



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

BCR/ABL FÜZYON PROTEİNİNİN K562 HÜCRE SERİSİNDE
İN VİTRO OLARAK İMMUNOLOJİK METODLA AKIM
SİTOMETRİDE TAYİNİ VE SONUÇLARIN RT-PCR İLE
KARŞILAŞTIRILMASI

YANDAL UZMANLIK TEZİ
Uzm. Dr. Bilal AYGÜN

ANKARA / 2013



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

BCR/ABL FÜZYON PROTEİNİNİN K562 HÜCRE SERİSİNDE
İN VİTRO OLARAK İMMUNOLOJİK METODLA AKIM
SİTOMETRİDE TAYİNİ VE SONUÇLARIN RT-PCR İLE
KARŞILAŞTIRILMASI

YANDAL UZMANLIK TEZİ
Uzm. Dr. Bilal AYGÜN

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Hakan ÖZDOĞU

Bu Tez Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu Tarafından
Onaylanmış (Proje no: DA12/33) ve Üniversitesi Araştırma Fonu Tarafından
Desteklenmiştir.

ANKARA / 2013

TEŞEKKÜR

Hematoloji uzmanlık eğitimim boyunca mesleki bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Prof. Dr. Hakan ÖZDOĞU, Prof. Dr. Can BOĞA ve Prof. Dr. Sema KARAKUŞ'a ve bu eğitim olanağını bize sağlayan sayın rektörümüz Prof. Dr. Mehmet HABERAL ve Merkez Müdürümüz Yrd. Doç. Dr. Turgut NOYAN'a,

Tezimin hazırlanmasında bana yardımcı olan Doç. Dr. İlknur KOZANOĞLU, Doç. Dr. Yusuf BARAN, Bio. İbrahim BOĞA, Bio. Erkan MAYTALMAN, Bio. Nilay OKTAR, Bio. Canan CANSUN ve tüm Hematoloji Laboratuvar çalışanlarına,

Eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Dr. Mutlu Kasar, Dr. Süheyl Asma, Dr. Mahmut YERAL, Dr. Soner Solmaz, Dr. Fatih ÖÇAL ve tüm Hematoloji B.D. çalışanlarına teşekkür ederim.

Her zaman manevi desteklerini yanımda hissettiğim aileme teşekkürlerimi sunarım.

Uzm. Dr. Bilal AYGÜN

İÇİNDEKİLER

<u>TEŞEKKÜR</u>	I
<u>İÇİNDEKİLER</u>	II
<u>TABLO LİSTESİ</u>	IV
<u>SEKİL LİSTESİ</u>	V
<u>KISALTMA LİSTESİ</u>	VI
<u>ÖZET ve ANAHTAR KELİMELE</u>	VIII
<u>ABSTRACT and KEY WORDS</u>	IX
<u>1. GİRİŞ ve AMAÇ</u>	10
<u>2. GENEL BİLGİLER</u>	11
<u>2.1. Kronik Myeloid Lösemi</u>	11
<u>2.1.1. Tarihçe</u>	12
<u>2.1.2. Epidemiyoloji</u>	12
<u>2.1.3. Etiyoloji ve Patogenez</u>	12
<u>2.1.4. Patofizyoloji</u>	13
<u>2.1.5. Klinik</u>	15
<u>2.1.6. Sitogenetik</u>	19
<u>2.1.7. Moleküler</u>	19
<u>2.1.8. Tanı</u>	20
<u>2.1.9. Ayırıcı Tanı</u>	20
<u>2.1.10. Prognoz</u>	22
<u>2.1.11. Tedavi</u>	23
<u>2.1.12. Akselere Faz ve Blastik Faz KML Hastalarının Tedavisi</u>	28
<u>2.1.13. Kök Hücre Nakli</u>	29
<u>2.2. Philadelphia Kromozomu</u>	31
<u>2.2.1. BCR ve ABL Genlerinin Yapısı</u>	33
<u>2.2.2. BCR/ABL Füzyon Geni</u>	34
<u>2.2.3. BCR/ABL Füzyon Proteininin Yapısı ve Hastalık Fenotipi</u>	35
<u>2.3. Akım Sitometri</u>	37
<u>3. GEREÇ ve YÖNTEM</u>	39
<u>3.1. Hücre Kültürü Aşamaları</u>	39
<u>3.1.1. K562 Hücrelerinin Çoğaltılması ve Çalışmada Kullanılacak Hücre</u>	
<u>Miktarlarının Standardizasyonu</u>	39
<u>3.1.2. İn Vitro İmatinib ile İnkübasyonu</u>	39
<u>3.1.3. Hücre Sayımı</u>	40
<u>3.1.4. Canlılık Analizleri</u>	41
<u>3.2. BCR/ABL Moleküler Çalışması</u>	41
<u>3.2.1. Hücrelerden RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi</u>	41
<u>3.2.2. RT-PCR Aşamaları</u>	42
<u>3.2.3. Örneklerde BCR-ABL/ABL Değerlerinin Kantitatif Olarak</u>	
<u>Hesaplanması</u>	42
<u>3.3. Akım Sitometri Aşamaları</u>	45
<u>3.4. İstatistik</u>	46
<u>4. BULGULAR</u>	47

<u>4.1. K562 Hücre Hattında BCR/ABL Füzyon Proteininin Gösterilmesinde Akım Sitometrik Yöntemlerin Standardizasyonu ve Moleküler Yöntemle Karşılaştırılması</u>	47
<u>4.1.1. K562 Kültürü, Hücre Sayımı ve Canlılık Oranları</u>	47
<u>4.1.2. Moleküler Çalışmanın Sonuçları</u>	47
<u>4.1.3. Akım Sitometri Sonuçları</u>	48
<u>4.2. İn Vitro İmatinib İnkübasyonu Sonuçları</u>	51
<u>4.2.1. İmatinib İlaç Konsantrasyonu ve Hücre Canlılığı Sonuçları</u>	51
<u>4.2.2. Moleküler Çalışma Sonuçları</u>	52
<u>4.2.3. Akım Sitometri Sonuçları</u>	52
<u>5. TARTIŞMA</u>	55
<u>6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER</u>	64
<u>KAYNAKLAR</u>	65
<u>ÖZGEÇMİŞ</u>	70

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
<u>Tablo 1. KML ile Lökomoid Reaksiyonun Ayırımı</u>	21
<u>Tablo 2. KML’de Prognozu Belirlemede Kullanılan Risk Skorları</u>	23
<u>Tablo 3. İmatinib Grupları</u>	40
<u>Tablo 4. cDNA**nın Palm Cycler Cihazındaki Döngüsü</u>	41
<u>Tablo 5. Tüm K562 Hücre Gruplarında BCR/ABL Gen Kopya Sayısının RT-PCR** Sonuçları.</u>	48
<u>Tablo 6. Tüm Gruplardaki Akım Sitometrik Yöntemle Elde Edilen MFI* Değerleri.</u>	50
<u>Tablo 7. Tüm Gruplardaki Akım Sitometrik Yöntemlerle Elde Edilen MFI* Değerlerinin İstatistiksel Analizi</u>	50
<u>Tablo 8. Kontrol ve Farklı Dozlarda İmatinib ile Kültüre Edilen K562 Hücre Hatlarındaki RT-PCR* ve Akım Sitometri Sonuçları</u>	54

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
<u>Şekil 1. Periferik kan myeloid seri elemanları</u>	14
<u>Şekil 2. İmatinib aracılı BCR/ABL inhibisyon mekanizması</u>	24
<u>Şekil 3. Philadelphia kromozomu</u>	32
<u>Şekil 4. BCR ve ABL1 genleri</u>	34
<u>Şekil 5. BCR-ABL/ABL oranının IS*'deki sonuçlarının bir önceki sonuca ihtiyaç duyulmadan yorumlanması. *IS: uluslararası birim, **MMR: majör moleküler yanıt, ***IS-NCN: uluslararası birim - normalize kopya değeri.</u>	43
<u>Şekil 6. Negatif kontrol ve kontrol gen ABL'nin 4 farklı (10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶) dilüsyonu ile yüksek pozitif kontrol ve IS-MMR kalibratörün RT-PCR eğrileri.</u>	44
<u>Şekil 7. Negatif kontrol ve BCR' nin 6 farklı (10-10⁶) dilüsyonu ile yüksek pozitif kontrol ve IS-MMR kalibratörün RT-PCR eğrileri.</u>	44
<u>Şekil 8. BCR/ABL immunolojik analiz için BD FACS DIVA analiz şablonu örneği. A ve B boncuk seçimi, C pozitif kontrol, D negatif kontrol</u>	46
<u>Şekil 9. K562 hücrelerinin inverted mikroskopta x20 büyütmede görüntüsü</u>	47
<u>Şekil 10. Akım sitometri sonuçlarının eşik değerinin ROC eğrisi ile gösterilmesi. Renkli çizgiler olarak gösterilen eğrilerin altındaki alan ölçülerek kesim değerleri hesaplanmıştır. Ortadaki çapraz eğri, alanın % 50'sini ifade eden referans eğridir.</u>	49
<u>Şekil 11. Tüm hücre gruplarında BCR-ABL proteinin akım sitometrik yöntem ile gösterilmesi. Hücre sayısı 50.000'in altında olan gruplarda (A ve B) negatif, 50.000 ve üzerindeki gruplarda (C, D, E, F, G, H ve I) pozitif olarak analiz edilmiştir.</u>	51
<u>Şekil 12. İmatinib ile kültüre edilen K562 hücre hatlarındaki akım sitometri sonuçları. Bütün grupların sonuçları pozitif bulundu.</u>	53

KISALTMA LİSTESİ

ABL	: Abelson lösemi virüs onkogen eşdeğeri
ALL	: Akut lenfoblastik lösemi
Allo-SCT	: Allojeneik kök hücre nakli
AML	: Akut myeloid lösemi
ATP	: Adenozin trifosfat
A-MuLV	: Abelson murine lökemia virus
BCR	: Kırılma noktası küme alanı (<i>breakpoint cluster region</i>)
CBA	: Sitometrik boncuk dizisi
cDNA	: Complementer DNA
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ET	: Esansiyel Trombositoz
FBS	: Fetal bovine serum
FISH	: Fluorescence in situ hibridization
G-CSF	: Granülosit-koloni stimülan faktör
GDP	: Guanidin difosfat
GTP	: Guanidin trifosfat
GVHD	: Graft-versus-host hastalığı
GVL	: Graft versus lösemi
FBS	: Fetal bovine serum
IC50	: Hücrelerin proliferasyonunun % 50 baskılandığı konsantrasyon
IFN	: İnterferon
IFN-α	: İnterferon alfa
IS	: Uluslararası birim
IM	: İdiyopatik Myelofibrozis
IRIS	: İnterferona karşı STI571' in uluslararası randomize çalışması (<i>International Randomized Study of Interferon versus STI571</i>)
Jak	: Janus kinaz
kD	: Kilodalton

KML	: Kronik myeloid lösemi
M-BCR	: Majör BCR
m-BCR	: Minör BCR
MDR	: Çoklu ilaç direnci
MFI	: Ortalama floresan yoğunluk
mM	: Milimolar
mm	: Milimetre
mm³	: Milimetreküp
MRD	: Minimal kalıntılı hastalık
m-RNA	: Messenger RNA
MSY	: Majör sitogenetik yanıt
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NCN	: Normalize Kopya Değeri
NK	: Natural killer
μ-BCR	: Mikro-BCR
NF-κB	: Nükleer faktör-kappa beta
nM	: Nanomolar
PBS	: Fosfat tamponu
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
Ph kromozomu:	Philadelphia kromozomu
PRV	: Polisitemia Rubra Vera
qRT-PCR	: Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
RT-PCR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SFK	: Src kinaz ailesi
SH	: Src homoloji alanı
THY	: Tam hematolojik yanıt
TSY	: Tam sitogenetik yanıt
v-ABL	: Abelson lösemi virüsü
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

BCR/ABL Füzyon Proteininin K562 Hücre Serisinde İn Vitro Olarak İmmunolojik Metodla Akım Sitometride Tayini ve Sonuçların RT-PCR ile Karşılaştırılması

Kronik myeloid lösemi (KML) genellikle Philadelphia (Ph) kromozomu adı verilen özel bir kromozomal anormallik ile karakterize hematopoietik öncü hücrenin neoplastik dönüşümü ile ortaya çıkan klonal myeloproliferatif bir hastalıktır. Ph kromozomu 9. ve 22. kromozomlar üzerinde bulunan BCR ve ABL genlerinin translokasyonu ile meydana gelmektedir. KML hastalarında minimal kalıntılı hastalık takibi RT-PCR ile BCR/ABL mRNA'sının gösterilmesine dayanır. RT-PCR ile BCR/ABL onkogeninin gösterilmesi, çok fazla tekniğe dayalı ve teknisyen bağımlıdır. RT-PCR tekniklerindeki güçlükler ve standardizasyonundaki zorluklar nedeniyle KML hastalarının tanı ve takibinde yeni metodların geliştirilmesi ve kullanılması rutin pratikte önem arz etmektedir. Bu çalışmada K562 hücre hattında, BCR/ABL füzyon gen proteininin akım sitometri cihazı kullanılarak immunolojik boncuk yöntemiyle gösterilmesinin standardizasyonu ve sonuçların altın standart olan moleküler yöntem ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışma 2 koldan oluşturuldu. Birinci kolda K562 hücre hattında doğrusal olarak artan miktarlarda 9 farklı hücre grubu (1×10^3 , 1×10^4 , 5×10^4 , 7.5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 1.5×10^6 , 2×10^6) kullanılarak RT-PCR ve akım sitometrik yöntemler istatistiksel olarak karşılaştırıldı. İkinci kolda ise, her bir grup için ayrı ayrı 1×10^7 K562 hücresi, 1 kontrol grubu ve 5 farklı dozda imatinib grubu ile 72 saat inkübe edildi. Sonrasında hücre canlılık analizleri yapıldı ve RT-PCR sonuçları ile akım sitometrik yöntem ile analiz sonuçları karşılaştırıldı. Çalışmanın 1. kolunda RT-PCR ile tüm hücre gruplarında BCR-ABL/ABL oranı pozitif olarak saptandı. Akım sitometrik yöntemler kullanıldığında hücre sayısı 1.000 ve 10.000 olan grupta BCR/ABL füzyon proteini tespit edilemedi, 50.000 ve üzerinde hücre sayılarının bulunduğu gruplarda BCR/ABL proteini pozitif bulundu ($p < 0,05$). 50.000 hücre ve üzerindeki grupların akım sitometri sonuçlarının RT-PCR ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak özgüllük ve duyarlılığı %100 olarak bulundu. Çalışmanın 2. kolunda tüm gruplarda RT-PCR ve akım sitometri sonuçları pozitif bulundu. Canlılığın azaldığı gruplarda akım sitometrik yöntemler ile ortalama floresan yoğunluğun azaldığı (MFI) görüldü. Ancak RT-PCR ile BCR-ABL/ABL oranlarının, canlılık sonuçlarından etkilenmediği görüldü. Sonuç olarak, akım sitometrik yöntemler ile canlı ve 50.000 ve/veya üzerinde hücre ile çalışıldığında BCR/ABL füzyon proteini gösterilebilir.

Anahtar Sözcükler: KML, BCR/ABL, RT-PCR, akım sitometri.

ABSTRACT

In Vitro Detection of BCR/ABL Fusion Protein Immunologically with Flow Cytometry in K562 Cell Line and Comparison of Results with RT-PCR

Chronic myeloid leukemia (CML) is a clonal myeloproliferative disease arising from a neoplastic transformation of hematopoietic progenitor cells, usually characterized with a specific chromosomal abnormality called Philadelphia (Ph) chromosome. Ph chromosome occurs with reciprocal translocation of BCR and ABL genes located on chromosomes 9 and 22, respectively. Follow up of minimal residual disease in CML patients is based on the detection of BCR/ABL mRNA by RT-PCR. Showing BCR/ABL oncogene by RT-PCR is a difficult and technician dependent method. Development and use of novel methods for diagnosis and follow up of CML patients are of importance in routine practice due to the difficulties in RT-PCR technique and its standardization. In this study, we aimed to standardize detection of BCR/ABL protein using a flow cytometric method in K562 cells, and to compare the results with the molecular method which is the gold standard. The study consisted of two arms. In the first arm, RT-PCR and flow cytometry methods were compared using nine different cell groups with gradually increasing amounts (1×10^3 , 1×10^4 , 5×10^4 , 7.5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 1.5×10^6 , 2×10^6) in K562 cells. In the second arm, 1×10^7 K562 cells were incubated for 72 hours with each of the 6 groups (1 control group and 5 different concentration of imatinib applied groups). Afterwards, cell viability analysis was performed and the results of the RT-PCR and flow cytometric analyses were compared. While BCR-ABL/ABL ratio was found to be positive in all groups with RT-PCR in the first arm of the study, BCR/ABL fusion protein could not be detected by flow cytometry in groups with 1.000 and 10.000 cells. BCR/ABL protein was found to be positive in the groups that contain 50.000 or more cells ($p < 0.05$). Specificity and sensitivity were 100% when flow cytometry results of the groups that contain 50.000 or more cells as compared with RT-PCR. RT-PCR and flow cytometry results were positive in all groups in the second arm. The mean fluorescence intensity was observed to decrease in flow cytometry methods in those groups with reduced viability. However, RT-PCR and BCR-ABL/ABL ratios were not affected by the viability. In conclusion, BCR/ABL fusion protein can be detected by using flow cytometry method, when a minimum of 50.000 viable cells are studied.

Key Words: CML, BCR/ABL, RT-PCR, flow cytometry.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kronik myeloid lösemi (KML) beyaz kan hücrelerinin miktarındaki artış ile karakterize edilen hematolojik bir kanserdir. KML’de granülositlerin ve özellikle de nötrofillerin üretiminde önemli bir artış gözlenir. KML tüm lösemi türlerinin % 20’sini teşkil eder¹. KML, genellikle Philadelphia (Ph) kromozomu adı verilen özel bir kromozal anormallik ile tespit edilmektedir. Ph kromozomu 9. ve 22. kromozomlar üzerinde bulunan BCR ve ABL genlerinin translokasyonu ile meydana gelmektedir. Bu hibrid gen, hücrenin kontrolsüz büyümesini ve bölünmesini sağlayan ve apoptozu baskılayan sinyal ileti yollarını aktif hale getiren tirozin kinaz aktivitesine sahip bir proteini kodlar². Diğer kinazlarda olduğu gibi, BCR/ABL ATP’ye bağlanarak fosfat gruplarını birçok sinyal ileti yollarının aktivasyonuna yol açabilecek substratlara taşır. BCR/ABL füzyon proteini tarafından gerçekleştirilen malign transformasyonun 4 temel mekanizması vardır. Bu mekanizmalar, hücrelerin adhezyon özelliklerini kaybetmesi, mitotik bölünmeyi sağlayan sinyal ileti yollarının sürekli aktif tutulması, apoptozun engellenmesi ve proteozomlarca ABL gen aktivitesini engelleyen proteinlerin parçalanmasıdır. BCR/ABL geni tarafından kontrol edilen bu mekanizmalar nedeni ile BCR/ABL proteini KML’nin tedavisi için ideal bir hedef olarak görülmektedir. KML hastalarında tirozin kinaz inhibitörlerinin kullanılması ile hedefe yönelik tedavide yeni bir dönem başlamıştır.

Kronik myeloid lösemi hastalarında minimal kalıntılı hastalık takibi RT-PCR ile BCR/ABL mRNA’sının gösterilmesine dayanır. RT-PCR ile BCR/ABL onkogeninin gösterilmesi, çok fazla tekniğe dayalı ve teknisyen bağımlıdır. Tanımlanmış en iyi metod yoktur. Laboratuvarlar arası karşılaştırma ve metodların validasyonunu yapmak zor ve zahmetlidir. RT-PCR tekniklerindeki güçlükler ve standardizasyonundaki zorluklar nedeniyle KML hastalarının tanı ve takibinde yeni metodların geliştirilmesi ve kullanılması rutin pratikte önem arz etmektedir.

Bu çalışmada KML hücre hattı olan K562 hücrelerinde BCR/ABL füzyon proteininin tayini için akım sitometrik yöntemler kullanıldı ve tespit edilen sonuçlar standart RT-PCR teknikleriyle elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kronik Myeloid Lösemi

Kronik myeloid lösemi hematopoietik bir öncü hücrenin neoplastik dönüşümü ile ortaya çıkan klonal myeloproliferatif hastalıktır. Başta myeloid ve monositik olmak üzere, eritroid, megakaryositik, B-lenfositler ve nadiren de T-lenfositler serileri etkilemektedir^{2,3}. Kronik Myeloid Lösemi; Polisitemia Rubra Vera (PRV), Esansiyel Trombositoz (ET) ve İdiyopatik Myelofibrozis (IM) ile birlikte kronik myeloproliferatif hastalıklar adı verilen bir grup içinde yer alır ve erişkin çağıdaki tüm lösemilerin %15-20'sini oluşturur¹. Hastalık sıklığı ve mortalitesi yaş ile beraber artış gösterir. 20 yaşın altındaki hastalar tüm hastaların %10'dan daha azını oluşturur. Erkeklerde kadınlara oranla 1,5-2 kat daha fazla izlenmektedir. Ancak hastalık seyri her iki cins için de aynıdır^{2,4}. Ph kromozomu KML'ye özgü bir kromozomal anormallik olarak bilinmektedir. Kromozom 9 (ABL1) ve kromozom 22 (BCR)'nin uzun kolları arasındaki parça değişimi sonucunda t(9;22) (q34;q11) oluşur, bu kromozomal bozukluk tüm hastaların % 90-95'inde izlenir. Translokasyon sonucu BCR/ABL füzyon geni ortaya çıkar². % 10 civarındaki hastada Ph negatiftir ve bu vakaların yaklaşık yarısında BCR/ABL füzyon geni moleküler incelemelerle saptanabilmektedir⁵. Bazı hastalarda nadir görülmekle birlikte hem Ph kromozomu, hem de BCR/ABL negatif saptanır. Bu vakalar atipik ve kötü prognoza sahiptirler⁴.

Kronik myeloid lösemi, myeloid elemanların artmış proliferasyonu ile karakterize bir klonal kök hücre bozukluğudur⁶. KML kronik, akselere ve blastik olmak üzere 3 klinik faza ayrılır. Olguların büyük çoğunluğu kronik fazda tanı almaktadır². Klinik olarak başlangıçta asemptomatik olmakla birlikte hastalar genellikle ateş, halsizlik, iştahsızlık, kilo kaybı gibi yakınmalarla başvururlar ve fizik muayenede splenomegali belirgin bir özelliktir. Tanı Ph kromozomunun varlığı ile konulur. Tedavide önceleri allojenik kök hücre nakli (Allo-SCT), interferon temelli rejimler, hidroksiüre ve busulfan gibi konvansiyonel kemoterapiler şeklinde iken, bir BCR/ABL tirozin kinaz inhibitörü olan imatinibin keşfi ile tedavide yeni bir dönem başlamıştır⁴.

