkili olabilir.

STAT aracılı sinyal iletimi ile uyarılan hedef genlerin (örneğin; c-myc, siklin D1 ve Bcl-xL) hücre döngüsünün kontrolünü sağlayarak ve/veya apoptozisi önleyerek karsinogeneze sürecinde etkili oldukları öne sürülmektedir. Ayrıca, STAT aracılı sinyal iletiminin malign sürecin gelişiminde MAP kinaz yolunun aktivasyonu ile etkileşebileceği düşünülmektedir.

STAT5a ve STAT5b ekspresyonlarındaki artış lösemik hücrelerde kontrolsüz proliferasyon ve angiogeneze yeteneği kazanımda rol alır.Aynı zamanda bu hücreler immün sistemden ve apoptozdan kaçış yeteneği kazanırlar.(194)

Bcr/Abl kimerik proteini hematopoietik hücrelerde büyüme faktöründen bağımsız olarak çoğalma ve transformasyonu indükler. Bu onkoprotein JAK/STAT yolunun sürekli aktif olmasına yol açar. İmatinib mesilat ile tetiklenen apoptozis STAT5 aktivitesinin inhibisyonu ve Bcl-xL ekspresyonunun azalması ile korelasyon göstermiştir. Buna göre, Bcr/Abl ile ilişkili apoptozis direncinde STAT5 aktivitesinin rolü vardır.

Heim MH.'nin 1999 yılında yaptığı çalışmada STAT1 knockout farelerde IFN sinyali azalırken ,STAT4 knockoutlarda IL12 sinyali ,STAT5a knockoutlarda prolaktin sinyali, STAT5b knockoutlarda GH sinyali ve STAT6 knockout olanlarda IL4 ve IL13 sinyali azalmıştır.Lösemi, lenfoma ve miyelomlarda ve hereditör immun yetmezlik sendromlarında JAK-STAT yolu ile ilişki saptanmıştır. (195) Klinik uygulamada JAK inhibitörleri ilk kullanılacak ajanlar arasındadır. Ruxolitinib non-selektif JAK 1 ve 2 inhibitörü, FDA tarafından orta ve yüksek riskli miyelofibroziste onaylanmıştır.(193)

Jung JH. ve ark.larının 2013 yılında yaptığı çalışmada Tanshinone IIA ve Cryptotanshinonun JAK-STAT sinyal yolağından apoptoza etkisi araştırılmıştır. Tanshinone IIA ve Cryptotanshinone antiinflamatuvar, antioksidan, antimetabolik, antikanser etkileri mevcuttur, ancak KML de etkili olduğu sinyal yolları bilinmemektedir. Sonuçta her iki molekülün de apoptozu caspas-9/3 ve Sub-G1 akümüasyonu ile K562 hücrelerinde indüklediği saptanmıştır. Tanshinone IIA JAK2/STAT5 sinyalini inhibe ederken Cryptotanshinone JAK2/STAT3 yolağını inhibe etmekte, ayrıca Tanshinone IIA SHP1 ve 2 ekspresyonunu artırırken, Cryptotanshinone SHP-1 ekspresyonunu regüle ettiği belirtilmiştir. Tanshinone IIA ve Cryptotanshinone her ikisi de bcl-xl, survivin ve siklin D1 ekspresyonunu etkilediği gösterilmiştir.. Ayrıca Tanshinone IIA imatinib ile sinerjistik gösterir, K562 hücrelerinde daha etkilidir. Bulgular, Tanshinone IIA ve Cryptotanshinone'un JAK/STAT 3/5 ve SHP 1/2 sinyali ile antikanser etkili olduğunu göstermiştir, Tanshinone IIA K562 hücrelerinde imatinib ile kombinasyon terapisinde kullanılabileceği öne sürülmüştür.(196)

Kaymaz BT. ve ark.nın 2013'te yaptığı çalışmada, K562 KML hücre hattında siRNA transfeksiyonu ve antisense-oligonukleotidlerin hedeflenmesi ile STAT5a ve STAT5b baskılanmasını ve apoptoz değerlendirmesini hedeflenmiş ve RT-PCR ve Western blot sonuçları siRNA transfeksiyonu sonrası mRNA ve protein seviyelerinde STATların down regüle olduğunu gösterilmiştir. Fakat ODN transfeksiyonu mRNA ve

protein seviyelerinde sınırlı supresyon göstermiş, ayrıca siRNA ile muamele edilmiş lösemik hücrelerde ODN ile muamele edilmiş hücrelere göre apoptozun daha fazla indüklendiği satanmıştır..Sonuçta siRNA uygulanması KML hastalarında yeni ve alternatif bir tedavi edici metod olabileceği belirtilmiştir.(194)

Aynı grubun 2013'te yayınlanan bir başka çalışmada ,K562 hücreleri anti - STAT3,anti-STAT5a ve anti-STAT5b siRNA'ları ile 12 gün boyunca transfekte edilmişler, mRNA ve protein seviyeleri, apoptoz hızı ve JAK-STAT yolağı elemanları gen ekspresyonları çalışılmış ve RT-PCR ve western blot sonuçları ile mRNA ve protein seviyesinde STAT ekspresyonları down regüle edilmiştir.TUNEL metodu ile STAT inhibisyonu ile apoptozun arttığı gösterilmiş ve bu sonuçlarla siRNA uygulamasının KML tedavisinde destekleyici rolü olabileceği belirtilmiştir.(197)

Kiper HD. ve ark.nın 2013'te yayınladıkları çalışmada ,KML K562 hücrelerinde zolendronik asitin sitotoksik ve apoptotik etkisi ve zolendronik asit ile indüklenen apoptozda STAT genlerinin rolü araştırılmış.Sonuçlar zolendronik asitin proliferasyonu baskıladığı ve apoptozu uyardığını göstermiştir. STA3,5a,5b nin mRNA ve protein seviyeleri baskılanmıştır.Bu veriler KML hastalarında tedavi seceneği olabileceğini göstermiştir.(198)

STAT5 proteinleri MPN,KML ve PV içeren lösemilerde yapısal olarak aktive olurlar. STAT'ın bu hastalıkların patogeneziindeki önemi bilinmemektedir.

Walz C. ve ark.nın 2012'de yayınlanan hayvan deneyi çalışmasında BCR/ABL1 ve JAK2 V617F ile uyarılan MPN de STAT5 gereksinimini göstermek için STAT5a ve 5b gen lokus mutasyonu olan sıçanlar kullanılmış. Bir allel mutasyonu olanlarda BCR/ABL 1 ile indüklenen KML benzeri MPN ve B -hücreli akut lenfoblastik lösemi varlığı azalma gösterirken,STAT5a ve 5b nin komplet delesyonu lösemi gelişimini önlemiştir.

Fakat, STAT5 delesyonlu lösemik kök hücrelerde BCR/ABL 1 aktive saptanmış ve STAT5 delesyonu lenfoid blastik kriz ve B-hücreli akut lenfoblastik lösemiye progresyonu engelleyememiştir. STAT5a ve 5b delesyonu sonrası JAK2 V617F polisitemi gelişimini indükleyememiş, fakat STAT5 kaybı miyelofibroz gelişimini önleyememiştir.Sonuçlar STAT5 a ve 5b nin BCR/ABL1 ile ilişkili KML benzeri lösemilerde ve JAK2 V617F ile

ilişkili polisitemilerde esansiyel olduğunu,MPN de STAT5a ve 5b nin tedavi hedefi olduklarını açıklayarak göstermiştir.(199)

Baškiewicz-Masiuk M. ve Machaliński B.' nin 2004 te yaptığı hücre çalışmasında KML ve AML hücrelerinde apoptoz ve klonojenite üzerinde STAT5a ve STAT5b ekspresyonlarının baskılanması göstermek amaçlanmıştır. Yeni tanı alan 34 KML ve AML hastanın blast hücreleri deneylerde kullanıldı. Antisense oligonukleotidler (ODNs) mRNA seviyesinde STAT5a ve STAT5b yi bloke etmek için uygulanmış ve RT-PCR ile ODN uygulaması sonrası STAT5 mRNA ekspresyonları çalışılmıştır.Sonuçta STAT5 baskılanması KML ve AML hücreleri proliferasyonunu engellediği ve apoptozu uyardığı gösterilmiştir.(200)

İkinci kuşak TKİ'leri dasatinib,nilotinib ve diğer 2.kusak TKİ bosutinib ve ponatinibdir.

