

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**KRONİK MYELOİD LÖSEMİDE
PHILADELPHIA KROMOZOMU
VE
BCR/ABL FÜZYON TRANSKRİPTİ
BELİRLENMESİNDE
REAL-TIME PCR, FISH VE SİTOGENETİK YÖNTEMLERİN
KARŞILAŞTIRMALI DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Fatma EKİCİ

Samsun – 2011

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**KRONİK MYELOİD LÖSEMİDE
PHILADELPHIA KROMOZOMU
VE
BCR/ABL FÜZYON TRANSKRİPTİ
BELİRLENMESİNDE
REAL-TIME PCR, FISH VE SİTOGENETİK YÖNTEMLERİN
KARŞILAŞTIRMALI DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Fatma EKİCİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. GÖNÜL OĞUR

Samsun - 2011

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresinde ve bu çalışmanın planlanması, yürütülmesi ve gerçekleştirilmesinde bilgi, deneyim, saygı ve anlayışını bir an olsun esirgemeyen Genetik Anabilim Dalı Başkanı, saygıdeğer hocam, danışmanım, sayın Prof. Dr. Gönül OĞUR'a,

Çalışmamıza değerli katkıları olan başta sayın Prof. Dr. Mehmet TURGUT olmak üzere Erişkin Hematoloji ve Pediatrik Hematoloji Bilim Dalı öğretim üyesi hocalarıma ve asistan arkadaşlarıma,

Uzmanlık eğitimimde bilgilerinden faydalandığım tüm hocalarıma ve asistan arkadaşlarıma,

İstatistik değerlendirmesinde yardımcı olan sayın Prof. Dr. Yüksel BEK'e,

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalıştığım, iyi ve kötü günlerimde hoş görü ve destekleri ile daima yanımda olan çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi bir borç bilir saygılar sunarım.

Hayatımın her aşamasında bana yürekten desteğinden ve sabrından dolayı aileme, sevgili dostlarıma, yaşam kaynağım canım kızıma,

Tüm hastalarıma ve ailelerine teşekkür ederim.

2.2.4.2.4. Tedavi	19
2.2.4.2.5. KML'de Tedaviye Yanıt Tanımları	24
2.3. Genetik ve Kanser	25
2.4. Hematolojik Malignitelerde Genetik Tanı Yöntemleri	30
2.4.1. Moleküler Sitogenetik Yöntemler (FISH)	31
2.4.2. Moleküler Genetik Yöntemler	33
3. MATERYAL-METOD	43
3.1. Hasta Seçimi	43
3.2. Metod	43
3.2.1. FISH Metodu	44
3.2.1.1 Kullanılan Prob	44
3.2.1.2. Probun Tanımlanması	44
3.2.1.3. FISH (Floresan in situ hibridizasyon) Metodu	45
3.2.1.4. FISH Sonuçlarının Değerlendirilmesi	45
3.2.2. Real Time PCR(RT-PCR) Metodu	45
3.2.2.1.RNA İzolasyonu Metodu	46
3.2.2.1.1. Kit içeriği	46
3.2.2.1.2. RNA izolasyonu	47
3.2.2.2. cDNA Sentezi ve PCR Amplifikasyonu	49
3.2.2.2.1. cDNA Sentezi	50
3.2.2.2.2. PCR Amplifikasyonu	51
3.2.2.3. RT- PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi	54

3.3. Etik Onay	54
3.4. İstatistiksel Analiz	54
4. BULGULAR	55
4.1. Konvansiyonel sitogenetik bulgular	57
4.2. Moleküler sitogenetik bulgular	61
4.3. Moleküler genetik bulgular	63
5. TARTIŞMA	70
6. SONUÇLAR	78
7. REFERANSLAR	81

TABLULAR

Tablolar	Sayfa Numarası
Tablo-1: Hematopoetik Büyüme Faktörleri	3
Tablo-2: Akut Lösemide Etyoloji	6
Tablo-3: KML’de prognozu belirlemede kullanılan risk skorları	17
Tablo-4: Bazı malignensi örneklerinde kromozom translokasyonlarının özellikleri	28
Tablo-5: Lösemilerde sık karşılaşılan, tanı, takip ve prognozda önemi olan kromozomal translokasyonlar ve ilişkili genler	31
Tablo-6: KML hastalarında rezidual lösemi saptanmasında metodlar	42
Tablo-7: Lghtcycler-t(9;22) Quantification Kit. Viallerin hacmi ve kimyasal bileşimleri	49
Tablo -8: cDNA master mix’i oluşturan reaktifler ve örnek hazırlama tablosu	51
Tablo -9: G6PDH master mix’ in hazırlanışı	52
Tablo -10: BCR-ABL master mix’ in hazırlanışı	52
Tablo-11: LightCycler BCR-ABL amplifikasyon programı	53
Tablo-12: KML, evrelere göre hasta sayıları	55
Tablo-13 KML evrelere göre materyal giriş sayıları	56

Tablo-14 KML evrelere göre materyal giriş sayıları ve sonuç alma oranları	56
Tablo-15: Ph1/bcr-abl için Klasik Sitogenetik, FISH ve RT-PCR pozitiflik oranları	57
Tablo-16: KML materyallerinde evreye göre “sitogenetik” değerlendirme sonuçları	58
Tablo-17: Sitogenetik Analizde Ph1 ve ek anomaliler	59
Tablo-18: Bcr/Abl füzyon FISH pozitifliği ve klinik evreler	61
Tablo-19: Ph kromozomu ya da bcr/abl tanımında Sitogenetik ve FISH karşılaştırma	63
Tablo-20: Bcr/Abl tanımında qRT-PCR ve Klinik Evre İlişkisi	65
Tablo-21: Remisyon ve Remisyon Dışı Evrelerde Sitogenetik, FISH ve qRT-PCR sonuçları	65
Tablo-22: qRT-PCR oranı 0-0.0009 aralığında evre, sitogenetik, FISH ve PCR analiz sonuçları	66
Tablo-23: Sitogenetik ve PCR pozitiflik tanımı, karşılaştırma	67
Tablo-24: FISH ve PCR pozitiflik tanımı, karşılaştırma	68

ŞEKİLLER

Şekiller	Sayfa Numarası
Şekil-1: Hematopoetik Hiyerarşi	3
Şekil-2: ABL ve BCR genlerindeki kırılma noktalarının lokalizasyonları ve birçok kırılmadan elde edilen kimerik mRNA' ların yapısı	10
Şekil-3: ABL ve BCR proteinleri. ABL ve BCR proteinlerini oluşturan çeşitli önemli bölgeler	12
Şekil-4: Hücre döngüsü ve sinyal ileti yolları	27
Şekil-5: Southern Blot Analizi sorası grafi görülüyor	34
Şekil-6: PCR reaksiyonu	35
Şekil-7: BCR/ABL füzyon transkripti şematik görünümü	44
Şekil-8: Kullanılan primerlerin ve hibridizasyon problemlerinin dizilimi ve yerleşimi	53
Şekil-9: 46,XX,t(9;22)(q34;q11),der(21p)	60
Şekil-10: 46,XX,der(9),der(21p),-22	60
Şekil-11: 46,XY,del(6q)	60
Şekil-12: 47,XX,+8,t(9;22)(q34;q11)	60
Şekil-13: Ph1 pozitifliği ve kompleks kromozomal anomaliler	60
Şekil-14: FISH, Klasik Füzyon	62
Şekil-15: FISH, Klasik Füzyon	62
Şekil-16: FISH, Atipik Füzyon	62
Şekil-17: FISH, Atipik Füzyon	62
Şekil-18: FISH, atipik Füzyon	62

yonları örneği

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ALL	: Akut lenfoblastik lösemi
allo-HKHN	:Allogeneik hematopoetik kök hücre nakli
AML	:Akut myeloid lösemi
ANNL	: Akut non lenfoblastik lösemi
AR ortalama	: Aritmetik ortalama
ATP	: Adenozin tri fosfat
BCR-ABL	: Breakpoint Cluster Region-Abelson proto-onkogeni
bp	:Base pair
cDNA	: Komplementer DNA
cen	: Sentromer
DAPI	: 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride hydrate
dATP	: Deoksi-Adenozin Trifosfat
dTTP	: Deoksi-Timidin Trifosfat
dGTP	: Deoksi-Guanozin Trifosfat
dCTP	: Deoksi-Sitidin Trifosfat
del	: Delesyon
der	: Derivatif kromozom
dic	: Disentrik kromozom
Dms	: Çift minik kromozomlar
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksitükleotid Three Phosphate
Dup	: Duplikasyon
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
FAB	: French-American-British
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
FISH	: Fluorescence In Situ Hybridization
FITC	: Floresan isotiyosiyonat
G-CSF	: Granülosit-koloni stimülan faktör

GM-CSF	: Granülosit-makrofaj koloni stimülan faktör
GMP	:Granülosit/makrofaj progenitör
GRB2	: Büyüme faktörü reseptörüne bağı protein 2
GTP	: Guanozin tri fosfat
HLA	: İnsan Lökosit Antijenleri
HKH	:Hematopoetik kök hücre
HSR	: Homojen boyanma bölgeleri
HU	: Hidroksiüre
Ig	: Immünglobulin
IL	: İnterlökin
IFN- α	: İnterferon alfa
IRIS deneyi	: Uluslararası Bağımsız İnterferon ve ST1571(İmatinib) araştırması
ISCN	: International System For Human Cytogenetic Nomenclature
İ	: İzokromozom
İns	: İnsersiyon
İnv	: İnversiyon
kb	: kilo baz
kd	: kilo dalton
Kİ	: Kemik İliğı
KLL	: Kronik Lenfoid Lösemi
KML	: Kronik myeloid lösemi
KSY	:Parsiyel (kısmi) sitogenetik yanıt
LSI	: Locus Specific Identifier
M-CSF	: Makrofaj koloni stimülan faktör
Mar	: Markır kromozom
MMR	: Mismatch repair
MMY	:Majör moleküler yanıt
MPH	: Miyeloproliferatif Hastalık
MRD	: Minimal Residual Disease (Minimal Kalıntı Hastalığı)
MSS	: Merkezi sinir sistemi
P	: Kromozomun kısa kolu
Ph1	: Philadelphia Kromozomu

Ph1+	: Philadelphia Kromozomu var (pozitif)
Ph1-	: Philadelphia Kromozomu yok (negatif)
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PK	: Periferik Kan
q	: Kromozomun uzun kolu
QPCR	: Quantitative Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAR α	: Retinoik asit reseptör α
rIFN α	: rekombinan interferon-alfa
RNA	: Ribonükleik asit
RT-PCR	: Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SCF	: Kök hücre faktörü
SY	: Sitogenetik Yanıt
SPSS	: Statistical Package For Science Studies
t	: Translokasyon
TBG	: Tümör Baskılayıcı Genler
TCR	: T hücre reseptör
THY	: Tam Hematolojik Yanıt
TK	: Tirozin Kinaz
TKI	: Tirozin Kinaz İnhibitörleri
TMY	: Tam Moleküler Yanıt
TNF	: Tümör nekrozis faktör
TRITC	: Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate
TSY	: Tam Sitogenetik Yanıt
WHO	: World Health Organisation

ÖZET

Dr. Fatma EKİCİ, Uzmanlık Tezi

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, 2011

KML, olguların %95' inden fazlasında hastalık patogenezinde önemli rolü olduğu bilinen, Philadelphia kromozomu adı verilen, özellikli bir translokasyon ile karakterize, klonal bir hematopoetik kök hücre hastalığıdır. Ph1 translokasyonu sonucu ortaya çıkan bcr/abl füzyon geni Kronik Myeloid Lösemi'de patogenezin başlıca sorumlusudur. Ph1 translokasyonunu ya da bcr/abl transkriptini tanımlayan sitogenetik analiz, FISH ve qRT-PCR metotları, KML hastalarının tanı ve takiplerinde etkin olarak kullanılan yöntemlerdir. Klinik göstergeler ve rutin laboratuvar testleri hastanın prognozu hakkında bilgi verse de, genetik değişiklikler hastanın uzun süre hayatta kalması ve tam remisyonun başarısı için dikkat edilmesi gereken en önemli göstergelerdir.

Çalışmamızın amacı, ph1+ KML vakalarında, Sitogenetik, FISH ve qRT-PCR' ın tanısal ve klinik kullanışlılığını karşılaştırmaktır.

Çalışmamızda 4' ü çocuk hasta olmak üzere 81 olguya ait toplam 161 materyalde eş zamanlı uygulanan sitogenetik, FISH ve qRT-PCR analizi sonuçlarını karşılaştırmalı olarak değerlendirdik. Ph1/bcr-abl pozitifliği saptama oranı qRT-PCR da sitogenetik ve FISH e göre anlamlı oranda yüksek bulunmuştur (sitogenetik, 71/161 (%47,3); FISH, 76/163 (%46.6); qRT-PCR, 132/194 (%68.0). Sitogenetik analizde, remisyon dışı evrelerde (kronik faz, relaps, akselere, blastik evre ve dirençli evrede) Ph1 pozitiflik oranı yüksek bulunmuş ve %57.0-%100.0 sınırları içinde saptanmıştır. Kronik fazda bu oran %94.3 bulunmuştur. Sitogenetik analizde, klinik remisyon evresinde %16.5 oranında Ph1 pozitifliği saptanmıştır (AR ortalama %3). Sitogenetik analizde 22 hastada Ph1 dışında, ek kromozom anomalileri saptandı. Trisomi 8 ve del(6q) en sık görülen anomalilerdi. Moleküler sitogenetik (FISH) analizinde remisyon dışı evrelerde (kronik faz, relaps, akselere, blastik evre ve dirençli evrede) Ph1 pozitiflik oranı yüksek bulunmuş ve %65.0-%100.0 sınırları içinde saptanmıştır. Kronik fazda bu oran %93.4 bulunmuştur. FISH analizinde, klinik remisyon evresinde %13.4 oranında bcr/abl füzyon pozitifliği saptanmıştır (AR ortalama %2).

FISH analizleri remisyon dışı hastalarda, 63 analizde klasik füzyon, 13 hastada ise atipik füzyon gösterdi. Sitogenetik ve FISH analizleri karşılaştırıldığında, her 2 yaklaşımın da Ph1 kromozomu ya da bcr/abl i tanımında aynı etkinlikte olduğu görüldü. "Remisyon dışı" tüm

evrelerde 0.0225-0.1074 sınırları içinde pozitiflik saptanmıştır. Klinik remisyona ait qRT-PCR oran sonuçları, $0,000543 \pm 0,001149$ bulunmuştur. qRT-PCR sonuçları, remisyon evresinde, bcr/abl transkript tanımlamada, sitogenetik ve FISH ile karşılaştırıldığında en duyarlı metod olarak belirlenmiştir. Kronik faz ve remisyon dışı fazlarda qRT-PCR' ın sitogenetik ve FISH ile aynı etkinlikte olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak KML hastalarının denetiminde **“kronik faz, relaps, akselere faz, blastik faz, ve dirençli fazlarda”** sitogenetik, FISH ve qRT-PCR aynı etkinlikte olmakla birlikte, her 3 ünün de farklı avantajları olduğundan, her üç yöntem birlikte uygulanmalıdır. Böylece atipik seyirli ve yüksek riskli olguları önceden belirlemek (sitogenetik ve FISH) olanaklı olacaktır. Ayrıca qRT-PCR' ın bu kırık noktalarını o hasta için tanıyıp tanımadığını bilmek temelinde qRT-PCR eşliği de önemlidir. **“Remisyon fazında”** ve **“major moleküler yanıt”** değerlendirmesinde ise qRT-PCR yeterli görülmektedir. Elde edilen aritmetik ortalamalar, qRT-PCR monitorizasyonunun laboratuvarımızda uygulanan şekli ile hasta denetiminde etkin olduğunu düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kronik Myelositer Lösemi, Philadelphia Kromozomu, Floresan In Situ Hibridizasyon, Kuantitatif Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu, Tanı ve Takip.

ABSTRAC

Fatma Ekici, MD, Residency Thesis

Ondokuz Mayıs University, 2011

CML, is a clonal, hematopoietic stem cell disease, stemmed from a chromosome called philadelphia which characterized by a specialized translocation and known to have a prominent role in the pathogenesis in the 95% of the cases. Bcr/abl fusion gene which originates from the Ph1 translocation is the leading factor in the pathogenesis in the Chronic Myeloid Leukemia. The cytogenetical analysis which defines Ph1 translocation or bcr/abl transcript called FISH and qRT-PCR method, are the effective procedures that are used in the diagnosis and follow-up of the patients with CML. Although the clinical parameters and routine laboratory tests give important factors about the prognosis of the disease, the most important signs for the survival of the patients and the success for the full remission are the genetic changes.

Our aim in this study is to compare the diagnostic and clinical practicability of cytogenetics, FISH and qRT-PCR in Ph1 and CML cases.

In our study, we comparatively assessed the results of cytogenetic, FISH and qRT-PCR analysis in 161 materials, composed of 81 cases which 4 of them were children. The ratio of positivity in the Ph1-bcr/abl were significantly higher in a qRT-PCR compared to cytogenetics and FISH [cytogenetic; 71/161 (47.3%), FISH; 76/163 (46.6%), qRT-PCR; 132/194 (68.0%)]. In cytogenetical analysis, in non-remission phases (chronic phase, relapse, acceleration phase, blastic phase and resistant phase) the Ph1 positivity rate is found higher between the borders of 57.0% and 100.0%. In chronic phase this ratio is found 94.3%. In cytogenetical analysis, at the phase of clinic remission the rate of Ph1 positivity is found 16.5% (arithmetic mean 3%). In cytogenetical analysis, in 22 patients, apart from Ph1, extra chromosome anomalies has been found. Trisomy 8 and del(6q) were the most common anomalies. In molecular cytogenetic analysis (FISH), in non-remission phases (chronic phase, relapse, acceleration phase, blastic phase and resistant phase) the ratio of Ph1 positivity is found higher between ratios of 65.0% and 100.0%. In chronic phase, this ratio is found 93.4%. In FISH analysis, at the phase of clinical remission, the bcr/abl fusion positivity is found in the ratio of 13.4% (arithmetic mean 2%). FISH analysis, in non-remission patients, showed classic fusion in 63 and atypical fusion in 13 of the patients. When cytogenetic and FISH analysis are compared, it's been seen that both are in equal effectivity in defining the Ph1 chromosome or bcr/abl. In all phases except "non-remission", the positivity has been found in the borders of 0.0225-0.1074. The qRT-PCR results has been found the most sensitive method when compared to cytogenetics or FISH in defining bcr/abl transcript at the remission phase. In chronic phase and non-remission phases, it's been seen that qRT-PCR has the equal effectivity with cytogenetics and FISH.

As a result, when assessing patients with CML, however, cytogenetics, FISH and qRT-PCR has the equal effectivity at the times of “chronic phase, relaps, acceleration phase, blastic phase and resistant phase”, all three of them should be used together since every one of them has different advantages. By this strategy, it will be possible to detect the atypical and high risk types beforehand (cytogenetic and FISH). In addition, the application of qRT-PCR is important on the basis that if it can define the broken point in that patient or not. But in “remission phase” and “major molecular response” assessment, qRT-PCR is sufficient. The arithmetic means which has been obtained, has shown that qRT-PCR monitorization, like the way performed as in our laboratory, is effective in patient research.

Key Words: Chronic Myeloid Leukemia, Philadelphia Chromosome, Flourescence In Situ Hybridization, Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, Diagnosis and Follow-Up.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik Myeloid Lösemi (KML), primitif pluripotent kök hücrenin, myeloid progenitör hücrelerde artmış proliferasyonu ve azalmış apoptozisi ile karakterize klonal bir hastalıdır (43). KML' li hastalarda 1960 yılında philadelphia kromozomunun (ph1) gösterilmesinden sonraki yıllarda kemik iliğinde ph1 pozitif metafazların gösterilmesi ve gelişen teknolojiyle birlikte bu kısalmış kromozom 22 (ph1) nin, kromozom 9 ve 22. kromozomlar arası resiprokal translokasyon sonucu oluştuğu ve kimerik bcr-abl füzyon genini ortaya çıkardığı anlaşılmıştır.

KML' nin moleküler patojeni bilinmesine rağmen gen translokasyonuna yol açan mekanizma bilinmemektedir. KML insidansı 100.000 de 1-2 olarak bildirilmektedir. 20 yaşın altında oldukça nadir olup ilerleyen dekadlarda görülen artış 50-60 yaşlarda pik yapmaktadır. Erkeklerde kadınlardan biraz daha fazla sıklıkta görülmektedir. 1945' te atom bombası atılmasından sonra ortaya çıkan radyasyon Japonya da KML sıklığını oldukça artırmıştır. Radyasyonun en belirgin olarak etkili olduğu lösemi tipi KML dir.

KML nin benzersiz moleküler karakteristiği [hastalığa neden olan ABL (9q34) ve BCR (22q11) translokasyonu] hastalığın tanısı ve tedaviye tepkinin gözlemlenmesi adına değerli bir araç niteliği göstermektedir. KML' de sıklıkla görülen philadelphia kromozomunu saptayan metodlar arasında kemik iliği veya periferik kan örneklerinden konvansiyonel sitogenetik ile kromozom karyotip analizi, moleküler sitogenetik yöntemlerden birisi olan FISH (Floresan In Situ Hibridizasyon) ve RNA izolasyonu sonrasında Real-Time PCR yöntemi kullanılarak bcr-abl füzyon genlerini tespit etme metodları bulunmaktadır.

Çalışmamızda KML' de philadelphia kromozomu ve bcr-abl füzyon transkripti belirlenmesinde Real-Time PCR, FISH ve sitogenetik yöntemlerin karşılaştırmalı değerlendirmesi, KML hastalarının klinik tanı, tedavi ve prognozunun belirlenmesinde Kanser sitogenetiği, moleküler sitogenetik (FISH), Real-Time PCR metodlarının hastaların klinik durumlarıyla ilişkilendirilmesi, takip ve tedavisinin yönlendirilmesinde kullanılması amaçlanmıştır. Bu bağlamda üç yöntemin birlikte çalışıldığı 161 sitogenetik, 163 FISH ve 198 Real Time PCR analiz sonuçları değerlendirilmiştir.

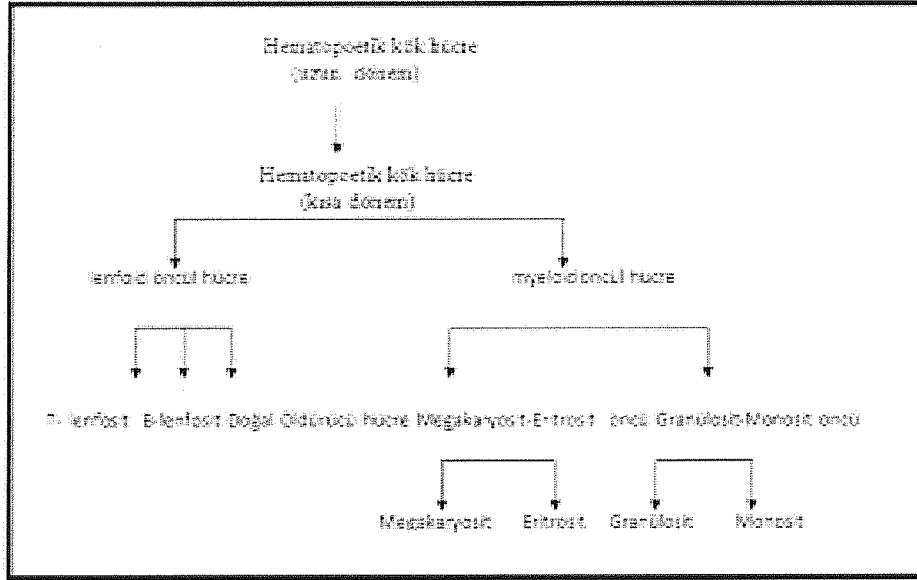
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hematopoez

Hematopoetik öncül hücrelerin çoğalması ve farklılaşması ile kan hücrelerinin oluşumuna hematopoez denir. Hematopoez, embriyonal dönemde yolk kesesinden ilkel bir dolaşım sisteminin oluşması ile intrauterin 2. haftada başlar. Hematopoetik öncül hücrelerden köken alan hücreler proliferer olur ve gestasyonun 10. haftası ile 2. trimesterin sonuna kadar dalak ve karaciğerde gerçekleşir. 3. trimesterde ise hematopoez kemiklerin medüller kısımlarında görülmeye başlar (intramedüller hematopoez).

Yenidoğanda kan yapımından ön planda kemik iliği sorumludur. Çocuklarda hemen tüm kemiklerin medüller boşluklarında kan yapımı aktif olarak devam etmektedir; erişkinlerde ise kan yapımı, aksiyel iskelet ve uzun kemiklerin proksimal kısımlarıyla sınırlıdır. Normal kan yapımının yetersizliğinde uzun kemiklerin tamamı, kemik iliğinin başka hücreler tarafından istilasında ise dalak ile karaciğer bu işlevi üstlenirler (ekstramedüller hematopoez) (4, 35).

Tüm kan hücreleri kemik iliğinde bulunan ve pluripotent hematopoetik kök hücre adı verilen hücrelerden oluşur. Pluripotent kök hücreler kendini yenileyebilme yetisine sahiptir ve bu hücrelerden multipotent kök hücreler meydana gelir. Multipotent hematopoetik kök hücre günümüzde en iyi tanımlanmış kök hücredir. Multipotent hematopoetik kök hücreler farklılaşma ve olgunlaşma kapasitesi gösterirken kendini yenileme özellikleri azalır. Lenfoid ve miyeloid progenitör kök hücreyi oluşturur. Bu aşamadan sonra progenitör kök hücreler tüm olgun kan hücrelerini (kırmızı dizi, miyelomonositer hücreler, lenfoid hücreler, megakaryositler) oluşturacak şekilde farklılaşarak olgunlaşırlar (şekil 1)(43).



Şekil-1: Hematopoetik Hiyerarşi (43)

Kemik iliği, hematopoetik hücreler, kan damarları (sinüsler), stromal hücreler, ekstrasellüler matris gibi bileşenlerden oluşan heterojen bir yapıya sahiptir. Adipositler, fibroblastlar, retikülün ve bazı glikoproteinler yanında hiyaluronik asit, kondroitin sülfat gibi bazı glikozaminoglikanlar sentezleyip sekrete ederek ekstrasellüler matrisin meydana gelmesini sağlarlar. Stromal hücreler çeşitli sitokin ve büyüme faktörleri salgırlar. Genellikle glikoprotein yapısındaki bu faktörler kök hücrelerin sağkalımı, proliferasyon ve farklılaşmasını sağlarken olgun hücrelerin de fonksiyonlarının düzenlenmesine yardımcı olur (Tablo 1).

Tablo-1: Hematopoetik Büyüme Faktörleri
<p>Stromal hücelere etki edenler: IL-1, TNF</p> <p>Pluripotent kök hücelere etki edenler: SCF, Fit-ligand</p> <p>Multipotent kök hücelere etki edenler: IL-3, GM-CSF, G-CSF, IL-6, trombopoetin</p> <p>Yönlennmiş progenitör hücelere etki edenler: G-CSF, M-CSF, IL-5, eritropoetin , trombopoetin</p>

IL: interlökin, TNF: Tümör nekrozis faktör, SCF: Kök hücre faktörü, GM-CSF: Granülosit-makrofaj koloni stimülan faktör, G-CSF: Granülosit-koloni stimülan faktör, M-CSF: Makrofaj koloni stimülan faktör

2.2. Hematolojik Malignansiler

Lösemilerin tek bir hematopoetik hücrenin transformasyonu ve lösemik bir klon oluşturması ile meydana geldiğine inanılmaktadır. Bu durum Klonal Ekspansiyon Teorisi olarak adlandırılmaktadır. Kronik Lenfoid Lösemi'de (KLL) transforme olmuş tüm lenfositlerin yüzeyinde aynı tip immunglobulin (Ig) bulunması, Akut lenfoblastik lösemi 'de (ALL) lösemik hücrelerin aynı tip Ig ve T hücre reseptör (TCR, T cell receptör) geninin yeni yapılanmasını içermesi klonal ekspansiyon teorisini desteklemektedir (88).

İlk kez 1845 te Benett, 1846 da da Virchow tarafından vakaların otopsisinde, kanın beyaz rengine dikkat çekilmiş ve yüksek lökosit sayısı sebebiyle beyaz kan terimi (weisses blut) kullanılmış, daha sonra ise beyaz anlamına gelen "leukos" ve kan anlamına gelen "haima" sözcüklerinden "leukhemia" şeklinde tanımlanmıştır. 1857 yılında ise Freidreich akut lösemi terminolojisini kullanmıştır. 1877 yılında tıp öğrencisi Paul Ehrlich, tüm hücrelerin tek bir kök hücreden çoğaldığını ileri sürmüştür. Sonraki çalışmalarda, 1900 yıllarında Naegelli lenfoblastların lenfoid hücre dizisine, myeloblastların ise myeloid hücre dizisine ait olduğunu belirtmiştir. Lösemilerin ilk tanımlandığı dönemlerde, sadece semptomatik tedavi uygulanmakta iken, 1873 te tedavide kan transfüzyonu uygulanmaya başlanmış, 1942 de ise, nitrojen mustard derivelerinin klinik etkisini gözleyen Gilman ve arkadaşları tarafından lösemi tedavisine kemoteropatik ajanlar eklenmeye başlanmıştır (4, 90). Folik asit antagonisti olan aminopterinin Farber, Diamond ve ark'ları tarafından ilk kez 1948 yılında tedavide kullanılmasıyla lösemilerde ölüm geciktirilebilmiştir (59, 90). Bu tarihten sonra çok ilaçlı kemoterapi yöntemleri geliştikçe hastalarda sağkalım oranları da yıllar içinde artmıştır.

Lösemiler kan hücrelerinin üretildiği kemik iliğinin klonal habis hastalıklarıdır. Çok fazla çoğalan fakat farklılaşmayan lökositler, başta kemik iliği olmak üzere karaciğer, lenf bezleri, dalak, deri, testis ve merkezi sinir sistemi (MSS) gibi organ ve sistemleri işgal edebilir. Yeterinden fazla hücre üretilmesine karşın, bu hücreler tam olarak olgunlaşıp farklılaşmadığından işlev gören hücre sayısı azalarak anemi,

trombositopeni ve nötropeni oluşmaktadır (26). Bu tam olarak farklılaşmamış hücreler 'blast' olarak adlandırılmaktadır. Bu hücreler normal fonksiyonlarını yerine getirme yeteneğinden yoksundur. Lösemilerin kendi içindeki alt sınıflamalarında ve fazlara ayırımında bu blastların normal hücrelere oranı ve yapısı dikkate alınmaktadır.

