

T.C
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

KRONİK MYELOİD LÖSEMİ İLE IL-3, IL-6 VE IL-11 GEN
EKSPRESYONLARI ARASINDAKİ İLİŞKİ

Uzmanlık Tezi

Dr. Serhat SEYHAN

TRABZON - 2016

T.C
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

KRONİK MYELOİD LÖSEMİ İLE IL-3, IL-6 VE IL-11 GEN
EKSPRESYONLARI ARASINDAKİ İLİŞKİ

Uzmanlık Tezi

Dr. Serhat SEYHAN

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Alper Han ÇEBİ

TRABZON – 2016

ÖNSÖZ

Tıp Fakóltesi eğitimini tamamladıktan sonra severek ve isteyerek başladığım uzmanlık eğitiminin de son gúnlerine gelmiş bulunmaktayım. Uzmanlık eğitimim boyunca bilimsel anlamda bilgi ve becerilerinin yanında, hayatın her safhasında katkısını göreğine inandığım tecrübesiyle de bana her türlü desteği veren değerli hocam Prof. Dr. Mevlit İKBAL'e, her zaman desteğini yanımda hissettiğim ve tez çalışmamla ilgili her türlü konuda katkıyı sağlayan tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Alper Han ÇEBİ'ye, bilgisiyle bana öncülük etmiş olan Uzm. Dr. Muhammed Yunus ALP'e, birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum Arř. Gör. Dr. Hale ÖNDER YILMAZ, Arř. Gör. Dr. Murat Hakkı YARAR, Laborant Günay DİNÇ, Biolog Murat CENCİ, Laborant Güllü KILIÇ, Biolog Buse BİLECEN SEZER, Laborant Elmas CEBECİ, Laborant Halime CANÖZÜ KESKİN'e ve beraber çalışmanın yanında tez çalışmamda da desteklerini esirgemeyen Laborant Bediha KAYA ve Biolog Selma KADI KARAYAVUZ'a teşekkürü borç bilirim.

Hayata gözlerimi açtığım ilk andan bu günlere gelene dek üzerimde çok büyük emeği olan biricik annem ve babama, hayatımıza sonradan dahil olup renk katan kardeşime ve her zaman desteğiyle yanımda olan biricik eşime ithafen...

Dr. Serhat SEYHAN

ÖZET

Kronik Myeloid Lösemi ile IL-3, IL-6 ve IL-11 Gen Ekspresyonları Arasındaki İlişki

Giriş ve Amaç: KML hematopoetik kök hücrelerin transformasyonundan köken alan hematopoetik bir malignensidir. KML hastalarının çoğunda 9. ve 22. kromozomlar arasında bir translokasyon sonucu oluşan BCR-ABL geni saptanır. IL-3, IL-6 ve IL-11 myeloid seri hücrelerinin gelişimini etkileyen sitokinlerdir. Çalışmamızın amacı KML gelişimi ile IL-3, IL-6 ve IL-11 arasında bir ilişki olup olmadığının değerlendirilmesidir.

Materyal ve Yöntem: Bu çalışmada Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı'na bağlı Hematoloji Polikliniği'nde takip edilen 26 ile 82 yaşları arasında 33 KML hastasından ve hastanemiz poliklinik bünyesinde yapılan muayene ve tetkikler sonucu sağlıklı olduğu tespit edilen, yaşları 29 ile 81 arasında değişen 34 bireyden kan alınmıştır. Bu kanlardan RNA izole edilerek cDNA'lar sentezlendi. Bu cDNA'lar kullanılarak IL-3, IL-6 ve IL-11 gen ekspresyon analizleri yapıldı.

Bulgular: İlk tanı anında gelen ve BCR-ABL ekspresyonu yüksek olan KML hastalarındaki IL-3, IL-6 ve IL-11 gen ekspresyonları, sağlıklı bireylere oranla önemli derecede azalmıştı. BCR-ABL ekspresyonu olmayan, majör moleküler yanıt tespit edilen KML hastalarında ise ilk tanı anına göre IL-3, IL-6 ve IL-11 gen ekspresyonlarında artış söz konusuydu.

Tartışma: Elde ettiğimiz sonuçlara göre KML'deki BCR-ABL ekspresyonunun artışı normal hematopoezde etkili olan IL-3, IL-6 ve IL-11 gen ekspresyonuna ihtiyaç duymadan, neoplastik hücrelerin çoğalmasını sağlayabilmektedir. KML hastalarımızda BCR-ABL ekspresyonu ile IL-3, IL-6 ve IL-11 ekspresyonu arasında ters orantı mevcuttur. IL-3, IL-6 ve IL-11 gen ekspresyonlarının; BCR-ABL ekspresyon seviyesi ile ilişkisini belirlemek ve KML hastalarının takibinde kullanılmak üzere daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Kronik Myeloid Lösemi, IL-3, IL-6, IL-11

SUMMARY

Correlation between Expressions of IL-3, IL-6 and IL-11 Genes and Chronic Myeloid Leukemia

Introduction and Aim: Chronic myeloid leukemia (CML) is a hematopoietic malignancy originating from transformation of a hematopoietic stem cell. BCR-ABL gene that resulted from a translocation between chromosomes 9 and 22 is detected in the majority of CML patients. IL-3, IL-6 and IL-11 are cytokines that affects the development of myeloid cells. The aim of this study to evaluate the relationship between IL-3, IL-6 and IL-11 and CML development.

Material and Methods: This study was performed using peripheral blood from 33 patients followed in our hematology clinic at Karadeniz Technical University Medical School obtained with a diagnosis of CML. We get peripheral blood from 34 healthy people that examined in Karadeniz Technical University Medical Schools clinics. RNA was isolated from peripheral blood and cDNA is synthesized. Then cDNA expression analysis was performed.

Results: IL-3, IL-6 and IL-11 gene expressions significantly decreased in CML patients with high expression of BCR-ABL gene compared to healthy individuals. After major molecular response IL-3, IL-6 and IL-11 gene expressions increased compared with the initial diagnosis of CML.

Conclusions: According to the our results; increase of BCR-ABL gene expression in CML patients may provide the proliferation of neoplastic cells without effective IL-3, IL-6 and IL-11 gene expressions in normal hematopoiesis. Inverse relationship in our CML patients are available between BCR-ABL expression and IL-3, IL-6 and IL-11 expressions. Studies for IL-3, IL-6 and IL-11 gene expressions are needed to determine the relationship with BCR-ABL expression level and to be used follow up of patients with CML.

Key Words: Chronic Myeloid Leukemia, IL-3, IL-6, IL-11

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	i
ÖZET.....	ii
SUMMARY	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1.Hematopoez.....	2
2.1.1.İnterlökin3.....	5
2.1.2.İnterlökin 6 Ailesi	5
2.1.2.1.İnterlökin 6	5
2.1.2.2.İnterlökin 11	6
2.2. Lösemi	6
2.3. Kronik Myeloid Lösemi	7
2.3.1. Tanım	7
2.3.2. Tarihçe	7
2.3.3. Epidemiyoloji.....	8
2.3.4.Etyoloji.....	8
2.3.5.Patogeneze	9
2.3.6. KML Klinik Özellikleri	16
2.3.6.1. Semptomlar	16
2.3.6.2. Fizik Muayene Bulguları	17
2.3.7. Laboratuvar Bulguları.....	17
2.3.7.1. Hematolojik Bulgular	17
2.3.7.2.Kromozomal Bulgular	18
2.3.8. KML Sınıflandırması ve Klinik Seyir	18
2.3.8.1. Kronik Faz	19

2.3.8.2.Akselere Faz (Hızlanmış Evre)	19
2.3.8.3.Blastik Faz	20
2.3.9. Ayırıcı Tanı	20
2.3.10.Prognostik Faktörler	22
2.3.11. Tedavi	24
2.3.11.1.AllogeneikHematopoetik Kök Hücre Nakli	25
2.3.11.2.OtologHematopoetik Kök Hücre Nakli	28
2.3.11.3.TirozinKinaz İnhibitörleri.....	28
2.3.11.4. Yeni Ajanlar	30
2.3.11.5. Tedavisine Cevabın Takibi.....	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. Gereç	33
3.1.1. Hasta Grubu	33
3.1.2. Kontrol Grubu	33
3.1.3. Örneklerin Toplanması	33
3.1.4. Kullanılan Aletler	34
3.1.5. Kimyasal Malzemeler	34
3.2. Yöntem	35
3.2.1. Kan Örneklerinin Alınması ve Saklanması	35
3.2.2. RNA İzolasyonu	35
3.2.3. cDNA Sentezi	37
3.2.4. Ekspresyon Analizi	37
3.3. İstatistiksel Analiz	38
4. BULGULAR	39
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇ	57
7. KAYNAKLAR	58

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

ABD	: Aktin bağlayıcı domain
BCL-2	: B-cell CLL/Lymphoma 2
BFU-E	: Burstformingunits-erythroid
CaLB.	: Putatif kalsiyum bağımlı lipid bağlayıcı bölge
CC.	: Coiled-coil
CFU-E	: ColonyFormingUnits-erythroid
CFU-G	: ColonyFormingUnits-granulocyte
CFU-GEMM	: Colonyformingunit-granulocyteerythrocytemonocyte megakaryocyte
CFU-GM	: ColonyFormingUnit-Granulocyte/Macrophage
CFU-M	: ColonyFormingUnits-macrophage
CRP	: C-Reaktif Protein
CSF	: Koloni stimüle edici faktör
CT.	: Cycletreshold
DBD	: DNA bağlayıcı domain
DH	: DbI/CDC24 guanine-nucleotideexchange factorhomology
DNA.	: Deoksiribonükleik asit
Epo	: Eritropoetin
EUTOS	: EuropeanTreatmentandOutcomeStudy
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FL	: Flt3 ligand
g	: g kuvveti
GAB2	: GRB2-ilişkili bağlayıcı protein 2
G-CSF	: Granülositkoloni stimüle edici faktör
GM-CSF	: GranülositMakrofaj koloni stimüle edici faktör
GRB2	: Growthfactorreceptor-bound protein 2
HKHN	: Hematopoetik kök hücre nakli
ICSBP	: Interferonkonsensus dizisi bağlayıcı protein
IFN- α	: İnterferon-alfa
IFN- γ	: İnterferon-gama

IGF1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
IL-11	: İnterlökin-11
IL-3	: İnterlökin-3
IL-5	: İnterlökin-5
IL-6	: İnterlökin-6
JMML	:Juvenilmyelomonositik lösemi
kb	: kilobaz
KKA	: Klonalkromozomalanomali
KMML	: Kronik myelomonositik lösemi
KSY	: Kısmi sitogenetik yanıt
LIF	: Lösemi inhibitör faktör
M-CSF	: Makrofaj koloni stimüle edici faktör
MMY	: Majör Moleküler Yanıt
MPH	: Myeloproliferatif hastalık
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik asit
NES	: Nuclearexportingsignal
NLSs	: Nükleer lokalizasyon sinyalleri
OSM	: Onkostatin M
PDGFR	: Trombosit kaynaklı büyüme faktör reseptörü
PH	: Plekstrinhomoloji
PI3K.	: Fosfatidilinozitol 3-kinaz
PPs	: Prolin zengin SH3 bağlayıcı bölgeler
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RAC GAP	: RAC guanozintrifosfataz aktive edici protein
RNA	: Ribonükleik asit
Rpm	: Dakikadaki devir sayısı
S/T-K	: Serin/threoninkinaz
SCF	: Kök hücre faktörü
SDF1	: Stromal kaynaklı faktör-1
SH3	: SRC homoloji 3
SIPA1	: Signal-inducedproliferation-associated gene-1
SOS	: Son of sevenless

STAT1	: Signaltransducerandactivator of transcription 1
STI571	: Sinyal transdüksiyon inhibitörü 571
TGF- β 1	: Transforminggrowthfactor beta 1
THY	: Tam hematolojik yanıt
TKİ	: Tirozinkinaz inhibitör
TNF- α .	: Tümör nekrozu faktörü alfa
Tpo.	: Trombopoetin
TSY	: Tam sitogenetik yanıt
Y177	: Tirozin 177
Y-K	: Tirozinkinaz



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.	Hematopoez	3
Şekil 2.	BCR ve ABL Genlerindeki Kırılma Noktalarının Lokalizasyonları ve Çeşitli Kırılma Noktalarından Elde Edilen KimerikmRNA'ların Yapısı.....	11
Şekil 3.	ABL1 ve BCR Genlerinin Proteinleri	13
Şekil 4.	p210 BCR/ABL'in Lökomojenik Sinyalleri.....	14
Şekil 5.	BCR-ABL Pozitif Hücrelerdeki Aktive Sinyal Yolakları	16
Şekil 6.	Kronik Fazdaki KML Hastalarının Tedavisindeki Tarihsel (1845-2012) Gelişim.....	25
Şekil 7.	S Grubu için GAPDH Amplifikasyon Eğrileri.....	40
Şekil 8.	H ve D Grubu için GAPDH Amplifikasyon Eğrileri	40
Şekil 9.	S ve H Grubu için IL-3 Amplifikasyon Eğrileri.....	42
Şekil 10.	D Grubu için IL-3 Amplifikasyon Eğrileri.....	42
Şekil 11.	S Grubu için IL-6 Amplifikasyon Eğrileri	44
Şekil 12.	H ve D Grubu için IL-6 Amplifikasyon Eğrileri	44
Şekil 13.	S ve H Grubu için IL-11 Amplifikasyon Eğrileri.....	46
Şekil 14.	D Grubu için IL-11 Amplifikasyon Eğrileri.....	46

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Hematopoetik Sitokinler	4
Tablo 2. Hematopoezdeki Hücrelere Etkili Sitokinler	4
Tablo 3. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ-2008) KML Akselere Faz Tanı Kriterleri	19
Tablo 4. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ-2008) KML Blastik Faz Tanı Kriterleri	20
Tablo 5. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ-2008) Atipik Kronik Myeloid Lösemi Tanı Kriterleri	21
Tablo 6. Sokal Skor Hesaplaması	23
Tablo 7. Hasford (Euro) Skor Hesaplaması	23
Tablo 8. EUTOS Skor Hesaplaması	24
Tablo 9. KML'de Transplantasyon Sonucunu Etkileyen Faktörler	27
Tablo 10. Mevcut TKİ'lerinin Başarısız Olduğu T315I mutasyonu olanlarda Yeni Geliştirilen Ajanlar	30
Tablo 11. Tam Hematolojik Yanıt Kriterleri	31
Tablo 12. KML'nin Her Üç Fazındaki Hastalarda 1. Basamak TKİ ve İntolerans Nedeniyle 2. Basamak TKİ'lerine Yanıt Tanımları	32
Tablo 13. Tedaviye Alınan Cevapların Tanımları	32
Tablo 14. Gruplardaki Cinsiyet, Yaş ve Lökosit Sayısı Dağılımı	39
Tablo 15. S, H ve D Grubu GAPDH CT değerleri	41
Tablo 16. S, H ve D Grubu IL-3 CT Değerleri	43
Tablo 17. S, H ve D Grubu IL-6 CT Değerleri	45
Tablo 18. S, H ve D Grubu IL-11 CT Değerleri	47
Tablo 19. S, H ve D Grupları Arasındaki IL-3 Ekspresyon Oranları	48
Tablo 20. S, H ve D Grupları Arasındaki IL-6 Ekspresyon Oranları	48
Tablo 21. S, H ve D Grupları Arasındaki IL-11 Ekspresyon Oranları	49

1. GİRİŞ

İnterlökin-3 (IL-3), interlökin-6 (IL-6) ve interlökin-11 (IL-11) hematopoezde özellikle myeloid hücrelerin gelişiminde çok etkili olan sitokinlerdir. Kronik myeloid lösemi (KML) 9. ve 22. kromozomlar arasında bir translokasyon sonucu BCR-ABL onkogeninin oluştuğu ve buna bağlı olarak myeloid hücrelerin kontrolsüz şekilde aşırı çoğalmasıyla seyreden bir hastalıktır. Lökositöz başta olmak üzere çeşitli klinik sonuçlara sebep olabilmektedir.

Araştırmamızın amacı sağlıklı bireylerdeki hematopoezde myeloid kök hücrelerin gelişimden başlayıp, myeloid seri hücrelerinin birçoğunda da gelişimi indükleyen IL-3, IL-6 ve IL-11 genlerinin, KML gelişen hastalardaki ekspresyonunu araştırarak; sağlıklı bireyler ile hastalar arasında fark olup olmayacağını gözlemlemektir. İlk tanı anında gelen ve BCR-ABL translokasyonu pozitif olan KML hastalarının ve yine bu hastaların çalışma süresi içinde Majör Moleküler Yanıt (MMY) ulaşanlarının iki örneği arasında da sözü edilen genlerin ekspresyonunu gözlemlemektir. BCR-ABL onkogeni çeşitli yollar üzerinden malign hücrelerin proliferasyonunu hızlı bir şekilde artırırken; normal hematopoezde myeloid hücrelerin gelişimi için önemli yer tutan sitokinlerin bu KML’de bu yollar üzerinde yer alıp almadığını araştırmaktır. İlişkinin belirlenmesi KML hastalığının patofizyolojisi hakkında bilgi sağlanmasının yanı sıra hastalıktaki risk hesaplamalarında ve tedaviye yanıtta önemi olan hücrelerdeki sayısal bozuklukların nedenleri hakkında da fikir yürütebilme imkanı sağlayacaktır. Anlamlı bir ilişki bulmamız halinde önlem alma ve tedavi noktasında da daha ileri adımların atılmasının önü açılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

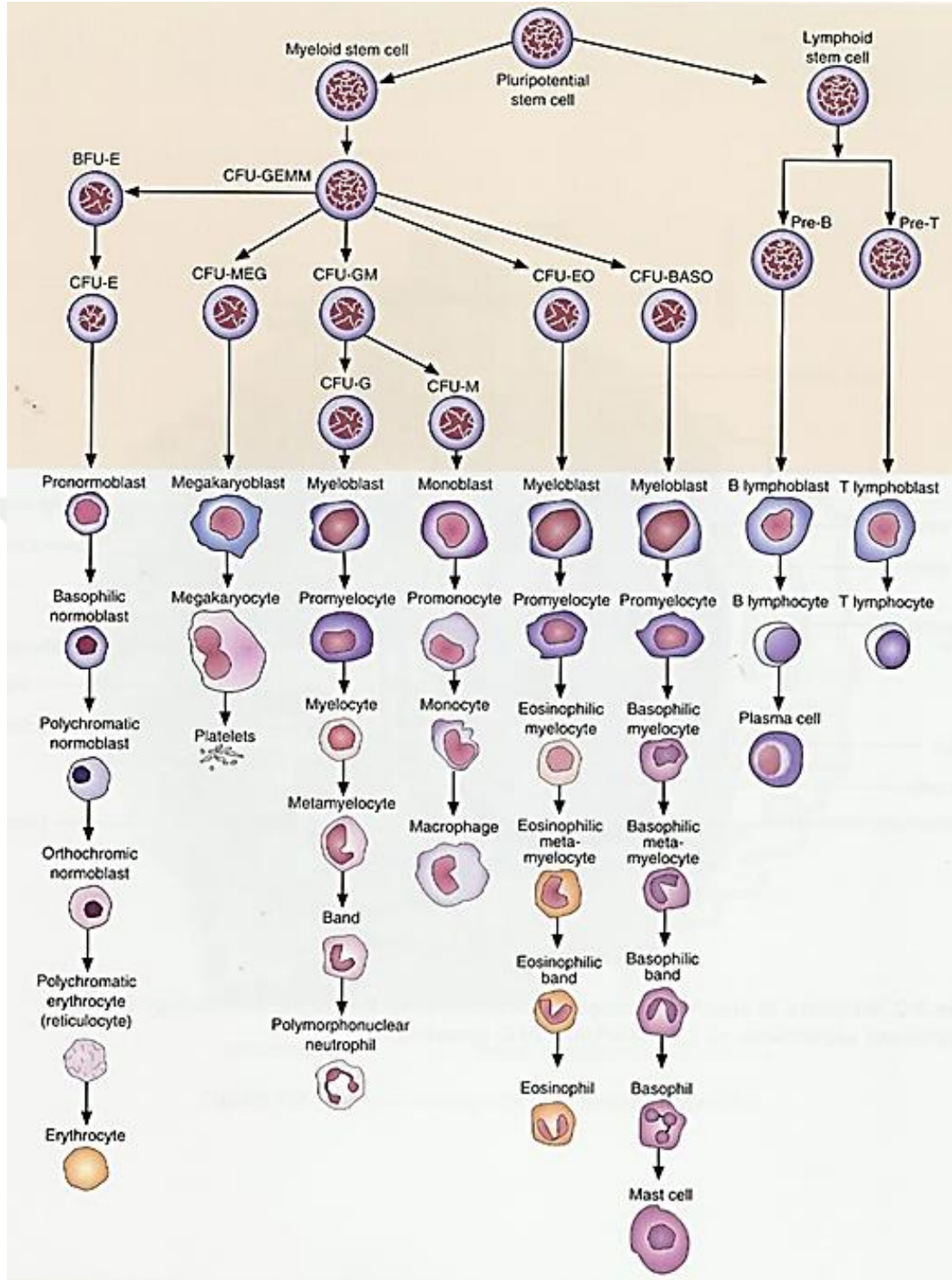
2.1. Hematopoez

Hematopoez kanda mevcut bulunan tüm hücre tiplerinin, primer olarak kemik iliğinde bulunan kök hücreler tarafından geliştiği, her gün yaklaşık 4×10^{11} hücrenin; ihtiyaç halinde 10 kat ve daha da fazla üretildiği kompleks bir mekanizma bütünüdür (1).

Hematopoez; replikasyon, proliferasyon ve farklılaşma yeteneklerine sahip pluripotent hematopoetik kök hücre ile başlar. Daha sonra bu pluripotent kök hücre sitokin ve faktörlerin etkisiyle lenfoid veya myeloid kök hücrelere diferansiye olur. Şekil 1’de gösterildiği gibi Lenfoid kök hücreler çoğalarak T, B ve natural killer hücrelere farklılaşırken, myeloid kök hücreler ise granülosit, monosit, eritrosit ve megakaryositleri oluşturur (2).

Beyaz kan hücreleri de denilen lökositler, vücudun koruyucu sisteminin mobil birimleridir. Bu birimler kısmen kemik iliği (granülositler, monositler ve birkaç lenfosit) ve kısmen de lenf dokusunda (lenfositler, plazma hücreleri) oluşturulmaktadır. Oluştuktan sonra, kanda vücudun ihtiyacı olan farklı bölgelerine taşınırlar (3).

Hematopoetik yolaktaki hücrelerin bölünmesi için sitokinler olarak bilinen çok sayıda faktörün varlığına ihtiyaç duyulmaktadır. Sitokinler hematopoetik hücreler üzerinde stimülatör, kostimülatör, inhibitör veya çok sayıda farklı aktiviteye sahiptir. Aktif sitokinler Tablo 1 ve 2’de yer almaktadır (4).



Şekil 1. Hematopoez

Tablo 1. Hematopoetik Sitokinler

Stimülatör Faktörler
• Granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF)
• Granülosit Makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF)
• Makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF)
• IL-3
• Eritropoetin (Epo)
• Trombopoetin (Tpo)
• İnterlökin-5 (IL-5)
Kostimülatör Sitokinler
Hematopoetik Etkili Klasik Büyüme Faktörleri
• Stem cell factor (SCF)
• Flt3 ligand (FL)
IL-6 Ailesi
• IL-6
• IL-11
• Lösemi inhibitör faktör (LIF)
• Oncostatin M (OSM)
Hematopoetik Etkili Diğer İnterlökinler
• IL-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12, IL-17, IL-20, IL-31

Tablo 2. Hematopoezdeki hücrelere etkili sitokinler

Hematopoetik Süreç	Aktiviteyi artıran önemli sitokinler
Eritropoez	Epo, SCF, IGF-1 [*] , IL-9, IL-3, Tpo, IL-20, SDF-1 ^{**}
Megakaryopoez	Tpo, IL-3, IL-6, IL-11, LIF, SCF, Epo, SCF, FL ^{***}
Mast hücre oluşumu	IL-3, SCF, IL-10?
Eozinofil oluşumu	IL-5, IL-3, GM-CSF, SCF
Granülopoez	G-CSF, GM-CSF, IL-3, SCF, IL-6, FL ^{***} , SDF-1 ^{**}
Makrofaj oluşumu	M-CSF, GM-CSF, IL-3, FL ^{***} , SDF-1 ^{**}
Lenfosit üretimi	IL-7, FL ^{***} , SCF, SDF-1 ^{**} , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-15, notch ligands
[*] IGF1: İnsülin benzeri growth faktör-1 ^{**} SDF1: Stromal derived factor-1 ^{***} FL: Flt3 ligand	

2.1.1. İnterlökin 3

İhle ve arkadaşlarının 1981 yılında farelerde yaptığı çalışmalarda hematopoetik hücrelerde 20 alfa hidroksisteroid dehidrogenaz enzim sentezini indükleyen, daha sonra IL-3 olarak adlandırılacak olan T hücre kaynaklı bir faktör bulmuştur (5, 6). IL-3 ağırlıklı olarak aktif T lenfositlerde üretilen bir sitokin olmasına rağmen mast hücreleri gibi diğer hücre tiplerinde eksprese edildiği bildirilmiştir. IL-3 multiple hematopoetik hücrelerde geniş etkiye sahip olduğu için multi-koloni stimüle edici faktör (multi-CSF) olarak da adlandırılır. IL-3'ün aktivitesi tek başına sınırlıdır; hematopoetik hücrelerin büyümesini stimüle etmek için birkaç sitokinin etki göstermesi gereklidir. IL-3, multipotent progenitörlerin proliferasyonunu uyarır ve erken hematopoetik progenitörlerin hayatta kalmasına katkıda bulunur. IL-3, lenfoid progenitörlerin üzerinde olumsuz bir etki gösterir. IL-3 Colony Forming Unit-Granulocyte Macrophage (CFU-GM)'ın direkt stimülatörüdür. IL-3; IL-5 ile birlikte eozinofil oluşumunu, IL-11 ve SCF ile birlikte megakaryosit oluşumunu indükler. IL-3'ün bazofiller için başlıca büyüme ve gelişme faktörü olduğu düşünülmektedir. IL-3, bazofilleri aktive eder ve histamin salınımına neden olur (4).