Dasatinib Bcr/Abl tirozin kinaz aktivitesini inhibe ederken, benzer yapıdaki SRC ailesi kinazlarını da inhibe eder. PDGFR, c-KIT ve Ephrin-A reseptör kinaz'ı da güçlü şekilde inhibe eden dasatinib, T315I ve muhtemelen F317L haricindeki in vitro dirençli BCR/ABL mutantlarına İmatinib'den yaklaşık olarak 300 kat daha etkindir .(169,170,171)

Nilotinib ARG, KIT, PDGFR- $\alpha$  ve PDGFR- $\beta$ 'yı inhibe eder.Ancak SRC, fms-benzeri tirozin kinaz 3 (FLT-3), VEGF reseptör ve EGF reseptör kinazları etkilemez. Öncelikle hücre kültüründe ve mürin modellerinde T315I mutasyonu haricinde imatinib'e dirençli mutantlara etkili olduğu gösterilmiştir.

Bugüne kadar tanımlanan imatinib direnci mekanizmaları ikiye ayrılmaktadır.Birinci grup; Bcr-Abl bağımlı direnç mekanizmalarıdır.Bunlar BCR/ABL duplikasyonu ,BCR/ABL mutasyonu ,T315I mutasyonu ve P-loop mutasyondur.İkinci grup;Bcr-Abl bağımsız direnç mekanizmalarıdır.Bunlar P-glikoproteinler tarafından oluşturulan ilaç effluxu(dışarı atımı) ,organik katyon transporter 1 tarafından yapılan ilaç alımı ve alternatif sinyal yolağı aktivasyonudur.

Bazı hastalar imatinibe primer direnç göstermektedirler.Bunun nedeni az sayıda lösemik kök hücrenin kendini yenileme kapasitesitesini imatinib tedavisi altında devam ettirmesidir. PI3K/AKT, RAS VE JAK/STAT sinyal yolakları apoptoza direnç nedeni

olmaktadırlar ve BCR/ABL tarafından aktive edilirler.Bu yolaklar BCR/ABL bağımlı prosurvival yolakları adaydırlar ve TKİ ile tedaviye karşı gelmede etkilidirler.(201)

EphA2 kanser büyümesi ve progresyonunda ilgi çekici bir terapötik hedeftir. Dasatinib EphA2 ve diğer kinazları içeren bir multi-kinaz inhibitördür.

2014 yılında Huang J. ve ark.'nın uterus kanser hücre hattında yaptığı çalışmada dasatinibin etkisi araştırılmış ve insan uterus kanser hücre hattında dasatinibin etkisi çalışılmıştır. Ayrıca in vivo, ortotopik sıçan uterus kanser modelinde dasatinibin etkisi gösterilmiştir. Sonuçta CAV-1, S897 de EphA2'nin fosforilasyonu ve PTEN in durumu dasatinibin uterus kanserinde etkisinde esas parçalar olarak düşünülmüştür.

Ayrıca CRaf, pCRafS338, pMAPKT202/Y204 (MAPK yolağı), pS6S240/244, p70S6kT389 (mTOR yolağı) ve pAKTS473 dasatinib cevabında etkili saptanmıştır ve dasatinib tedavisi altında CAV-1 in plasma memebranında yüksek ekspresyonu BRaf/CRaf heterodimerini bozduğu ve MAPK yolağını inhibe ettiği gösterilmiştir. (202)

Lin YC. ve ark.'nın 2013 te yayınlanan çalışmasında AMPK bağımlı ER stresin HNSCC (baş ve boyun squamöz hücreli karsinomu)' da dasatinibin antikanser etkisinde önemli bir rol oynadığını gösterilmiş ve metformin tarafından AMPK aktivasyonunun dasatinibin etkisini artırabileceği belirtilmiştir. Dasatinib HNSCC(baş ve boyun squamöz hücreli karsinomu) a karşı potansiyel olarak etkili olan BCR/ABL ve SRC kinaz inhibitorudur. Aynı grup tarafından daha önce dasatinib ile uyarılmış apoptozda EGFR baskılanmasının kritik olduğunu göstermişken ayrıca AMPK bağımlı ER stresin bu olayda etkili olduğunu gösterilmiştir. Dasatinib , c-bcl bağımlı biçimde EGFR yıkımına aracılık eden ER stresini uyarır ve apoptozu neden olduğu belirtilmiştir. Dasatinib tarafından indüklenen AMPK aktivasyonu ,PDK4'ün up-regülasyonu doğrultusunda ATP azalmasına bağlanmıştır.Ayrıca, metformin tarafından AMPK aktivasyonu dasatinibin antikanser etkisini duyarlılaştıracağı belirtilmiştir.(203)

Pogliaghi M. ve ark.'nın 2014'te yayınlanan çalışmasında TKİ dasatinibin, in vitro olarak HIV(insan immünyetmezlik virüsü) ile enfekte CD4 T-lenfositlerin üremesinin 3.4 log azalttığı, hücre aktivasyonu ve proliferasyonunu baskılayarak etkili olduğu gösterilmiştir.(204)

CBF( core binding factor) lösemilerde c-KIT gen aktive edici mutasyonları bulunmaktadır. Mpakou VE ve ark.'nın 2013'te yayınlanan hücre çalışmasında c-KIT mutasyonu olan ve olmayan lösemik hücre hatlarında TKİ dasatinibin etkisini araştırılmıştır. AML KASUMI- 1 hücre hattında ,N822K c-KIT mutasyonu olanda, dasatinib c-KIT ve SRC kinazının güçlü bir supresörüdür ve downstream hedef olan AKT' nin fosforilasyonunu SRC aracılı VEGF/VEGFR tip2 üzerinden inhibe ettiği gösterilmiştir. Dasatinib ayrıca, KASUMI-1 hücre hattında proliferasyonu bloke etmiş ve caspas 3 aktivitesi üzerinden apoptozu uyarmıştır.. Bu bulgu ile ileride c-KIT pozitif CBF-AML tedavisine dasatinibin entere edilebileceği belirtilmiştir.(205)

Shapira S. ve ark.'nın 2012'de yayınlanan hücre çalışmasında K562 BCR/ABL pozitif ve HL60 BCR/ABL negatif hücrelerde dasatinibin hTERT mRNA ekspresyonu azalmasına yol açtığı gösterilmiştir.Fosfo Sp1 hTERT transkripsiyonunu regüle etmektedir. Sp1 nükleer ekspresyonunda azalma ve hTERT promotora bağlanma saptanmış ve MAPK da baskılanma, fosfo AKT de azalma ve hTERT in nükleer ekspresyonunda azalma saptanmıştır. K562 BCR/ABL pozitif ve HL60 BCR/ABL negatif hücrelerde dasatinib telomeraz aktivitesini şiddetle baskılar. Sonuçta transkripsiyonel ve posttranslasyonel olarak nilotinib ve dasatinib tarafından telomeraz aktivitesinin baskılandığını gösterilmiştir. (206)

2011yılında yayınlanan Okabe S.ve ark.'nın K562NR( nilotinib rezistan) hücrelerde yaptığı çalışmada ,Lyn aktivasyonunun hücre yaşamının devamı için dominant role sahip olduğunu görülmüş ve dasatinibin Lyn kinaz aktivitesi yolu ile nilotinib rezistan hücrelerde apoptozu indüklediği gösterilmiştir.(207)

Nam S. ve ark.'nın 2007 yılında yayınladığı bir çalışmada dasatinibin Src, Hck ve Lyn'i içeren SFK( Src ailesi kinazları) 'ların tirozin fosforilasyonunu inhibe ettiğini K562 KML hücrelerinde göstermişler. STAT5 sinyali de dasatinib tarafından baskılanmıştır ve bu durum fosforile STAT5 ve STAT5 DNA bağlama aktivitesi düzeylerinde azalma ile gösterilmiştir. Dasatinib STAT5 hedef genleri olan de bcl-x, mcl1, siklin D1 i de azaltmıştır. Bu durum hücre proliferasyonu inhibisyonu ve apoptozun induksiyonunu göstermekte olduğu belirtilmiş ve ayrıca fosforile STAT5 düzeyleri mekanistik olarak BCR/ABL sinyalini inhibe etmede dasatinib kullanılan hastalarda biomarker olabileceği belirtilmiştir.(208)

EGFR ve SRC arasındaki kooperasyon iyi bilinmektedir ve akciğer kanserinde artmış SRC aktivitesi mevcuttur. EGFR mutasyonları AKT ve STAT yollarını aktive ederek akciğer kanseri devamında rol oynarlar.