Lösemi, kök hücreden spesifik kan hücrelerinin oluşumuna kadar herhangi bir farklılaşma aşamasında gözlenebilir. Lösemik dönüşüm temelde genetik bir mutasyon sonucu oluşmaktadır. Mutasyona uğrayan hücrelerin çoğu, organizma tarafından çeşitli mekanizmalarla ortadan kaldırılmasına rağmen az sayıda hücre aşırı çoğalma özelliği kazanabilmektedir. İşte bu hücreler "klonojenik lösemik hücreler" olarak adlandırılmaktadır (93).

Löseminin ortaya çıkış ve ilerleme hızına bağlı olarak "akut lösemi" ve "kronik lösemi" tanımları kullanılır. Akut lösemide anormal hücreler genellikle olgunlaşmamış durumdadır ve sahip oldukları görevleri yerine getiremez. Anormal hücre sayısı hızla artar ve hastalık ilerler. Kronik lösemide de olgunlaşmamış hücreler bulunmaktadır ama lösemili hücrelerin çoğu olgunlaşmıştır ve normal işlevlerinin bir bölümünü yerine getirirler. Hücre sayısındaki artış ve hastalığın ilerleme hızı akut lösemiye göre daha yavaştır. Lösemi genellikle iki farklı hücreden ortaya çıkar: Bunlar "lenfoid" ve "myeloid" hücrelerdir. Lösemi, köken aldığı hücre tipine bağlı olarak "lenfositik lösemi" ya da "myeloid lösemi" olarak adlandırılır (5, 90).

Sonuç olarak lösemilerin büyük bir bölümünü 4 grup altında toplayabiliriz:

- **Akut lenfositik lösemi (ALL):** Erken çocukluk döneminde en çok görülen lösemi tipidir. Ayrıca 30-40 yaş arasında ileri dönemde ortaya çıkabilir.

- **Akut myeloid lösemi (AML):** Hem çocuklarda hem erişkinlerde görülür. Bazen akut lenfositik-olmayan lösemi (ANLL) olarak da adlandırılır. Genellikle 60 yaş üstü erişkinlerde ortaya çıkar.

- **Kronik lenfositik lösemi (KLL):** Genellikle 55 yaş üstü erişkinlerde ortaya çıkar. Daha gençlerde de görülebilir. Ancak çocukluk döneminde hemen hiç karşılaşılmaz.

- **Kronik myeloid lösemi (KML):** Genellikle erişkin yaşlarda görülür (79, 90).

Lösemilerin modern sınıflandırması morfolojik, immünofenotipik, sitogenetik ve moleküler bulgulara dayanır.

2.2.1. Akut Lösemiler

Gelişmiş toplumlarda tüm kanserlerin yaklaşık %3 ünü oluşturur. A.B.D.' de kanserden ölümlerin % 1.5' u akut lösemiler nedeniyledir. Erişkin akut lösemilerin yaklaşık %80' ini AML, geri kalanını ise ALL oluşturur. Çocukluk çağı lösemilerinin %97' si akut lösemilerden meydana gelmektedir (5, 90).

Akut lösemilerin oluş sebebi tam olarak bilinmemekle birlikte genetik yatkınlık, kimyasal ajanlar, ilaçlar, virüsler, iyonizan radyasyon, çevresel ve mesleki etkenler etyolojide suçlanan faktörler arasında sayılmaktadır (tablo 2)(33, 95).

Tablo-2: Akut Lösemide Etiyoloji	
İyonize ve iyonize olmayan radyasyon	
Kimyasal maddeler: Benzen, Alkilleyici ajanlar, Sigara, Pestisitlere maruziyet, Kimyasal saç boyaları	
İlaçlar: Alkilleyici ajanlar: siklofosfamid, melfalan, klorambusil Topoizomeraz 2 inhibitörleri: antrasiklinler, etoposid	
Konjenital hastalıklar: Trizomi 21 Klinefelter sendromu Kromozom Instabilite Sendromları	
Edinsel hastalıklar: Kronik myeloproliferatif hastalıklar Myelodisplastik sendromlar Aplastik anemi Paroksizmal noktürnal hemoglobinüri Virüsler (insan T lenfosit virüsü, HTLV-1, EBV)	

2.2.2. Akut Lenfoid Lösemiler (ALL)

ALL, yıllık insidansı 1-5/100.000 dir. Her yaşta görülse de en sık çocuklarda görülür. 1976' da Fransız, İngiliz ve Amerikalı patoloğların ortaya koyduğu FAB (French-American-British) sınıflamasına göre lösemik hücrelerin L1, L2 ve L3 olmak üzere 3 subtipi vardır. Bu sınıflamada daha çok sitolojik özellikler baz alınmıştır (5, 90). ALL' nin heterojen bir hastalık grubu olması nedeni ile prognostik faktörlerin

belirlenmesi de önerilmektedir ve risk sınıflaması için yaş, başlangıç lökosit sayısı, immunofenotipik değerlendirme yanı sıra sitogenetik ve moleküler genetik incelemeler son derece büyük önem taşımaktadır. Örneğin t(9;22), t(4;11), (1;19) ve 11q23 kötü prognoz ile ilişkilendirilmekte iken t(12;21) ve hiperdiploidi iyi prognoz göstergesi sayılmaktadır (58, 65).

2.2.3. Akut Miyoleid Lösemi (AML)

AML erişkin yaş grubunda en sık rastlanan lösemi tipidir. Hastalığın sıklığı 3-5/100.000 düzeylerindedir. FAB grubu tarafından, morfolojik ve sitokimyasal özelliklere dayanan 8 alt tipe ayrılmıştır (M0, M1, M2, M3, M4, M5a, M5b, M7). 2000 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından morfoloji, immunofenotip, genetik ve klinik özellikleri birleştiren yeni bir sınıflama geliştirilmiştir. AML' de hastanın yaşı yanında lösemik klonun sitogenetik ve moleküler özellikleri prognozu belirleyen en önemli parametrelerdir. İyi prognozlu grup inv(16) veya t(16;16), t(8;21), t(15;17) anomalilerini, orta risk grubu +8, t(9;11)' i, kötü risk grubu ise ikiden fazla kromozomda sitogenetik anomali, -5, 5q-, -7,7q- ve 3. kromozomun uzun kolunda anomali gösteren AML' li hastaları kapsar (65).

Kromozom 5 ve 7' ye ait anomaliler sıklıkla ileri yaştaki hastalar ve sekonder AML'de bulunur (5).

2.2.4. Kronik Lösemiler

2.2.4.1. Kronik Lenfositik lösemi (KLL)

KLL, Galton ve Dameshek tarafından 1966 ve 1967 yıllarında tanımlanmıştır. Hastalık genellikle yavaş seyirli olarak tanımlanmışsa da olguların tümü için homojen bir davranış modelinden söz edilemez (78).

Batı ülkelerinde en sık görülen lösemi olarak bilinir ve tüm lösemilerin %20-30' unu oluşturur. Yılda 3/100.000 sıklıkta görülür. Genellikle orta yaşta ve sıklıkla 60 yaşın üstünde görülür. Bazı ailelerde birden fazla KLL olgusunun görülebilmesi genetik bir eğilim olasılığını düşündürmüştür. Sitogenetik analizler değerlendirildiğinde en sık gözlenen anomaliler, Trizomi 12, del(13q14.3), del(11q22-q23), del 17p13.3 ve del 6q dur (78).

KLL' de Binet ve Rai sistemi olmak üzere kullanılan iki sınıflandırma sistemi mevcuttur. Her iki sistemde de kan lenfosit ikilenme zamanı, kemik iliği histolojisi veya

lösemik hücrelerin karyotipi gibi birbirinden bağımsız prognostik parametreler göz önüne alınmaktadır (78, 87).

2.2.4.2. Kronik Myeloid Lösemi (KML)

KML, genotipinden elde edilen bilginin rasyonel bir terapinin yolunu açtığı ilk neoplastik hastalıktır. İyi bilinen patofizyolojisi, direkt tanı yapılabilmesi, belirli prognostik faktörleri ve hastalığa yol açan faktörlerin direkt tedavi edilebilmesinin bir sonucu olarak KML, görülme sıklığından daha çok, araştırmanın konusu olmuştur ve ayrıca diğer kanserler için de model hastalık görevi görmektedir (30, 38, 39, 91).

KML, olguların %95' inden fazlasında hastalık patogenezinde önemli rolü olduğu bilinen, Philadelphia kromozomu adı verilen, özellikli bir translokasyon ile karakterize, klonal bir hematopoetik kök hücre hastalığıdır (21). Ph 1 kromozomu 1960' ta Peter Nowell ve David Hungerford tarafından ifade edilmiş ve keşfedildiği şehrin adını almıştır (28, 60). 1973'te Janet D. Rowley translokasyonun ayrıca kromozom 9' u da içerdiğini belirlemiştir (28, 72). KML, sitogenetik anomalinin tanımlandığı malignansilerin prototipidir (48) ve tüm lösemilerin % 15-20'sini oluşturur (43).

Her yaşta görülmekle birlikte özellikle ileri yaş grubu hastalığıdır. Erkeklerde daha sık görülür (1.3/1)(29, 47, 79, 89). Birleşik Devletler Epidemiyoloji Araştırması ve Sonuçları verilerine göre 2003-2007 yılları arasında KML görülme sıklığı her 100.000 kişide 1-2 olarak tespit edilmiştir (89). 40-60 yaş arasında görülme sıklığı artar; tanıdaki ortalama yaş 67'dir (43). KML, çocukluk lösemilerinin sadece %3' ünü oluşturur (43).

KML' nin moleküler patojeni bilinmesine rağmen gen translokasyonuna yol açan mekanizma bilinmemektedir (31, 39, 52, 67). Hiroshima ve Nagasaki' ye atılan atom bombaları sonucu Japonya'da yüksek oranda KML vakaları görülmesinden dolayı radyasyonun önemli bir etken olduğu ifade edilse de hastalığın nedenleri arasında radyasyon küçük bir yer edinmektedir (39).

2.2.4.2.1. Patofizyoloji

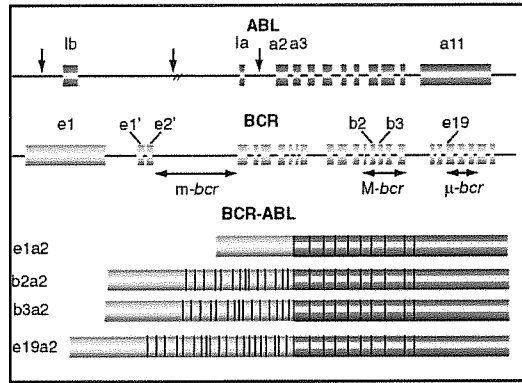
KML' nin, BCR-ABL füzyon geni kaynaklı primitif bir hematopoetik kök hücre transformasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Transforme olan hematopoetik kök hücrenin (HKH) normal hematopoetik hücreler üzerinde proliferatif bir avantajı vardır ve böylelikle zaman içerisinde Ph1 pozitif klonun residual normal hematopoezin

yerini almasına yol açar. Translokasyon, myeloid, eritroid, megakaryostik ve B-lenfoid kökenli hücrelerde bulunmakta ve hastalığın hematopoietik kök hücre kaynaklı olması ile ilişkilidir. Kronik fazdaki hastalardaki hematopoetik ekspansiyonu, matür hücrelerin yanı sıra sayıları artan prekürsör ve progenitör hücrelerin ekspansiyonundan kaynaklanan bir myeloid hücre kütlesi artmasına neden olur. Kronik fazda lösemik hücreler minimal olarak invazivdir ve özellikle kan, kemik iliği, dalak ve karaciğer gibi hematopoetik dokularda bulunmaktadır. Malign klonun proliferatif avantajının nedeni hematopoetik büyüme faktörlerine karşı gösterdiği yüksek tepkisellik ve/veya inhibitör faktörlerine karşı gösterdiği düşük tepkisellik olabilir. Kronik myeloid lösemi progenitörleri ayrıca ilik stromal hücrelere ve ekstraselüler matrikse karşı defektif adezyon oluşturmaktadırlar. Özellikle mikroçevre ortamları, dolaşımdaki çok sayıdaki progenitörün oluşturduğu anormal progenitör trafiği ve ekstraselüler hematopoeze neden olur. Yapılan birçok araştırma göstermiştir ki her ne kadar Ph1 pozitif klon normal hematopoezin yerini alsada dahi residual normal kök hücreleri yok etmemektedir. Örneğin Ph negatif progenitörler in vitro koşullarda KML hücreli kültürlerden sonra görülebilir, hücre yapısı fenotipi bağlamında seçilebilir ve yüksek doz kemoterapi sonrasında dahi kanda tespit edilebilirler (43).

KML' nin karakteristiği olan BCR-ABL geni, 9. kromozomdaki ABL geninin kromozom 22' ye füzyonu ve 22. kromozomdaki BCR geninin kromozom 9' a füzyonu ile sonuçlanan bir kromozomal translokasyondan kaynaklanmaktadır. Translokasyon ABL geni exon a2' nin upstream'inde ve 22. kromozom M-BCR geninde meydana gelen bir kırılmadan kaynaklanmaktadır. Bu da 5' BCR' ın ve 3' ABL' nin, kısa bir kromozom olan 22' deki bir jukstapozisyonuna neden olur. Ortaya çıkan mRNA genellikle iki BCR-ABL bileşkelerinden birini içermektedir: e13a2 (önceden b2a2) ve e14a2 (ya da b3a2). Her iki BCR-ABL mRNA molekülü, 210 kd bir füzyon proteinine dönüştürülür ve buna p210 BCR-ABL denir. Nadiren, diğer varyant kırılma noktaları ve füzyonları, farklı fonksiyonel onkojenik BCR-ABL proteinlerinin ortaya çıkmasına neden olabilir ve bunların en önemlileri de p190 BCR-ABL(e1a2 mRNA ile ilişkili) ve p230 BCR-ABL' dir (e19a2 mRNA ile ilişkili).

KML hastalarının yaklaşık % 95' i klasik Ph1 kromozomuna sahiptir. Kimi zaman bu değişiklik kromozom düzeyinde saptanamaz ve FISH veya PCR ile saptanabilen kriptik bir form gösterir. Kriptik translokasyon KML hastalarının yaklaşık % 2-3' ünde

gözlenir. Çok az sayıdaki Ph1 negatif hastalarda (BCR-ABL negatif hastalık) ise henüz lösemnin moleküler temeli bilinmemektedir.



Şekil-2: ABL ve BCR genlerindeki kırılma noktalarının lokalizasyonları ve birçok kırılmadan elde edilen kimerik mRNA' ların yapısı (43)

Bazı araştırmalar, t(9;22) translokasyonundan önce klonal hematopoezin gelişmesinden dolayı KML' nin çok aşamalı bir etyopatogenezi olabileceğini öne sürmüştür. Hematopoetik bir kök hücrede klasik bir BCR-ABL füzyon geninin oluşmasının KML başlangıcı adına yeterli olduğunu öne süren ciddi, yerleşmiş kanıtlar bulunmaktadır. BCR-ABL ekspresyonunun, fare fibroblast hücre dizilerini, büyüme faktörlü hematopoetik hücre dizilerini ve primer murin kemik iliği hücrelerini transforme ettiği belirlenmiştir. İnsan CD34+ hücrelerindeki BCR-ABL ekspresyonunun yüksek proliferasyona, düşük apoptozis' e ve değişken adezyona ve KML hastalarının progenitör hücrelerinde görülen migrasyon taklitli değişimlere neden olduğu bilinmektedir. Retroviral transdüksiyon ile ektopik olarak BCR-ABL gen ekspresyonu yaratılan murin kemik iliği hücrelerinin transplantasyonu, yüksek periferel kan hücresi sayımı (dominant olarak granülositler), splenomegali ve ekstramedüller hematopoez gibi insanda görülen belirtilerle KML ile yakın benzerlikler gösteren bir myeloproliferatif hastalığın başlangıcına neden olur (her ne kadar bu hastalık insanda görülen KML' den çok daha fulminant olsa da). Transgenik ve "knock in" fare KML modellerinin ön gelişmeleri problemlidir. Bu onkojeni uygun hücre tipinde uygulamak ciddi önem taşımaktadır. BCR-ABL' nin B hücre lenfositik ve megakaryositik prekürsörlerdeki ekspresyonu, B akut lenfositik lösemnin (B-ALL) ve megakaryositik myeloproliferatif sendromun gelişmesiyle sonuçlanmıştır. Hematopoetik kök hücrelerde ekspresyonu düzenlemek adına bir kök hücre lösemi (KHL) pekiştirici ile onkojenin özellikli ekspresyonu KML benzeri bir hastalığın ortaya çıkması ile sonuçlanır. Bu

araştırmaların hepsi sadece BCR-ABL ekspresyonu ile farelerde kronik faz KML benzeri bir hastalığın oluşturulabileceğini göstermektedir (43).

ABL geni, birçok dokuda görülen bir non reseptör tirozin kinazı kodlamaktadır (Şekil 3). Homozigot olarak bozukluğu içeren ABL geni bulunan farelerde yüksek perinatal mortalite, lenfopeni, osteoporoz görülür ve anormal kafa ve göz gelişimine bağlı olarak daha kktrler. BCR geni de birçok modüler alan içeren bir sinyal proteinini kodlamaktadır (Şekil 3). BCR yetersizliği bulunan fareler her ne kadar normal gelişim gösterseler de aktivasyon sonrası nötrofilleri aşırı derecede oksijen metabolit üretmektedir. Normal olarak regüle edilmiş ABL proteini tirozin kinaz aktivitesi temel olarak N -terminal BCR sekanslarının jukstapozasyonu ile aktive edilmektedir. BCR, protein dimerizasyonu yoluyla, kinaz aktivasyon kıvrımlarındaki tirozin kalıntılarının fosforilasyonuna ve kinaz aktivitenin konstitütif aktivasyonuna neden olur. BCR sekanslarının ABL' e füzyonu ayrıca ABL' e, büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein 2 (GRB2) SH2-binding alanı gibi yeni regülatör bölgeler eklemektedir. BCR-ABL' nin kontrolsüz kinaz aktivitesi ve birçok efektör proteini ile olan ilişkisi, proliferasyonu regüle eden hücre sinyali mekanizmaların dereglasyonuna neden olur. ABL proteini hem çekirdekte hem sitoplazmada ve de bu iki bölgenin arasındaki alanlarda bulunurken, BCR-ABL ise sadece sitoplazmik ve sitoskeletona yerleşerek adezyona ve migrasyon anormalitelerine neden olur (43).

belirtmektedir. Bu formlar, akut lenfoblastik lösemi, kronik myeloid lösemi (KML) ve KML'nin daha ılımlı bir formu ile ilişkilidir. Her bir formdaki amino asit miktarı parentezler içerisinde belirtilmiştir. **B**, BCR-ABL' nin lökomojenik sinyali. BCR-ABL proteinleri, CC domainleri ve transotofosforilat yoluyla dimerler ve tetramerler oluşturabilirler. Y177'deki fosforilasyon, büyüme faktörlü reseptöre bağlı protein 2 (GRB2) için yüksek duyarlılıklı bir binding sitesi oluşturur. GRB2, SH2 domaini yoluyla BCR-ABL'ye ve SH3 domainleri yoluyla da SOS' a ve GRB2 ile ilişkili binding protein 2 (GAB2)' ye bağlanır. Sonrasında da SOS, RAS' ı aktive etmektedir. BCR-ABL fosforilasyonu sonrasında GAB2, fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) ve SHP2 proteinlerini toplar. ABL' nin SH2 domaini SHC' ye bağlanabilir ve bu da fosforilasyon sonrasında GRB2 toplayabilir. Karboksi-terminal bölgedeki SH-3 binding siteleri ve ABL SH3 domaini, hücre adezyonu/migrasyonu regülasyonları içeren birçok proteini bağlayabilmektedir. BCR-ABL, RAS, SHP2 ve PI3K-AKT sinyal yollarını aktive ederek hücre proliferasyonuna ve survivala kısmi olarak katkıda bulunabilir. Ayrıca ICSBP ve JUNB transkripsiyonlarını downregüle edebilir ve de SIPA1'e engel olabilir. Kırmızı oklar, direkt ilişkileri ve/veya aktivasyonları ifade eder. Siyah oklar, negatif regülasyonları ifade eder. Kırık oklar, birden fazla aşamayı ifade eder (43).

BCR-ABL proteininin yapısı ve etkilenen biyokimyasal yollar ayrıntılı bir şekilde araştırılmıştır (Şekil 3). Ancak bu gibi durumlar sadece hücre dizilerinde ve aşırı ekspresyon görülen durumlarda gözlemlenmiştir. Bunların primer lösemi hücrelerinde varlığı ve KML patojeni ile ilişkileri kesin değildir. Murin transdüksiyon transplantasyon KML modeli, BCR-ABL alanlarının rolünü ve öncül hematopoetik hücrelerdeki sinyal ilişkisini incelemek adına faydalı olmuştur. Ancak murin KML modeli, insanda görülen KML'nin tam bir temsili değildir ve KML hastalarında hastalığın gelişmesinde farklı bölgelerin rollerinin hala doğrulanması gerekmektedir.

ABL tirozin kinaz, onkojenik transformasyon için çok önemlidir. ABL' in kinaz aktivitesini içeren ATP bölgesindeki bir nokta mutasyonlu BCR-ABL formu gösteren fareler lösemi geliştirmezler. Bu durum, in vivo' da ABL kinaz aktivitesinin, BCR-ABL lökomojenezi adına gerekli olduğunu göstermektedir. KML' de kinaz inhibitör tedavisinin başarısı, hastalığın bakımındaki kinaz aktivitesinin önemi konusunda gelecekte de kanıt sunabilmektedir. BCR-ABL' deki diğer önemli bölgelerin de ayrıca ABL' in kinaz aktivitesini regüle ettiği ya da diğer "downstream" sinyal yollarına

bağladığı belirlenmiştir. BCR' in amino-terminal çift kıvrımlı (CC) oligomerizasyon bölgesi de ABL kinaz aktivitesinin önemli bir aktivatörüdür ve ayrıca BCR-ABL' in F-aktin fiberlerle olan ilişkisine yol açmaktadır. BCR' in tirozin 177' deki fosforilasyonu, RAS aktivasyonu adına önemli bir GRB2-binding alanı oluşturmaktadır. Tirozin 177 BCR-ABL kalıntısının (residue) fenilalanine (Y177F) mutasyonu, ABL' in kinaz aktivitesini etkilemeden GRB2' ye bağlanmasını engellemektedir. Y177G mutanı, farelerde bir myeloproliferatif bozukluk oluşturmak adına çok yetersizdir. ABL kinaz bölgesinin ve ABL' in SH2 bölgesindeki aktivasyon kıvrımındaki (loop) bir tirozin fosforilasyon bölgesi de ayrıca RAS aktivasyonuna katkıda bulunmaktadır. ABL' nin SH2 bölgesindeki mutasyonlar ve Y1294F nokta mutasyonu, BCR-ABL' nin farelerde KML benzeri bir myeloproliferatif hastalık (MPH) oluşturma gücünü azaltmaktadır. Normal ABL' nin düzgün fonksiyonu açısından, ABL' nin karboksi-terminal bölgesine ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak ABL aktin bağlanma delesyonunun, BCR-ABL' nin farelerde KML benzeri bir MPH' a neden olması durumunu etkilemediği raporlanmış ve bu bölgenin BCR-ABL aracılı lökomojenler için önemsiz olabileceği düşünülmüştür. Bazı BCR-ABL bölgeleri (domain) tamamlayıcı ya da örtüşen fonksiyonlar gösterebilmektedir (43).

Birçok sinyal proteini BCR-ABL ekspresyonlu hücrede fosforlanmakta ve/veya birçok fonksiyonel bölge yoluyla BCR-ABL ile ilişkiye girmektedir. Bu ilişkiler daha sonrasında RAS, PI3K, AKT, JNK ve SRC ailesinden kinazlar, protein fosfataz , STAT' lar , nükleer faktör-B ve MYC gibi mekanizmalar yoluyla sinyal aktivasyonu yaratabilirler. BCR-ABL ayrıca interleukin-3 (IL-3) gibi sitokin ekspresyonlarını, granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) ve granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktörleri (GM-CSF) tetikleyebilir. Stat5a, Stat5b, Cbl ve Il-3 GM-CSF farelerin kemik iliklerindeki BCR-ABL ekspresyonu sonrasında dahi KML benzeri bir MPH baş göstermiştir ve bu durum BCR-ABL aracılı lökomojenler adına bu proteinlere gerek olmayabileceğini göstermektedir. SRC ailesinden LYN, HCK ve FGR gibi kinazların bulunmadığı farelerde BCR-ABL ekspresyonu KML benzeri bir MPH' a neden olmuş ancak B-ALL başlangıcı görülmemiştir ve bu durum kinazların lenfoid blast krizindeki veya ALL' deki potansiyel önemini göstermektedir. IFN konsensus sekans bağlanma proteini (ICSBP) kodlu genin bozulması, farelerde KML benzeri bir hastalığın gelişmesine neden olur. Zorlu ICSBP ekspresyonu ise BCR-ABL kaynaklı KML

benzeri hastalığı engellemektedir. KML hastalarında ayrıca ICSBP transkriptlerinin downregülasyonu görülmüştür ve bu redüksiyon IFN- α tedavisi ile tersine çevrilebilmektedir. Bu veriler ICSBP downregülasyonunun, KML' nin patojenitesi açısından önemli olduğunu göstermektedir (43).

Hastalığın ileri faza ve blast krizine ilerlemesi, hematopoetik dokularda yer alan immatür blast hücrelerindeki artış nedenidir ve lenf nodları, cilt, yumuşak doku ve merkezi sinir sistemi gibi birçok ekstramedüller bölgeye sıçrayabilmektedir. Tek bir gen defektinden ziyade birçok moleküler mekanizma, KML' de blast krizinin karakteristiği olan maturasyon arrestinin, ilgili proliferasyon ve "survival" ın ve artan doku invazivliğinin nedenidir. BCR-ABL ekspresyonu seviyesinin artması yaygın bir özelliktir ve blast krizinin özelliklerinin gelişmesinde hücre sinyali ve önemli regülatör genlerin transkripsiyonu ve uyarılması üzerindeki etkileri yoluyla anahtar bir faktör rolü oynar. Hastalık ilerlemesinin, BCR-ABL ekspresyonlu klonun ek moleküler değişimlere olan yatkınlığının artması ile ilişkili olduğuna inanılmaktadır ve hastalığın ilerleyişi sırasında KML hastalarında kronik fazdan blast fazına geçişte ek sitogenetik ve moleküler değişimlere sıklıkla rastlanıldığı bilinmektedir. KML'deki genetik instabilite, oksidatif stres, azalan DNA onarımı ya da azalan DNA hasar kontrol bölgesi sinyal tepkisi gibi birçok faktörden kaynaklanmaktadır. Blast fazdaki KML hastalarından elde edilen lösemik hücrelerde gözlemlenen genetik değişimler, hastaların %60-80' inde görülen +8, +Ph , +19 ve i(17q) gibi rastgele olmayan sitogenetik değişimler, TP53, RB ve CDKN2A gibi genlerde görülen nokta mutasyonlar ve EVI1 ve MYC gibi genlerin aşırı ekspresyonudur. t(3;21)(q26;q22) gibi AML1-EVI1 oluşturan kromozom translokasyonları da gözlemlenmiştir. KML balistik faz ilişkili diğer füzyon genleri ise; t(8;21)(q22;q22) translokasyonu kaynaklı AML1-ETO, t(7;11)(p15;p15) kaynaklı NUP98-HOXA9 ve inv(16)(p13;q22) kaynaklı CBF β -SMMHC genleridir. Bu gözlemler blast krizindeki myeloid farklılaşma bloğunun, BCR-ABL ile hematopoetik transkripsiyonel regülatörlerdeki defektler arasındaki işbirliğini içerebileceğini belirtmektedir. Gen ekspresyonu analizleri, KML' nin kronik fazdan ileri faza ilerlemesinin üç aşamalı bir süreç değil de iki aşamalı bir süreç izlediğini göstermiştir; sayısı artan lösemili blast hücrelerinin toplanmasından önce ilerlemiş fazın erken döneminde meydana gelen yeni gen ekspresyonu değişimleri. İlerleme programında ciddi ve kayda değer diğer durumlar da WNT/beta-katenin yolunun

deregülasyonu, JUN B ve FOS' un azalan ekspresyonu ve alternatif kinaz deregülasyonudur. Diğer araştırmalar da blast fazdaki KML hastalarında granülosit/makrofaj progenitör (GMP) havuzunun genişlediğini ve bu hücrelerin, kendini yenileme kapasitesini artırmasına neden olacak, yüksek seviyede BCR-ABL ekspresyonu ve yüksek WNT sinyal aktivitesi gösterdiğini ifade etmişlerdir. GMP hücrelerinin, KML' nin blast fazında lösemik kök hücrelere transforme olabileceği de ifade edilmiştir ancak bu bulguların ve WNT sinyali rolünün doğrulanması gerekmektedir (43).

2.2.4.2.2.Klinik Özellikler

Hastaların % 90' dan fazlası kronik evrededir. Tanı sıklıkla başka bir nedenle kan sayımı yapıldığı esnada konur. Genellikle semptomlar yorgunluk, kilo kaybı, kemik ağrısı, gece terlemesi ve splenomegaliyle ilişkili abdominal rahatsızlıklardır. Semptomların çoğu lökostatize ilişkindir, dalak infarktüsü ilişkili akut abdominal ağrı, priapizm, hipermetabolizm, hiperürisemi, ve gut artritidir.

Laboratuvar bulguları genellikle, lökositozis ($100.000/mm^3$ 'ü aşabilir), trombositozis ve anemidir. Periferik yaymada tüm myeloid hücre formları görülür. Kronik fazda blast oranı %0,5-10 arasındadır. Serum vitamin B12 ve ürik asit düzeyi yükselir. Lökosit alkalen fosfataz aktivitesi azalmıştır veya hiç yoktur. Kemik iliği, diferansiyasyonun tüm aşamalarındaki normal myeloid hücreleri içeren hipersellüler yapıdadır. Megakaryositlerin sayısı artmış olabilir. Eozinofili veya bazofili veya her ikisi yaygındır (20, 43).