2.1.2. İnterlökin-6 Ailesi

IL-6 aile üyeleri birden fazla özelliklere sahiptir. Hematopoetik faaliyetleri bu ailenin dört üyesi gerçekleştirmektedir: IL-6, IL-11, LIF ve OSM. Erken hematopoetik progenitörlerin aktivitesini stimüle ederler ve megakaryositik hücreleri indüklerler (4).

2.1.2.1. İnterlökin 6

IL-6, immünoglobulinleri üreten B lenfositleri indükleyen sitokindir. IL-6; IL-3 ve diğer erken etkili sitokinlerle beraber erken hematopoetik progenitörlerin proliferasyonunu destekler. Ayrıca GM-CSF ve M-CSF ile birlikte sırasıyla granülosit ve makrofaj oluşumunda görev alırlar. IL-6, diğer megakaryositik büyüme

faktörlerinin varlığında olgunlaşmamış megakaryositleri uyarır. IL-6 miyelom hücre çoğalması majör sitokin olup ayrıca hepatosit akut faz reaktanı faktörüdür (4). IL-6 diyabet, ateroskleroz, depresyon, Alzheimer hastalığı, sistemik lupus eritematozus, multiple myelom, prostat kanseri, Behçet hastalığı ve romatoid artrit gibi pek çok hastalıkta inflamasyon ve oto-immün süreci stimüle eder (7-15).

2.1.2.2. İnterlökin 11

IL-11 ilk olarak 1990 yılında kemik iliği kaynaklı stromal hücrelerden izole edilen multifonksiyonel bir sitokindir (16). IL-11, primer hematopoetik fonksiyonları olan bir sitokindir. IL-11'in tek başına hematopoez üzerindeki etkisi minimaldir ama GM-CSF, SCF, IL-3, IL-4, IL-6 ve Tpo gibi birkaç sitokinle beraber hücrelerin oluşumuna katkı sağlar. IL-11'in hematopoetik etkisi megakaryositik hücrelerde en belirgindir. Ayrıca bu etkinlik colony forming unit-granulocyte, erythrocyte, monocyte, megakaryocyte (CFU-GEMM), CFU-GM, burst forming units-erythroid (BFU-E), colony forming units-granülosit (CFU-G), colony forming units-erythroid (CFU-E) ve colony forming units-macrophage (CFU-M) gibi diğer hematopoetik progenitörlere kadar uzanır (4). IL-11 rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak *Oprelvekin* adıyla üretilmiş olup, ağır trombositopeniyi önlemek için kullanılmaktadır (17, 18).

2.2. Lösemi

Myeloid veya lenfoid hücrelerin gelişimi esnasında ortaya çıkan mutasyonların neden olduğu, lökositlerin kontrolsüz şekilde çoğalmasına lösemi adı verilir. Dolaşımda anormal lökositlerin büyük ölçüde artmasıyla karakterizedir (3).

Lenfositik lösemiler genellikle lenf nodu ya da diğer lenfoid dokulardan başlayan ve vücudun diğer bölgelerine yayılan, lenfoid hücrelerin kontrolsüz çoğalmasından kaynaklanır. Myeloid lösemi ise; kemik iliğinde, genç myeloid hücrelerindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkan, özellikle lenf düğümleri, dalak, karaciğer gibi birçok ekstrameduller dokuya ve vücuda yayılan bir lösemi tipidir. Myeloid lösemi, bazen parsiyel farklılaşmış hücreler sonucu nötrofilik lösemi,

eozinofilik lösemi, bazofilik lösemi veya monositik lösemi olarak sonuçlanabilir. Daha sıklıkla lösemi hücreleri farklılaşmamıştır; morfolojik olarak sıradışı şekilli ve normal lökositlerle özdeş değildir. Genellikle daha az farklılaşan hücreler; daha çok akut lösemidir. Tedavisiz kalırsa sıklıkla birkaç ay içinde ölüme neden olur. Daha fazla farklılaşan hücrelerden bazıları ise 10-20 yıla kadar yavaş gelişebilen kronik seyirli lösemiler olabilmektedir (3).

2.3. Kronik Myeloid Lösemi

2.3.1. Tanım

Kronik Myeloid Lösemi (KML) primitif hematopoetik hücrelerin transformasyonundan köken alan hematolojik bir malignensidir (19). Kronik miyelositik lösemi ve kronik granülositik lösemi olarak da adlandırılan KML miyeloid hücre serilerinin aşırı üretimi ile karakterize hematopoetik kök hücrelerin klonal miyeloproliferatif hastalığıdır (20).

2.3.2. Tarihçe

KML ilk defa 1845 yılında farlı bir antite olarak tanımlanmıştır (21). John Hughes Bennett çok büyümüş bir dalak ile kaybedilen genç bir erkek hasta tariflemiştir (21). D. Craigie de yine aynı yıl kanındaki pürülan maddeye bağlı dalak hastalığı sonucu ölen bir vaka yayınlamıştır (22). Bu yıllarda KML başka bulgu olmaksızın sadece masif splenomegali ve lökositoz ile açıklanmaya çalışılmıştır. KML'nin modern tarihçesi 1960 yılında Peter Nowell ve David Hungerford ile başlar (19). Peter Nowell ve David Hungerford 1960 yılında Ulusal Bilimler Akademisinde çalıştıkları 7 kronik granülositik lösemi hastasının her birinde diğer lösemi türlerinden farklı olarak lösemik hücrelerin anormal küçük bir kromozom içerdiğini açıklamışlar ve sonrasında da yayınlamışlardır (23). Böylece insan neoplazilerindeki ilk kromozom anomalisi tanımlanmıştır (24). Daha sonra keşfedildiği şehirden esinlenerek Philadelphia kromozomu olarak isimlendirilmiştir (19). 1970'li yıllarda kromozom bantlama teknikleri geliştikten sonra 1973 yılında Chicago

Üniversitesinden Janet D. Rowley Ph kromozomunun 9. ve 22. kromozomlar arasında meydana gelen resiprokal bir translokasyon sonucu olduğunu göstermiştir (25). 1982 yılında Abelson onkogeninin 9. kromozomdan 22. kromozoma transloke olduğu gösterilmiştir (26). 1990 yılında da BCR-ABL geninin tirozin kinaz aktivitesine sahip kimerik bir protein kodladığı, yine aynı yıl içinde, oluşan bu füzyon genin farelerde KML gelişimine neden olduğu yayınlanmıştır (27,28).

2.3.3. Epidemiyoloji

KML en sık görülen myeloproliferatif hastalıktır. Tüm lösemi vakalarının yaklaşık %15-20'sini oluşturur (19). KML'nin yıllık insidansı ortalama 1,5/100.000'tur ve yaşa göre görülme sıklığı erkeklerde kadınlara oranla daha yüksektir (E/K=1,1-1,9) (29). Yıllık insidansı ülkelere göre değişmekle birlikte ABD'de bu oran 1,75/100.000'e kadar çıkarken birçok Avrupa ülkesinde 0,7-1/100.000 ve bazı doğu ülkelerinde ise 0,4/100.000 gibi daha düşüktür (30). ABD'de her yıl 4000 yeni vaka bildirilmektedir (31). KML sıklığı 40'lı yaşların ortalarına kadar yavaş yavaş artar, daha sonra yaşla birlikte hızlı bir yükselme görülür (29). Tanı anında ortalama yaş 57-60'dır (30).

Çocuklarda ise KML 0,6-1,2 milyon çocuk/yıl insidansı ile çok nadir görülen bir hastalıktır (32). Tüm çocukluk lösemilerinin sadece %3'ünü oluşturur (19).

2.3.4. Etyoloji

KML insidansı artan yaş ve iyonize radyasyona maruziyet ile beraber artmaktadır (33). Atom bombası atılan yerlerdeki hayatta kalan kişilerde insidansın arttığı bildirilmiştir. Ancak Çernobil faciası sonrası hayatta kalanlarda KML insidansında artış olmaması, sadece yüksek doz radyasyona maruziyetin KML gelişimini indüklediğini düşündürmektedir. Ne sitotoksik ilaçlara maruziyetle ne de viral bir etyolojiyle ilgili kesin kanıt bulunamamıştır. İmatinibin tedavide kullanılmadığı önceki yıllarda sigara kullanımının blastik krize geçişi hızlandırdığı ve hayatta kalma üzerinde olumsuz etki ettiği bildirilmiştir (29). Ancak 2015 yılında

Albertini ve arkadaşlarının yapıkları bir çalışmada 1,3-butadiene olan maruziyetin insanlarda KML ile ilişkili olabileceği göstermişlerdir (34).

2.3.5. Patogenez

KML gelişiminde t(9;22) sonucu oluşan füzyon geninin rolü büyüktür (29). KML’li birçok hastanın karyotipi çeşitli bantlama teknikleriyle incelenmiş ve %92’sinde t(9;22) tespit edilmiştir (35). Ayrıca t(9;22) %25-30 erişkin ALL ve %2-10 çocuk ALL vakalarında ve nadir olarak da AML’de gözlenebilir (36). Ph translokasyonunda, 9. kromozomdaki ABL geninin 3^l kısmı, 22. kromozomdaki BCR geninin 5^l kısmına eklenir ve sonuç olarak hibrid BCR-ABL geni oluşur (37).

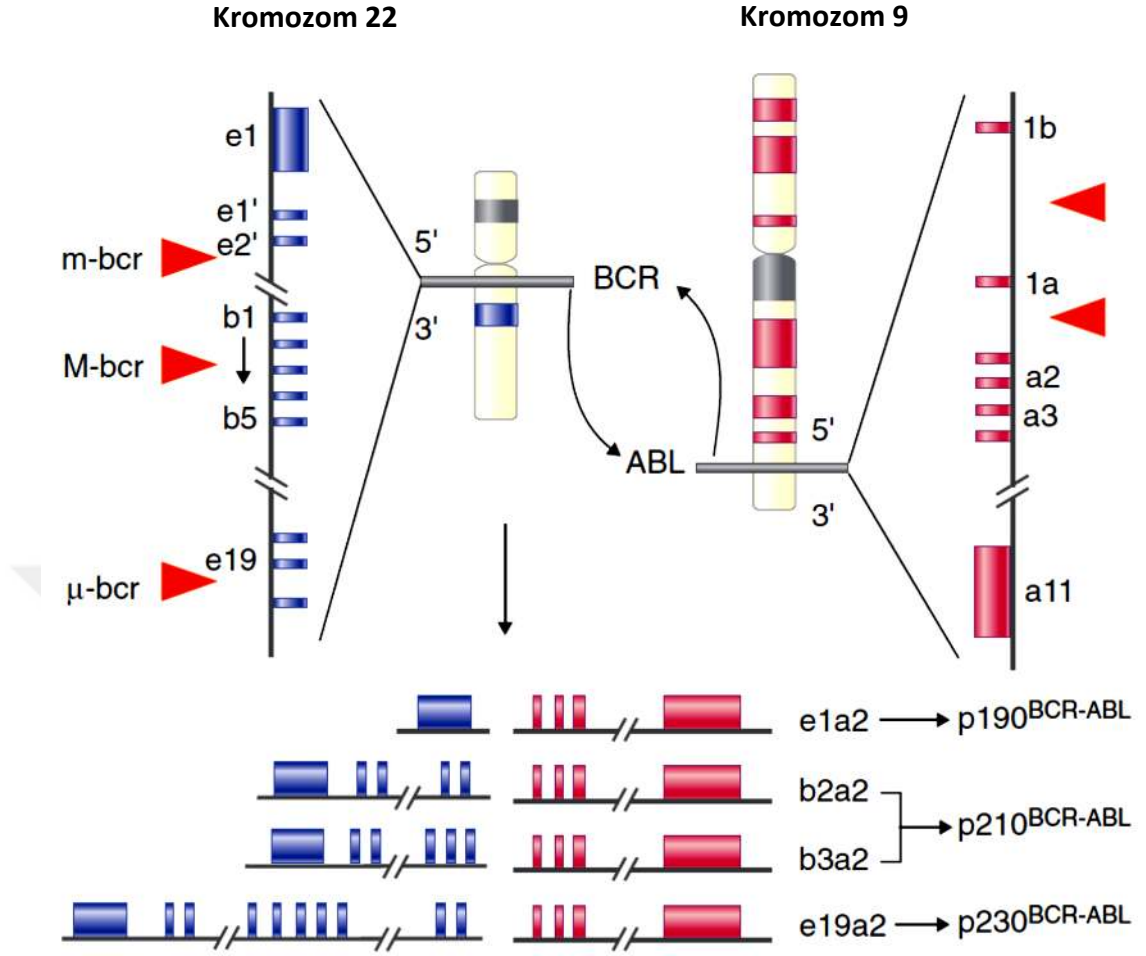
ABL1 geni farelerde lösemiye neden olan Abelson virüsün (v-ABL) homologudur (20). ABL1 hücre farklılaşması, hücre bölünmesi, hücre adezyonu ve stres yanıtı süreçlerine dahil olan sitoplazmik ve nükleer tirozin kinaz proteini kodlayan bir protoonkogendir (38). ABL1 geni 145 kD ağırlığında bir protein olan nonreseptör tirozin kinazı kodlar (36). ABL1 geni ekzon 1a ve 1b’den oluşan iki alternatif spliced ekzonları ile ortak olan 2-11 ekzonlarından oluşur (39). ABL1 geninden ilk ekzon alternatif splicinge uğrayarak 6 veya 7 kilobaz (kb)’lık mesajcı ribonükleik asit (mRNA) sentezleyebilir. Ekzon 1a ile kodlanan ABL proteini (ABL1A) nükleusta lokalize olurken; ekzon 1b ile kodlanan ABL proteini plazma membranına yönlendirilir (36).

BCR geni 22q11.23’de yer alan, 160 kD ağırlığında serin-treonin kinaz ile ilişkili fosfoproteini kodlar (40, 41). BCR geni 23 ekzonludur ve 135 kb’lık bir yer kaplar (42). BCR geninin 1. ve 2. ekzonları alternatif oluşturur (36). BCR geni birkaç protein substrat için otofosforilasyon ve transfosforilasyon aktivitesine sahiptir. Fosfotransferaz aktivitesi için ilk ekzon gereklidir (43).

BCR-ABL translokasyonu sonucunda 185-230 kD arasında füzyon proteinleri oluşabilir (44). BCR-ABL translokasyonunun üç baskın izoformu tanımlanmıştır (45). BCR-ABL’in bu üç izoformu, kendi moleküler ağırlıklarına bağlı olarak p210, p190 ve P230 şeklinde tarif edilmiştir (46). BCR geni genellikle ekzon 2 (a2)’nin 5^l ucundan kırılan ABL geni ile kaynaşır. Yani BCR-ABL boyutunu BCR’in kırılma noktası belirler (47). KML hastalarının çoğunluğu, ALL hastalarının 1/3’de BCR

kırılma noktası; *major breakpoint cluster region* (M-bcr) olarak da bilinen ekzon 12 (e12; eski kullanımıyla b1)'den ekzon 16 (e16; eski kullanımıyla b5)'ya kadar geniş bir bölgeyi kapsayabilir(48). Çoğunluğundaki kırılma 13. ekzon (e13; b2)'dan veya 14. ekzon (e14; b3)'dan sonraki intronda meydana gelir. e13a2 (b2a2) veya e14a2 (b3a2) şeklinde oluşan BCR-ABL mRNA transkripti 8,5 kB büyüklüğünde diziye ve 210 kD ağırlığında füzyon proteini kodlar (48). Oluşan bu yeni proteine molekül ağırlığından dolayı p210^{BCR-ABL} adı verilir (20).

Ph pozitif ALL hastalarının çoğunda, KML hastalarının az bir kısmında ve nadir olarak da AML hastalarında görülen BCR bölgesi kırıkları majör-bcr'ın upstream bölgesinde yer alan *minör breakpoint cluster region* (m-bcr) denilen intronik bölgede görülür. m-bcr'daki kırık bölgesi genellikle 1. ekzondan (e1) sonraki intronik bölgede, e1a2 olacak şekilde meydana gelir. Bu şekilde oluşan mRNA transkripti 7 kB uzunluğunda bir dizi ve 190 kD ağırlığında füzyon proteini kodlar. Oluşan bu proteine de p190^{BCR-ABL} adı verilir. Kronik nötrofilik lösemi vakalarının çoğuyla ilişkili olabilen daha nadir diğer bir kırık bölgesi 19. ve 20. ekzon arasında *micro-bcr* (μ -bcr)'da gerçekleşir. e19a2 şeklinde oluşan transkript 230 kD ağırlığında onkoprotein kodlar ve p230^{BCR-ABL} olarak adlandırılır (49, 50). Şekil 2'de BCR-ABL translokasyonu sonucu oluşan üç izoform gösterilmektedir (20).



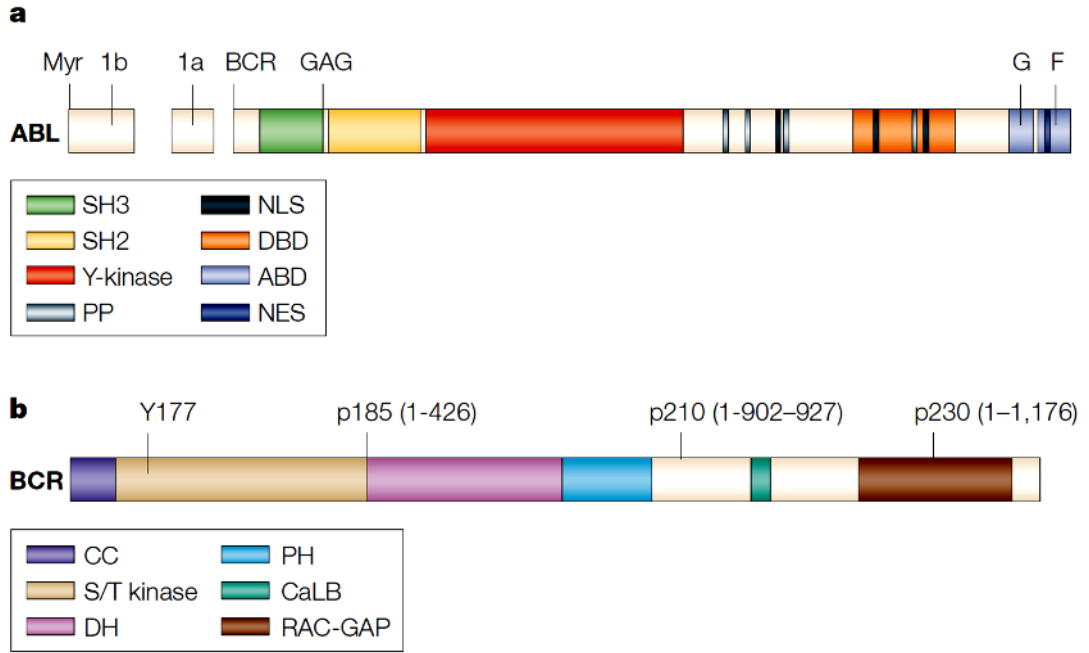
Şekil 2. BCR ve ABL Genlerindeki Kırılma Noktalarının Lokalizasyonları ve Çeşitli Kırılma Noktalarından Elde Edilen Kimerik mRNA'ların Yapısı

ABL proteinini hücrenin hem çekirdek hem de sitoplazmasında bulunmakta ve bu ikisi arasında da bir shuttle gibi işlev görmektedir. Hücre yüzey büyüme faktör ve adezyon reseptöründen gelen sinyalleri hücre iskelet yapısını düzenleyen sinyallere çevirir (51, 52). Farelerde ABL geninin homozigot olarak hasarı daha küçük boyutlu olmalarına, lenfopeni, osteoporoz, perinatal mortalite insidansında artışa, anormal baş ve göz gelişimi gibi değişken fenotiplere yol açabilir (53, 54). ABL geninin SH1 bölgesi (Tirozin kinaz domain, Y kinaz) çoğu dokuda eksprese olan non-reseptör tirozin kinazı kodlamaktadır (19, 55). Tirozin kinazlar, ATP'den substrat proteinlere fosfat gruplarının transferini sağlayarak büyüme ve farklılaşmada rol oynarlar. Tirozin kinaz aktivitesinin sıkı kontrolü çok önemli olup; herhangi bir şekilde kontrol kaybı maligniteye yol açabilir (55).

Birinci ekzonun alternatif şekilde kesilmesiyle oluşan iki ABL izoformu (1a ve 1b) oluşur ve bunlardan biri (1b) bir miristoilasyon modifikasyon alanı (Myr) içerir. Miristoilasyon, proteinlerin amino terminalindeki glisine 14 karbonlu doymuş yağ asidi olan miristatin bağlanma işlemidir. Alternatif olarak kesilen dizilerin yanında ABL'in amino ucu SH3, SH2 ve tirozin kinaz (Y kinaz) domainleri içerir. SH3 ve SH2 domainleri bir kelepçe gibi tirozin kinazı kontrol altında tutan otoinhibitör yapıya sahiptir (56, 57). ABL1b'de amino terminalinin en uç noktasında yer alan miristol grubu ayrıca tirozin kinaz bölgesine bağlanır ve SH2 ve SH3 kelepçesini tutan bir mandal gibi çalışır (56, 58). ABL1'in karboksi terminal bölgesi prolinden zengin dört tane SH3 binding bölgesi (PPs), üç nükleer lokalizasyon sinyali (NLSs), nükleer export sinyali (NES), DNA bağlayıcı domain (DBD) ve aktin bağlayıcı domain (ABD) içerir. Aktin bağlayıcı domain hem monomerik (G) hem de filamentöz (F) aktin formları için bağlanma bölgeleri içerir. Şekil 3'te ABL1 ve BCR genlerinin proteinleri gösterilmektedir (59).

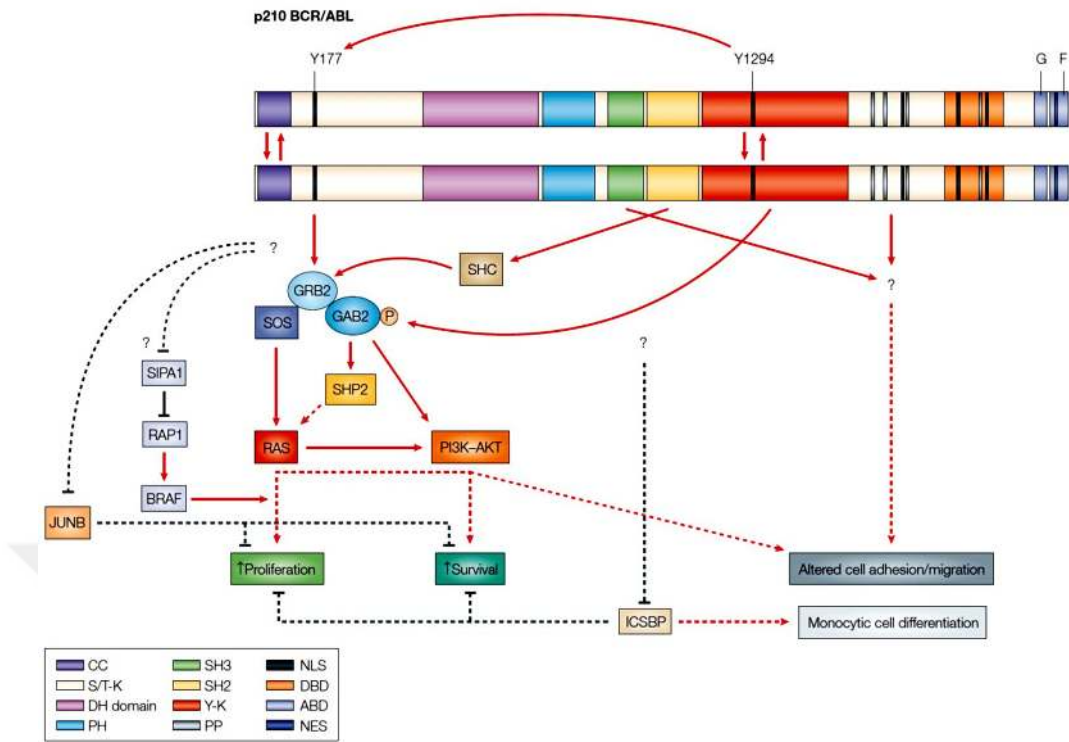
BCR geni multiple modüler domainler içeren bir sinyal proteini kodlar (19, 59). BCR hasarı olan farelerde gelişim normalken, nötrofiller aktivasyonu takiben yüksek miktarda oksijen metabolit üretimine neden olur (60).

BCR geni sarmal bobin (coiled-coin, CC) oligomerizasyon domaini, serin/threonin (S/T) kinaz domaini, Dbl/CDC24 guanin nükleotit değişim faktör homolojisi (DH) domaini, plekstrin homology (PH) domaini, putatif kalsiyum bağımlı lipid bağlayıcı bölge (CaLB) ve RAC guanozin trifosfataz aktive edici protein (RAC GAP) domaini içerir. BCR aynı zamanda hem tirozin 177 (Y177)'de büyüme faktör reseptörüne bağlı protein 2 (GRB2) için hem de SH2 domainleri yoluyla GRB-10, 14-3-3 ve ABL proteini için bağlanma bölgeleri içermektedir. (Şekil 3).