2006 yılında Song L. ve ark.'nın yaptığı çalışmada oral alınan SRC yolağı inhibitörü dasatinibin akciğer kanserinde EGFR üzerinden etkisi akciğer kanseri hücre hattında çalışılmış. SFK lar fosfoinositol 3kinaz, PTEN, AKT, STAT lar gibi downstream moleküller aracılığı ile reseptör tirozin kinazlarla etkileşirler ve dasatinibin bu hücre hattında SRC kinazı inaktive ederek hücre canlılığını azalttığı, tümör invazyonunu engellediği gösterilmiştir. (209)

Bizim çalışmamızda dasatinibin K562 KML hücre dizisinde JAK-STAT yolağı üzerinden apoptoza etkisini araştırdık.

Dasatinib' in K-562 hücre dizisi üzerindeki doz ve zaman bağımlı sitotoksik etkisi XTT yöntemiyle belirlendi. IC<sub>50</sub> değeri, 48. Saat için 3.3 nM olarak hesaplandı. K562 KML hücre dizisinde STAT5A ve STAT5B hedef genlerinin mRNA kopya sayılarını belirlemede kullanılacak olan G6PDH referans geninin standart eğrisi çizdirildi. G6PDH standart eğrisinin çizdirilmesinden sonra, K562 hücre dizisindeki STAT5A ve STAT5B genlerinin ekspresyonları kantite edildi. Hedef genlerin mRNA ekspresyonlarını kıyasladığımızda, STAT5A ekspresyonu 96. saatte 1.5 kat azalırken (%33.2 oranında baskılandı.) (p:0.02), STAT5B ekspresyonu 96. saatte 4.47 kat azaldı. (%77.6 oranında baskılandı.) (p< 0.001).

KML-K562 hücre modelinde dasatinib uygulaması sonrası STAT5A ve STAT5B gen ekspresyonları çalışıldı. qRT-PCR uygulaması 3 kez tekrarlandı ve ortalama mRNA ekspresyonları referans gen düzeylerine göre hesaplandı. Dasatinib uygulamasını takiben STAT5A ve STAT5B ekspresyonlarının 96. saatte anlamlı olarak baskılanması gösterildi.

STAT5A ve STAT5B protein düzeylerinin WesternBreeze® Chromogenic Kit–Anti-Rabbit” kit ile değerlendirilmesi yapıldı. Kontrol grubuna karşılık dasatinib uygulanmış hücrelerin protein ekspresyon sonuçları karşılaştırıldı. STAT5A ve STAT5B ekspresyon düzeyleri 96. saatte kontrol grubuna göre belirgin olarak baskılandı. Beta aktin kontrol grubu olarak kullanıldı. Sonuçlar mRNA ekspresyonları ile uyumlu saptandı. Dasatinib muamelesi sonrasında hücrelerin apoptotik durumu zamana bağlı olarak “Cell

Death Detection kit” ile spektrofotometrik olarak ölçölüp belirlendi. Buna göre, 96. Saatte Dasatinib uygulaması sonrasında, kontrol grubuna göre 4.5 katlık apoptoz artışı saptandı. ( $p<0.0001$ )

Bizim çalışmamızdan elde edilen sonuçlarla da, KML hücrelerinde dasatinibin apoptozisi anlamlı düzeyde indüklediği ve JAK-STAT yolağı üzerinden de bu etkiyi gösterdiği ortaya konmuş ve doğrulanmış oldu. STAT5a ve 5b ekspresyonlarını baskılayarak apoptozisi indüklediğini göstermektedir.

Daha önce literatürde dasatinibin BCR/ABL tirozin kinaz aktivitesini inhibe ederken, benzer yapıdaki SRC ailesi kinazlarını da inhibe ettiği ve PDGFR, c-KIT ve Ephrin-A reseptör kinaz’ı da güçlü şekilde inhibe ettiği belirtilmiştir ancak bizim çalışmamız ile dasatinibin apoptozu JAK-STAT yolağı üzerinden de uyardığı saptanmıştır. Bu sonuç ile JAK kinaz ile ilişkili hastalıklarda dasatinibin etkili olabileceği düşünülebilir. Gelecekte yapılacak çalışmalar dasatinibin bu yolak üzerinden klinik kullanıma girmesi için ışık tutacaktır.

## KAYNAKLAR:

1. Clinic manifestations and diagnosis of chronic myeloid leukemia (Last updated September 2010) , Author: Richard A Van Etten, MD, PhD, Section Editor: Richard A Larson, MD, Deputy Editor: Rebecca F Connor, MD, www.uptodate.com
2. The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms: order out of chaos. Tefferi A, Thiele J, Vardiman JW. Cancer. 2009 Sep 1;115(17):3842-7.
3. <http://www.gata.edu.tr/dahilibilimler/ichastaliklari/files/dersler/935.pdf> “Kronik Myeloproliferatif Hastalıklar” Doç. Dr. Oral Nevruz
4. Meir Wetzler, John C. Byrd, Clara D. Bloomfield (çeviri: Berksoy Şahin) Kronik Myeloid Lösemi, Harrison’s Principles of Internal Medicine, fifteenth edition- 2001, 6.2.111:709-714
5. Jabbour, E, Cortes, JE, Ghanem, H, et al. Targeted therapy in chronic myeloid leukemia. In: Targeted Cancer Therapy, Kurzrock, R, Markman, M (Eds), Humana Press 2008. p.87.
6. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia-advances in biology and new approaches to treatment. N.Engl J Med 2003;349:1451-64.
7. Moloney WC (1987). "Radiogenic leukemia revisited". Blood 70 (4): 905–8. PMID 3477299.(7)
8. Shapira T, Pereg D, Lishner M (September 2008). "How I treat acute and chronic leukemia in pregnancy". Blood Rev.22 (5): 247–59
9. Menezes J, et al. (June 2008). "Occurrence of Acute Myeloid Leukemia in Young Pregnant Women". Clinical Medicine: Blood Disorders 1: 27–31
10. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, Kantarjian HM (1999). "Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy". Annals of Internal Medicine 131 (3): 207–219.

11. Tefferi A (2006). "Classification, diagnosis and management of myeloproliferative disorders in the JAK2V617F era". Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2006: 240–5.
12. Rowley JD. A new consistent abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining. Nature. 1973;243:290–293.
13. Nowell PC (2007). "Discovery of the Philadelphia chromosome: a personal perspective". Journal of Clinical Investigation 117 (8): 2033–5.
14. Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M; European LeukemiaNet (2007). "Chronic myeloid leukaemia". Lancet 370 (9584): 342–50.
15. Jackson, P, Baltimore, D. N-terminal mutations activate the leukemogenic potential of the myristoylated form of c-abl. EMBO J 1989; 8:449.
16. Saglio G., Cilloni D., 2004., Abl: The prototype of oncogenic fusion proteins Cell Mol.Life Sci 61, 2897-2911
17. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. Cell. 1984 Jan;36(1):93-9
18. McWhirter, JR, Galasso, DL, Wang, JY. A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. Mol Cell Biol 1993; 13:7587.
19. Maru, Y, Witte, ON. The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. Cell 1991; 67:459.
20. Chuang, TH, Xu, X, Kaartinen, V, et al. Abr and Bcr are multifunctional regulators of the Rho GTP-binding protein family. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92:10282.
21. Diekmann, D, Brill, S, Garrett, MD, et al. Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac. Nature 1991; 351:400.