2.1.1. Tarihçe

Kronik myeloid lösemiye ilk olarak 1848 yılında rastlanmasına rağmen bugünkü anlamda ilk olarak 1924'te tanımlanmıştır. 1960 yılında Nowell ve Hungerford tarafından KML'li hastalarda anormal bir kromozom saptanmıştır. Bu kromozom insan kanserleri ile ilişkili olan ilk kromozomal bozukluktur ve daha sonra keşfedildiği şehrin ismiyle Philadelphia kromozomu olarak anılmıştır. 9. ve 22. kromozomlar arasındaki bu translokasyon, kromozomal bantlama tekniğindeki ilerlemeler sayesinde 1973'te Rowley tarafından gösterilmiştir. 1980'li yıllarda yapılan araştırmalarda, karşılıklı translokasyona bağlı olarak 9. kromozom üzerindeki "ABL" proto-onkogeni ile 22. kromozom üzerindeki "BCR" geninin birleşmesi sonucu oluşan "BCR/ABL" füzyon geninin, KML hastalarında kök hücre çoğalmasını arttıran ve apoptozisi inhibe eden tirozin kinaz aktivitesine sahip bir proteini kodladığı saptanmıştır. Bu bilgiye dayanılarak 1990'lı yılların ortalarından itibaren tirozin kinaz inhibisyonuna yönelik araştırmalar ve geliştirilen ilaçlarla, günümüzde KML daha iyi tedavi edilebilir bir hastalık haline gelmiştir⁷.

2.1.2. Epidemiyoloji

Kronik myeloid lösemi yaklaşık olarak tüm lösemi vakalarının % 15-20'sini oluşturmaktadır. Hastalık sıklığı ve mortalitesi yaş ile artış gösterir. 20 yaşın altındaki vakalar tüm hastaların % 10'dan daha azını oluşturur. Erkek cinsiyette kadınlara oranla 1,5 kat daha fazla izlenir, hastalık seyri her iki cins için de farklı değildir. İdentik ikizler için hastalığın konkordansı yoktur. KML spesifik bir karyotip anormalliğinin (Ph kromozomu) lökomogenez patogenezi ile ilişkili olabileceğinin kanıtlandığı ilk hastalıktır.

2.1.3. Etiyoloji ve Patogenez

Yüksek doz radyasyona maruziyet KML insidansında artışa yol açar³. Her ne kadar benzen ve alkilleyiciler gibi kimyasal lökomojenlerin Akut myeloid lösemi (AML) ile doz bağımlı ilişkileri olsa da, KML'ye yol açtıkları gösterilememiştir. Bununla birlikte deoksi ribonükleik asit (DNA) topoizomerez II inhibitörlerinin KML'ye neden oluşu tanımlanmıştır. KML'nin belirgin ailesel bir paterni yoktur.

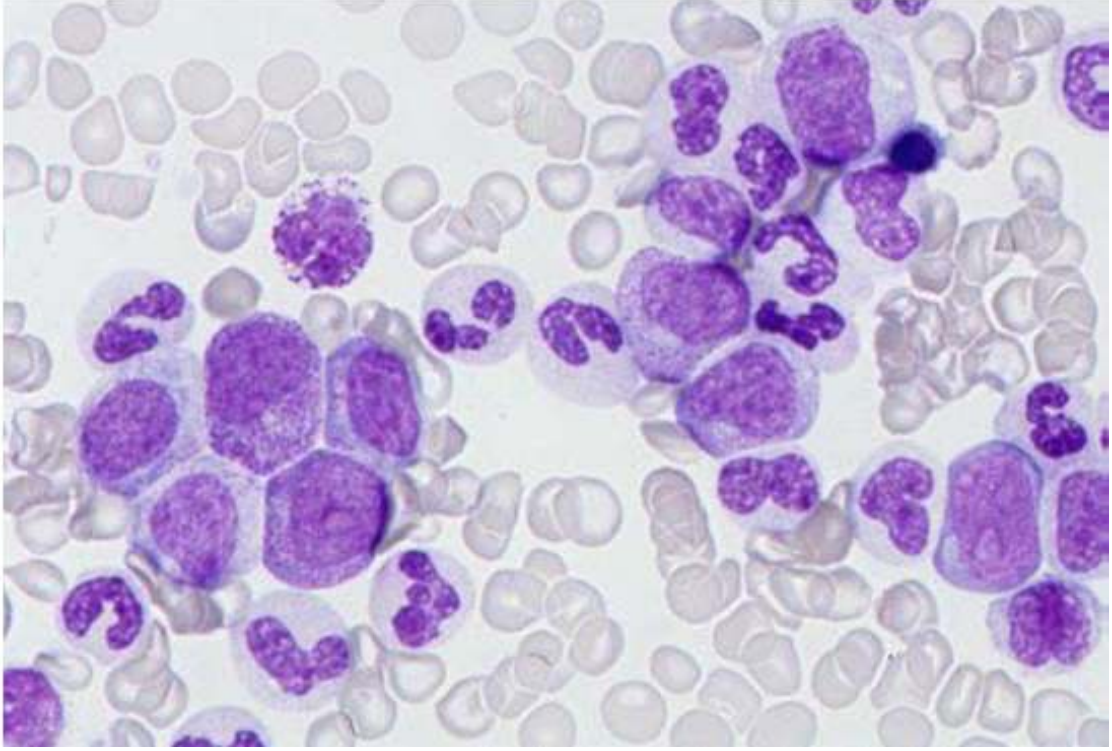
Kronik myeloid lösemiye özgü olan kromozomal anormallik Ph kromozomu olarak anılmaktadır. 9 ve 22 no'lu kromozomların uzun kolları arasındaki parça

değişimi sonucunda t(9;22) (q34;q11) oluşan bu bozukluk tüm olguların % 90-95'inde izlenmektedir⁸. Translokasyon BCR/ABL füzyon genini ortaya çıkarır. % 10 civarındaki Ph negatif olgunun yaklaşık yarısında ise BCR/ABL füzyon geni moleküler incelemelerle saptanabilmektedir⁵. Hem Ph kromozomu, hem de BCR/ABL negatif olanlar ise oldukça nadir, atipik ve kötü prognoza sahip vakalardır⁹.

ABL geni Abelson murine lökemia virus (A-MuLV) tarafından taşınan *v-abl* onkojeninin insandaki homologudur¹⁰. BCR'nin etkisi ile bir proto-onkojen olan ABL, sürekli tirozin fosfokinaz aktivitesi gösteren bir onkojene dönüşür^{8,10}. Bu yüksek ve sürekli tirozin fosfokinaz aktivitesi ile oluşan hastalık büyüme faktörlerinden, adhezyondan bağımsız ve apoptozise dirençli özelliklerle tanımlanmıştır¹¹.

2.1.4. Patofizyoloji

Kronik myeloid lösemide sitogenetik anormalliğin başlangıcı ile tanı arasında 6-8 yıllık prelinik dönem olarak adlandırılan sessiz bir dönem bulunur. Bu süre içinde Ph pozitif kök hücreden gelişen neoplastik klonun yanı sıra normal kök hücre klonları da hematopoezde rol oynar. Bu dönemde bazı düzenleyici mekanizmalar tarafından kontrol edilebilen pluripotent neoplastik kök hücrelerin zaman içinde nasıl otonomi kazandığı ve klonal üstünlük sağladığı halen bilinmemektedir. Ancak BCR/ABL füzyon geninin ürünü olan ve güçlü tirozin kinaz aktivitesine sahip P210 proteininin, neoplastik kök hücrelerde proliferasyonu arttırarak ve apoptozisi inhibe ederek Ph pozitif klona çoğalma önceliği kazandırdığı düşünülmektedir. P210 proteini farklılaşmayı engellemeden myeloid seri elemanlarının çoğalmasını indükler ve yaşam sürelerini uzatır. Neoplastik klona ait hücre sayısındaki artışa yol açan bu durumun yanı sıra lösemik kök hücrelerin kemik iliği stroması ile etkileşimleri de anormaldir. Hücrelerin adhezyon yeteneklerinin kaybolmasının, olgunlaşma ve proliferasyon bozukluğuna yol açtığı ve immatür hücrelerin kemik iliğinden çevre kanına geçmesiyle karakterize anormal bir myeloid hücre trafiğine sebep olduğu ileri sürülmektedir. İmmatür myeloid hücrelerin periferik kana geçtiği bir başka hastalık olan AML'den farklı olarak KML'de lösemik kök hücreler farklılaşma ve olgunlaşma yeteneklerini tamamen kaybetmemişlerdir. Bu nedenle KML'de hem kemik iliğinde hem de periferik kanda sayıca artmış halde farklılaşma ve olgunlaşma sürecindeki tüm myeloid seri elemanları görülebilir (Şekil 1).



Şekil 1. Periferik kan myeloid seri elemanları¹²

Hastalık, hemen daima birbirini izleyen üç klinik evreye sahiptir: Kronik faz, akselere faz ve blastik faz. Hastaların % 80'i ilk evre olan kronik evrede tanınır. Hastaların yaklaşık % 10'u akselere fazda ve diğer % 10'u blastik fazda bulunur. Bazı olgularda akselere faz görülmeksizin kronik fazdan blastik faza geçiş olabilir¹³.

Kronik evrede myeloid hiperplazi sonucu granülosit sayısı artmış olmakla birlikte lösemik hücrelerin olgunlaşmaları ve yaşam süreleri normale yakındır. Myeloid ve eritroid seriye ait elemanların fonksiyonlarının genellikle normal olmasına karşın bazı olgularda trombosit fonksiyonları bozulmuştur. Hastalığın doğal seyrinde kronik evre ortalama 3-4 yıl sürer. Kronik evredeki hastaların % 5'i tanıdan sonraki ilk yıl içinde blastik evreye dönüşür. Sonraki her yıl için bu oran yaklaşık % 20-25 civarındadır¹⁴.

Akselere faz, hastalığın hızlanarak kronik evreden çıktığı ve blastik dönüşüme doğru seyrettiği ara dönemdir. Bu dönemde periferik kanda ve kemik iliğinde

myeloblastların oranı artar. Ateş, kilo kaybı, gece terlemesi gibi sistemik semptomlar ortaya çıkar ve lökosit sayısını kontrol altında tutabilmek için artan dozlarda ilaç kullanılması gerekebilir. Akselere faz genellikle kısa sürer ve hastalar birkaç ay içinde blastik faza dönüşüm gösterir.

Blastik faz hastalığın terminal dönemidir. Bu dönemde hastalık akut lösemi tablosuna benzer. Blastik dönüşüm genellikle myeloid fenotipte gerçekleşir ancak bazen lenfoid fenotipte de görülebilir. Her iki durumda da prognoz kötüdür ve yoğun tedavilere rağmen hastalığın kronik faza geri dönüşü nadiren gerçekleşir. Remisyon sağlanamayan olgularda sağ kalım 3-6 ay civarındadır.

Hastalığın kronik fazdan akselere ve blastik faza ilerlemesinin mekanizması tam olarak anlaşılmamakla birlikte trizomi 8, izokromozom 17 ve ikinci bir t(9;22) gibi ek sitogenetik anormallikler genellikle kronik fazdan akselere faza ya da blastik faza geçildiği zaman ortaya çıkmaktadır. Myeloid tip blastik dönüşüm esnasında daha yaygın olarak görülen ve hastalığın progresyonu ile ilişkilendirilen bu sekonder sitogenetik anormalliklerin farklı bir kök hücre grubunda gelişmediği ve Ph pozitif hücrelerde olduğu gösterilmiştir. KML hastalığın gelişimi ve evreleri göz önüne alındığında, çok basamaklı neoplastik oluşum kuramı için tipik bir örnektir.

2.1.5. Klinik

Kronik myeloid lösemi; kronik faz, akselere faz ve blastik faz olmak üzere 3 klinik faza ayrılır. Olguların büyük çoğunluğu (>%85) kronik fazda tanı almaktadır. Bu fazda myeloid progenitör hücre sayısı artış gösterir ve diferansiyasyon devam ettikçe matür granülositler periferik kanda izlenmeye devam eder. Kronik faz yaklaşık olarak 3-5 yıl süre ile devam eder. Kronik fazı hücre diferansiyasyonunun hızlı bir şekilde kayb olduğu, bazofili ve trombositozun ortaya çıktığı akselere faz takip eder. Hastalığın son dönemi olan blastik fazda (blast krizi) ise immatür blastik hücreler periferik kanda izlenirken, kemik iliğinde lösemi hücreleri %30 ve üzeri oranlarda bulunmaktadır. Bu faz için ortalama yaşam beklentisi 3-6 ay olarak kabul edilir⁸.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından akselere fazdaki hastalar, KML tanısı olan ve aşağıdaki özelliklerden bir veya daha fazlasına sahip olanlar olarak tanımlanmıştır.

- Periferik kanda veya kemik iliğinde %10-19 oranında blast mevcudiyeti

- Periferik kanda bazofillerin $\geq\%20$ oranında bulunması
- Tedaviden bağımsız olarak trombosit sayısının 100,000/mikroL değerinden az olması
- Tedaviye yanıtızsız olarak dalak boyutu ve beyaz küre sayısının artış göstermesi
- Ph kromozomuna ilave yeni kromozomal bozuklukların gelişmesi (sitogenetik evrimleşme)

Kronik myeloid lösemi seyrinde hiç istenmeyen ve tedavisi oldukça zor olan son dönem ise blastik fazdır¹⁵.

Bu fazdaki hasta aşağıdaki özelliklerden en az bir tanesine sahiptir.

- Periferik kanda veya kemik iliğinde blast oranının $\geq\%20$ olması
- Kemik iliği biyopsisinde büyük odaklar ya da kümeler halinde blastların mevcudiyeti
- Kemik iliği dışında blastik infiltrasyonların varlığı (örneğin; myeloid sarkomlar ya da kloromalar)

Kronik myeloid lösemi’de hastaların yaklaşık % 30’u tanı anında asemptomatik olup, rutin medikal incelemeler sırasında rastlantısal olarak saptanmaktadır. Semptomatik hasta grubunda ise yakınmalar spesifik olmayıp, yavaş gelişim göstermektedir. Halsizlik, yorgunluk, iştahsızlık, dalak büyümesine bağlı abdominal rahatsızlık ve erken doyma hissi, metabolizma artışına bağlı gece terlemesi ve kilo kaybı, hiperürisemiye bağlı akut gut artriti, lökosit sayısının aşırı artması ve lökostatiz sonucu tinnitus, stupor ve priapizm, dalak enfarktı ve perisplenite bağlı olarak sol üst kadranda ve sol omuz ağrısı, nötrofillerin dermisteki perivasküler infiltrasyonuna bağlı akut febril nötrofilik dermatoz (sweet sendromu), hiperhistaminemiye bağlı akne ve ürtiker, vazopressine yanıtı diyabetes insipidus karşılaşılabilen semptomlardır. Fizik muayenede en çok dikkati çeken bulgular hastaların % 90’ında görülebilen splenomegali dışında palor ve sternal hassasiyettir¹⁶.

Tam kan sayımı ve periferik yayma incelemesi KML tanısını büyük ölçüde öngörmeyi sağlar. Serum hemoglobin konsantrasyonu hastaların hemen tamamında azalmıştır. Bununla birlikte eritrosit morfolojisinde belirgin anormallikler izlenmez. Hafif seviyede bir retikülosit artışı olağandır. İnterferon (IFN) tedavisi alan hastalarda pozitif direkt antiglobulin testi saptanabilir.

Tanı anında lökositoz ($>25 \times 10^9/L$) hastaların tamamında mevcut olup, %50 hastada lökosit sayısı $100 \times 10^9/L$ 'yi aşmaktadır. Tedavi uygulanmadığı takdirde total lökosit sayıları progresif olarak artış gösterir. Hastalık gelişiminin her evresinde kanda granülositler mevcuttur ve genel olarak normal görünümündedirler. Ortalama blast hücre prevalansı %3 olup (%0-10), progranülositler % 4, myelosit, metamyelosit ve çomak formları % 40 oranında izlenir. Parçalı nötrofiller ise tüm lökositlerin yaklaşık % 35'ini oluşturur.

Kronik myeloid lösemi hastalarının % 90'ından fazlasında nötrofil alkalen fosfataz (LAP) aktivitesi yoktur ya da yok denecek kadar düşük seviyededir. Bununla birlikte tedavi ile lökosit sayıları normale yaklaştıkça, şiddetli enfeksiyon veya enflamasyon varlığında aktivite yükselir. Paroksizmal nokturnal hemoglobinüri, hipofosfatazya, IM hastalarının yaklaşık olarak dörtte birinde ve androjen kullanan bazı hastalarda nötrofil alkalen fosfataz aktivitesi belirgin olarak azalmıştır. Enfeksiyon, enflamasyon, gebelik ve yine IM hastalarının yaklaşık olarak dörtte birinde nötrofil alkalen fosfataz aktivitesi artış gösterir¹⁷.

Eozinofil oranı artmasa da mutlak eozinofil sayısı hemen daima artış gösterir. Bununla birlikte nadiren eozinofillerin hakim olduğu Ph pozitif eozinofilik KML olabilmektedir. Mutlak bazofil sayısı hemen her hastada artmıştır. Kanda bazofilik progenitör hücreler artmış olarak bulunur. Genellikle kronik fazda bazofilik hücre oranı % 10-15'in üzerine çıkmaz. Bununla birlikte, nadiren total lökosit sayısının % 30-80 kadarını bazofillerin oluşturduğu Ph kromozomu pozitif KML vakaları da vardır. Böyle olgularda şiddetli pruritus, ürtiker ve gastrik hiperasidite olabilir. KML hastalarının bazofilleri, normal bazofillerden farklı olarak mast hücre α -triptaz içerirler.

Kronik myeloid lösemi hastalarının tanı anında mutlak lenfosit sayıları da artmıştır (ortalama $15 \times 10^9/L$). Ancak bu artış T hücre artışı şeklinde olup, B hücre sayıları korunmuştur. KML'de natural killer (NK) hücre aktivitesi bozulmuş ve dolaşımdaki mutlak NK hücre sayısı azalmıştır.

Tanı anında hastaların yaklaşık yarısında platelet sayıları artmıştır. Kronik fazın seyri sırasında da platelet sayısı artarak $500.000/\mu L$ 'nin üzerine çıkabilmektedir. Nadiren platelet sayıları azalmış olabilir ve böyle bir bulgu hastalığın akselere faza progresyon göstermesinin, ya da sekonder myelofibrozis gelişiminin bir işareti olabilir. Fonksiyonel nötrofil bozuklukları hafif seviyede olup, fırsatçı organizmalara

predispozisyon ortaya çıkarmaz. Trombositoya bağı trombohemorajik komplikasyonlar beklenmez.

Kemik iliğı belirgin olarak hipersellülerdir. Granülopoiezis çok belirgin olup, eritropoiezis azalmıştır. Eozinofil, bazofil ve megakaryositler ise normal veya artmış olarak bulunabilmektedir. Artmış hücresel döngüye bağı olarak makrofajlarda glukoserebrozid yükü ve bu hücrelerin gaucher hücrelerine benzer bir görünüm alması ya da lipid birikimine bağı polikrom boyamada deniz mavisi görünmesi olasıdır. Kemik iliğinde retikülin fibrozis artmıştır ve bu artış megakaryosit miktarı ile bağlantılıdır. Gerek kemik iliğı, gerekse periferik kanda nötrofil, makrofaj veya eozinofil kolonileri oluşturan hücreler (CFU) belirgin olarak artmıştır¹⁸.

Tedavi edilmemiş KML olgularında, artmış ürik asit üretimi, hiperürisemi ve hiperürikozüriye neden olur. Agresif tedavi yapıldığında ise, hızlı hücre yıkımı ilave pürin yükü ve hatta ürik asit presipitasyonuna bağı üriner tübül blokajı ortaya çıkarabilir. Ürat taşları oluşumu ve gut gelişimi diğerkomplikasyonlardır.

Nötrofiller transkobalamin I ve III olmak üzere vitamin B12 bağlayıcı proteinler içerirler. Myeloproliferatif hastalığı olan kişilerde serum B12 bağlama kapasitesi artmıştır ve bunun temel kaynağı da matür nötrofilik granülositlerdir. KML olgularında B12 bağlayıcılarının bir göstergesi olarak serum B12 seviyesi artmıştır ve normalin on katına kadar yükselebilir. Hastalar tedavi gördükçe ve total lökosit sayıları normale yaklaştıkça, normal seviyelere doğru gerileme izlenir.

Kronik myeloid lösemide serum laktik asit dehidrogenaz (LDH) seviyesi yükselmiştir. Serum kolesterolü azalmış olarak saptanır. Hastalığın akut lösemiye transformasyonu ile hiperkalsemi veya hipokalemi gelişebilir. KML hastalarının serum örneklerinde anjiyogenin, endoglin (CD105), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), β -fibroblast büyüme faktörü ve hepatosit büyüme faktörü gibi anjiyogenik faktörler belirgin olarak artmıştır¹⁶.

2.1.6. Sitogenetik

KML hastalarının kemik iliğı ve çekirdekli kan hücrelerinin % 90'ından fazlası Ph kromozomu (t[9;22](q34;q11)) içerir. Yaklaşık olarak hastaların % 5'inde varyant Ph kromozomları (kompleks rearanjmanlar) bulunmaktadır. Böyle durumlarda iki değıl, üç kromozom parça alışverişine dahil olur ve y kromozomu dışındaki herhangi bir

kromozomun parça değişimine katılması olasılık dahilindedir. Bazı nadir kompleks varyant olgularda parça değişimi sonrası 22 nolu kromozomun uzun kolunda beklenen kısalma gerçekleşmez. Bu durum maskelenmiş Ph kromozomu, ya da maskelenmiş translokasyon olarak adlandırılır. Bu olgularda mikroskopik incelemede maskelenmiş olan t(9;22) bantlama teknikleri veya moleküler problemler ile saptanabilir. Bu yardımcı testler arasında southern blot analizi ile BCR reanjmanının gösterilmesi, anormal mRNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) amplifikasyonu bulunur. PCR yönteminin yüksek duyarlılığı, işlem sırasında özen gösterilmesi gerekliliği ve bir miktar yanlış negatifliği akla getirir¹⁹.

2.1.7. Moleküler

Kronik myeloid lösemi hastalarında BCR/ABL füzyonunun floresan insitu hibridizasyon yöntemi (FISH) ile saptanması, southern blot ve PCR bağımlı yöntemlere, duyarlı bir alternatif oluşturur²⁰. Tanısal amaçlı FISH basit, doğru ve duyarlı bir metoddur ve çeşitli moleküler füzyonları saptayabilir. İnterfaz FISH sitogenetik incelemeye göre (Ph kromozomunu tanımlamada) daha duyarlı ve daha hızlıdır, ancak KML hücreleri konsantrasyonunun düşük olduğu minimal rezidüel hastalık durumlarında sınırlı kullanıma sahiptir. Hastalar kantitatif southern blot, FISH, kantitatif western blot, ya da yarışmalı ters transkriptaz RT-PCR gibi metodlarla takip ediliyorsa, sitogenetik incelemelerin sıklığı azaltılabilir. Moleküler yöntemler kan örneğinde çalışılabildiğinden, ilik hücreleri gerektiren sitogenetik incelemelerden çok daha pratik uygulamalardır. Southern blot, western blot ve FISH kantitatif ve duyarlıdır. Kantitatif RT-PCR ise rezidüel hastalık ya da kemik iliği transplantasyonu sonrası nüks olan hastaların takibi için uygun olan yöntemdir²¹.

2.1.8. Tanı

Klinik ve laboratuvar bulguları ile KML'den şüphelenildiği durumlarda tanı periferik kan yayması ve kemik iliğinin incelenmesine dayanır. Splenomegali, periferik kanda granülositik lökositöz, kemik iliğinde myeloid hiperplazi ve LAP skorunda düşüklük gibi bulgular KML lehine olmakla birlikte kesin tanı için yeterli değildir. Karyotip analizi yoluyla Ph kromozomunun ya da moleküler yöntemlerle BCR/ABL translokasyonun gösterilmesi tanı koydurucudur. KML düşünölen bütün hastalarda tanı

koymak için BCR/ABL translokasyonu varlığı kanıtlanmalıdır²². Sitogenetik analiz veya diğer moleküler yöntemlerle Ph kromozomu ya da BCR/ABL füzyonu gösterilememesi KML tanısından uzaklaştırır.