Şekil 3. ABL1 ve BCR Genlerinin Proteinleri

BCR-ABL proteinleri CC domainleri ve transotofosforilat yoluyla dimerler veya tetramerler oluşturabilirler. Y177'deki fosforilasyon büyüme faktör reseptörüne bağlı protein 2 (GRB2) için yüksek afiniteli bir bağlayıcı bölge meydana getirir. GRB2 SH2 domaini aracılığıyla BCR-ABL'e ve SH3 domaini yoluyla da GAB2 ve SOS'a bağlanır. SOS RAS'ı aktif hale getirir. Fosforilasyonu takiben GAB2, PI3K ve SHP2 proteinlerini aktive eder. ABL'in SH2 domaini SHC'ye bağlanabilir ve fosforilasyonu takiben GRB2'yi uyarabilir. ABL'in SH3 domaini ve karboksi terminal bölgesindeki SH3 binding bölgeleri hücre adezyon ve migrasyonunun regülasyonunu içeren birkaç protein bağlayabilmektedir. İnterferon regülatör faktör 8 olarak da bilinen İnterferon consensus dizisi bağlayıcı protein (ICSBP) myeloid hücrelerin hayatta kalmasını ve proliferasyonunu negatif yönde regüle eder. JUNB de RAS'ın antagonisti gibi davranarak hücrelerin hayatta kalmasını ve proliferasyonunu inhibe eder. SIPA1 (signal-induced proliferation-associated gene-1) ise RAP1'i inaktif halde tutar. BCR-ABL; RAS, SHP2 ve PI3K sinyal yollarını aktive ederek hücrelerin hayatta kalmasını ve proliferasyonunu kısmen destekleyebilir. Aynı zamanda ICSBP ve JUNB'nin transkripsiyonlarını downregüle edebilir ve ayrıca da SIPA1'i inhibe edebilir (Şekil 4) (59).



Şekil 4. p210 BCR/ABL’in Lökomojenik Sinyalleri

ABL’in SH3 domaininin delesyonu artan tirozin kinaz aktiviteli mutant bir protein oluşumuna yol açar ve in vitro olarak bu mutant protein fibroblast ve hemapoetik hücrelerde transformasyona neden olur. Ancak, yalnızca farelerde çok büyük bir gecikme ile lenfoid lösemi/lenfoma oluşumunu uyarmıştır (61, 62). SH3 domaininin delesyonu olan BCR-ABL’in mutant formu fatal myeloproliferatif hastalığa neden olur (62). Bu bulgular SH3 domaini kaybı yoluyla ABL tirozin kinazının aktive olmasının KML benzeri myeloproliferatif hastalığa neden olmak için yeterli olmadığını göstermekte ve KML benzeri hastalıkların gelişimi için BCR-ABL’in diğer domainleri de gereklidir (59).

BCR’ın CC oligomerizasyon domaini ABL’in tirozin kinaz aktivitesi için önemli bir aktivatördür ve aktin fibrilleriyle BCR-ABL’in birleşmesini de destekler (63). CC domaini olmayan BCR’ın oluşturduğu BCR-ABL’in mutant formu (Δ CC-BCR-ABL) farelerde MPH oluşturmada başarısız olmuş; daha ziyade uzun bir latent periyodun ardından T hücreli lösemi/lenfoma oluşumuna neden olmuştur (64-66).

BCR-ABL’nin BCR bölgesindeki diğer önemli bölge GRB-2’nin bağlanma bölgesidir. GRB2 SOS (guanin-nükleotit exchanger of RAS)’un yanı sıra GAB2

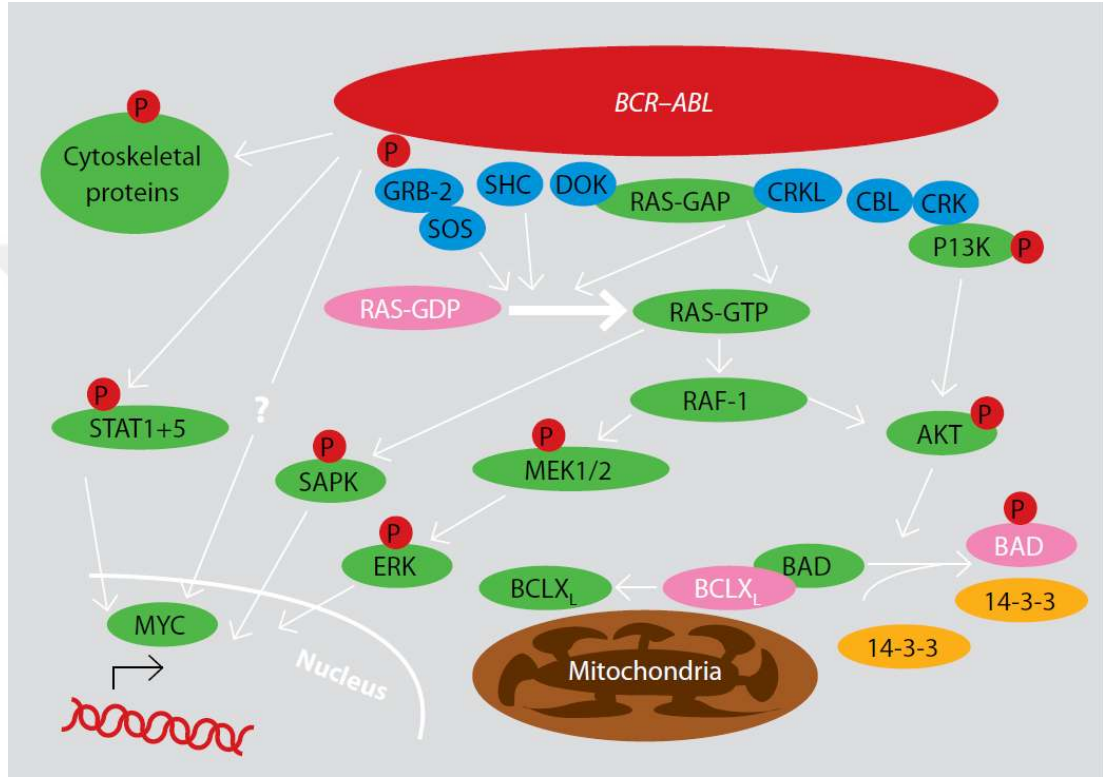
(GRB2 ile ilişkili bağlayıcı protein 2)'yi bağlar. Bu kompleksin oluşumu BCR'daki Y177'nin fosforilasyonuna bağlıdır (67, 68). Bu kompleks fosfatidilinozitol 3-kinaz (PI3K)'in ve SHP2 aracılığıyla RAS'ın aktive olmasına yol açar (67-69). BCR-ABL'in Y177'deki Y177F (Tirozin177Fenilalanin) mutasyonu GRB2'nin bağlanma yeteneğini ortadan kaldırır; ancak ABL'in kinaz aktivitesini etkilemez (67, 68). KML için kemik iliği transplantasyonu yapılan BCR-ABL'in Y177F mutant formu olan farelerde MPH gelişimi büyük ölçüde azalmıştır. BCR-ABL Y177F mutasyonu olan farelerde uzun bir latent periyodun ardından T-ALL veya abdominal T hücreli lenfoma gelişebilir (64, 65, 70). Bu sonuçlar gösteriyor ki Y177'nin fosforilasyonu MPH gelişimi için gereklidir (59).

ABL'in kinaz domaininin aktivasyon alanında lokalize olan diğer tirozin fosforilasyon bölgesi (bu p210 BCR-ABL bölgesindeki Y1294'e karşılık gelir) ABL'in SH2 domaini ile birlikte RAS yolağının aktivasyonuna katkıda bulunur. ABL'in SH2 domaininin SHC v GRB2 aracılığıyla RAS'ı aktive ettiğine inanılmaktadır (71). RAS yolağının aktivasyonunda Y1294'ün mekanizması bilinmemektedir. ABL'in SH2 domainindeki mutasyonlar BCR-ABL'in farelerde KML benzeri MPH'ların oluşumunu azaltır (72, 73). Y1294F nokta mutasyonunda da BCR-ABL'deki lökomojenik etki zayıflatılmıştır (66, 74). Bu veriler ABL'in hem SH2 domaini ve hem de fosforilasyon bölgesi olan Y1294'ün BCR-ABL'in genel lökomojenik gücüne katkıda bulunduğunu göstermektedir (59).

ABL'in karboksi terminal bölgesi hem normal ABL işlevselliği için hem de lenfoid lökomogenez için gereklidir (53, 75). Ayrıca ABL'in aktin bağlayan domaininin veya ABL kinaz domainin downstream bölgesindeki tüm karboksi terminal bölgesi delesyonu BCR-ABL'in farelerde KML benzeri MPH geliştirmesini etkilemedi (74, 76). Dolayısıyla bu alanların fonksiyonu BCR-ABL aracılı lökomogenez için vazgeçilebilir (59).

Birçok sinyal proteininin çeşitli fonksiyonel domainler aracılığıyla BCR-ABL ile etkileşimde olduğu gösterilmiştir. Bu proteinler RAS, PI3K, AKT, JNK, SRC ailyal kinazlar, protein and lipid fosfatazlar gibi çeşitli sinyal yolaklarını ve bunların hedefe ulaşan STATs, nükleer faktör-κB and MYC gibi transkripsiyon faktörlerini aktive ederler (77). BCR-ABL ayrıca IL-3, G-CSF ve GM-CSF gibi sitokinlerin ekspresyonunu da indükler (78, 79).

BCR-ABL'in KML fenotipi ile sonuçlanan önemli sinyal yolları üzerinde çeşitli substratları ve etkileri Şekil 5'te gösterilmektedir (80). Bunların net sonucu büyüme faktöründen bağımsız hücre proliferasyonu ve gelişimi, kemik iliği stromasına lösemik hücrelerin adherensinin azalması ve mutajenik uyarıya karşı apoptotik yanıtın azalmasıdır (55).



Şekil 5. BCR-ABL Pozitif Hücrelerdeki Aktive Sinyal Yolakları

2.3.6. KML Klinik Özellikleri

2.3.6.1. Semptomlar

KML'nin kronik faz, akselere faz ve blastik faz olmak üzere 3 fazı vardır(81). Hastalarının yaklaşık %90'ına kronik fazda tanı koyulur (82). Kronik faz klinik başlangıcı genellikle sinsidir (29). KML tanısı alan hastaların yaklaşık %40-50 kadarı, rutin fizik muayene ve kan testleri yapılarına kadar asemptomatiktir (20).

Anemi ve splenomegali varlığında KML semptomları, yorgunluk, kilo kaybı, halsizlik, çabuk doyma hissi, sol üst kadranda dolgunluk veya ağrı şeklinde kendini

gösterir. Nadiren kanama (düşük trombosit sayısı veya trombosit disfonksiyonu ile ilişkili) veya tromboz (trombositoz veya belirgin lökositoz ile ilişkili) görülebilir. Diğer nadir görülen semptomlar; gut artriti ve urat nefropatisi (yüksek ürik asit düzeyleri nedeniyle), priapizm (belirgin lökositoz veya trombositoz ile ilişkili), kaşıntı, diare, flushing, retinal hemoraji, üst gastrointestinal sistem ülser ve kanamasıdır (histamin yüksekliği ve bazofili nedeniyle). Baş ağrısı, kemik ağrısı, artralji, dalak enfarktüsüne bağlı ağrı ve ateş kronik fazda yaygın değildir fakat KML progresyonunda sık görülür. Pulmoner ve serebral damarların lökositlerle oklüzyonuna bağlı olarak lökostaz semptomları olan uyuşukluk, koordinasyon kaybı, konfüzyon ve dispne kronik faz KML’de WBC sayısı 50.000 hücre/ μ l üzerinde olmasına rağmen yaygın olmayan fakat blastik ve akselere fazda daha sık görülen bulgulardır (19, 20, 29).

2.3.6.2. Fizik Muayene Bulguları

Fiziksel muayenede solgunluk ve splenomegali saptanabilir (19). Splenomegali vakaların yaklaşık %50-60’ında görülen en sık fizik muayene bulgusudur (20). Tedaviye rağmen devam eden splenomegali hastalığın hızlanma işaretidir (29). Hepatomegali daha az yaygındır (%10-20) ve genellikle hafiftir (sağ kostal kenardan 1-3 cm aşağıda). Deri ya da diğer dokuların infiltrasyon gibi lenfadenopati de yaygın değildir. Eğer varsa bu bulgular Ph Negatif KML, akselere veya blastik faz KML’yi destekler (20).

2.3.7. Laboratuvar Bulguları

2.3.7.1. Hematolojik Bulgular

KML hastalarının %40’ı sadece laboratuvar anormallikleri dayanılarak tespit edilebilir (83). Tipik bir KML tanısı zor değildir (20). Tedavi edilmeyen hastalarda lökosit sayısı progresif bir şekilde artmaktadır (19). Tedavi edilmeyen KML hastalarında genellikle 10.000-500.000 hücre/ μ l’de lökositoz vardır. Baskın hücreler nötrofillerdir ve belirgin sola kayma görülür. Eozinofili ve bazofili genellikle

artmıştır (20). Bazofiliye sekonder histamin üretimi de artabilir (29). Periferik kanda blast oranı %0,5-10 arasındadır (19). Genellikle %5'in altında blast, %10'un altında blast ve promyelosit gözlenebilir (29). Monositlerde de artış görülebilir (20). Trombosit sayısı tanı anındaki hastaların %50'sinde yüksektir ve kronik faz boyunca trombosit sayısı artabilir (19). Trombositoz yaygın olarak görülürken trombositopeni nadir olup kötü prognozla ilişkilidir (20). KML izole bir trombositoz ile de ortaya çıkabilir (83). Hastaların üçte birinde hemoglobin seviyesi 11 gr/dL'nin altındadır (20). Nötrofil alkalen fosfataz aktivitesi hastaların %90'ından fazlasında düşüktür veya yoktur (19). Serum B12 vitamini, laktat dehidrogenaz, ürik asit ve lizozim seviyeleri sıklıkla artmıştır (20).

Tanı anında kemik iliği hiperselülerdir ve belirgin myeloid hiperplazi gözlenir. Myeloid: eritroid oranı 15-20:1 ile belirgin olarak artmıştır. Kemik iliği blast yüzdesi genellikle normal veya hafif yükselmiştir. Kemik iliğinde veya periferik kanda bazofili, eozinofili ve monositoz mevcut olabilir. Hastaların yarısında kemik iliğinde retikülin boyası ile görülebilen fibrozis mevcuttur (20, 29).

2.3.7.2. Kromozomal Bulgular

Kromozomal olarak t(9;22)(q34;q11.2) varlığı KML tanısı koyar (29). Ph kromozomu tanıda görülen hastaların %20'si -Y ve trizomi 8 (+8) gibi ek kromozomal anomaliler de içerebilir. Hastaların %5'inde varyant Ph kromozomu gözlenebilir. Hastaların az bir kısmında görülen gizli veya kompleks translokasyonlar Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) veya polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile saptanabilir (19).

2.3.8. KML Sınıflandırması ve Klinik Seyir

KML'nin kronik faz, akselere faz ve blastik faz olmak üzere 3 fazı vardır (81). KML tipik olarak kronik faz ile başlar ve başlangıçtan 3 veya 5 yıl içinde akselere veya blastik faza ilerleyebilir (84). Yeni tanı alan hastaların yaklaşık %10'unda akselere veya blastik fazda tanı konur (29). Tedavi almayan hastaların çoğunda lökosit sayısı progresif olarak artar (85). Ortalama yaşam süresi tedavilerle önemli oranda yükselmiştir

(19). Progresyon sıklıkla trizomi 8, trizomi 19, i(17q), Ph kromozom duplikasyonu, Y kromozom kaybı gibi sekonder kromozomal anomaliler ve p53 delesyonu/mutasyonu, Rb, myc ve Ras gen upregülasyonu gibi onkogenik değişiklikler sonucu meydana gelir (86-92).

2.3.8.1. Kronik Faz

Hastalarının yaklaşık %90'ına kronik fazda tanı koyulur(82). Kronik faz klinik başlangıcı genellikle sinsidir (29). Tedaviye yanıtın iyi olduğu fazdır(93). Kronik fazdaki hastalarda ölüm nadiren görülür (20). Tedavisiz kaldığı zaman akselere faza ve sonunda blastik faza geçiş olur (19).

2.3.8.2. Akselere Faz (Hızlanmış Evre)

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından ileri sürülen kriterlere göre akselere faz tanısı koymak için aşağıdakilerden en az biri olmalıdır (94, 95):

Tablo 3. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ-2008) KML Akselere Faz Tanı Kriterleri

Akselere Faz
• Periferik kan lökositlerinin ve/veya kemik iliği hücrelerinin %10-19'unun blast olması
• Periferik kan bazofillerinin $\geq$ %20 olması
• Tedavi ile ilişkisiz persistan trombositopeni $<100.000/\text{mm}^3$
• Tedaviye yanıtsız persistan trombositoz $>1 \times 10^6/\text{mm}^3$
• Tedaviye yanıt vermeyip giderek artan dalak büyüklüğü ve lökosit sayısı
• Sitogenetik olarak klonal dönüşüm olması (Kronik faz KML tanısı anında mevcut olmayan ek anomali)

Ayrıca büyük kümeler halinde megakaryositik proliferasyon, retikülün işaretli veya kollajen fibrozis, ağır granülositik displazi akselere fazı düşündürülen bulgulardır (94, 95). Akselere faz sıklıkla semptomatiktir. Ateş, gece terlemesi, kilo kaybı ve progresif splenomegali görülebilir (96).

2.3.8.3. Blastik Faz

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından ileri sürülen kriterlere göre blastik faz tanısı koymak için aşağıdakilerden en az biri olmalıdır (94, 95):

Tablo 4. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ-2008) KML Blastik Faz Tanı Kriterleri

Blastik Faz
• Periferik kan lökositlerinin veya kemik iliği hücrelerinin $\geq$ %20 blast olması
• Ekstramedüller (kemik iliği dışı) blastik proliferasyon
• Kemik iliği biyopsisinde büyük odaklar veya kümeler halinde blastlar olması

Blastik faz morfolojik olarak akut lösemilere benzer (96). Hastaların %70'inde myeloid kökenli blastlar, %20-30'unda da lenfoblastlar görülür (97-101). Blastik fazdaki hastalarda kilo kaybı, ateş, gece terlemesi ve kemik ağrısı gibi belirtiler görülebilir (96). Blastik fazda uzun süreli sağkalım nadirdir ve ortalama yaşam süresi 2-6 ay arasındadır (84, 102, 103). Çoklu ilaç direnci ve antiapoptotik sinyallerin upregülasyonu nedeniyle allogenik kök hücre transplantasyonu ile yüksek doz kemoterapi yanıtı kötüdür (84, 85). Daha uzun bir yaşam süresi umuduyla de novo AML veya ALL'de kullanılan sitotoksik ilaç kombinasyonları blast krizindeki hastalara verilse de gerçekçi bir tedavi olmaktan uzaktır (104).

2.3.9. Ayırıcı Tanı

Atipik kronik myeloid lösemi ilk tanı anında hem myelodisplastik hem de myeloproliferatif özellikleri olan BCR-ABL1 negatif bir lösemidir (105). Gerçek insidansı tam bilinmemekle beraber her 100 BCR-ABL1 pozitif KML hastasına karşı 1-2 vaka rapor edilmiştir (106). Bu hastaların prognozu kötüdür (105). Küçük sayıda hastalar rapor edilmiş olup ortalama yaşam süresi 14-29 ay arasındadır (106-109). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından ileri sürülen tanı kriterleri aşağıdadır (105).

Tablo 5. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ-2008) Atipik Kronik Myeloid Lösemi Tanı Kriterleri

Atipik KML tanı kriterleri
• Periferik kanda nötrofil ve prekürsörlerinin arttığı lökositoz ($Lökosit \geq 13 \times 10^5/L$) • Ph kromozomu veya BCR-ABL füzyon geni olmaması • PDGFRA veya PDGFRB'da yeniden düzenleme olmaması • Lökositlerin $\geq 10\%$'sının nötrofil prekürsörlerden oluşması • Minimal absolute bazofili (Bazofiller genellikle lökositlerin 2%'sinin altında), • Monositoz olmaması veya minimal absolut monositozis (Monositler genellikle lökositlerin 10%'unun altında) • Eritroid ve megakaryositik seride displazinin olduğu veya olmadığı granulositik proliferasyon ve granulositik displazinin eşlik ettiği hiperselüler kemik iliği • Periferik kan veya kemik iliğinde $< 20\%$ blast

Lökomoid reaksiyondan ayrımı yapılmalıdır; WBC < 50.000/ μ l, toksik granülasyon, granüositlerde Döhle cisimleri, bazofilinin olmaması, normal veya yüksek LAP skoru, klinik özellikler ve fizik muayene bulguları genellikle lökomoid reaksiyonu destekleyici niteliktedir (20).

KMML aneminin ve/veya trombositopeninin sıklıkla, displastik nötrofillerin bazen eşlik ettiği matür monositik hücrelerin aşırı çoğalması ile karakterize myelodisplastik/myeloproliferatif neoplazmdır (110). KMML'de Ph kromozomu ve/veya BCR-ABL füzyon geni yoktur ve bu tanı kriterleri arasındadır (111). Ph negatif KML'den ayrımı yapılmalıdır (20).

Kortikosteroidlere sekonder olarak görülen nötrofili; kendini sınırlaması ve kısa süreli olması ile KML den ayrılmaktadır (20).

Juvenil myelomonositik lösemi (JMML) eski adı juvenil KML olan hepatosplenomegali, lenfadenopati, solgunluk, ateş ve deri döküntüsü ile karakterize infantil ve erken çocukluk döneminin nadir fatal hastalığıdır (112-114). Monosit kökenli hücrelerin GM-CSF'ye karşı artmış duyarlılığı sonucu myeloid hücrelerin klonal çoğalmasıyla organ infiltrasyonu ile seyreden bir hastalıktır (115, 116). KML'nin aksine bazen monozomi 7 görülse de sıklıkla karyotip normaldir ve akut lösemiye gidiş nadirdir. JMML'li hastaların çoğu PTPN11, NRAS, KRAS2, CBL ve NF1 gibi genleri de içerebilen GM-CSF sinyal iletim yolunda bir mutasyona sahiptir (117-120).

KML'yi diğer miyeloproliferatif ve miyelodisplastik sendromlardan ayırt etmek daha zordur. Polisitemia verada hastaların çoğunda normal veya artmış LAP skoru, $<25.000/\mu\text{l}$ lökosit sayısı vardır ve Ph kromozumu saptanmaz (20).

2.3.10. Prognostik Faktörler

İmatinib mesilat tedavisinden önce hastaların yaklaşık %10'unda 2 yıl içerisinde ölüm görülmekteydi. Sonraki yıllarda bu oran %20 olurken ortalama yaşam süresi yaklaşık 4 yıldır (29). İmatinib KML tedavisinde bir devrim olmuştur. Yeni tanı konan KML vakalarında, imatinib tedavisi ile 7 yıllık tahmini sağkalım oranı %86'dır. Takipteki hastaların ilk 7 yıl boyunca yıllık mortalite oranı yaklaşık %2 olmuştur (20).

En yaygın kullanılan evreleme sistemleri prognostik faktörlerin analizlerinden elde edilmiştir (29). Evreleme sistemleri hasta bireylerde kronik fazın uzunluğunu tahmin etmek amacıyla geliştirilmiştir (19). Halen kullanılan üç risk skorlama sistemi [Sokal, Hasford (Euro) ve EUTOS (European Treatment and Outcome Study)] kronik faz KML'de klinik uygulamaya konulmuştur (121). Sokal, Hasford (Euro) ve EUTOS risk hesaplaması tanı sırasında, herhangi bir tedavi başlamadan yapılmalıdır. Risk skorlamalarında dalak büyüklüğü kaburga yayındaki en uzak noktadan cm olarak alınır; blast, bazofil ve eozinofil oranları ise periferik kandaki yüzdelerdir (122-124).

En iyi bilinen ve en eski olan sistem Sokal ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (19). Sokal skorunda bulunan dolaşımdaki blast yüzdesi, dalak boyutu, trombosit sayısı ve yaş gibi prognostik faktörler Tablo 6'da gösterilmiştir. Bu sistem tek veya kombine kemoterapi alan hastalarda geliştirilmiştir (122).

Tablo 6. Sokal Skor Hesaplaması

Sokal Skoru	
=	
0,0116 x (yaş-43,4)	
+	
0,0345 x [dalak boyutu (cm) - 7.51]	
+	
0,188 x [(trombosit sayısı/700) ² - 0,563]	
+	
0,0887 x (blast - 2,1)	
	Risk Sınıflandırması Düşük Risk < 0,80 Orta Risk ≥ 0,80 ve ≤ 1,20 Yüksek Risk > 1,20

Hasford sistemi dolaşımdaki blast oranı, dalak büyüklüğü, trombosit sayısı, yaş, eozinofil ve bazofillerin oranı gibi önemli prognostik faktörler mevcuttur (Tablo 7). Bu sistem IFN tedavisi alan hastalarda geliştirilmiştir (123). Bu sistem eozinofil, bazofil oranlarının bulunması ile Sokal indeksinden ayrılır. Yapılan çalışmalarda Sokal ve Hasford sistemlerinin her ikisinin de imatinib ile tedavi edilen hastalarda uygulanabilir olduğu gösterilmiştir (29).

Tablo 7. Hasford (Euro) Skor Hesaplaması

Hasford (Euro) Skoru	
=	
0,6666 x yaş (<50 yaş ise 0; diğerleri 1)	
+	
0,0420 x dalak boyutu (cm)	
+	
0,0584 x blast (%)	
+	
0,0413 x eozinofil (%)	
+	
0,2039 x bazofil (%) (<%3 ise 0; diğerleri 1)	
+	
1,0956 x trombosit (<1500 x 10 ⁹ /L ise 0; diğerleri 1) x 1000	
	Risk Sınıflandırması Düşük Risk ≤ 780 Orta Risk > 780 ve ≤ 1480 Yüksek Risk > 1480

EUTOS skor hesaplamasında sadece dalak boyutu ve bazofil oranı mevcuttur (Tablo 8). Bu skora sistemi imatinib alan hastalarda geliştirilmiştir (124).