22. Kantarjian HM, Melo JV, Tura S et al: Chronic myelogenous leukemia: disease biology and current and future therapeutic strategies, *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*, 2000;90-109
23. Quintás-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2009 Feb 19;113(8):1619-30. Epub 2008 Sep 30.
24. Lichty, B. D.; Keating, A.; Callum, J.; Yee, K.; Croxford, R.; Corpus, G.; Nwachukwu, B.; Kim, P.; Guo, J.; Kamel-Reid, S. (1998). "Expression of p210 and p190 BCR-ABL due to alternative splicing in chronic myelogenous leukaemia". *British journal of haematology* 103 (3): 711–715
25. Sattler, Martin; James D. Griffin (April 2001). "Mechanisms of transformation by the BCR/ABL oncogene". *International Journal of Hematology* 73 (3): 278–91.
26. Significance of the P210 versus P190 molecular abnormalities in adults with Philadelphia chromosome-positive acute leukemia. Kantarjian HM, Talpaz M, Dhingra K, Estey E, Keating MJ, Ku S, Trujillo J, Huh Y, Stass S, Kurzrock R. *Blood*. 1991 Nov 1;78(9):2411-8
27. New type of Bcr/Abl junction in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. Saglio G, Guerrasio A, Rosso C, Zaccaria A, Tassinari A, Serra A, Rege-Cambrin G, Mazza U, Gavosto F. *Blood*. 1990 Nov 1;76(9):1819-24
28. Appleby N., Burke E., Curran T.A., Neary E., 2005, Chronic Myeloid Leukemia Molecular abnormalities and treatment options., *TSMJ*, 6, 45-51
29. Characterization of the different BCR-ABL transcripts with a single multiplex RT-PCR., *Journal molecular diagnostics.*, 6(4), 343-347 *Transplant*. 1996 May;17 Suppl 3:S45-7
30. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. Johansson B, Fioretos T, Mitelman F. *Acta Haematol*. 2002;107(2):76-94. Review.
31. Savage, DG, Szydlo, RM, Goldman, JM. Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral centre over a 16-year period. *Br J Haematol* 1997; 96:111.

32. Kurzrock, R, Kantarjian, HM, Shtalrid, M, et al. Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia without breakpoint cluster region rearrangement: a chronic myeloid leukemia with a distinct clinical course. *Blood* 1990; 75:445.
33. Harris, NL, Jaffe, ES, Diebold, J, et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999; 17:3835.
34. Daley, GQ, Van Etten, RA, Baltimore, D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 1990; 247:824.
35. Elefanty, AG, Hariharan, IK, Cory, S. bcr-abl, the hallmark of chronic myeloid leukaemia in man, induces multiple haemopoietic neoplasms in mice. *EMBO J* 1990; 9:1069.
36. Castellanos, A, Pintado, B, Weruaga, E, et al. A BCR-ABL(p190) fusion gene made by homologous recombination causes B-cell acute lymphoblastic leukemias in chimeric mice with independence of the endogenous bcr product. *Blood* 1997; 90:2168.
37. Voncken, JW, Kaartinen, V, Groffen, J, Heisterkamp, N. Bcr/Abl associated leukemogenesis in bcr null mutant mice. *Oncogene* 1998; 16:2029.
38. Stein, B., Smith, B.D. (2010). "Treatment Options for Patients With Chronic Myeloid Leukemia Who Are Resistant to or Unable to Tolerate Imatinib". *Clinical Therapeutics*: 804-820.
39. An, X.; Tiwari, A.; Sun, Y.; Ding, P.; Ashby Jr, C.; Chen, Z. (2010). "BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: a review". *Leukemia research* 34 (10): 1255–1268.
40. Goto, T, Nishikori, M, Arlin, Z, et al. Growth characteristics of leukemic and normal hematopoietic cells in Ph' + chronic myelogenous leukemia and effects of intensive treatment. *Blood* 1982; 59:793.

41. Kantarjian, HM, Talpaz, M, LeMaistre, CF, et al. Intensive combination chemotherapy and autologous bone marrow transplantation leads to the reappearance of Philadelphia chromosome-negative cells in chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 1991; 67:2959.
42. Ogawa, M, Fried, J, Sakai, Y, et al. Studies of cellular proliferation in human leukemia. VI. The proliferative activity, generation time, and emergence time of neutrophilic granulocytes in chronic granulocytic leukemia. *Cancer* 1970; 25:1031.
43. Jonuleit, T, Peschel, C, Schwab, R, et al. Bcr-Abl kinase promotes cell cycle entry of primary myeloid CML cells in the absence of growth factors. *Br J Haematol* 1998; 100:295.
44. Strife, A, Lambek, C, Wisniewski, D, et al. Discordant maturation as the primary biological defect in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res* 1988; 48:1035.
45. Tefferi A (2006). "Classification, diagnosis and management of myeloproliferative disorders in the JAK2V617F era". *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006: 240–5.
46. Jamieson, CH, Ailles, LE, Dylla, SJ, et al. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med* 2004; 351:657.
47. Reya, T, Duncan, AW, Ailles, L, et al. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 2003; 423:409.
48. Dierks, C, Beigi, R, Guo, GR, et al. Expansion of Bcr-Abl-positive leukemic stem cells is dependent on Hedgehog pathway activation. *Cancer Cell* 2008; 14:238.
49. Amarante-Mendes, GP, Naekyung Kim, C, Liu, L, et al. Bcr-Abl exerts its antiapoptotic effect against diverse apoptotic stimuli through blockage of mitochondrial release of cytochrome C and activation of caspase-3. *Blood* 1998; 91:1700.
50. Skorski, T, Wlodarski, P, Daheron, L, et al. BCR/ABL-mediated leukemogenesis requires the activity of the small GTP-binding protein Rac. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:11858.

51. Skorski, T, Wlodarski, P, Daheron, L, et al. BCR/ABL-mediated leukemogenesis requires the activity of the small GTP-binding protein Rac. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:11858.
52. Hurley, RW, McCarthy, JB, Verfaillie, CM. Direct adhesion to bone marrow stroma via fibronectin receptors inhibits hematopoietic progenitor proliferation. *J Clin Invest* 1995; 96:511.
53. Gordan MY, Dowding CR, Rilet GP, Goldman JM, Greaves MF. Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukemia. *Nature* 1987;328:342-4.
54. Bazzoni, G, Carlesso, N, Griffin, JD, Hemler, ME. Bcr/Abl expression stimulates integrin function in hematopoietic cell lines. *J Clin Invest* 1996; 98:521.
55. Kurzrock R, Talpaz M. *Molecular Biology in Cancer Medicine* (Second Edition) Martin Dunitz Ltd.1999
56. Nishii, K, Kabarowski, JH, Gibbons, DL, et al. ts BCR-ABL kinase activation confers increased resistance to genotoxic damage via cell cycle block. *Oncogene* 1996; 13:2225.
57. Nowicki, MO, Falinski, R, Koptyra, M, et al. BCR/ABL oncogenic kinase promotes unfaithful repair of the reactive oxygen species-dependent DNA double-strand breaks. *Blood* 2004; 104:3746.
58. Sawyers, CL. Signal transduction pathways involved in BCR-ABL transformation. *Baillieres Clin Haematol* 1997; 10:223.
59. Matulonis, U, Salgia, R, Okuda, K, et al. Interleukin-3 and p210 BCR/ABL activate both unique and overlapping pathways of signal transduction in a factor-dependent myeloid cell line. *Exp Hematol* 1993; 21:1460.
60. Jiang, X, Lopez, A, Holyoake, T, et al. Autocrine production and action of IL-3 and granulocyte colony-stimulating factor in chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:12804.