Lökomoid kan görüntüsüne neden olan durumlar (enfeksiyonlara bağlı olarak periferik kanda immatür nötrofilik prekürsörlerle görülen reaktif nötrofili, nadir inflamatuvar durumlar, malign hastalıklar, kortikostereoidler gibi ilaçlar, eklampsi, tiroid storm, diyabetik ketoasidoz, aşırı adrenokortikotropik hormon, ciddi yanıklar, civa zehirlenmesi), bazı myeloproliferatif hastalıklar (polisitemia vera, esansiyel trombositemi, primer myelofibrozu, sınıflandırılmayan myeloproliferatif neoplazm) ve myelodisplastik/myeloproliferatif neoplazmlar (atipik KML, kronik myelomonositik lösemi , sınıflandırılmayan myelodisplastik/myeloproliferatif neoplazm), KML' nin ayırıcı tanısında göz önünde bulundurulabilir. Ancak tanıda nadiren problem yaşanmaktadır. Tanıda sorun yaşanmaması sitogenetik analizlerle Ph1 kromozomunun

ya da RT-PCR veya FISH ile BCR-ABL geninin belirlenebilmesine bağlıdır. Vakaların yaklaşık %5' inde Ph1 kromozomu tespit edilemez ve tanının doğrulanması FISH ya da RT-PCR analizlerinde BCR-ABL transkriptinin belirlenmesi ile yapılır (39).

Kronik evre KML hastasında ilk değerlendirmede:

- Öykü, fizik muayene, tam kan sayımı, çevresel kan yayması, lökosit formülü, biyokimya
- Kİ aspirasyon-biyopsisi (blast ve bazofillerin yüzdesi, konvansiyonel sitogenetik inceleme, gerektiğinde FISH)
- Tanı aşamasında kemik iliğinden örnek alınamadığında konvansiyonel sitogenetik inceleme (ve gerektiğinde FISH incelemesi) çevresel kandan yapılabilir.
- Moleküler yanıtın izleminde kullanılan bazı yöntemlerde BCR/ABL, başlangıç değeri ile karşılaştırıldığından başlangıçta çevresel kandan (BCR/ABL) QPCR çalışılması önerilir.
- Tanı sırasında Sokal veya Euro (Hasford) risk puanlaması yapılmalıdır (Tablo 3)(89).

Tablo- 3: KML' de prognozu belirlemede kullanılan risk skorları

<p>Sokal indeksi (77):</p> <p>SI= EXP [0.0116 (yaş-43.4) +0.0345 (dalak büyüklüğü*- 7.51) +0.188 (trombosit sayısı/700] 2 - 0.563) +0.0887 (periferik blast yüzdesi - 2.10)]</p> <p>*kot altı uzunluk (cm)</p>
<p>Yeni skorlama sistemi (Hasford)(36):</p> <p>Yeni skor: (0.6666 x yaş [eğer yaş< 50, 0; aksi halde 1] +0.420 x dalak büyüklüğü [cm kot altı] +0.0584 x blast [%] +0.0413 x eozinofil[%] +0.2039 x bazofil eğer bazofil < 3%, 0; aksi halde 1] +1.0956 x trombosit sayısı [eğer trombositler<1500 x 10⁹/L, 0; aksi halde 1]) x 1000</p> <p>Düşük risk <780; Orta risk 781 - 1479; Yüksek risk ≥1480</p>

Not: Dalak büyüklüğü kaburga yayından en uzak nokta (cm) olarak alınır, blast, bazofil ve eozinofiller periferik (çevre) kandaki yüzdelerdir. Tüm bu faktörler herhangi

bir tedavi başlanmasından önceki değerlerdir. Risk hesaplanması için <http://www.icsg.unibo.it/rrcalc.asp> sitesine başvurulabilir.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) KML evre tanımları

Hızlanmış Evre (DSÖ 2008 kriterleri)

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

Blastik Evre (DSÖ 2008 kriterleri)

- Periferik (çevre) kan lökositlerinin veya kemik iliğindeki çekirdekli hücrelerin \geq % 20'sinin blast olması
- Kemik iliği dışı (ekstramedüller) blastik proliferasyon
- Kİ biyopsisinde gruplar halinde blastların olması (82, 89).

2.2.4.2.3. KML' nin Doğal Süreci ve Prognostik Sınıflandırmalar

KML'nin karakteristik bir bifazik klinik süreci vardır. Kronik faz, ortalama 3-5 yıl sürebilir. Tedavi edilmeyen KML, akut myeloid ya da lenfoblastik lösemiye doğru ilerleme gösterir (blast krizi); %5 görülür ve ortalama sağ kalım 3-6 aydır. Bazı durumlarda blastik transformasyondan önce ilerlemiş bir faz [akselere faz (% 10)] görülür ve ortalama süre 3-18 aydır. Hastalık fazlarına ek olarak bazı temel karakteristiklerin de ayrıca prognostik parametreleri olduğu görülmüştür. Bu karakteristikler Sokal ve Euro derecelendirmeleri ile formülize edilmiştir (15, 89). Derivatif kromozom 9' daki delesyonlar gibi sitogenetik değişimler prognozu etkilemektedir. Imatinib, bu delesyonların negatif prognostik etkisini kısmen azaltabilir ancak delesyonların büyüklüğü ve lokasyonu bu bağlamda önem teşkil etmektedir. Son olarak hematolojik, sitogenetik ve moleküler tepkilerin derecesi ve zamanı önemli prognostik bilgi sağlamaktadır (37, 39).

2.2.4.2.4. Tedavi

KML' nin yaklaşık 150 yıl önceki ilk tanımlanmasından sonra yüzyıldan fazla bir zaman süresince tedavisi konusunda çok az gelişme kaydedilmiştir. **Radyasyon tedavisi** ve **busulfan**, hayat beklentisini uzatmaktan daha çok yaşam kalitesini artırmak adına faydalı olmuştur. Hayat beklentisini artırmak adına ilk başarılı adım **hidroksiüre (HU)** ile sağlanmış, allogeneik hematopoetik kök hücre nakli (**allo-HKHN**) ile çok daha yüksek hayatta kalma oranları sağlanmış ve sonrasında bazı hastalarda da **rekombinan interferon-alfa (rIFN α)** tedavisi ile başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Hastalığın patojenini anlamak, moleküler karşılığı BCR-ABL füzyon geni olan Ph1 kromozomunun keşfedilmesiyle mümkün olmuştur. Bcr-Abl proteinlerinin tirozin kinaz (TK) aktivitesinin belirlenmesi, BCR-ABL kodlu proteinleri hedef alıp, TK aktivitesini engelleyerek lösemik fenotipi kontrol eden sinyalleri iptal eden yeni seri bileşiklerin keşfedilmesinin yolunu açmıştır. TK inhibitörlerinden biri olan **İmatinib (IM)**' in yüksek ve spesifik biyokimyasal aktiviteye ve makul bir farmakokinetik ve toksisite profiline sahip olduğu bulunmuş ve bu nedenle derhal klinik uygulamaya adapte edilmiştir. Bu da KML' nin tedavisinde ve genel olarak kanser tedavisinde devrimsel bir adım olarak sonuçlanmıştı. Erken Kronik Faz Ph+ KML' nin standart tedavisi HU, rIFN α \pm LDAC, günlük 400 mg IM ve allo-HKHN tedavilerini içermektedir (7). Blastik fazın tedavisi akut Lösemi ile benzerdir (30).

Konvansiyonel Tedavi

Busulfan: Alkile edici bir ajan olup KML tedavisinde ilk kullanılan ilaçtır. Allo-HKHN planlanan hastalarda transplantasyon sonuçlarını olumsuz olarak etkileyebileceğinden lökosit sayısının azaltılmasında kullanımı önerilmemektedir (45).

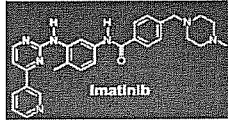
Hidroksiüre: Ribonükleotid redüktaz enzim inhibitörüdür. KML' nin başlangıç kontrolünde busulfan'ın yerini almıştır. Allo-HKHN öncesi transplantasyon sonrası komplikasyonları artırmadığı için güvenle kullanılabilir. Ph1 kromozomunu negatifleştirmez (45).

Küratif Tedavi

İnterferon-alfa (IFN- α): İmatinib tedavisinin keşfedilmesinden önce kronik faz KML' nin standart tedavisi rekombinan interferon alfa ile yapılmaktaydı. Araştırmalarda interferon tedavisinin busulfan veya hidrosikarbamid (hidroksiüre) tedavisinden daha etkili olduğu ve hidrosikarbamidin de busulfan tedavisinden daha

etkili olduđu raporlanmıřtır. IFN- α ve IFN- α + dűřük doz sitarabin tedavisinin karřılařtırıldıđı bir arařtırmada, kombine terapisinin sitogenetik tepki elde edilmesini artırdıđı ancak hayatta kalma oranını artırmadıđı gözlemlenmiřtir. İnterferon alfa tűm yařtaki hastalarda hayatta kalma durumunu korumuřtur ancak daha genç hastalarda dűřük doz kullanılması gerekmiřtir (11, 39). İki “pegilate” IFN- α forműlasyonları geliřtirilmiř ve “nonpegilate” interferon alfa ile KML’ de test edilmiř, ancak Peginterferon alfa-2b, interferon alfadan daha iyi sonuçlar ortaya çıkarmamıřtır. Bařka bir çalıřmada ise peginterferon alfa-2b, interferon alfadan daha iyi sonuçlar ortaya koymuřtur. IFN- α ve imatinib karřılařtırmasında imatinibin en iyi tepki oranlarını (hematolojik, sitogenetik, molekűler) ve en dűřük yan etkileri sergilediđi gűrűlműřtir. Hayati tehlike arz etmese de yan etkiler birçok hastanın yařam kalitesini dűřűrmektedir ve klinik ortamda interferon alfanın bařlıca dezavantajıdır (39).

İmatinib:



İmatinib (Gleevec, Novartis) 1998’ de klinik kullanıma girerek KML’ nin tedavisini ve izlemine radikal anlamda deđiřirmiřtir. Fenilaminopirimidin tűrevi kűçük molekűllű bir ilaç olan imatinib, ABL1 tirozin kinaz bűlgesindeki ATP binding bűlgesinde rekabetçi bir bađlanma ile BCR-ABL geni kodlu onkojenik protein tirozin kinaz aktivitesini hedef alıp ATP’ ye olan eriřimi engellemektedir. Daha sonraları diđer tirozin kinaz inhibitbűrleri geliřtirilmiřtir. řu anda dasatinib (Sprycel, Bristol-Myers Squibb) ve nilotinib (Tassigna, Novartis) adlı iki Tirozin Kinaz İnhibitbűrű (TKI) klinik kullanım için mevcuttur. Her iki ilaçta terapotik dozlarda T315I hariç tűm imatinib dirençli mutantlara karřı aktiftir.

Dasatinib ve nilotinib gibi ikinci jenerasyon TKI’ ler, KML’ nin ilk adım tedavisi adına umut verici sonuçlar gűstermiřtir ancak bunların uygulanması, imatinib ve diđer TKI’ lerin etkisine engel olan allosterik deđiřimlere yol açan nokta mutasyonların ortaya çıkması ile imatinib intoleransı ve direnci gűsteren hastalar ile sınırlıdır (28, 64). Yeni tanılı kronik faz KML hastalarında imatinib tedavisi yűksek oranda tam sitogenetik remisyon [IRIS deneyinde (Uluslararası Bađımsız İnterferon ve ST1571 (İmatinib) Arařtırması) %87] ve dűřűk ya da belirlenemeyen oranda BCR-ABL transkriptli molekűler remisyon sađlar. Bu geliřmeler dűnya çapında KML tedavi

yöntemlerinin değişmesine ve standart moleküler görüntüleme gelişmelere yol açmıştır. İmatinib ve IFN- α tedavisinin uygulandığı bir deney sonuçlarına dayanılarak (IRIS) 400 mg imatinib kronik faz KML tedavisinde standart yöntem olarak belirlenmiştir (39). İmatinib tedavisinde en sık karşılaşılan yan etki hematolojik toksisite (nötropeni, trombositopeni, anemi), karaciğer enzimlerinde yükselme ve periferik ödemdir ve genellikle ciddi boyutta değildir (22, 39). İmatinib kaynaklı hipofosfatemiyeye ilişkili hiperfosfatüri, kemik ve mineral metabolizmalarında değişimler gözlemlenmiştir (12, 39). İmatinib kaynaklı kongestif kalp yetmezliği bildirilmiştir (39, 50). İmatinibin insanlar üzerindeki olası teratojenisitesi hakkında çok az bilgi vardır (6, 39).

İmatinib terapisinin başlangıcından sonra medyan BCR-ABL transkript konsantrasyonlarındaki süren azalmanın 24 aya kadar devam ettiği görülmüştür ancak azalma oranı zamanla düşüş göstermiştir ve bu da imatinibe duyarlı residual hastalık varlığının göstergesidir. İmatinibe dirençli olduğu bilinen bu gibi residual hastalıklar kök hücrelerde görülebilmektedir. 2 yıl süresince sürekli olarak negatif residual hastalık gösteren hastalarda (n=12) imatinib tedavisi durdurulmuş ve imatinibsiz ortalama 18 aylık bir takip süresince hastaların yarısı tam remisyonda kalmıştır (39, 71). İmatinib tedavisi başarısız olursa mutasyon analizi, alternatif tedavi stratejisine ihtiyaç duyan kinaz bölgesindeki yüksek dirençli mutantları belirleyebilir (Y253F/H, E255K/V, T315I ya da H396P/R)(32, 39, 42). Daha az dirençli mutasyonlar (M244V, M351T, F359V) günlük imatinib dozunun 600 ya da 800 mg' a çıkarılması ile tedavi edilebilirler (49). İmatinib tedavisinin başarısızlığından önce mutasyonları tespit etmenin klinik yararı belirlenememiştir (81). Dirençli hastaların %50' sinde BCR-ABL mutasyonları görülmektedir. İmatinib direncinin diğer nedenleri BCR-ABL' nin genomik amplifikasyonu, FRAP1 (mTOR/Akt) yolu aktivasyonu gibi, BCR-ABL' den bağımsız mekanizmalar, fonksiyonel p53 SRC aktivasyonu yitimi ve aneuploidi ile sonuçlanan karyotipik klonal değişimlerdir (39).

İmatinib ile etkileyici sonuçlar elde edilmiş olsa da birçok sorun çözülmeyi beklemektedir. Birincisi 800 mg doz artırımına rağmen kronik faz KML olmayan hastalarda tedaviye tepki ve hayatta kalma oranları çok düşüktür (İmatinib tedavisinin uygulanmaya başlanmasından beri blast krizinde ortalama hayatta kalma süresi 2-3 aydan sadece 7.5 ay' a çıkmıştır ve uzun dönemde hayatta kalan hasta sayısı azdır).

İkinci olarak BCR-ABL transkriptleri gözlemlenemeyen birçok hastada dahi moleküler analizler rezidual hastalık tespit etmişlerdir ve relapslar imatinib tedavisinin kesilmesinden sonra ortaya çıkmıştır ve bu da ilaç tedavisine devam edilmesi gerektiğinin bir göstergesidir. Üçüncü olarak hastalığın ileri safhalara ilerlemesi ve BCR-ABL mutasyonlarının oluşumu nedeniyle hastalar imatinib direnci gösterebilir. Dördüncü olarak, nadiren de olsa, imatinib intoleransı inflamatuvar deri reaksiyonlarına, transaminazlarda artışa ya da sıvı retansiyonuna neden olabilmekte ve imatinib tedavisinin durdurulmasına neden olmaktadır. Son olarak mitotik değişime neden olan sentrozom bozukluklarının, kemik ve mineral metabolizmalarının ya da kardiyak fonksiyonların uzun dönem imatinib tedavisinin etkileri bilinmemektedir (39).

Allo-HKHN (Allo-Hematopoetik Kök Hücre Nakli)

İmatinib tedavisinin gelişimine kadar allo-HKHN' nin hastalığı tedavi edebilecek tek tedavi opsiyonu olduğu düşünülüyordu. Amerikan Hematoloji Derneği bültenlerinde bu transplantasyonun ilk kronik fazda uygulandığı hastaların %50' sinin 5 yıl sonunda hayatta ve lösemisiz olduğu belirtilmiştir. Sonraki araştırmalarda bu verileri desteklemişler ve hayatta kalma oranınının 10-15 yıla çıktığını belirtmişlerdir. Kök hücre transplantasyonu sonrası hayatta kalma 5 risk faktörüne bağlıdır: hastanın yaşı, transplantasyon esnasında hastalığın fazı, ilişkili olmayan donör transferi, kadın donör, erkek alıcı ve tanıdan transplantasyona kadar geçen süre. Olası bir transplant riski bu faktörler ile değerlendirilebilir. İki büyük kayıt merkezinden (Uluslar arası Kemik İliği Tranplantasyonu Derneği ve Avrupa Kan ve İlik Transplantasyonu Grubu [EBMT]), 1978-1997 yılları arasında nakil gören hastaların uzun dönem hayatta kalma verileri alınmıştır. İlk kronik fazda nakil gören 3372 hastadan 18 yıl sonunda hayatta kalanlar %50 oranındadır. 20 yılda hayatta kalanlar %41 oranındayken EBMT skoru 0-1 olan hastalarda %49' dur. Transplantasyondan sonraki 21. yıla kadar her yıl %1 oranında relaps gözlemlenmiştir ve bu da allo-HKHN' nin etkili bir tedavi olmadığını göstermektedir. Bununla birlikte transplantasyon sonrasında zaman içerisinde sonuçlar gelişme göstermiştir. Sonuçlarda gelişme görülmesinin nedenleri arasında İnsan Lökosit Antijenleri (HLA) yazımındaki gelişme, enfeksiyonların yönetimi, destekleyici bakım, immunosupresyon ve relaps yönetimi vardır. Transplantasyon öncesindeki sitogenetik

remisyonun, transplantasyon sonuçlarını geliştirdiği görülmüştür (39). Transplantasyon sonrası görülen relaps interferon alfa, donör lenfosit infüzyonları veya imatinib ile tedavi edilebilir. Sitogenetik ve moleküler görüntüleme ile tespit edilen erken relaps tedaviye iyi tepki vermektedir. Relaps gösteren birçok hastada kalıcı remisyon sağlayan donör lenfositleri, interferon alfa tedavisi yerine ilk adım terapi yöntemi olarak kullanılmaya başlanmıştır ve ayrıca imatinibden daha etkilidir. Düşük yoğunluklu uygulamalar yaşlı hastalarda ve komorbidite gösteren hastalarda transplantasyonu mümkün kılabılır ancak uzun dönem sonuçları henüz değerlendirilememektedir. allo-HKHN' nin en büyük dezavantajı prosedüre bağlı mortalite ve morbidite oranlarıdır ve hastalık ve transplantasyon risklerine bağlı olarak %10 ila %70 arasında bir orana sahiptir(39). Bir araştırmada ilk adım tedavi yöntemi olarak en uygun ilacın (genellikle interferon alfa) kullanılması, transplantasyona nazaran daha yüksek hayatta kalma oranları vermiştir. Düşük riskli hastalar ilaç tedavisine en iyi tepki gösteren hastalardır. İmatinib tedavisi kaynaklı hayatta kalma oranları interferon alfa tedavisi kaynaklı oranlardan daha iyi olduğundan imatinib tedavisinin başarısız olması durumunda ikinci adım tedavi olarak allo-HKHN tavsiye edilmektedir (yüksek hastalık riski ve çok düşük tranplantasyon riski, hastanın tercihi ve ekonomik sorunlar göz önünde bulundurularak)(39). Yüksek hastalık riski ve düşük transplantasyon riski taşıyan bir hasta için ilk adım tedavi olarak allograft uygun olabilir. Böyle bir hastanın tedavisinde imatinib de denenebilir çünkü imatinibe erken verilecek bir tepki allograft tedavisinin uygulanmasını ya da uygulanmasına gerek olmadığını belirten prognostik bir bilgi sağlayabilmektedir. Elde edilen verilerde transplantasyona 2 hafta kala imatinib tedavisi durdurulmak kaydıyla allo-HKHN öncesi imatinib tedavisinin negatif bir etki yaratmadığı görülmüştür (39).

Tedavi önerileri pahalı ilaçların mali yükü ve modern tanısal teknolojiler gibi ekonomik şartlara bağlılık göstermektedir. Allo-HKHN, ömür boyu imatinib tedavisine nazaran daha ekonomik bir tedavi alternatifi sunmaktadır (39).

2.2.4.2.5. KML' de Tedaviye Yanıt Tanımları (8, 62, 89)

KML tedavisinde kemoterapi yanıtları, hematolojik yanıt, Ph1 kromozomu ya da bcr/abl füzyon geni varlığında sitogenetik yanıt, ve moleküler yanıt olarak değerlendirilmektedir. Hedeflenen tam hematolojik yanıt, tam sitogenetik yanıt ve tam moleküler yanıtıdır.

Tam Hematolojik Yanıt (THY)

- Lökosit sayısı < 10.000/ μ L
- Çevresel kanda bazofil < % 5
- Çevresel kanda miyeloblast, promiyelosit, miyelosit görülmemesi
- Trombosit sayısı < 450.000/ μ L
- Dalagın ele gelmemesi

Sitogenetik Yanıt (SY)

- Tam sitogenetik yanıt (TSY): Ph1 pozitif metafazın olmaması
- Parsiyel (kısmi) sitogenetik yanıt (KSY) : Ph1 pozitif metafaz % 1- % 35
- Minör sitogenetik yanıt: Ph1 pozitif metafaz % 36 - % 65
- Minimal sitogenetik yanıt: Ph1 pozitif metafaz % 66 - % 95
- Sitogenetik yanıtızsızlık: > % 95 Ph1 pozitif metafaz

Konvansiyonel sitogenetik incelemede en az 20 metafaz değerlendirilmelidir. Majör sitogenetik yanıt tam ve kısmi sitogenetik yanıtı içerir (Ph1 pozitif metafaz % 0 - % 35). Konvansiyonel sitogenetik inceleme Ph1 kromozomu dışındaki sayısal ve yapısal kromozom anomalilerini de saptayabildiğinden avantajlıdır. Kemik iliğinde metafaz elde edilemediğinde, tam sitogenetik yanıt tanımı en az 200 çekirdek puanlaması ile yapılmış interfaz FISH çalışmasına dayanır. Sitogenetik yanıt FISH ile değerlendirildiğinde laboratuvarın raporunda belirtilen yanlış pozitiflik oranı dikkate alınmalıdır.

Moleküler Yanıt

• **Tam moleküler yanıt (TMY):** RT-PCR veya “nested” PCR yöntemi kullanıldığında ardışık iki ölçüm ile BCR-ABL kimerik mRNA' sının saptanmaması (10^{-4} duyarlılığında).

• **Majör moleküler yanıt (MMY):** BCR-ABL/ABL oranının uluslararası ölçeğe göre \leq % 0,1 olması (NCCN V.2 2010 KML kılavuzunda BCR-ABL kimerik mRNA'

da başlangıç değerinden 3 log veya daha fazla azalma olması **majör moleküler yanıt** olarak tanımlanmaktadır (62, 89).

İzlem

Avrupa LösemiNet eksper paneli, TKİ döneminde KML hastalarının izlemi konusunda çok açık öneriler belirtmiştir. Bu öneriler şu anda altın standart olarak kabul görmekte ve uygulanmaktadır. Erken kronik faz KML' nin ilk adım imatinib tedavisinde, optimal etki tam hematolojik yanıt (THY) ile elde edilebilir ve 3 ay sonunda en azından minör sitogenetik yanıt ($Ph1+ \leq \%65$), 6 ay sonunda en azından kısmi sitogenetik yanıt ($Ph1+ \leq \%35$), 12 ay sonunda TSY, 18 ay sonunda MMY ve herhangi bir zamanda da stabil ya da gelişen majör moleküler yanıt (MMY) elde edilmelidir. İmatinib tedavisinin başarısızlığı şu durumlarda ortaya çıkar: 3 ay sonunda THY'dan daha düşük bir sonuç, 6 ay sonunda sitogenetik yanıt görülmemesi ($Ph1+ > \%95$), 12 ay sonunda kısmi sitogenetik yanıtından daha düşük bir cevap ($Ph1+ > \%35$), 18 ay sonunda TSY' dan daha düşük bir yanıt, THY veya TSY kaybı, imatinibe duyarsız mutasyonların ortaya çıkması ya da herhangi bir zamanda $Ph1+$ hücrelerde meydana gelen diğer klonal kromozom anomalileri (7).

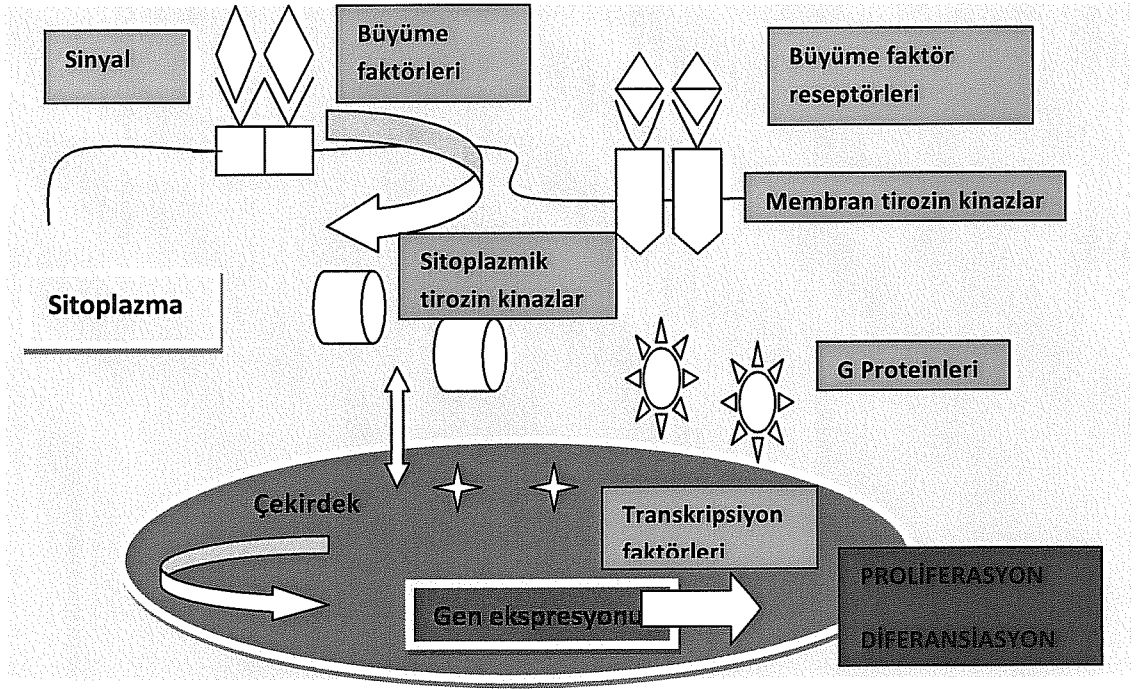
2.3. Genetik ve Kanser

Kanser, DNA tamiri, hücre döngüsü, apopitozis, farklılaşma, ve hücre- hücre teması gibi temel hücresel işlevleri etkileyen genetik hastalıklar grubudur. Kanserin sebeplerinin anlaşılmasındaki belki de en önemli gelişme, kanserin genetik bir hastalık olduğunun kavranmış olmasıdır. Kanser gelişimi, hücresel işlevin temel yönlerini kontrol eden genlerin bir veya birkaçında mutasyonların olmasını gerektiren çok basamaklı bir süreçtir. Kansere ilişkili genomik değişimler tek bir nükleotidin yer değiştirmesinden, büyük ölçüde kromozomların tekrar düzenlenişlerine dek uzanmaktadır. Kalıtsal genetik hastalıklardan farklı olarak kanser, büyük oranda somatik hücrelerde meydana gelen mutasyonlarla ortaya çıkar. Kanserin yaklaşık % 1-5' i ise, zigot oluşumundan itibaren hücre bölünmesi ve dokuların meydana gelişinde gerçekleşen (germ-line) ve kişilerin yatkınlıklarını artıran mutasyonlarla ilgilidir. Kanser ile diğer genetik hastalıklar arasındaki önemli bir diğer fark, kanserin tek bir mutasyonla oluşabilmesinden ziyade genellikle çok sayıda (6-10) mutasyondan kaynaklanmasıdır. Kansere yol açan mutasyonlar, DNA hasarının tamirini, hücre

bölünmesini, apoptozis' i, hücresele farklılaşmayı ve hücre-hücre teması gibi pek çok hücresele işlevi olumsuz yönde etkilemektedir (63, 95).

İnsan bedeni bölünen ve özgün dokulara farklılaşan hücrelerden meydana gelir. Sağlıklı bir bireyde hücreler bölünür, büyür, farklılaşır ve sonuçta apoptozis adı verilen programlı bir ölüm çerçevesinde yaşamlarını sonlandırırlar. Eğer bu bütünlük içinde ilgili genlerde bir mutasyon ortaya çıkarsa kontrolsüz bir hücre çoğalması olacak ve kanser oluşumuna zemin hazırlayacaktır (63).

Tümör oluşumundan sorumlu genler, **onkogenler**, **tümör baskılayıcı genler**, **DNA tamir genleri** olmak üzere üç ana gruba ayrılır. **Proto-onkogenler** normal hücre döngüsünde görev alan, hücre büyümesi, farklılaşması ve çoğalmasından sorumlu olan genlerdir. Mutasyona uğrayarak onkogenik aktivite kazanırlar ve sürekli hücre bölünmesine yol açarak tümör oluşumuna neden olabilir; çeşitli mutasyonlarla aktiflenerek **onkogene** dönüşebilir ve bir tümörün başlaması ya da ilerlemesine katkıda bulunabilirler. Proto-onkogenin aktif hale gelmesi için genin her iki alelinden birinin mutasyona uğraması yeterlidir (dominant etki)(63,95). Proto-onkogenlerin kodladığı gen ürünleri, polipeptid büyüme faktörleri, büyüme faktör reseptörleri, transmembran reseptörler, GTP-bağlayan reseptörler, protein kinazlar, transkripsiyon faktörleri, gen regüle eden proteinler gibi proteinleri içerir. Tüm bu moleküller normal koşullarda hücrenin büyüme, farklılaşma ve çoğalması ile ilgili sinyal ileti mekanizmalarını aktive ettiklerinden, sağlıklı bir hücre döngüsü içinde denetim altındadırlar. Hücre döngüsü kontrol mekanizmalarının herhangi bir yerinde oluşacak aksama, proto-onkogenlerin onkogenik aktivite kazanmasına ve sonuçta kontrolsüz hücre çoğalmasının uyarılmasına yol açacaktır (63).