2.1.9. Ayırıcı Tanı

Kronik myeloid lösemi ayırıcı tanısında öncelikle, enfeksiyon veya neoplazma bağlı lökomoid reaksiyonu düşünmek gerekir. Bakteriyel enfeksiyonlara yanıt olarak ortaya çıkan ve genellikle nötrofilik karakterdeki lökositozdan farklı olarak lökomoid reaksiyonda, hem lökosit sayısı artar hem de periferik kanda immatür hücrelere rastlanır. Myeloid ya da lenfoid tipte ortaya çıkabilen lökomoid reaksiyonun daha sık görülen myeloid tipinde, periferik kanın görünümü lökosit morfolojisi yönünden KML'ye benzer. Özellikle periferik kanda myeloid öncüllerinin izlendiği sola kayma durumlarında lökomoid reaksiyon KML ile karışabilir. Ancak lökomoid reaksiyonda lökosit sayısı genellikle KML'den daha düşüktür. Ayrıca splenomegali, bazofili, eozinofili ve trombositoz gibi bulguların olmayışı lökomoid reaksiyonu destekler. Yüksek LAP skoru ve Ph kromozomu negatifliği de lökomoid reaksiyon lehinedir (Tablo 1).

Tablo 1. KML ile Lökomooid Reaksiyonun Ayırımı²³

Özellik	KML	Lökomooid Reaksiyon
Lökomooid reaksiyon için bilinen neden	Yok	Var
Lökosit sayısı	Sıklıkla $>70 \times 10^9/L$	Genellikle $<70 \times 10^9/L$
Lökosit diferansiyasyonu	Granülosit öncülleri	Genellikle olgun nötrofil, nadir immatür granülositler
LAP skoru	Azalmış	Normal veya artmış
Bazofili	Var	Yok
Splenomegali	Var	Yok

Kemik iliği infiltrasyonu ya da ekstramedüller tümör invazyonu gibi kemik iliğinde yer kaplayan durumlar sonucu oluşan lökoeritroblastik reaksiyon da bazen KML'ye benzer bir tabloya yol açabilir. Lökoeritroblastik tabloda periferik kanda genç myeloid ve eritroid seri elamanları bulunur. Ön planda çekirdekli eritrositler ve gözyaşı hücreleri görülür, eritrositlerde anizositoz ve poikilositoz dikkati çeker. Az sayıda myelosit ve metamyelosit tabloya eşlik eder. Klinik değerlendirme ile ayırıcı tanıya gidilemeyen durumlarda kemik iliği incelemesi yapılmalıdır. KML'nin diğer kronik myeloproliferatif hastalıklardan ayırımı da önem taşır. PRV'de de KML'de olduğu gibi lökositoz, trombositoz, kemik iliği fibrozisi, splenomegali ve serum vitamin B12 düzeyinde yükseklik beklenir. Bununla birlikte artmış eritrosit kitlesi ve yüksek LAP aktivitesi bulunan PRV'de Ph kromozomu negatiftir. ET ayırıcı tanıda düşünülmesi gereken bir diğer kronik myeloproliferatif hastalıktır. Her ne kadar KML'de ET'ye nazaran lökosit sayısı daha yüksek ve trombosit sayısı daha düşük olsa da bazı KML olgularında yüksek trombosit sayısı ve belirgin olmayan bir lökositoz görülebilir. Kemik iliği fibrozisi ve splenomegali ile karakterize bir tablo olan IM'de lökositoz, KML'de olduğu ölçüde çarpıcı değildir. Periferik kan yaymasında; polikromatofili, gözyaşı şeklinde eritrositler ve normoblastlar gibi diseritropoetik bulguların varlığı daha çok IM'yi düşündürür. Kemik iliğinde fibrozisin belirgin olduğu IM'de KML'den farklı olarak LAP skoru artmıştır ve Ph kromozomu negatiftir. Ancak KML seyri esnasında da kemik iliği fibrozisi görülmesi seyrek değildir. Bu nedenle kronik myeloproliferatif hastalık şüphesi olan tüm hastalarda KML ayırıcı tanısı için kemik iliği incelemesi ile sitogenetik veya moleküler testlerin yapılması önerilmektedir. Myelodisplastik sendromlar içinde değerlendirilen Kronik Myelomonositik Lösemi (KMML), lökositoz ve splenomegali yönünden KML ile karışabilir. Daha çok ileri yaşlarda görülen bu

hastalıkta periferik kanda myeloid hücrelerin yanı sıra monositler dikkati çeker. KML'den farklı olarak bazofili ve Ph kromozomu yoktur.

2.1.10. Prognoz

Kronik myeloid lösemili hastaların klinik gidişi ve prognozu değişkendir. İmatinib mesilat tedavisinden önce ölüm, tanıdan sonraki 2 yıl içinde hastaların % 10'unda, sonraki her yıl için de yaklaşık % 20'sinde beklenirdi ve ortalama sağkalım süresi 4 yıl idi. Bu nedenle KML'de farklı risk gruplarını tanımlayan birkaç prognostik model geliştirilmiştir. En yaygın kullanılan evreleme sistemleri prognostik faktörlerin çok değişkenli analizlerinden kaynaklanır. Konvansiyonel kemoterapi uygulanan hastalar temel alınarak hazırlanmış olan *Sokal* indeksinde; dolaşımdaki blast yüzdesi, dalak boyutu, trombosit sayısı, sitogenetik klonal değişim ve hastanın yaşı en önemli prognostik faktörlerdir²⁴. İnterferon-alfa tedavisi alan hastalara dayanılarak geliştirilen *Hasford* sisteminde ise; yaş, dalak boyutu, dolaşımdaki blast yüzdesi, trombosit sayısı ile eozinofil ve bazofil yüzdeleri en önemli prognostik faktörler olarak tanımlanmıştır. *Sokal* indeksinden farklı olarak bu sistemde sitogenetik değişim göz ardı edilmiş, bunun yerine eozinofil ve bazofil yüzdeleri risk skorlamasına ilave edilmiştir. İnterferon-alfa tedavisi alan hastalara uygulandığı zaman *Hasford* sistemi, *Sokal* indeksine göre sağ kalım süresini öngörmede daha başarılı bulunmuştur (Tablo 2). Ancak *Hasford* sistemi, kemik iliği ya da kök hücre nakli yapılan hastalar için henüz geçerli değildir²⁵. Bununla birlikte ilk sonuçlar, bu sistemin imatinib tedavisi alan hastalar için uygulanabilir olduğunu düşündürmektedir. Tura'nın ve Kantarjiyan'ın prognostik modellerinde; yaş ≥ 60 , kot kenarını aşan dalak ≥ 10 cm, kandaki blast oranı ≥ 3 veya kemik iliğindeki blast oranı ≥ 5 , kandaki bazofil oranı ≥ 7 veya kemik iliğindeki bazofil oranı ≥ 3 , trombosit sayısı $\geq 700.000/\text{mm}^3$ ya da akselere döneme ait karakteristik bulgulardan herhangi birinin varlığı negatif prognostik faktörlerdir ve bunların sayısına göre hastalar gruplandırılır. Bu olumsuz faktörlerin varlığında kısa dönemli prognoz çok kötüdür ve ilk yılda ölüm oranı 3 kat yüksektir. Tedaviye sitogenetik yanıt alınması ve buna bağlı olarak sağ kalım süresinde tatmin edici bir uzama sağlanması, hastalığın başlangıcındaki risk kategorisiyle önemli ölçüde ilişkilidir. Özellikle *Sokal* risk skoru kullanılarak, kısa sürede sitogenetik yanıt elde edilen hastalarda uzun bir süre için sağ kalım ihtimalinin yüksek olduğu öngörülebilir²⁴.

Tablo 2. KML’de Prognozu Belirlemede Kullanılan Risk Skorları^{24, 25}

Sokal indeksi (24): SI= EXP [0.0116 (yaş-43.4) +0.0345 (dalak büyüklüğü*- 7.51) +0.188 (trombosit sayısı/700) 2 - 0.563) +0.0887 (pereiferik blast yüzdesi - 2.10)] *kot altı uzunluk (cm)
Yeni skarlama sistemi (Hasford) (25): Yeni skor: (0.6666 x yaş [eğer yaş< 50, 0; aksi halde 1] +0.420 x dalak büyüklüğü [cm kot altı] +0.0584 x blast [%] +0.0413 x eozinofil [%] +0.2039 x bazofil eğer bazofil < 3% , 0; aksi halde 1] +1.0956 x trombosit sayısı [eğer trombositler<1500 x 10 ⁹ /L, 0; aksi halde 1]) x 1000 Düşük risk <780; Orta risk 781 - 1479; Yüksek risk ≥1480

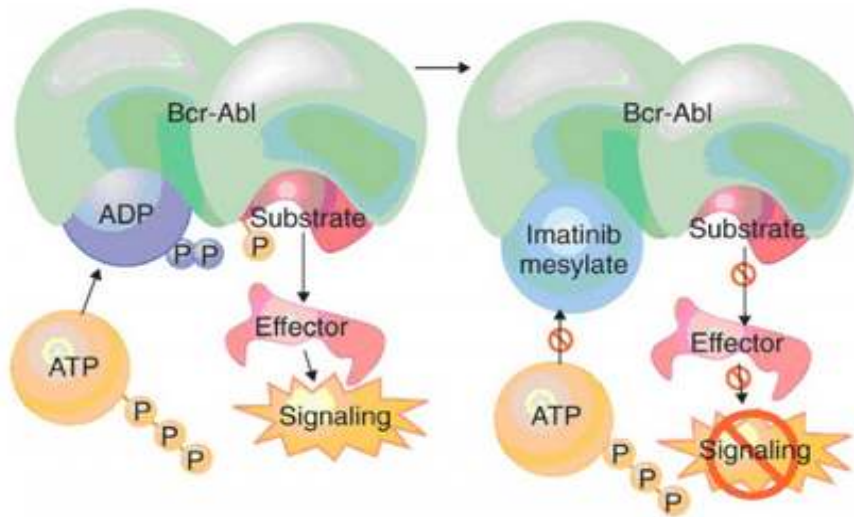
2.1.11. Tedavi

Hiperürisemi ve hiperürikozüri KML’nin tanı ve relaps durumlarında sık rastlanılan bulgulardır. Aşırı hücre yıkımı öngören durumlar varlığında (yüksek lökosit sayısı, belirgin splenomegali) kemoterapi öncesi 300 mg/gün allopurinol ve uygun hidrasyon sağlanmalıdır. Allopurinol allerjik deri reaksiyonları ile ilişkili olduğundan, yüksek lökosit sayısı ve dalak büyüklüğü ortadan kalkınca ilaç kesilmelidir. Şiddetli hiperürisemi durumunda ise sodyum bikarbonat ve idrar alkalinizasyonu ve ürik asiti allantoina dönüştüren rekombinant bir ürikaz olan rasburikaz kullanılabilir.

Kronik myeloid lösemi tedavisi, geçmişte allojenik kök hücre transplantasyonu, interferon temelli rejimler ve hidroksiüre, busulfan gibi diğer konvansiyonel kemoterapiler şeklinde iken, bir BCR/ABL tirozin kinaz inhibitörü olan imatinib mesilatın kullanıma girmesi ile tamamen değişim göstermiştir.

Günümüzde imatinib, kronik fazdaki tüm KML olgularının başlangıç sitoredüktif tedavisidir. Beyaz küre sayılarının çok belirgin olduğu vakalarda imatinib öncesinde veya eş zamanlı olarak hidroksiüre kullanılabilir. Hiperlökositik sendrom belirtileri nedeniyle hızlı sitoredüksiyon gerekli ise hidroksiüre lökoferez ile kombine edilebilir. Lökoferez KML’yi geçici bir süre kontrol altında tutabilmektedir. Bu nedenle sadece iki endikasyonu mevcuttur. Bunlardan birisi, stupor, hipoksi, tinnitus, papilla ödemi, priapizm gibi lökostaz bulguları olan ve hızlı sitoredüksiyon ile geri dönüşümü olabilecek hiperlökositik hastalardır. Diğeri ise, kemoterapinin fetüs için yüksek riskler ortaya koyduğu gebeliğin ilk aylarındaki hastalardır. Gebe olmayan hiperlökositik hastalarda lökoferezin hidroksiüre ile birlikte kullanılması başarıyı yükseltir. İmatinib mesilat başlandıktan sonra halen belirgin trombositopenisi olan hastaların tedavisine anagrelide eklenebilir.

BCR/ABL tirozin kinaz aktivitesinin inhibisyonu KML hücrelerini de inhibe edecektir. İmatinib ilk kez 1998 yılında, o dönemdeki ismi ile STI571 olarak klinik çalışmalarda yer almış bir 2-fenilaminopirimidin derivatıdır²⁶. İmatinibin BCR/ABL ilişkili abelson tirozin kinazla bağlanması fosforilasyonu engelleyerek aktivasyonu ortadan kaldırır (Şekil 2). Diğer bir deyişle imatinib BCR/ABL'nin selektif inhibitörüdür. 2001 yılında FDA onayı alan imatinib, günümüzde KML'nin standart başlangıç tedavisidir. Yapılan çalışmalarda imatinib genel olarak, daha önce IFN ile tedavi edilen hastalarda % 55 majör sitogenetik yanıt (MSY) ve yeni tanı alan hastalarda % 74 tam sitogenetik yanıt (TSY) göstermiştir. Eldeki veriler IFN ile kıyaslandığında, imatinib için uzun dönem tolerabilite ve ortalama sürvinin çok daha yüksek olacağını düşündürmektedir. IRIS isimli (Randomized study of IFN and STI571) çalışmada yeni tanı almış 1106 KML hastası standart doz olan 400 mg/gün imatinib veya IFN ile birlikte düşük doz sitarabin kollarından birisine randomize edildi. Kollar arasında geçişe olanak sağlandı. 18 ay sonra yapılan değerlendirmede, imatinib kolunda tam sitogenetik yanıt % 76 olurken, IFN artı sitarabin kolunda % 14,5 olarak saptandı. Takip sırasında IFN intoleransı nedeniyle birçok hasta tedavi kolunu değiştirdi. İmatinib koluna transfer olan hastaların çokluğu nedeniyle her iki kol arasında sürvi farkı gösterilmesi mümkün olmadı. IRIS çalışmasında 60 aylık izlem sonunda imatinib alan hastalarda % 98 tam hematolojik yanıt (THY), % 92 MSY, % 87 TSY saptanmıştır²⁷.



Şekil 2. İmatinib aracılı BCR/ABL inhibisyon mekanizması²⁸

İmatinib yapılan çalışmalar sonucunda yeni tanı almış KML hastalarının tedavisinde ilk seçenek olmuřtur²⁹. İmatinib tedavisi ile varyant Ph kromozom translokasyonu olan hastaların prognozu, klasik Ph kromozom translokasyonu olanlar ile benzerdir. Yaşlı ve genç hastalar tedavi yanıtı açısından değerlendirildiğinde, kronik fazdaki hastalarda yaşın tedavi yanıtını etkilemediği gözlemlenmiştir.

İmatinib, başta IFN olmak üzere diğer KML tedavi seçenekleri ile kıyaslandığında çok daha iyi tolere edilmektedir. İmatinib ile sık karşılaşılan sorunlar arasında süperfisiyal ödem, bulantı, kas krampları, döküntü, halsizlik ve diyare sayılabilir. Transaminaz yüksekliği ve ondan daha sık görülen myelosüpresyon ise önemli yan etkileridir. Bunlardan myelosüpresyon, yeni tanı almış hastalardan ziyade IFN'ye refrakter hastalar için ciddi sıkıntı oluşturabilir. İmatinib ile periorbital ödem nadir olgularda bildirilmiştir. İmatinib için potansiyel teratojenite mevcuttur. İmatinibe bağlı deri reaksiyonları % 7-21 hastada izlenmektedir ve genellikle hafif seyirlidir. Kısa süre ile tedaviye ara verip, daha sonra yavaş ve kademeli olarak doz artırımı yapıldığında döküntülerin çoğu tekrarlamamaktadır.

Kronik myeloid lösemi hücre infiltrasyonuna bağlı sweet sendromu olguları rapor edilmiştir. Gastrointestinal stromal tümör nedeniyle imatinib tedavisi alan hastalarda çok ender rastlanan bir yan etki olan kemik iliği süpresyonu, malign klonun hematopoiezin çok büyük bir kısmını oluşturduğu KML hastalarında sık görölmektedir. Kemik iliği süpresyonu gelişen bu hastalarda 300 mg/gün ve altındaki dozları uygulamadan önce, kan sayımları düzelinceye kadar ilaca ara verilir. Nötropeni durumunda granülosit koloni stimölan faktör (G-CSF) ve granülosit makrofaj koloni stimölan faktör (GM-CSF) gibi büyüme faktörleri, trombositopeni varlığında ise interlökin-11 (IL-11) ve trombosit transfüzyonları kullanılabilir. İmatinib ile myelosüpresyon gelişmesi sitogenetik yanıtın elde edilmesine olumsuz etki eden bağımsız bir risk faktörüdür. KML'de imatinib kullanımı ile kemik iliğindeki fibroziste azalma, VEGF sekresyonunda azalma ve kemik iliği anjiyogenezinde azalma görölmüştür.

İmatinibe olan yanıtın tanımlanmasında THY, lökosit sayısının $<10 \times 10^9/L$ olması, platelet sayısının $<450.000 \times 10^9/L$ olması, kanda immatür myeloid hücrelerin bulunmaması ve splenomegali dahil lösemi ilişkili tüm lösemi bulgularının ortadan kalkması anlamına gelirken, TSY, standart sitogenetik inceleme ile Ph kromozomu

pozitif hücrelerin bulunmamasını ifade eder. MSY, kemik iliği hücrelerinin sitogenetik analizinde Ph kromozomu pozitif hücrelerin % 35'den az olması anlamına gelir. Majör moleküler yanıt, BCR-ABL/ABL değerinin <% 0.05 olması iken, tam moleküler yanıt ise, RT-PCR ile BCR/ABL'nin saptanamamasıdır.

Üç aylık bir tedavide en azından minör sitogenetik remisyon göstermeyen ya da nötropeni gelişen hastalar yanıtı olarak kabul edilir. Yeterli imatinib yanıtı 3 ay içinde tüm kan sayımlarının normalizasyonu (tam hematolojik yanıt) ve 18 aya kadar tam sitogenetik yanıtın (30 metafaza kadar olan incelemede Ph kromozomu pozitif hücrelerin bulunmaması) elde edilmesi demektir. Potansiyel yanıt kavramı ise 6 aya kadar minör sitogenetik yanıt (% 35'den az Ph kromozomu pozitif metafaz), ya da 12 aya kadar majör sitogenetik yanıt (% 65'den fazla Ph kromozomu negatif metafaz) elde edilmesinin karşılığıdır. 6 aylık tedavi sonrası % 100 Ph kromozomu pozitif hastalığı olanlara allojenik kök hücre naklinin önerilmesi uygun olabilir.

Tam hematolojik yanıtın veya sitogenetik yanıtın kaybı; 3 aylık bir süre zarfında Ph kromozomu pozitif metafaz oranında % 30'dan daha fazla bir artma gözlenmesi, yeni sitogenetik anormalliklerin ortaya çıkması veya seri RT-PCR testinde BCR-ABL/ABL oranında 1 logaritma veya daha fazla artış olması tedaviye yanıtın kaybı anlamına gelir.

Tam moleküler remisyon veya uzamış sitogenetik remisyon elde edildikten sonra imatinib tedavisinin ne zaman kesileceğine dair yeterli veri yoktur. Zorunlu bir durum olmadıkça tedavinin kesintisiz olarak devam etmesi önerilir.

Kronik myeloid lösemi tedavisinde ilk seçim ilaç ve ilk tirozin kinaz inhibitörü olan imatinibin ardından dasatinib ve nilotinib gibi yeni ikinci jenerasyon tirozin kinaz inhibitörleri de kullanıma girmiştir. Bu ilaçların Ph kromozomu pozitif ALL olgularında (KML blastik faz lenfoid varyant) etkili olduğu görülmüştür.

İkinci kusak tirozin kinaz inhibitörleri, imatinib kullanan KML hastalarında imatinib tedavisinin etkili olmadığı durumlarda (6 ay sonra MSY, 12 ay sonra TSY, 18 ay sonra 3-log altında yük azalmaması) düşünülür³⁰. Yeni tirozin kinaz inhibitörlerinden nilotinib imatinibden 30 kat daha fazla etkin bir aminoprimidindir. Dasatinib ise imatinibe göre 300 kat daha güçlü bir çift kinaz (Scr/Abl) inhibitörüdür³¹. Ph pozitif KML'li imatinib direnci olan hastalarda 70 mg nilotinib verilerek yapılan bir çalışmada % 90 THY, % 51 MSY, % 40 TSY elde edilmistir³². Dasatinib imatinib dirençli ya da

intoleransı olan 387 kronik faz KML hastasına uygulanmış ve hastaların % 91’inde THY, % 59’unda MSY, % 49’unda TSY elde edilmistir. Yan etki olarak 3.ve 4. derece trombositopeni ve nötropeni hastalarda sırasıyla % 48 ve % 49’unda bildirilmistir. Hastalarda non hematolojik toksisitelerinden diyare % 37, başağrısı % 32, yorgunluk % 31 ve plevral effüzyon % 27 oranında gözlemlenmiş³³. 400 mg ve 600 mg imatinibe dirençli hastalarda yapılan randomize çalışmalarda dasatinib 70 mg günde 2 kez kullanımı ile allojenik kök hücre nakli yapılan hastalar karşılaştırıldığında 2 yıllık sağkalım dasatinib alanlarda % 100, allojenik kök hücre nakli yapılanlarda ise % 72 bulunmuş³⁴.

Dasatinib: İmatinib direnci söz konusu olduğunda kullanılmak üzere yeni tirozin kinaz inhibitörleri geliştirilmiştir. Bu amaçla kullanıma giren ikinci kuşak tirozin kinaz inhibitörlerinin ilki, imatinib direnci ya da intoleransı durumunda Türkiye’de de kullanım izni bulunan dasatinib molekülüdür. Dasatinib, c-Kit ve PDGF- β reseptörünü de içeren bazı onkogen kinazlar ile birlikte BCR/ABL kinaz ve Src ailesi kinazlarının (SFKs) aktivitesini inhibe eden güçlü bir tirozin kinaz inhibitörüdür. İnaktif durumdaki BCR/ABL kinaza bağlanan imatinibe karşılık dasatinib; hem aktif hem de inaktif durumdaki ABL kinaza bağlanarak etki gösterdiği için, yapısal olarak imatinib ile çok fazla benzerlik göstermese de 100 ila 300 kat daha yüksek aktiviteye sahiptir. Dasatinibin BCR/ABL kinaz mutasyonlarından, Src ailesi kinazlarını tutan alternatif sinyal yollarının aktivasyonundan ve çoklu ilaç direnç (MDR) geninin aşırı ekspresyonundan kaynaklanan imatinib direncini yenebileceği gösterilmiştir. Klinik çalışmalarda, imatinib direnci bulunan ya da yan etkiler nedeniyle imatinib tedavisini bırakmak zorunda kalan hastaların çoğunda dasatinib tedavisi ile remisyon elde edilmiştir. Oral yolla alınan ve büyük ölçüde karaciğerde metabolize edilen dasatinibin yan etkileri imatinibe benzerdir ve genellikle geri dönüşümlüdür. Genellikle oluşan yan etkiler doz azaltılmasıyla kontrol edilebilir. Gelişebilecek hipokalsemi ve/veya hipofosfatemi hemen her zaman oral tedavi ile düzeltilebilir. Nadiren kalbin elektriksel iletisisteminde gecikme (Q-T mesafesi uzaması gibi) ve myelosüpresyona bağlı ciddi trombositopeni görülebilir³⁵.