Tablo 8. EUTOS Skor Hesaplaması

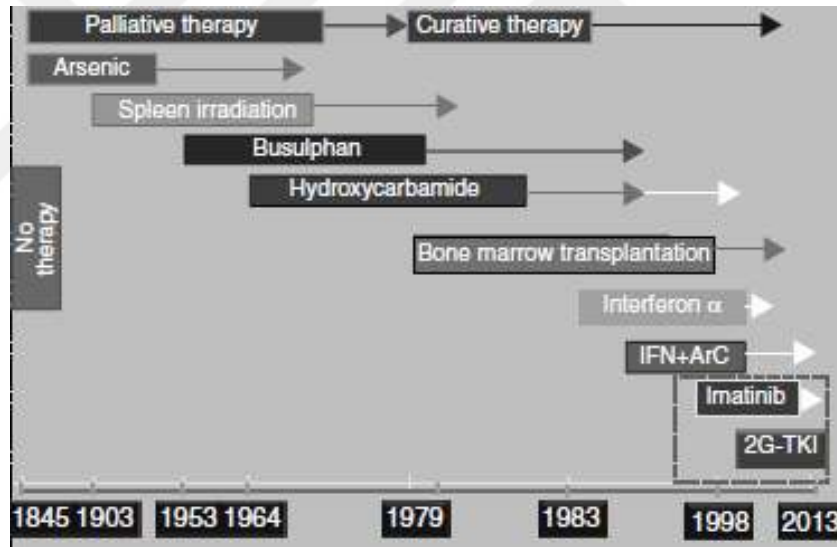
EUTOS Skoru	Risk Sınıflandırması Düşük Risk ≤ 87 Yüksek Risk > 87
=	
7 x bazofil (%)	
+	
4 x dalak boyutu (cm)	

2.3.11. Tedavi

KML'nin ilk tedavisi 19. yüzyılda arsenik içeren bileşiklerin kullanımı ile gerçekleşmiştir (125). 20. yüzyılın başlarında splenomegali derecesini azaltmak için kullanılan dalak ışınlama tedavisi, busulfan verilen hastalarda yaşam süresinin arttığına gösterilmesinin ardından 1960'lı yıllarda yerini alkilleyici ajanlara bırakmıştır (126). Daha sonra busulfanın kan değerlerini her zaman normalleştiremediği ve daha da önemlisi mutajenik olabileceği ve blastik krizi indükleyebilmesi nedenleriyle yerini ribonükleotit redüktaz inhibitörü olan hidroksiüre (hidroksikarbamid)'e bırakmıştır (127). Hidroksiüre busulfana göre daha az toksiktir ve majör yan etkisi reversibl kemik iliği supresyonudur. Hidroksiüre günümüzde lökosit sayısını hızlı bir şekilde düşürüp lökostaz komplikasyonlarını önlemek amacıyla kullanılmaktadır (128, 129). Busulfan ve hidroksiüre kan sayımını düzeltmiş ve semptomatik iyileşme sağlamış olmalarına rağmen hastalığın progresyonunu geciktiremediler (127). Ayrıca sitogenetik ve moleküler yanıt da oluşturmazlar ve uzun süreli sağkalım üzerinde anlamlı bir etkileri saptanmadı (130).

1970'li yıllarda, tamamen farklı iki tedavi stratejisi olan, interferon-alfa (IFN- α) ve allogeneik kök hücre transplantasyonu sadece Ph negatifliği başarısı ile değil; aynı zamanda daha uzun yaşam süresi ile ilişkidir (131). İmatinibden önceki dönemde allogeneik kök hücre transplantasyonu mümkün olmadığı zaman, IFN- α tedavisi tercih edilen tedavi oldu (29). Ph pozitif KML tanısı olan erken kronik fazdaki IFN- α kullanan hastaların %80'inde komplet hematolojik yanıt ve %10-38'inde de majör sitogenetik yanıt saptanmıştır (132, 133). Daha sonra çeşitli

randomize klinik çalışmalar; busulfan, hidroksiüre ya da her ikisi ile IFN- α karşılaştırıldığında IFN- α 'da 6-7 yıl daha fazla ortalama yaşam beklentisi olduğunu gösterdi (134-136). IFN- α subkutanöz olarak kullanılır ve yaşam kalitesini etkileyen yan etkiler eşlik edebileceği için çoğu hastada uzun dönem kullanımı mümkün olmamıştır (127). IFN- α 'ya subkutanöz sitarabin eklenmesi hastalardaki sitogenetik remisyon oranını arttırmıştır ve bir çalışmada sitarabin eklenmesinin yaşam süresini artırdığı fakat toksisiteyi de artırdığı gösterilmiştir (137). IFN- α etki mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır ama bir miktar immünmodülatör etkisi olduğu düşünülmektedir (127). KML hastalarının modern tedavisinde IFN- α kullanımı imatinib ve diğer tirozin kinaz inhibitörlerinin kullanımıyla değiştirilmesi tartışılmaktadır (19). 1845-2012 yılları arasındaki KML tedavisindeki gelişmeler Şekil 6'da gösterilmiştir (138).



Şekil 6. Kronik Fazdaki KML Hastalarının Tedavisindeki Tarihsel (1845-2012) Gelişim

2.3.11.1. Allogeneik Hematopoetik Kök Hücre Nakli

Allogeneik Hematopoetik Kök Hücre Naklinin (HKHN) KML'li hastalar için küratif tedavi olma şansı vardır ama tirozin kinaz inhibitörleriyle alınan mükemmel sonuç allogeneik HKHN'nin ilk basamak tedavideki yerini değiştirmiştir (139, 140). KML'deki allogeneik HKHN ilk önce singeneik donörlerde sonrasında kardeş ve

daha sonra da akraba olmayan gönüllü donörlerde yapılmıştır (141-143). Total vücut ışınlanması veya busulfan gibi hazırlayıcı myeloablatif rejimleri takiben normal donör kök hücre infüzyonu hastaların çoğunda uzun ömürlü sitogenetik remisyon sağlar (127). Allogeneik HKHN kronik faz KML hastalarında gerçekleştirilirse olası tedavi ve daha uzun süreli sağkalım ile sonuçlanır (140). Transplantasyonla ilişkili mortalite tam HLA uyumu olan genç hastalarda daha düşüktür. 1980'lerde, infüzyon öncesinde nakli üründen donör T lenfositlerinin çıkarılması, alloimmun aracılı greft versus host hastalığı insidansını ve şiddetini azalttı (127). Kısa vadede son derece başarılı olmasına rağmen, bu yaklaşımda relaps riski artmıştır (144). Bunun üzerine donör lenfositlerinin ufak parçalar halinde infüzyonu daha kalıcı remisyon sağlamıştır (145). Fakat donör lenfositlerinin parçalar halinde infüzyonu, greft versus host reaksiyonunu riskini arttırdığı bildirilmiştir (146, 147). Donör lenfosit infüzyonuna bağlı nakil sonrası erken relapsı anlamak için; transplantasyon sonrası sitogenetik ve RT-PCR analizleri izlenmelidir (127).

Transplantasyon ile kür sağlanan hastaların başarısındaki temel etken sadece yüksek doz kemoterapi kullanımına bağlı değil aynı zamanda donör kaynaklı immün sistem tarafından rezidü kalan lösemik hücrelerin harabiyetine bağlıdır (127). Yoğunluğu azaltılmış tedavi rejimleri, ileri yaş ve komorbiditesi olan allogeneik HKHN yapılan hastalara toksisiteyi düşürmek ve daha fazla yararlı olmak açısından bir yelpaze sunar (148, 149). 1990'lara gelindiğinde allogeneik HKHN, kronik faz ve erken akselere fazdaki tüm uygun hastalar için ilk basamak tedavi olmuştu. Normalde akut lösemi tedavisinde kullanılan intravenöz kemoterapi kombinasyonları, blast krizindeki hastaları transplantasyon öncesi tekrar kronik faza sokmak için kullanılırdı (127). Avrupa Kan ve Kemik İliği Transplantasyonu Grubu kapsamlı kayıtlarına gönderilen verilerle, Gratwohl ve arkadaşları Tablo 9'da sıralanan parametrelere dayalı KML için miyeloablatif transplantasyon sonucu için bir risk skoru geliştirdi (150). Düşük Gratwohl puanları (0-1) olan hastalarda 3 yıllık genel sağkalım oranı %90'dan fazladır (151).

Tablo 9. KML’de Transplantasyon Sonucunu Etkileyen Faktörler

Skor	
Yaş	
<20	0
20-40	1
>40	2
Hastalığın Fazı	
Kronik Faz	0
Akselere Faz	1
Blastik Faz	2
Kök Hücre Kaynağı	
HLA Uyumlu Kardeşler	0
Akraba olmayan gönüllü donör/uyumsuz aile üyesi	1
Donör-Alıcı Cinsiyetleri	
Erkek - Erkek	0
Erkek - Kadın	0
Kadın - Kadın	0
Kadın - Erkek	1
Tanıdan Transplantasyona kadar geçen zaman	
< 12 Ay	0
> 12 Ay	1

Tirozin kinaz inhibitör (TKİ)'lerinin tedavide kullanılmaya başlamasıyla, KML için yapılan kemik iliği nakli sayısı büyük ölçüde azalmıştır. Erken transplantasyon için başlıca engellerden birisi nakil ile ilişkili mortalite korkusudur ve oral ilaç tedavileri, nakillere göre daha tercih edilebilir görünmektedir. Çoğu hasta için TKİ'lerine duyulan güven haklıdır ve allogeneik HKHN multipl TKİ'lerinin başarısız olduğu veya hastalık progresyonunun arttığı sınırlı hastalarda ikinci basamak hatta üçüncü veya dördüncü basamak tedavi haline gelmiştir. Son veriler düzenli moleküler takiple TKİ'lerinin başarısız olduğu hastaların, erken dönemde fark edilebildiğini göstermektedir ve bu bilgiyle hastalığın seyri allojenik HKHN'a dönebilir (127).

2.3.11.2. Otolog Hematopoetik Kök Hücre Nakli

Otolog HKHN, hücreler moleküler remisyondayken toplanırsa eğer KML tedavisinde etkin olabilir. Ancak tedavi cevabı bu derece başarılı hastalarda nüks görülmediği için çoğu gruplar tarafından terkedilmiştir (29).

2.3.11.3. Tirozin Kinaz İnhibitörleri

İmatinib mesilat BCR-ABL'in kinaz aktivitesini bloke eden bir tirozin kinaz inhibitörüdür ve böylece Ph⁺ hücrelerin proliferasyonunu da inhibe eder (152, 153). İmatinib mesilat inaktif konformasyonda Abl kinazın ATP bağlanma bölgesine kompetitif inhibisyon gösterir ve böylece BCR-ABL sinyal yolağındaki proteinlerin tirozin fosforilasyonunun inhibe ederek işlev görür (29). Fosforilasyonu inhibe eden imatinib KML'ye neden olan lösemik transformasyon süreçlerini indükleyen sinyal yollarının aktivasyonu engellemektedir (20).

1996 yılında, Druker ve arkadaşları KML hücreleri üzerinde daha sonra sinyal transdüksiyon inhibitörü 571 (STI571) olarak da bilinen son derece selektif 2-fenilaminopirimidin in vitro etkisinin verilerini ilk defa rapor etmişlerdir (153). Şimdi imatinib olarak bilinen STI571'in çalışmalarında hastaların önemli bir bölümünde kronik fazın düzelmesi ve kan sayımının kontrolünün yanında sitogenetik cevabın da alındığı gösterilmiştir (154). Yapılan çalışmalarda daha önce IFN- α 'nın başarısız olduğu kronik faz KML hastalarında yüksek oranda tam sitogenetik remisyon gösterildi (155).

İmatinibe verilen yanıtlar kronik fazdaki hastalarda daha önemli ve uzun ömürlü rağmen KML'nin tüm aşamalarına karşı kullanılmaktadır (154-159).

İmatinib genellikle iyi tolere edilir. Sık bildirilen hematolojik toksisiteler nötropeni ve trombositopeniyi içerir (160). En sık bildirilen non-hematolojik yan etkiler ise gastrointestinal rahatsızlıklar, ödem, kaşıntı, kas-iskelet sistemi şikayetleridir ancak bunların hiçbirisi tedavinin kesilmesine neden olmaz (161). İmatinib kullanan KML hastalarında yaşam kalitesini etkileyen majör faktör çoğunlukla kas-iskelet ağrısı ve kas krampları ile ilişkili kronik yorgunluktur (162). Hastaların bazılarında hipofosfatem ve kemik mineral dansitesinde azalma

görüldüğü için imatinib alan hastalar bu yönden gözetim altında tutulmalıdır (163, 164). Çalışmalarda uzun dönem imatinib tedavisinin konjestif kalp yetmezliği ve kardiyotoksisiteye ile ilişkisi bulunmuştur (165). Ancak bunun çok nadir görüldüğü ortaya konmuştur (166).

TKİ'leri günlük oral olarak kullanılır ve kademeli olarak maksimum etkiyi oluştururlar. Tümör yükü zamanla azalır ve düzenli olarak izlenmelidir. İmatinibi; dasatinib, nilotinib, bosutinib gibi ikinci jenerasyon ve son zamanlarda ponatinib gibi üçüncü jenerasyon TKİ'leri hızlıca takip etmiştir (127).

Dasatinib oral yoldan kullanılabilen SRC kinaz ailesinin ve ABL1'in güçlü inhibitörü olan bir moleküldür. Dasatinibin önemli bir avantajı, ABL1 kinaz domainine hem aktif hem de inaktifken bağlanabilmesidir (160). Bunun bir sonucu olarak dasatinib, T315I hariç neredeyse bütün imatinibe rezistan BCR-ABL1 mutasyonlarına karşı etkilidir (167). Kronik evredeki KML hastalarında dasatinib ile yapılan bir çalışmada imatinibe direçli hastalarda 6. aydaki tam sitogenetik yanıt %22, imatinibi tolere edemeyenlerde ise %56 olarak bulunmuştur (168). 2010 yılı Ekim ayında, DASISION çalışma sonuçlarına göre, FDA yeni teşhis Ph-pozitif kronik fazdaki erişkin KML hastalarının ilk basamak tedavisi için dasatinibi (100 mg günde bir kez) onayladı (169). CA180-034 çalışmasının sonucuna dayanarak FDA tarafından, imatinibe direnci veya intoleransı olan kronik fazdaki KML hastalarında önerilen başlangıç dozu, günde 1 kere 100 mg olarak onaylandı (170).

Nilotinib, imatinibe göre daha güçlü olan çok selektif BCR-ABL1 tirozin kinaz inhibitörüdür. Nilotinib imatinib rezistan hücrelerde 20-50 kat, imatinib sensitif hücrelerde ise 3-7 kat daha kuvvetlidir (160). Kronik evredeki nilotinib verilen KML olgularında ile 6. ayda tam sitogenetik yanıt oranı imatinibe direçli olgularda %30 bulunurken, imatinibi tolere edemeyen olgularda da %35 bulunmuştur (171). 2010 haziran ayında sonuçlanan çok merkezli ENESTnd çalışması sonuçlarına göre FDA yeni tanı konulan Ph-pozitif kronik evre KML erişkin hastalarının ilk basamak tedavisi için Nilotinib (300 mg günde iki kez) kullanımını onayladı (172). Ayrıca imatinibe rezistansı veya intoleransı olan kronik ve akselere faz KML hastalarının tedavisi (400 mg günde iki kez) için de FDA tarafından onay almıştır (160).

Bosutinib SRC ailesi ve ABL1 kinazlarının ve minimal olarak da KİT ve PDGFR (platelet derived growth factor receptor) inhibitörüdür ve imatinib, dasatinib,

nilotinibe rezistan T315I hariç birçok BCR-ABL1 kinaz domain mutasyonlarına karşı etkilidir (173, 174). Bosutinib yeni tanı konmuş kronik faz KML hastalarında ilk basamak tedavi seçeneği olarak henüz tavsiye edilmemektedir (160). Bosutinible ilgili Gambacorti-Passerini ve arkadaşlarının 2015'te yayınladığı çalışmanın sonucu olarak FDA önceki tirozin kinaz inhibitörlerine intoleransı veya rezistansı olan üç fazın tamamındaki KML hastalarının tedavisi için bosutinibi (500 mg günde bir kez) onayladı (175).

Ponatinib, T315I da dahil olmak üzere, BCR-ABL1 kinaz mutasyonlarının çoğuna karşı güçlü etkili, oral yoldan alınabilen, çok hedefli kinaz inhibitörüdür (176). PACE çalışma sonuçlarına göre FDA önceki tirozin kinaz inhibitörlerine intoleransı veya rezistansı olan üç fazın tamamındaki KML hastalarında tedavi için ponatinibi onayladı (177).

2.3.11.4. Yeni Ajanlar

Mevcut tüm TKİ'lerinin başarısız olduğu ve T315I mutasyonu olan KML'li hastalar için geliştirilen birçok yeni ajan Tablo 10'da gösterilmiştir (29).

Tablo 10. Mevcut TKİ'lerinin Başarısız Olduğu T315I Mutasyonu Olanlarda Yeni Geliştirilen Ajanlar

Ajanlar	Etki Mekanizması
Omacetaxine (homoharringtonine)	Protein translasyon inhibitörü
XL228	T315I mutasyonu karşı potansiyel etkisi ile Src/Abl1 inhibitörü
FTY720 (fingolimod)	ABL1 aracılı lökomogenez için gerekli olan protein fosfataz 2A aktivasyonu
AP24534	T315I dahil BCR-ABL1 inhibitörü
DCC-2036	ATP dışı kompetitif ABL1 inhibitörü
PH-739358	T315I mutasyonunu karşı da etkili Aurora kinaz inhibitörü
Sorafenib	Birçok tirozin kinaz proteinlerinin (EGFR ve PDGFR) ve Raf kinazların inhibitörüdür

2.3.11.5. Tedavisine Cevabın Takibi

KML tedavisinde TKİ'lerinin yanıtını izleme önemli yönetim stratejilerinden biridir (178-180). TKİ tedavisine yanıt hematolojik, sitogenetik ve moleküler yanıtların ölçümü ile belirlenir. TKİ tedavisinin amacı; tedavinin başlangıcından itibaren 12 ay içinde tam sitogenetik yanıt (TSY)'a ulaşmak ve hastalığın akselere veya blastik faza ilerlemesini engellemektir (160).

Tam hematolojik yanıt (THY) için kriterler Tablo 11'de verilmiştir (178, 179).

Tablo 11. Tam Hematolojik Yanıt Kriterleri

Tam Hematolojik Yanıt
• Trombosit sayısı $< 450 \times 10^9/L$ • Lökosit sayısı $< 10 \times 10^9/L$ • Periferik kanda granülosit görülmemesi • Bazofiller $< \%5$ • Palpabl olmayan dalak

Kromozom bantlama analizi ile kemik iliği hücrelerinden elde edilen en az 20 metafaz alanı ile sitogenetik yanıt (cytogenetic response-CyR) derecesinin değerlendirilebileceği kabul edilmiştir (178, 179).

- TSY için Ph + metafazın olmaması gereklidir.
- Kısmi (parsiyel) sitogenetik yanıt (KSY) için de Ph + metafaz oranı % 1-35 arasında olmalıdır.

Moleküler cevap ise BCR-ABL1 transkriptinin ABL1 transkriptine ya da uluslararası kabul görüş diğer transkriptlere oranına bakılarak; en iyi şekilde Uluslararası Ölçeğe (International Scale-IS) göre değerlendirilir. BCR-ABL1/ABL1 oranının $\leq \% 0,1$ olması majör moleküler yanıt (MMY)'a karşılık gelir. Derin moleküler yanıt (MR) tanımları için kriterler aşağıdadır.

MY^{4.0} aşağıdakilerden biridir;

- Tespit edilebilen hastalık, BCR-ABL1^{IS} değeri $< \%0.01$ veya
- Tespit edilemeyen hastalık, ABL1 transkript cDNA > 10.000 kopyadır.

MY^{4.5} da aşağıdakilerden biridir;

- Tespit edilebilen hastalık, BCR-ABL^{IS} değeri < %0.0032 veya
- Tespit edilemeyen hastalık, cDNA >32.000 ABL1 kopyadır.

KML'nin her üç fazındaki 1. basamakta kullanılan TKİ'lerin ve intolerans sebebiyle 2. basamak TKİ'lerini kullanan hastalarda tedaviye verilen yanıtlar ve bu yanıtların ne anlama geldiği aşağıdaki tablolarda verilmiştir (178).

Tablo 12. KML'nin Her Üç Fazındaki Hastalarda 1. Basamak TKİ ve İntolerans Nedeniyle 2. Basamak TKİ'lerine Yanıt Tanımları

Optimal		Uyarı	Yanıtsız
Başlangıç		Yüksek risk KKA/Ph+*	
3 Ay	BCR-ABL ^{IS} ≤ %10 ve/veya Ph+ ≤ %35 (KSY)	BCR-ABL ^{IS} > %10 ve/veya Ph+ %36-95	THY yok ve/veya Ph+ > %95
6 Ay	BCR-ABL ^{IS} < %1 ve/veya Ph+ %0 (TSY)	BCR-ABL ^{IS} %1-10 ve/veya Ph+ %1-35	BCR-ABL ^{IS} > %10 ve/veya Ph+ > %35
12 Ay	BCR-ABL ^{IS} < %0,1 (MMR)	BCR-ABL ^{IS} %0,1-1	BCR-ABL ^{IS} > %1 ve/veya Ph+ > %0
Daha sonra herhangi bir zaman	MMR veya daha iyisi	KKA/Ph- (-7 veya 7q-)	- THY kaybı - TSY kaybı - Onaylanmış MMR kaybı** - Mutasyonlar*** - KKA/Ph+
*: KKA/Ph+: Ph+ olan hücrelerde yeni ortaya çıkan klonal kromozomal anomali. Trizomi 8, ikinci Ph+'liği [+der (22)t (9;22) (q34;q11)], izokromozom 17 [i (17) (q10)], trizomi 19 ve ider (22) (q10)t (9;22) (q34;q11) gibi yeni oluşan anomaliler. **: Ardışık iki testten birinde BCR-ABL ^{IS} > %1. ***: BCR-ABL kinaz domaindeki nokta mutasyonları.			

Tablo 13. Tedaviye Alınan Cevapların Tanımları

Tedaviye cevabın tanımları	
Optimal	En iyi uzun vadeli sonuç Tedaviyi değiştirmek için endikasyon yoktur.
Uyarı	Hastalar, ölüm ve progresyon riskinin sınırlandırmak için farklı tedavi almalıdır.
Yanıtsız	Hastalık ve tedaviye cevabın özelliği; tedavi başarısızlığı durumunda tedavinin değişmesine olanak vermeyi ve daha sıkı monitörize etmeyi gerektirir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın protokolü KTÜ Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Karar No: 2015/72). Çalışmaya alınan bütün hasta ve sağlıklı gönüllü bireyler araştırma öncesinde ayrıntılı olarak bilgilendirilip, yazılı olarak onamları alındı.

3.1. Gereç

3.1.1. Hasta Grubu

Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı'na bağlı Hematoloji Polikliniği veya Servisine gelen KML tanısıyla Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na Majör BCR-ABL^{IS} çalışılması için gönderilip sonucu pozitif gelen ve takip dönemlerinde de MMY alınan hastaların her iki zamanda gelen 33 adet ribonükleik asit (RNA) örnekleri alınarak yapılmıştır.

3.1.2. Kontrol Grubu

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi poliklinik bünyesinde yapılan muayene ve tetkikler sonucu hematolojik olarak sağlıklı olduğu tespit edilen, yaşları arasında değişen 34 gönüllü birey kontrol grubu olarak çalışmaya katılmıştır.

3.1.3. Örneklerin Toplanması

KML tanısıyla rutin tetkik işlemleri sırasında Majör BCR-ABL^{IS} çalışılması için Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na gönderilen hasta materyallerinden Qiagen RNeasy Mini Kit ile RNA izolasyonu yapıldı. Yapılan izolasyon sonucu 50 mikrolitre (µl) RNA elde edildi. Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları spektrofotometre ölçülüp, yoğunluklarına göre sulandırılarak konsantrasyonları

eşitlenmeye çalışıldı. Daha sonra İpsogen RT Kit 33,V1 ile en fazla 10 µl RNA koyduğumuz her hastadan 25 µl komplementer DNA (cDNA) elde edildi. cDNA aşamasından sonra İpsogen BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR 24,V1 kiti ile Qiagen Rotor-Gene Q'da her hastadan duplike olarak çalışıldı. Çalışma sonucunda elimizde kalan RNA örnekleri -80 °C' lik derin dondurucuda saklandı.

Kontrol hastalarından EDTA'lı tüplere 3 ml kan örnekleri alındı. Aynı gün içinde RNA izolasyonu yapıldı.

3.1.4. Kullanılan Aletler

- LightCycler® 480 II Real time PCR
- Spektrofotometre (NanoDrop 2000 UV-Vis Thermo Scientific)
- PZR Cihazı (Applied Biosystems Veriti)
- 4 °C'lik buzdolabı (Vestel)
- -20 °C'lik derin dondurucu (Vestel)
- -80°C'lik derin dondurucu (Thermo Scientific)
- Soğutmalı santrifüj (Beckman Coulter Allegra® X-15R)
- Mikrosantrifüj (Hettich Mikro 200)
- Flash spindown (My Fuge by Benchmark)
- Vorteks (Boeco)
- Isıtıcı Blok (Benchmark)
- Ayarlanabilir otomatik pipetler (Eppendorf)

3.1.5. Kimyasal Malzemeler

- RNA izolasyon kiti (Qiagen RNeasy Mini Kit)
- cDNA sentez kiti (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit Roche)
- Real time PCR miks kiti (LightCycler® 480 Probes Master)
- IL-3 Primer (RealTime ready Roche)
- IL-6 Primer (RealTime ready Roche)
- IL-11 Primer (RealTime ready Roche)

- GAPDH Primer (RealTime ready Roche)
- Etanol (J. T. Baker)
- 2-Mercaptoethanol (for synthesis Merck)

3.2. Yöntem

3.2.1. Kan Örneklerinin Alınması ve Saklanması

Kontrol hastalarından EDTA'lı tüplere 2-3 ml periferik kan örnekleri alındı. Hastaların hemogram sonuçlarındaki lökosit sayıları dikkate alınarak her hastadan 10/lökosit sayısı bölünerek RNA izolasyonu için ne kadar kan kullanacağımız hesaplandı. Kan geldiği gün RNA izolasyonunun ilk aşaması yapıp -20°C'lik derin dondurucuya kaldırıldı. Daha sonra toplanan grupla beraber ikinci aşama yapıldı ve elde edilen RNA'lar hasta RNA'larının da bulunduğu -80°C'lik derin dondurucuya kaldırıldı.