Şekil-4: Hücre döngüsü ve sinyal ileti yolları (63)

Onkogen aktivasyonu, proto-onkogenin yapısında bir nokta mutasyon veya amplifikasyon ile olabileceği gibi delesyon, duplikasyon, kromozomal translokasyon veya retroviral DNA gibi hareketli bir genetik parçanın genoma insersiyonu ile oluşabilmektedir. Gen mutasyonu, proto-onkogenlerin aktivasyonunu uyarabilen çeşitli mekanizmalardan yalnızca biridir (63).

Gen amplifikasyonu onkogen aktivasyon mekanizmalarından bir diğeridir. Normalde bir hücrede iki kopya halinde bulunan genler amplifiye olduklarında düzinelere, hatta yüzlerce kopya oluştururlar. Amplifiye bölgeler kromozomlar üzerinde zincirleme tarzda yer aldıklarında uzun, homojen, atipik bir boyanma gösterirler. Bu yapıları kromozom terminolojisinde “homojen boyanma bölgeleri” (HSR) adı verilmektedir. Amplifiye olan bölgeler genelde çiftler halinde bulunduğundan “çift minik kromozomlar” (Dms) olarak adlandırılır. İster HSR ister Dms formda olsun, amplifikasyon, gen ekspresyonunda artışa neden olur, bu da kanserin ilerleyişini hızlandırır. Tümör hücrelerinde amplifiye olduğu saptanan ilk proto-onkogen MYCN’ dir. MYCN’ nin kodladığı N-MYC geni bir çocukluk çağı tümörü olan nöroblastomada amplifiye olmaktadır. İleri evre göstergesidir. Bir protein kinaz reseptörünü kodlayan erbB-2 gen amplifikasyonu ise meme ve over kansinomlarında ileri evre göstergesidir (63).

Proto-onkogenler, kromozomal translokasyonlar sırasında oluşan mutasyonlar ile de aktive edilir. Sıklıkla lösemi ve lenfomalarda ve nadiren de tümörlerde tanımlanmışlardır (Tablo 4). Kromozomal translokasyonlar sonucunda kromozomların kırık noktalarındaki genler arasında etkileşim olur. Sonuçta sıklıkla yeni bir özelliğe sahip onkogenik etkili bir kimerik protein oluşturur. Kronik myeloid lösemi' de görülen Philadelphia kromozomunda, 9. kromozomun uzun kolunda yer alan bir trozinkinaz olan ABL proto-onkogeni, 22. kromozom uzun kolunda yer alan BCR (breakpoint cluster region) geni ile füzyon oluşturmaktadır. Abl geninin tirozin kinaz aktivitesi korunmakta fakat bcr etkisi ile işlev ve ekspresyonu değişerek yeni bir protein oluşmaktadır. Oluşan yeni proteinin artmış olan tirozin kinaz aktivitesi hücre transformasyonuna yolaçar (63).

Tabllo-4:Bazı malignensi örneklerinde kromozom translokasyonlarının özellikleri (61)

Neoplazi	Kromozom Translokasyonları	Olguların %'si	Etkilenen Proto-onkogen
Burkit Lenfoma	t(8;14)(q24;q32)	%80	MYC
	t(8;22)(q24;q11)	%15	
	t(2;8)(p12;q24)	%5	
KML	t(9;22)(q34;q11)	%90-95	BCR-ABL
Akut Lenfoblastik Lösemi	t(9;22)(q34;q11)	%10-15	BCR-ABL
Akut Lenfoblastik Lösemi	t(1;19)(q23;p13.3)		PRL homeobox gene
Akut Promyelositik Lösemi	t(15;17)(q22;q21)		Retinoik asit reseptör
Kronik Lenfositik Lösemi	t(11;14)(q13;q32)	%10-30	BCL-1
Foliküler Lenfoma	t(14;18)(q32;q21)		BCL-2

Onkogenler genellikle hücre çoğalmasını uyarırlar fakat bazı transkripsiyon faktörlerinin onkogenik aktivitesi, hücre farklılaşmasının inhibisyonu ile sonlanır. Tiroid hormonu ve retinoik asit, plazma membranını aşarak hücre içi reseptörlere bağlanarak farklılaşma sağlayan proteinlerdir. Tiroid ve retinoik asit reseptörlerinde oluşan bir mutasyon sonucu, onkogenik proteinler oluşur ve hücre farklılaşması engellenir. Farklılaşmamış lösemik hücreler aktif olarak proliferasyon evresinde kalır.

Akut myeloid lösemi M3 tipinde görülen PML/RAR α mutasyonu buna örnektir. Yüksek doz retinoik asit tedavisi ile PML/RAR α onkogen proteininin etkisi baskılanabilmekte ve lösemik hücrelerde farklılaşma sağlanmaktadır (63).

Son yıllarda kromozomların uçlarındaki telomerlerin uzatılmasından sorumlu, ribonükleoprotein yapısında olan ve telomerlerin devamlılığını sağlayan **telomeraz enzimi**'nin onkogenik etkisi üzerinde durulmaktadır. İnsanda telomeraz, telomere, heksamerik bir DNA yapısını, 'TTAGGG', eklemektedir. İnsan germ hücrelerinde telomerazlar yaklaşık 15 kb'lik telomerik heksamerik tekrarları içerir. Normal gelişme döneminde hücreler farklılaşırken telomerazın fonksiyonu azalır ve telomerler her bir hücre bölünmesinde ortalama 35 bazlık telomerik tekrar DNA' sını kaybederek kısalır. Bölünmeler sonrasında kromozom uçları hasar görür ve telomerlerin yakınlarına lokalize genler delesyona uğrayabilir. Hasar gören DNA, p53 ve Rb1 genlerinin rol oynadığı sinyal yolları ile hücre döngüsünün G0 fazına girer ve hücre bölünmesi durur (61, 63).

Telomeraz aktivitesinin kültür ortamında transforme hücrelerde ve tümörlerde yeniden belirdiği gözlenmiştir. Bazı genomik ve kromozomal mutasyonlar telomerazı yeniden aktive edebilmektedir. Şüpheli kanseröz lezyonlarda biyopsi veya iğne aspirasyonu ile elde edilen hücrelerde telomeraz aktivitesinin ortaya çıkışı kanser lehine bir veri olarak değerlendirilmektedir (61, 63).

Tümör Baskılayıcı Genler (TbG), Tümör baskılayıcı genlerin kansere yol açabilmesi için proto-onkogenlerden farklı olarak ilgili "genin her iki allelinin de mutasyon ile inaktive olması" gerekmektedir. Tümör baskılayıcı genlerdeki inaktivasyonda bilinen üç temel genetik model bulunmaktadır: İlk modelde mutasyon, genin "promoter" (Bir genin 5' kısmında yer alan ve transkripsiyonun algılanmasını sağlayan kısımdır) bölgesini etkiler veya kodlayıcı dizide "erken stop kodon" oluşturur. Her iki durumda da işlevsel protein yapımı engellenmektedir. İkinci model DNA metilasyonu ile ilgilidir: Bir promoter bölgeye yakın CpG adacıklarının metilasyonu transkripsiyonun inhibisyonuna neden olur. Son olarak, tümörün genomik yapısı içinde bir kromozom kaybı (anöploidi) söz konusu ise ve ilgili kromozom bir tümör baskılayıcı gen taşıyorsa fonksiyon göreceği gen ortadan kalkacağı için tümör baskılayıcı gen yine inaktive olmuş olur (63).

İlk apoptozis geni, B-hücreli lenfomada tanımlanmıştır. Foliküler hücreli hemen tüm B-hücre lenfomalarında 18q21' de lokalize bcl-2 geni, bir apoptozis genidir. t(14;18) sonucunda bcl-2 geni aktive olur. Bcl-2 geni tarafından kodlanan protein, bir mitokondrial iç membran proteindir ve B-hücrelerinde güçlü antiapoptotik etkileri vardır. Translokasyon sonucu hücrelerin doğal apoptozisi engellendiğinden, B-hücre popülasyonunda artış ortaya çıkar. Hücre siklusunu kontrol eden diğer genler örneğin c-myc, p53 ve pRb de apoptozda rol alır (63).

DNA Tamir Genleri (Mismatch Repair Genes), DNA tamir mekanizmaları, mutajenik etkilerle, ya da replikasyondaki hatalara bağlı olarak hasara uğrayan DNA'nın onarımı ile ilgili sistemlerdir. DNA replikasyonu sırasında, DNA'nın replike olan zincirinde, DNA polimerazlar, yanlış nükleotidleri yerleştirebilirler. DNA polimerazlar bu replikasyon hatalarının çoğunu yapılarında bulunan 3'-5' yönünde çalışan ekzonükleazlarını kullanarak düzeltebilmelerine rağmen, yanlış yerleştirilmiş olan bazı nükleotidler replikasyondan sonra kalabilirler. Hata okuma sonrasında kalan hatalar, yanlış eşleşme onarım (mismatch repair-MMR) mekanizması ile düzeltilir. Eğer bu hatalar DNA tamir mekanizmalarınca tanınıp uzaklaştırılmazsa mutasyona yol açabilirler. Örneğin, BRCA1(ailevi meme kanseri tip1 de), BRCA2 (ailevi meme kanseri tip2 de) genleri ve Xeroderma Pigmentosum (XP) genlerinin (XPA' dan gen G' ye kadar lösemi ve deri kanserinde) DNA tamirinde görev aldıkları ve bu genlerin mutasyonlarının ilgili malignitelerin ortaya çıkışında rol oynadığı ileri sürülmüştür (61, 94). DNA tamir genleri, DNA'nın kendini eşlemesi (replikasyon) esnasında ve hata okumadan kaçan yanlış eşleşmeleri düzenleyen evrimsel olarak korunmuş bir işlemdir ve böylece genomun stabilitesini korur (94).

2.4. Hematolojik Malignitelerde Genetik Tanı Yöntemleri

Hematolojik malignitelerde genetik mutasyonların belirlenmesi, tanı, prognoz, remisyon ve relaps açısından son derece önemlidir. Lösemi olguları, klasik sitogenetik analizler, Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi yöntemler ile taşıdıkları genetik belirteçler açısından araştırılmaktadır. Tablo 5' de lösemilerde sıklıkla karşılaştığımız, tanı, takip ve prognozda önemi olan kromozomal translokasyonlar ve ilişkili genlerden bir kısmı özetlenmiştir.

Tablo-5: Lösemilerde sıklıkla karşılaşılan, tanı, takip ve prognozda önemi olan kromozomal translokasyonlar ve ilişkili genler (43)

ABERASYON TRANSLOKASYONLAR	İLİŞKİLİ LÖSEMİ TİPİ	GENLER
t(1;19)(q23;p13)	Pre-B- ALL	PBX1, E2A
t(4;11)(q21;q23)	ALL, AML	AF4, MLL
t(8;14)(q11;q32)	ALL	
t(8;14)(q24;q32)	ALL-L3	c-MYC, IgH
t(8;21)(q22;q22)	AML- M2, M4	ETO, AML1
t(9;22)(q34;q11)	ALL, AML-M1, M2, KML	ABL, BCR
t(15;17)(q22;q21)	AML- M3,	PML, RARa
t(16;16)(p13;q22)	AML- M4Eo	MYH11, CBFb

2.4.1. Moleküler Sitogenetik Yöntemler (FISH)

FISH tekniğinde, özgün nükleik asit bölgeleri içeren DNA problemleri, lam üzerinde fikse edilmiş metafaz / interfaz hücrelerinin içerdiği DNA ile yerinde (in situ) hibridize edilir. Problemlerin işaretlenmesinde en yaygın metod floresan boya olup, işaretlenmiş DNA floresan boyadan yayılan ışığın bir dalga boyunda absorblanması ile görünür hale gelirler ve floresan mikroskopta analiz gerçekleştirilir (96). Sadece işaretlenen bölgenin analizinin yapılabilir olması ve diğer aberasyonların aynı anda tesbit edilememesi, tekniğin dezavantajlarından biri olmakla birlikte, metafaz elde edilemeyen durumlarda ve maskelenmiş/varyant translokasyonların belirlenmesinde klasik bantlama

yöntemlerinden daha başarılıdır (2, 17, 41). FISH, periferik kan ve kemik iliği gibi birçok numunede uygulanabilir. Kanser uygulamalarında FISH için kullanılan problemler genellikle lokus özellikli belirleyici DNA problemleri ya da alfa-satellite sentromer problemleri ya da bu ikisinin kombinasyonudur.

Geleneksel FISH (S-FISH ya da dual-FISH olarak da adlandırılır) iki renkli bir tekniktir ve 5' BCR floresan probunun yanı sıra ikinci bir 3' ABL floresan probe kontrast bir renkle bu genlerin pozisyonunu belirlemek için kullanılır (86). Ph1 translokasyonu varlığında 1 füzyon, 1 yeşil ve bir kırmızı, sinyal alınmaktadır. S-FISH hem metafaz hem de interfaz hücrelere uygulanabilmektedir. %1-6.5 arası bir yanlış pozitif eşik değeri gösterir (23, 86). Buna ek olarak potansiyel füzyon sinyallerinin derecelendirmesi subjektif olduğundan S-FISH ayrıca birçok yanlış negatif sonuç ile etkinliği sınırlanmaktadır (17). Triple prob FISH (üç renkli FISH), BCR ya da ABL'deki kırılma noktalarını (örneğin: 9q34'deki argininosuccinate synthetase gen lokusu) kapsayan üçüncü bir probe eklenmesiyle iki probe S-FISH tekniğinin hassasiyetini artırmaktadır. Her probe farklı bir florokrom ile etiketlenir ve Ph1 pozitif hücreler, üçüncü probe ko-lokalizasyonunun kaybedilmesi ve S-FISH analizinin karakteristiği BCR/ABL füzyon sinyali ile ayırt edilir. Normal kromozom 9 ve 22 ilişkili sinyaller, tek kırmızı, aqua ve yeşil sinyal alınması beklenirken del 9 durumunda aqua sinyali gözlenmemiştir. Bu iki aşamalı doğrulama işlemi % 0.065-0.27 (SD % 0.08-0.15) yanlış pozitif oranında Ph1 pozitif hücrelerin belirlenmesindeki hassasiyeti artırmaktadır (75, 76). Dual color Dual Füzyon (DC DF) FISH ve Tri-color FISH ile yapılan bir çalışmada DC DF probe 2 füzyonlu KML hastalarının farklı aberan sinyallerini tanımlamada ve görüntülemeye yararlı olsa da füzyon delesyonu olan vakalarda tedaviye verilen yanıtı görüntüleyebilmek adına tri-color dual füzyon probe kullanmayı önermişlerdir (76).

Double FISH (D-FISH), S-FISH analizinde kullanılan iki probe yanında 3' BCR ve 5' ABL' e bağlı ve 9 ve 22 kromozomlarının kırılma noktalarına denk gelen iki ek probe kullanılır. BCR/ABL translokasyonu durumunda D-FISH double füzyon sinyali ortaya çıkarır çünkü dört probe ilgili BCR-ABL ve ABL-BCR lokuslarına bağlıdır (17). S-FISH ile karşılaştırıldığında bu durum hem yanlış negatif hem de yanlış pozitif riskini azaltmaktadır (14).

Ph1 translokasyonunun tespit edilmesi için en sık kullanılan prob BCR/ABL Dual Color, Dual Füzyon Translokasyon Problarıdır. Varyant Ph translokasyonlu ya da kromozom 9 ve 22 içeren ikincil yapısal değişiklik görülen vakalarda hibridizasyon örneği çeşitlilik gösterebilir ve FISH ile uyumlulukları sağlaması için rutin kromozom analizine ihtiyaç duyulabilir.

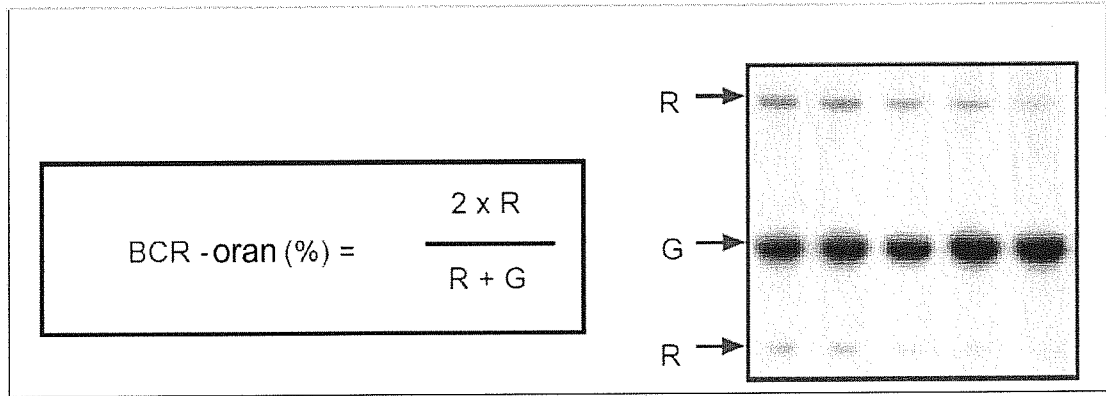
Kanser sitogenetiğinde deneysel ve kliniksel FISH uygulamaları, sayısal kromozomal anormalileri (aneuploidiler), translokasyonlar, inversiyonlar, delesyonlar, duplikasyonlar, izokromozomlar, derivatif kromozomlar, disentrikler, ringler, asentrikler, “double minute” ler ve amplifikasyonlar gibi anomalilerin belirlenmesinde önemli katkı sağlar. FISH özellikle fazla sayıda bölünmemiş hücre üzerinde klonalite özelliğini belirleyebilmek için kullanışlıdır ve özellikle de mitotik indeksin düşük olduğu suboptimal kanserlerde faydalıdır (55, 56). Double FISH (D-FISH) ve S-FISH in karşılaştırıldığı bir çalışmada normal kontrol vakalarında “cut off” oranları sırasıyla %0,73 ve %6,24 bulunmuş, tedavi almakta olan KML vakalarında da pozitiflik oranları sırasıyla %54,2 ve %29,2 bulunmuş ve D-FISH’ in S-FISH’ e göre daha sensitif ve spesifik olduğunu belirtmişlerdir (98). Hipermetafaz FISH (HMF) tek bir koleksiyon süresince ek kromozomal analizlerin yapılabilmesini mümkün kılmaktadır. Ancak hipermetafaz FISH sadece sirkülasyondaki bölünen hücreleri değerlendirir ve bu yüzden bölünmeye girmeyen Ph1+ hücreleri belirleyememektedir (41).

2.4.2. Moleküler Genetik Yöntemler

Konvensiyonel sitogenetik ve moleküler sitogenetiğin yetersiz kaldığı durumlarda başvurulan tekniklerdir. Bu teknikler Southern blot, Western Blot ve PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)(Quantitative PCR, Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) ve Nested RT-PCR)’ dir.

Southern Blot Analizi: Southern blot analizinde hastanın lökositlerinden alınan genomik DNA bir grup restriksiyon enzimi (örneğin Bg/II, XbaI, HindIII, EcoRI, BamHI) ile parçalanır, bir agaroz jelde yürütülür, naylon bir zara transfer edilir ve M-bcr’ nin 3’ ve 5’ kısmından elde edilen etiketli iki DNA probuna hibridize edilir. Otoradyografi sonrasında, değişim göstermeyen BCR allel i belirten bir şerit görülür. KML hastalarında ise bir ya da iki ek şerit, yeni oluşumlu bir BCR allel’ i gösterebilir (Şekil 5). Bu teknik kullanılarak Ph1 pozitif hastalarının %98’ indeki yeni bir BCR düzenin varlığı ve Ph1 negatif vakalarının da büyük bir bölümü belirlenebilir. Rutin

kullanım için neredeyse tüm vakalarda bilgilendirici olan Bg/II ve XbaI yeterlidir. Ancak M-bcr' de nadiren restriksiyon kesim bölge polimorfizmleri olduğundan en az iki restriksiyon enzimli yeni bir düzen bulgusu genellikle yeni bir hastadaki yanlış-pozitif bir sonucun kapsam dışı bırakılmasını belirtir. Translokasyonlu aleldeki BCR sekanslarının kısmi delesyonları ve M-bcr dışında belirleyici nadir varyantlar nedeniyle veya yeni oluşum bandının çok büyük, küçük veya tesadüfen normal alel ile aynı boyutta olması nedeniyle yanlış-pozitif sonuçlar artabilir. Buna rağmen yanlış-pozitif veya yanlış-negatif sonuçlar nadirdir.



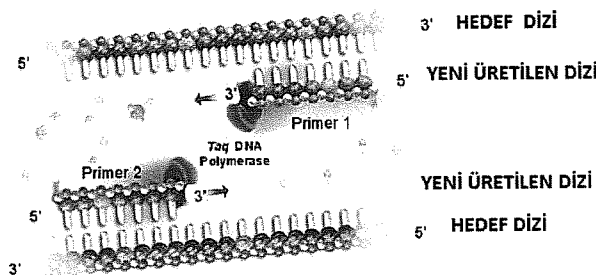
Şekil-5: Southern Blot Analizi sonrası grafi görüldüğü (41)

Terapi sonrası, southern blot analizi BCR yeni oluşumlu hücrelerin oranının incelenen tüm hücrelerle kıyaslanması sonucundaki derecelendirmeye olanak sağlar. KML hücrelerinin oranı, yeni düzenli plus germline bantlarının intensitelerinin toplamından ayrılan yeni düzenli bandın intensitesinin iki katı olarak belirlenir (BCR oran). Bunun nedeni de KML hücrelerinin bir normal ve bir yeni düzenli kromozom 22' den sinyaller elde etmesine rağmen normal hücrelerin iki normal kromozomdan aynı sinyalleri elde etmesidir. Eş zamanlı olarak numune periferik kan ve kemik iliğinden elde edilen hastalık seviyesi benzerdir ve bu yüzden analiz için genellikle periferik kan kullanılır. Kuantitatif Southern blot analizi %1-5 oranında lösemili hücrelerin belirlenebilmesine ve derecelendirilebilmesine olanak sağlar. Tedaviye yanıt adına bir değerlendirme yapmak için başlangıç restriksiyon örneği ve yeni düzenli bandın intensitesi hakkında bilgi sahibi olmak gerekmektedir. Southern blot' in sitogenetiğe nazaran en büyük avantajı kemik iliği yerine periferik kan kullanılabilmesine olanak sağlayan bölünmüş hücrelerden bağımsız olmasıdır (41).

Western Blot Analizi: Western blot analizi, kemik iliği ve periferik kandaki BCR-ABL proteinlerini nitel ve nicel olarak belirlemek için kullanılabilir. Lökositler

potansiyel proteaz inhibitörlerinin varlığında çözünürler, poliakrilamid jel ile parçalanır, naylon bir membrana transfer edilir ve bir anti-ABL antikorla probe edilir. Farklı türde BCR-ABL proteinleri (p190, p210, p230 ve nadir varyantlar), p145 ABL' den migrasyondaki farklılıktan dolayı ayrı tutulmalıdır. Hassasiyet limiti yaklaşık %0.5-1' dir. Kuantitatif bir western blot analizi, BCR-ABL/ABL protein oranları ile eşzamanlı geleneksel sitogenetik analizler arasında linear bir korelasyonun varlığını göstermiştir (34, 41).

PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu): PCR, çok küçük miktardaki DNA' nın kullanımına imkan veren ve oldukça hassas bir teknik olması açısından fazlaca tercih edilmektedir. PCR iki oligonükleotid primer arasındaki bir DNA fragmanın enzimatik çoğaltılmasıdır. Bu primerler ilgilenilen DNA dizisini, her iki zincirde birbirine zıt yönde sınırlayacak şekilde hedef DNA dizisine komplementer olarak dizayn edilmiştir. Primerler arasında kalan dizin DNA polimeraz enzimiyle sentez edilerek kopyalanmış olur. Reaksiyon "Denatürasyon", "Annealing" ve "Elongasyon" dan oluşan 3 adımda tamamlanır. "Denatürasyon" adımı yaklaşık 95°-100° de gerçekleşir ve hedef DNA ikili zincirinin hidrojen bağları kopar iki tekli zincir haline gelir. Primerlerin tekli zincir hedef DNA' ya ideal hibridize olduğu ısı "Annealing" ısısıdır ve primerlerin nükleotid dizilimine göre değişkenlik gösterir (40°-60°). 3. adım olan "Elongasyon" da DNA polimeraz enzimi aktive olur ve ortamdaki Deoksi-Adenozin (dATP), Deoksi-Timidin (dTTP), Deoksi-Guanozin(dGTP) ve Deoksi-Sitidin (dCTP) Trifosfat moleküllerini kullanarak hedef DNA' ya komplementer zincirin sentezini gerçekleştirir. Bu adımda yaklaşık 70°-75° de gerçekleşir. Bu üç adımın her tamamlanışı (bir siklus) hedef DNA dizisinin miktarının iki kat artışıyla sonuçlanır. Bir PCR reaksiyonu ortalama 20-40 siklustan oluşur (Şekil 6)(85).



Şekil-6: PCR reaksiyonu (85)

Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR): 1989 yılında allojenik kemik iliği transplantasyonu sonrası KML hastalarında, minimal residual

hastalığın belirlenebilmesi için klasik PCR yöntemleri kullanılmıştır. Ancak, çok merkezli bir başka araştırmadan gelen sonuçlar klasik PCR' in yüksek yanlış-pozitif oranlara meyilli olduğunu ortaya çıkarmış ve KML hastalarının takibinde çelişki yaratmıştır. Bu nedenlerle son on yılda PCR yöntemleri daha da geliştirilmiş, RT-PCR ve Q-PCR yöntemleri oluşturularak, PCR' in özgünlüğü artırılmıştır (41).

Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu, PCR' in varyant bir formudur. PCR' da DNA' nın kopyeleri amplifiye edilmektedir; oysa RT-PCR da RNA molekülünden revers transkriptaz enzimi aracılığı ile, öncelikle komplementer DNA (cDNA) elde edilmesi, daha sonra bu DNA' nın klasik PCR ile amplifiye edilmesi söz konusudur. Metodoloji kimi zaman “Real-Time PCR” ile karıştırılmakta (Q-PCR) ve anlam karmaşası yaşanmaktadır; zira Real-Time PCR yöntemi de zaman zaman RT-PCR (qRT-PCR yerine) olarak ifade edilmektedir.

Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu yarı-kuantitatif bir yöntemdir; işlemde saptanması hedeflenen amplikonlar, amplifikasyon işlemleri sonlanmadan önce saptanamaktadırlar. Bu nedenle yanlış pozitiflik görülebilmektedir. Bu nedenlerle kuantitatif PCR (Q-PCR)' a göre daha çok zaman alan ve daha az duyarlılığı olan bir tekniktir.

Multipleks PCR: KML' de tanıda bcr-abl mRNA transkriptleri taraması: KML' de tanı için incelenecek materyallerde gerek klasik transkriptlerin gerekse, atipik transkriptlerin birlikte saptanabilmesi için, multipleks PCR yöntemi önerilmektedir. Yöntemde tek bir reaksiyon tübünde birden fazla primer kullanılarak, çok sayıda hedef DNA' nın amplifiye edilmesi sağlanır. KML için üç BCR ve bir ABL primerinin kullanılması önerilmektedir. Böylece klasik b2a2 ve b3a2 transkriptleri yanında, ABL ekzon a2 nin olmadığı atipik transkriptler de (b2a3 yada b3a3) saptanabilecektir. Yöntemde e1a2 ya da e6a2 gibi M-bcr dışındaki BCR “breakpoint” kaynaklı transkriptler de belirlenebilmektedir (41).

Minimal residual hastalığın belirlenmesi:

‘nested’ RT-PCR: KML tanısı sırasında ve hastalığın tekrarlanması (relaps) döneminde, lösemi hastalarında genelde toplam 10^{12} tümör hücre yükü bulunmaktadır. Sitogenetik analizler, western blot ve geleneksel FISH analizlerinin bcr/abl transkriptini (tümör yükünü) saptamadaki duyarlılıkları, maksimum %1 dir. Bunun altındaki yoğunlukları saptamada bu yöntemler yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle transkriptin bu

yöntemlerle negatif saptandığı durumlarda, hastadaki tümör yükü ya sıfır olabileceği gibi 10^{10} da olabilir. Diğer bir deyişle transkript negatif sonuç gösteren bir hasta gerçekte residuel lösemi hücresi barındırabilir.

Transkript negatif olan hastanın klinik ve hematolojik remisyonda olduğu ifade edilir. Aslında 'remisyon' terimi sadece residuel lösemik hücre sayısındaki tahmini kesitsel bir noktayı ifade etmektedir. Ulaşılmak istenen asıl hedef, residuel tümör hücrelerinin varlığını ve kuantifikasyonunu ortaya koymak (rezidüel hastalık) ya da tümör hücre yükünün sıfır olduğu durumu saptamaktır.

BCR-ABL mRNA tanımı için uygulanan RT-PCR analizi, residual hastalık analizi konusunda en duyarlı yöntemdir ve 10^5 - 10^6 normal hücre arasındaki tek bir lösemi hücresini belirleyebilir. Bu yüzden PCR geleneksel metodlara nazaran 4 aralık derecesinden daha yüksek hassasiyet göstermektedir. Ancak, RT-PCR ile belirlenemeyecek oranda residual hastalık taşıyan hastalar, hala, hastalığın tekrar etmesine neden olacak bir milyon tümörlü hücre barındırabilirler. Residuel hastalığın belirlenebileceği hassasiyet, analiz edilebilen periferik kan ve kemik iliği miktarı ile sınırlıdır. İki turlu amplifikasyonda kullanılan ve uygun BCR ve ABL ekzonlarına karşılık gelen iki çift primer nested RT-PCR analizi ile, tedavi sonrası residual KML hücreleri 10^6 hücrede 1 hassasiyet oranı ile belirlenebilir. Kalitatif PCR metodu MRD varlığını belirlemek için kullanılmakta ancak bireysel hastalarda hastalığın tekrar edebilme durumunu tahmin edememektedir (41).