Nilotinib: Yeni geliştirilen bir diğer ikinci kuşak tirozin kinaz inhibitörü, yapısal olarak imatinibe benzeyen nilotinib molekülüdür. Nilotinib, imatinibden yaklaşık 30 kat daha güçlü bir imatinib türevidir³⁶. Dasatinib gibi nilotinib de, çeşitli mutasyonlar

sonucu imatinib direnci gelişen hastaların tedavisinde kullanılmaktadır. Bazı mutasyon tiplerinde dasatinib, bazılarında nilotinib molekülünün daha etkili olduğu düşünülmekle birlikte her iki ilacın da T315I mutasyonu olan KML hastalarının tedavisinde etkili olmadığı bilinmektedir. Henüz araştırma aşamasında olan bir takım yeni tirozin kinaz inhibitörleri (bosutinib gibi) bu mutasyona karşı da etkili görünmektedir.

2.1.12. Akselere Faz ve Blastik Faz KML Hastalarının Tedavisi

Bilindiği gibi KML üç klinik fazı (kronik, akselere, blastik) olan bir hastalıktır. Başta imatinib olmak üzere güncel tedavi yöntemleri ile hastaların artık çok az bir kısmı akselere ve blastik fazlara ilerlemektedir. Yine de bu iki faz tüm hastalar için hastalığın son dönemini oluşturur. Bununla birlikte hastaların % 10 kadarının akselere veya blastik faz döneminde tanı aldığı unutulmamalıdır.

Akselere faza ilerleyen hastanın tedavisinin amacı, 60 yaşın altında olan, kontrol edilemeyen, enfeksiyonu ve organ disfonksiyonu olmayan hastaları Allo-SCT'ye hazırlamaktır. Bunun için hastalara Allo-SCT yapılana kadar normal dozdan daha yüksek bir dozda imatinib (400 yerine 600 mg/gün peroral) tedavisine devam edilir. Böylelikle hastalar mümkün olduğunca kronik fazda tutularak Allo-SCT'nin başarı şansı artırılır. Kısa dönem mortalite ve morbidite risklerine rağmen Allo-SCT akselere fazdaki hastalar için küratiftir. Allo-SCT için uygun olmayan hastalar için ise tekrar kronik faza dönme ihtimalleri düşünülerek 600 mg/gün peroral dozunda imatinib tedavisine devam edilmesi önerilmektedir¹⁶.

Akselere fazda tanı alan ve imatinibden fayda görmeyen hastalar ile imatinib tedavisi devam ederken akselere faza ilerleyen hastalar tedaviye dirençli hastalar olarak adlandırılırlar. Akselere faz ve blastik fazdaki bazı hastalarda imatinib ile ancak kısa süreli remisyonlar gözlenmiş ve relaps gelişen bu hastalar incelendiğinde ilaç direncine etki eden mutasyonlar saptanmıştır. T315I mutasyonu imatinib ile hedef bağlanma bölgesi arasında değişikliğe neden olmaktadır³⁷. İşte bu mutasyonun varlığı veya yokluğu dirençli hastalar için tedavi stratejisini belirler. T315I mutasyonu bulunan hastalar tirozin kinaz inhibitörlerinin hiç birisinden fayda görmeyecektir. Bu hastaları için Allo-SCT denenebilir. T315I mutasyonu negatif olan hastalar için ise seçilecek tedavi ikinci kuşak bir tirozin kinaz inhibitörü (dasatinib veya nilotinib) olmalıdır. İmatinibe dirençli olan hastalarda denenmiş olan bu ilaçlara yanıt oranları % 30-40

civarındadır. Yanıt alınması durumunda hastanın Allo-SCT'ye hazırlanması önerilir. Dasatinib imatinibe dirençli olan akselere fazdaki hastalara 70 mg dozda, günde iki kez, imatinibi tolere edemeyen kronik fazdaki hastalara ise 100 mg dozda, günde bir kez verilir. İlacın önemli yan etkileri nötropeni ve plevral efüzyondur. Nilotinib için önerilen doz günde iki kez olmak üzere 400 mg'dir³⁶. İlk göze çarpan yan etkileri ise trombositopeni, nötropeni, bilirubin ve lipaz yüksekliğidir.

Blast krizindeki (blastik faz) ve Allo-SCT için uygun olan hastalar için önerilen tedavi, akselere hastalarda olduğu gibi 600 mg/gün tirozin kinaz inhibitörü (imatinib) kullanımı ve hastanın daha erken bir faza döndürülmesini takiben Allo-SCT'dir. Hasta tanı anında blastik fazda ise idame edilebildiği sürece imatinib ile devam edilmesi uygundur. Blast krizinde olan ve imatinibi tolere edemeyen veya ilaca direnç gösteren hastalar için ikinci jenerasyon bir tirozin kinaz inhibitörü kullanmak ve hastayı kronik faza döndürerek Allo-SCT'ye hazırlamak tavsiye edilmektedir.

2.1.13. Kök Hücre Nakli

Allojenik kemik iliği ya da kök hücre nakli, KML'de kür sağladığı bilinen tek tedavi şeklidir. Bununla birlikte transplantasyon sonrası erken dönemdeki yüksek mortalite riski, uygun verici bulma güçlüğü ve uygulanması için özel tıbbi donanım gerektirmesi nedeniyle bazı güçlükleri barındırmaktadır. Ancak uygun vericisi olan genç hastalarda en seçkin tedavi yöntemidir. Kemik iliği nakli yapılan hastaların analizi, en iyi sonuçların tanının ilk yılı içinde kronik evrede nakil yapılan hastalarda elde edildiğini göstermektedir³⁸. Hastalığın ileri evrelerinde yapılan nakiller kronik evrede yapılanlar kadar başarılı değildir. Allojenik kök hücre nakli, kronik evre KML hastalarının yaklaşık % 70'inde kür sağlayabilir fakat graft-versus-host hastalığı (GVHD) ve fırsatçı enfeksiyonlara bağlı komplikasyonlar ve ölüm riskiyle birlikte³⁹. Hastaların yaklaşık % 20'sinde transplantasyon sonrası hastalık nükseder, bu durumda yapılan verici lökosit infüzyonlarıyla muhtemelen 'graft versus lösemi' etkisiyle ikinci kez remisyon elde etmek mümkündür. Akraba dışı nakillerde transplantasyona bağlı mortalite oranları yükselse de hastaların 2 yıllık nüksüz sağ kalım oranları % 40 civarındadır. Transplantasyon başarısını etkileyen faktörler; hastanın yaşı, hastalığın evresi, kemik iliği donörü (akraba olup olmadığı), hazırlama rejimleri, GVHD gelişimi ve transplantasyon sonrası tedavidir. Öncesinde interferon alfa (IFN- α) tedavisi almış

olanlarda transplantasyon başarısının daha düşük olduğunu bildiren çalışmalar olmasına rağmen bu durum tartışmalıdır. Transplantasyon ile ilişkili mortalite riski, yaş ilerledikçe arttığından dolayı hasta yaşı önemli bir prognostik faktördür. Allojenik kök hücre nakli için üst yaş sınırı 65 olmakla birlikte en iyi sonuçların 40 yaşın altındaki hastalarda alındığı bildirilmektedir. Yaşın yanı sıra hastanın HLA uygun sağlıklı bir vericisinin olması da başarılı bir nakil için önemlidir. Transplantasyon başarısını etkileyen hasta ile ilgili diğer bir faktör ise hastalığın evresidir. En iyi sonuçlar erken kronik evrede elde edilir. Akselere ve blastik fazda yapılan nakillerde sağkalım düşüktür ve relaps sık görülür. İdeal donör adayı homozigot ikiz kardeş olmakla birlikte, Allo-SCT için en uygun verici profili HLA uygunluğu yüksek (tam uyumlu ya da tek lokusta uyumsuzluk olan) akraba donörlerdir. Akraba dışı nakillerde, graft yetersizliği, akut ve kronik GVHD oranları akraba vericilerden yapılan nakillere göre daha yüksektir ve transplantasyon sonrası iyileşme dönemi daha uzundur. Kök hücre kaynağı olarak periferik kanın kullanılması ile verici için daha düşük risk sağlanır ve engraftman daha hızlı oluşur. Akraba olmayan vericilerde yapılan bazı çalışmalarda, periferik kan ve kemik iliği kök hücreleri karşılaştırıldığı zaman hastalıksız sağ kalım ve GVHD yönünden fark olmadığı gösterilmiştir⁴⁰. Transplantasyon öncesi hazırlama rejimleri myeloablasyon amacıyla uygulanır. Bu şekilde hem lösemi hücreleri yok edilir, aynı zamanda da graftın reddini önlemek için immünsüpresyon sağlanmış olur. Sitotoksik hazırlama rejimi için genellikle siklofosfamid ve busulfan kombinasyonu tercih edilir. Busulfana alternatif olarak tüm vücut ışınlaması da kullanılmıştır. Sitotoksik rejimi geliştirme çabaları daha iyi etkinlik yerine toksisiteyi arttırmıştır⁴¹. Transplantasyon sonrası GVHD gelişenlerde nüks sıklığının azaldığı ancak ciddi GVHD görülenlerde buna paralel olarak mortalite riskinin arttığı saptanmıştır. Nüks oranının azalmasının graft versus lösemi (GVL) etkisinden kaynaklandığı ileri sürülmektedir.

Transplantasyon sonrası nüks eden olgularda ek tedaviye gerek duyulmadan, donör lenfosit infüzyonlarıyla (DLI) hematolojik ve sitogenetik remisyon elde edilebilir. Bu durumun immünolojik yolla oluşan GVL etkisiyle olması muhtemeldir. Erken kronik evrede IFN- α tedavisinin etkinliği nedeniyle, transplantasyon sonrası hastalığı nükseden olgularda remisyon sağlamak için ya da ileri evrede transplantasyon yapılmış olan nüks riski yüksek olgularda relapsı önlemek amacıyla IFN- α kullanılmaktadır.

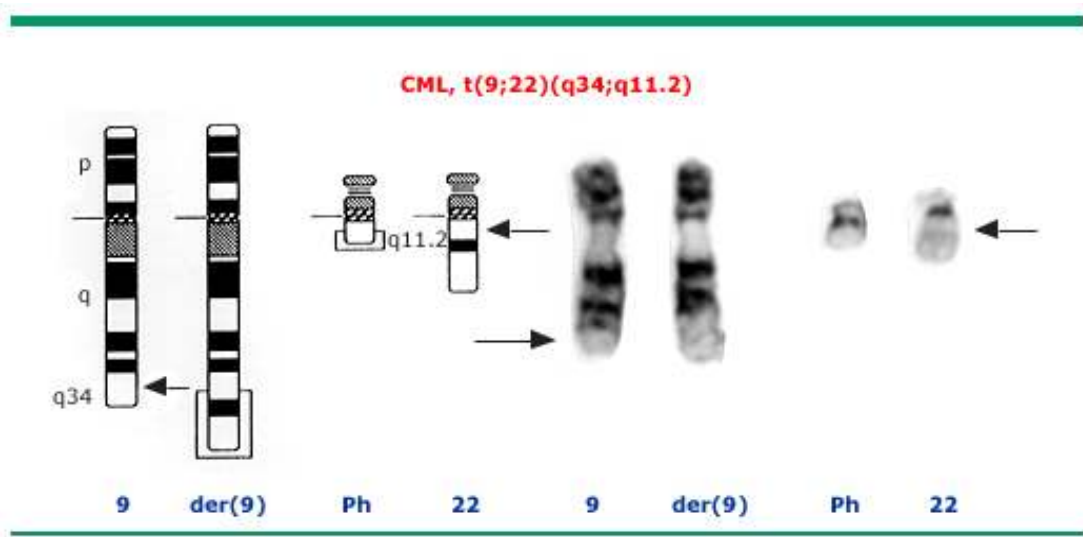
Kord kanı zengin bir hematopoetik kök hücre kaynağıdır ve kemik iliği transplantasyonunda kullanılmıştır⁴². İlk sonuçlar graft versus host hastalığının daha az görüldüğü ve daha hafif şiddetli olduğu bildirilmiştir, bu nedenle daha uyumsuz vericilerden faydalanmaya olanak sağlar⁴³.

Kronik myeloid lösemi hastalarının kemik iliklerindeki primitif kök hücreler Ph pozitif ve Ph negatif olmak üzere iki hücre popülasyonundan meydana gelir. Eğer Ph negatif olan normal kök hücreler ayrılabilirse, bu hücrelerle uygulanan otolog kök hücre naklinin kür sağlama potansiyeli olacaktır. KML hastalarının çoğunda nakil için uygun bir vericinin bulunmaması ve ileri yaşlarda, akraba olmayan vericilerden yapılan nakillerde toksisitenin fazla olması alternatif bir tedavi yaklaşımı olarak otolog kök hücre naklinin geliştirilmesine yol açmıştır. Periferik kök hücre nakli işlemi için genel anestezi gerekmemesi ve engraftmanın daha hızlı olması nedeniyle kök hücre kaynağı olarak periferik kan, kemik iliğinden daha uygundur. Kemoterapi ve G-CSF uygulandıktan sonraki iyileşme döneminde periferik kanda normal hematopoetik kök hücreler artmış sayıda bulunacağından, bu dönemde aferez yöntemiyle hücreler toplanır. Ph pozitif hücrelerin in vitro olarak ayıklanmasının ardından kültür ortamında çoğaltılan Ph negatif kök hücreler, myeloablatif tedavi uygulandıktan sonra hastaya verilir. Bazı vakalarda uzun bir sağ kalıma sahip elde edilebilmesine rağmen, genellikle geçici olarak normal hematopoez sağlandığı düşünülmektedir⁴⁴. Otolog kök hücre nakli uygulanan hastalarda nüks oranı yüksektir. Otolog hücrelerin kullanılmasına rağmen, sitomegalovirus (CMV) enfeksiyonları ve ebstein bar virus (EBV) lenfoproliferatif sendromlarının aktivasyonu gibi şiddetli immün regülasyon bozuklukları ortaya çıkabilir⁴⁵. Otolog kök hücre nakli, allojenik nakil için uygun vericisi olmayan hastalarda geçici kür sağlayabilir. Allo-SCT sonrası relaps durumundaki tedavi seçenekleri ise, birinci ve ikinci jenerasyon tirozin kinaz inhibitörleri ile DLI uygulamasıdır.

2.2. Philadelphia Kromozomu

Kanser ile ilişkisi bulunan ilk kromozom anomalisi Ph kromozomudur. Sitogenetikte uygulanan tekniklerin gelişmesi ile kromozomlarda daha detaylı bant boyama teknikleri sonucu bu iki kromozomdaki kırık noktaları tespit edilerek 9 numaralı kromozomun uzun kolu ile 22 numaralı kromozomun uzun kolu arasındaki

karşılıklı translokasyon olduğu anlaşıldı. Bunun sonucunda küçük bir 22 numaralı kromozom ile daha uzun 9 numaralı kromozom ortaya çıkmaktadır (Şekil 3). Ph kromozomu 5'bcrl ile 3'abl dizilerinin birleşmesiyle oluşan BCR/ABL (22q-) onkogenini taşır. Kromozom 9 üzerindeki diğer translokasyon paterni olan ABL-BCR (9q+) KML hastalarının yaklaşık % 60'ında eksprese edilir ama bunun hiçbir biyolojik fonksiyonu yoktur ve henüz fenotipi bilinmemektedir.



Şekil 3. Philadelphia kromozomu⁴⁶

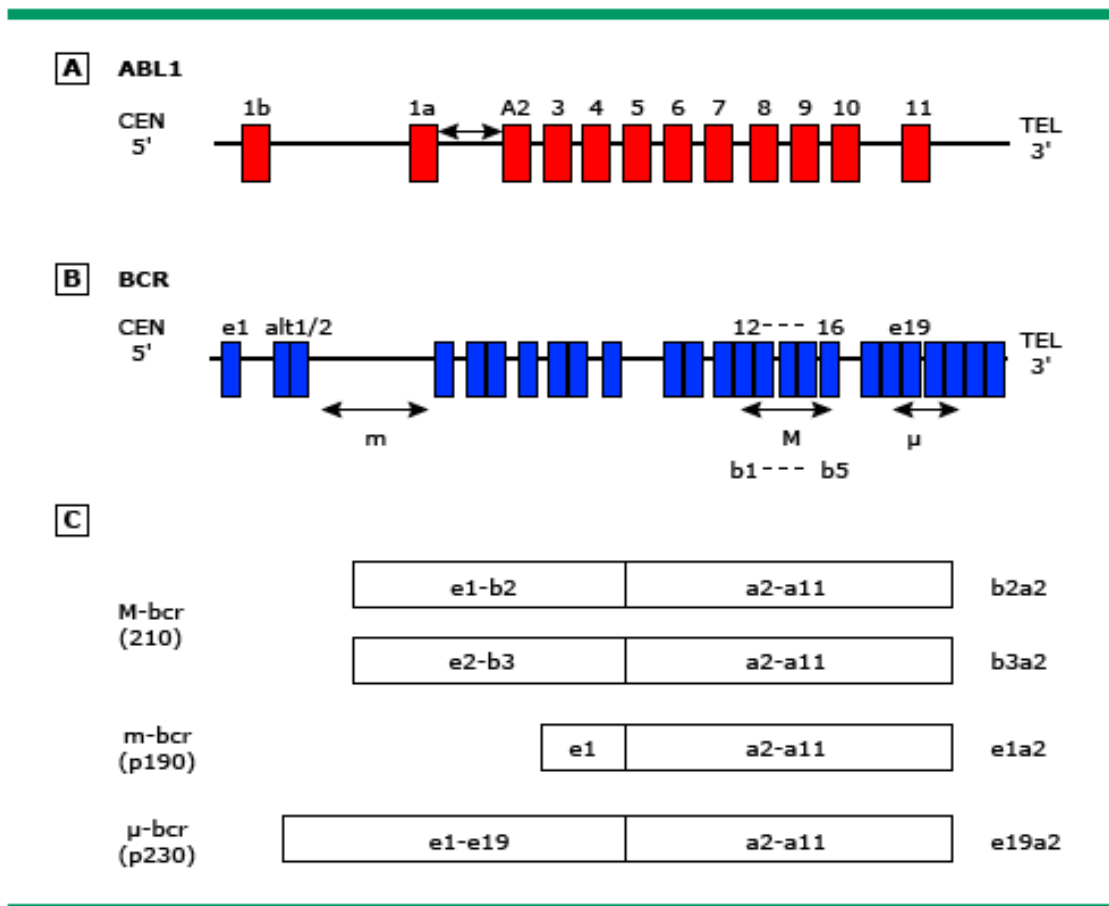
Kronik myeloid lösemiye neden olan faktörler hala bilinmemekle birlikte epidemiyolojik çalışmalar iyonize edici radyasyonun (IR) etken olduğunu göstermişlerdir. Çünkü IR çift zincirli DNA kırıklarına yol açabildiği en iyi bilinen ajanlardan biridir. Kromozom 9 ve 22'nin hücre çekirdeğindeki topografik yerleşimleri de resiprokal translokasyonlarını kolaylaştırmaktadır. İnsan hematopoetik hücrelerinde ABL ve BCR genlerinin konfokal mikroskopisi ve FISH teknikleri ile gösterilmesi sonucu hücre siklusunun S fazından G2 fazına geçişte yanyana geldiklerini göstermiştir. ABL ve BCR genlerinin birleşmelerinin en kritik anının hücre döngüsünün bu periyodu olduğunu düşündürmektedir. 2002 yılında Saglio ve arkadaşları tarafından kromozom 22 üzerindeki BCR genine ve kromozom 9 üzerinde ABL genine çok yakın yerleşimli duplike olmuş büyük genomik segmentler gösterilmiştir⁴⁷. Bu segmentlerin fonksiyonel bir BCR/ABL füzyon geni oluşturmak üzere her iki kromozom arasındaki homolog

rekombinasyonu kolaylaştırdığı düşünülmektedir. KML vakalarının % 90'ından fazlasında, erişkin ALL vakalarının 1/3 ünde ve çocuk ALL ile AML vakalarının % 6'sında t(9;22)(q34.1;q11.7) görülmektedir⁴⁸.

2.2.1. BCR ve ABL Genlerinin Yapısı

ABL geni Abelson murine lösemi virusunda bulunan viral ABL geni ile benzer bir yapı gösterir. 9. kromozom üzerinde bulunan ABL geni, 145 kD ağırlığında bir proteini üretir⁴⁹. ABL proteinleri nonreseptör tirozin kinazlar olup sinyal iletimi ve hücre büyümesinin düzenlenmesinde önemli role sahiptirler. ABL'nin N terminal segmenti üç Src homoloji bölgelerini (SH1, SH2 ve SH3) içerir, bu bölgeler ABL'nin tirozin kinaz fonksiyonunu düzenler. SH1 bölgesi oldukça önemli olup tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. SH2 fonksiyonunun tamamının eksikliğinde fosfotirozin bağlanmasında azalma ve ABL'nin transforme kapasitesinde düşüş görülür. SH3 tirozin kinaz fonksiyonu üzerinde negatif düzenleyici etkiye sahiptir. Myr dizileri ABL proteinin plazma zarı proteinleri ile etkileşimini sağlar. Normal ABL proteini hücre siklusunun düzenlenmesine, genotoksik strese karşı hücrel cevaba ve integrin sinyalizasyonu aracılığıyla hücrel çevre hakkında bilgi iletilmesine karışır. ABL proteini hücrel ölçü birimi gibi kompleks rol sağlayarak çeşitli hücre dışı ve hücre içi kaynaklardan sinyalleri bir bütün olarak toplar, hücre siklusu ve apoptozise gelince kararları etkiler. 22. kromozom üzerinde bulunan BCR geni, sürekli eksprese edilerek 160 kD ağırlığında bir protein üretir (Şekil 4). BCR proteinin NH2 ucundaki ilk ekzon, 14-3-3 protein ailesinin bir üyesi olan Bap-1 proteini ve BCR proteinin kendisini hedefleyen serin treonin kinazı kodlar. BCR'nin N-terminal bölgesinde 'coiledcoil'in vivo ortamda dimerizasyona olanak sağlar. Molekülün merkezi dbl benzeri ve pleckstrin-homoloji bölgelerini içerir. PH bölgesi, Rho guanidin exchange faktörleri üzerindeki guanidin trifosfatın (GTP) guanidin difosfata (GDP) dönüşümünü uyarır. Rho guanidin exchange faktörleri, nükleer faktör kappa beta (NF-kB) gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu sağlayabilir. PH bölgesinden sonra kalsiyum bağımlı lipid bağlanma bölgesi (CaLB) yer alır. C-terminal bölgesi Ras için GTP'az aktivitesine sahiptir ve Ras guanozin trifosfat-aktivatör protein (RAC-GAP) bölgesi olarak geçer. Ras süper ailesinin küçük GTP'azı aktin polimerizasyonunu ve fagositik hücrelerde NADPH oksidase aktivitesinin düzenleyicisidir. BCR birkaç tirozin rezidüsü

üzerinden özellikle tirozin 177 (Y177) 6 üzerinden fosforlanabilir. Y177, Ras yolağının aktivasyonuna karışan önemli adaptör molekül olan growth factor receptor-bound protein 2'ye (Grb-2) bağlanır. İlginç olarak ABL'nin COS1 hücrelerinde BCR'yi fosforile ettiği, bunun sonucunda da BCR kinaz aktivitesinin düştüğü gösterilmiştir. Buna rağmen BCR'nin sinyal iletimindeki rolü tartışmalıdır. BCR $-/-$ farelerin yaşayabildiği ve normal kan üretimine sahip oldukları ancak nötrofil süperoksit üretiminde artış olduğu gözlemlenmiştir⁵⁰.