3.2.2. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için Qiagen RNeasy Mini Kit kullanıldı. Başlamadan önce;

- Konsantre halde bulunan Buffer RPE, ilk kullanımdan önce üzerine 4 katı hacimde %100'lük etanol eklenir ve karıştırılır.
- Kullanımdan önce Buffer RLT içerisinde presipitatlar oluşmaması için 37°C 'ye ısıtılarak çözülmalıdır.
- 2-merkaptoetanol (2-ME) kullanımdan hemen önce Buffer RLT içerisine eklenmelidir. Örnek başına 1 mililitre (ml) (1000µl) RLT içerisine 10 µl 2-ME eklenir. Bu solüsyon oda sıcaklığında 1 aya kadar saklanabilir.

Periferik kan ilk geldiği gün yaptığımız ilk aşama;

- 50 ml'lik etekli falcon tüp içine periferik kan konuldu ve üzerine 5 katı kadar Buffer EL eklenir.
- 4°C'lik buzdolabına kaldırılır ve burada 10-15 dk kadar bekletilir, arada 2 kez hafifçe altüst edilerek karıştırılır.

- 400 g kuvveti (g)'de 10 dakika (dk) süreyle, 4°C'de santrifüj edildi, süpernatant kısım tamamen alınır.
- Kan miktarının 2 katı kadar Buffer EL eklenip, hücrelerin iyice çözülmesi sağlanır.
- 400 g'de 10 dk süreyle, 4°C'de santrifüj edildi ve süpernatant kısım tamamen atılır.
- Kullandığımız kan miktarı $\leq 0,5$ ise 350 μ l, $> 0,5$ ise 600 μ l 2-ME ile hazırlanmış Buffer RLT eklenir.
- Lizat tamamen homojen olmalıdır, beyaz küreler parçalanıp lizat sıvılaşıncaya kadar pipetle karıştırılır.
- -20°C'de saklanmak istenen lizat bu aşamada saklanabilir.
- -20°C'lik derin dondurucuda ilk aşaması yapıp bekleyen materyaller bir grup (6-10) olduktan sonra ikinci aşamaya geçilir.
- Son basamakta eklenen 2-ME eklenmiş Buffer RLT miktarı kadar %70'lik etanol eklenir ve pipetaj yapılır.
- Pipetaj sonrası lizat, QIAamp Spin kolona yüklenir. Kolonun maksimum kapasitesi 700 μ l'dir. Gerekirse iki seferde lizat yüklenebilir.
- 1 dk süreyle mikrosantrifüjde 13.000 dakikadaki devir sayısı (rpm)'nda santrifüj edilir.
- QIAamp spin kolon temiz bir tüpe aktarılır. 700 μ l Buffer RW1 eklenir.
- 15 saniye (sn) boyunca mikrosantrifüjde 11.000 rpm'de santrifüj edilir.
- QIAamp spin kolon temiz bir tüpe aktarılır. Üzerine 500 μ l Buffer RPE eklenir.
- 15 sn boyunca mikrosantrifüjde 11.000 rpm'de santrifüj edilir.
- QIAamp spin kolon temiz bir tüpe aktarılır ve 500 μ l Buffer RPE eklenir.
- 3 dk süresince mikrosantrifüjde 11.000 rpm'de santrifüj edilir.
- QIAamp spin kolon temiz bir tüpe aktarılır. Maksimum hızda 1 dk boş olarak çevrilir.
- QIAamp spin kolon 1.5 ml'lik eppendorf tüpe aktarılır. 50 μ l Rnase free water eklenir.

- 1 dk boyunca mikrosantrifüjde 11.000 rpm’de santrifüj edilir. Santrifüj sonrası elde ettiğimiz ürün RNA’dır.

3.2.3. cDNA Sentezi

Elde ettiğimiz RNA’dan cDNA elde etmek için Roche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit kullanıldı. Kit içerisindeki malzemeler numaralandırılmış olup içerikler metinde belirtilmiştir.

- İlk aşamada 10 µl RNA, 2 µl Random Hexamer Primer (6) ve 1 µl Anchored oligo (dT)₁₈ Primer (5)’den toplam 13 µl pcr tüplerine konur. RNA konsantrasyonuna göre RNA miktarı azaltılıp yerine su konabilir.
- Hazırlanan pcr tüpleri 65°C’de 10 dk pcr programına koyulur.
- PCR devam ederken her hasta için 4 µl Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer (2), 2 µl Deoxynucleotide Mix (4), 0.5 µl Protector RNase Inhibitor (3) ve 0.5 µl Transcriptor Reverse Transcriptase (1)’dan oluşan miks hazırlanır.
- 10 dk sonra içinde 13 µl olan pcr tüpüne, hazırlanan miksdan 7 µl konulur.
- Hazırlanan pcr tüpleri aşağıdaki pcr programına koyulur.
25°C’de 10 dk 1 döngü
50°C’de 60 dk 1 döngü
85°C’de 5 dk 1 döngü
- PCR programı bittiğinde elimizde 20 µl cDNA olur ve -20°C’de dolaba kaldırılır.

3.2.4. Ekspresyon Analizi

IL-3, IL-6, IL-11 ve houskeeping gen olarak seçtiğimiz GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) genleri ilgili primerler kullanılarak cDNA’dan çoğaltıldı. Kantitatif Real time PZR (LightCycler® 480 II Real time PCR) ile gen ekspresyonu tayinleri yapıldı. IL-3, IL-6, IL-11 ve G6PDH primerleri için RealTime ready, real time PZR master miksi için LightCycler® 480 Probes

Master kullanıldı. Kit içerisindeki malzemeler numaralandırılmış olup içerikler metinde belirtilmiştir.

- LightCycler® 480 Probes Master içindeki; LightCycler® 480 Probes Master'dan 10 µl ve sudan 3 µl konularak örnek+No Template Control (NTC) sayısı kadar miks hazırlanır.
- RealTime ready kitindeki çalışmamıza ait primerden de her örnek başına 2 µl konulur.
- Hazırlanan miks 96'lık plate üzerinde çalıştığımız sayı kadar kuyucuklara dağıtılır.
- Dağıtılan kuyucukların üzerine önceki aşamada elde ettiğimiz cDNA'dan 5 µl konulur.
- Plate'in üzeri kapatılarak aşağıdaki pcr programı hazırlanıp LightCycler® 480 II Real time PZR'a koyulur.

95°C'de 10 dk	}	1 döngü
95°C'de 10 sn		
60°C'de 30 sn	}	45 döngü
72°C'de 1 sn		
40°C'de 10 sn	}	1 döngü

3.3. İstatistiksel Analiz

Hasta ve kontrol grubundan elde edilen veriler SPSS 20.0 (USA) programı kullanılarak istatistiksel analiz yapıldı. Gruplar arasındaki dağılımlarının karşılaştırılması ki-kare (X^2) testi ile yapıldı. Gruplar arasında yaş ve cinsiyet açısından değerlendirme sonrası sonuçlar önemli olarak kabul edildi ($p<0.05$). Ayrıca gruplar arasında IL-3, IL-6 ve IL-11 gen ekspresyon düzeylerinin kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla nisbi kantitasyon metodu kullanılarak kantitatif real time PZR analizi yapıldı. Sonuçların anlamlılık derecesi $2^{-\Delta\Delta ct}$ Livak metodu kullanılarak gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

KML hastalarında IL-3, IL-6 ve IL-11 gen ekspresyonlarının çalışılması için Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 15/07/2015 tarih ve 2015/72 no'lu etik kurul onayı alındıktan sonra Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Hematoloji Bilim Dalında KML tanısı konulup, rutin tetkikleri çalışılması için periferik kan veya kemik iliği örnekleri Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalına gönderilen yaşları 26 ile 82 arasında değişen, yaş ortalaması 57,21 ($\pm 17,53$) olan 15 erkek ve 18 kadın toplamda 33 hasta ve Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Polikliniklerinde yapılan muayene ve tetkikler sonucu hematolojik açıdan sağlıklı oldukları anlaşılan yaşları 29 ile 81 arasında değişen, yaş ortalaması 54,85 ($\pm 13,68$) olan 17 erkek ve 17 kadın toplamda 34 sağlıklı kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi.

Elimizde bulunan 3 gruptan sağlıklı olanlarına S grubu, ilk tanı anında majör BCR-ABL'i yüksek olanlar H grubu ve aynı hastaların MMY'a ulaşan örneklerinin olduğu grup ise D grubu olarak adlandırıldı.

S Grubu: Sağlıklı gönüllüler, Kontrol Grubu

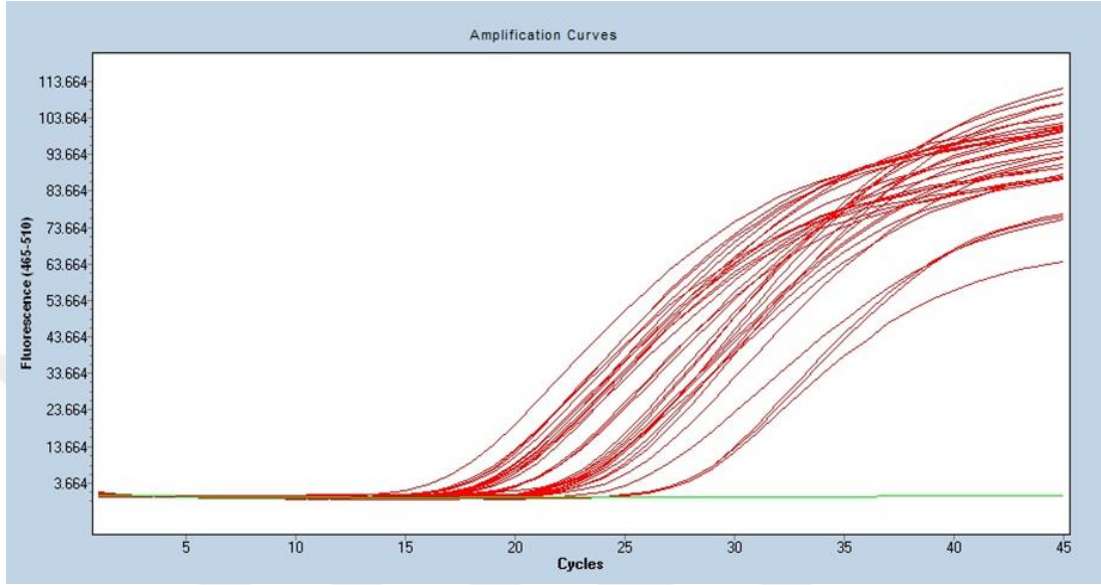
H Grubu: İlk tanı anındaki majör BCR-ABL'i yüksek olan hastalar

D Grubu: H grubundaki hastaların MMY'a ulaşan örnekleri

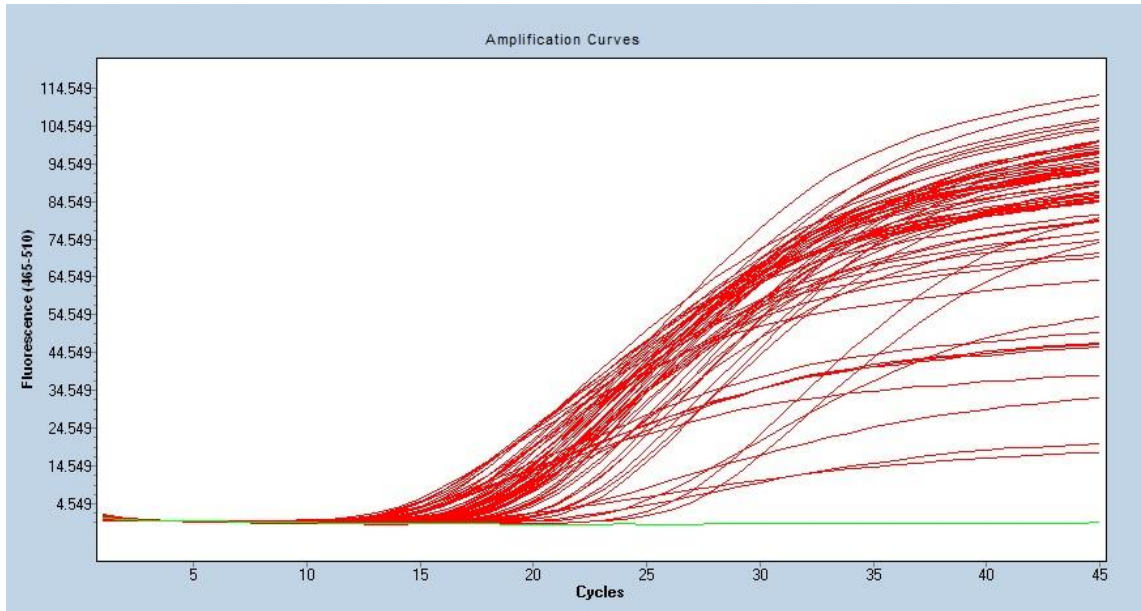
Tablo 14. Gruplardaki Cinsiyet, Yaş ve Lökosit Sayısı Dağılımı

	Cinsiyet		Yaş ($\pm$ SD)	Lökosit sayısı ($\pm$ SD) (/ μ l)
	Kadın (n)	Erkek (n)		
S Grubu	17	17	54,85 ($\pm 13,68$)	7859 ($\pm 1918,45$)
H Grubu	18	15	57,21 ($\pm 17,53$)	25576 ($\pm 26445,84$)
D Grubu	18	15	57,21 ($\pm 17,53$)	7168 ($\pm 2407,78$)

Houskeeping gen olarak seçtiğimiz GAPDH için LightCycler® 480 II Real time PZR sonucunda elde ettiğimiz amplifikasyon eğrileri Şekil 7 ve 8’de gösterilmiştir.



Şekil 7. S Grubu için GAPDH Amplifikasyon Eğrileri



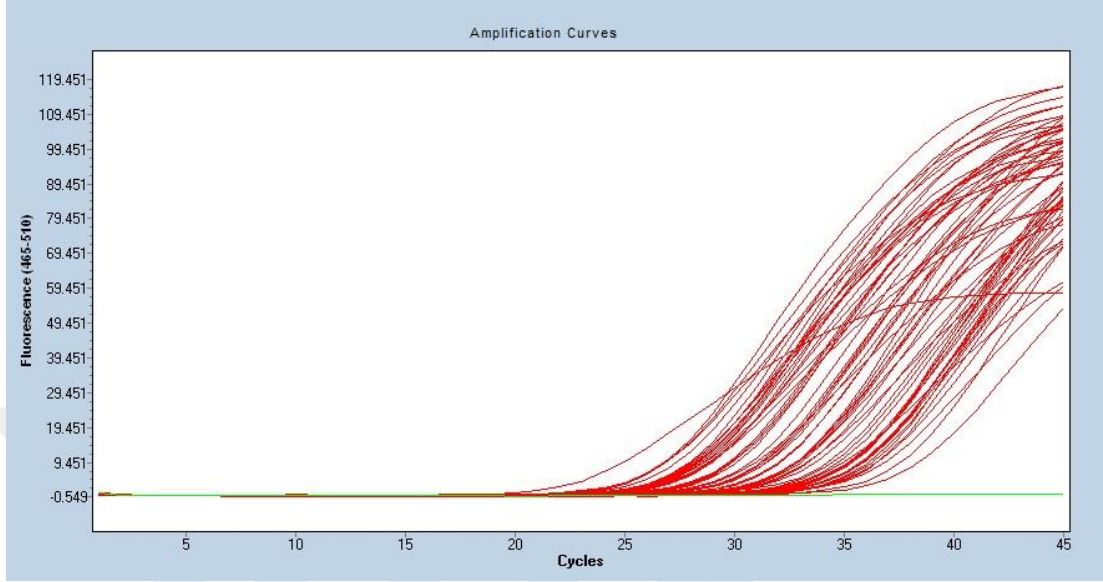
Şekil 8. H ve D Grubu için GAPDH Amplifikasyon Eğrileri

Çalışma sonucunda houskeeping genimiz olan GAPDH için amplifikasyon eğrilerinin yanında elde ettiğimiz cycle treshold (CT) değerlerini aldık. GAPDH için elde ettiğimiz CT değerleri Tablo 15’de verilmiştir.

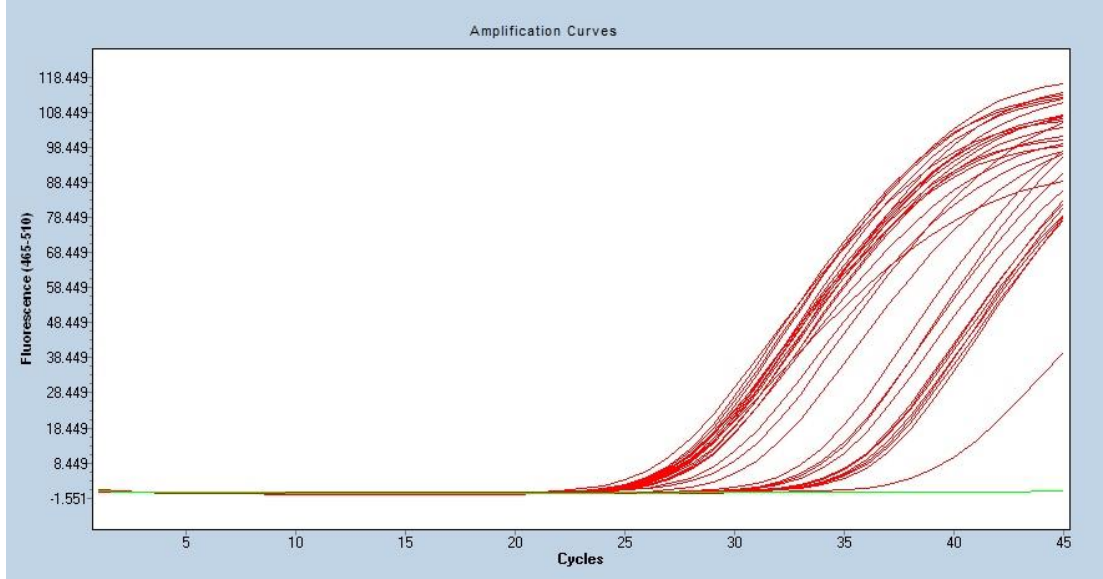
Tablo 15. S, H ve D Grubu GAPDH CT Değerleri

	GAPDH		GAPDH		GAPDH
S1	18,9	H1	14,36	D1	21,8
S2	27,98	H2	19,63	D2	18,16
S3	18,99	H3	14,53	D3	18,07
S4	20,92	H4	13,92	D4	19,01
S5	19,67	H5	15	D5	20,03
S6	18,08	H6	14,76	D6	23,92
S7	28,19	H7	20,79	D7	17,9
S8	18,88	H8	19,29	D8	20,04
S9	19,57	H9	16,31	D9	18,27
S10	25,13	H10	17,19	D10	20,65
S11	21,23	H11	17,91	D11	18,03
S12	22,88	H12	17,7	D12	26,09
S13	25,63	H13	15,88	D13	26,92
S14	28,26	H14	21,97	D14	19,89
S15	19,62	H15	16,38	D15	17,57
S16	19,34	H16	15,8	D16	16,19
S17	19,03	H17	15,28	D17	16,36
S18	17,15	H18	14,45	D18	19,74
S19	18,49	H19	16,37	D19	17,16
S20	18,67	H20	13,34	D20	18,21
S21	19,65	H21	13,89	D21	18,87
S22	20,22	H22	15,12	D22	18,65
S23	24,31	H23	17,42	D23	17,68
S24	21,3	H24	18,83	D24	17,78
S25	23,16	H25	17,9	D25	19,9
S26	19,31	H26	14,42	D26	18,64
S27	22,7	H27	18,68	D27	21,94
S28	22,85	H28	19,08	D28	21,18
S29	22,93	H29	15,64	D29	21,46
S30	24,8	H30	18,83	D30	18,76
S31	23,44	H31	17,35	D31	21,4
S32	23,55	H32	19,67	D32	19,21
S33	23,88	H33	18,68	D33	22,72
S34	23,81	ORT.	16,86	ORT.	19,76
ORT.	21,84				

IL-3 için LightCycler® 480 II Real time PZR sonucunda elde ettiğimiz amplifikasyon eğrileri Şekil 9 ve 10'da verilmiştir.



Şekil 9. S ve H Grubu için IL-3 Amplifikasyon Eğrileri



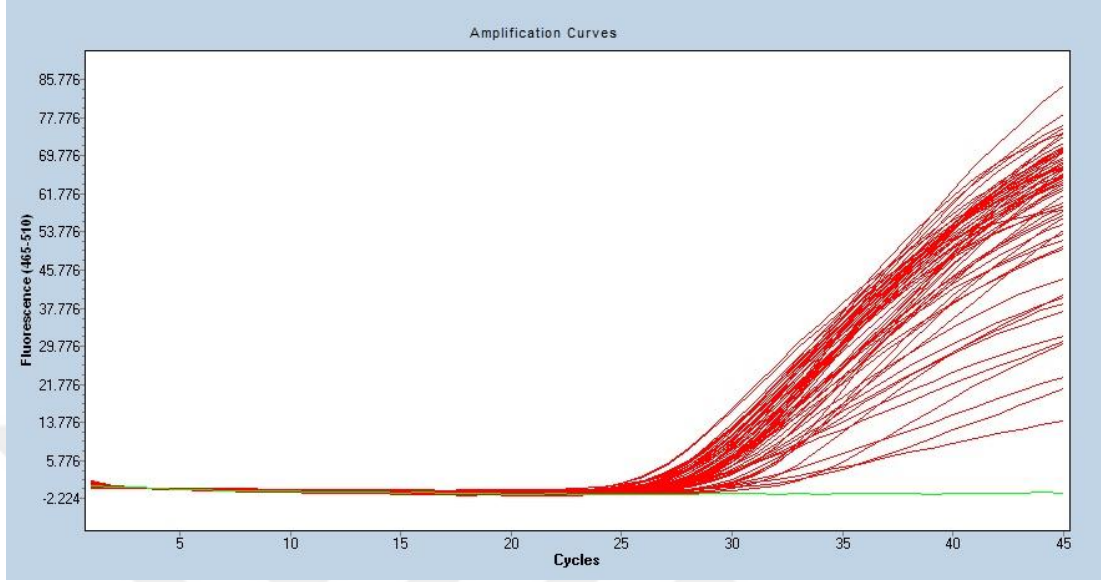
Şekil 10. D Grubu için IL-3 Amplifikasyon Eğrileri

Çalışma sonucunda IL-3 için amplifikasyon eğrilerinin yanında elde ettiğimiz CT değerleri Tablo 16'daki gibidir.

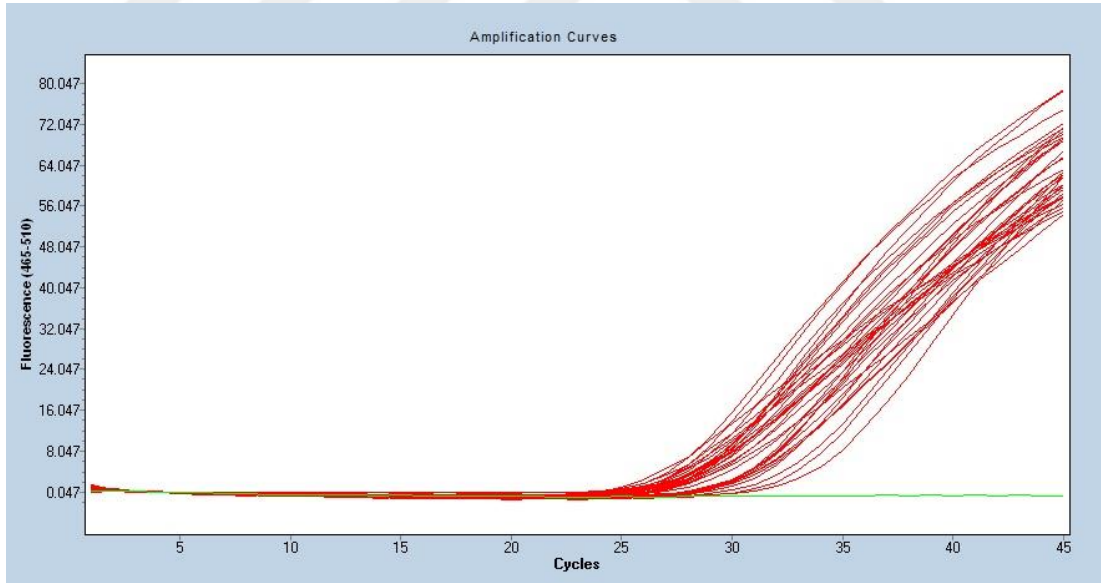
Tablo 16. S, H ve D Grubu IL-3 CT Değerleri

	IL-3		IL-3		IL-3
S1	34,09	H1	34,16	D1	26,34
S2	26,43	H2	27,95	D2	28,31
S3	32,85	H3	28,17	D3	29,3
S4	31,36	H4	32,72	D4	27,86
S5	32,91	H5	36,46	D5	28,05
S6	31,98	H6	33,51	D6	27,36
S7	28,18	H7	30,25	D7	34,05
S8	28,7	H8	35,57	D8	28,39
S9	28,88	H9	35,49	D9	35,74
S10	26,83	H10	35,66	D10	30,13
S11	29,86	H11	23,26	D11	34,54
S12	32,93	H12	36,26	D12	26,73
S13	28,02	H13	34,75	D13	27,4
S14	29,71	H14	27,94	D14	35,85
S15	28,48	H15	34,11	D15	30,92
S16	27,7	H16	35,84	D16	35,66
S17	28,61	H17	35,22	D17	35,63
S18	31,38	H18	35,71	D18	40
S19	31,2	H19	36	D19	28,15
S20	29,85	H20	33,57	D20	27,96
S21	32,59	H21	34,26	D21	28,68
S22	31,37	H22	35,14	D22	28,64
S23	27,99	H23	28,2	D23	36,17
S24	32,06	H24	35,76	D24	36,57
S25	27,79	H25	38	D25	27,95
S26	29,62	H26	32,43	D26	36,14
S27	31,03	H27	35,96	D27	27,55
S28	27,22	H28	36,27	D28	27,32
S29	30,74	H29	35,65	D29	28,53
S30	28,62	H30	36,49	D30	34,34
S31	30,12	H31	34,42	D31	27,55
S32	26,87	H32	35,55	D32	33,39
S33	33	H33	37,62	D33	27,76
S34	28,98	ORT.	33,89	ORT.	30,88
ORT.	29,94				

IL-6 için LightCycler® 480 II Real time PZR sonucunda elde ettiğimiz amplifikasyon eğrileri Şekil 11 ve 12’de gösterilmiştir.