RT-PCR metodunun etkinliği yükseltildiğinde, yaşa bağlı bir frekansla, birçok normal kişide de her 10^8 hücrede 1 ile 10 arası seviyede, BCR-ABL mRNA transkripti belirlendiğini raporlayan çalışmalar mevcuttur. BCR-ABL' nin ve muhtemelen birçok diğer füzyon geninin, normal kemik iliğindeki mitoz hücrelerde hücre bölünme süreçleri devamınca oluşturulduğu ileri sürülmektedir. Ancak örneğin KML oluşumunda, sadece doğru primitif hematopoetik progenitör çerçevesindeki bir BCR-ABL' nin, büyüyen bir klon olarak seçici bir avantaj sağlayacağına değinilmektedir. BCR-ABL' nin tek başına myeloid hücre sayısındaki artış için yeterli olamayacağı, maligniteyi belirleyen diğer yardımcı genetik olayların da gerekebileceği diğer savlar arasındadır.

Hemen tüm KML hastalarında tanı sırasında, dominant M-bcr transkriptinin alternatif bölünmesi sonucunda P190 bcr-abl protein kodlu e1a2 BCR-ABL transkriptleri saptanmıştır. Bu transkriptlerin çok az sayıda olması nedeniyle tedavi

sonrasında birçok hastada PCR negatifliği sağlanmıştır. Alternatif bölünümlü (spliced) varyantların tekrar görünmesi sitogenetik relapstan önce görülmüştür; ancak bunun hastalığın tekrar etmesi adına bir kanıt olarak değerlendirilmesi konusu tartışmalıdır. Bu bulgunun başka araştırmalarla doğrulanması gerekmektedir; yine de yöntemin bazı durumlarda kantitatif analizlere alternatif olarak düşünülebileceğine değinilmektedir (41).

Kantitatif pcr: Kalitatif RT-PCR sınırlı bilgi sunduğu için, KML sürecinde ortaya çıkan residual hastalığın kinetiklerinin izlenebilmesine olanak sağlayan kantitatif (Q-PCR veya qRT-PCR) ve yarı kantitatif RT-PCR analizleri geliştirilmiştir. Q-PCR hedeflenen bir DNA bölgesinin amplifiye edilmesini ve eş zamanlı olarak da amplifiye edilen transkriptlerin sayılarının belirlenmesini (transkriptin kantifikasyonu) hedefler. Yöntemde önce revers transkripsiyon ile cDNA saptanması söz konusudur. Klasik PCR'ın aksine amplifikasyon süreci "sırasında" ampikon sayısı saptanır. Oysa klasik PCR da ampikon işlem sürecinin "en sonunda" saptanabilmektedir. "Real time" PCR olarak da adlandırılan Q-PCR 2 yöntem temelinde gerçekleştirilir. Ya özgün olmayan floresan boyalar, çift zincirli DNA ile etkinleşir; ya da floresan işaretli oligonükleotidlerden oluşan diziye özgün DNA probları kullanılır; bu durumda hedef saptama, sadece komplementer DNA ya özgün hibridizasyon oluşumu sonrasında gerçekleşir. Teknik sıklıkla revers transkripsiyon ile birleştirilerek kullanılmaktadır (qRT-PCR).

Birçok araştırmacı amplifikasyon etkinliği ve reaksiyon kinetiklerindeki varyasyonların kontrolünü sağlayan kompetitif PCR stratejileri kullanmaktadır (54). Genel olarak "nested" PCR yöntemi kullanılmakta ve hastaların aynı miktardaki cDNA'larına eklenen bir seri BCR-ABL kompetitör dilüsyonları uygulanmaktadır. Kompetitör ve numune bandının eşit intensitede olduğu ekivalans noktası dansitometri ile belirlenmektedir. Numunedeki BCR-ABL transkriptlerinin sayısı, hastada normalde bulunan bir gendeki (housekeeping gene) transkriptlerin sayısına eşitlenir. Birçok araştırmada kontrol geni olarak ABL ya da glikoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) kullanılmaktadır. Standartlaştırılmış sonuçlar BCR-ABL/ABL oranları ya da BCR-ABL/G6PD oranlarının yüzdeleri şeklinde ifade edilir. Uygun kontrol genlerinin transkript seviyesinin kantifikasyonu farklı RNA kaliteleri amaçlanıyorsa önemlidir (41).

Periferik kan numunelerinin seri kantatif RT-PCR analizleri, remisyonu sürdürme eğilimi gösteren hastaları relaps eğilimi gösteren hastalardan ayırmak için etkilidir. Sitogenetik veya hematolojik relaps öncesinde, yükselen veya sürekli yüksek seviyedeki BCR-ABL mRNA oranları tespit edilebilir. Düşük veya azalan BCR-ABL transkript seviyeleri artan remisyonu ifade ederken, yüksek veya artan BCR-ABL transkript seviyeleri ise relapsın belirtisidir (41).

Moleküler düzeydeki relapsın farkına varmak ve hastalık yükü hala düşükken terapötik müdahale için, kantatif PCR verileri kullanılmaktadır. BCR-ABL' nin kantatif RT-PCR analizi, mobilize periferik kan kök hücrelerindeki residual lösemi yükünü takip etmek adına güvenilir bir metoddur. Kuantitatif RT-PCR analizi myeloablatif terapi (otograft) sonrası hastaların tekrar infüzyonu için en uygun hücre koleksiyonlarının seçilmesini sağlar (41).

Mevcut protokolleri basitleştirmek için yeni gerçek zamanlı PCR prosedürleri geliştirilmektedir. PCR esnasında PCR ürününün çoğalma fazında ürün logaritmik olarak takip edilir ve ölçülebilir. Bu ölçüm araştırılan materyaldeki hedef bölgenin doğru bir şekilde kantitasyonunu sağlar. Bu metodun temeli, PCR için gereken spesifik primerlerin yanında floresan işaretli problemlerin reaksiyona sokulmasıdır. Bu problemler PCR sırasında çoğalan amplifikasyon ürünleri ile hibridize olur ve yaydıkları floresan sinyaller özel tasarlanmış bir cihaz içinde bulunan optik bir sistem tarafından taranır. PCR sırasında floresan yoğunluğu da artar. PCR esnasında floresan sinyalin ilk algılanmaya başladığı nokta, araştırılan materyaldeki hedef bölgenin miktarı ile korelasyon gösterir. Araştırılan gen ve /veya gen ürünü ile normalize edilir ve araştırılan materyalde bulunan malign hücrelerin sayısı belirlenir. Bu analizin yapılabilmesi için, içinde optik bir sistemi bulunan özel PCR sistemi (Hidrolyz Probu (Tagman) Formatı, Hibridizasyon Probu (Light Cyler) Formatı, Cybre Green Formatı) ne ihtiyaç vardır (28).

TaqMan sistemi kullanılarak BCR-ABL mRNA kantifikasyonu için birçok prosedür geliştirilmiştir. Analiz, PCR' in ekstansiyon fazında büyütülemeyen çift hibridizasyon probunun bölünmesi için Taq polimerazın 5' nükleaz aktivitesinin kullanılmasını temel almıştır. Problemler spesifik olmayabilir (bir BCL ya da ABL bölgesini belirten) ya da füzyon spesifik olabilir (b2a2, b3a2, e1a2 veya diğer BCR-ABL füzyon sekanslarını belirten). Bir floresan boya haberci görevi görür ve bunun

emisyonu ikinci bir floresan boya tarafından tetiklenir. Proben nükleaz aktivite ile degradasyonu tetikleyici ajanı ortaya çıkarır ve floresan emisyonunda bir artışa yol açar. Floresans eş zamanda bir sekans detektörü ile izlenir ve ölçülür. C_T değerleri floresansın eşik değerini aştığı noktayı belirleyerek hesaplanır. C_T , numunedeki hedef transkriptlerin miktarına denk gelmektedir (28, 41).

Bazı laboratuarlarda ortaya çıkan ampikonların sayısını ölçmek için, floresan bir boyanın (SYBRGreen) PCR reaksiyonuna girmesi sonucu emisyonla uğrayan sinyalin yoğunluğunu kullanmakta ve primerler füzyon alt türünün amplifikasyonunun spesifitesini belirlemektedir (28).

BCR-ABL füzyon transkriptlerinin belirlenmesi ve kuantifikasyonu için, ani termosikasyon ile PCR ürünü bir formasyonun meydana geldiği andaki eş zamanlı floresan tespitini kombine eden LightCycler teknolojisi kullanılarak alternatif bir gerçek zamanlı RT-PCR yaklaşımı geliştirilmiştir. PCR amplifikasyonun floresans takibi, donör taşıyan iki komşu hibridizasyon probunun ve akseptör floroforazların arasındaki floresans rezonans enerji transferi (FRET) konseptine bağlıdır. Akseptör florofor spektrumunun tepkimesiyle çakışan emisyon spektrumlu donör florofor tepkimesi akseptöre radyoaktivitesiz bir enerji transferiyle sonuçlanır. Uygun koşullar sağlandıktan sonra iki probdan elde edilen floresans miktarı PCR ürününün miktarıyla orantılıdır. Kapillerlerdeki düşük seviye/yüzey oranlı amplifikasyon nedeniyle PCR reaksiyon zamanları 30 dakikadan aza düşürülmüştür (28, 41).

ABL ekzonunu tamamlayıcı bir çift prob tasarımı ile tüm bilinen BCR-ABL varyantlarının ve ayrıca internal kontrol olarak normal ABL' nin tespit edilebilmesi mümkün kılınmıştır. 10 hedef molekül/reaksiyon dan az amplifiye etmek, sağlıklı donörlerden 10^5 hücrede bir KML hücresi tespit etme ve 10^7 HL60 hücresinde bir K562 hücresi tespit edilebilmesine uygun koşullar hazırlanmıştır. Analizin kullanılabilirliğini belirlemek için tedavi sonrası KML hastası 120 kişiden alınan 254 numune örneğinden BCR-ABL ve ABL transkriptleri derecelendirilmiştir. Residual hastalığın seviyesi BCR-ABL/ABL oranı olarak ifade edilmiştir. LightCycler ile belirlenen BCR-ABL/ABL oranları ile aynı cDNA numuneleriyle uygulanan nested kompetitif RT-PCR analizi tarafından belirlenen BCR-ABL/ABL oranları arasında yüksek bir korelasyon görülmüştür (41). Bu üç metodoloji, kalitatif 2 aşamalı "nested" PCR ve kompetitif PCR uygulamalarının yerini almıştır çünkü daha doğru sonuçlar vermelerinin ve hızlı

olmalarının yanı sıra aynı derecede hassasiyet göstermekte ve ayrıca daha az kontaminasyon riski taşımaktadırlar (28). Ayrıca güncel sitogenetik analizlerle belirlenen Ph1 pozitif metafazların oranı ile Southern blot analiziyle belirlenen BCR oranı arasında da yüksek bir korelasyon gözlemlenmiştir.

KML hastalarında hem periferik kan hem de kemik iliği işleme tabi tutulabilir (41). Terapi sonrası KML hastalarının takibi adına gerçek zamanlı PCR yaklaşımları güvenilir ve hassas yöntemlerdir. Metodolojinin en büyük avantajları amplifikasyon ve ürün analizinin kontaminasyon riskini azaltmak adına aynı reaksiyon kanalında uygulanması ve sonuçların “housekeeping “ genlerin kuantifikasyonu ile standartlaştırılmasıdır (40). Rutin sitogenetik analizler, interfaz ve hipermetafaz FISH ve kalitatif ve kantitatif RT-PCR analizleri karşılaştırıldığında farklı tekniklerin avantajları ve dezavantajları olduğu ancak genel olarak iyi korelasyon gösterdikleri belgelenmiştir (41). KML hastalarının tanısı ve görüntülenmesinde PCR rutin olarak sitogenetik ve, FISH ve standart tanısal testler ile kombine edilmektedir. Moleküler testler kullanılarak düşük seviye minimal residual hastalığın ölçülmesi, diğer rutin tekniklere nazaran daha yüksek hassasiyet göstermesinden dolayı tedaviye verilen tepkiyi ölçmede altın standart olarak kabul görmektedir (28).

Kimerizm Analizi: Birçok alternatif teknik de araştırma sürecinde uygulanmıştır. Bunlar genellikle residual lösemisinin rutin değerlendirilmesi adına uygulanması zor, kesin olmayan ve geliştirilmemiş tekniklerdir. Chimera analizi bunlara bir örnektir. Bu analiz genomik DNA veya farklı bireylerden alınan hücreleri ayırt eden ve donör hücrelerin miktarını hesaplamak için allojenik kemik iliği nakli sonrası hastalarda kullanılabilir bir analizdir. Tipik olarak PCR polimorfik işaretçileri belirlemek adına kullanılır. Chimera analizi tümörlü ve normal hücreleri ayırt edemediğinden direk olarak residual lösemiye tespit etmek için kullanılamaz. Erkek hasta ve kadın donörü içeren cinsiyet farklı allojenik kök hücre transplantasyonu sonrasında kalan erkek hücrelerini tespit edebilmek adına spesifik Y kromozom sekansları kullanılabilir.

KML’ de kantitatif Y kromozom PCR’ ı ve BCR-ABL’nin kantitatif PCR’ ı arasında iyi bir korelasyon gözlemlenmiştir (41). FISH tekniği de kimerizmi (alıcı ve verici ayrı cinsiyetten ise) belirlemek için kullanılabilir.

Tablo-6: KML hastalarında rezidual lösemi saptanmasında metodlar (41).

Metod (%)	Hedef	Doku	Sensitivite
Konvansiyonel sitogenetikler	Ph1-kromozomu	Kİ	1-10
FISH	BCRve ABL füzyonları	PK/Kİ	0.2-5
Southern Blotting	M-bcr yenedüzenlenmeleri	PK/Kİ	1-10
Western Blotting	BCR-ABL protein	PK/Kİ	0.2-1
RT-PCR	BCR-ABL mRNA	PK/Kİ	0.001-0.0001

3. MATERYAL-METOD

3.1. Hasta Seçimi

Bu çalışma, erişkin ve çocukluk çağı kronik myeloid lösemi (KML) hastalarında yürütülmüş ve bcr/abl füzyon geninin tanımlanmasında Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yönteminin sitogenetik analizler ve floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemleri ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada, Temmuz 2008-Aralık 2010 tarihleri arasındaki 29 aylık sürede, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Erişkin ve Çocuk Hematoloji Bilim Dallarında izlenen ve genetik analiz için Pediatrik Genetik Tanı Laboratuvarlarına yönlendirilen, 81 hastanın verileri, retrospektif olarak değerlendirilmiştir.

3.2. Metod

Kemik İliği Sitogenetik Analizleri için laboratuvarlarımızın rutin lösemi protokolleri temelinde 2 farklı yöntem (direkt analiz ve inkübasyon yöntemi uygulanmıştır (70)). Bu analizler rutin işlemler çerçevesinde uygulandığından ve daha önceki ilişkili tezlerde yöntemin detayları bildirildiğinden burada yaklaşımlar özetle aktarılacaktır (1, 70).

1.5-2 ml heparinize, steril kemik iliği (veya periferik kan), RPMI 1640 ilave edilerek 1500 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Hücre çökeltisi üstündeki sıvı (supernatant) atıldı. Pipetaj ile karıştırılan hücreler içinde 4.5 ml üreme besiyeri (RPMI 1640, %10 fetal bovin serum, %1 L-glutamin, %1 penisilin ve streptomisin) olan 2 adet steril konik tüpe ayrı ayrı eklendi.

Direkt Metod için, birinci konik tüpe 0,05µg/ml konsantrasyonda kolsemid ilave edildi, 40 dakika 37°C etüvde bekletildi. 1300 rpm de 10 dakika santrifüj yapıldı. Supernatant atıldı, vorteksleme yapılarak tüpteki toplam sıvı miktarı 5 ml' ye tamamlanincaya dek, 0,075 M KCL eklenerek hipotonik şok uygulandı.

30 dakika etüvde bekletildi. 1300 devirde 10 dakika santrifüj edilerek supernatant atıldı. Vorteksleme işlemi ile damla damla 3:1 oranında metanol- asetik asit (Carnoy fiksatif) eklenerek hücre yıkaması ve fiksasyonu gerçekleştirildi. Sıvı 5 ml' ye tamamlanıp -20°C de en az 1 saat bekletildi. Bu süre sonunda, fiksatif ile yıkama işlemi 3 kez daha tekrarlandı ve son santrifüjden sonra, supernatant atılarak, hücre çökeltisinden lamalar üzerine yayma işlemi gerçekleştirildi (70).

İnkübasyon Metodu için daha önce tanımlandığı biçimde hücre ekimi yapılmış olan ikinci konik tüp 37 °C etüvde 18-24 saat inkübe edildi. Ertesi sabah 0,05µg/ml

kolsemid damlatılarak 65 dakika etüvde bekletildi. Direkt metoddakine benzer şekilde hipotonik şok, fiksasyon (Carnoy fiksatif), 3 kez yıkama ve yayma uygulandı. Laboratuvarımıza geç ulaşmış materyallerde, direkt çalışma yerine, hücre ekimi yapılan 2. bir inkübasyon tübü hazırlandı; bu tübe 0,02µg/ml konsantrasyonda kolsemid eklenerek 18-24 saat 37°C etüvde beklendi. Ertesi sabah, hipotonik şok ve sonrası tüm işlemler inkübasyon yöntemindeki gibi tekrarlandı.

Kromozom plaklarını içeren, GTG-bantlama ile boyanmış preparatlar, ışık mikroskobu altında incelendi ve Olympus BX51 mikroskop bağlantılı 3.9 versiyon Applied Imaging Otomatik Görüntü Analiz Sistemi ile karyotipleme yapıldı. Floresan in situ hibridizasyon (FISH) analizleri için yayılmış olan 2 lam -20°C de saklandı.

Kromozomların tanımlanmaları "International System For Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) 2005" e göre yapıldı (74). 2 ve üzeri yapısal, 3 ve üzeri sayısal kromozomal aberasyon saptanması klonal olarak kabul edildi.

3.2.1. FISH Metodu

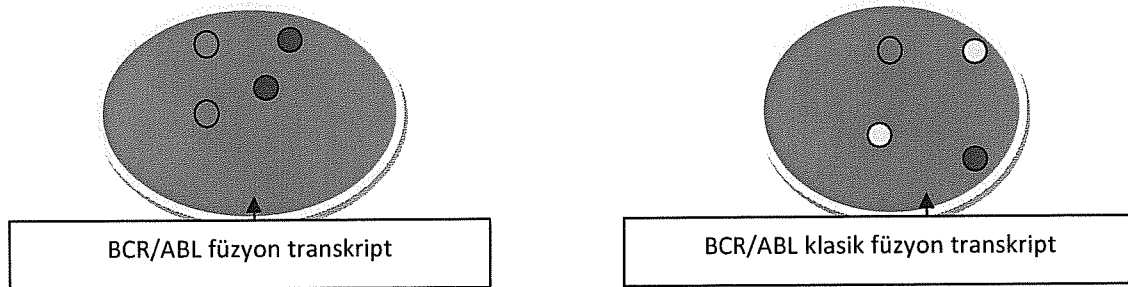
3.2.1.1 Kullanılan Prob

LSI BCR/ABL Dual Color, Dual Fusion Translokasyon Probu (Vysis Inc., Downer' s Grove, IL) uygulandı.

3.2.1.2. Probun Tanımlanması

BCR/ABL PROBU: FISH analizinde kullanılan 'LSI BCR/ABL Dual Color, Dual Fusion Translokasyon' Probu (Vysis Inc., Downer' s Grove, IL), 22 nolu kromozom için yeşil işaretli BCR probu ve 9 nolu kromozom için kırmızı işaretli ABL probu karışımıdır.

t(9;22) translokasyonu **olmayan**, normal, bir çekirdekte iki kırmızı, iki yeşil sinyal görülür. **t(9;22) varlığında** bir kırmızı ve bir yeşil sinyal, normal 9 ve 22 nolu kromozomlardan; iki sarı sinyal ise translokasyonu **olan** (derive) 9 ve derive 22 nolu kromozomlardan elde edilir (şekil 7).



Şekil-7: BCR/ABL füzyon transkripti şematik görünümü.

Ender durumlarda BCR 'nin 3' bölgesinde delesyon ve/veya ABL' nin 5' bölgesinde kırılma, ya ekstra sinyal paternine (ekstra kırmızı veya yeşil) veya tek bir füzyon paternine neden olur (atipik füzyon).

3.2.1.3. FISH (Floresan in situ hibridizasyon) Metodu

FISH analizleri için, -20°C de saklanan boyanmamış lamalar ya da yeni hazırlanan preparatlar kullanıldı.

FISH çalışmaları için tüm hastalarda, ilgili prob kitleri kullanıldı. Pre-hibridizasyon ve hibridizasyon işlemleri, ticari kitde önerilen uygulamalar modifiye edilerek gerçekleştirildi (92). Lamalar, %1 HCl ve pepsin olan benmari içinde 37°C' ye ısıtılmış solusyonda 12 dakika bekletildi. Takiben distile su ve 1×PBS ile çalkalandı; 10 dakika fiksatifte tutuldu; sonra 1×PBS ve distile su ile yine çalkalandı, alkol serilerinden (%70-80-96) geçirildikten sonra (**ön işlem**) prob karışımı karanlık oda koşullarında lamın üzerine konuldu. Lamel uygulandıktan sonra, lamel etrafı yapıştırıcı ile kapatıldı. Lamalar 75°C' ısı plağında 5 dakika bekletildi (**denaturasyon**); nemlendirilmiş, kapalı ve ışık görmeyen bir kutuya konulup 37°C deki etüvde 1 gece bekletildi (**hibridizasyon**). Lamalar, üzerindeki lamel alınarak, 72°C 0.4×SSC (Standart Salin Citrate) solusyonunda 2 dakika tutuldu; takiben 15-45 saniye 2×SSC/NP40 solusyonunda bekletildi (**hibridizasyon sonrası yıkama**). Lamın daha önceden işaretlenmiş bölgesine 10µl DAPI damlatıldı ve lamelle üzeri kapatıldı (92).

3.2.1.4. FISH Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Lamalar, FITC (floresan isotiyosiyonat), DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride hydrate), TRITC (Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate) ve "triple pass filter" aqua uyumlu filtresi olan, Olympus BX51 floresan mikroskopta x100 immersiyon objektif ile incelendi; her hastada ilgili sinyal için yaklaşık 200 interfaz nukleusu analiz edildi (92).

3.2.2. Real Time PCR (RT-PCR) Metodu

RNA izolasyonu için K3EDTA' lı toplama tüplerinde laboratuvarımıza ulaştırılan periferik kan veya kemik iliği örneklerinden, "High Pure RNA Isolation Kit" (Roche Molecular Biochemicals) kullanılarak RNA elde edilmiştir. İzole edilen RNA' dan cDNA eldesi ve LightCycler01 sistemi (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)' nde PCR amplifikasyonu için LightCycler-t(9;22) Quantification Kit (Roche Molecular Biochemicals) kullanılarak ~ 4- 4,5 saatlik, iki aşamalı standart QRT-PCR prosedürü

uygulanmıştır. RNA kalitesindeki varyasyonları azaltmak ve revers transkripsiyon reaksiyonunun etkililiğini korumak için füzyon geni ekspresyonunun seviyesi bir referans genine (G6PDH) karşı normalize edilmiştir.

3.2.2.1.RNA İzolasyonu Metodu

RNA izolasyonu için K3EDTA' lı toplama tüplerine (4.5 ml' lik) alınan periferik kan veya kemik iliği örnekleri kullanıldı. RNA izolasyonuna başlangıç için gerekli kan örneği miktarı, lökosit sayısına göre, μl ' de 5000-10.000 olan bir kan örneği için 500 μl olarak kullanıldı.

RNA izolasyonunda High Pure RNA Isolation Kit (Roche Molecular Biochemicals) kullanıldı.

3.2.2.1.1. Kit içeriği

I. **Eritrosit Lizis tamponu:** Kan/kemik iliği örneklerinin ilk olarak muamele edildiği, eritrositlerin lizise uğratıldığı, 100 ml hacimli reaktiftir.

II. **Lizis/-bağlayıcı tampon:** 4.5 M guanidine-HCl, 50 mM Tris-HCl ve %30 Triton X-100 (w/v), pH:6,6 içerir (25°C).

III. **DNase I, liyofilize:**10 KU liyofilize DNase I içerir. 0.55 ml elusyon tamponu içinde çözülerek porsiyonlara ayrılır ve -20°C' de saklanır.

IV. **DNase inkübasyon tamponu:** 1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl ve 10 mM MnCl_2 , pH: 7,0 içerir (25°C).

V. **Yıkama tamponu-1:** İlk kullanımdan önce 20 ml saf etanol eklenerek hacim 53 ml' ye tamamlanır. 5 M guanidine hidroklorit ve 20 mM Tris-HCl, pH:6,6 içerir (25°C).

VI. **Yıkama tamponu-2:** İlk kullanımdan önce 40 ml saf etanol eklenerek hacim 50 ml' ye tamamlanır. 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH:7,5 içerir (25°C).

VII. **Elusyon tamponu:** Nükleaz içermeyen, steril, bidistile sudan oluşur.

VIII. **50 adet High Pure filtre tüpü:** İki tabaka halinde inceltilmiş fiber-glas filtre içeren poliprolen tüptür. 700 μl kapasiteye sahiptir.

IX. **Toplama tüpleri:** 2ml' lik 50 adet poliprolen tüp.

Tüm kit içeriği oda ısısında 12 ay stabildir. DNase I liyofilize solusyonu ise elusyon tamponu içinde çözüldükten sonra -15 ile -25°C' ta saklanmalıdır (69).

3.2.2.1.2. RNA izolasyonu

Steril, 1.5 ml' lik kapaklı bir eppendorf tüpüne 1000 µl lizis tamponu alındı.

Üzerine beyaz küre miktarına göre, 200-500 µl kan/kemik iliği örneği konarak tüp alt-üst edilip karıştırıldı, vorteks yapılmadı.

Tüp içeriğinin, elde ya da çalkalayıcıda 10 dakika oda ısısında karışması sağlandı.

Tüpler, 5000 rcf' de 5 dakika santrifüj edildi.

Bir pipet yardımıyla kırmızı renkli supernatant kısmı dikkatlice uzaklaştırıldı.

Tekrar 1000 µl lizis tamponu eklendi. Oda ısısında 5 dakika süresince beyaz pellet kısmının tampon içinde çözünmesi sağlandı, vorteks yapılmadı.

Santrifüjde 5 dakika, 5000 rcf' de santrifüjlendi.

Supernatant kısmı pipet yardımıyla dikkatlice uzaklaştırıldı. Beyaz pellet etrafında kırmızı renkli debrilerin kalmamasına özen gösterildi.

Beyaz pelletin 200 µl 1xPBS içinde çözünmesi sağlandı.

Karışımın üzerine 400 µl lizis/-bağlayıcı tampon eklendi ve 15 saniye vortekslendi.

Toplama tüpünün üzerine High Pure filtre tüpü yerleştirildi. Hazırlanan karışım filtreli tüpe alındı.

Standart masa üstü bir santrifüjde 1 dakika, 8000 rcf' de santrifüj edildi.

RNA filtrede tutulmuş ve sıvı kısım alttaki toplama tüpüne geçerek ayrılmış oldu.

Steril bir tüpe 90 µl DNase inkübasyon tamponu kondu. Üzerine 10 µl DNase I eklendi. Bu karışım filtreli tüpe alındı. 15 dakika oda ısısında inkübe edildi.

Daha sonra 500 µl yıkama tamponu-1 filtreli tüpe kondu. 8000 rcf' de 1 dakika santrifüj edildi. Altta toplanan sıvı uzaklaştırıldı.

Bu kez 500 µl yıkama tamponu-2 filtreli tüpe eklendi, bir önceki basamaktaki gibi santrifüjlendi.

Tekrar 200 µl yıkama tamponu-2 filtreli tüpe eklendi ve 2 dakika maksimum hızda (13 000 rcf) santrifüj edildi. Alttaki toplama tüpü ile birlikte toplanan sıvı da uzaklaştırıldı.

Filtreli tüp, yeni, steril 1.5 ml' lik bir tüp içine yerleştirildi.

RNA' nın elusyonu için filtreli tüpe 50-100 µl elusyon tamponu kondu. Oda ısısında 1 dakika bekletildi. Sonra 1 dakika 8000 rcf' de 20 sn santrifüj yapıldı.

RNA alttaki steril tüpte toplanmış oldu. İzole edilen bu RNA hemen porsiyonlanarak -80°C' deki derin dondurucuya alınarak çalışma gününe kadar saklandı (69).

3.2.2.2. cDNA Sentezi ve PCR Amplifikasyonu

İzole edilen RNA' dan cDNA eldesi ve LightCycler cihazında PCR amplifikasyonu için LightCycler-t(9;22) Quantification Kit (Roche Molecular Biochemicals) kullanıldı. Kiti oluşturan reaktiflerin hacmi ve kimyasal bileşimleri (Tablo 7) de açıklandı. Kiti reaktifler, kullanılacağı zamana kadar -20°C' de, kullanım aşamasında ise soğutucu blokta ya da buzda saklandı. Vialler, tüm çalışma boyunca ışıktan korundu. Tıpkı mRNA izolasyonunda olduğu gibi cDNA sentezi ve PCR amplifikasyonu hazırlık aşamasında da kontaminasyonu önlemek için temiz çalışma alanı ve RNase-DNase içermeyen steril malzeme (pipet ucu, eppendorf tüpü vb.) kullanıldı (68).

Tablo-7: Lghtcyclcr-t(9;22) Quantification Kit. Viallerin hacmi ve kimyasal bileşimleri (68).

Via no	Reaktifin adı	İçerik/ Fonksiyon
1	RT-Buffer, 5x	1x290 µl, Kullanıma hazır, reaksiyon tamponu.
2	Random primer p(dN) ₆	1x18 µl, Kullanıma hazır, primer solusyonu.
3	Deoxynucleotide Mix	1x32µl, Kullanıma hazır, deoksinükleotit solusyonu.
4	AMVrevers Transcriptase	1x32µl, Kullanıma hazır, revers Transkriptaz solusyonu.
5	RNase Inhibitor	1x47µl, Kullanıma hazır, RNase inhibitör solusyonu.
6	Reaction Mix,10x	1x220 µl, t(9;22) ve G6PDH cDNA' sı için hazır PCR mix solusyonu.
7	t(9;22) Detection Mix	1x300 µl, BCR-ABL füzyon transkriptleri için kullanıma hazır primer ve hibridizasyon probu karışımı.
8	G6PDH Detection Mix	1x245 µl, İnsan Glukoz-6-Fosfat Dehidrojenaz transkriptlerine spesifik hibridizasyon probu ve primer karışımı.
9a-c	G6PDH RNA Standarts I-III	1x80 µl her bir tüp, Kullanıma hazır, stabilize edilmiş, in vitro G6PDH transkriptleri. her birinin içeriği; Standart I, 1 µl' de 200 fg in vitro transkript içerir. Standart II, 1 µl' de 10 fg in vitro transkript içerir. Standart III, 1 µl' de 0,2 fg in vitro transkript içerir.
10	t(9;22) Positive Control	1x60 µl, Kullanıma hazır, lösemik K562 hücresinden izole edilmiş mRNA solusyonu (pozitif b3a2 füzyon transkriptleri).
11	H ₂ O, sterile, PCR-grade	2x1.1 ml, Reaksiyon karışımlarını dilue ederken ve negaif kontrol olarak kullanılan nükleaz içermeyen distile su.