Şekil 4. BCR ve ABL1 genleri⁵¹

2.2.2. BCR/ABL Füzyon Geni

BCR ve ABL genlerinin özel bölgelerinden kırılması ve birleşmesi sonucu ortaya çıkan BCR/ABL füzyon geni, hematolojik malignitelerle birlikte söz

edilmektedir. ABL'deki kırılma noktaları, ABL geninin üzerinde 300 kb'den uzun olan 5'segmentinin herhangi bir yerinde meydana gelebilir. Kırılma noktaları, sıklıkla ekzon 1b ve ekzon 1a arasındaki intronik dizide, ekzon 1a'nın 3'ucunda yeralan dizide, ya da ekzon 1b'nin 5'ucunda yeralan intronik dizide yer alabilirler. Bu nedenle BCR/ABL füzyon genleri 1b ve 1a ekzonlarını veya tek başına ekzon 1a'yı ya da her iki alternatif ekzonu da bulundurmayaabilir. Füzyon geninin yapısı ne olursa olsun BCR/ABL mRNA'sı 1. ekzonu içermez ve BCR ekzonlarını içeren transkript direkt ABL ekzon a2'ye bağlanır. BCR'deki kırılma noktaları, BCR geninde, başlıca üç tanımlanmış bölgede kırılma noktaları yer alır. KML hastalarının % 95'inde ve ALL hastalarının yaklaşık 1/3'ünde BCR geni 'Majör breakpoint cluster region'(M-bcr) adı verilen 5.8 kb'lık bölgenin içinde kısalmaya uğrar. Bu bölge orjinal adı b1-b5 olan ve günümüzde ise e12-e16 olarak adlandırılan beş ekzondan oluşur. Kırılmaların büyük çoğunluğuya ekzon 13'ün (b2) ya da ekzon 14'ün (b3) 3'bölgelerindeki intronlarda oluşur. Oluşan hibrid transkriptler ya e13a2 (b2a2) ya da e14a2 (b3a2) birleşmesine sahiptirler. Her iki durumda da mRNA 210 kD'lik p210 BCR/ABL füzyon proteinini kodlayan 8,5 kb'lık bir diziden oluşur. KML hastalarının % 99'unda b2a2 ve b3a2 olarak iki tip BCR/ABL bileşkesi gözlenmektedir⁵².

2.2.3. BCR/ABL Füzyon Proteininin Yapısı ve Hastalık Fenotipi

BCR/ABL proteinleri, ABL ekzon 1'in BCR'nin farklı kısımlarıyla yer değiştirdiği füzyon geninden kodlanır. Füzyon geninde yer alan ABL içeriği değişmediğinden hastalık fenotipindeki değişkenlik BCR geni tarafından kodlanan protein dizilerinden kaynaklanmaktadır.

P210 BCR/ABL Ekspresyonu: Klasik tipte KML'nin ilgili olduğu onkoproteindir. Hastalığın kronik fazındaki belirgin özelliği granülositik ve megakaryositik serilerdeki aşırı artıştır. Mekanizması iyi bilinmese de p210 BCR/ABL'nin granülositik farklılaşma ve maturasyonla ilgili hücre sinyal yollarını bozduğudüşünülmektedir. Genede bu bozulma çok ağır değildir. Hücrelerin bir kısmı olgun nötrofiller, eozinofiller ve bazofiller oluşturmak üzere gelişimlerinin son basamaklarına ulaşabilirler. P210 BCR/ABL onkoproteininin e13a2 (b2a2) ve e14a2 (b3a2) bileşkelerini taşıyan iki farklı formu bulunur. Ekzon e14, 75 nükleotid içerir, sonuç olarak e14a2 birleşmesine sahip füzyon geninin kodladığı onkoproteinde fazladan

25 aminoasit bulunur. M-bcr kırılma noktası pozisyonunun hastalık fenotipine etkisinin araştırıldığı ilk çalışmalar sonucunda e13a2 birleşmesine sahip onkoproteinlerin yer aldığı KML tipinde akut fazın daha geç dönemlerde başladığı öne sürüldü. Fakat daha büyük örneklerle yapılan çalışmalar sonucunda, bu görüşün yanlış olduğu ve p210 BCR/ABL'yi kodlayan transkript tipinin herhangi bir prognostik değer taşımadığı gösterilmiştir.

P190 BCR/ABL Ekspresyonu: Sıklıkla ALL'de görülürken belirgin bir monositozun olduğu bazı KML hastalarında da görülebilir. P190 BCR/ABL mRNA'sı e1a2 birleşimini içerir ve proteinin toplam onkojenik potansiyeli yalnızca BCR ekzon e1'den gelen dizilerle sınırlıdır. Bu tip proteinin eksprese olduğu dominant hastalık tipinin ALL olması, myeloid öncüllerinden çok lenfoid öncüllerindeki belirli metabolik yolların seçici olarak bozulması demektir.

P230 BCR/ABL Ekspresyonu: BCR/ABL füzyon proteinlerden en büyüğü olan bu protein, e19a2 birleşmesine sahip mRNA transkriptlerince kodlanır, e19a2 transkriptine sahip hastalarda nadir görülen myeloproliferatif bir hastalık olan nötrofilik KML'ye ait özellikler gözlenmiştir. Nötrofilik KML'yi klasik KML'den ayıran özellikler; daha hafif ve yavaş klinik seyirin olması, daha az splenomegali varlığı, hastalığın blastik transformasyona dönüşümü gecikmiş olmasıdır. Dolaşımdaki baskın lösemik myeloid hücre tipi olgun granülositlerdir. Ayrıca μ -bcr bölgesi kırığının M-bcr'den farklı olduğundan, iyi huylu fenotipten sorumlu olduğu düşünülmektedir. P230 BCR/ABL, BCR'nin peptid dizisinin % 90'ından fazlasını içerir. Sadece C-terminalindeki GAP homoloji bölgesinin 2/3'ünü bulundurmaz. Kalan 1/3'lük kısım fonksiyonel olarak aktiftir ve GAP aktivitesi için gereklidir. Bu onkoproteinini eksprese eden KML öncüllerinin, hem normal hem de transloke BCR alleleri fizyolojik olarak normal GAP aktivitesi gösteren bir protein eksprese edebildiklerinden, granülositik diferansiyonun normal basamaklarından geçebildiği öne sürülmüştür. Bu görüş, p230 BCR/ABL'deki ek BCR dizilerinin diğer iki füzyon proteinine göre daha hafif seyirli bir myeloproliferatif hastalıkla sonuçlanan bir fonksiyona yol açtığı görüşü ile uyumludur⁵³.

Yüksek hassasiyetteki 'Kantitatif Revers Transkriptaz- Polimeraz Zincir Tepkimesi' (RT-PZT) metodu kullanıldığında, hücrelerinde M-bcr kırılma noktası bulunan ve eksprese edilen füzyon proteini p210 BCR/ABL olan hastalarda e1a2

bileşkesine sahip transkriptlerde saptanabilir. Erken dönemlerde, p210 BCR/ABL kodlayan mRNA'ya ek olarak BCR/ABL'nin p190 formunu kodlayan BCR/ABL mRNA'sının bulunması, bu durumun bir şekilde akut faza ya da blast krizine olan ilerlemeyle ilişkili olduğu düşünülmüştür. Sonraki çalışmalarda ise, p190 tipi BCR/ABL mRNA moleküllerinin, tek ve klasik M-bcr kırılma noktası bulunan KML hastalarının % 90'ından fazlasında, hastalığın fazından bağımsız olarak saptanabildiğini ortaya çıkarmıştır. Daha baskın olan p210 BCR/ABL mesajına karşın düşük düzeylerdeki ekspresyonları, e1a2 transkriptlerinin büyük olasılıkla e13a2 ya da e14a2 transkriptlerinden birinin alternatif kesilmesiyle oluştuğunu düşündürür.

2.3. Akım Sitometri

Akım sitometri, hücre veya partiküllerin akmakta olan bir akışkanın içindeyken karakteristiklerinin ölçülmesidir. Akım sitometresi ile bir süspansiyon halindeki hücre ya da partiküller lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilir; hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir. Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özellikleri olabildiği gibi; hücreye bağlanan çeşitli florokromlar da olabilir. Böylece hücre ya da partikülün immun fenotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilir⁵⁴. Ölçüm sırasında hücreler canlı veya sabit olmalıdır, ayrıca sıvı içinde hücreler tek tek askıda olmalıdır. Hücreleri içeren süspansiyon sürekli bir akışla lazer ışını içinden geçmelidir. Her bir hücre lazer ışığının bir kısmını saptırır ve aynı zamanda lazer tarafından uyarıldıklarından yani ekstra enerji yüklenmiş olduğundan, floresan ışığı yayarlar.

Akım sitometri aynı zamanda hücreler arası serbest kalsiyum, zar potansiyeli, Ph veya serbest yağ asitlerindeki hızlı değişiklikleri de izleyebilir. Akım sitometreler; akışkanlar, lazer optikler, elektronik dedektörler, analog dijital çevrimciler ve bilgisayarları içerir. Optik kısım lazer ışığı yayar ve ışını birkaç hücre çapının oluşturduğu demet üzerine odaklar⁵⁵.

Akım sitometrisinin Hematoloji'de en çok kullanıldığı alanlar arasında:

- Lösemik hücrelerin immunfenotiplenmesi
- Hücrenin DNA içeriğinin ve hücre döngüsünün analizi
- Hematopoetik kök hücrelerin sayılması ve alt gruplarının belirlenmesi

- Hücre canlılığının tespit edilmesi, apoptozis ile ilgili araştırmalar
- MDR'nin tespit edilmesi
- Hücresel immün yanıtın belirlenmesi
- Trombosit  alışmaları
- Trombosit ürünlerine bulaşmış lökositlerin sayılması
- Hedef olarak seçilen hücrelerin floresanla işaretilenerek saflaştırılması ve diğer uygulama alanları sayılabilir.

Akım sitometri çalışmaları için periferik kan  rneği, kemik iliği aspirasyon materyali ve biyopsileri, ince iğne aspirasyon materyalleri ve tüm vücut sıvılarındaki hücreler (Bronkoalveolar lavaj (BAL), beyin omurilik sıvısı (BOS) gibi) kullanılabilir⁵⁶.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü Aşamaları

3.1.1. K562 Hücrelerinin Çoğaltılması ve Çalışmada Kullanılacak Hücre Miktarlarının Standardizasyonu

Kryoprezerve olarak temin edilen K562 KML hücre hattı (American Type Cell Culture (ATCC), USA) 37 °C su banyosunda çözöldü. Bu hücreler kryoprezervasyon sonrası adaptasyon için % 10 fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, UK), penisilin-streptomisin (StemCell Technologies, Vancouver, Canada) ve L-glutamin (StemCell Technologies, Vancouver, Canada) içeren RPMI-1640 (HyClone, Thermo Scientific, Utah, ABD) besiyerinde T-75 flask içerisinde % 95 nem % 5 CO₂, 37 °C sıcaklıkta inkübatör (HeraCell, Thermo Scientific, Utah, ABD) içerisinde 5 gün kültüre edilerek çoğaltıldı. Akım sitometrik testin duyarlılık ve özgüllüğünün gösterilebilmesi amacıyla K562 hücre hattında 9 farklı hücre grubu kullanılarak iki yöntem istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Bu amaçla K562 hücre hatlarının artan hücre sayıları kullanıldı. Hücreler kültür sonrası santrifüj edilerek yıkandı ve 9 farklı hücre porsiyonlanarak, akım sitometri ve moleküler genetik laboratuvarına teslim edildi. Her aşamada hücre sayımı ve canlılık analizleri yapıldı. Çalışmanın bu kısmında canlılığın % 99-% 100 olmasına dikkat edildi. Hücre miktarları aşağıdaki gibi düzenlendi.

Çalışma grupları: 1×10^3 , 1×10^4 , 5×10^4 , 7.5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 1.5×10^6 , 2×10^6 .

Tüm doz gruplarında çalışma 3 kez tekrar edildi.

3.1.2. İn Vitro İmatinib ile İnkübasyonu

Çalışma için kullanılan K562 hücre hattı için İmatinib Mesylate (Sigma Aldrich, Germany) IC₅₀ konsantrasyonu 250 nM olarak tespit edildi⁵⁷. İmatinib mesylate için 10 mM DMSO içinde stok solüsyonu hazırlandı ve kullanılacağı zamana kadar -20 °C' de saklandı. Bu aşamadan sonra ilaç etkilerinin ölçölmesi amacıyla bir kontrol grubu ve 5 farklı doz grubu için 6 adet T-25 flask içine ekim yapıldı. Her flask içine başlangıçta toplam 1×10^7 miktarında K562 hücre ekildi. Kontrol gruplarına imatinib eklenmedi. İmatinib konsantrasyonları birinci doz grubu için 50 nM, ikinci doz grubu için 100 nM,

üçüncü doz grubu 250 nM (IC₅₀ değerini temsil edebilmesi amacıyla), dördüncü doz grubu için 500 nM ve beşinci doz grubu için 1000 nM olarak ayarlandı ve her bir grup kendi içinde üç örnek-1, örnek-2 ve örnek-3 olarak düzenlendi (Tablo 3). Gruplara ait flasklar % 95 nem, % 5 CO₂, 37 °C sıcaklıkta inkübatör içerisinde 72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda flasklar moleküler biyoloji ve akım sitometri na teslim edildi. Her bir örnekte 1x10⁶ K562 hücresi olacak şekilde ayarlandı. Bu çalışma üç defa tekrar edildi.

Tablo 3. İmatinib Grupları

İmatinib Grupları	K562 Hücre Miktarları
Kontrol	10x10 ⁶ K562 K-1, K-2, K-3
50 nm İmatinib	10x10 ⁶ K562 50-1, 50-2, 50-3
100 nm İmatinib	10x10 ⁶ K562 100-1, 100-2, 100-3
250 nm İmatinib	10x10 ⁶ K562 250-1, 250-2, 250-3
500 nm İmatinib	10x10 ⁶ K562 500-1, 500-2, 500-3
1000 nm İmatinib	10x10 ⁶ K562 1000-1, 1000-2, 1000-3

3.1.3. Hücre Sayımı

Pasajlar sonrası elde edilen KML hücre hatlarında final hücre süspansiyonu içinden 1 ml örnek alındı ve hücre sayımı ile canlılık analizleri yapıldı. Hücre sayımı için Thoma sayım kamerası kullanıldı ve tüm sayımlar 2 bağımsız kişi tarafından sayılarak ortalaması alındı. Thoma lamının esas 0,1 mm³ hacimde sayım yapılmasıdır. Lamın sayım alanı 0,1 mm yüksekliğinde bir çukur içerisinde bulunmaktadır ve alan cam yüzeyindeki çizgilerle belirlenmiştir. Thoma lamında 16 büyük kare, her büyük karede 25 küçük kare olmak üzere toplam 400 küçük kare vardır. Sayım bu karelerde yapıldı.

Hesaplama

$$\text{mL'deki hücre sayısı} = A \times K \times 10.000$$

A = 16 alanda sayılan hücre sayısı

K = Dilüsyon katsayısı

10.000 = 0,1 mm³'deki sayım sonucunu 1 mL'deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanılan bir değişmezdir.

3.1.4. Canlılık Analizleri

Phosphate Buffered Solution (PBS, Sigma Aldrich, Germany) veya Hank's Balance Salt Solution (HBSS, HyClone, Utah, USA) içinde hücre süspansiyonu hazırlandı. 100 µL % 0.4'lük trypan blue solüsyonu (Sigma), 40 µL PBS ya da HBSS ve 40 µL hücre süspansiyonu eppendorf tüpe aktarıldı ve 5-10 dakika beklendikten sonra hazırlanan solüsyondan 10'ar µL örnek alındı, thoma lamında 2 ayrı bölgeye aktarıldı ve ışık mikroskopunda (Olympus, BX51, Tokyo, Japan) incelenerek hücre sayımı yapıldı. Boya almayan hücreler canlı, mavi boyanan hücreler ölü olarak değerlendirildi.

Canlı hücrelerin miktarı aşağıdaki formül yardımıyla hesaplandı:

$$\text{Canlılık (\%)} = \text{Canlı hücre} / \text{Total hücre} \times 100$$

3.2. BCR/ABL Moleküler Çalışması

3.2.1. Hücrelerden RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Elde edilen hücrelerin üzerine 200 µl fosfat tampon serumu (PBS) eklendi. RNA izolasyonu için filtre-kolon yöntemi ve High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) kullanıldı. İzolasyonun son aşamasında 50 µl elüsyon tamponu (Elution Buffer) eklenerek RNA elde edildi. Her bir örnekteki RNA miktarı NANODROP 2000 UV spektrofotometre (Thermo Scientific, USA) ile ölçülerek not edildi. RT-Dx kiti (Ipsogen, Marseille, France) kullanılarak elde edilen RNA' lardan complementer DNA (cDNA) sentezi yapıldı. Aşağıdaki siklus ve derecelerde Palm Cyclex Genetix Brand Light Cyclex (Genetix Biotech Asia, New Delhi, India) cihazı ile cDNA elde etme işlemi gerçekleştirilmiştir (Tablo 4). Çalışma gerçekleşene kadar örnekler +4 °C'de saklanmıştır

Tablo 4. cDNAnın Palm Cyclex Cihazındaki Döngüsü**

Sıcaklık	Süre
1. aşama 25 °C	10 dakika
2. aşama 50 °C	60 dakika
3. aşama 85 °C	15 dakika
4. aşama 4 °C	Sonsuz

*cDNA: complementer DNA

3.2.2. RT-PCR Aşaması

MBCR-IS MMR kit (Ipsogen, Marseille, France) kullanılarak RT-PCR uygulaması yapıldı. Kit içerisinde IS-MMR kalibratör, yüksek pozitif kontrol, ABL geni için 4 adet kontrol, BCR geni için 5 adet kontrol ve H₂O bulunmaktadır. Standartlar, kopya sayısı belli olan pozitif kontrollerdir. BCR/ABL Mbc IS-MMR Kit ile b3a2 ve b2a2 varyantlarını taşıyan KML hastalarının kemik iliği veya periferik kan örneklerinden izole edilmiş RNA'dan BCR/ABL p210 (Mbc) transkriptinin kantitatif olarak tespit edilmesini sağlar. Kit ile hastada «Majör Moleküler Yanıt (MMR)» varlığı ve «Minimal Rezidüel Hastalık (MRD)» takibi yapılabilmektedir. Kit içerisinde Mbc kopya değerlerinin «Uluslararası Birime (IS)» çevrilmesini sağlayan WHO tarafından kalibre edilen IS RNA Kalibratör bulunmaktadır⁵⁸.

BCR ve kontrol gen ABL için üretici firmanın tariflediği şekilde primer prob ve master mix hazırlandı. Örnek sayısı kadar 0,2 ml'lik ependorf tüpler BCR ve ABL için hazırlanarak soğuk bloğa dizildi ve hazırlanan karışımdan her bir ependorfa dağıtıldı. Her gen ekspresyonunun ölçümü için gene özgü protokolle hazırlanan karışımdan 20 µl çalışma plate'indeki çalışılacak tüm kuyucuklara ilave edilip üzerine 5 µL cDNA'ları eklendi (20µL karışım + 5µL K562 örneği). Daha sonra dikkatlice 72- well rotora RT-PCR cihazına (Rotor- Gene Q, Corbett Research, Australia) yerleştirildi ve çalışmaya başlandı.

3.2.3. Örneklerde BCR-ABL/ABL Değerlerinin Kantitatif Olarak Hesaplanması

Tüm örneklerin ve IS Kalibratörün Normalize Kopya Değerinin (NCN) Hesaplanması

$$NCN = (Mbc_{CN} / ABL_{CN}) \times 100$$

Örnek:

$$NCN_{KONTROL1} = (297132 / 209911) \times 100$$

$$NCN_{KONTROL1} = 141,55$$

$$NCN_{IS\ Kalibratör} = (154 / 85867) \times 100$$

$$NCN_{IS\ Kalibratör} = 0,179$$

Örneklerin Uluslararası Ölçek (IS) Değerinin Hesaplanması

$$IS\text{-}NCN_{\text{ÖRNEK}} = NCN_{\text{ÖRNEK}} \times IS\text{-}Cal \text{ Değeri} / NCN_{\text{Kalibratör}}$$

$$IS\text{-}NCN_{\text{ÖRNEK}} = \text{Hasta BCR/ABL}_{\text{NCN}} \text{ değerinin IS karşılığı}$$

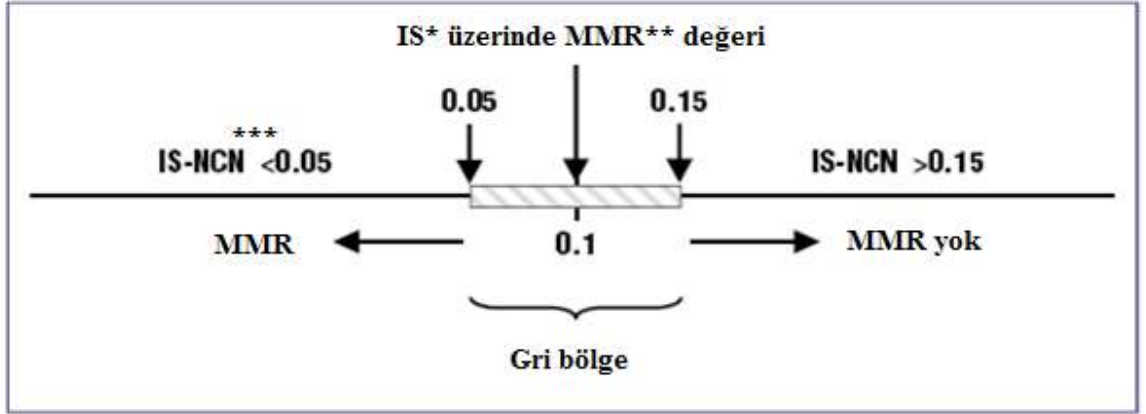
$$NCN_{\text{Örnek}} = \text{Örneğin çalışmada elde edilen BCR/ABL}_{\text{NCN}} \text{ değeri}$$

$$IS\text{-}Cal \text{ Değeri} = IS\text{-}MMR \text{ Kalibratörün setifikalı değeri}$$