Şekil 11. S Grubu için IL-6 Amplifikasyon Eğrileri



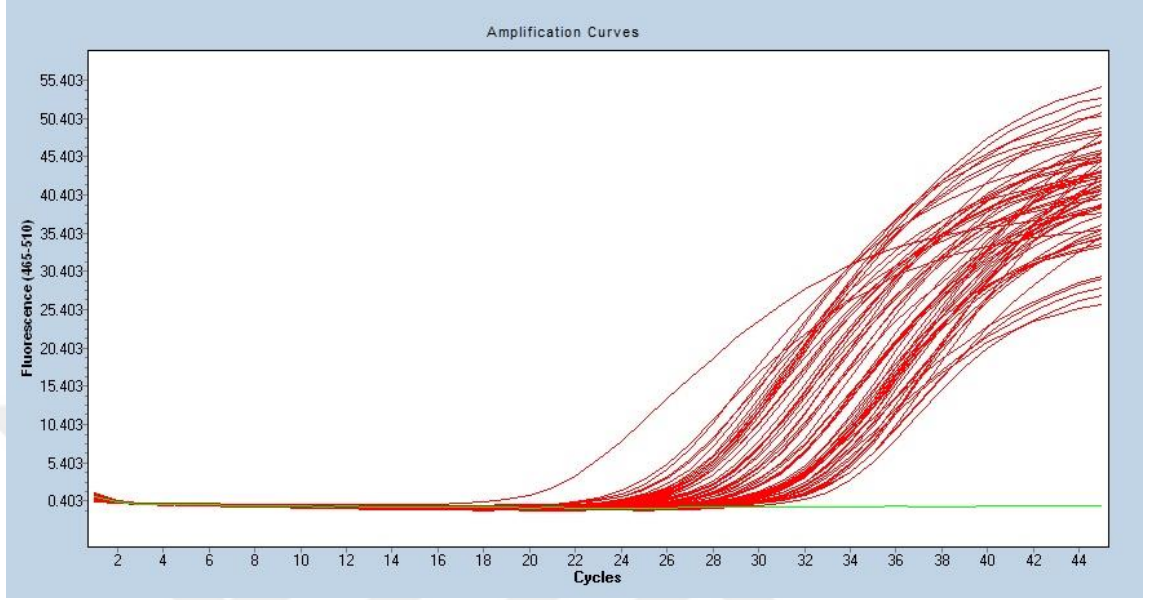
Şekil 12. H ve D grubu için IL-6 amplifikasyon eğrileri

Çalışma sonucunda IL-6 için amplifikasyon eğrilerinin yanında elde ettiğimiz CT değerleri Tablo 17’de verilmiştir.

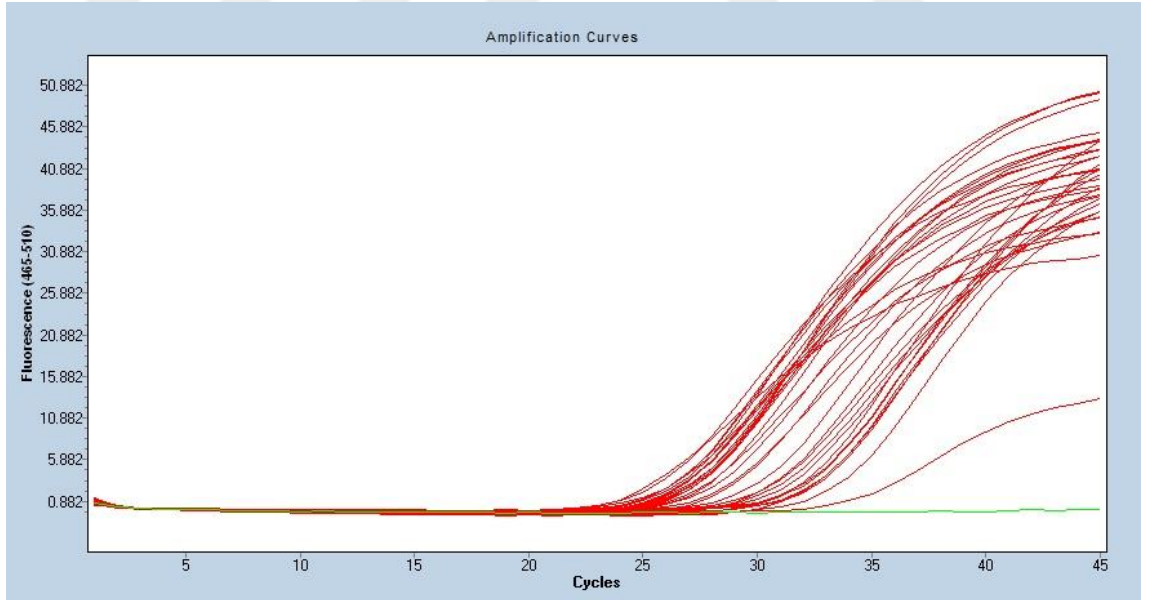
Tablo 17. S, H ve D Grubu IL-6 CT Değerleri

	IL-6		IL-6		IL-6
S1	30,3	H1	28,58	D1	27,59
S2	26,01	H2	29,91	D2	27,8
S3	30,67	H3	28,53	D3	27,36
S4	27,65	H4	28,92	D4	27,67
S5	28,68	H5	28,57	D5	27,23
S6	28,73	H6	28,56	D6	28,33
S7	28	H7	33,02	D7	27,98
S8	28,88	H8	30,67	D8	29,56
S9	29,83	H9	27,52	D9	28,91
S10	27,86	H10	29,43	D10	31,39
S11	30,87	H11	29,92	D11	29,6
S12	32,95	H12	28,95	D12	29,87
S13	28,42	H13	31,43	D13	28,31
S14	30,76	H14	28,7	D14	29,27
S15	26,83	H15	33,12	D15	30,31
S16	26,74	H16	27,41	D16	26,37
S17	28,33	H17	26,38	D17	27,14
S18	28,53	H18	28,54	D18	31,73
S19	28,87	H19	28	D19	27,54
S20	27,24	H20	29,16	D20	28,02
S21	28,03	H21	29,14	D21	27,98
S22	31,54	H22	27,1	D22	28,07
S23	28,2	H23	27,73	D23	27,75
S24	31,67	H24	28,54	D24	27,59
S25	28,89	H25	28,58	D25	28,11
S26	28,68	H26	29,71	D26	28,67
S27	31,06	H27	29,81	D27	29,23
S28	27,69	H28	31,63	D28	28,69
S29	32,65	H29	29,29	D29	29,82
S30	30,99	H30	29,37	D30	28,67
S31	31,11	H31	29,12	D31	28,93
S32	28,13	H32	29,94	D32	29,44
S33	34,22	H33	29,53	D33	29,96
S34	29,85	ORT.	29,24	ORT.	28,63
ORT.	29,38				

IL-11 için LightCycler® 480 II Real time PZR sonucunda elde ettiğimiz amplifikasyon eğrileri Şekil 13 ve 14’te verilmiştir.



Şekil 13. S ve H Grubu için IL-11 Amplifikasyon Eğrileri



Şekil 14. D Grubu için IL-11 Amplifikasyon Eğrileri

Çalışma sonucunda IL-11 için amplifikasyon eğrilerinin yanında elde ettiğimiz CT değerleri Tablo 18’de verilmiştir.

Tablo 18. S, H ve D Grubu IL-11 CT Değerleri

	IL-11		IL-11		IL-11
S1	31,64	H1	32,06	D1	26,4
S2	24,57	H2	25,17	D2	26,54
S3	30,01	H3	25,13	D3	27,38
S4	29,06	H4	31,84	D4	26,28
S5	30,39	H5	31,49	D5	26,73
S6	30,42	H6	30,71	D6	24,59
S7	26,88	H7	28,12	D7	30,93
S8	27,38	H8	33,11	D8	28,26
S9	27,79	H9	31,93	D9	32,5
S10	26,65	H10	31,57	D10	30,22
S11	29,77	H11	21,27	D11	32,86
S12	32,25	H12	31,72	D12	27,17
S13	27,32	H13	32,68	D13	27,14
S14	28,51	H14	27,59	D14	33,67
S15	26,84	H15	30,92	D15	28,36
S16	25,38	H16	31,54	D16	30,67
S17	25,69	H17	31,87	D17	30,57
S18	29,17	H18	31,75	D18	34,06
S19	28,66	H19	31,07	D19	25,71
S20	28,2	H20	32,06	D20	25,98
S21	30,6	H21	31,56	D21	27,06
S22	30,59	H22	31,57	D22	27,32
S23	27,21	H23	26,75	D23	32,51
S24	31,53	H24	33,4	D24	31,27
S25	26,76	H25	33,11	D25	28,74
S26	28,62	H26	29,9	D26	32,4
S27	29,55	H27	32,17	D27	27,82
S28	26,37	H28	33,36	D28	26,38
S29	30,21	H29	33,03	D29	27,52
S30	27,52	H30	33,41	D30	32,1
S31	29,63	H31	32,49	D31	26,89
S32	27,58	H32	33,58	D32	32,34
S33	31,67	H33	33,86	D33	27,72
S34	28,55	ORT.	30,96	ORT.	28,97
ORT.	28,62				

Yeni tanı alan, majör moleküler yanıt gelişen ve sağlıklı kontrol gruplarının rölatif gen ekspresyon analizi Livak $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak hesaplandı. Hesaplama önce her grup için GAPDH, IL-3, IL-6 ve IL-11 CT değerlerinin ortalaması alındı.

$$\Delta CT = (\text{Hedef gen ortalama CT}) - (\text{Houskeeping gen ortalama CT})$$

$$\Delta\Delta CT = (\text{Hasta grup } \Delta CT) - (\text{Kontrol grup } \Delta CT)$$

İki grup arasındaki farklılık $2^{-\Delta\Delta CT}$ ile hesaplandı ve gruplar arasındaki ilişki araştırıldı.

Elde ettiğimiz verilere göre H grubundaki hastaların kontrol grubuna (S grubu) göre IL-3 ekspresyon düzeyleri 476,19 kat azalmış olarak bulundu. D grubundakilerin ise S grubuna göre IL-3 ekspresyon düzeylerinde 8,11 katlık azalma saptanmıştır (Tablo 19). D grubundaki hastaların H grubuna göre IL-3 ekspresyon düzeylerinde 58,71 kat artış saptanmıştır.

Tablo 19. S, H ve D Grupları Arasındaki IL-3 Ekspresyon Oranları

	IL-3 Ort. CT	GAPDH Ort. CT	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$	Ekspresyondaki Değişiklik
S Grubu	29,94	21,84	8,1			
H Grubu	33,89	16,86	17,03	8,93	0,0021	476,19 kat azalma
D Grubu	30,88	19,76	11,12	3,02	0,1233	8,11 kat azalma

IL-6 için H grubundaki hastaların ekspresyon düzeyleri ise kontrol grubuna göre 28,65 kat azalmış olarak bulunmuştur. D grubunun IL-6 düzeyleri ise kontrol grubuna göre 2,51 kat azalma göstermiştir (Tablo 20). D grubundaki hastaların H grubuna göre IL-6 ekspresyon düzeylerinde 11,41 kat artış saptanmıştır.

Tablo 20. S, H ve D Grupları Arasındaki IL-6 Ekspresyon Oranları

	IL-6 Ort. CT	GAPDH Ort. CT	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$	Ekspresyondaki Değişiklik
S Grubu	29,38	21,84	7,54			
H Grubu	29,24	16,86	12,38	4,84	0,0349	28,65 kat azalma
D Grubu	28,63	19,76	8,87	1,33	0,3978	2,51 kat azalma

IL-11 ekspresyon çalışmamızın sonucunda da H grubunda kontrol grubuna göre 158,73 katlık azalma saptandı. D grubunda ise kontrol grubuna oranla 5,39 katlık bir azalma elde edilmiştir (Tablo 21). D grubundaki hastaların H grubuna göre IL-11 ekspresyon düzeylerinde 29,45 kat artış saptanmıştır.

Tablo 21. S, H ve D Grupları Arasındaki IL-11 Ekspresyon Oranları

	IL-11 Ort. CT	GAPDH Ort. CT	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$	Ekspresyondaki Değişiklik
S Grubu	28,62	21,84	6,78			
H Grubu	30,96	16,86	14,1	7,32	0,0063	158,73 kat azalma
D Grubu	28,97	19,76	9,21	2,43	0,1856	5,39 kat azalma

5. TARTIŞMA

KML hematopoetik kök hücrelerin neoplastik transformasyonundan kaynaklanan klonal myeloproliferatif bir hastalıktır (183-185). KML vakalarının %90'ından fazlası 9 ve 22 nolu kromozomlar arasında resiprokal translokasyon sonucu oluşan Philadelphia kromozomu varlığı ile ilişkilidir (49). Bu translokasyon sonucunda 22. kromozomdaki BCR geni ile 9. kromozomdaki ABL geni birleşerek BCR-ABL onkogenini oluşturur (28, 186). BCR-ABL çok sayıda proteinle etkileşime giren ve birden fazla sinyal iletim yolunu aktive edebilen birçok fonksiyonel domain içerir (187-189).

IL-3 hematopoetik hücrelerin proliferasyonunda rol oynayan uyaranlardan biridir. Pluripotent kök hücrelerden başlayarak myeloid serideki hücrelerin tamamına, hemen hemen her basamakta etkilidir (4).

IL-6'nın sinir sistemi, immün ve endokrin sistem başta olmak üzere çok sayıda sistemde biyolojik rolü olan geniş bir yelpazeye sahiptir (190, 191). IL-6 hem akut hem de kronik inflamasyonun primer düzenleyicisidir, bu sayede birçok hastalığın tedavisi için de hedef halini almıştır (192). Bizim için daha önemli olan kısmı IL-6'nın hematopoez özellikle hematopoetik kök hücrelerin ve trombositlerin gelişimindeki rolüdür (4).

IL-11'in aktivitesi için uzun bir liste yazılmasına karşın hematopoetik progenitorlerin proliferasyon ve diferansiyasyonunda, ayrıca trombositlerin gelişiminin hemen her basamağında etkili olması, çalışmamız açısından daha değerlidir.

Yapmış olduğumuz çalışmanın sonucunda yeni tanı almış hasta grubunda IL-3, IL-6 ve IL-11 gen ekspresyonlarında sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı azalma görülmüştür (sırasıyla 476,19; 28,65; 158,73 kat azalma). Benzer şekilde majör moleküler yanıtın olduğu grupta sağlıklı kontrollere göre aynı genlerin ekspresyonlarında azalma gözlemlenmiştir (sırasıyla 8,11; 2,51; 5,39 kat azalma). Majör moleküler yanıtın olduğu grup hasta grubuna göre karşılaştırıldığında grubunda IL-3, IL-6 ve IL-11 gen ekspresyonlarında anlamlı bir artış tespit edilmiştir (sırasıyla 58,71; 11,41; 29,45 kat artış).

IL-3 için belirli patolojik koşullara yanıt olarak üretilen bir sitokin olduğunu ve normal hematopoez için gerekli olmadığını gösteren yayınlarda mevcuttur (193). IL-3 bazal hematopoez için gerekli değildir. Ancak hematopoetik hücrelerin proliferasyonunu, hayatta kalmasını ve farklılaşmasını desteklemek için etkili olan sitokindir. IL-3'ün anormal ekspresyonu hematopoezde bir dengesizliğe neden olabilir (78). Farelerde artmış IL-3 ekspresyonunun miyeloproliferatif bozukluklara neden olabileceği gösterilmiştir (194).

Hariharan ve arkadaşlarının 1988 yılında yaptığı bir çalışmalarında KML'de BCR-ABL onkogeninin myeloid hücre hattı üzerinde otokrin olarak salgılatığı faktörleri araştırmışlardır. Çalışma sonucunda myeloid lösemik hücrelerin tamamen bağımsız olarak büyümesinin altında bu hücrelerden az miktarda da olsa salgılanan IL-3'ün rolünün olabileceği düşünülmüştür (195).

KML'nin gelişiminde BCR-ABL'in kritik rolü olduğunu ve moleküler mekanizmasının daha fazla aydınlatılması gerekliliğini vurgulayan bir çalışma farelerde yapılmıştır. Bu çalışmada farelerdeki lösemik hücrelerin aşırı miktarda IL-3 ve GM-CSF eksprese ettiği bulunmuştur. Ayrıca KML gelişiminde rol oynayan moleküler mekanizmalardan olan IL-3 ve GM-CSF gibi hematopoetik büyüme faktörlerinin, KML'deki klinik fenotipe de katkı sağladığı gösterilmiştir (78).

Veronika Sexl ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarında transkripsiyon faktörü olan STAT5'in a ve b olmak üzere iki tipinin üzerinde durulduğu, in vitro ve in vivo olarak myeloid ve lenfoid tümör gelişimde STAT5a/b'nin zorunlu bir faktör olmadığı ortaya konmuştur. Çalışmada in vivo ve in vitro örneklerle IL-3 ve IL-6 eklenmiş ve bu faktörlerin etkilerinin göz önüne alınması gerektiği vurgulanmıştır (196).

Anderson ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada farelerde BCR-ABL onkogeninin sitokin sekresyonunu indüklediğinin anlatıldığı çalışmada farelerdeki myeloid hücre serisinde BCR-ABL geninin IL-3 sekresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca BCR-ABL onkogenindeki SH2 bölgesinin delesyonunda IL-3 sekresyonun olmadığı da gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada BCR-ABL'in lösemi gelişimini birden fazla yolla aktive ettiğine değinilmiştir (197).

Öte yandan BCR-ABL genindeki SH2 bölgesiyle ilgili yapılan başka bir çalışmada SH2 bölgesine nokta mutasyonu ve komplet delesyon uygulanarak

sonuçlar değerlendirilmiştir. İntrensek ABL kinaz aktivitesi üzerinde olumsuz etkisine rağmen her iki SH2 bölge mutasyonları hematopoetik faktör bağımlı ve büyüme faktöründen bağımsız hücre hatlarında hala transformasyona neden olabilir. Beklenmedik bir şekilde bu iki mutasyon da, yabanil tip P210 BCR-ABL'den daha fazla transforme edici aktiviteye sahiptir. Bu çalışmanın sonucuna göre SH2 domaini fibroblastların transformasyonu için daha zorunlu iken, hematopoetik faktör bağımlı hücre hatlarının transformasyonu için vazgeçilebilir durumda olduğu gösterilmiştir (198). Anderson arkadaşlarının yaptığı çalışmada BCR-ABL onkogenindeki SH2 bölgesinin delesyonunda IL-3 sekresyonun olmadığı gösterilmiştir (197). SH2 bölgesinin delesyonunda da lösemik transformasyon olması gösteriyor ki IL-3 sekresyonu olmadığı zaman da lösemi gelişebilir. Nitekim bizim yaptığımız çalışmada da IL-3 ekspresyon seviyesinin yeni tanı alan hastalarda normale göre çok düşük çıkması IL-3'n myeloid lösemi için elzem olmadığını göstermektedir.

Ayrıca yüksek miktarda eksprese olan BCR-ABL proteininin IL-3'den bağımsız hücre hatlarındaki etkisini ortaya koyan bir çalışma da George Q. Daley ve David Baltimore tarafından yapılmıştır. IL-3'den bağımsız p210 BCR-ABL ile enfekte edilmiş hücrelerde kısa latent döneme sahip, regrese olmayan ve letal olabilen tümör oluşumu izlenmiştir. Bu çalışmada p210 BCR-ABL'in tümör oluşumunu indüklediği ve bu hücre hatlarında IL-3 için otokrin bir salınımın kanıtı olmadığı vurgulanmıştır. IL-3'den bağımsız hücre hatlarında her zaman yüksek oranda ABL ekspresyon olması IL-3'den bağımsız hücrelerin ABL ekspresyonunun yüksek olması gerektiğini destekler (199). Bizim yaptığımız çalışmamızda da BCR-ABL ekspresyonu yüksek olduğu zaman hücrelerin IL-3 ekspresyonunun çok azaldığını bulduk. Tedavi alan hastalarda ise yeni tanı alanlara göre artmış IL-3 ekspresyon seviyeleri, BCR-ABL ekspresyonunun düşük olduğu zamana denk gelmekte ve bu durum George Q. Daley ve David Baltimore'un yaptığı çalışma ile uyumludur.

Li ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada IL-3 geni, GM-CSF geni ve her ikisi de homozigot olarak inaktive edilmiş farelerde BCR-ABL'e bağlı KML benzeri hastalıkların gelişimine bu sitokinlerin etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. P210 BCR-ABL'e bağlı KML benzeri lösemi için alıcı, donör ve her ikisi için de ne IL-3 ne de GM-CSF'nin gerekmediği ortaya konmuştur. IL-3 ve GM-CSF genleri inaktif

olan farelerin kullanımı lökomogenezinin bu hematopoetik büyüme faktörlerine bağlı olmadığını göstermiştir. Bu çalışmanın sonuçları farelerde BCR-ABL'in indüklediği KML benzeri lösemi için IL-3 ve GM-CSF gerekli olmadığını göstermiştir. Bu durum insanlarda saptanan kronik faz KML'de IL-3'ün otokrin üretiminin rolü olmadığını desteklemektedir (200). Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuç da yine bu çalışmayla uyumludur; IL-3 ekspresyonunun yeni tanı alan hastalarda sağlıklı kontrollere göre çok düşük, majör moleküler yanıtı giren hastalarda da sağlıklı kontrollere göre yine düşük olarak çıkması KML ile IL-3 arasındaki ilişkiyi zayıflatmakta, KML için IL-3'ün gerekli olmadığı görüşü ağırlık kazanmaktadır.

Ren ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarında kemik iliği hücrelerinde BCR-ABL ekspresyonu gösteren STAT5a, STAT5b, CBL, GM-CSF ve IL-3 genleri yönünden homozigot inaktive edilmiş farelerde buna rağmen KML benzeri myeloproliferatif hastalık geliştiği izlenmiştir. Bu da BCR-ABL aracılı lösemi oluşumunda bu proteinlere gerek olmadığını göstermektedir (59). BCR-ABL ekspresyonu gösterdikten sonra KML gelişmesi için IL-3'ün varlığına bile gerek olmadığını gösterilmesi bizim çalışmamızdaki ekspresyon seviyesinin normale göre çok düşük çıkması Ruibao Ren'in kaleme aldığı çalışmanın sonucuyla uyumluluk göstermektedir.

BCR-ABL ekspresyonu örnek olarak fare myeloid hücre serisi ve insan megakaryositik hücre hatlarında hematopoetik hücrelerin sitokinden bağımsız olarak büyümesini ve gelişmesini teşvik eder. Zaten imatinib tedavisi de bu hücre hatlarındaki IL-3 ve GM-CSF varlığında bu hücrelerin proliferasyonunu inhibe etmediği; sitokinlerin yokluğunda BCR-ABL'in eksprese olduğu hücreleri apoptozi aktive ettiği gösterilmiştir (59).

Anand ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, IL-6 için daha önce yapılan çalışmalara bakacak olursak; proinflamatuvar sitokinlerden olan IL-1, IL-6 ve TNF- α (Tümör nekrozu faktörü alfa)'nın KML'deki rolü araştırılmıştır. Serum IL-6 seviyesinin, KML kronik ve blastik fazdaki hastaların serum IL-6 seviyesi normale oranla belirgin derecede arttığı bulunmuştur. IL-6'daki bu artış blastik fazdaki hastalarda çok daha belirgindir. Serum IL-6 seviyesinin periferik kan monosit sayısı, kemik iliği blast sayısı ve bazofil sayısı ile önemli derecede ilişkili olduğu

bulunmuştur. Elde edilen sınırlı veriler ışığında serum IL-6 seviyesinin KML için bir prognostik faktör olarak rol oynayabileceği düşünülmüştür (201).

Welner ve arkadaşları lösemili hücrelerin, rutin devam eden hematopoezin normal paternini de bozduğu ve bunun nasıl oluştuğunu açıklamaya çalıştıkları çalışmalarında, KML'ye maruz kalan fare hematopoetik progenitör hücrelerin bölünmeye daha hazır hale geldiği, farklılaşmasının değiştiği ve kendini yenileme potansiyelinin azaldığını tespit etmişlerdir. Bu değişikliklerin çoğundan IL-6'nın sorumlu olduğu ve dahası IL-6'nın nötralizasyonunun bu değişiklikleri önlemede ve hastalığın tedavisinde önemli bir rolü olabileceği öngörülmüştür (202).

Pehlivan ve arkadaşlarının kronik faz KML'de IL-6, IL-10, TGF- β 1 (Transforming growth factor beta 1), IFN- γ (İnterferon-gama) ve TNF- α genleri polimorfizmlerinin prognostik önemini araştırdıkları çalışmada, IL-6 için KML hastalarında kontrol grubuna göre artmış olan GG genotipi tespit edilmiştir. GG genotipinin de IL-6 için artmış ekspresyonla ilişkili olduğu belirtilmiştir. Çalışma sonucunda da IL-10'un KML prognozunda yararlı bir marker olabileceği ve IL-6 GG genotipinin de duyarlılık ile ilişkili olabileceği vurgulanmıştır (203).