61. Li, S, Gillessen, S, Tomasson, MH, et al. Interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor are not required for induction of chronic myeloid leukemia-like myeloproliferative disease in mice by BCR/ABL. *Blood* 2001; 97:1442.
62. Hu, Y, Liu, Y, Pelletier, S, et al. Requirement of Src kinases Lyn, Hck and Fgr for BCR-ABL1-induced B-lymphoblastic leukemia but not chronic myeloid leukemia. *Nat Genet* 2004; 36:453.
63. Hoelbl, A, Schuster, C, Kovacic, B, et al. Stat5 is indispensable for the maintenance of bcr/abl-positive leukaemia. *EMBO Mol Med* 2010; 2:98.
64. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, Kantarjian HM (1999). "Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy". *Annals of Internal Medicine* 131 (3): 207–219. PMID 10428738.
65. Tefferi A (2006). "Classification, diagnosis and management of myeloproliferative disorders in the JAK2V617F era". *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006: 240–5. doi:10.1182/asheducation-2006.1.240. PMID 17124067.
66. Savage DG; Szydlo RM; Goldman JM (1997). "Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral centre over a 16-year period". *Br J Haematol* 96 (1): 111–6. doi:10.1046/j.1365-2141.1997.d01-1982.x. PMID 9012696.
67. Tefferi A, Thiele J, Orazi A, Kvasnicka HM, Barbui T, Hanson CA, Barosi G, Verstovsek S, Birgegard G, Mesa R, Reilly JT, Gisslinger H, Vannucchi AM, Cervantes F, Finazzi G, Hoffman R, Gilliland DG, Bloomfield CD, Vardiman JW (2007). "Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert pane". *Blood* 110 (4): 1092–7. doi:10.1182/blood-2007-04-083501. PMID 17488875.
68. Kantarjian H, Dixon D, Keating M, Talpaz M, Walters R, McCredie K, Freireich E (1988). "Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia". *Cancer* 61 (7): 1441–6. doi:10.1002/1097-0142(19880401)61:7<1441::AID-CNCR2820610727>3.0.CO;2-C. PMID 3162181.

69. Sokal J, Baccarani M, Russo D, Tura S (1988). "Staging and prognosis in chronic myelogenous leukemia". *Semin Hematol* 25 (1): 49–61. PMID 3279515.
70. Vardiman J, Harris N, Brunning R (2002). "The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms". *Blood* 100 (7): 2292–302. doi:10.1182/blood-2002-04-1199. PMID 12239137. Retrieved 2007-09-22.
71. Karbasian Esfahani M, Morris EL, Dutcher JP, Wiernik PH (2006). "Blastic phase of chronic myelogenous leukemia". *Current Treatment Options in Oncology* 7 (3): 189–199. doi:10.1007/s11864-006-0012-y. PMID 16615875.
72. Sacchi S, Kantarjian HM, O'Brien S, et al. Chronic myelogenous leukemia in nonlymphoid blastic phase: analysis of the results of first salvage therapy with three different treatment approaches for 162 patients. *Cancer* 1999; 86:2632.
73. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, et al. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 2001; 344:1038.
74. Kantarjian HM, Cortes J, O'Brien S, et al. Imatinib mesylate (STI571) therapy for Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in blast phase. *Blood* 2002; 99:3547.
75. Fruehauf S, Topaly J, Buss EC, et al. Imatinib combined with mitoxantrone/etoposide and cytarabine is an effective induction therapy for patients with chronic myeloid leukemia in myeloid blast crisis. *Cancer* 2007; 109:1543.
76. Martiat, P, Mecucci, C, Nizet, Y, et al. P190 BCR/ABL transcript in a case of Philadelphia-positive multiple myeloma. *Leukemia* 1990; 4:751.
77. Mitani, K, Sato, Y, Tojo, A, et al. Philadelphia chromosome positive B-cell type malignant lymphoma expressing an aberrant 190 kDa bcr-abl protein. *Br J Haematol* 1990; 76:221.
78. Dinçkol G. Nobel Tıp Kitapevleri. Klinik Hemotoloji Kitabı. 2003;199-214.

79. Brien SG, Guilhot F, Larson RA, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2003;348:994-1004
80. Mauro MJ, Deininger MW. Chronic myeloid leukemia in 2006: a perspective. *Haematologica*. 2006;91:152,
81. Kronik Miyeloproliferatif Hastalıklarda Tanı ve Tedavi Kılavuzu, Türk Hematoloji Derneği, (1.Versiyon/Mayıs 2010)
82. Virchow R. Weisses Blut. *Frorieps Notizen*. 1845;36:151–156.
83. Geary CG. The story of chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2000;10:2-11.
84. Ito K, Bernardi R, Morotti A, et al. PML targeting eradicates quiescent leukaemia-initiating cells. *Nature*. 2008;453:1072–1078.
85. O'Dwyer ME, La Rosee P, Nimmanapalli R, Bhalla KN, Druker BJ. Recent advances in Philadelphia chromosome-positive malignancies: the potential role of arsenic trioxide. *Semin Hematol*. 2002;39:18–21.
86. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*. 1960;132:1497.
87. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim?term=chronic myeloid leukemia](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim?term=chronic%20myeloid%20leukemia)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/608232>
88. Valent, P. (2010). "Standard treatment of Ph+ CML in 2010: how, when and where not to use what BCR/ABL1 kinase inhibitor?". *European Journal of Clinical Investigation* 40 (10):918–931.
89. Dinçkol G. Nobel Tıp Kitapevleri. *Klinik Hemotoloji Kitabı*. 2003;199-214.
90. Kantarjian HM, Melo JV, Tura S et al: Chronic myelogenous leukemia: disease biology and current and future therapeutic strategies, *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*, 2000;90-109

91. Baccarani M, Rosti G, de Vivo A, et al. A Randomized study of interferon alpha versus interferon-alpha and low dose-ara-binosyl cytosine in Chronic myeloid leukemia. *Blood* 2002;99:1527-35.
92. K Ebru, İC Haznedaroğlu, Kronik Miyelositer Lösemi, Türkiye Klinikleri J Int Med Sci 2007, 3(2):56-61
93. Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, et al. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010;362:2260-2270.
94. Saglio G, Kim DW, Issaragrisil S, et al. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010;362:2251-2259.
95. Hagop M. Kantarjian, Francis Giles, Norbert Gattermann, et al. Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is effective in patients with Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase following imatinib resistance and intolerance. *Blood*. 2007;110: 3540-3546.
96. Cortes J, Kim DW, Raffoux E, et al. Efficacy and safety of dasatinib in imatinib-resistant or -intolerant patients with chronic myeloid leukemia in blast phase. *Leukemia*. 2008;22(12):2176-83
97. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*. 2013;122(6):872-84.
98. Hughes TP, Hochhaus A, Branford S, et al; IRIS investigators. Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: an analysis from the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS). *Blood*. 2010; 116(19):3758-3765.

99. Marin D, Ibrahim AR, Lucas C, et al. Assessment of BCRABL1 transcript levels at 3 months is the only requirement for predicting outcome for patients with chronic myeloid leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors. *J Clin Oncol.* 2012;30(3):232-238.
100. Neelakantan P, Gerrard G, Lucas C, et al. Combining BCRABL1 transcript levels at 3 and 6 months in chronic myeloid leukemia: implications for early intervention strategies. *Blood.* 2013;121(14):2739-2742.
101. Baccarani M, Cortes J, Pane F, et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol.* 2009;27(35):6041-51.
102. O'Brien S, Abboud CN, Akhtari M, et al. Clinical Practice Guidelines in Oncology. Chronic Myelogenous Leukemia, Version 1.2013, National Comprehensive Cancer Network
103. Kantarjian HM, Giles FJ, Bhalla KN, et al. Nilotinib is effective in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase after imatinib resistance or intolerance: 24-month follow-up. *Blood.* 2011;117(4):1141-1145.
104. Giles FJ, le Coutre PD, Pinilla-Ibarz J, et al. Nilotinib in imatinib-resistant or imatinib-intolerant patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase: 48-month follow-up results of a phase II study. *Leukemia.* 2013;27(1):107-112.
105. Shah NP, Kim DW, Kantarjian H, et al. Potent, transient inhibition of BCR-ABL with dasatinib 100 mg daily achieves rapid and durable cytogenetic responses and high transformation-free survival rates in chronic phase chronic myeloid leukemia patients with resistance, suboptimal response or intolerance to imatinib. *Haematologica.* 2010;95(2):232-240.
106. Rea D, Vellenga E, Junghanss C, et al. Six-year follow-up of patients with imatinib-resistant or imatinib-intolerant chronic phase chronic myeloid leukemia receiving dasatinib. [abstract] *Haematologica.* 2012;97(s1). [Abstract 1430]