3.2.2.2.1. cDNA Sentezi

cDNA sentez aşamasına geçmeden önce kaç reaksiyonluk bir çalışma yapılacağı hesaplandı. Örneğin elimizde n adet hasta örneği bulunuyorsa toplam reaksiyon sayısı:

2x3 adet G6PDH standartları (StandartI, StandartII, StandartIII)

2 adet kontrol (Pozitif kontrol, Negatif Kontrol)

n adet hasta örneği

+1 pipetleme payı

Toplam olarak: $6+2+n+1=n+9$ reaksiyondur. $n+9$ testlik cDNA mix hazırlamak gerekir.

Hasta örnekleri ve diğer reaksiyonlar için gerekli olan 0,2 ml' lik PCR tüpleri hazırlandı. Çalışma esnasında, reaktifleri ve RNA örneklerini stabil tutabilmek için soğutucu blok veya bir miktar buz hazır bulunduruldu. Hazırlanan RNA tüplerine 10' ar μ l RNA örnekleri kondu (StandartI, II, III, Pozitif kontrol ve Negatif kontrol de dahil olmak üzere).

Hasta örnekleri için 500 ng mRNA veya 1μ g total RNA' nın üzerindeki bir miktar tek bir cDNA sentezi için yeterlidir. RNA örnekleri 10 dakika 65°C ' de denatüre edildi. Denatürasyon sırasında cDNA mix hazırlandı (Tablo 8) RNA örnekleri ve vialler kapakları açılmadan önce kısa bir santrifüjleme işlemi yapıldı. Vialler ve denatüre olmuş RNA' lar soğutucu blok üzerine alındı. Her bir RNA örneğinin üzerine (standartlar ve kontroller de dahil) 10 μ l cDNA mix eklendi. Pipet ucu ile her bir tüpteki karışıma 3-4 defa pipetaj yapıldı, vortekslenmedi. Bir thermocycler' da cDNA reaksiyonuna geçildi. Bunun için örnekler; 60 dakika 37°C ' de, daha sonra revers transkriptazın denatürasyonu için 10 dakika 65°C ' de ve son olarak ise $+4^{\circ}\text{C}$ ' de beklemeye alındı.

Tablo-8: cDNA master mix'i oluşturan reaktifler ve örnek hazırlama tablosu (68).

Bileşen	Tek reaksiyon başına düşen hacim	n+9 reaksiyon için gerekli hacim
Vial 1 H ₂ O, PCR grade	4,4 µl	(n+9) x 4,4 µl
Vial 1 RT-Buffer	4 µl	(n+9) x 4 µl
Vial 2 Random primer p(dN) ₆	0.2 µl	(n+9) x 0.2 µl
Vial 3 Deoxynucleotide Mix	0.4 µl	(n+9) x 0.4 µl
Vial 4 AMV revers Transcriptase	0.4 µl	(n+9) x 0.4 µl
Vial 5 RNase Inhibitor	0.6 µl	(n+9) x 0.6 µl
Toplam hacim	10 µl	(n+9) x 10 µl

Bu şekilde cDNA sentezi tamamlanmış oldu. Örnekler reaksiyon bitiminde thermocyclerda ya da buzdolabında +4°C' de, PCR amplifikasyonu aşamasına kadar saklandı. Bu testte G6PDH geni, yapılan test için bir iç kontrol görevi görmesi yanı sıra oluşan BCR-ABL transkriptlerinin kantitatif olarak hesaplanmasında bir değişken olarak kullanıldı.

3.2.2.2.2. PCR Amplifikasyonu

Amplifikasyon işlemi LightCycler sisteminde, özel kapiller cam tüpler içinde gerçekleştirildi. Tıpkı cDNA sentezinde olduğu gibi amplifikasyon için de bir master mix hazırlandı. Bu reaksiyonda test edilecek transkriptler iki ayrı gene ait oldukları için (BCR-ABL ve G6PDH) hazırlanacak master mixlerde iki ayrı tiptedir. Buna göre G6PDH mastermix'i (Tablo 9)

Standartlar dublike olarak(I, II, III) toplam 6 reaksiyon,

Negatif ve Pozitif kontroller 2 reaksiyon

Hasta örnekleri n reaksiyon

Toplam:6+2+n+1(pipetleme payı): n+9 testlik olmak üzere hesaplandı.

Tablo-9: G6PDH master mix' inin hazırlanışı.

İçerik	Reaksiyon hacmi/tüp	n+9 reaksiyonluk hacim
Vial 8 G6PDH Detection Mix	3.8 µl	(n+9) x 3.8 µl
Vial 11 H ₂ O,PCR grade	9.2 µl	(n+9) x 9.2 µl
Vial 6 Reaction Mix,10x	2 µl	(n+9) x 2 µl
Toplam hacim	15 µl	(n+9) x 15 µl

BCR-ABL master mix'i(Tablo 10)ise;

Negatif ve Pozitif kontroller 2 reaksiyon,

Hasta örnekleri n reaksiyon,

+1 pipetleme payı

Toplam: 2+n+1= 3+n testlik olmak üzere hesaplandı.

Tablo-10: BCR-ABL master mix' inin hazırlanışı.

İçerik	Reaksiyon hacmi/tüp	n+3reaksiyonluk hacim
Vial 7 t(9;22) Detection Mix	6.2 µl	(n+3) x 6.2 µl
Vial 11H ₂ O,PCR grade	6.8 µl	(n+3) x 6.8 µl
Vial 6 Reaction Mix,10x	2 µl	(n+3) x 2 µl
Toplam hacim	15 µl	(n+3) x 15 µl

BCR-ABL master mix ve G6PDH master mix hazırlandıktan sonra amplifikasyon basamakları aşağıdaki protokole uygun yapıldı.

Her bir reaksiyon için LightCycler kapiller tüpleri hazırlandı ve bu tüpler özel soğutucu blok üzerine yerleştirildi.

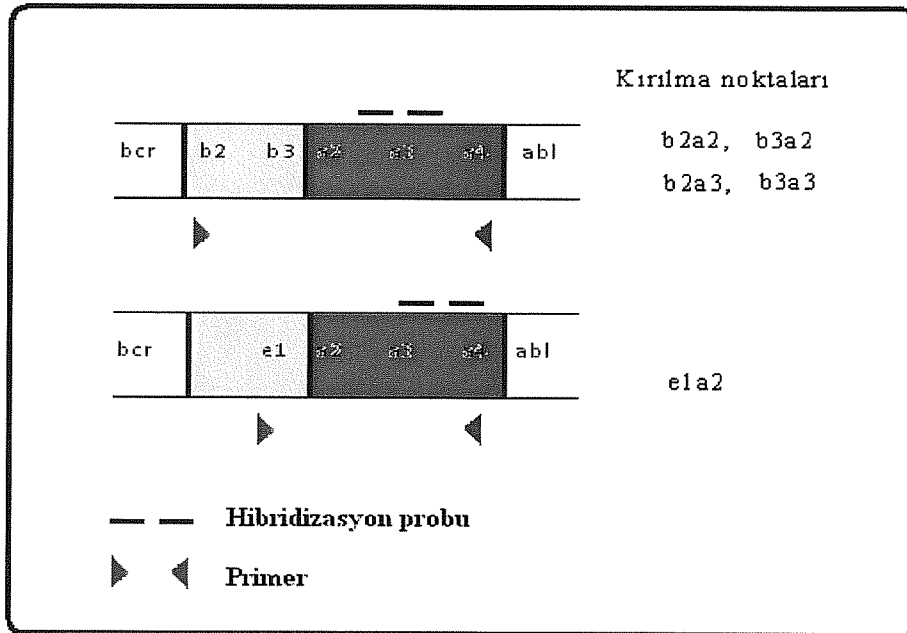
Hazırlanan master mix' ler pipet yardımıyla nazikçe karıştırıldı, vorteks yapılmadı.
Her bir kapiller tüpe 15 µl master mix dağıtıldı.
Üzerine 5 µl cDNA eklendi.
Kapiller tüplerin ağız kısmı özel kapakları ile kapatıldı.
Mikrosantrifüjde 500-1000 rpm' de 5 saniye santrifüj yapıldı.
Daha önceden BCR-ABL programı seçilmiş olan LightCycler sisteminin rotor bölümüne hazırlanan bu kapiller tüpler yerleştirildi.

Amplifikasyon işlemi Tablo 11' deki programa göre gerçekleştirildi.

Tablo-11: LightCycler BCR-ABL amplifikasyon programı (68)

Program/siklus	40°C	64°C	72°C	95°C	Programın işlevi
Program1(1siklus)				30 sn	Denaturasyon
Program2(45siklus)		10 sn 2.segment	26 sn 3.segment	1 sn 1.segment	Amplifikasyon
Program3 (1siklus)	60 sn				Soğutma

Şekil-8: Kullanılan primerlerin ve hibridizasyon problemlerinin dizilimi ve yerleşimi (68)



3.2.2.3. R-T PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

LightCycler sistemi ile yapılan QRT- PCR testinde izole edilen RNA örnekleri cDNA sentez aşamasına kadar -80°C ' de saklanmış ve cDNA sentezini takiben amplifikasyon aşamasına geçilerek QRT-PCR testi sonuçlandırılmıştır. QRT-PCR sonuçları, BCR-ABL sinyal miktarının kontrol geni G6PDH (BCR-ABL/ G6PDH)' ine bölünmesi ile elde edilmiştir.

3.3. Etik Onay

Çalışmaya başlamadan önce Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan onay alındı.

3.4. İstatistiksel Analiz

Veriler SPSS (Statistical Package for Social Science Studies) For Windows 15.0 İstatistik Paket programı ile bilgisayar ortamına aktarıldı. Sitogenetik ve FISH sonuçları, BCR-ABL pozitif metafaz/hücrelerin sayılan tüm metafaz/hücrelere olan oranı olarak, QRT-PCR sonuçları da BCR-ABL' nin G6PDH'ye oranı olarak belirtildi. Veriler ortalama \pm SD (standart sapma alt değer-üst değer), ortanca (min-maks.) ve yüzde olarak sunuldu. Farklılıkların istatistiksel analizinde t testi, paired sample testi, Wilcoxon testi, sürekli değişkenlerin istatistiksel analizinde Mann-Whitney U testi ve kategorik değişkenlerin analizinde Ki Kare test kullanıldı. Korelasyon analizinde Spearman' s korelasyon testi kullanıldı. Verilerin analizinde SPSS 15.0 yazılımı kullanıldı ve $p < 0,05$ olması anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Erişkin ve Çocuk Hematoloji Bilim Dallarında izlenen yeni tanı almış/tedavisi yapılmış/tedavisi devam etmekte/remisyonda olan 77'si erişkin ve 4'ü çocuk toplam 81 Philadelphia pozitif KML hastası çalışmaya dahil edildi. Bölümümüze ilk refere edilişteki klinik özelliklerine göre, yeni tanı almış 39, tedavisi yapılmış/tedavisi devam etmekte olan 42 hasta mevcuttu, toplam 81 hastadan 41'i kronik fazda, 30'u remisyonda, diğerleri ise sırasıyla akselere, blastik ve dirençli evrede idi (Tablo 12).

Tablo-12: KML, evrelere göre hasta sayıları

	Hasta Sayısı
Kronik Faz	41
Remisyon	30
Akselere	2
Blastik	3
Dirençli	5
Toplam	81

81 olgunun tanı sırasındaki yaş ortalaması 47.47 ± 17.17 , yaş sınırları 1.5-84.0 arasında idi. Erişkin hastalardan 38'i kadın, 39'u erkekti. 3'ü kız ve 1'i erkek olan toplam 4 çocuk hastanın yaşları ise sırası ile 1.5, 12, 14 ve 17 idi

8 hasta dışında tüm hastalar tirozin kinaz inhibitörleri ile tedavi görmekte/görmüş idi. 2 hastaya, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Çocuk Hastanesi Çocuk Hematoloji Bilim Dalında allo-HKHN uygulanmış, 5 hasta düzensiz tedavi almıştı. 3 hasta ise takip süresince "excitus" olmuştu.

Her hastanın birden fazla başvurusu olduğundan, hastalığın farklı fazlarında toplam 198 materyal girişi oldu. Kronik evrede 45, remisyonda 131, relapsda 2, hızlanmış evrede 3, blastik evrede 8, dirençli durumda 9 materyal (kemik iliği/periferik kan) çalışmaya alındı (Tablo 13).

Tablo-13 KML evrelere göre materyal giriş sayıları

	Hasta Sayısı
Kronik Faz	45
Remisyon	131
Relaps	2
Akselere	3
Blastik	8
Dirençli	9
Toplam	198

198 materyal girişinin 161 inde Philadelphia kromozomunun ya da bcr/abl transkriptin belirlenmesi açısından, sitogenetik, FISH ve qRT-PCR çalışmalarının her 3 ü de eş zamanlı olarak uygulanmıştı; sadece qRT-PCR uygulanan test sayısı 35 idi. FISH+PCR uygulanan test sayısı ise 163 idi.

Analizler tek tek değerlendirildiğinde, 161 sitogenetik, 163 FISH ve 198 qRT-PCR analizlerinde sonuç alma oranı sırası ile 150 (%93.1), 163 (%100), 194 (%97,9) idi (Tablo 14).

Tablo-14 KML evrelere göre materyal giriş sayıları ve sonuç alma oranları

	Test Sayısı	Okuma %
Sitogenetik	161	93.1
FISH	163	100
qRT-PCR	194	97.9

Yöntemlere göre Ph1/bcr-abl pozitifliği saptanan analiz oranları ise sırasıyla 71/161 (%47,3), 76/163 (%46.6), 132/194 (%68.0) saptanmıştır (Tablo 15). Tüm materyaller “evreden bağımsız” olarak değerlendirildiğinde, Ph1/bcr-abl pozitifliği saptama oranı qRT-PCR da sitogenetik ve FISH e göre anlamlı oranda yüksek bulunmuştur (Tablo 15).

Tablo-15: Ph1/bcr-abl için Klasik Sitogenetik, FISH ve RT-PCR pozitiflik oranları

	Klasik Sitogenetik	FISH	RT-PCR	p değeri
Analiz Edilen	161	163	198	
Sonuç Alınan	150 (%93.1)	163 (%100)	194 (%97.9)	¹⁻³ , p:0.68 ²⁻³ , p:0.89 ¹⁻² , p:0.57
Ph1/bcr-abl Pozitiflik	71 (%47.3)	76 (%46.6)	132(%68.0)*	¹⁻² , p:0.80 ²⁻³ , p:0.010 ¹⁻³ , p:0.004

(*)Okuma değeri 0.0001 den büyük olan olgu sayısı

4.1. Konvansiyonel sitogenetik bulgular

Hastaların sitogenetik analizleri “International System For Human Cytogenetic Nomenclature” (ISCN) 2005 protokollerine uygun olarak yapılmıştır (74). Konvansiyonel yaklaşımlar temelinde direkt analizler ve 24 saat inkübasyon hücre kültürlerinin sitogenetik incelemeleri yapılmış, veriler tüm örnekler taranarak elde edilmiştir.

Sitogenetik analizler, 161 materyalinn 150 'sinde (%93,1) başarılı bir şekilde tamamlanmıştır. Her test için yaklaşık 20 metafaz analiz edilmiştir. 10 metafazın altındaki kromozomal sayı, özgün bir patolojiyi yansıtmıyorsa analiz optimal altı olarak değerlendirilmiştir. Analizler sonucunda ph pozitiflik oranı her evre için ayrı ayrı hesaplanmış ve pozitiflik sonucu aritmetik ortalama (% değeri) ile ifade edilmiştir (Tablo 16).

Tablo-16: KML materyallerinde evreye göre “sitogenetik” değerlendirme sonuçları

KML evreleri	Analiz Edilen	Sonuç Alınan	Sitogenetik Ph1+ (%)	Ph1 pozitif AR Ortalama
Kronik Evre	45	40 (%88.9)	40 (%100.0)	0.9433± 0,14424
Klinik Remisyon	96	91 (%94.8)	15 (% 16.5)	0,0330±0,11343
Relaps	2	2 (%100)	2 (%100.0)	0,5900±0,12728
Hızlanmış Evre	3	3 (%100)	3 (%100.0)	1,0000±0,00000
Blastik Evre	8	7 (%87.5)	7 (%100.0)	0,5714 ± 0,53452
Dirençli	7	7 (% 100)	7 (%100.0)	0,9500±0,3229

^(AR) Aritmetik

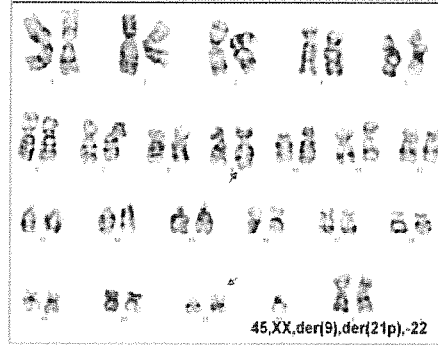
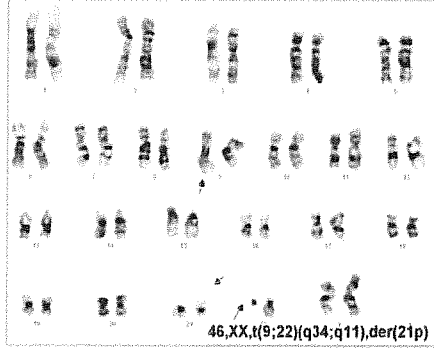
Kronik evredeki olup sitogenetik sonuç alınan hastaların tümünde Ph1 pozitif saptandı; pozitiflik oranı %94.3 idi. Klinik remisyon olarak bildirilen ve sonuçlanan 91 Olgudan 15 inde (%16.5) sitogenetikde Ph1 pozitifliği saptanmıştı. Relaps ve blastik evre olarak bildirilen olgularda Ph1 pozitiflik ortalaması sırası ile %59.0 ve %57.0 idi. Hızlanmış evre ve dirençli evrede ise bu oranlar sırası ile %100.0 ve %95.0 idi (Tablo16).

Çalışmamızda sitogenetik analiz uygulanan toplam 161 olgudan 60’ında ek bir kromozomal anomali olmaksızın sadece Ph1 kromozomu saptandı. 22’inde ise ek sayısal ve yapısal kromozom anomaliler gözlemlendi. 6’ında Trizomi 8, 2’inde derive 1p ve -Y birlikteliği, 8’inde del 6q, 1’inde kompleks kromozomal yapılanma, 1’inde derive 9, 2’inde derive 21p, 1’inde derive 22, 1’inde kromozom 22 kaybı ve 1’inde -Y gözlemlendi (Tablo 17).

Tablo-17 Sitogenetik Analizde Ph1 ve ek anomaliler

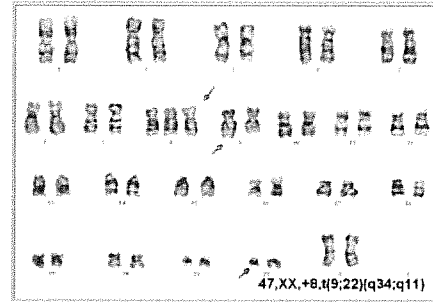
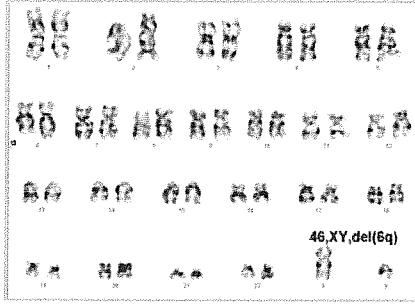
	Sayı
SADECE PH1 KROMOZOMU	60
Ph1 + EK ANOMALİLER	
Trisomi 8	6
Derive 1p, -Y	2
Del 6q	8
Kompleks Anomali	1
Derive 9	1
Derive 22	2
-22	1
-Y	1
Toplam (Ek Anomali)	22

Klasik sitogenetik analizler sonucu olgularımızda sayısal ve/veya yapısal kromozom anomalisi saptanan karyotip örnekleri (46,XX,t(9;22)(q34;q11),der(21p), 46,XX,der(21p),-22, 46,XY,del(6q), 47,XX,+8,t(9;22)(q34;q11), 47,XX,+8,t(9;22)(q34;q11), Ph1 pozitifliği ve kompleks kromozomal anomali birlikteliği) Şekil 9-13' de görülmektedir.



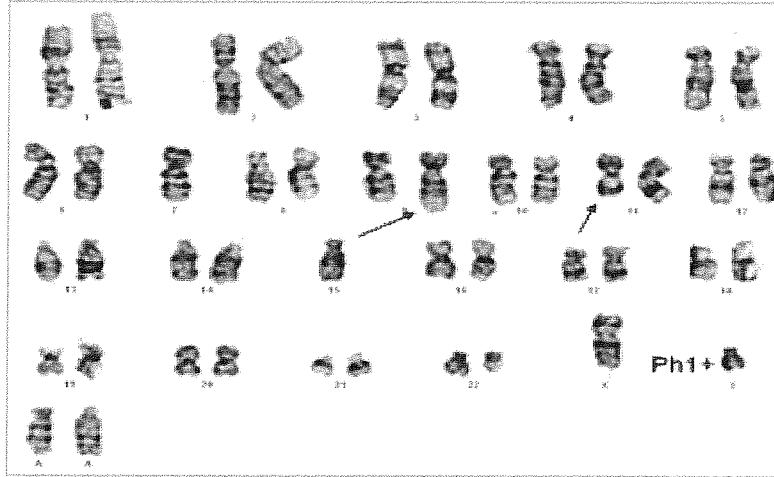
Şekil-9: 46,XX,t(9;22)(q34;q11),der(21p)

Şekil-10: 45,XX,der(9),der(21p),-22



Şekil-11: 46,XY,del(6q)

Şekil-12: 47,XX,+8,t(9;22)(q34;q11)



Şekil-13: Ph1 pozitifliği ve kompleks kromozomal anomaliler

“Yeni Tanı” evresindeki toplam 39 olgunun 37’ sinde Ph1 kromozomu saptanmış, 2’ sinde ise hücre gözlenemediğinden FISH analizi de gerçekleştirilememiştir. Ancak bu 2 olguda eş zamanlı periferik kan örneğinden qRT-PCR ile bcr/abl transkript saptanmıştır.

“Kronik Faz” döneminde analiz edilen 45 hasta nın, 35’ i yeni tanılı, 5’ i tedavi altında, 4 ‘ü düzensiz tedavi almakta iken bölümümüze refere edilmişlerdi. Kronik faz dönemindeki 45 hastadan sonuç alınamayan 5’ i hariç 40 ında Ph1 kromozomu

belirlenmişti. 5 hastada metafaz gözlenmedi; hücre gözlenemeyen 1' i hariç, diğerlerinde FISH ve PCR ile Ph1 kromozomu/bcr-abl transkript saptandı.

Sitogenetik ve FISH analizlerinde Ph1 pozitifliği %89 - %100 aralığında olan kronik faz dönemindeki 4 hastada ek anomali saptandı. Ek anomali saptananların 1' i hariç 3' ünün PCR çalışmasından sonuç alındı. 1' inin PCR çalışması ise başarısızdı.

4.2. Moleküler sitogenetik bulgular

Bcr-abl tespiti için “Dual Color, Dual Fusion Translokasyon” DNA probu (Vysis Inc., Downer' s Grove, IL) kullanılmıştır. Her test için yaklaşık 200 interfaz ve/veya metafaz hücreleri analiz edilmiştir. %3 \geq BCR-ABL pozitif hücre yüzdesi background sinyali olarak tanımlanmıştır.

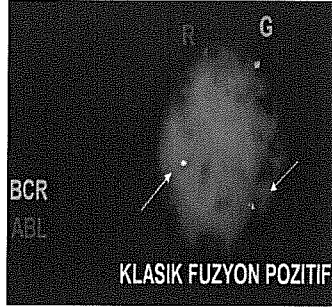
Moleküler sitogenetik analizler, 163 numunenin tümünde (%100) başarılı bir şekilde tamamlanmıştır. FISH sonuçları, BCR-ABL pozitif hücrelerin sayılan tüm hücrelere olan oranı olarak belirtilmiştir. Analizler sonucunda bcr-abl pozitiflik oranı her test için ayrı ayrı hesaplanmış ve bu sonuç % değeri ile ifade edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar ile istatistik analizler gerçekleştirilmiş; tüm evreler için ayrı ayrı, her bir evreye ait toplam bcr-abl pozitiflik % değerlerinin ortalamaları hesaplanmış ve çıkan bu sonuç o evre için ortalama bcr-abl pozitif % değeri olarak ifade edilmiştir (Tablo 18).

Tablo-18: Bcr/Abl füzyon FISH pozitifliği ve klinik evreler

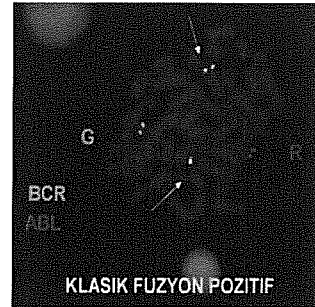
KML EVRE	Analiz Edilen	Sonuç Alınan	Bcr/Abl FISH + (%)	Ph1 pozitif AR Ortalama
Kronik Evre	44	44 (%100)	44 (%100)	0,9346 \pm 0,15008
Klinik Remisyon	97	97(% 100)	13 (%13.4)	0,0198 \pm 0,09069
Relaps	2	2 (%100)	2 (%100.0)	0,7500 \pm 0,35355
Hızlanmış Evre	3	3 (%100)	3 (%100)	1,0000 \pm 0,00000
Blastik Evre	8	8(%100)	6 (% 75.0)	0,6450 \pm 0,44731
Dirençli	7	7 (% 100)	7 (%100.0)	0,8871 \pm 0,15239

^(AR) Aritmetik

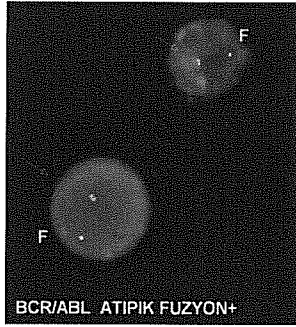
FISH analizinde ph1 pozitifliği saptanan 76 testin 63 ünde klasik füzyon, 13' ünde ise atipik füzyon saptandı. Bunlardan 7 tanesinde tek başına atipik füzyon sinyali belirlenirken diğer 6 tanesinde ise atipik ve klasik füzyon birlikteliği tespit ettik (Şekil 14-18).



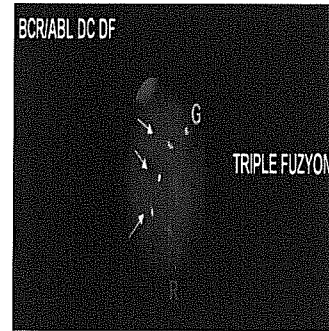
Şekil-14: FISH, Klasik Füzyon



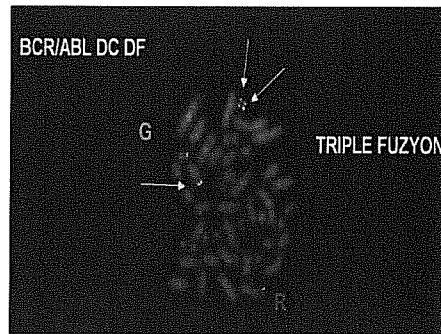
Şekil-15: FISH, Klasik Füzyon



Şekil-16: FISH, Atipik Füzyon



Şekil-17: FISH, Atipik Füzyon



Şekil-18: FISH, atipik Füzyon

Sitogenetik ve FISH analizleri karşılaştırıldığında, her 2 yaklaşımın da Ph1 kromozomu ya da bcr/abl i tanımında aynı etkinlikte olduğu görüldü (Tablo 19).

Tablo-19: Ph kromozomu ya da bcr/abl tanımında Sitogenetik ve FISH karşılaştırma

	SİTO-GENETİK ¹			FISH ²			p Değeri
	Analiz Edilen Olgu Sayısı	Sonuç Alınan Analiz Sayısı	Klasik Sitogenetik (%)	Analiz Edilen	Sonuç Alınan	FISH (%)	
Kronik Evre	45	40(%88.9)	40% 94.3*	44	44(%100)	44%93*	¹⁻² , p:0.91
Klinik Remisyon	96	91(%94.8)	15%3.3*	97	97(%100)	13%1.98*	¹⁻² , p:0.72
Relaps	2	2 (%100)	2% 59*	2	2 (%100)	2%75*	¹⁻² , p:0.62
Hızlanmış Evre	3	3 (%100)	3% 100*	3	3 (%100)	3%100*	¹⁻² , p:0.68
Blastik Evre	8	7 (%87.5)	7%57*	8	8(%100)	6%64*	¹⁻² , p:0.81
Dirençli	7	7 (% 100)	7% 95*	7	7(% 100)	7%88*	¹⁻² , p:0.79

4.3. Moleküler genetik bulgular

LightCycler sistemi ile yapılan qRT- PCR testinde izole edilen RNA örnekleri cDNA sentez aşamasına kadar -80 °C' de saklanmış ve cDNA sentezini takiben amplifikasyon aşamasına geçilerek qRT-PCR testi sonuçlandırılmıştır. Bu sistemde, “thermocycler” ile oluşan PCR ürünü floresan işaretli iki hibridizasyon probu ile işaretlenir. Daha sonra floresan monitöründe biri alıcı, diğeri de verici olan bu iki hibridizasyon probu arasındaki “Floresan Rezonansı Enerji Transferi (FRET)”, analiz edilerek BCR-ABL transkriptleri tespit edilmiş olur. 3' hibridizasyon probunu fluorescein ile, 5' hibridizasyon probunu ise Red640-N-hydroxy-succinimide esterle işaretlenmiştir. 5' ucundan LC Red640 ile işaretlenen prob, 3' ucundan ekstansiyon olmaması için fosforilasyon ile modifiye edilmiştir. Her bir annealing basamağında

sonra oluşan floresans ölçülerek 640 nm (F2) ve 530 nm (F1) ler arasındaki floresan oranı belirlenir. Başlangıçta ne kadar çok molekül varsa o kadar erken bir dönemde floresan değerleri logaritmik bir hızla bazal değerlerin üzerine çıkar.