Humlova ve arkadaşlarının tedavi sırasında immünolojik profildeki değişimleri analiz ettikleri çalışmada, KML hastalarında tedaviye bağlı CRP (C-Reaktif Protein) ve IL-6'nın azalma eğilimine girdiğini göstermişlerdir. IL-6'daki azalma daha yaygın ve anlamlı bulunmuştur. Bu veriler ışığında IL-6 düzeylerinin azalması başarılı bir tedavinin oldukça güvenilir bir göstergesi olabileceği fikrini öne sürmüşlerdir (204).

Öte yandan, Chen ve arkadaşlarının IFN- α ve IFN- α ile IL-6 kombinasyonunun, KML hastalarının kemik iliğindeki mononükleer hücreleri üzerindeki büyüme ve BCR-ABL, BCL-2 (B-cell CLL/Lymphoma 2) ve C-MYC gen ekspresyonu üzerindeki etkisini araştırdıkları çalışmada, hücre büyümesi IFN- α ile belirgin şekilde inhibe edildiğini göstermişlerdir. Fakat inhibisyon derecesi, IFN- α ile IL-6 bir araya getirildiğinde azalmıştır. Yine bu çalışmaya göre BCR-ABL ve BCL-2 geninin ekspresyon seviyesi, IFN- α ve IFN- α ile kombine IL-6 tarafından azaldığı bulunmuştur (205). Bizim çalışmamızdaki IL-6 ekspresyon seviyesi de hastaların tanı anındaki yani BCR-ABL yüksek olduğu zaman daha düşüktür. Çalışmamızdaki majör moleküler yanıt alınan hasta grubunda IL-6 ekspresyon

seviyesi ilk tanı anına göre yüksek olduğunu göstermiş olmamız Chen ve arkadaşlarının bulgularını desteklemektedir.

Yine KML’de T hücrelerin fonksiyonunu değerlendirmek için IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, TNF- α ve GM-CSF gen ekspresyonunun değerlendirildiği bir çalışmada, diğer örneklerde sonuç alınırken IL-3, IL-6 ve GM-CSF mRNA’sı örneklerde tespit edilememiştir (206). Bizim yaptığımız çalışmada hastalarımızın IL-3 ve IL-6 RNA’sı tespit edilmiş olup sağlıklı bireylere göre anlamlı seviyede azalma meydana geldiği gösterilmiştir. Liu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada IL-3 ve IL-6 gen ekspresyonunu bulamamaları yüksek oranda kullandıkları metod ile ilgilidir.

Aralarında 6 KML hastasının da olduğu 42 myeloproliferatif hastanın yer aldığı Li ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada IL-3, IL-6 ve GM-CSF’ye karşı antikorlar kültürle konulup, trombosit kolonilerinin gelişimi izlenmiştir. Değişen konsantrasyonlarda anti-IL3, anti-IL6 ve anti-GMCSF antikorları kültürle eklenmiş ve herhangi bir ekzojen büyüme faktörü eklenmemiştir. Sonuç olarak antikorların varlığında trombosit kolonilerinin sayısında önemli bir azalma meydana gelmemiştir (207). Bu sonuç da gösteriyor ki; IL-3 ve IL-6’nın hematopoezdeki önemli olan rolleri, KML ve benzeri hastalıklarda değerini kaybediyor ve yoklukları hücrelerin gelişimi için pek de önemli bir sorun teşkil etmiyor. Çalışmamızda da yeni tanı almış, BCR-ABL ekspresyonu yüksek olan hastalarda IL-3 ve IL-6 ekspresyon seviyelerinin sağlıklı bireylere oranla çok düşük olması (sırasıyla 476,19; 28,65 kat azalma), çoğalan hücrelerin bu sitokinlere olan ihtiyacının da azaldığını göstermektedir. Majör moleküler yanıt düzeyine ulaşan hastalarda da IL-3 ve IL-6 ekspresyonunun yine normale göre düşük fakat yeni tanı alanlara göre yüksek oluşu (sırasıyla 58,71; 11,41 kat artma); BCR-ABL eksprese eden hücrelerin çok azalıp, normal hücrelerin ve normal hematopoezin arttığını ve bu yönden bakınca IL-3 ve IL-6 ihtiyacıyla beraber bu sitokinlerin ekspresyonunun da arttığı düşünülmektedir.

Kobayashi ve arkadaşları in vitro olarak normal hematopoezi teşvik ettiği gösterilen IL-11’in, anormal mekakaryopoez üzerindeki iyi bilinmeyen etkisini araştırılmışlardır. KML blastik faz ve akut mekakaryoblastik lösemi hastalarından alınan mekakaryoblastik hücre hatlarına konulan IL-11’in doza bağımlı olarak çoğalmayı teşvik ettiği görülmüş ve bu hücre hatlarında yapılan ekspresyon çalışmasında IL-11 varlığı gösterilmiştir. Bu hücrelerin büyümesi, anti-IL-11

antikoru ve IL-11 antisens oligonükleotitleri ile inhibe edilmiştir. Bu sonuçlar IL-11'in otokrin döngü ile kısmen de olsa malign mekakaryositik hücre hatlarını düzenlediği düşünülmüştür. Ayrıca IL-11 transkripti akut myeloid lösemi hücrelerinden kurulan hücre hattında da tespit edilmiş fakat bu hücrelerin büyümesinin IL-11 ile stimüle olmadığı ve IL-11 antisens oligonükleotitleri ile de inhibe olmadığı görülmüştür. Bu sonuçlar IL-11'in otokrin döngü ile kısmen de olsa malign mekakaryositik hücre hatlarını düzenlediği düşünülmüştür (208).

Einat ve arkadaşlarının normal bireyler ile KML'de Sitosin Arabinozid veya Eilatin tedavisine dirençli hastalarda hematopoetik hücreler üzerine IL-11'in diğer büyüme faktörleriyle beraber sinerjik etkisini araştırmışlardır. Çalışmadan elde edilen sonuca göre IL-11 verilmesi malign klondan ziyade normal myeloid hücrelerin büyümesini artırabilir bu da kemateropik ajanlarla tedavi edilen KML hastaları için klinik öneme sahip olabilir (209). Bu da gösteriyor ki kemateropik ajanlara bağlı gelişen sitopenilerde IL-11'in klinik olarak kullanılması malign hücrelerden ziyade normal hematopoezdeki hücrelerin büyümesini teşvik edecektir. Bizim çalışmamızda da yeni tanı KML hastalarında IL-11 ekspresyonu kontrol grubuna göre çok azalmış bulunmuştur (158,73 kat azalma). Bu da malign hücrelerin gelişimi için IL-11'e duyulan ihtiyacı göstermektedir. Majör moleküler yanıt seviyesine ulaşan hastalarda ise yine IL-11 ekspresyon seviyesi hafif azalmış (5,39 kat azalma) olup yeni tanı anına göre çok artmıştır. Burada da BCR-ABL ekspresyon seviyesi düşüp, malign hücreler tedaviyle azalmış olup normal hematopoezde etkili IL-11 ekspresyonunun arttığı görülmüştür.

Çalışmamızda yer alan sitokinler IL-3, IL-6 ve IL-11 için farklı çalışmalarda benzer veya farklı sonuçlar elde edilmiştir. Sonuçlarımızın literatürdeki bazı çalışma sonuçlarıyla çelişiyor gözükmesi, hasta seçimi kriterlerinin farklı olmasından, hastaların bulunduğu evre veya tedavide kullanılan ilaç seçimlerinin farklılığından olabileceği gibi coğrafik faktörlerin de etkili olabileceği akılda tutulması gereken hususlardır. Yaptığımız tezin Doğu Karadeniz Bölgesinde yapılan ilk çalışma olması sonraki yapılacak tezler için bir ön çalışma niteliğinde olması, ortaya koyduğu sonuçlar açısından önem arz etmektedir.

6. SONUÇ

Kronik myeloid lösemi BCR-ABL onkogeninin oluşmasına bağlı olarak myeloid hücrelerin kontrolsüz şekilde aşırı çoğalmasıyla seyreden bir hastalıktır. BCR-ABL birçok yolağı aktive ederek KML oluşumunu tetikler.

Normal hematopoezde hücrelerin gelişimi için IL-3, IL-6 ve IL-11 gibi sitokinler pek çok basamakta etkili olmaktadır.

Yeni tanı almış KML hastaları ve aynı hastaların MMY'a girmiş olan örnekleri üzerinde IL-3, IL-6 ve IL-11 ekspresyon çalışması yapıp sağlıklı kontrollerle karşılaştırarak, sonucunda bir oran elde ettik. Sonuca göre yeni tanı almış hastaların IL-3, IL-6 ve IL-11 ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna göre çok azaldığı gösterildi (IL-3 için 476,19 kat; IL-6 için 28,65 kat ve IL-11 için 158,73 katlık azalma). MMR'a ulaşan hastaların da IL-3, IL-6 ve IL-11 ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna göre azaldığını gösterdik (IL-3 için 8,11 kat; IL-6 için 2,51 kat ve IL-11 için 5,39 katlık azalma). Bu sonuçlara göre BCR-ABL'in indüklediği KML hastalarında malign myeloid hücrelerin gelişiminde IL-3, IL-6 ve IL-11'nin rolünün normale oranla çok az olduğu, BCR-ABL'in başka yolakları aktive ederek bu hücrelerin proliferasyonunu sağladığı düşünülmektedir. Nitekim BCR-ABL ekspresyonu düşük olan MMY'a giren hastalarda bu sitokinlerin ekspresyon seviyesinde artış; normale yaklaşma dikkati çekmektedir. Bu da normal hematopoezin aktivitesinin arttığı hücrelerde bu sitokinlerin ihtiyacının da arttığının göstergesidir. KML hastalarında BCR-ABL ekspresyonu ile IL-3, IL-6 ve IL-11 ekspresyonu seviyeleri arasında ters orantı olduğunu gösterildi.

KML hastalarında malign transformasyonu BCR-ABL'in hangi yolakları aktive ederek gerçekleştirdiğini göstermek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. IL-3, IL-6 ve IL-11 için de BCR-ABL ekspresyon düzeyini, hastalarda normal hematopoez gelişimini ve KML hastalarının takibini yapmak üzere daha ileri düzeyde çalışmalara ihtiyaç olup gelecekte hastaların takip ve tedavi planlamasında alternatifler oluşturabilecektir.

7. KAYNAKLAR

1. Kaushansky K. Hematopoiesis and Hematopoietic Growth Factors. In: Goldman L, Schafer AI, editors. Goldman's Cecil Medicine. 24th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012. p. 1021-4.
2. Rodak BF, Carr JH. Hematopoiesis. In: Rodak BF, Carr JH, editors. Clinical Hematology Atlas. 4th ed. Canada: Elsevier; 2013. p. 11-8.
3. Hall JE. Resistance of the Body to Infection: I. Leukocytes, Granulocytes, the Monocyte-Macrophage System, and Inflammation. In: Hall JE, editor. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology Student Consult. 13th edition ed. Philadelphia: Elsevier; 2016. p. 455-64.
4. Shaheen M, Broxmeyer HE. The Humoral Regulation of Hematopoiesis. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Silberstein LE, McGlave P, et al., editors. Hematology Basic Principles and Practice. 5th ed. New York: Churchill Livingstone; 2009.
5. Ihle JN, Pepersack L, Rebar L. Regulation of T cell differentiation: in vitro induction of 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in splenic lymphocytes from athymic mice by a unique lymphokine. Journal of immunology. 1981;126 (6):2184-9.
6. Ihle JN, Weinstein Y, Keller J, Henderson L, Palaszynski E. Interleukin 3. Methods in enzymology. 1985;116:540-52.
7. Kristiansen OP, Mandrup-Poulsen T. Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent? Diabetes. 2005;54 Suppl 2:S114-24.
8. Dubinski A, Zdrojewicz Z. [The role of interleukin-6 in development and progression of atherosclerosis]. Polski merkuriusz lekarski : organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego. 2007;22 (130):291-4.
9. Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, et al. A meta-analysis of cytokines in major depression. Biological psychiatry. 2010;67 (5):446-57.
10. Swardfager W, Lanctot K, Rothenburg L, Wong A, Cappell J, Herrmann N. A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. Biological psychiatry. 2010;68 (10):930-41.
11. Tackey E, Lipsky PE, Illei GG. Rationale for interleukin-6 blockade in systemic lupus erythematosus. Lupus. 2004;13 (5):339-43.
12. Gado K, Domjan G, Hegyesi H, Falus A. Role of INTERLEUKIN-6 in the pathogenesis of multiple myeloma. Cell biology international. 2000;24 (4):195-209.

13. Smith PC, Hobisch A, Lin DL, Culig Z, Keller ET. Interleukin-6 and prostate cancer progression. *Cytokine & growth factor reviews*. 2001;12 (1):33-40.
14. Hirohata S, Kikuchi H. Changes in biomarkers focused on differences in disease course or treatment in patients with neuro-Behcet's disease. *Internal medicine*. 2012;51 (24):3359-65.
15. Nishimoto N. Interleukin-6 in rheumatoid arthritis. *Current opinion in rheumatology*. 2006;18 (3):277-81.
16. Paul SR, Bennett F, Calvetti JA, Kelleher K, Wood CR, O'Hara RM, Jr., et al. Molecular cloning of a cDNA encoding interleukin 11, a stromal cell-derived lymphopoietic and hematopoietic cytokine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87 (19):7512-6.
17. Dorner AJ, Goldman SJ, Keith JC, Jr. Interleukin-11. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. 1997;8 (6):418-29.
18. Wilde MI, Faulds D. Oprelvekin: a review of its pharmacology and therapeutic potential in chemotherapy-induced thrombocytopenia. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. 1998;10 (2):159-71.
19. Bhatia R, Radich JP. Chronic myeloid leukemia. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Silberstein LE, McGlave P, et al., editors. *Hematology Basic Principles and Practice*. 5th ed. New York: Churchill Livingstone; 2009. p. 1109-23.
20. Kantarjian H, O'Brien S. The Chronic Leukemias. In: Goldman L, Schafer AI, editors. *Goldman's Cecil Medicine*. 24th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012. p. 1209-17.
21. Bennett JH. Case of hypertrophy of the spleen and liver in which death took place from suppuration. *Edinburgh M & Surg J*. 1845;64:443.
22. Craigie D. Case of disease of the spleen, in which death took place in consequence of the presence of purulent matter in the blood. *Edinb Med Surg J*. 1845;64:400.
23. Nowell P, Hungerford D. A minute chromosome in chronic granulocytic leukemia. *Science*. 1960;132:1497-501.
24. Lynch RG. The Philadelphia Chromosome. *The ASIP Bulletin*. 2001;4 (2):1-2.
25. Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973;243 (5405):290-3.

26. Klein AD, Kessel AGV, Grosveld G, Bartram CR, Hagemeijer A, Bootsma D, et al. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*. 1982;300 (5894):765-7.
27. Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science*. 1990;247 (4946):1079-82.
28. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science*. 1990;247 (4944):824-30.
29. Bloomfield CD, Marcucci G, Wetzler M. Acute and Chronic Myeloid Leukemia. In: Longo DL, Kasper DL, Jameson JL, Fauci AS, Hauser SL, Loscalzo J, editors. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 18th ed. USA: The McGraw-Hill; 2012. p. 2065-9.
30. Hoglund M, Sandin F, Simonsson B. Epidemiology of chronic myeloid leukaemia: an update. *Annals of hematology*. 2015;94 Suppl 2:S241-7.
31. Longo DL. Myeloid Leukemias, Myelodysplasia and Myeloproliferative Syndromes. In: Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, editors. *Harrison's Manual of Medicine*. 16th ed. USA: McGraw-Hill; 2005. p. 290-6.
32. de la Fuente J, Baruchel A, Biondi A, de Bont E, Dresse MF, Suttorp M, et al. Managing children with chronic myeloid leukaemia (CML): recommendations for the management of CML in children and young people up to the age of 18 years. *British journal of haematology*. 2014;167 (1):33-47.
33. Radivoyevitch T, Jankovic GM, Tiu RV, Sauntharajah Y, Jackson RC, Hlatky LR, et al. Sex differences in the incidence of chronic myeloid leukemia. *Radiation and environmental biophysics*. 2014;53 (1):55-63.
34. Albertini RJ, Carter EW, Nicklas JA, Vacek PM, Walker VE. 1,3-Butadiene, CML and the t (9:22) translocation: A reality check. *Chemico-biological interactions*. 2015;241:32-9.
35. Rowley JD. The Philadelphia chromosome translocation. A paradigm for understanding leukemia. *Cancer*. 1990;65 (10):2178-84.
36. Chisoe SL, Bodenteich A, Wang YF, Wang YP, Burian D, Clifton SW, et al. Sequence and analysis of the human ABL gene, the BCR gene, and regions involved in the Philadelphia chromosomal translocation. *Genomics*. 1995;27 (1):67-82.
37. Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukaemia. *Leukemia*. 1996;10 (5):751-6.

38. Barila D, Superti-Furga G. An intramolecular SH3-domain interaction regulates c-Abl activity. *Nature genetics*. 1998;18 (3):280-2.
39. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Roe BA, Canaani E. Alternative splicing of RNAs transcribed from the human abl gene and from the bcr-abl fused gene. *Cell*. 1986;47 (2):277-84.
40. Prakash O, Yunis JJ. High resolution chromosomes of the t (9;22) positive leukemias. *Cancer genetics and cytogenetics*. 1984;11 (4):361-7.
41. Hariharan IK, Adams JM. cDNA sequence for human bcr, the gene that translocates to the abl oncogene in chronic myeloid leukaemia. *The EMBO journal*. 1987;6 (1):115-9.
42. Heisterkamp N, Stam K, Groffen J, de Klein A, Grosveld G. Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph' translocation. *Nature*. 1985;315 (6022):758-61.
43. Maru Y, Witte ON. The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. *Cell*. 1991;67 (3):459-68.
44. Bunz F. Oncogenes. In: Bunz F, editor. *Principles of Cancer Genetics*. USA: Springer; 2008. p. 49-76.
45. Padron E, Hazlehurst LA, Pinilla-Ibarz J. Molecular Pathogenesis of BCR-ABL in Chronic Myeloid Leukemia. In: Saba HI, Mufti GJ, editors. *Advances in Malignant Hematology*. UK: Wiley-Blackwell; 2011. p. 62-70.
46. Quintas-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2009;113 (8):1619-30.
47. Coveler A, Oehler VG. Chronic Myeloid Leukemia (CML). In: Estey EH, Appelbaum FR, editors. *Leukemia and Related Disorders*. New York: Humana Press; 2012. p. 97-148.
48. Yong ASM, Melo JV. Pathophysiology of Chronic Myeloid Leukemia. In: Faderl S, Kantarjian H, editors. *Leukemias: Principles and Practice of Therapy*. USA: Wiley-Blackwell; 2011. p. 261-70.
49. Melo JV. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood*. 1996;88 (7):2375-84.
50. Melo JV, Deininger MW. Biology of chronic myelogenous leukemia--signaling pathways of initiation and transformation. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2004;18 (3):545-68, vii-viii.
51. Woodring PJ, Hunter T, Wang JY. Regulation of F-actin-dependent processes by the Abl family of tyrosine kinases. *Journal of cell science*. 2003;116 (Pt 13):2613-26.

52. Hernandez SE, Krishnaswami M, Miller AL, Koleske AJ. How do Abl family kinases regulate cell shape and movement? *Trends in cell biology*. 2004;14 (1):36-44.
53. Schwartzberg PL, Stall AM, Hardin JD, Bowdish KS, Humaran T, Boast S, et al. Mice homozygous for the ablm1 mutation show poor viability and depletion of selected B and T cell populations. *Cell*. 1991;65 (7):1165-75.
54. Tybulewicz VL, Crawford CE, Jackson PK, Bronson RT, Mulligan RC. Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene. *Cell*. 1991;65 (7):1153-63.
55. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *The New England journal of medicine*. 2003;349 (15):1451-64.
56. Nagar B, Hantschel O, Young MA, Scheffzek K, Veach D, Bornmann W, et al. Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell*. 2003;112 (6):859-71.
57. Harrison SC. Variation on an Src-like theme. *Cell*. 2003;112 (6):737-40.
58. Hantschel O, Nagar B, Guettler S, Kretzschmar J, Dorey K, Kuriyan J, et al. A myristoyl/phosphotyrosine switch regulates c-Abl. *Cell*. 2003;112 (6):845-57.
59. Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nature reviews Cancer*. 2005;5 (3):172-83.
60. Voncken JW, van Schaick H, Kaartinen V, Deemer K, Coates T, Landing B, et al. Increased neutrophil respiratory burst in bcr-null mutants. *Cell*. 1995;80 (5):719-28.
61. Gross AW, Zhang X, Ren R. Bcr-Abl with an SH3 deletion retains the ability To induce a myeloproliferative disease in mice, yet c-Abl activated by an SH3 deletion induces only lymphoid malignancy. *Molecular and cellular biology*. 1999;19 (10):6918-28.
62. Gross AW, Ren R. Bcr-Abl has a greater intrinsic capacity than v-Abl to induce the neoplastic expansion of myeloid cells. *Oncogene*. 2000;19 (54):6286-96.
63. McWhirter JR, Galasso DL, Wang JY. A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Molecular and cellular biology*. 1993;13 (12):7587-95.
64. Zhang X, Subrahmanyam R, Wong R, Gross AW, Ren R. The NH (2)-terminal coiled-coil domain and tyrosine 177 play important roles in induction of a myeloproliferative disease in mice by Bcr-Abl. *Molecular and cellular biology*. 2001;21 (3):840-53.

65. He Y, Wertheim JA, Xu L, Miller JP, Karnell FG, Choi JK, et al. The coiled-coil domain and Tyr177 of bcr are required to induce a murine chronic myelogenous leukemia-like disease by bcr/abl. *Blood*. 2002;99 (8):2957-68.
66. Smith KM, Yacobi R, Van Etten RA. Autoinhibition of Bcr-Abl through its SH3 domain. *Molecular cell*. 2003;12 (1):27-37.
67. Pendergast AM, Quilliam LA, Cripe LD, Bassing CH, Dai Z, Li N, et al. BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell*. 1993;75 (1):175-85.
68. Puil L, Liu J, Gish G, Mbamalu G, Bowtell D, Pelicci PG, et al. Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *The EMBO journal*. 1994;13 (4):764-73.
69. Sattler M, Mohi MG, Pride YB, Quinnan LR, Malouf NA, Podar K, et al. Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL. *Cancer cell*. 2002;1 (5):479-92.
70. Million RP, Van Etten RA. The Grb2 binding site is required for the induction of chronic myeloid leukemia-like disease in mice by the Bcr/Abl tyrosine kinase. *Blood*. 2000;96 (2):664-70.
71. Goga A, McLaughlin J, Afar DE, Saffran DC, Witte ON. Alternative signals to RAS for hematopoietic transformation by the BCR-ABL oncogene. *Cell*. 1995;82 (6):981-8.
72. Zhang X, Wong R, Hao SX, Pear WS, Ren R. The SH2 domain of bcr-Abl is not required to induce a murine myeloproliferative disease; however, SH2 signaling influences disease latency and phenotype. *Blood*. 2001;97 (1):277-87.
73. Roumiantsev S, de Aoz IE, Varticovski L, Ilaria RL, Van Etten RA. The src homology 2 domain of Bcr/Abl is required for efficient induction of chronic myeloid leukemia-like disease in mice but not for lymphoid leukemogenesis or activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Blood*. 2001;97 (1):4-13.
74. Ren R. The molecular mechanism of chronic myelogenous leukemia and its therapeutic implications: studies in a murine model. *Oncogene*. 2002;21 (56):8629-42.
75. Prywes R, Foulkes JG, Rosenberg N, Baltimore D. Sequences of the A-MuLV protein needed for fibroblast and lymphoid cell transformation. *Cell*. 1983;34 (2):569-79.
76. Wertheim JA, Perera SA, Hammer DA, Ren R, Boettiger D, Pear WS. Localization of BCR-ABL to F-actin regulates cell adhesion but does not attenuate CML development. *Blood*. 2003;102 (6):2220-8.

77. Wong S, Witte ON. The BCR-ABL story: bench to bedside and back. *Annual review of immunology*. 2004;22:247-306.
78. Zhang X, Ren R. Bcr-Abl efficiently induces a myeloproliferative disease and production of excess interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in mice: a novel model for chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 1998;92 (10):3829-40.
79. Jiang X, Lopez A, Holyoake T, Eaves A, Eaves C. Autocrine production and action of IL-3 and granulocyte colony-stimulating factor in chronic myeloid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96 (22):12804-9.
80. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000;96 (10):3343-56.
81. Greenberg EM, Probst A. Chronic leukemia. *Critical care nursing clinics of North America*. 2013;25 (4):459-70, vi.
82. Medina J, Kantarjian H, Talpaz M, O'Brien S, Garcia-Manero G, Giles F, et al. Chromosomal abnormalities in Philadelphia chromosome-negative metaphases appearing during imatinib mesylate therapy in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Cancer*. 2003;98 (9):1905-11.
83. Granatowicz A, Piatek CI, Moschiano E, El-Hemaidi I, Armitage JD, Akhtari M. An Overview and Update of Chronic Myeloid Leukemia for Primary Care Physicians. *Korean journal of family medicine*. 2015;36 (5):197-202.
84. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 1999;341 (3):164-72.
85. Gorczyca W. Hematologic malignancies: correlation between morphology, phenotype, and chromosomal/genetic markers. In: Gorczyca W, editor. *Cytogenetics, FISH and molecular testing in hematologic malignancies*. UK: Informa Healthcare; 2008. p. 115-234.
86. Handa H, Hegde UP, Kotelnikov VM, Mundle SD, Dong LM, Burke P, et al. Bcl-2 and c-myc expression, cell cycle kinetics and apoptosis during the progression of chronic myelogenous leukemia from diagnosis to blastic phase. *Leukemia research*. 1997;21 (6):479-89.
87. Shet AS, Jahagirdar BN, Verfaillie CM. Chronic myelogenous leukemia: mechanisms underlying disease progression. *Leukemia*. 2002;16 (8):1402-11.
88. Hirsch-Ginsberg C, LeMaistre AC, Kantarjian H, Talpaz M, Cork A, Freireich EJ, et al. RAS mutations are rare events in Philadelphia chromosome-negative/bcr gene rearrangement-negative chronic myelogenous leukemia, but are prevalent in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 1990;76 (6):1214-9.