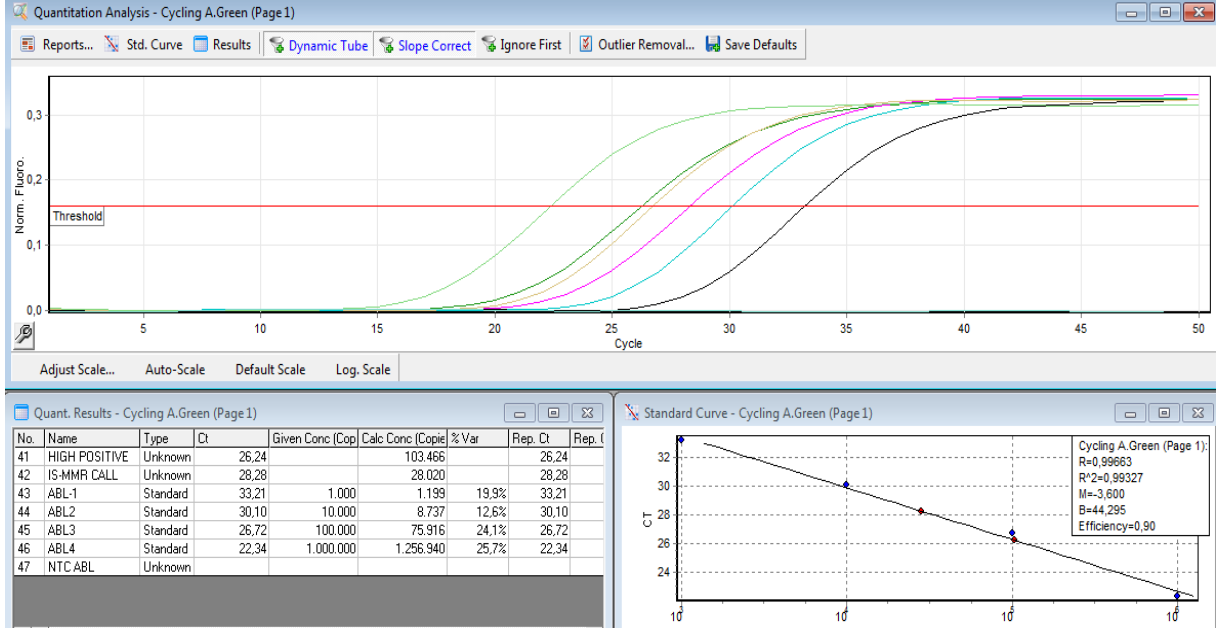
$$NCN_{\text{Kalibratör}} = \text{Çalışmada elde edilen IS-MMR Kalibratörün normalize kopya değeri}$$

$$CN = \text{Kopya sayısı}$$

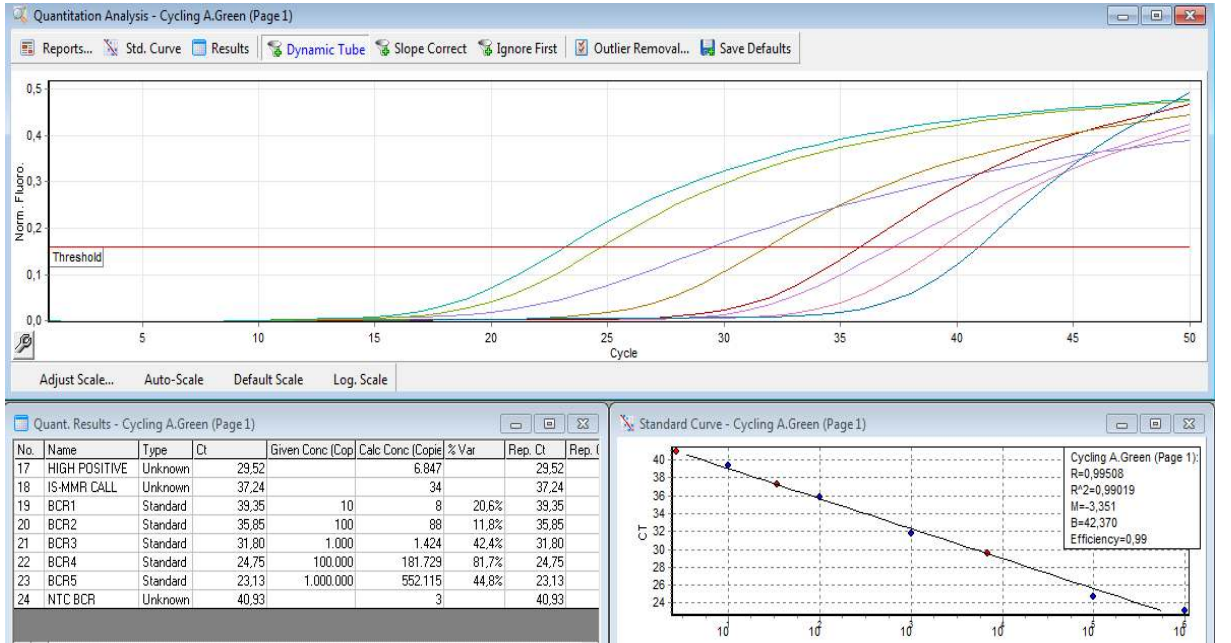
Aşağıdaki Şekil 5'te BCR-ABL/ABL oranının IS' deki sonuçlarının bir önceki sonuca ihtiyaç duyulmadan yorumlanması gösterilmiştir. Şekil 6 ve şekil 7'de ise ABL ve BCR genlerinin standart eğrileri gösterilmiştir.



Şekil 5. BCR-ABL/ABL oranının IS*'deki sonuçlarının bir önceki sonuca ihtiyaç duyulmadan yorumlanması. *IS: uluslararası birim, **MMR: majör moleküler yanıt, ***IS-NCN: uluslararası birim - normalize kopya değeri.



Şekil 6. Negatif kontrol ve kontrol gen ABL'nin 4 farklı (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6) dilüsyonu ile yüksek pozitif kontrol ve IS-MMR kalibratörün RT-PCR eğrileri.

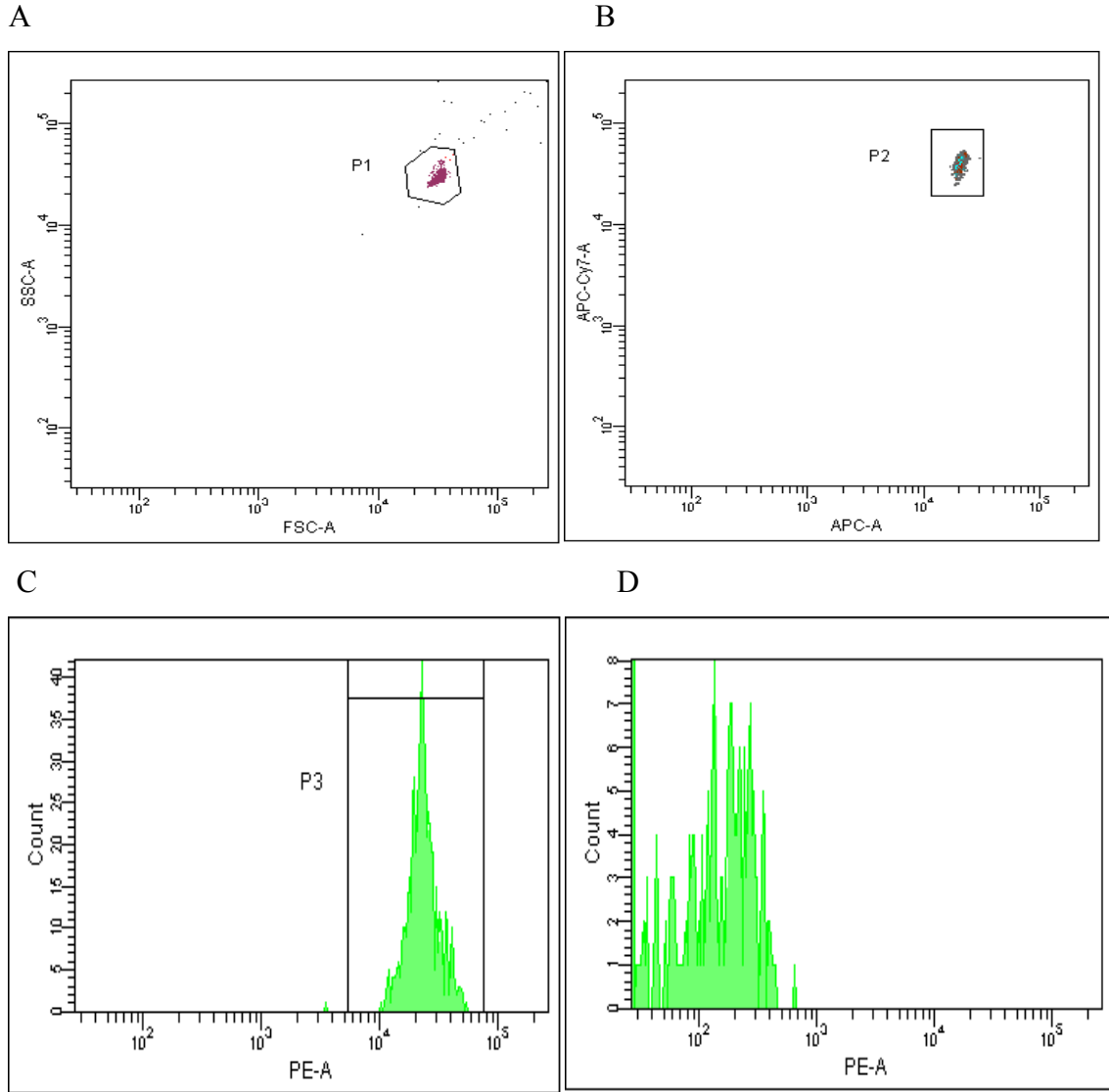


Şekil 7. Negatif kontrol ve BCR' nin 6 farklı (10 - 10^6) dilüsyonu ile yüksek pozitif kontrol ve IS-MMR kalibratörün RT-PCR eğrileri.

Kantitasyon hesaplamalarında en az 3 standart kullanılarak korelasyon eğrisi çizilmiştir. Standart eğrinin slope değeri -2 ile -4,7 aralığında, korelasyon katsayısının (r) değerinin de 0,95 ile 0,999 aralığında olması gereklidir.

3.3. Akım Sitometri Aşaması

Akım sitometri aşaması, immunolojik boncuk yöntemiyle üretici firmanın önerdiği şekilde uygun boncuklar kullanılarak yapıldı. Hücre kültüründen elde edilen hücreler falkon tüplere konup 300 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant dikkatlice atıldı ve % 5'lik FBS içeren PBS ile 500 g'de 5 dakika +4 °C de santrifüj edilerek yıkama yapıldı. Pellet içindeki hücreler resüspanse edilip hücre sayımı yapıldı. Ön çalışma olarak hücre sayıları 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , $1,5 \times 10^6$, 2×10^6 ve $2,5 \times 10^6$ olarak ayarlandı ve çalışılacak hücre sayısı 1×10^6 olarak karar verildi. Beckton-Dickinson BCR/ABL protein kite (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) ait pretreatment A ve pretreatment B solüsyonlarından örnek başına 5' er μL alınıp % 5'lik FBS içeren PBS ile 50 kat seyreltilerek pretreatment tampon hazırlandı. Hücreler 500 g'de 5 dakika +4 °C de santrifüj edildi. Ependorfun içine ayarlanmış sayıda hücre sayısı ve 250 μL taze hazırlanmış pretreatment tampon eklenip buz üstünde 10 dakika inkübe edildi. Süre sonunda % 5'lik FBS içeren PBS ile 500 g' de 5 dakika +4 °C'de santrifüj edilerek yıkama yapıldı. Beckton-Dickinson lizat treatment solusyonundan her örnek için 2 μL alınıp BD pharmingen lizis tampon ile 50 kat seyreltilerek lizis solüsyonu hazırlandı. Hücreler 500 g'de 5 dakika +4 °C'de santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Taze hazırlanmış lizis solusyonundan 100 μL her örneğe eklenip buz üstünde 15 dakika inkübe edildi. Süre sonunda 20.000 g' de 10 dakika +4 °C santrifüj edildi. Bu aşamada süpernatant atılmaz. Süpernatant ependorflara aktarıldı. Cihaza okutacağımız BD tüplerine BCR/ABL protein kite ait 'capture beads' ve 'detector reagent' den ve hücre lizatından 50 μL eklendi. Karanlıkta, oda sıcaklığında ve karıştırarak 2 saat süre ile inkübe edildi. Süre sonunda oda sıcaklığına gelmiş BD sitometrik boncuk dizisi (CBA; Cytometric Bead Array) yıkama tamponundan 1 mL eklenerek 500 g'de 5 dakikada santrifüj edildi. Süpernatant boncuklar bozulmadan dikkatlice atıldı ve 300 μL CBA tampon eklenerek FACS Canto II akım sitometri (Beckton-Dickinson, San Jose, CA, USA) cihazında okuma yapıldı. Yüzde bağlanma (% bağlanma) ve ortalama floresan yoğunluk (MFI) değerleri her bir örnek için not edildi. Analizler FACS DIVA (Beckton-Dickinson, San Jose, CA, USA) yazılımı kullanılarak çözümlendi. Aşağıdaki Şekil 8'de BCR/ABL immunolojik analiz için BD FACS DIVA (Beckton-Dickinson, San Jose, CA, USA) analiz şablonu örneği gösterilmiştir.



Şekil 8. BCR/ABL immunolojik analiz için BD FACS DIVA analiz şablonu örneği. A ve B boncuk seçimi, C pozitif kontrol, D negatif kontrol

3.4. İstatistik

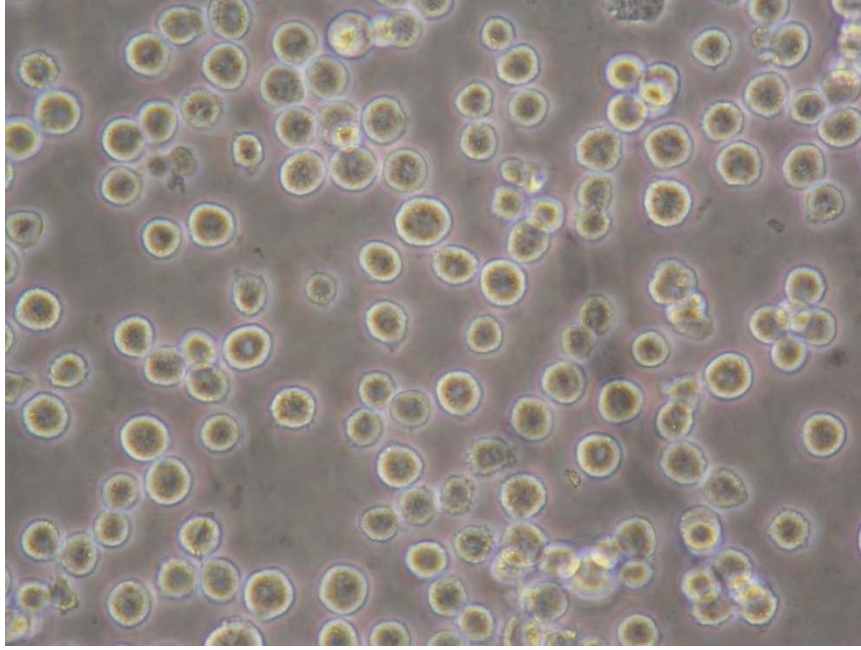
Verilerin istatistiksel analizinde SPSS 17.0 paket programı kullanıldı. Kategorik ölçümler sayı ve yüzde olarak, sürekli ölçümlerse ortalama ve standart sapma (gerekli yerlerde ortanca, minimum ve maksimum) olarak özetlendi. Çalışmamızda iki yöntem karşılaştırdı. BCR/ABL tayininde altın standart olarak kabul edilen RT-PCR yöntemi ile akım sitometrik yöntemler duyarlılık (sensitivite) ve özgüllük (spesifite) değerleri hesaplanarak ve ROC eğrisi altında kalan alan incelenerek değerlendirildi. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi 0.05 ($p < 0,05$) olarak alındı.

4. BULGULAR

4.1. K562 Hücre Hattında BCR/ABL Füzyon Proteininin Gösterilmesinde Akım Sitometrik Yöntemlerin Standardizasyonu ve Moleküler Yöntemle Karşılaştırılması

4.1.1. K562 Kültürü, Hücre Sayımı ve Canlılık Oranları

K562 hücre hatları başarılı şekilde kültüre edildi ve çoğaltılarak çalışma için kullanıldı (Şekil 9). Çalışma iki ayrı aşamadan oluşturuldu. Birinci aşamada 9 farklı dozda hücre süspansiyonu kullanılarak BCR/ABL proteini moleküler ve akım sitometrik yöntemlerle tayin edildi. Hücre sayımları iki bağımsız kişi tarafından yapılarak ortalamaları alındı. Tüm gruplarda canlılık % 99-100 olarak tespit edildi.



Şekil 9. K562 hücrelerinin inverted mikroskopta x20 büyütmede görüntüsü

4.1.2. Moleküler Çalışmanın Sonuçları

RT-PCR ile tüm hücre gruplarında BCR-ABL/ABL oranı pozitif olarak saptandı. Hücre sayısı 1000 olan grupta ABL konsantrasyonu 287 kopya (<5000) saptandığından, bu gruptaki BCR/ABL tespitindeki moleküler hassasiyet düşük kabul

edildi. Diğer gruplarda ise ABL konsantrasyonu analiz yapabilmeye izin verecek ölçüde (>5000) saptandı (Tablo 5).

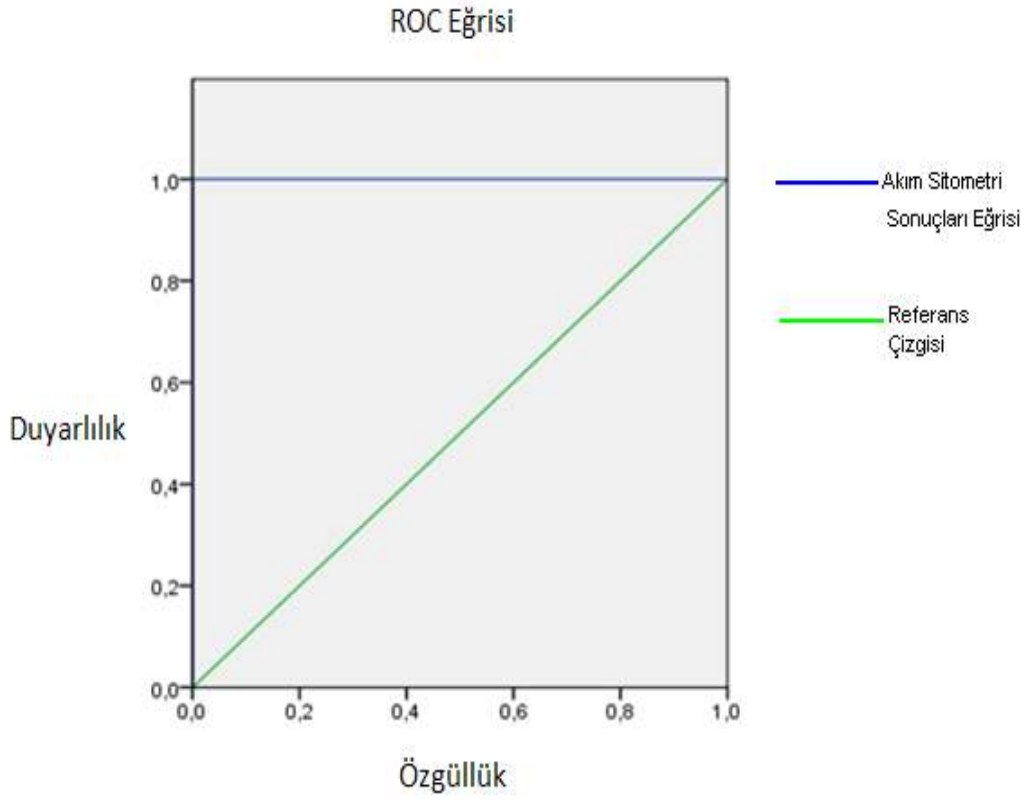
Tablo 5. Tüm K562 Hücre Gruplarında BCR/ABL Gen Kopya Sayısının RT-PCR Sonuçları.**

K562 Hücre Sayısı	BCR-ABL	ABL	NCN* BCR-ABL/ABL	(NCN* BCR-ABL/ABL)x100	IS Değeri	SONUÇ
1.000	95	287	0,331010453	33,1010453	33,580482	Pozitif
10.000	10.715	31.295	0,342386963	34,23869628	34,73461076	Pozitif
50.000	51.322	58.591	0,875936577	87,59365773	88,86236734	Pozitif
75.000	58.253	72.076	0,808216327	80,82163272	81,99225609	Pozitif
100.000	63.126	42.740	1,476977071	147,6977071	149,8369658	Pozitif
500.000	96.502	360.524	0,2676715	26,76715004	27,15484638	Pozitif
1.000.000	197.223	672.184	0,29340327	29,34062697	49,51531814	Pozitif
1.500.000	350.943	650.230	0,539721329	53,9721329	91,08351147	Pozitif
2.000.000	444.063	615.530	0,721431937	72,1431937	121,7490407	Pozitif
Yüksek Pozitif	11.882	66.950	0,177475728	17,74757282	18,00462928	-
IS-MMR CALL	57	53.051	0,001074438	0,107443781	-	-

*NCN: Normalize kopya değeri, **RT-PCR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

4.1.3. Akım Sitometri Sonuçları

Akım sitometrik yöntemler kullanıldığında hücre sayısı 1000 ve 10.000 olan grupta BCR/ABL füzyon proteini tespit edilemedi ve bu gruplarda sonuç negatif kabul edildi. 50.000 ve üzerinde hücre sayılarının bulunduğu gruplarda BCR/ABL proteini pozitif olarak gösterildi. Hücre sayısındaki artış ile birlikte MFI düzeylerinin orantılı olarak arttığı tespit edildi ($p<0.05$). 50.000 hücre ve üzerindeki grupların akım sitometri sonuçlarının RT-PCR ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak özgüllük ve duyarlılığı % 100 olarak bulundu. Tüm gruplar göz önüne alındığında akım sitometrik yöntemler için MFI eşik değeri 797 ve true prelansı (doğru pozitiflik) ise % 100 olarak tespit edildi. Aşağıdaki şekilde (Şekil 10) ROC eğrisinde özetlendiği gibi bulduğumuz eşik değerinin güvenilirliğini göstermektedir. ROC eğrisindeki yeşil çizgi istatistikte referans çizgisi olarak kullanılmaktadır. Bu yeşil eğrinin altında kalan alan % 50'yi temsil etmektedir. Bizim bulduğumuz eğrinin altında kalan alan ise referans çizgiyi geçmekle birlikte % 100 doğru sonucu bulacağımızı göstermektedir. Yani biz K562 hücrelerinde çalışırken 50.000 ve üzerinde K562 hücresi aldığımızda BCR/ABL proteinini pozitif gösterme ihtimalimiz % 100'dür, MFI değeri 797 üstünde olması beklenmektedir.



Şekil 10. Akım sitometri sonuçlarının eşik değerinin ROC eğrisi ile gösterilmesi. Renkli çizgiler olarak gösterilen eğrilerin altındaki alan ölçülerek kesim değerleri hesaplanmıştır. Ortadaki çapraz eğri, alanın %50'sini ifade eden referans eğridir.

Aşağıda tüm gruplara ait akım sitometrik yöntem sonuçları Tablo 6 ve Tablo 7’de, tüm hücre gruplarında BCR-ABL proteinin akım sitometrik yöntem ile gösterilmesi ise Şekil 11’de verilmiştir.

Tablo 6. Tüm Gruplardaki Akım Sitometrik Yöntemle Elde Edilen MFI* Değerleri.