Pozitif bir kontrol olarak her testte lösemik K562 hücrelerinden izole edilmiş, 10 µl de 5 ng mRNA (pozitif b3a2 füzyon transkriptleri)' sı kullanılmıştır. Negativite, LightCycler kuantifikasyonu arka planında pozitif bir floresans sinyalinin görülmemesi şeklinde, pozitivite ise spesifik bir floresans sinyalinin tespit edilmesi olarak tanımlanmıştır. Analizlerin standartları ve kalite kontrolü Roche tarafından önerildiği şekliyle uygulanmıştır. Ayrıca analizin hassasiyeti ve özgünlüğü MPH ön tanısı ile laboratuvarımıza refere edilen Ph1 pozitif KML olmayan (klinik ve hematolojik veriler, sitogenetik ve moleküler sitogenetik analizler sonucunda değerlendirilmiş) hastaların test edilmesi ile belirlenmiştir. Test edilen 50 MPH ön tanılı hastanın qRT-PCR sonuçları negatiftir. QRT-PCR sonuçları BCR-ABL' nin G6PDH'ye oranı olarak belirtilmiştir.

Moleküler genetik analizler, 198 numunenin 194 'ünde (%97,97) başarılı bir şekilde tamamlanmış, 4 hastada ise PCR çalışmalarından sonuç alınamamıştır. Analizler sonucunda bcr-abl pozitiflik oranı (bcr-abl' nin G6PDH' ye oranı) her test için ayrı ayrı hesaplanmış ve bu sonuç QRT-PCR oranı olarak ifade edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar ile istatistik analizler gerçekleştirilmiş ve tüm evreler için ayrı ayrı, her bir evreye ait hastaların sonuçları toplamının ortalamaları hesaplanmış ve çıkan bu sonuç o evre için ortalama bcr-abl pozitif değeri olarak QRT-PCR oranı ile belirtilmiştir.

Çalışmamızda klinik remisyona ait qRT-PCR oran sonuçları 0,000000-0,006890 sınırları arasında bulunmuştu.

Remisyon dışı tüm evrelerde 0.0225-0.1074 sınırları içinde pozitiflik mevcuttu, remisyon evresinde bcr/abl oranı ortalaması ise $0,00054371 \pm 0,001149194$ idi (3 log ve altında). Kronik evrede bcr-abl oranı 0,001900-0,213200 aralığında, relaps durumunda 0,012600-0,047100, akselere evrede 0,012100-0,050600, blastik evre de 0,000001-0,805000, dirençli dönem de ise 0,001320-0,055600 aralığında idi. Tablo 20 de bcr-abl qRT-PCR sonuçları klinik evre ile ilişkilendirilerek özetlenmiştir.

Tablo-20: Bcr/Abl tanımında qRT-PCR ve Klinik Evre İlişkisi

KML evreleri	Analiz Edilen Olgu Sayısı	Sonuç Alınan Analiz Sayısı	QRT-PCR(BCR-ABL/G6PDH)
Kronik Evre	45	41 (%91.1)	410,04250000±0,04313161*
Klinik Remisyon	131	131 (% 100)	1310,00054371±0,001149194*
Relaps	2	2 (%100)	20,02985000±0,02439518*
Hızlanmış Evre	3	3 (%100)	30,03670000±0,02136422*
Blastik Evre	8	8(%100)	60,10740650±0,28201693*
Dirençli	9	9 (% 100)	90,02252444±0,01671231*

Klinik remisyon dönemi ve diğer fazlar için sitogenetik, FISH, ve PCR analiz sonuçlarının ortalama değerleri Tablo 21 da gösterilmiştir.

Tablo-21: Remisyon ve Remisyon Dışı Evrelerde Sitogenetik, FISH ve qRT-PCR sonuçları

KML Evreler	Klasik Sitogenetik (%)	FISH (%)	QRT-PCR (BCR-ABL /G6PDH)
Klinik Remisyon	%3.3	% 1.98	0,00054371±0,001149194
Diğer Evreler	% 89	% 89	0, 0541±0,06327905

Kronik Faz döneminde 45 hasta analiz edilmişti, 35 hasta yeni tanı, 5' i tedavi altında, 4' ü düzensiz tedavi almakta iken bölümümüze refere edilmişlerdi.

Kronik Faz döneminde KI den metafaz elde edilemeyen 5 hastanın tümünde PCR ile sonuç alındı. Sitogenetik ve FISH analizlerinde Ph1 + liği %89 -100 aralığında olan

4 hastada ek anomali saptandı. Ek anomali saptananların 1, i hariç 3 ünün PCR çalışmasından sonuç alındı. 1' inin analizi ise başarısızdı. Kronik faz KML hastalarında sitogenetik sonuçların ortalaması % 29- %100 arasında, FISH analiz sonuçları %43- %100 ve QRT-PCR oranı ise 0,0019- 0,213 aralığındaydı.

Sitogenetik ve FISH negatif olan toplam 75 remisyon dönemindeki testin 28 inde PCR da da hiç okuma saptanmadı (negatif). 12 testde bcr/abl oranı 4 ya da 5 log değerinin altında idi (0,000006- 000097 arasında), 35 hastada ise sitogenetik ve FISH sonucu negatif iken hastaların QRT-PCR oranlarının aralığı 0,000113-0,00219 idi, bu 35 hastanın PCR oranı için aritmetik ortalaması 0,000459±0,000411 idi.

qRT-PCR çalışması gerçekleştirilmiş 110 (%96,5)'u remisyon döneminde, 4 ü (% 3.5) blastik dönemde olan 114 vakanın PCR sonucu ortalaması hesaplanmış olup 0,000165±0,0002252 bulunmuştur (0-0.0009 aralığında). Aynı aralıkta sitogenetikte 80, FISH' te ise 84 analiz gerçekleştirilmiş ve sonuçların ortalaması sırasıyla %1.57 ve %1.74 bulunmuştur qRT-PCR oranı 0-0.0009 aralığında olan hastaların evreleri ve evrelerine göre ilişkilendirilmiş sitogenetik, FISH, ve PCR analiz sonuçlarının ortalama değerleri Tablo 22 da gösterilmiştir.

Tablo-22: qRT-PCR oranı 0-0.0009 aralığında evre, sitogenetik, FISH, ve PCR analiz sonuçları

KML Evreler	Klasik Sitogenetik (%)	FISH (%)	QRT-PCR (BCR-ABL/G6PDH)
Klinik Remisyon	%1.57	% 1.74	0,000165 ±0,0002252
Blastik Evre	% 34.5	% 25	0,0043800±0,00043071

qRT-PCR sonuçları remisyon evresinde bcr/abl transkript tanımlamada sitogenetik ve FISH ile karşılaştırıldığında en duyarlı metod olarak belirlenmiştir (Tablo 23 ve 24). Diğer evrelerde 3 yaklaşım arasında fark gözlenmemiştir.

Tablo-23: Sitogenetik ve PCR pozitiflik tanımı, karşılaştırma

KML evreleri	SİTOGEN ¹		Klasik Sitogenetik Ph1+ (%)	PCR ²		QRT-PCR (BCRABL /G6PDH)	P Degeri
	Analiz Edilen Olgu Sayısı	Sonuç Alınan Analiz Sayısı		Analiz Edilen Olgu Sayısı	Sonuç Alınan Analiz Sayısı		
Kronik Evre	45	40 (%88.9)	40 % 94.3*	45	41 (%91.1)	41 0,0532*	¹⁻² , p:0.76
Klinik Remisyon	96	91 (%94.8)	15 (%16.5)** %3.3*	131	131 (% 100)	63 (%48.1)** 0.000543*	¹⁻² , p<0.001
Relaps	2	2 (%100)	2 % 59*	2	2 (%100)	2 0.0298*	¹⁻² , p:0.62
Hızlanmış Evre	3	3 (%100)	3 % 100*	3	3 (%100)	3 0.0367*	¹⁻² , p:0.68
Blastik Evre	8	7 (%87.5)	7 %57*	8	8 (%100)	6 0.107*	¹⁻² , p:0.81
Dirençli	7	7 (% 100)	7 % 95*	9	9 (% 100)	9 0.0225*	¹⁻² , p:0.79

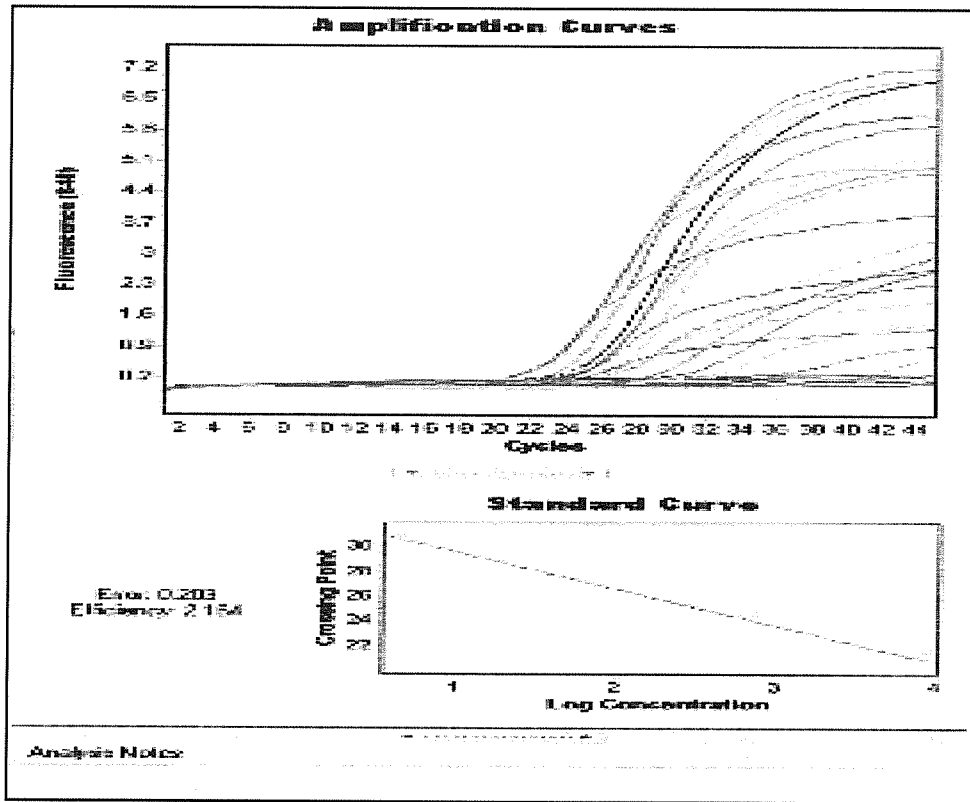
(*) Ph1 ve bcr/abl PCR pozitifliği için aritmetik ortalama; (**) Klinik Remisyon tanımında Sitogen. ve PCR pozitiflik oranı

Tablo-24 FISH ve PCR pozitiflik tanımı, karşılaştırma

	FISH²			PCR²			P Değeri
KML Evreleri	Analiz Edilen	Sonuç Alınan	Bcr/abl + FISH (%)	Analiz Edilen Olgu Sayısı	Sonuç Alınan Analiz Sayısı	QRT-PCR (BCR-ABL /G6PDH)	
Kronik Evre	44	44 (%100)	44 % 93*	45	41 (%91.1)	41 0,0532*	¹⁻² , p:0.76
Klinik Remisyon	97	97 (% 100)	13 (%14.3)** % 1.98*	131	131 (% 100)	63 (%48.1)** 0.000543*	¹⁻² , p<0.001
Relaps	2	2 (%100)	2 % 75*	2	2 (%100)	2 0.0298*	¹⁻² , p:0.62
Hızlanmış Evre	3	3 (%100)	3 % 100*	3	3 (%100)	3 0.0367*	¹⁻² , p:0.68
Blastik Evre	8	8 (%100)	6 % 64*	8	8 (%100)	6 0.107*	¹⁻² , p:0.77
Dirençli	7	7 (% 100)	7 % 88*	9	9 (% 100)	9 0.0225*	¹⁻² , p:0.80

(*) bcr/abl pozitifliği için aritmetik ortalama; (**) Klinik Remisyon tanımında FISH ve PCR pozitiflik oranı

Şekil-19: KML de Real Time PCR ile BCR-ABL ve Referans Gen Ekspresyonları örneği



5. TARTIŞMA

Ph1 translokasyonu sonucu ortaya çıkan bcr/abl füzyon geni Kronik Myeloid Lösemide patogenezin başlıca sorumlusudur. Ph1 translokasyonunu ya da bcr/abl transkriptini tanımlayan sitogenetik analiz, FISH ve qRT-PCR metotları, KML hastalarının tanı ve takiplerinde etkin olarak kullanılan yöntemlerdir. Klinik göstergeler ve rutin laboratuvar testleri hastanın prognozu hakkında bilgi verse de, genetik değişiklikler hastanın uzun süre hayatta kalması ve tam remisyonun başarısı için dikkat edilmesi gereken en önemli göstergelerdir.

Kan hastalıklarının tanı ve tedavilerini yürütmekte olan merkezlerde metotlar mümkün olduğunca çok genetik bilgiyi ortaya çıkarmaya olanak vermelidir. Böylece her hastanın tanısına ve bu tanıya uygun tedavi protokolunun oluşturulmasına katkı sağlanacaktır (44).

Konvensiyonel sitogenetik analiz yöntemleri, bilinen bir genetik değişikliği öngörmeksizin, incelenen örnekteki kromozomal yapının analizine olanak sağlar (3). Sitogenetik analiz, Ph1 kromozomunun gösterilmesinin ilk basamak yaklaşımıdır. Ph1 dışında yüksek risk olabilecek diğer kromozomal anomalilerini de göstermesi, önemli bir avantaj sağlamaktadır. Öte yandan yaklaşım, kemik iliği aspirasyonu gerektiren ve bölünen hücrelerin varlığında gerçekleştirilebilen bir yöntemdir. İnvaziv bir girişim olması, aspire edilen hücrelerle sınırlı olması, myelofibrosis gibi durumlarda hücre elde edilememesi riskinin olması ve minimal kalıntı hastalık tesbitinde duyarlılığının düşük olması gibi dezavantajları da söz konusudur. Yöntem de kullanılan besiyeri ve metodolojik farklılıklar (direkt yöntem, inkübasyon) da sonucu etkileyebilmektedir.

Sitogenetik analiz yöntemlerinin başarısı bir anlamda kromozomların rezolüsyonu ile de sınırlıdır. Kanser sitogenetiğinde bu rezolüsyon yaklaşık 10Mb' dir (51). Kriptik yeniden düzenlenmeler 1-2 megabaz büyüklüğünden daha küçük oldukları için kromozom düzeyinde görüntülenemezler. Ayrıca gen düzeyindeki mutasyonlar da sitogenetik yöntemler ile tespit edilemezler (27).

FISH yöntemi bcr/abl füzyon transkripti saptayan bir başka genetik yöntemdir. FISH yöntemi, In situ uygulanabilmesi, kriptik translokasyonu gösterebilmesi, bölünmeyen hücrelerde ve periferik kan' da etkin olması ve 200-500 gibi yüksek oranda hücre sayımına izin vermesi gibi avantajlara sahiptir. Ayrıca atipik transkriptleri de belirleyebilmektedir (abl delesyonu). Yöntemin Prob tiplerine göre tekniğin avantaj ve

dezavantajları farklıdır. Örneğin, S-FISH' için %1-6.5 luk eşik bir yanlış pozitiflik oranı bildirilmektedir. Sinyal skorlama subjektif yapıldığından, yanlış negatiflik de söz konusu olabilmektedir. Triple FISH de bu oranlar azalmış ve duyarlılık yükseltilmiştir. D-FISH yönteminde ise 2 füzyon gözlenir. Duyarlılığı S-FISH den yüksektir. Hipermetafaz FISH' de mitozu durdurucu bir ajan kullanılarak kolsemide maruz kalan hücre sayısı 500+ arttırılır. Böylece incelenecek metafaz sayısı belirgin olarak artar.

qRT-PCR yaklaşımı ile, FISH analizinde olduğu gibi sadece değişime uğramış hedef genlerdeki anomaliler analiz edilir, sitogenetik analizde olduğu gibi, hastalık tanı ve prognozunda etkili olabilecek ilave anomalileri belirleyememektedir. qRT-PCR' da ender görülen minör kırık noktalar saptanamıyabilir ve kimi varyant transkriptler de belirlenemeyebilir (yalancı negatif). Ancak hastaların takibinde ve minimal kalıntı hastalık (MRD) tesbitinde qRT-PCR halen en duyarlı yöntem kabul edilmektedir. Kimi FISH+ olgularda qRT-PCR negatifliği bildirilmektedir (16,19)

Literatürde yeni tanı konulmuş, relaps ya da tedavi edilmemiş KML hastalarında sitogenetik, FISH ve QRT-PCR arasında %100 uyum görüldüğü bildirilmektedir (9).

Çalışmamızda da yeni tanılı 39 vakamızın ve klinik remisyon dışı diğer dönemlere ait olguların analizlerinde bcr/abl transkript ya da Ph1 her üç yöntemle de aynı oranda tanımlanmıştır.

BCR-ABL nin saptanmasında RNA elde edilme aşamasında yada diğer aşamalarda önceden belirlenemeyen sebeplerle PCR çalışmasından sonuç alınmadığı durumlarda FISH ve sitogenetik ile sonuç alınabilmesi mümkündür. Bizim çalışmamızda da PCR başarısız 4 vakada sitogenetik ve FISH % 100' e yakın bir pozitiflikle tanı koydurmuştur. Benzer şekilde sitogenetikte metafaz elde edilemeyen durumlarda FISH ve PCR tanı koydurucu olabilmektedir. Bizim çalışmamızda da metafaz gözlenmeyen 11 sitogenetik analizden eş zamanlı giren periferik kan örneklerinde PCR ve FISH ile pozitif sonuç alınmıştır.

Ülkemizde 2002 yılında yapılan bir çalışmada 17 si yeni tanılı 13 ü ise tedavi altındaki 30 eş zamanlı FISH ve Real Time PCR çalışmasında, olgularda her iki yöntemle de bcr-abl pozitifliği saptanmıştır. FISH testi ile RT-PCR sonuçları arasında kuvvetli bir korelasyon bulmuşlar, buna göre bcr-abl /G6PD oranını 0.0009' un altında olan bir örneğin FISH testi sonucunun %5-10 arasında olacağını ve yine bcr-abl /G6PD oranı 0,003' ün üzerinde olan bir örneğin, FISH testi sonucunun % 35' in üzerinde

olacağını % 96 güvenilirlikle bildirmişlerdir. FISH yöntemi ile negatife karşılık gelen %5' in altı değerlerin, RT- PCR ile 0 bcr-abl /G6PD' a karşılık gelmekte olduğunu ve bu şekilde FISH veya RT-PCR' ın yanıt değerlendirmesi için kullanılabileceğini ifade etmişlerdir (10).

2005 yılında yapılan bir çalışmada ise, sitogenetik, FISH ve RT-PCR analiz sonuçlarını karşılaştırmışlar ve 20 KML hastasından preparatı analiz edilebilir 11 hastanın 6'sında ph1 pozitifliği bulmuşlar (%54.54) dır. Bir hastada Ph1 pozitifliğini % 50 olarak bulmuşlar, diğer bir hastada ise ise 38-45,XY[11]/46,XY[8] kromozom yapısı tanımlanmıştır (80).

LSI BCR/ABL ES (extra sinyal) Dual Color Translocation probu kullanarak 20 KML hastasının 17' sini analiz etmişler %52.94 oranında pozitif BCR-ABL sinyalleri saptamışlar. ABL kontrol geni kullandıkları RT-PCR çalışmasında 63 hastanın 4 ünde kontrol PCR' ı başarılı olmadığından sonuç alamamışlar, RT-PCR ile negatif buldukları tüm hastaları diğer yöntemlerle de negatif bulmuşlardır. RT PCR yöntemiyle sonuç alamadıkları 3 hastanın 2' sini FISH ve konvansiyonel bantlamada pozitif bulmuşlar, 1 tanesini FISH de normal bulmuşlar, 1 tanesinde ise sitogenetik çalışmada da sonuç alamamışlardır. RT-PCR da pozitif buldukları 6 hastanın 4 tanesinin sitogenetik analizlerinden sonuç alamamış 2 hastada ise normal karyotip bildirmişlerdir (80).

2008 yılında yayınlanan bir çalışmada, Durak ve ark., klasik sitogenetik ve FISH sonuçlarını uyumlu bulmuşlar, FISH için sonuç alma oranları %100 iken klasik sitogenetik ile sonuç alma oranını %64.1 olarak bildirmişler ve FISH ' in klasik sitogenetik analizlerin KML'deki hastalık kuantifikasyonunu belirlemede başarısız olduğu durumlarda kullanılması gerektiğini belirtmişlerdir (25). Jha ve ark., da 35 KML hastasında sitogenetik ve FISH analizleri uygulamışlar ve çalışmalarının sonucunda KML hastalarında iyi yayılmış metafazlar yoluyla uygulanan klasik karyotiplenmenin, kromozomal tanı için rutin bir prosedür olduğunu, kromozomal tanı ve tedavinin izlenmesi adına her zaman iyi kaliteli metafazlar elde etmenin mümkün olmadığını ve FISH' in, interfaz hücrelerdeki ve hatta düşük kaliteli metafazlardaki Ph1 kromozomunu (BCR-ABL füzyon geni) tespit etmede yüksek hassasiyetli bir teknik olduğunu belirtmişlerdir (46).

Bizim çalışmamızda da FISH sonuç alma oranımız % 100 dür.

Sitogenetik analiz KML’de halen altın standart tanı yöntemi olarak belirtilmekte ve en önemli avantajının Ph translokasyonuna ek olarak görülebilen ilave kromozom anomalilerini saptayabilmesi olduğuna değinilmektedir. Bizim çalışmamızda da bulgular da belirttiğimiz gibi 23 hastanın 11 inde Ph1 + liği yanı sıra, 12 hastada ise Ph1– iken ek anomali saptanmıştır. Bunun yanında Durak ve ark., tedavi altında olup kromozom elde edilemeyen 14 KML olgusunda sitogenetik analiz ile tanı koyamadıklarını ancak FISH ile tanı koyabildiklerini bildirmişlerdir. Birçok çalışmada sitogenetik analizler için fazla sayıda canlı, bölünen hücreye ihtiyaç olduğu, bu durumun özellikle tedavi altında olan hastalarda sıkıntı yarattığı ve izlem şansını ortadan kaldırdığı, bu nedenle metafaz elde edilemeyen olgularda hedefe yönelik FISH’ in metafaz ve interfaz hücrelerinin analiz edilmesine izin veren, basit, uygulaması kolay ve oldukça etkili bir teknik olduğu belirtilmektedir (24, 25, 73). Bizim de benzer şekilde daha önce belirttiğimiz üzere 11 numunede sitogenetik durumu belirleyemememize rağmen 9’ unda FISH ile sonuç almıştık. Ancak FISH yöntemi; teşhis, prognoz, risk stratifikasyonu ve terapötik başarının monitorizasyonunda klasik sitogenetik analize güçlü bir araç olarak eşlik edebilir. Örneğin tedavinin geç fazında ortaya çıkacak Ph1 translokasyonuna ek bir sitogenetik anomali sadece FISH ile tesbit edilemeyebilir (13, 56). Bu veriler ışığında, KML’li hastaların monitorizasyonunda klasik sitogenetik ve FISH tekniğinin birlikte kullanılmasının gerekli olduğu kanısındayız.

B. Durak ve arkadaşları 50 KML olgusunun %6 sında Ph translokasyonu RT-PCR ile pozitif iken, FISH ile negatif bulmuşlar ve bu sonucu RT-PCR yönteminin sensitivitesi nedeniyle beklenen bir durum olarak değerlendirmişlerdir (25).

Ph1 negatif, BCR-ABL pozitif sonuçlardan, normal görünen metafazlardaki submikroskopik BCR-ABL yeniden düzenlemeleri (kriptik düzensizlikler) sorumlu olabilir.

Minimal rezidüel hastalığın değerlendirilmesi açısından üç farklı yöntem karşılaştırıldığında, RT-PCR “rezidüel” KML hücrelerinin saptanmasında 1000-10000 kat daha sensitiftir (21). RT-PCR’ ın duyarlılığının tedavi sonrası takip aşamasında oldukça önemli olduğu belirtilmekte (20) özellikle komplet sitogenetik yanıtı sahip olan hastalarda minimal rezidüel hastalığın değerlendirilmesini kolaylaştırdığı bildirilmektedir (83). RT-PCR’ ın bir diğer avantajı da, kan ve kemik iliğine ait

örneklerden benzer sonuçlar elde edildiğinin bildirilmiş olması ve çalışmalarda PK'nın kullanılmasının önerilmesidir (40, 54, 89). Bu özellik, imatinib kullanmakta olan hastalarda rezidüel KML klonunun periferik kan örneğinden PCR ile monitorizasyonunu sağlayarak invazif kemik iliği aspirasyon işlem sıklığını azaltmaktadır.

Biz de çalışmamızda bu verileri göz önünde bulundurarak hastalarımızın Kİ gönderilmiş olan 7 si hariç, PK larının çalışılmasını tercih etmiştik ve çalışmanın sonucunda da PK ve Kİ sonuçlarımız uyumlu bulunmuştur. B. Durak ve ark. ları çalışmalarında FISH ve RT-PCR sonuçları uyumsuz olan sırasıyla 2 ve 7 olgu saptadıklarını belirtmişlerdir (25). Cox ve ark. 8 lösemi ve diğer miyeloproliferatif hastalığı olan 75 hastanın 4'ünde RT-PCR ile BCRABL pozitif iken FISH ile Ph negatif; bir hasta da ise FISH ile Ph pozitif iken PCR negatif olarak rapor etmişlerdir (19). Benzer şekilde, Campbell ve ark. 15 erişkin ALL hastasının 7'sinde sitogenetik ve moleküler çalışmalar arasında uyumsuzluk saptamıştır. 5 olgu BCR-ABL pozitif iken FISH ile gösterilememiş, 2 olgu ise FISH ile Ph1 pozitif iken RT-PCR ile analiz edilememiştir (16). Ph1 pozitif, BCR-ABL negatif sonuçlar teknik hata veya BCR-ABL translokasyonunun nadir formlarına bağlı olabilmektedir.

Bizim çalışmamızda QRT-PCR ile 0,0001 den küçük bcr-abl/G6PDH oranı belirlediğimiz 42 remisyon hastasında FISH ile bcr-abl füzyon transkriptleri saptanamamış ve negatif bulunmuştur. Sitogenetik ve FISH' te Ph1 pozitif saptadığımız tüm vakalar PCR ile de pozitif saptanmıştır.

RT-PCR' a ait yanlış negatif sonuçlar lösemik hücrelerin periferik kanda kemik iliğine göre daha düşük düzeyde bulunmasına da bağlanmaktadır (16,19). Bizim çalışmamızda ise Ph1+ iken BCR-ABL negatif sonuç bulunmamıştır; sitogenetik ya da FISH Ph1 + iken bütün PCR sonuçlarımız da bcr-abl füzyon genini belirlemiştir.

Fei Bao ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada yeni tanı konulmuş, relaps ya da tedavi edilmemiş hastalarda FISH ve QRT-PCR arasında %100 uyum gördüklerini bildirmişlerdir. Kendi çalışmalarının Schoch ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaya benzer bir şekilde FISH ve QRT-PCR arasında ortalama bir korelasyon saptadıklarını bildirmişler, tedavi altındaki hastalarda ise FISH' in bariz teknik kısıtlılıkları olduğundan dolayı tedavi takibinde QRT-PCR' ın altın standart olarak kabul gördüğünü ve FISH' in yeni tanı hastalarda hızlı bir tanı için kullanışlı olmasına

karşın minimal residual hastalığın görüntülenmesi adına yeterince hassas bir metot olmadığını bildirmişlerdir (9, 73). Tchirkov ve arkadaşları 24 KML hastasının izleminde FISH ve kompetitif RT-PCR' ı karşılaştırmışlar ve her iki metodun da güvenilir olduğu ve iyi bir korelasyon gösterdiğini belirlenmiştir (83). Kim ve arkadaşları FISH, RT-PCR ve QRT-PCR değerlerini karşılaştırmış ve kendi hasta grubundaki BCR-ABL transkriptlerini tespit etmede en hassas testin QRT-PCR olduğunu belirtmiştir. FISH' in ilk tur RT-PCR ile, ikinci tur RT-PCR ve QRT-PCR' a oranla daha yakın bir korelasyon gösterdiğini saptamışlar, QRT-PCR' ın ise FISH ile, ancak FISH-pozitif numunelerin analiz edildiği durumlarda iyi bir korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir (9). Raani ve ark. tedavi gören yetişkin hastaların moleküler izlemini yapmış ve 21 vakayı FISH ve QRT-PCR ile karşılaştırmıştır. İki kategori FISH (pozitif ve negatif ve üç kategori QRT-PCR (negatif , zayıf pozitif ve güçlü pozitif) kullanılarak genellikle iyi bir korelasyon elde etmişler ancak FISH' i sadece multiplex PCR' da negatif olan hastalarda uyguladıklarını belirtmişlerdir (9).

Schoch ve ark. tarafından raporlanan ve farklı metotlarla analiz edilen 350 kişilik bir araştırmada FISH ve QRT-PCR sonuçları karşılaştırıldığında 0.91' lik bir korelasyon katsayısı elde edilmiştir (73). Hong Qian –Zhu ve arkadaşları tedavi gören 31 KML hastasında MRD' yi görüntülemeye BCR-ABL geninin kuantatif tespitinde DC DF FISH ve QRT-PCR' ın rolünü belirlemek için yaptıkları bir çalışmada FISH analizinde BCR-ABL füzyon geni pozitif hücrelerin ortalama yüzdesini % (96.2 ± 3.8) ve BCR-ABL' nin ABL' e oranı ortalamasını ise 0.74 ± 0.11 bulmuşlardır (97). Bizim çalışmamızda da kronik evre 41 olgumuzda FISH pozitiflik oranı %91.1 iken PCR oranı ise 0,0425±0,0431 tespit edilmiştir.