89. Bi S, Lanza F, Goldman JM. The involvement of "tumor suppressor" p53 in normal and chronic myelogenous leukemia hemopoiesis. *Cancer research*. 1994;54 (2):582-6.
90. Griesshammer M, Heinze B, Bangerter M, Heimpel H, Fliedner TM. Karyotype abnormalities and their clinical significance in blast crisis of chronic myeloid leukemia. *Journal of molecular medicine*. 1997;75 (11-12):836-8.
91. Furukawa Y, DeCaprio JA, Belvin M, Griffin JD. Heterogeneous expression of the product of the retinoblastoma susceptibility gene in primary human leukemia cells. *Oncogene*. 1991;6 (8):1343-6.
92. Bernstein R. Cytogenetics of chronic myelogenous leukemia. *Seminars in hematology*. 1988;25 (1):20-34.
93. Cortes J. Natural history and staging of chronic myelogenous leukemia. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2004;18 (3):569-84, viii.
94. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002;100 (7):2292-302.
95. Vardiman JW, Melo JV, Baccarani M, Thiele J. Chronic Myelogenous Leukaemia, BCR-ABL1 positive. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al., editors. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008. p. 32-7.
96. Cortes JE, Silver RT, Khoury HJ, Kantarjian HM. Chronic Myeloid Leukemia: <http://www.cancernetwork.com/cancer-management/CML>; 2014 [cited 2016 21.01].
97. Derderian PM, Kantarjian HM, Talpaz M, O'Brien S, Cork A, Estey E, et al. Chronic myelogenous leukemia in the lymphoid blastic phase: characteristics, treatment response, and prognosis. *The American journal of medicine*. 1993;94 (1):69-74.
98. Khalidi HS, Brynes RK, Medeiros LJ, Chang KL, Slovak ML, Snyder DS, et al. The immunophenotype of blast transformation of chronic myelogenous leukemia: a high frequency of mixed lineage phenotype in "lymphoid" blasts and A comparison of morphologic, immunophenotypic, and molecular findings. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 1998;11 (12):1211-21.
99. Nair C, Chopra H, Shinde S, Barbhaya S, Kumar A, Dhond S, et al. Immunophenotype and ultrastructural studies in blast crisis of chronic myeloid leukemia. *Leukemia & lymphoma*. 1995;19 (3-4):309-13.

100. Patel BB, Mohamed AN, Schiffer CA. "Acute myelogenous leukemia like" translocations in CML blast crisis: two new cases of inv (16)/t (16;16) and a review of the literature. *Leukemia research*. 2006;30 (2):225-32.
101. Saikia T, Advani S, Dasgupta A, Ramakrishnan G, Nair C, Gladstone B, et al. Characterisation of blast cells during blastic phase of chronic myeloid leukaemia by immunophenotyping--experience in 60 patients. *Leukemia research*. 1988;12 (6):499-506.
102. Cervantes F, Villamor N, Esteve J, Montoto S, Rives S, Rozman C, et al. 'Lymphoid' blast crisis of chronic myeloid leukaemia is associated with distinct clinicohaematological features. *British journal of haematology*. 1998;100 (1):123-8.
103. Marin D, Marktel S, Szydlo R, Klein JP, Bua M, Foot N, et al. Survival of patients with chronic-phase chronic myeloid leukaemia on imatinib after failure on interferon alfa. *Lancet*. 2003;362 (9384):617-9.
104. Mughal TI. Primary treatment of chronic myeloid leukemia. In: Mughal TI, editor. *Chronic Myeloid Leukemia A Handbook for Oncologists and Hematologists*. Boca Raton: CRC Press; 2013. p. 47-72.
105. Vardiman JW, Bennett JM, Bain BJ, Brunning RD, Thiele J. Atypical chronic leukaemia, BCR-ABL1 negative. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al., editors. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008. p. 80-1.
106. Shepherd PC, Ganesan TS, Galton DA. Haematological classification of the chronic myeloid leukaemias. *Bailliere's clinical haematology*. 1987;1 (4):887-906.
107. Breccia M, Biondo F, Latagliata R, Carmosino I, Mandelli F, Alimena G. Identification of risk factors in atypical chronic myeloid leukemia. *Haematologica*. 2006;91 (11):1566-8.
108. Hernandez JM, del Canizo MC, Cuneo A, Garcia JL, Gutierrez NC, Gonzalez M, et al. Clinical, hematological and cytogenetic characteristics of atypical chronic myeloid leukemia. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2000;11 (4):441-4.
109. Kurzrock R, Bueso-Ramos CE, Kantarjian H, Freireich E, Tucker SL, Siciliano M, et al. BCR rearrangement-negative chronic myelogenous leukemia revisited. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2001;19 (11):2915-26.

110. Vardiman J, Pierre R, Bain B. Chronic myelomonocytic leukemia. In: Jaffe E, Harris N, Stein H, Vardiman J, editors. World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press; 2001. p. 49.
111. Orazi A, Bennett JM, Germing U, Brunning RD, Bain BJ, Thiele J. Chronic myelomonocytic leukaemia. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al., editors. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008. p. 76-9.
112. Niemeyer CM, Kratz C. Juvenile myelomonocytic leukemia. Current oncology reports. 2003;5 (6):510-5.
113. Koike K, Matsuda K. Recent advances in the pathogenesis and management of juvenile myelomonocytic leukaemia. British journal of haematology. 2008;141 (5):567-75.
114. Emanuel PD. Juvenile myelomonocytic leukemia and chronic myelomonocytic leukemia. Leukemia. 2008;22 (7):1335-42.
115. Arico M, Biondi A, Pui CH. Juvenile myelomonocytic leukemia. Blood. 1997;90 (2):479-88.
116. Passmore SJ, Chessells JM, Kempinski H, Hann IM, Brownbill PA, Stiller CA. Paediatric myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukaemia in the UK: a population-based study of incidence and survival. British journal of haematology. 2003;121 (5):758-67.
117. Loh ML, Sakai DS, Flotho C, Kang M, Fliegauf M, Archambeault S, et al. Mutations in CBL occur frequently in juvenile myelomonocytic leukemia. Blood. 2009;114 (9):1859-63.
118. De Filippi P, Zecca M, Lisini D, Rosti V, Cagioni C, Carlo-Stella C, et al. Germ-line mutation of the NRAS gene may be responsible for the development of juvenile myelomonocytic leukaemia. British journal of haematology. 2009;147 (5):706-9.
119. Niemeyer CM, Kang MW, Shin DH, Furlan I, Erlacher M, Bunin NJ, et al. Germline CBL mutations cause developmental abnormalities and predispose to juvenile myelomonocytic leukemia. Nature genetics. 2010;42 (9):794-800.
120. Kato M, Yasui N, Seki M, Kishimoto H, Sato-Otsubo A, Hasegawa D, et al. Aggressive transformation of juvenile myelomonocytic leukemia associated with duplication of oncogenic KRAS due to acquired uniparental disomy. The Journal of pediatrics. 2013;162 (6):1285-8, 8 e1.

121. Hu B, Savani BN. Impact of risk score calculations in choosing front-line tyrosine kinase inhibitors for patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in the chronic phase. *European journal of haematology*. 2014;93 (3):179-86.
122. Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, Tura S, Gomez GA, Robertson JE, et al. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. *Blood*. 1984;63 (4):789-99.
123. Hasford J, Pfirrmann M, Hehlmann R, Allan NC, Baccarani M, Kluin-Nelemans JC, et al. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group. *Journal of the National Cancer Institute*. 1998;90 (11):850-8.
124. Hasford J, Baccarani M, Hoffmann V, Guilhot J, Saussele S, Rosti G, et al. Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: the EUTOS score. *Blood*. 2011;118 (3):686-92.
125. Doyle AC. Notes on a case of Leucocythaemia. *The Lancet*. 1882;119 (3056):490.
126. Witts L, Blackburn E, Callender S, Dacie J, Davidson W, Doll R, et al. Chronic granulocytic leukaemia: comparison of radiotherapy and busulphan therapy. Report of the Medical Research Council's working party for therapeutic trials in leukaemia. *BMJ*. 1968;1 (5586):201-8.
127. Apperley JF. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*. 2015;385 (9976):1447-59.
128. Kennedy BJ. Hydroxyurea therapy in chronic myelogenous leukemia. *Cancer*. 1972;29 (4):1052-6.
129. Schwartz JH, Cannellos GP. Hydroxyurea in the management of the hematologic complications of chronic granulocytic leukemia. *Blood*. 1975;46 (1):11-6.
130. Goldman JM. Chronic myeloid leukemia: a historical perspective. *Seminars in hematology*. 2010;47 (4):302-11.
131. Bonifazi F, de Vivo A, Rosti G, Guilhot F, Guilhot J, Trabacchi E, et al. Chronic myeloid leukemia and interferon-alpha: a study of complete cytogenetic responders. *Blood*. 2001;98 (10):3074-81.
132. Kantarjian HM, Smith TL, O'Brien S, Beran M, Pierce S, Talpaz M. Prolonged survival in chronic myelogenous leukemia after cytogenetic response to interferon-alpha therapy. The Leukemia Service. *Annals of internal medicine*. 1995;122 (4):254-61.

133. Talpaz M, Kantarjian HM, McCredie K, Trujillo JM, Keating MJ, Gutterman JU. Hematologic remission and cytogenetic improvement induced by recombinant human interferon alphaA in chronic myelogenous leukemia. *New England Journal of Medicine*. 1986;314 (17):1065-9.
134. Hehlmann R, Heimpel H, Hasford J, Kolb HJ, Pralle H, Hossfeld DK, et al. Randomized comparison of interferon-alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. The German CML Study Group. *Blood*. 1994;84 (12):4064-77.
135. The Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia. Interferon alfa-2a as compared with conventional chemotherapy for the treatment of chronic myeloid leukemia. . *The New England journal of medicine*. 1994;330 (12):820-5.
136. Allan N, Shepherd P, Richards S. UK Medical Research Council randomised, multicentre trial of interferon- α 1 for chronic myeloid leukaemia: improved survival irrespective of cytogenetic response. *The Lancet*. 1995;345 (8962):1392-7.
137. Guilhot F, Chastang C, Michallet M, Guerci A, Harousseau JL, Maloisel F, et al. Interferon alfa-2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia. French Chronic Myeloid Leukemia Study Group. *The New England journal of medicine*. 1997;337 (4):223-9.
138. Mughal TI. A historical perspective of chronic myeloid leukemia. In: Mughal TI, editor. *Chronic Myeloid Leukemia A Handbook for Oncologists and Hematologists*. Boca Raton: CRC Press; 2013. p. 10-9.
139. Radich J. Stem cell transplant for chronic myeloid leukemia in the imatinib era. *Seminars in hematology*. 2010;47 (4):354-61.
140. Pavlu J, Szydlo RM, Goldman JM, Apperley JF. Three decades of transplantation for chronic myeloid leukemia: what have we learned? *Blood*. 2011;117 (3):755-63.
141. Fefer A, Cheever MA, Thomas ED, Boyd C, Ramberg R, Glucksberg H, et al. Disappearance of Ph1-positive cells in four patients with chronic granulocytic leukemia after chemotherapy, irradiation and marrow transplantation from an identical twin. *New England Journal of Medicine*. 1979;300 (7):333-7.
142. Goldman JM, Baughan AS, McCarthy DM, Worsley AM, Hows JM, Gordon-Smith EC, et al. Marrow transplantation for patients in the chronic phase of chronic granulocytic leukaemia. *Lancet*. 1982;2 (8299):623-5.
143. Hansen JA, Gooley TA, Martin PJ, Appelbaum F, Chauncey TR, Clift RA, et al. Bone marrow transplants from unrelated donors for patients with chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 1998;338 (14):962-8.

144. Apperley JF, Jones L, Hale G, Waldmann H, Hows J, Rombos Y, et al. Bone marrow transplantation for patients with chronic myeloid leukaemia: T-cell depletion with Campath-1 reduces the incidence of graft-versus-host disease but may increase the risk of leukaemic relapse. *Bone marrow transplantation*. 1986;1 (1):53-66.
145. Kolb HJ, Mittermuller J, Clemm C, Holler E, Ledderose G, Brehm G, et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood*. 1990;76 (12):2462-5.
146. Mackinnon S, Papadopoulos EB, Carabasi MH, Reich L, Collins NH, Boulad F, et al. Adoptive immunotherapy evaluating escalating doses of donor leukocytes for relapse of chronic myeloid leukemia after bone marrow transplantation: separation of graft-versus-leukemia responses from graft-versus-host disease. *Blood*. 1995;86 (4):1261-8.
147. Dazzi F, Szydlo RM, Craddock C, Cross NC, Kaeda J, Chase A, et al. Comparison of single-dose and escalating-dose regimens of donor lymphocyte infusion for relapse after allografting for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000;95 (1):67-71.
148. Khouri IF, Keating M, Korbling M, Przepiorka D, Anderlini P, O'Brien S, et al. Transplant-lite: induction of graft-versus-malignancy using fludarabine-based nonablative chemotherapy and allogeneic blood progenitor-cell transplantation as treatment for lymphoid malignancies. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1998;16 (8):2817-24.
149. Crawley C, Szydlo R, Lalancette M, Bacigalupo A, Lange A, Brune M, et al. Outcomes of reduced-intensity transplantation for chronic myeloid leukemia: an analysis of prognostic factors from the Chronic Leukemia Working Party of the EBMT. *Blood*. 2005;106 (9):2969-76.
150. Gratwohl A, Hermans J, Goldman JM, Arcese W, Carreras E, Devergie A, et al. Risk assessment for patients with chronic myeloid leukaemia before allogeneic blood or marrow transplantation. Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Lancet*. 1998;352 (9134):1087-92.
151. Saussele S, Lausker M, Gratwohl A, Beelen DW, Bunjes D, Schwerdtfeger R, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo SCT) for chronic myeloid leukemia in the imatinib era: evaluation of its impact within a subgroup of the randomized German CML Study IV. *Blood*. 2010;115 (10):1880-5.
152. Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Muller M, Druker BJ, et al. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer research*. 1996;56 (1):100-4.

153. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nature medicine*. 1996;2 (5):561-6.
154. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2001;344 (14):1031-7.
155. Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Gambacorti-Passerini C, et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *The New England journal of medicine*. 2002;346 (9):645-52.
156. Goldman JM, Druker BJ. Chronic myeloid leukemia: current treatment options. *Blood*. 2001;98 (7):2039-42.
157. Sawyers CL, Hochhaus A, Feldman E, Goldman JM, Miller CB, Ottmann OG, et al. Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood*. 2002;99 (10):3530-9.
158. Talpaz M, Silver RT, Druker BJ, Goldman JM, Gambacorti-Passerini C, Guilhot F, et al. Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. *Blood*. 2002;99 (6):1928-37.
159. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2003;348 (11):994-1004.
160. Radich JP, Deininger M, Abboud CN, Altman JK, Barta SK, Berman E, et al. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Chronic Myelogenous Leukemia Version 1.2016. <http://www.NCCN.org>: National Comprehensive Cancer Network; 2016 [cited 2016 31.01].
161. Schiffer CA. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors for chronic myelogenous leukemia. *The New England journal of medicine*. 2007;357 (3):258-65.
162. Efficace F, Baccarani M, Breccia M, Cottone F, Alimena G, Deliliers GL, et al. Chronic fatigue is the most important factor limiting health-related quality of life of chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. *Leukemia*. 2013;27 (7):1511-9.
163. Berman E, Nicolaides M, Maki RG, Fleisher M, Chanel S, Scheu K, et al. Altered bone and mineral metabolism in patients receiving imatinib mesylate. *The New England journal of medicine*. 2006;354 (19):2006-13.

164. Berman E, Girotra M, Cheng C, Chanel S, Maki R, Shelat M, et al. Effect of long term imatinib on bone in adults with chronic myelogenous leukemia and gastrointestinal stromal tumors. *Leukemia research*. 2013;37 (7):790-4.
165. Kerkela R, Grazette L, Yacobi R, Iliescu C, Patten R, Beahm C, et al. Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. *Nature medicine*. 2006;12 (8):908-16.
166. Atallah E, Durand JB, Kantarjian H, Cortes J. Congestive heart failure is a rare event in patients receiving imatinib therapy. *Blood*. 2007;110 (4):1233-7.
167. Shah NP, Tran C, Lee FY, Chen P, Norris D, Sawyers CL. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science*. 2004;305 (5682):399-401.
168. Hochhaus A, Baccarani M, Deininger M, Apperley JF, Lipton JH, Goldberg SL, et al. Dasatinib induces durable cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase with resistance or intolerance to imatinib. *Leukemia*. 2008;22 (6):1200-6.
169. Kantarjian HM, Shah NP, Cortes JE, Baccarani M, Agarwal MB, Undurraga MS, et al. Dasatinib or imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: 2-year follow-up from a randomized phase 3 trial (DASISION). *Blood*. 2012;119 (5):1123-9.
170. Shah NP, Guilhot F, Cortes JE, Schiffer CA, le Coutre P, Brummendorf TH, et al. Long-term outcome with dasatinib after imatinib failure in chronic-phase chronic myeloid leukemia: follow-up of a phase 3 study. *Blood*. 2014;123 (15):2317-24.
171. Kantarjian HM, Giles F, Gattermann N, Bhalla K, Alimena G, Palandri F, et al. Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is effective in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase following imatinib resistance and intolerance. *Blood*. 2007;110 (10):3540-6.
172. Saglio G, Kim DW, Issaragrisil S, le Coutre P, Etienne G, Lobo C, et al. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2010;362 (24):2251-9.
173. Golas JM, Arndt K, Etienne C, Lucas J, Nardin D, Gibbons J, et al. SKI-606, a 4-anilino-3-quinolinecarbonitrile dual inhibitor of Src and Abl kinases, is a potent antiproliferative agent against chronic myelogenous leukemia cells in culture and causes regression of K562 xenografts in nude mice. *Cancer research*. 2003;63 (2):375-81.

174. Puttini M, Coluccia AM, Boschelli F, Cleris L, Marchesi E, Donella-Deana A, et al. In vitro and in vivo activity of SKI-606, a novel Src-Abl inhibitor, against imatinib-resistant Bcr-Abl+ neoplastic cells. *Cancer research*. 2006;66 (23):11314-22.
175. Gambacorti-Passerini C, Kantarjian HM, Kim DW, Khoury HJ, Turkina AG, Brummendorf TH, et al. Long-term efficacy and safety of bosutinib in patients with advanced leukemia following resistance/intolerance to imatinib and other tyrosine kinase inhibitors. *American journal of hematology*. 2015;90 (9):755-68.
176. Cortes JE, Kantarjian H, Shah NP, Bixby D, Mauro MJ, Flinn I, et al. Ponatinib in refractory Philadelphia chromosome-positive leukemias. *The New England journal of medicine*. 2012;367 (22):2075-88.
177. Cortes JE, Kim DW, Pinilla-Ibarz J, le Coutre P, Paquette R, Chuah C, et al. A phase 2 trial of ponatinib in Philadelphia chromosome-positive leukemias. *The New England journal of medicine*. 2013;369 (19):1783-96.
178. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*. 2013;122 (6):872-84.
179. Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperley J, et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27 (35):6041-51.
180. Kantarjian H, Schiffer C, Jones D, Cortes J. Monitoring the response and course of chronic myeloid leukemia in the modern era of BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors: practical advice on the use and interpretation of monitoring methods. *Blood*. 2008;111 (4):1774-80.
181. Hughes TP, Branford S. Monitoring disease response to tyrosine kinase inhibitor therapy in CML. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2009:477-87.
182. Radich JP. How I monitor residual disease in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2009;114 (16):3376-81.
183. Goldman JM. Chronic myeloid leukemia. *Current opinion in hematology*. 1997;4 (4):277-85.
184. Cortes JE, Talpaz M, Kantarjian H. Chronic myelogenous leukemia: a review. *The American journal of medicine*. 1996;100 (5):555-70.
185. Enright H, McGlave PB. Chronic myelogenous leukemia. *Current opinion in hematology*. 1996;3 (4):303-9.

186. Elefanty AG, Hariharan IK, Cory S. bcr-abl, the hallmark of chronic myeloid leukaemia in man, induces multiple haemopoietic neoplasms in mice. *The EMBO journal*. 1990;9 (4):1069-78.
187. Gotoh A, Broxmeyer HE. The function of BCR/ABL and related proto-oncogenes. *Current opinion in hematology*. 1997;4 (1):3-11.
188. Raitano AB, Whang YE, Sawyers CL. Signal transduction by wild-type and leukemogenic Abl proteins. *Biochimica et biophysica acta*. 1997;1333 (3):F201-16.
189. Sattler M, Salgia R. Activation of hematopoietic growth factor signal transduction pathways by the human oncogene BCR/ABL. *Cytokine & growth factor reviews*. 1997;8 (1):63-79.
190. Kamimura D, Ishihara K, Hirano T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*. 2003;149:1-38.
191. Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annual review of immunology*. 1997;15:797-819.
192. Kamimura D, Arima Yn, Hirano T, Ogura H, Murakami M. IL-6 and Inflammatory Diseases. In: Yoshimoto T, Yoshimoto T, editors. *Cytokine Frontiers*. Japan: Springer; 2014. p. 53-78.
193. Hara T, Miyajima A. Function and signal transduction mediated by the interleukin 3 receptor system in hematopoiesis. *Stem cells*. 1996;14 (6):605-18.
194. Wong P, Chung S, Dunbar C, Bodine D, Ruscetti S, Nienhuis A. Retrovirus-mediated transfer and expression of the interleukin-3 gene in mouse hematopoietic cells result in a myeloproliferative disorder. *Molecular and cellular biology*. 1989;9 (2):798-808.
195. Hariharan IK, Adams JM, Cory S. bcr-abl oncogene renders myeloid cell line factor independent: potential autocrine mechanism in chronic myeloid leukemia. *Oncogene research*. 1988;3 (4):387-99.
196. Sexl V, Piekorz R, Moriggl R, Rohrer J, Brown MP, Bunting KD, et al. Stat5a/b contribute to interleukin 7-induced B-cell precursor expansion, but abl- and bcr/abl-induced transformation are independent of stat5. *Blood*. 2000;96 (6):2277-83.
197. Anderson SM, Mladenovic J. The BCR-ABL oncogene requires both kinase activity and src-homology 2 domain to induce cytokine secretion. *Blood*. 1996;87 (1):238-44.
198. Ilaria RL, Jr., Van Etten RA. The SH2 domain of P210BCR/ABL is not required for the transformation of hematopoietic factor-dependent cells. *Blood*. 1995;86 (10):3897-904.

199. Daley GQ, Baltimore D. Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210bcr/abl protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85 (23):9312-6.
200. Li S, Gillessen S, Tomasson MH, Dranoff G, Gilliland DG, Van Etten RA. Interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor are not required for induction of chronic myeloid leukemia-like myeloproliferative disease in mice by BCR/ABL. *Blood*. 2001;97 (5):1442-50.
201. Anand M, Chodda SK, Parikh PM, Nadkarni JS. Abnormal levels of proinflammatory cytokines in serum and monocyte cultures from patients with chronic myeloid leukemia in different stages, and their role in prognosis. *Hematological oncology*. 1998;16 (4):143-54.
202. Welner RS, Amabile G, Bararia D, Czibere A, Yang H, Zhang H, et al. Treatment of chronic myelogenous leukemia by blocking cytokine alterations found in normal stem and progenitor cells. *Cancer cell*. 2015;27 (5):671-81.
203. Pehlivan M, Sahin HH, Pehlivan S, Ozdilli K, Kaynar L, Oguz FS, et al. Prognostic importance of single-nucleotide polymorphisms in IL-6, IL-10, TGF-beta1, IFN-gamma, and TNF-alpha genes in chronic phase chronic myeloid leukemia. *Genetic testing and molecular biomarkers*. 2014;18 (6):403-9.
204. Humlova Z, Klamova H, Janatkova I, Malickova K, Kralikova P, Sterzl I, et al. Changes of immunological profiles in patients with chronic myeloid leukemia in the course of treatment. *Clinical & developmental immunology*. 2010;2010:137320.
205. Chen H, Tang L, Peng X, Luo Z, Luo S, Tan W. [Effects of IFN-alpha combined with IL-6 on cell growth and related genes expression and apoptosis of bone marrow cells from CGL patients]. *Zhonghua xue ye xue za zhi = Zhonghua xueyexue zazhi*. 2000;21 (7):341-4.
206. Liu Y, Kleine HD, Engel H, Andreeff M. Cytokine expression of T cells in chronic myeloid leukemia. *Chinese medical journal*. 2000;113 (3):232-5.
207. Li Y, Hetet G, Maurer AM, Chait Y, Dhermy D, Briere J. Spontaneous megakaryocyte colony formation in myeloproliferative disorders is not neutralizable by antibodies against IL3, IL6 and GM-CSF. *British journal of haematology*. 1994;87 (3):471-6.
208. Kobayashi S, Teramura M, Sugawara I, Oshimi K, Mizoguchi H. Interleukin-11 acts as an autocrine growth factor for human megakaryoblastic cell lines. *Blood*. 1993;81 (4):889-93.

209. Einat M, Nagler A, Amiel A, Fejgin MD, Rudi A, Kashman Y, et al. Synergistic effects of interleukin-11 with other growth factors on the expansion of hematopoietic progenitors from normal individuals and chronic myeloid leukemia patients resistant to treatment with cytosine arabinoside or eilatin. *Leukemia research*. 1996;20 (9):751-9.