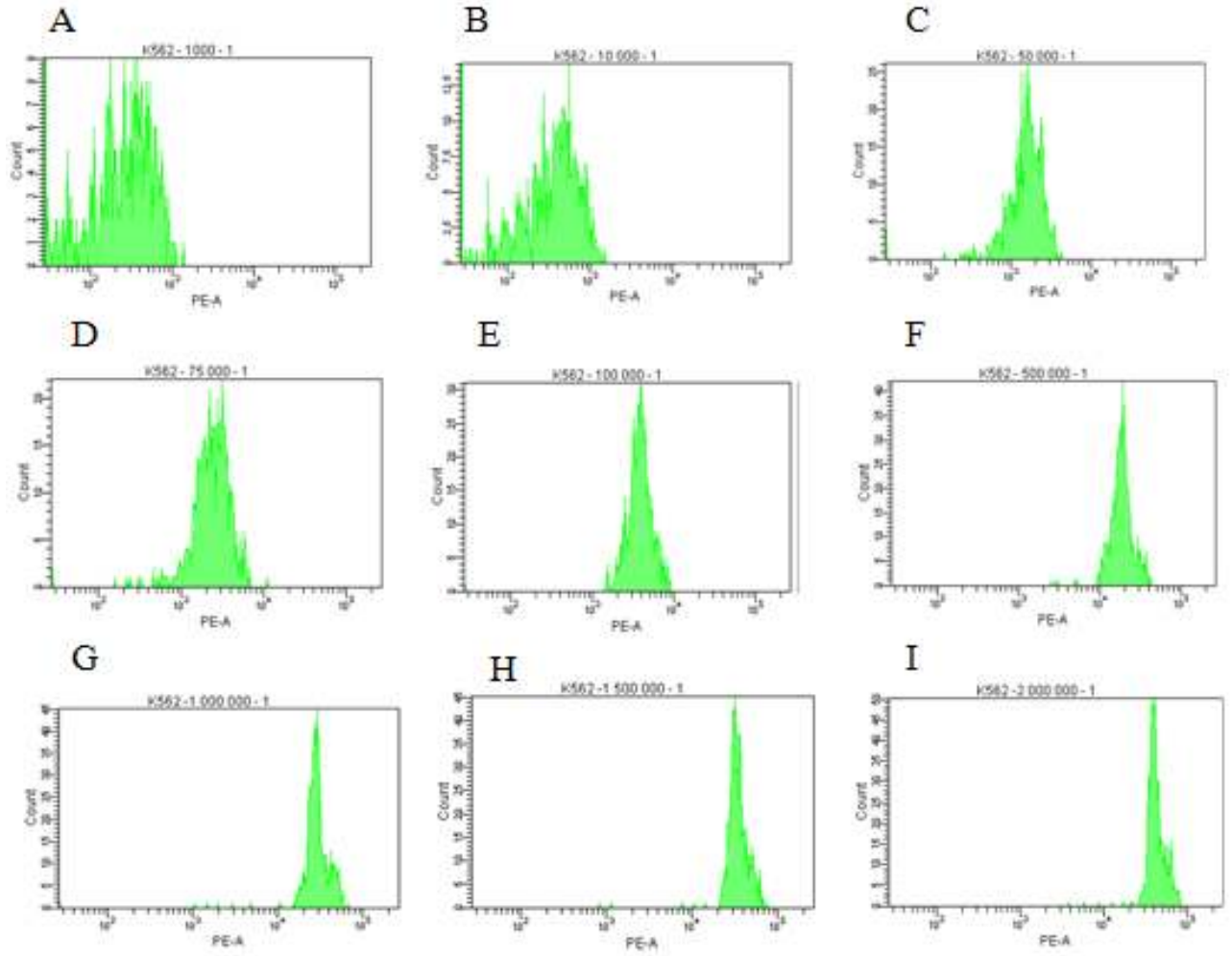
K562 Hücre Sayıları	MFI* değerleri	Sonuç
1000- 1	123	Negatif
1000- 2	132	Negatif
1000- 3	124	Negatif
10.000 - 1	308	Negatif
10.000 - 2	339	Negatif
10.000 - 3	341	Negatif
50.000 - 1	1657	Pozitif
50.000 - 2	1253	Pozitif
50.000 - 3	1681	Pozitif
75.000 - 1	2420	Pozitif
75.000 - 2	2237	Pozitif
75.000 - 3	1923	Pozitif
100.000 - 1	3983	Pozitif
100.000 - 2	6494	Pozitif
100.000 - 3	6022	Pozitif
500.000 - 1	19385	Pozitif
500.000 - 2	23305	Pozitif
500.000 - 3	19074	Pozitif
1.000.000 - 1	30447	Pozitif
1.000.000 - 2	30494	Pozitif
1.000.000 - 3	30749	Pozitif
1.500.000 - 1	36022	Pozitif
1.500.000 - 2	39611	Pozitif
1.500.000 - 3	36267	Pozitif
2.000.000 - 1	43825	Pozitif
2.000.000 - 2	38031	Pozitif
2.000.000 - 3	41949	Pozitif

*MFI: Ortalama floresan yoğunluk

Tablo 7. Tüm Gruplardaki Akım Sitometrik Yöntemlerle Elde Edilen MFI* Değerlerinin İstatistiksel Analizi

Hücre Sayısı	N	Ortalama	Standart Sapma	Ortanca	Minimum	Maksimum
1.000	3	126,3	4,9	124,0	123	132
10.000	3	329,3	18,5	339,0	308	341
50.000	3	1.530,3	240,5	1657,0	1253	1681
75.000	3	2.193,3	251,4	2237,0	1923	2420
100.000	3	5.499,7	1344,5	6022,0	3983	6494
500.000	3	20.588,0	2358,1	19.385,0	19.074	23.305
1.000.000	3	30.563,3	162,5	30.494,0	30.447	30.749
1.500.000	3	37.300,0	2005,1	36.267,0	36.022	39.611
2.000.000	3	41.268,3	2956,4	41.949,0	38.031	43.825
Toplam	27	15.488,7	16.446,6	6.022,0	123	43.825

*MFI: Ortalama floresan yoğunluk



Şekil 11. Tüm hücre gruplarında BCR-ABL proteinin akım sitometrik yöntem ile gösterilmesi. Hücre sayısı 50.000'in altında olan gruplarda (A ve B) negatif, 50.000 ve üzerindeki gruplarda (C, D, E, F, G, H ve I) pozitif olarak analiz edilmiştir.

4.2. İn Vitro İmatinib İnkübasyonu Sonuçları

4.2.1. İmatinib İlaç Konsantrasyonu ve Hücre Canlılığı Sonuçları

Tüm gruplarda her bir alt grup için toplamda 1×10^7 hücre ile çalışmaya başlandı. Kontrol ve diğer gruplarda hücre canlılık analizleri yapıldı. Buna göre; ilaç ile inkübe edilmeyen kontrol gruplarında canlılık % 99-100 olarak tespit edilirken; diğer gruplarda aşağıdaki sonuçlara ulaşıldı:

- 50 nM-1 grubu: % 94
- 50 nM-2 grubu: % 94
- 50 nM-3 grubu: % 94
- 100 nM-1 grubu: % 93
- 100 nM-2 grubu: % 93
- 100 nM-3 grubu: % 93

- 250 nM-1 grubu: % 79
- 250 nM-2 grubu: % 79
- 250 nM-3 grubu: % 79
- 500 nM-1 grubu: % 50
- 500 nM-2 grubu: % 50
- 500 nM-3 grubu: % 50
- 1000 nM-1 grubu: % 36,5
- 1000 nM-2 grubu: % 36,5
- 1000 nM-3 grubu: % 36,5

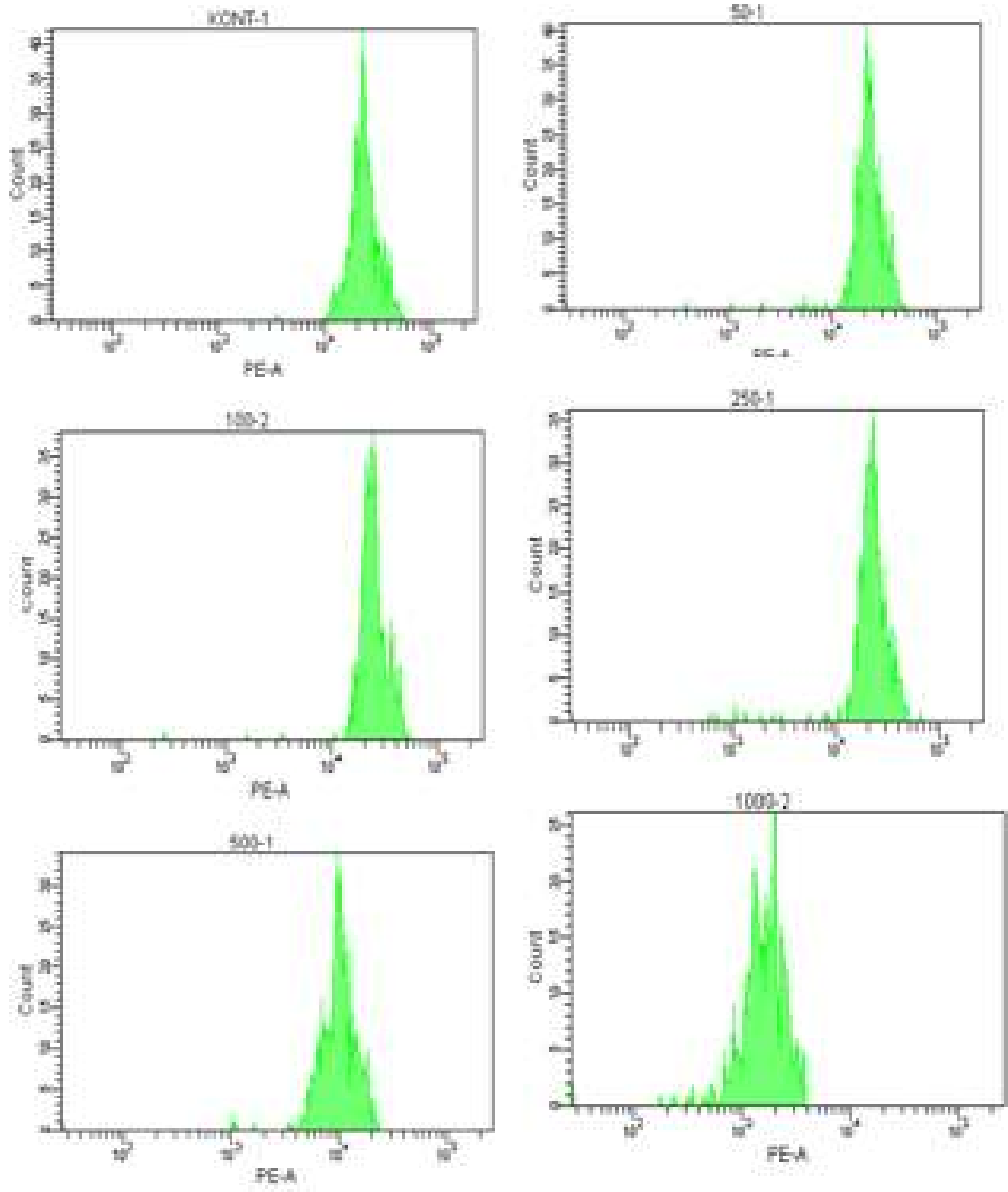
Canlılık sonuçları değerlendirildiğinde; 50 ve 100 nM ilaçla inkübe edilen gruplarda canlılık kontrol grubuna yakın iken, 250 nM ve üzerinde azaldığı izlendi.

4.2.2. Moleküler Çalışma Sonuçları

Tüm gruplarda final 1×10^6 hücre süspansiyonundan önce RNA izolasyonu sonra ise uygun konsantrasyonda RNA ile cDNA sentezi yapıldı. RT-PCR ile tüm hücre gruplarında bcr-abl/abl oranı pozitif olarak saptandı (Tablo 8). Tüm gruplarda BCR-ABL/ABL oranlarının, canlılık sonuçlarından etkilenmediği gösterildi.

4.2.3. Akım Sitometri Sonuçları

Tüm gruplarda hücre sayısı 1×10^6 olarak standardize edildiğinden; akım sitometrik yöntemler kullanıldığında BCR/ABL füzyon proteini pozitif olarak tespit edildi (Şekil 12). Ancak canlılığın düşük olduğu gruplarda, özellikle ilaç dozu 500 ve 1000 nM olan gruplarda, MFI değerlerinin, canlılığın yüksek olduğu gruplara göre daha düşük olduğu tespit edildi (Tablo 8). Bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.001$).



Şekil 12. İmatinib ile kültüre edilen K562 hücre hatlarındaki akım sitometri sonuçları. Bütün grupların sonuçları pozitif bulundu.

Tablo 8. Kontrol ve Farklı Dozlarda İmatinib ile Kültüre Edilen K562 Hücre Hatlarındaki RT-PCR* ve Akım Sitometri Sonuçları

GRUPLAR	BCR-ABL	ABL	NCN BCR-ABL/ABL	(NCN** BCR-ABL/ABL)x100	Uluslararası Ölçüm (IS) Değeri	Moleküler Sonuç	Akım Sitometri BCR/ABL MFI***	Akım Sitometri Sonuçları
K-1	117.068	198.489	0,589795908	58,97959081	63,6740193	Pozitif	24.558	Pozitif
K-2	76.801	164.445	0,46703153	46,70315303	50,42044929	Pozitif	25.557	Pozitif
K-3	197.223	672.184	0,29340627	29,340627	49,51531814	Pozitif	22.017	Pozitif
50-1	85.629	369.130	0,231975185	23,19751849	25,04390451	Pozitif	23.787	Pozitif
50-2	198.139	220.033	0,900496744	90,04967437	97,21709874	Pozitif	34.021	Pozitif
50-3	180.670	282.213	0,640190211	64,01902109	69,11455859	Pozitif	27.586	Pozitif
100-1	227.796	311.203	0,731985232	73,19852315	79,02469501	Pozitif	25.283	Pozitif
100-2	166.534	308.388	0,540014527	54,00145272	58,2996507	Pozitif	25.621	Pozitif
100-3	139.106	374.597	0,371348409	37,13484091	40,09055581	Pozitif	22.848	Pozitif
250-1	173.547	283.769	0,611578432	61,15784318	66,02564774	Pozitif	23.827	Pozitif
250-2	108.718	101.433	1,071820808	107,1820808	115,7131439	Pozitif	21.346	Pozitif
250-3	73.073	105.199	0,694616869	69,4616869	74,99042858	Pozitif	13.805	Pozitif
500-1	84.554	89.500	0,94473743	94,47374302	101,9932972	Pozitif	10.610	Pozitif
500-2	18.969	45.709	0,414994859	41,49948588	44,80260084	Pozitif	11.118	Pozitif
500-3	16.050	44.258	0,362646301	36,26463012	39,15108136	Pozitif	11.989	Pozitif
1000-1	40.851	126.017	0,324170548	32,4170548	21,37464475	Pozitif	1.696	Pozitif
1000-2	53.845	88.838	0,606103244	60,6103244	39,9642768	Pozitif	1.738	Pozitif
1000-3	32.542	93.890	0,346597082	34,6597082	22,85337002	Pozitif	1.234	Pozitif
Yüksek pozitif	3.711	103.466	0,035866855	3,586685481	3,872164547	-	-	-
IS-MMR CAL	34	28.020	0,001213419	0,121341899	-	-	-	-

*RT-PCR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, **NCN: Normalize Kopya Değeri, ***MFI: Ortalama floresan yoğunluk

5. TARTIŞMA

Yirmi birinci yüzyılın biyoloji için özellikle heyecan verici bir dönem olacağı kesindir. Proteinleri, DNA ve RNA'yı incelemeye yarayan yeni yöntemler bilgi patlaması yaratmakta ve bilim adamlarının hücreleri ve makromolekülleri bugüne kadar akla gelmeyen şekillerde incelemesine olanak vermektedir. Teknolojinin klinik pratiğe katkısı pek çok alanda olmuştur ve klinik bilimlerde içinde laboratuvar ile en çok ilişkide olan bilim dalı Hematoloji'dir. Moleküler Hematoloji; genel olarak tanısal süreçte uygulanan metodlardan, tedavinin değerlendirilmesi ve hasta takibine kadar pek çok alanda klinik uygulamalara girmiştir.

Moleküler tekniklerin sıklıkla kullanılmaya başladığı son 20 yılda, hematolojik hastalıklar bu durumdan nasibini almıştır. Hematolojik hastalıkların gerek tanısında ve gerekse takibinde ve tedaviye yanıtların irdelenmesinde PCR bazlı moleküler teknikler rutin olarak kullanılmaktadır.

Kronik myeloid lösemi letal ve klonal bir kök hücre hastalığıdır. KML'nin dünya çapındaki insidansı yüzbinde 1-2'dir. Hastalık genellikle üç fazlı bir seyir gösterir. Başlangıç aşaması kronik faz olarak adlandırılır. Zaman içerisinde akselere faza ve bir terminal blastik kriz fazına ilerler. Vakaların yaklaşık % 90'ına kronik fazda tanı konur. KML, 9 ve 22 kromozomlar arasındaki resiprokal translokasyon ile karakterizedir. Bu translokasyon sonucu kısalmış kromozom 22, Philadelphia (Ph) kromozomu olarak adlandırılır ve Nowell ve Hungerford adlı araştırmacılar tarafından keşfedilmiştir. Ph kromozomu insan kanserleri ile ilişkili ilk özgül genetik değişikliktir. Ph kromozomu KML vakalarının % 90'ından fazlasında bulunmaktadır. Dokuz ve 22. kromozomlar arasındaki dengeli translokasyon 9. kromozomdaki ABL geninin 22. kromozomdaki BCR genine füzyonu ile sonuçlanır. ABL geninin ürünü bir tirozin kinazdır ve aktivitesi sıkı bir şekilde kontrol edilir. ABL, bir non-reseptör tirozin kinaz olup çoğu dokuda eksprese edilir. Hücre içerisinde hem sitoplazmada hem de çekirdekte yer alır ve iki kompartman arasında etkileşim içerisinde. Normal ABL proteini, çeşitli hücre içi ve dışı kaynaklardan gelen sinyallere göre hareket ederek hücre döngüsünü, hücre yapışmasını, programlı hücre ölümlerini, hücrenin büyüme ve çoğalmasını ve ayrıca hücrelerin stres ortamına verdiği yanıtı kontrol eder^{59,60}.

Yirmi ikinci kromozomdaki kırılmalar 5 ila 6 kilobazlık çok sınırlı bir DNA bölgesinde meydana geldiği için kırılma noktalarının yoğunlaştığı bölge 'breakpoint cluster region'anlamında BCR geni olarak isimlendirilir. BCR/ABL füzyon geni ve kodladığı p210 kD proteini KML patogenezinde kritik bir role sahiptir. BCR/ABL füzyon geninden sentezlenen yapısal olarak aktif tirozin kinaz, diferansiasyonu bloklamaz fakat miyeloid seri hücrelerinin proliferasyonunu artırır ve yaşam süresini uzatır. Bu genin ürününün tek başına KML oluşumuna neden olabildiği düşünülmektedir. ABL geni üzerindeki kırılma noktası, 9q34 kromozomunda 300 kb'lık bir bölgenin 5'ucundaki herhangi bir bölgesinde meydana gelebilir. Kırılma noktası Ia, Ib veya daha sıklıkla 2 ekzonun arasındaki bir noktada oluşabilir. Kırılmanın farklı noktalarda oluşması, ABL geninin BCR geni ile translokasyonunda herhangi bir probleme neden olmaz. ABL geninin aksine, BCR geni üzerindeki kırılmalar farklı noktalarda oluşabilir. Birçok KML hastasında ve akut lenfoblastik lösemili (ALL) hastaların 1/3'ünde, kırılma noktası 5,8 kb uzunluğunda olan 12. ve 16. ekzonlar arasında meydana gelmektedir. Bu bölge majör-BCR (M-BCR) olarak adlandırılmaktadır. Kırılmanın bu bölgede meydana gelmesi ile 210 kD moleküler ağırlığında BCR/ABL füzyon proteini kodlayan, b2a2 veya b3a2 genleri oluşur. ALL hastalarının 2/3'ünde ve nadiren KML hastalarında kırılma noktası e2 ekzonunda oluşmakta ve 190 kD moleküler ağırlığında BCR/ABL proteini kodlayan e2a2 geni oluşur. e2 ekzon bölgesinde oluşan kırılma noktası minör-BCR (m-BCR) olarak isimlendirilir. Kırılma noktasının ABL'de sabit, BCR'de ise değişken olması ABL geninin sağlıklı hücreleri değişime uğratarak kanser hücresine dönüşmesini sağlarken, BCR geninin hastalığın fenotipini etkilediği ortaya çıkmıştır. Nitekim bazı ALL hastalarında BCR/ABL füzyon proteininden farklı olarak oluşan TEL/ABL füzyon geninin de lösemiye neden olduğu gösterilmiştir⁵⁹⁻⁶¹.

BCR/ABL gen ürünü; Ras, Jak2, STAT5, fosfatidil inozitol 3 kinaz/AKT ve nükleer faktör-kappa B (NF-kB) gibi stimule edici sinyal yolları ile de ilişkilidir. KML'nin standart tedavi yöntemleri içerisinde allojeneik kök hücre transplantasyonu ve IFN- α tedavileri yer almaktadır. Son yıllarda geliştirilen bir ilaç olan imatinib mesilat (Glivec, Gleevec, STI-571; Novartis, Basel, Switzerland) KML'de önemli bir etkinlik göstermektedir. İmatinibin üretilmesi kanser tedavi mekanizmalarının filozofisini değiştirmiştir. İmatinib bir 2-fenilaminopirimidin bileşiğidir. BCR/ABL, c-ABL,

TEL/ABL, platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF) reseptör tirozin kinaz ve c-kit tirozin kinazların potansiyel inhibitörüdür. Diğer tirozin kinazlarda önemli bir inhibisyon gözlenmez. Özgül terapötik bir ajan olan imatinib, BCR/ABL'nin enzimatik aktivitesini inhibe etmek için tasarlanmıştır. BCR/ABL proteinin tirozin kinaz aktivitesi transformasyon için zorunludur ve bu nedenle ideal bir terapötik hedeftir. İmatinib, ABL kinazın ATP bağlanma bölgesine ATP'nin bağlanmasını yarışmalı olarak bloklayarak BCR/ABL eksprese eden hematopoetik hücrelerin büyüme ve gelişimini engeller ve bu hücrelerde apoptozisi indükler. İmatinib kronik fazda olduğu kadar akselere ve blastik kriz fazında da uzun süreli hematolojik ve sitogenetik remisyona neden olabilmektedir. İmatinib ile yapılan klinik denemeler iyi tolere edilen ve güvenli bir ajan olduğunu göstermektedir. Uzun süreli etkinlik ve toksisite ile ilgili veriler ise henüz çok sınırlıdır.

Rutin sitogenetik analizler KML hastalarının tanısının konulmasında ve tedaviye yanıtlarının değerlendirilmesinde halen altın standart olarak görülmektedir. Yeni tedavi alternatifleri ile birlikte, hastaların pek çoğu tam sitogenetik yanıtı ulaştığı için, minimal rezidüel hastalığı (MRD) tespit etmek için, daha hassas, doğru ve pratik tekniklere ihtiyaç vardır. Moleküler takipte hassasiyeti arttırmak, hastalığın prognozunu anlamada güvenilirlik getirecektir. Moleküler çalışmalar 10^{-6} düzeyine varan artmış bir hassasiyet ile hastalıklı hücre miktarını tespit edebilmektedir. İyi moleküler yanıtlar, iyileşme ile korelasyon göstermektedir. PCR yönteminin standardizasyonu için yapılan çalışmalara rağmen, BCR/ABL sonuçlarının validasyonu mümkün olamamıştır. PCR teknikleri zor, zahmetli, zaman alıcı ve maliyeti yüksek testler olup, yüksek donanım ve teknolojiler gerektirir. Bu çalışmanın amacı KML hücre hattı olan K562' de akım sitometrik teknikleri kullanarak BCR/ABL gen ürünü olan protein miktarını immunolojik boncuklar yöntemi ile göstermek ve mevcut moleküler yöntemle sonuçları karşılaştırmaktır ve verilerin klinik pratiğe uygulanmasında ilk basamağı oluşturması sağlamaktır. BCR/ABL gen ürünü olan proteinin akım sitometri ile tayininin standart kabul gören bir yöntem olup olamayacağını ve hastaların tanı ve tedaviye yanıtlarının değerlendirilmesi konusunda kullanılıp kullanılamayacağı amaçlanmıştır.