Testoni ve arkadaşları ,GIMEMA KML Çalışma Partisi tarafından desteklenmiş ve yürütülmüş olan bir çalışmalarında 18 yaş ve üstü, erken kronik faz Ph+ ve BCR-ABL+ KML hastalarında kemik iliği hücrelerinin sitogenetik ve I-FISH ve PCR (RT ve QRT) analizlerini karşılaştırmışlar. Sonuçta minimal residual hastalığın belirlenmesinde I-FISH analizinin sitogenetiğe nazaran daha hassas olduğunu tespit etmişlerdir. Bu sonucu I-FISH analizinde daha fazla hücrenin analiz edilmesi ile açıklamışlardır. Sitogenetik ve I-FISH analizlerinin karşılaştırıldığı araştırmada %1'lik eşik değerinin altındaki tüm vakalarda (%98.4) sitogenetik analizi sonrası TSY gözlemlemişlerdir. Buna karşılık sitogenetik analiz sonrası TSY durumu ile nitelenen vakaların %13.2'

sinde %1 ila %5 arası ve %4.1' inde %5' ten fazla pozitif çekirdek gözlemlenmişler bunun bir neticesi olarak I-FISH ve sitogenetik analizlerde negatif durum gösteren hastalarda MMY oranının yüksek ve BCR/ ABL transkript seviyelerinin daha düşük olduğunu ve sadece sitogenetik analizlerinde negativite gösteren hastaların daha kötü sonuçlar gösterdiğini tespit etmişlerdir (84).

Ph+ metafazları yüzdeleri ve BCR-ABL pozitif çekirdek yüzdeleri arasındaki ilişki kuvvetli olmasına rağmen, bu yüzdelerin aynı olduğunu kanıtlayan veriler olmadığından, I-FISH analizinin tepkinin farklı derecelerini belirleyebilmek adına kullanılmayacağını bildirmişler, fakat tüm metafazlar Ph- olmak şartıyla I-FISH analizinin metafaz Sitogenetik analizi yerine kullanılabilceğini bildirmişler ve eğer metafaz sayısı az ise I-FISH analizinin sitogenetik analize nazaran tepkinin sürecini takip etmede daha iyi görüntüleme sağlayacağını belirtmişlerdir (84).

Yapılan çalışmalarda kemik iliği ve kan numuneleri I-FISH sonuçları arasında fark olmadığı gösterilmiştir. BCR-ABL pozitif hücrelerin I-FISH analizi ile tespit edilmesinde TSY' in kaybedildiği sonucuna varmak için her zaman sitogenetik analiz ile doğrulayıcı bir teste ihtiyaç olduğu bildirilmektedir. Ayrıca Ph+ hücrelerdeki ek kromozomal anomalileri, tepki yitimini, Ph1- hücrelerdeki diğer kromozomal anomalileleri ve myelodisplastik bir durumun gelişmekte olduğunu belirten bir hematolojik anomalinin varlığını belirlemek için sitogenetik analize gerek duyulduğu bildirilmektedir (84).

TSY'deki KML hastalarının izlenmesi için I-FISH analizinin tercih edilen bir teknik olup olmadığının, BCR-ABL transkript seviyelerinin kuantifikasyonu için diğer tekniklerin elverişliliğine ve yerini alabilmesine bağlı olduğu hakkındaki tartışmalar devam etmektedir. 2009 yılında Özbek ve arkadaşları da yayınladıkları bir makalede terapiyi değerlendirmede sitogenetik ve moleküler yöntemlerin uyumlu olduklarını ve her iki yöntemin birbirini tamamlayıcı olduklarını düşündüklerini belirtmişlerdir (66).

Bulgularımıza göre; Ph translokasyonunun belirlenmesinde klasik sitogenetik tanı evresinde günümüzde halen altın standart yöntemdir. Alternatif bir moleküler sitogenetik yöntem olarak FISH, metafaz ve interfaz hücrelerinin analiz edilmesine izin veren, basit, uygulaması kolay, etkili bir tekniktir ve özellikle KML' li hastaların monitorizasyonunda klasik sitogenetik ile birlikte uygulanması önerilmektedir. RT-

PCR tekniğinde ise daha önce materyal metod kısmında belirtildiği gibi birçok hasta aynı anda çalışılabilmekte ve işlem RNA izolasyonundan itibaren 4-4,5 saatte sonuçlanmaktadır. Bu nedenle FISH' e göre aynı anda daha fazla materyali daha kısa sürede çalışabilme imkanı veren ve daha hassas bir şekilde minimal residüel hastalığın değerlendirilmesini kolaylaştıran, sensitivitesi yüksek diğer bir yöntem olduğu kabul edilmektedir. qRT- PCR esnasında floresan sinyalin ilk algılanmaya başladığı nokta, araştırılan materyaldeki hedef bölgenin miktarı ile korelasyon gösterir. Araştırılan gen ve /veya gen ürünü ile normalize edilir ve araştırılan materyalde bulunan malin hücrelerin sayısı belirlenir.

Moleküler tanı yöntemlerinin avantajları, füzyon geninin tanısının doğrulanması yanında doğru kırık noktalarının belirlenmesidir. Çok küçük olmaları nedeniyle sitogenetik ile tanımlanamayan bazı genetik yeniden düzenlenmeler (nokta mutasyonları, küçük duplikasyonlar, insersiyon ve delesyonlar) in ortaya konabilmesidir. Tedavi sonuçları çok hassas ve kesin verilerle kontrol edilip tedavi özelleştirilebilir. Hastalık klinik olarak progresse olmadan önce moleküler bir "marker" in varlığı gözlenebilir.

Dezavantajı ise, FISH analizinde olduğu gibi sadece değişime uğramış hedef genlerdeki anomalilerin analiz edilebilmesidir; hastalık tanı ve prognozunda etkili olabilecek ilave anomalileri belirleyememektedir.

6. SONUÇLAR

1. Analizler tek tek değerlendirildiğinde, 161 sitogenetik, 163 FISH ve 198 qRT-PCR analizlerinde sonuç alma 4 ü çocuk hasta olmak üzere toplam 81 KML hastasında, Ph1/bcr-abl füzyon tanımı için, sitogenetik, FISH ve moleküler genetik (PCR) tanı yaklaşımları uygulanmıştır.

2. Hasta materyallerindeki mükerrer girişler nedeni ile işlemler toplam 198 materyal üzerinde gerçekleştirilmiştir.

3. İlk başvuruda 81 hastanın klinik evrelemesinde, 41 hastanın kronik faz, 30 unun remisyon fazı, 2 sinin akselere, 3 ünün blastik, 5 inin ise dirençli faz hastaları olduğu saptanmıştır.

4. 198 materyalin klinik evrelemesinde, 45 hastanın kronik faz, 131 unun remisyon fazı, 2 sinin relaps, 3 sinin akselere, 8 ünün blastik, 5 inin ise dirençli faz hastaları olduğu saptanmıştır.

5. 161 materyalde sitogenetik, FISH ve moleküler genetik (PCR) tanı yaklaşımları eşzamanlı uygulanmıştır.

6. Sonuç alma oranı sırası ile 150 (%93.1), 163 (%100), 194 (%97,9) idi

7. Tüm materyaller “evreden bağımsız” olarak değerlendirildiğinde, Ph1/bcr-abl pozitifliği saptama oranı qRT-PCR da sitogenetik ve FISH e göre anlamlı oranda yüksek bulunmuştur (sitogenetik, 71/161 (%47,3); FISH, 76/163 (%46.6); qRT-PCR, 132/194 (%68.0).

8. Sitogenetik analizde, remisyon dışı evrelerde (kronik faz, relaps, akselere, blastik ve dirençli fazlar) Ph1 pozitiflik oranı yüksek bulunmuş ve %57.0-%100.0 sınırları içinde saptanmıştır. Kronik fazda bu oran %94.3 bulunmuştur.

9. Sitogenetik analizde, klinik remisyon evresinde %16.5 oranında Ph1 pozitifliği saptanmıştır (AR ortalama %3).

10. Sitogenetik analizde 22 hastada Ph1 dışında, ek kromozom anomalileri saptandı. Trisomi 8 ve del(6q) en sık görülen anomalilerdi. Tek başına Ph1 saptanan 60 hasta gözlemlendi.

11. Moleküler sitogenetik (FISH) analizinde remisyon dışı evrelerde (kronik faz, relaps, akselere, blastik ve dirençli fazlar) Ph1 pozitiflik oranı yüksek bulunmuş ve %65.0-%100.0 sınırları içinde saptanmıştır. Kronik fazda bu oran %93.4 bulunmuştur.

12. FISH analizinde, klinik remisyon evresinde %13.4 oranında bcr/abl füzyon pozitifliği saptanmıştır (AR ortalama %2).

13. FISH analizleri remisyon dışı hastalarda, 63 analizde klasik füzyon, 13 hastada ise atipik füzyon gösterdi.

14. Sitogenetik ve FISH analizleri karşılaştırıldığında, her 2 yaklaşımın da Ph1 kromozomu ya da bcr/abl i tanımında aynı etkinlikte olduğu görüldü.

15. Moleküler genetik analizler, 198 numunenin 194 'ünde (%98) başarılı bir şekilde tamamlanmış, 4 hastada ise PCR çalışmalarından sonuç alınamamıştır.

16. “Remisyon dışı” tüm evrelerde 0.0225-0.1074 sınırları içinde pozitiflik saptanmıştır.

17. Klinik remisyonla ait qRT-PCR oran sonuçları, $0,000543 \pm 0,001149$ bulunmuştur.

18. qRT-PCR sonuçları, remisyon evresinde, bcr/abl transkript tanımlamada, sitogenetik ve FISH ile karşılaştırıldığında en duyarlı metod olarak belirlenmiştir. Kronik faz ve remisyon dışı fazlarda qRT-PCR' ın sitogenetik ve FISH ile aynı etkinlikte olduğu gözlenmiştir.

Çalışmamız ülkemizde bu alanda yapılmış en geniş hasta sayısı ve materyalini kapsayan ve 3 farklı genetik yöntemin birlikte etkinliğini, istatistiksel olarak irdeleyen ve klinik fazlarla birlikte değerlendiren bir çalışmadır.

KML hastalarının denetiminde **“kronik faz, relaps, akselere faz, blastik faz, ve dirençli fazlarda”** sitogenetik, FISH ve qRT-PCR aynı etkinlikte olmakla birlikte, her 3 ünün de farklı avantajları olduğundan, her üç yöntem birlikte uygulanmalıdır. Böylece atipik seyirli ve yüksek riskli olguları önceden belirlemek (sitogenetik ve FISH) olanaklı olacaktır. Ayrıca qRT-PCR’ ın bu kırık noktalarını o hasta için tanıyıp tanımadığını bilmek temelinde qRT-PCR eşliği de önemlidir. **“Remisyon fazında”** ve **“major moleküler yanıt”** değerlendirmesinde ise qRT-PCR yeterli görülmektedir. Elde edilen aritmetik ortalamalar, qRT-PCR monitorizasyonunun laboratuvarımızda uygulanan şekli ile hasta denetiminde etkin olduğunu düşündürmektedir.

7. REFERANSLAR

1. Adar M. Çocukluk Çağı Lösemilerinde Kromozom Analizleri ve Floresan İn Situ Hibridizasyon Çalışmaları. 2008, Samsun, Uzmanlık Tezi
2. Amare PS, Baisane C, Saikia T, Nair R, Gawade H, Advani S. (2001). fluorescence in situ hybridization: a highly efficient technique of molecular diagnosis and predication for disease course in patients with myeloid leukemias. *Cancer Genet. Cytogenet.* 125-134.
3. Anastasi J.: Genetic and Molecular Genetic Studies in the Diagnosis of Myeloid Diseases, *Human Pathology*, 34(4):306-313, 2003.
4. Ar MC, Öngören Ş, Ferhanoglu B, Aydın Y, Eşkazan E, Soysal T, Ülkü B, Başlar Z, Çetin G. Hematopoezis. *Hematoloji Derskitabı, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları*, 2008:1-8.
5. Ar MC, Öngören Ş, Ferhanoglu B, Aydın Y, Eşkazan E, Soysal T, Ülkü B, Başlar Z, Çetin G. Akut Lösemiler. *Hematoloji Derskitabı, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları*, 2008:119-138.
6. Ault P, Kantarjian H, O'Brien S, et al. Pregnancy among patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib. *J Clin Oncol* 2006;24:1204-08.
7. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum F, Apperley J, Cervantes F, Cortes J, Deininger M, Gratwohl A, Guilhot F, Horowitz M, Hughes T, Kantarjian H, Larson R, Niederwieser D, Silver R, Hehlmann R. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2006;108:1809-1820.
8. 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 Dec 10;27(35):6041-51.
9. Bao F, Munker R, Lowery C, Martin S, Shi R, Veillon DM, Cotelingam JD, Nordberg ML. Comparison of FISH and Quantitative RT-PCR for the Diagnosis and Follow-Up of BCR-ABL-Positive Leukemias. *Mol Diag Ther* 2007;11 (4):239-245.
10. Barış F. Kronik Myelositer Lösemide BCR-ABL Füzyon Transkriptlerinin RT-PCR Tekniği Kullanılarak Nicel Olarak Belirlenmesi. Ankara, 2002, Yüksek Lisans Tezi.

11. Berger U, Engelich G, Pfirrmann M, et al. Chronic myeloid leukemia in the elderly: long-term results from randomized trials with interferon alpha. *Leukemia* 2003;17:1820–26.
12. Berman E, Nicolaides M, Maki RG, et al. Altered bone and mineral metabolism in patients receiving imatinib mesylate. *N Engl J Med* 2006;354:2006–13.
13. Budny B, Kanik M, Latos-Bieleniska A. Fluorescence in situ hybridization (FISH) application in research and diagnostics. *Folia Histochem Cytobiol* 2002;40(2):108-108.
14. Buno I, Wyatt WA, Zinsmeister AR, Dietz-Band J, Silver RT, Dewald GW. A special fluorescent in situ hybridization technique to study peripheral blood and assess the effectiveness of interferon therapy in chronic myeloid leukemia. *Blood* 1998;92:2315–2321.
15. Büyükaşık Y, Haznedaroğlu IC, İlhan O. On behalf of Turkish CML Study Group. Chronic Myeloid Leukemia: Practical Issues in Diagnosis, Treatment and Follow-Up *International Journal of Hematology and Oncology (UHOD) Number: 2 [Suppl 1] Volume:20 Year:2010.*
16. Campbell LJ, Martinow A, Michael PM, et al. Correlation of cytogenetics, BCR-ABL PCR studies and fluorescence in situ hybridisation (FISH) in adult lymphoblastic leukemia. *Aust NZ J Med* 1999;29(5):707-712.
17. Chase A, Huntly BJP, Cross NCP. Cytogenetics of chronic myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001;14:553–571.
18. Corbin AS, La Rosee P, Stoffregen EP, Druker BJ, Deininger MW. Several Bcr-Abl kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib. *Blood* 2003;101:4611–41.
19. Cox MC, Maffei L, Buffolino S, et al. A competitive analysis of FISH, RT-PCR and cytogenetics for the diagnosis of bcr-abl-positive leukemias. *Am J Clin Pathol* 1998;109(1):24-31.
20. Crist MW, Smithson WA. The leukemias. In: *Nelson Textbook of Pediatrics*, 16th edition, Ed(s), Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB. W. B. Saunders Company, USA, 2000:1543-1548.

21. Cross NC. Minimal residual disease in chronic myeloid leukemia. *Hematol Cell Ther* 1998;40:224-228.
22. Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2005;105:2640–53.
23. Dewald GW, Schad CR, Christensen ER, Tiede AL, Zinsmeister AR, Spurbeck JL, et al. The application of fluorescent in situ hybridization to detect Mbc/abl fusion in variant Ph chromosomes in CML and ALL. *Cancer Genet Cytogenet* 1993;71:7 – 14.
24. Durak B. Hematolojide FISH. Türk Hematoloji Derneği'nin çalışmalarından bilimsel alt komite kursları, moleküler hematoloji klinik hematoloji için pratik genetik yaklaşım kurs kitabı 2006;13-17.
25. Durak B, Akay OM, Yaşar NŞ, Özdemir M, Gülbaş Z, Artan S. Bcr-abl Pozitif Lösemilerde Klasik Sitogenetik, FISH ve RT-PCR analizlerinin karşılaştırılması. *Osmangazi Tıp Dergisi*. 2008;30(1):1-9.
26. Fialkow PJ, Demmon AM, Jacobson RJ. Chronic myelocytic leukemia. *Journal of clinical investigation*, 1978;62:823-825.
27. Fischer K, Scoll C, Salat J, Dohner H, Design and Validation of DNA Probe Sets for a Comprehensive Interphase Cytogenetic Analysis of Acute Myeloid Leukemia, *Blood*, 88:3962-3971, 1996.
28. Feroni L, Gerrard G, Nna E, Khorashad JS, Stevens D, Swale B, Milojkovic D, Reid A, Goldman J, Marin D. Technical aspects and clinical applications of measuring BCR-ABL1 transcripts number in chronic myeloid leukemia. *Am. J. Hematol*. 2009;84:517–522.
29. Gaynon P, Bleyer W, Steinherz P, et al. (1990). Day 7 marrow response and outcome for children with acute lymphoblastic leukemia and unfavorable presenting features. *Med. Pediatr. Oncol*. 18, 273-279.
30. Geary CG, The Story of Chronic Myeloid Leukaemia. *British Journal of Hematology*. 110:2-11, 2000.
31. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia—advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med* 2003;349:1451–64.

32. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 2001;293:876–80.
33. Greaves M. F. : Aetiology of Acute Leukemia.
34. Guo JQ, Lian J, Glassman A et al. Comparison of bcr-abl protein expression and Philadelphia chromosome analyses in chronic myelogenous leukemia patients. *American Journal of Clinical Pathology* 1996;106:442-448.
35. Gülersu I, Çocuklarda Hematopoetik Sistemin Gelişimi, *Temel Pediatri, Milli Pediatri Derneği*. 2009:967-1045.
36. Hasford J, Pfirmann M, Hehlmann R, et al: A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:850-858.
37. Hasford J, Pfirmann M, Shepherd P, et al. The impact of the combination of baseline risk group and cytogenetic response on the survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alpha. *Haematologica* 2005; 90: 335–40.
38. Hehlmann R, Berger U, Hochhaus A. Chronic myeloid leukemia: a model for oncology. *Ann Hematol* 2005;84:487–97.
39. Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M. on behalf of the European LeukemiaNet, Chronic myeloid leukaemia. *Lancet* 2007;370:342–50.
40. Hochhaus A, Lin F, Reiter A, et al. Quantification of residual disease in chronic myeloid leukemia patients on interferon- therapy by competitive polymerase chain reaction. *Blood* 1996;87:1549-1555.
41. Hochhaus A, Minimal residual disease in chronic myeloid leukaemia patients. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, Vol. 15, No.1, pp. 159-178, 2002.
42. Hochhaus A, La Rosee P. Imatinib therapy in chronic myelogenous leukemia: strategies to avoid and overcome resistance. *Leukemia* 2004;18:1321–31.
43. Hofmann R, Benz JE Jr, Shattil SJ, Furie B, Silberstein LE, McGlave P, Heslop H. *Hematology: Basic Principles and Practice*, 5th edition. 2008 Churchill Livingstone, An Imprint of Elsevier.

44. Hokland P, Pallisgaard N.: Integration of Molecular Methods for Detection of Balanced Translocations in the Diagnosis and Follow-up of Patients With Leukemia, *Seminars in Hematology*, 37(4):358-367, 2000.
45. İlhan O. Kronik Miyelositer Lösemi.
46. Jha CB, Kucheria K, Choudhary VP. Diagnostic role of conventional cytogenetics and Fluorescence in situ Hybridization (fish) in chronic myeloid leukemia patients. *Kathmandu University Medical Journal* (2006), vol. 4, No. 2, Issue 14, 171-175.
47. Kalwinsky D, Roberson P, Dahl G. (1985). Clinical relevance of lymphoblast biological features in children with acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 3, 477-484.
48. Kantarjian HM, Cortes JE, O'Brien S, Luthra R, Giles F, Verstovsek S, Faderl S, Thomas D, Garcia-Manero G, Rios MB, Shan J, Jones D, Talpaz M, 2004. Long-term survival benefit and improved complete cytogenetic and molecular response rates with imatinib mesylate in Philadelphia chromosome-positive chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of interferon-alpha. *Blood* 104 (7), 1979–1988.
49. 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;103:2873–78.
50. Kerkelä R, Grazette L, Yacobi R, et al. Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. *Nat Med* 2006;12 (8):908–16.
51. Kirsch IR, Ried T.: Integration of Cytogenetic Data with Genome Maps and Available Probes: Present Status and Future Promise, *Seminars in Hematology*, 37(4):420-428, 2000.
52. Krause DS, van Etten RA. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med* 2005;353:172–87.
53. Landstrom AP & Tefferi A, Fluorescent in situ hybridization in the diagnosis, prognosis, and treatment monitoring of chronic myeloid leukemia, *Leukemia & Lymphoma*, March 2006;47(3):397–402.
54. Lin F, Goldman JM, Cross NCP, et al. A comparison of the sensitivity of blood and bone marrow for the detection of minimal residual disease in chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 1994;86:683-685.

55. Mark HFL, 2000c. FISH as an adjunct to conventional cytogenetics: analysis of metaphase and interphase cells. In: Malhotra, S. (Ed.), Adv.Struct. Biol., vol. 6. Jai Press, Inc., Stamford, CT, pp. 1-39.
56. Mark HFL, Sokolic RA, Mark Y. Conventional cytogenetics and FISH in the detection of BCR/ABL fusion in chronic myeloid leukemia (CML). *Exp Mol Pathol* 2006;81(1):1-7.
57. Martinelli G, Testoni N, Amabile M et al. Quantification of BCR-ABL transcripts in CML patients in cytogeetic remission after interferon α based therapy. *Bone Marrow Transplantation* 2000;25:729-736.
58. Mattison RJ, Larson RA. Role of allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults with acute lymphoblastic leukemia. *Curr Opin Oncol* 2009;21(6):601-8.
59. Miller DR. Hematologic malignancies: leukemia and lymphoma. In: Miller RM, Baehner RL, Miller LP (eds). *Blood Diseases of Infancy and Childhood* Xth. ed. Mosby, 2005:660- 768.
60. Nowell P, Hungerford D. A minute chromosome in human chronic granulocyticleukemia. *Science* 1960;132:1497–1501.
61. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. (2005). Genetik ve kanser. Thompson& Thompson, Tıbbi Genetik (çeviri)'de, Altıncı baskı , Aktaş, D. Güneş kitabevi, 311-333.
62. O'Brien S. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology:Chronic Myelogenous Leukemia. Version 2.2010. [professionals/physician_gls/PDF/cml.pdf](http://professionals.physician_gls/PDF/cml.pdf).
63. Oğur, G. Kanser, kromozomlar ve genler. *Türkiye Klinikleri J. Pediatr. Sci.* 2005;1(2):73-92.
64. O'Hare T, Walters DK, Stoffregen EP, et al. In vitro activity of BCR-ABL inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistantAbl kinase domain mutants. *Cancer Res* 2005;65:4500–4505.
65. Öztürk A, Beyan C, Tekgündüz E, Özkalemkaş F, Karadoğan İ, Dilek İ, Tiftik N, Kartı S, Atamer T, Özçelik T, Celkan TT. Türk Hematoloji Derneği. Akut lösemiler. Ulusal Tanı ve Tedavi Rehberi. Sürüm 1- Mayıs 2010 www.thd.org.tr.

66. Palandüz S, Bayrak A, Sirma S, Vural B, Cefle K, Uçur A, Ozturk S, Yenerel MN, Besisik SK, Yavuz S, Dizküçükkaya R, Sargın D, Nalcaci M, Pekcelen Y, Ozbek U. Comparison of the cytogenetic and molecular analyses in the assesment of imatinib response in chronic myelocytic leukemia. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2009 Oct; 13(5):599-602.
67. Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2005;5:172–83.
68. www.roche-applied-science.com LightCycler t(9;22) Quantification Kit. Instruction Manuel Version 3 , February 2006 Roche Molecular Systems.
69. www.roche-applied-science.com High Pure RNA Isolation Kit Version December 2007.
70. Rooney DE, Czepilkowski BH. (1986). Human cytogenetics a pratical approach(modifiye).
71. Rousselot P, Huguet F, Rea D, et al. Imatinib mesylate discontinuation in patients with chronic myelogenous leukemia in complete molecular remission for more than two years. *Blood* 2007;109:58–60.
72. Rowley JD. Identification of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia. *Ann Genet* 1973;16:109–112.
73. Schoch C, Schnittger S, Bursch S, et al. Comparision of chromosome banding analysis, interphase- and hypermetaphase-FISH, qualitative and quantitative PCR for diagnosis and follow-up in chronic myeloid leukemia: a study on 350 cases. *Leukemia* 2002;16:53-59.
74. Shaffer LG, Tommerup N. (2005). An International System for Human Cytogenetic Nomenclature
75. Sinclair PB, Green AR, Grace C, Nacheva EP. Improved sensitivity of BCR-ABL detection: a triple-probe three-color fluorescence in situ hybridization system. *Blood* 1997; 90:1395–1402.
76. Siu LLP , Ma ESK, WongWS, Chan MH, Wong KF. Application of tri-colour, dual fusion fluorescence in situ hybridization (FISH) system for the characterization of BCR-ABL1 fusion in chronic myelogenous leukaemia (CML) and residual disease monitoring *BMC Blood Disorders* 2009, 9:4

77. Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, et al: Prognostic discrimination in “good-risk” chronic granulocytic leukemia. *Blood* 1984;63:789-799.
78. Soysal T, Ar MC, Öngören Ş, Ferhanoğlu B, Aydın Y, Eşkazan E, Ülkü B, Başlar Z, Çetin G. Kronik Lenfositik Lösemi. *Hematoloji Derskitabı, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları*, 2008:149-156.
79. Soysal T, Ar MC, Öngören Ş, Ferhanoğlu B, Aydın Y, Eşkazan E, Ülkü B, Başlar Z, Çetin G. Kronik Myeloid Lösemi. *Hematoloji Derskitabı, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları*, 2008:157-171.
80. Soysal Y, Lösemilerin Sitogenetik, Moleküler Sitogenetik, Moleküler Genetik ve Klinik Değerlendirilmesi. 2005, Ankara, Doktora Tezi.
81. Soverini S, Martinelli G, Rosti G, et al. ABL mutations in late chronic phase chronic myeloid leukemia patients with up-front cytogenetic resistance to imatinib are associated with a greater likelihood of progression to blast crisis and shorter survival: a study by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 2005;23:4100–09.
82. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al, eds. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC;2008.
83. Tchirkov A, Giollant M, Tavernier F, et al. Interphase cytogenetics and competitive RTPCR for residual disease monitoring in patients with chronic myeloid leukemia during interferon-alpha therapy. *Br J Haematol* 1998;101:552-557.
84. Testoni N, Marzocchi G, Luatti S, Amabile M, Baldazzi C, Stacchini M, Nanni M, Rege-Cambrin G, Giugliano E, Giussani U, Abruzzese E, Kerim S, Grimoldi MG, Gozzetti A, Crescenzi B, Carcassi C, Bernasconi P, Cuneo A, Albano F, Fugazza G, Zaccaria A, Martinelli G, Pane F, Rosti G, Baccarani M. Chronic myeloid leukemia: a prospective comparison of interphase fluorescence in situ hybridization and chromosome banding analysis for the definition of complete cytogenetic response: a study of the GIMEMACMLWP. *Blood*, 2009, Vol. 114, No. 24:4939-4943

85. Thompson MW, Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, Thompson JS, Boerkoel CF III Genetics in medicine Thompson & Thompson Elsevier, 2004.
86. Tkachuk D, Westbrook C, Donlon T, Cleary M, Suryanarayan K, Homge M, et al. Detection of bcr-abl fusion in chronic myelogeneous leukemia by in situ hybridization. Science 1990; 250: 559 – 562.
87. Travade P, Chastang C, Dighiero G, Binet JL, Cooperative Group on CLL of Societe Française d'hematologie. New trends in CLL treatment. Blood Cells, 1987;12:485-496.
88. Tunalı A. Kan hastalıkları, İç hastalıkları, Dördüncü baskı, Editör: Öbek A. 1990:769-773.
89. Turgut B, Eşkazan E, Göksoy SH, Demir M, Nevruz O, Küçükaya DR, Karakuş S, Soysal T, Özbek U, Tangün Y. Türk Hematoloji Derneği. Kronik Miyeloid Lösemi ve Kronik Miyeloproliferatif Hastalıklar. Ulusal Tanı ve Tedavi Rehberi. Sürüm 1- Mayıs 2010 www.thd.org.tr.
90. Ünal Ş, Tuncer AM. Lösemide epidemiyoloji, tanısal yaklaşım ve sınıflandırma. Katkı pediatri dergisi: Lösemiler, Editörler, Kale G, Tuncer AM, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı ve Çocuk Sağlığı Enstitüsü Yayını, 2004:338-349.
91. Virchow R. Weißes Blut (Leukämie). Archiv für path Anat 1847;1:563.
92. Vysis Product Catalog, 2005:4-41.
93. Willams WS, Beutler E, Litchman MA, Coler BS, Kippt S, Mauner AM. Willam's Hematology, 5. Edition, McGraw Hill Company, New York, 1991;2209-2349.
94. Williams SK, Cummings MR. Gen Mutasyonu, DNA Onarımı ve Transpozisyon.. Genetik Kavramlar(çeviri)' da, Sekizinci Baskı, Editör, Öner C. Palme yayıncılık. 2009: 361-391.
95. Williams SK, Cummings MR. Hücre Döngüsünün Düzenlenmesi ve Kanser. Genetik Kavramlar(çeviri)' da, Sekizinci Baskı, Editör, Öner C. Palme yayıncılık. 2009:434-456.
96. Yılmaz E. (2005). İnsan moleküler genetiği için araçlar. Tıbbi genetik(çeviri)'de, Altıncı baskı, Editörler, Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, Güneş kitapevi, 33-49.

97. Zhu H-Q, XiaoLi Liu X-L, Song L-L, LiuQ-F, Meng F-Y, Zhou S-Y. Minimal residual disease monitoring in chronic myeloid leukemia patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using interphase fluorescence in situ hybridization and realtime quantitative reverse transcription PCR. Chinese Journal of Cancer, 2010; Vol. 29 Issue 2:194-197.

98. DU QF, Zhang S, Liu XL, Meng FY. Dual-color/dual-fusion interphase fluorescence in situ hybridization probe for monitorig tumor load during imatinib therapy for chronic myeloid leukemia. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2010 Jaan;30(1):123-5