107. Jabbour E, Jones D, Kantarjian HM, et al. Longterm outcome of patients with chronic myeloid leukemia treated with second generation tyrosine kinase inhibitors after imatinib failure is predicted by the in vitro sensitivity of BCR-ABL kinase domain mutations. *Blood*. 2009;114(10):2037-2043.
108. Milojkovic D, Apperley JF, Gerrard G, et al. Responses to second-line tyrosine kinase inhibitors are durable: an intention-to-treat analysis in chronic myeloid leukemia patients. *Blood*. 2012;119(8):1838-1843.
109. Tam CS, Kantarjian H, Garcia-Manero G, et al. Failure to achieve a major cytogenetic response by 12 months defines inadequate response in patients receiving nilotinib or dasatinib as second or subsequent line therapy for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2008;112(3):516-518.
110. Fava C, Kantarjian HM, Jabbour E, et al. Failure to achieve a complete hematologic response at the time of a major cytogenetic response with second-generation tyrosine kinase inhibitors is associated with a poor prognosis among patients with chronic myeloid leukemia in accelerated or blast phase. *Blood*. 2009;113(21):5058-5063.
111. Milojkovic D, Nicholson E, Apperley JF, et al. Early prediction of success or failure of treatment with second-generation tyrosine kinase inhibitors in patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica*. 2010;95(2):224-231.
112. Jabbour E, Kantarjian H, O'Brien S, et al. Predictive factors for outcome and response in patients treated with second generation tyrosine kinase inhibitors for chronic myeloid leukemia in chronic phase after imatinib failure. *Blood*. 2011;117(6):1822-1827.
113. Jabbour E, le Coutre PD, Cortes J, et al. Prediction of outcomes in patients with Ph1 chronic myeloid leukemia in chronic phase treated with nilotinib after imatinib resistance/intolerance. *Leukemia*. 2013;27(4):907-913.
114. Jabbour E, Kantarjian H, Ghanem H, et al. The achievement of a 3-month complete cytogenetic response to second-generation tyrosine kinase inhibitors predicts survival in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia after imatinib failure. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2013;13(3):302-306.

115. Rousselot P, Huguet F, Rea D, et al. Imatinib mesylate discontinuation in patients with chronic myelogenous leukemia in complete molecular remission for more than 2 years. *Blood*. 2007;109(1):58-60.
116. Ross DM, Branford S, Seymour JF, et al. Patients with chronic myeloid leukemia who maintain a complete molecular response after stopping imatinib treatment have evidence of persistent leukemia by DNA PCR. *Leukemia*. 2010;24(10):1719-1724.
117. Mahon FX, R'ea D, Guilhot J, et al; Intergroupe Franc,ais des Leuc'emies My'elo'ides Chroniques. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol*. 2010;11(11): 1029-1035.
118. Takahashi N, Kyo T, Maeda Y, et al. Discontinuation of imatinib in Japanese patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica*. 2012;97(6):903-906.
119. (KML Tanı/Tedavi Kılavuzu 2013,THD)
120. Baker DE. İmatinib meyslate. *Rev Gastroenterol Disord* 2002;2(2):75-86.
121. Druker BJ. İmatinib and chronic myeloid leukemia: validating the promise of molecularly targeted therapy. *Eur J Cancer* 2002;38(5):70-76.
122. Druker BJ. Circumventing resistance to kinase-inhibitor therapy. *N Engl J Med* 2006; 354:2594.
123. Schiffer CA. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors for chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 2007; 357:258.
124. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003; 348:994.
125. An, X.; Tiwari, A.; Sun, Y.; Ding, P.; Ashby Jr, C.; Chen, Z. (2010). "BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: a review". *Leukemia research* 34 (10): 1255–1268.

126. Bixby, D., Talpaz, M. (2009). "Mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia and recent therapeutic strategies to overcome resistance". *Hematology*: 461-476.
127. Stein, B., Smith, B.D. (2010). "Treatment Options for Patients With Chronic Myeloid Leukemia Who Are Resistant to or Unable to Tolerate Imatinib". *Clinical Therapeutics*: 804-820.
128. Gorre, M., Mohammed, M., Ellwood K., Hsu N., Paquette R., P. Rao P. N. and Sawyers C. L.(2001). "Clinical Resistance to STI-571 Cancer Therapy Caused by BCR-ABL Gene Mutation or Amplification". *Science*: 876-880.
129. Thomas, J.; Wang, L.; Clark, R.; Pirmohamed, M. (2004). "Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance". *Blood* 104 (12): 3739–3745.
130. Jabbour, E., Cortes, J., Kantarjian, H. (2009). "Nilotinib for the treatment of chronic myeloid leukemia: An evidence-based review". *Core evidence* 4: 207-213.
131. "GLIVEC Tablets - Summary of Product Characteristics (SPC)". *electronic Medicines Compendium*. Novartis Pharmaceuticals UK Ltd.
132. "Gleevec (imatinib) dosing, indications, interactions, adverse effects, and more". *Medscape Reference*. WebMD. Retrieved 24 January 2014.
133. "Imatinib". *Macmillan Cancer Support*. Retrieved 26 December 2012.
134. Haberfeld, H, ed. (2009). *Austria-Codex (in German) (2009/2010 ed.)*. Vienna: Österreichischer Apothekerverlag.
135. Kerkelä R, Grazette L, Yacobi R, Iliescu C, Patten R, Beahm C, Walters B, Shevtsov S, Pesant S, Clubb FJ, Rosenzweig A, Salomon RN, Van Etten RA, Alroy J, Durand JB, Force T (August 2006). "Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate". *Nat. Med.* 12 (8): 908–16.

136. Shima H, Tokuyama M, Tanizawa A, Tono C, Hamamoto K, Muramatsu H, Watanabe A, Hotta N, Ito M, Kurosawa H, Kato K, Tsurusawa M, Horibe K, Shimada H (October 2011). "Distinct impact of imatinib on growth at prepubertal and pubertal ages of children with chronic myeloid leukemia". *J. Pediatr.* 159 (4): 676–81.
137. Comert M, Baran Y, Saydam G. Changes in molecular biology of chronic myeloid leukemia in tyrosine kinase inhibitor era. *Am J Blood Res.* 2013 Aug 19;3(3):191-200.
138. Doç. Dr. Fevzi Altuntaş, Erciyes üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji B.D. İmatinib Direnci ve Tedavisi, KML Güncel Tanı ve Tedavisi Konuşma, 10/05/2008 Konya
139. Hughes TP, Kaeda J, Branford S, et al. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2003; 349: 1421-1432
140. Kantarjian H, Giles F, Wunderle L, et al. Nilotinib in imatinib- resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. *N Engl J Med.* 2006;354:2542-2551.
141. Kantarjian HM, Giles F, Gattermann N, et al. Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is effective in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase following imatinib resistance and intolerance. *Blood.* 2007;110:3540-3546.
142. Weisberg E, Manley P, Mestan J, Cowan-Jacob S, Ray A, Griffin JD (June 2006). "AMN107 (nilotinib): a novel and selective inhibitor of BCR-ABL". *Br. J. Cancer* 94 (12): 1765–9.
143. Manley, PW; Drueckes, P; Fendrich, G; Furet, P; Liebetanz, J; Martiny-Baron, G; Mestan, J; Trappe, J et al. (2010). "Extended kinase profile and properties of the protein kinase inhibitor nilotinib". *Biochimica et Biophysica Acta* 1804 (3): 445–53.
144. FDA: Sprycel (dasatinib): Drug Safety Communication - Risk of Pulmonary Arterial Hypertension, 10/11/2011
145. Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, et al. (June 2006). "Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias". *N. Engl. J. Med.* 354 (24): 2531–41.

146. Tokarski, J. S.; Newitt, J. A.; Chang, C. Y.; Cheng, J. D.; Wittekind, M.; Kiefer, S. E.; Kish, K.; Lee, F. Y.; Borzilleri, R.; Lombardo, L. J.; Xie, D.; Zhang, Y.; Klei, H. E. (2006). "The Structure of Dasatinib (BMS-354825) Bound to Activated ABL Kinase Domain Elucidates Its Inhibitory Activity against Imatinib-Resistant ABL Mutants". *Cancer Research* 66 (11): 5790–5797.
147. Dr. Hakan GÖKER, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Erişkin Hematoloji – KİT Ünitesi, Ankara, Kök Hücre Uygulamaları: Bugün ve Gelecek, 9. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi Konuşma Metinleri Kitabı
148. Blume KG, Forman SJ, Appelbaum FR. Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation 3rd. ed. Blackwell Pub. 2004.
149. Hehlmann R, Berger U, Pffirmann M, et al. Drug treatment is superior to allografting as first-line therapy in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2007;109:4686-4692. Epub 2007 Feb 22
150. Ljungman P, Bregni M, Brune M, et al. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe 2009 Bone Marrow Transplantation advance online publication, 6 July 2009; doi:10.1038/bmt.2009.141
151. Gratwohl A, Brand R, Apperley J, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia in Europe 2006: transplant activity, long-term data and current results. An analysis by the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Haematologica*. 2006;91(4):513-21.
152. Kantarjian, H, Talpaz, M, O'Brien, S, et al. High-dose imatinib mesylate therapy in newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic phase chronic myeloid leukemia. *Blood* 2004; 103:2873.
153. Cortes, JE, Kantarjian, HM, Goldberg, SL, et al. High-dose imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: high rates of rapid cytogenetic and molecular responses. *J Clin Oncol* 2009; 27:4754.

154. Teoman Soysal, Kronik Myeloid Lösemi’de Çifte Çetrefil: Transplantasyon’a karşı İmatinib, [www.thd.org.tr](http://www.thd.org.tr), 9.MSEK
155. Goldman JM, Hughes T, Radich J, et al. Continuing reduction in level of residual disease after 4 years in patients with CML in chronic phase responding to first line Imatinib in the IRIS study. *Blood*. 2005; 106: 51a, abstract 163
156. Guilhot FG, Roy L, Millot F. Update of first line imatinib therapy in chronic phase chronic myeloid leukemia. *Hematology*. (EHA Educ. Program). 2006; 2: 93-97
157. Hughes TP, Kaeda J, Branford S, et al. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2003; 349: 1421-1432
158. Baccarani, M, Rosti, G, Castagnetti, F, et al. Comparison of imatinib 400 mg and 800 mg daily in the front-line treatment of high-risk, Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia: a European LeukemiaNet Study. *Blood* 2009; 113: 4497.
159. Cortes, JE, Baccarani, M, Guilhot, F, et al. Phase III, randomized, open-label study of daily imatinib mesylate 400 mg versus 800 mg in patients with newly diagnosed, previously untreated chronic myeloid leukemia in chronic phase using molecular end points: tyrosine kinase inhibitor optimization and selectivity study. *J Clin Oncol* 2010; 28: 424
160. Golemovic M, Verstovsek S, Giles F, et al. AMN107, a novel aminopyrimidine inhibitor of Bcr-Abl, has in vitro activity against imatinib-resistant chronic myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 2005; 11: 4941-4947.
161. Ray A, Cowan-Jacob SW, Manley PW, Mestan J, Griffin JD. Identification of BCR-ABL point mutations conferring resistance to the Abl kinase inhibitor AMN107 (nilotinib) by a random mutagenesis study. *Blood*. 2007; 109: 5011-5015.
162. Kantarjian HM, Giles F, Bhalla KN, et al. Nilotinib in chronic myeloid leukemia patients in chronic phase (CMLCP) with imatinib resistance or intolerance: 2-year follow-up results of a phase 2 study [abstract]. *Blood*. 2008; 112: 1112. Abstract 3238.

163. Giuseppe Saglio, M.D., Dong-Wook Kim, M.D., Ph.D., Surapol Issaragrisil, M.D., Philipp le Coutre, M.D., Gabriel Etienne, M.D., Clarisse Lobo, M.D., Ricardo Pasquini, M.D., Richard E. Clark, M.D., Andreas Hochhaus, M.D., Timothy P. Hughes, M.D., M.B., B.S., Neil Gallagher, M.D., Ph.D., Albert Hoenekopp, M.D., Mei Dong, M.D., Ariful Haque, M.S., Richard A. Larson, M.D., and Hagop M. Kantarjian, M.D. for the ENESTnd Investigators, Nilotinib versus Imatinib for Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia *N Engl J Med* 2010; 362:2251-2259
164. Prof. Dr. Akif Selim Yavuz, İTF Hematoloji B.D. Medical Tribune Yıl :4, Sayı:7, 20/Ağustos/2010
165. Shah NP, Tran C, Lee FY, Chen P, Norris D, Sawyers CL. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science*. 2004; 305:399-401.
166. Vajpai N, Strauss A, Fendrich G, et al. Solution conformations and dynamics of ABL kinase-inhibitor complexes determined by NMR substantiate the different binding modes of imatinib/nilotinib and dasatinib. *J Biol Chem*. 2008;283:18292-18302.
167. Melnick JS, Janes J, Kim S, et al. An efficient rapid system for profiling the cellular activities of molecular libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:3153-3158.
168. Hochhaus A, Baccarani M, Deininger M, et al. Dasatinib induces durable cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase with resistance or intolerance to imatinib. *Leukemia*. 2008;22:1200-1206.
169. Shah NP, Kantarjian HM, Kim DW, et al. Intermittent target inhibition with dasatinib 100 mg once daily preserves efficacy and improves tolerability in imatinib-resistant and - intolerant chronic-phase chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2008;26:3204-3212
170. Kantarjian HM, Kim DW, Dorlhiac-Llacer P, et al. Dasatinib 140 mg once daily (QD) demonstrates equivalent efficacy and improved safety compared with 70 mg twice daily (BID) in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia (CML-AP):2-year follow-up data from CA180-035 [abstract]. *Blood*. 2008;112:1106-1107. Abstract 3224.

171. Saglio G, Kantarjian HM, Hochhaus A, et al. Dasatinib 140 mg once daily (QD) demonstrates equivalent efficacy and improved safety compared with 70 mg twice daily (BID) in patients with chronic myeloid leukemia in blast phase (CML-BP): 2-year data from CA180-035 [abstract]. *Blood*. 2008;112:1107-1108. Abstract 3226.
172. Bradeen HA, Eide CA, O'Hare T, et al. Comparison of imatinib mesylate, dasatinib (BMS-354825), and nilotinib (AMN107) in an N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)-based mutagenesis screen: high efficacy of drug combinations. *Blood* 2006; 108:2332.
173. Jabbour E, Cortes JE, Giles FJ, et al. Current and emerging treatment options in chronic myeloid leukemia. *Cancer* 2007; 109:2171.
174. O'Hare T, Eide CA, Deininger MW. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2007; 110:2242.
175. Cortes-Franco J, Dombret H, Schafhausen P, et al. Danusertib hydrochloride (PHA-739358), a multi-kinase aurora inhibitor, elicits clinical benefit in advanced chronic myeloid leukemia and Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2009;114:356. Abstract 864
176. Gambacorti-Passerine C, Kim DW, Kantarjian HM, et al. An ongoing phase 3 study of bosutinib (SKI-606) versus imatinib in patients with newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia. Abstract 208. American Society of Hematology annual meeting and exposition, Orlando, Florida, December 4-7, 2010.
177. Cortes J, Talpaz M, Bixby D, et al. Phase I trial of oral ponatinib (AP24534) in patients with refractory chronic myelogenous leukemia (CML) and other hematologic malignancies: emerging safety and clinical response findings. Abstract 210. American Society of Hematology annual meeting and exposition, Orlando, Florida, December 4-7, 2010.
178. Kimura, S.; Ashihara, E.; Maekawa, T. (2006). "New tyrosine kinase inhibitors in the treatment of chronic myeloid leukemia". *Current pharmaceutical biotechnology* 7 (5): 371–379

- 179."Homoharringtonine (Omacetaxine Mepesuccinate) in Treating Patients With Chronic Myeloid Leukemia (CML) With the T315I BCR-ABL Gene Mutation". ClinicalTrial.gov. Retrieved October 27, 2012
- 180.Deguchi, Y.; Kimura, S.; Ashihara, E.; Niwa, T.; Hodohara, K.; Fujiyama, Y.; Maekawa, T. (2008). "Comparison of imatinib, dasatinib, nilotinib and INNO-406 in imatinib-resistant cell lines". Leukemia research 32 (6): 980–983.
- 181.Doç. Dr. Güray Saydam, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı, Hematolojik Malignitelere Sinyal İletim Sistemleri, Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi Temel Moleküler Hematoloji Kursu
- 182.Lale Doğan, Dicle Güç, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser Hacettepe Tıp Dergisi 2004; 35:34-42
- 183.Plataniak LC. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. Blood 2003; 101: 4667-79.
- 184.Kolch W. Meaningful relationships: The regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. Biochem J 2000; 351:289-305.
- 185.Lee JT, McCubrey JA. The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia. Leukemia 2002; 16:486-507
- 186.Deninger M, Buchdunger E, Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. Blood. 2005;105(7):2640-2653.
- 187.Doç. Dr. Nilgün Kapucuoğlu, Onkogenler ve Tümör Supressor Genler , [tip.sdu.edu.tr/akademikyapi/dersnotlar/Patoloji/Doc.../onkogen.pdf](http://tip.sdu.edu.tr/akademikyapi/dersnotlar/Patoloji/Doc.../onkogen.pdf)
- 188.Yu H, Jove R. The STATs of cancer-new molecular targets come of age. Nat Rev Cancer 2004;4:97-105
- 189.Williams JG. Serpentine receptors and STAT activation: more than one way to twin a STAT. Trends in Biochemical Sciences 1999;24:333-4

190. Bowman, T., Garcia R, Turkson J, Jove R. et al. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000;19:2474-88
191. Buettner R, Mora LB, Jove R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res* 2002;8:945-54
192. Sinclair A, Latif AL, Holyoake TL. Targeting survival pathways in chronic myeloid leukaemia stem cells. *Br J Pharmacol.* 2013 Aug;169(8):1693-707. doi: 10.1111/bph.12183.
193. Furqan M, Mukhi N, Lee B, Liu D. Dysregulation of JAK-STAT pathway in hematological malignancies and JAK inhibitors for clinical application. *Biomark Res.* 2013 Jan 16;1(1):5.
194. Kaymaz BT, Selvi N, Gokbulut AA, Aktan C, Gündüz C, Saydam G, Sahin F, Cetintaş VB, Baran Y, Kosova B. Suppression of STAT5A and STAT5B chronic myeloid leukemia cells via siRNA and antisense-oligonucleotide applications with the induction of apoptosis. *Am J Blood Res.* 2013;3(1):58-70. Epub 2013 Jan 17.
195. Heim MH. The Jak-STAT pathway: cytokine signalling from the receptor to the nucleus. *J Recept Signal Transduct Res.* 1999 Jan-Jul;19(1-4):75-120.
196. Jung JH, Kwon TR, Jeong SJ, Kim EO, Sohn EJ, Yun M, Kim SH. Apoptosis Induced by Tanshinone IIA and Cryptotanshinone Is Mediated by Distinct JAK/STAT3/5 and SHP1/2 Signaling in Chronic Myeloid Leukemia K562 Cells. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:805639. doi: 10.1155/2013/805639. Epub 2013 Jun 26.
197. Kaymaz BT, Selvi N, Gündüz C, Aktan C, Dalmızrak A, Saydam G, Kosova B. Repression of STAT3, STAT5A, and STAT5B expressions in chronic myelogenous leukemia cell line K-562 with unmodified or chemically modified siRNAs and induction of apoptosis. *Ann Hematol.* 2013 Jan;92(2):151-62. doi: 10.1007/s00277-012-1575-2. Epub 2012 Oct 4.

- 198.Kiper HD, Tezcanli Kaymaz B, Gokbulut AA, Selvi N, Avci CB, Kosova B, Iskender G, Yandim MK, Gunduz C, Sahin F, Baran Y, Saydam G. STAT pathway in the regulation of zoledronic acid-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia cells. *Biomed Pharmacother.* 2013 Jul;67(6):527-32. doi: 10.1016/j.biopha.2013.04.006. Epub 2013 May 7.
- 199.Walz C1, Ahmed W, Lazarides K, Betancur M, Patel N, Hennighausen L, Zaleskas VM, Van Etten RA. Essential role for Stat5a/b in myeloproliferative neoplasms induced by BCR-ABL1 and JAK2(V617F) in mice. *Blood.* 2012 Apr 12;119(15):3550-60. doi: 10.1182/blood-2011-12-397554. Epub 2012 Jan 10.
- 200.Baśkiewicz-Masiuk M , Machaliński B. The role of the STAT5 proteins in the proliferation and apoptosis of the CML and AML cells. *Eur J Haematol.* 2004 Jun;72(6):420-9.
- 201.Danisz K, Blasiak J. Role of anti-apoptotic pathways activated by BCR/ABL in the resistance of chronic myeloid leukemia cells to tyrosine kinase inhibitors. *Acta Biochim Pol.* 2013 Nov 22. [Epub ahead of print]
- 202.Huang J , Hu W, Bottsford-Miller J, Liu T, Han HD, Zand B, Pradeep S, Roh JW, Thanappappa D Sr, Dalton HJ, Pecot CV, Rupaimoole R, Lu C, Fellman BM,Urbauer DL, Kang Y, Jennings NB, Huang L, Broaddus RR, Deavers MT, Coleman R, Sood AK. Crosstalk between EphA2 and BRAf/CRaf is a Key Determinant of Response to Dasatinib. *Clin Cancer Res.* 2014 Jan 31.
- 203.Lin YC, Wu MH, Wei TT, Lin YC, Huang WC, Huang LY, Lin YT, Chen CC. Metformin sensitizes anticancer effect of dasatinib in head and neck squamous cell carcinoma cells through AMPK-dependent ER stress. *Oncotarget.* 2013 Jan 7.
- 204.Pogliaghi M, Papagno L, Lambert S, Calin R, Calvez V, Katlama C, Autran B. The tyrosine kinase inhibitor Dasatinib blocks in-vitro HIV-1 production by primary CD4+ T cells from HIV-1 infected patients. *AIDS.* 2014 Jan 14;28(2):278-81. doi: 10.1097/QAD.0000000000000073.

205. Mpakou VE, Kontsioti F, Papageorgiou S, Spathis A, Kottaridi C, Girkas K, Karakitsos P, Dimitriadis G, Dervenoulas I, Pappa V. Dasatinib inhibits proliferation and induces apoptosis in the KASUMI-1 cell line bearing the t(8;21)(q22;q22) and the N822K c-kit mutation *Leuk Res.* 2013 Feb;37(2):175-82. doi: 10.1016/j.leukres.2012.10.011. Epub 2012 Nov 10.
206. Shapira S, Granot G, Mor-Tzuntz R, Raanani P, Uziel O, Lahav M, Shpilberg O. Second-generation tyrosine kinase inhibitors reduce telomerase activity in K562 cells. *Cancer Lett.* 2012 Oct 28;323(2):223-31. doi: 10.1016/j.canlet.2012.04.022. Epub 2012 Apr 30.
207. Okabe S, Tauchi T, Tanaka Y, Ohyashiki K. Dasatinib preferentially induces apoptosis by inhibiting Lyn kinase in nilotinib-resistant chronic myeloid leukemia cell line. *J Hematol Oncol.* 2011 Aug 2;4(1):32. doi: 10.1186/1756-8722-4-32.
208. Nam S, Williams A, Vultur A, List A, Bhalla K, Smith D, Lee FY, Jove R. Dasatinib (BMS-354825) inhibits Stat5 signaling associated with apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells. *Mol Cancer Ther.* 2007 Apr;6(4):1400-5.
209. Song L, Morris M, Bagui T, Lee FY, Jove R, Haura EB. Dasatinib (BMS-354825) selectively induces apoptosis in lung cancer cells dependent on epidermal growth factor receptor signaling for survival. *Cancer Res.* 2006 Jun 1;66(11):5542-8.
210. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, Cervantes F, Clark RE, Cortes JE, Guilhot F, Hjorth-Hansen H, Hughes TP, Kantarjian HM, Kim DW, Larson RA, Lipton JH, Mahon FX, Martinelli G, Mayer J, Müller MC, Niederwieser D, Pane F, Radich JP, Rousselot P, Saglio G, Sauße S, Schiffer C, Silver R, Simonsson B, Steegmann JL, Goldman JM, Hehlmann R. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood.* 2013 Aug 8;122(6):872-84. doi: 10.1182/blood-2013-05-501569.