RT-PCR yöntemi, son yıllarda BCR/ABL transkriptlerinin izleminde tercih edilen ve hassasiyeti yüksek bir yön tem haline gelmiştir. Bu yöntemde hasta materyalleri arasında, PCR reaksiyonunun verimini etkileyen değişkenler (RNA ve

cDNA kalitesi gibi), bir kontrol gen (ABL, BCR, G6PDH) aracılığı ile normalize edilmektedir. Kantitatif PCR birçok akademik ve ticari laboratuvarlarda yapılmakla beraber standardize değildir ve merkezler arası kalite değişkendir. Hasta materyallerinin kalite ve miktarına dayalı olarak yapılan bu testler de, çalışılan bir örneğin test hassasiyetini gösterecek, standart çalışma materyalleri bulunmamaktadır. Örneğin hastaya ait materyalin laboratuvara nakli sırasında geçen uzun süre ve uygun olmayan taşıma koşulları, degradasyon problemlerine ve buna bağlı olarak da yanlış negatif sonuçlara neden olacaktır. Bir başka problem de halen sonuçların laboratuvarlar arasında karşılaştırılabilir olmamasıdır. 2005 yılında National Institutes of Health (NIH), Bethesda’da yapılan bir toplantıda uygun RNA kalitesi, PCR metodolojisi, revers transkripsiyon ve PCR amplifikasyonunun yeterliliği, normalizasyon için uygun kontrol genleri, standardizasyon, testlerin hassasiyeti ve negatif sonuçların yorumlanması, testin kalite değerlendirmesi, uluslararası referans ve kontrol materyali ve son olarak da sonuçların uluslararası bir ölçek içinde verilmesi konusu görüşülmüştür.

Uluslararası birim (IS) olarak tanımlanan terim, % 0.1 düzeyinde standardize edilmiş majör moleküler yanıt değerine karşı gelen, mutlak BCR/ABL değeridir. BCR/ABL değerlerinin raporlamasında önerilen IS, bugün majör moleküler yanıt tanımlamada kullanılan “standart baseline ” ve log azalması gibi kavramlarından da kurtulmayı amaçlamaktadır. Laboratuvara özgü dönüşüm faktörlerinin dönüşüm faktörü (CF:conversion factor) uygulanması ile IS sistemine geçilmesi mümkündür. Sertifikalı referans materyallerinin yokluğunda, alternatif sistem referans laboratuvar ile perifer lar arasında örnek değişimi şeklinde olabilir⁶²⁻⁶⁷. Türkiye’de ise BCR/ABL gerçek zamanlı kantitatif PCR ile BCR/ABL düzey tayini yapabilen merkezlerin sayısı, ihtiyacın altında kalmaktadır. Bu durum bu hastaların tanı ve MRD takibinde alternatif, güvenilir, hızlı ve standardize bir başka yöntemin geliştirilmesi gerekliliğini doğurmaktadır.

Kronik myeloid lösemide moleküler yanıtın ölçülmesi, hastalığın ilerlemesinin önlemesi açısından yararlı ve duyarlı bir ölçümdür. Sitogenetik yanıt alındıktan sonra ileri değerlendirmeler için de moleküler izlem gereklidir. Yapılan çalışmalar, erken moleküler yanıtların değerlendirilmesinin, uzun soluklu hastalıksız sağ kalım sürelerini arttırdığını göstermektedir. Artan BCR/ABL düzeyleri, hastanın imatinibe dirençli hale geldiğinin ya da ABL mutasyonunu taşıdığıının en erken göstergesidir. Bu sebeple moleküler takip ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde ve zamanında kararlar

verilmesinde de önemli role sahiptir⁶⁸. Son 15 yıl içinde BCR/ABL transkriptlerinin özellikle allojeneik kemik iliği nakli, interferon alfa ve tirozin kinaz inhibitörlerinin kullanıldığı KML'li hastalarda gösterilmesi ve bu transkriptlerin kantitatif olarak tayinleri ile daha ayrıntılı bir takip olanağı doğmuştur.

BCR/ABL transkript sayısının kontrol geni transkript sayısına oranı en sık kullanılan yöntemdir. BCR/ABL transkript sayısının mikrogram RNA'ya oranlanarak verilmesi RNA konsantrasyonunun tayini güvenilirmez olduğu için yanlış sonuçlar verebilir. Uygun bir kontrol geni şu özelliklere sahip olmalıdır: 1) Tanı esnasında tespit edilen BCR/ABL düzeyine yakın bir ekspresyon düzeyi göstermelidir. 2) BCR-ABL'nin stabil olduğu kadar stabilitesi olmalıdır. 3) İlgili geni amplifiye etmek için kullanılan primerler genomik DNA'dan psödogen gibi nonspesifik amplifikasyonlara yol açmamalıdır. RNA stabilitesi hem kontrol geni hem de BCR/ABL için benzer olmalıdır. Örneğin çalışma zamanındaki gecikmeler değişik sonuçlara yol açabilir. BCR/ABL kantitasyonu için araştırılmış ve uygun bulunmuş 3 kontrol geni BCR, ABL ve β -glukuronidazdır. Bunlardan ABL en yaygın kullanılanıdır. Çalışmamızda kontrol geni olarak ABL kullanılmıştır.

Moleküler çalışmada 5-10 ml periferik kan örneği içinde $1-2 \times 10^7$ çekirdekli hücre olması hedeflenir. Hücre ayırımında ficoll kullanımı yerine eritrosit lizisi tercih edilir. Kronik fazdaki hastalarda klinik yanıtın araştırılmasında periferik kan örneklerinin kullanılması uygundur. EDTA kullanımı PCR reaksiyonu için daha uygun olmakla birlikte, RNA ekstraksiyonu öncesi hücrelerin yıkanması heparinli kanın kullanımına da olanak verir. Transkriptlerin degradasyonunun önlenmesi için örnekler 36 saat içinde çalışılmalı, transkript düzeyi az olan vakalarda bu süre 24 saati aşmamalıdır. Bu konu moleküler çalışmalarda pre-analitik dönemde karşılaşılan ve standartizasyonu etkileyen önemli problemlerden biridir.

Kontaminasyonun önlenmesi için 1) Plazmid dilüsyonlarının hazırlandığı alan, 2) RNA ekstraksiyonunun yapıldığı ve PCR "master mix"-line cDNA eklenen çalışma alanları, 3) PCR "master mix" inin hazırlandığı çalışma alanı ve 4) PCR amplifikasyon ve ürünlerin görüntülendiği alanlar birbirinden kesinlikle ayrılmalıdır. Çalışma alanlarına ait önlük ve eldiven kullanılmalıdır. Aerosole dirençli pipet uçları kullanılmalıdır. Dekontaminasyon amacıyla çalışma alanları ve kullanılan aletler % 2 veya % 10'luk hipokloritle düzenli olarak silinmelidir⁶⁹. Standart eğrinin korelasyon

katsayısı testin lineer olduğunun gösterilmesi açısından 0.98 veya daha üzeri olmalıdır. Testin tespit ettiği değer aralığındaki onda birlik standart dilüsyonları hazırlanmalıdır. Bu sayede aynı primer ve prob karışımı ile yapılan reaksiyonda degradasyona ait veya kullanılan reaktiflere ait farklılıklar dengelenmiş olacaktır⁶⁹. Sonuçların “reproducible” olduğunun gösterilebilmesi için RNA ekstraksiyonundan RQ-PCR’a kadar tüm reaksiyon aşamaları farklı kişiler tarafından tekrarlanmalıdır. Bütün bunlar ileri teknoloji gerektirir ve testin çalışılmasında maliyeti önemli ölçüde etkilerken, zaman alıcıdır.

Genel duyarlılık, primer hücre solüsyonundaki hücre sayısına, kontrol gen transkriptlerinin sayısına ve PCR reaksiyonuna bağlıdır ve yapılan her PCR reaksiyonu için değişkenlik gösterir.

IRIS çalışmasında saptanan standart baz değerinin uluslararası skalada % 100’ü temsil etmesi benimsenmiştir. Bu standart değerden 3 log aşağısı ise % 0.10 olarak kabul edilmiştir ve MMR varlığını gösterir. Bu amaç için her in kendisine ait “uluslararası ölçek dönüşüm faktörünü” belirlemesi gerekmektedir²⁷. Bu faktör hesaplanırken BCR/ABL transkript değeri önceden bilinen bir örnek kullanılır. Bu örnek plazmid, liyofilize hücreler, hücre ekstraktları veya in vitro olarak stabilize edilmiş RNA olabilir. Hazırlanmış olan bu materyellerin kullanımı ile her laboratuvar kendisi için MMR’a uygun BCR-ABL/kontrol geni oranı yüzdesi saptayabilecektir. Hesaplanacak olan dönüşüm faktörü bu değerle bağlantılı olacaktır. BCR/ABL düzeyi ile dönüşüm faktörünün çarpımı da uluslararası ölçek olarak BCR/ABL düzeyini verecektir. Ancak IS’de sonuç verilebilmesi için laboratuvarın CF alması gereklidir. Tüm çabalara rağmen Türkiye’de CF’ye sahip yalnızca bir referans vardır.

Her tedavi edilmemiş hastalarda saptadığı BCR/ABL transkript seviyelerine dayanarak hesaplanan baz bir değere göre tedavi alan hastalarda izlemeler esnasında sırasında log10 ölçeğine göre kaç logaritmalık düşüşler olduğunu bildirmelidir. Bazı hastaların takipleri sırasında çok farklı merkezlerden refere ediliyor olmaları nedeniyle, BCR/ABL takibinde sıkıntılar yaşanmaktadır. Bu kit içinde ABL kontrol genine ait 4 adet standart, BCR genine ait 6 adet standart ve yüksek pozitif kontrol bulunmaktadır. Kit içerisinde ayrıca Mbc kopya değerlerinin «Uluslararası Birime (IS)» çevrilmesini sağlayan «Dünya Sağlık Örgütü (WHO)» tarafından kalibre edilen IS RNA Kalibratör

bulunmaktadır. Akım sitometrik sonuçlar, moleküler olarak IS-MMR kit ile (Ipsogen, Marseille, France) elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Akım sitometrik yöntemler ise, ileri düzeyde donanım gerektirir ancak daha az tekniğe dayalı ve daha az teknisyen bağımlı olması yanında hızlı sonuç alınan yöntemlerdir. KML ön tanıli veya hiperlökositozla takip edilen hastalarda akım sitometrik yöntemlerin kullanılması KML tanısının konulması açısından hızlıca sonuca ulaşılması yönünden önemli olabilir. KML tanısında akım sitometrik yöntemler tarama testi niteliği kazanabilir. Ayrıca KML’de tedaviye yanıt ve MRD takibinde standart yeni metodların geliştirilmesi, bilimsel birikime katkı sağlaması açısından önemlidir.

Akım sitometrik çalışmanın standardizasyonu ve kullanılması gereken hücre sayısının tespit edilmesi için yapılan çalışmamız sonucunda; hücre sayısı 1.000 ve 10.000 olan grupta BCR/ABL füzyon proteininin akım sitometrik olarak gösterilemediği sonucuna varıldı. Hücre sayısı 50.000 ve üzerinde ise BCR/ABL füzyon proteini pozitif olarak gösterildi. MFI değerleri ise hücre sayısına paralel olarak artış gösterdiği saptandı. Jilani ve arkadaşlarının çalışmasında imatinib ile tedavi edilen 54 KML hastasından, tedavi öncesi, tedavinin 3. ay (n=33), 6. ay (n=13), 9. ay (n=13) ve 12. aylarında (n=6) plazma örnekleri alınarak hem RT-PCR hem de akım sitometri ile analiz edilmiştir. Yapılan analizlerin sonucunda immunolojik analiz ile RT-PCR sonuçları paralellik gösterdiği tespit edilmiştir. Hasta serum örneklerinde çalışılması, daha kolay ve pratik bir yöntem olarak kabul edilebilir. Yine aynı çalışmada K562 hücreleri (hücre sayısı 1×10^6 olacak şekilde) içerisine 5 ile 0,005 mikromolar imatinib ve AMN107 eklenmiş, % 5 CO₂ içinde 37 °C’de 18 saat süreyle inkübe edilmiş. Hücreler daha sonra PBS ile iki kez yıkanmış, lizis ve lizatları boncuk esaslı BCR/ABL yöntem ile analiz edilmiştir. Sonuçta hücre sayısı ile saptanan boncuk oranı lineer saptanmış ve sonuçlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş (p<0,01). Ayrıca çalışmada boncuk bazlı immunolojik yönteminin sensitivitesi ve spesifitesi gösterilmiş ancak istatistiksel olarak analiz edilmemiştir⁷⁰.

D’alessio ve arkadaşlarının çalışmasında santral sinir sistemi tutulumu olan 1 KML ve 2 B-ALL hastası ile santral tutulumu olmayan 1 B-ALL hastası çalışmaya dahil edilmiş. Öncelikle beyin omurilik sıvısında akım sitometri ile sırasıyla % 88, % 42, % 78 ve % 0 oranlarında blast saptanmış ve ilk 3 hastada BCR/ABL proteini pozitif, 4. hastada negatif saptanmış (MFI değerleri sırasıyla 11.118, 1.718, 109 ve 50) ve

yöntemin sensitivitesi yüksek olarak değerlendirilmiştir⁷¹. Ancak vaka sayısının azlığı nedeniyle istatistiksel analiz yapılmamıştır.

Lucas ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada, 110 trombositozu ve/veya nötrofilisi mevcut KML şüphesi olan hasta örnekleri ile 47 sağlıklı kontrol grubunun örnekleri çalışmaya dahil edilmiş ve qRT-PCR ile BCR/ABL1 mRNA ile akım sitometrik yöntemle BCR/ABL1 proteini tespit edilerek analiz edilmiştir. Bütün örneklerde qRT-PCR ile saptanmış BCR/ABL1 durumu ile akım sitometride BCR/ABL1 proteini tespitinin % 100 uygunluğu teyit edilmiştir. MFI eşik değeri (cut-off) 99 olarak belirlenmiş ve qRT-PCR <% 1 olan grupta immunoassay ile BCR/ABL1 proteini çok düşük oranda saptanmış veya hiç tespit edilememiştir. qRT-PCR <% 1-10 olan grupta BCR/ABL1 proteini kolayca tespit edilmiş. Ayrıca qRT-PCR >% 10 saptanan yeni KML tanısı alan grupta ise BCR/ABL1 proteini son derece yüksek saptanmıştır. Bununla birlikte bu çalışmada tirozin kinaz inhibitörleri ile tedaviye başlanan hastalarda akım sitometrik yöntemin spesifitesi ve sensitivitesi doğrulanmıştır⁷². Biz çalışmamızda MFI eşik değerini 797 olduğunu istatistiksel olarak gösterdik.

Raponi ve arkadaşlarının çalışmasında boncuk yöntemi ile akım sitometride BCR/ABL füzyon proteini gösterilmiş. Çalışmaya 89 akut lösemi tanısı olan hasta (53 B-ALL, 5 T-ALL, 30 AML, 1 akut bifenotipik lösemi), 5 relaps hastalığı olan hasta (1 T-ALL, 3 B-ALL, 1 AML) ve 7 KML blastik krizde olan hasta gruplarından alınan taze kemik iliği veya periferik kan örneği dahil edilmiştir. Bu örnekler hem akım sitometride analiz edilmiş hem de PCR'da çalışılmış ve karşılaştırılmıştır. BCR/ABL akım sitometride 30 hastada (23 B-ALL, 7 KML blastik kriz) pozitif bulunmuş ve bu örneklerin hepsi RT-PCR'de de pozitif saptanmış. 2 vakada akım sitometride negatif olmasına rağmen RT-PCR'de pozitif bulunmuştur. Bu iki hastanın çalışma sırasında sırasıyla analiz edilen lösemi hücre miktarları $5,9 \times 10^5$ ve $5,1 \times 10^5$ olduğu ve bu hastalar steroid tedavisi aldığı rapor edilmiştir. Bu çalışmada BCR/ABL proteininin akım sitometrik immunoassay ile BCR/ABL füzyon transkriptlerinin moleküler yöntemler ile belirlenmesi arasında, analiz edilecek preparatların lösemi hücre miktarı 8×10^5 olması koşuluyla % 100 korelasyon bulunmuştur⁷³. Bizde çalışmamızda K562 hücre hatlarında hücre sayısının en az 50.000 ve üzerinde olduğu durumda akım sitometrik yöntem ile % 100 özgüllük ve duyarlılıkta pozitiflik gösterdik.

Çalışmamızda hücre sayısı en düşük olan (1000 hücre) grupta moleküler olarak BCR-ABL/ABL oranı gösterilebildi. Ancak hücre sayısı 1000 ve 10.000 olan grupta akım sitometrik yöntemler BCR/ABL füzyon proteini gösterilemedi. Akım sitometrik yöntemle BCR/ABL proteininin gösterildiği ilk hücre miktarı 50.000 olarak değerlendirildi. Ancak 10.000-50.000 arasındaki herhangi bir değerde çalışma yapılmadı. Bu durum çalışmamızın zayıf taraflarından biri olarak değerlendirildi.

Çalışmamızda akım sitometrik yöntemlerin yeterli sayıda ve canlı hücre ile kullanılarak uygulanması sonucuna ulaşmaktayız. Çalışmada kullanılacak canlı hücre sayısı arttıkça, akım sitometrik yöntemlerin hassasiyeti artmakta ve MFI değerleri yükselmektedir. Literatürde akım sitometrik yöntemler kullanıldığı esnada canlı hücrelerle çalışılması gerekliliğinden bahseden herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Diğer lösemilerde görülebilen bazı translokasyonların immunolojik yöntemle dayalı akım sitometrik gösterilmesi de sağlanabilir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

1. KML hastalarının tanı ve takibinde BCR/ABL geninin moleküler olarak kantitasyonu altın standarttır. Ancak yöntemdeki güçlükler standardizasyonu zorlaştırmaktadır. Yeni, kolay ve ucuz başka yöntemlere ihtiyaç vardır.

2. Akım sitometrik olarak BCR/ABL füzyon proteininin immunolojik yöntemle gösterilmesi bu hastaların tanısında kullanılabilir.

3. Akım sitometrik yöntemler kolay ulaşılabilir ve daha az tekniğe dayanır. Ancak moleküler çalışmalarda olduğu gibi, her çalışmada mutlaka negatif ve pozitif kontroller kullanılmalıdır.

4. Akım sitometrik yöntemler kullanılarak BCR/ABL füzyon proteini gösterilmek istenirse pozitif hücre sayısı en az 50.000 olmalıdır. Hücre sayısı arttırıldıkça MFI değerleri orantılı olarak artar.

5. Akım sitometrik yöntem ile BCR/ABL füzyon proteini gösterirken, hücrelerin mutlaka canlı olması gerekir. Hücre canlılığı azaldıkça MFI değerleri azalır. Bu durum ölçüm tekniğinin hücre canlılığından etkilendiğini göstermiş olup, örneklerin canlı ve optimal şartlarda yapılması gerektiğini ortaya koymuştur. RT-PCR metodu canlılıktan etkilenmemektedir.

6. Akım sitometrik yöntemler ile gerçek eşik (cut-off) değerini tespit edebilmek amacıyla 10.000 ve 50.000 arasındaki hücre sayıları yeniden analiz edilebilir.

7. Canlı ve uygun sayıda (50.000 ve üzeri) hücre ile çalışıldığında akım sitometrik yöntemler BCR/ABL tayininde % 100 duyarlılık ve % 100 özgüllüktedir.

KAYNAKLAR

1. **Koca E, Haznedaroğlu İC.** Imatinib mesylate and the management of chronic myeloid leukemia (CML). *Turkish Journal of Haematology* **2005**;22(4),161-72.
2. **Faderl S, Kantarjian HM, Talpaz M.** Chronic myelogenous leukemia: update on biology and treatment. *Oncology (Williston Park)* **1999**;13:169-80.
3. **Cortes JE, Talpaz M, Kantarjian H.** Chronic myelogenous leukemia: a review. *Am J Med* **1996**; 100:555-70.
4. **Lichtman MA, Liesveld JL.** Chronic myelogenous leukemia and related disorders. In: Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligshon U, Kaushansky K, Prchal JT, Eds. *Williams Hematology*, New York: McGraw-Hill 2006:1266-67.
5. **Cortes JE, Talpaz M, Beran M.** Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia with rearrangement of the breakpoint cluster region. Long-term follow-up results. *Cancer* **1995**;75:464-70.
6. **Larson RS, Wolff SN.** Chronic Myeloid Leukemia. Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM, Eds. *Wintrobe's Clinical Hematology* Egypt: Middle East Edition **1999**;2342.
7. A.Ü. Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı (1997). Klinik Hematoloji. Ankara: Antip A.Ş. Tıp Kitapları ve Bilimsel Yayınları.
8. **Faderl S, Talpaz M, Kantarjian HM.** Should polymerase chain reaction analysis to detect minimal residual disease in patients with chronic myelogenous leukemia be used in clinical decision making? *Blood* **1999**;93:2755-9.
9. **Chase A, Huntly BJ, Cross NJP.** Cytogenetics of chronic myeloid leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* **2001**;14:553-71.
10. **Deininger M, Goldman JM, Melo JV.** The molecular biology of chronic myeloid leukemia: a review. *Blood* **2000**; 96: 3343-56.
11. **Di Bacco A, Keeshan K, McKenna SL.** Molecular Abnormalities in Chronic Myeloid Leukemia: Deregulation of Cell Growth and Apoptosis. *The Oncologist* **2000**;5:405-15.
12. **Garcia-Manero G.** A prognostic score for patients with lower risk myelodysplastic syndrome. *Leukemia* **2008**;22(3):538-43.
13. **Larson RS, Wolff SN.** Chronic Myeloid Leukemia. Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM, Eds. *Wintrobe's Clinical Hematology*. Egypt: Middle East Edition **1999**;2345.
14. **Kern WF.** PDQ Hematoloji (Ferhanoğlu B, Çev.). İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık **2005**.
15. **Wetzler M, Byrd JC, Bloomfield CD.** Acute and Chronic Myeloid Leukemia. Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. United States of America: The McGraw-Hill Companies **2005**;638
16. **Koca E, Haznedaroğlu İC.** Kronik myeloid lösemi. *Türkiye Klinikleri J Hem Onc-Special Topics* **2007**; 3:56-61.

17. **Bhatia R, Radich JP.** Chronic myeloid leukemia. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil S, Furie B, Silberstein LE, McGlave P, Heslop H, Eds. *Hematology: Basic Principles and Practice*. 5. Ed., Philadelphia: Elsevier Inc **2009**;1109-23.
18. **Lichtman MA, Liesveld JL.** Chronic myelogenous leukemia and related disorders. In: Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal JT, Eds. *Williams Hematology*. 7. Ed., New York: McGraw-Hill Co 2006:1245.
19. **Silver RT.** Chronic Myeloid Leukemia. Bast, Kufe, Pollock, Weichselbaum, Holland, Frei. *Cancer Medicine* e.5. Türkiye: AND Medical Consulting & Publishing Ltd, **2002**;1972
20. **Cureo A, Bigani R, Emmanuel B.** Fluorescence in situ hybridization for the detection and monitoring of the Ph-positive clone in chronic myelogenous leukemia: comparison with metaphase banding analysis. *Leukemia* **1998**;12:1718–23.
21. **Haigh S, Cuthbert G.** Fluorescence in situ hybridization characterization of different cryptic BCR/ABL rearrangements in chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;156:188-9
22. **Baccarani M, Dreyling M.** ESMO Guidelines Working Group. Chronic myelogenous leukemia: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* **2009**; 20:105-7.
23. **Hoffman R,** Eds, *Hematology Basic Principles and Practice*, 3rd Edition, Pennsylvania, Churchill Livingstone **2000**.
24. **Sokal JE, Cox EB, Baccarani N.** Prognostic discrimination in good-risk chronic granulocytic leukemia. *Blood* **1984**;63:789-99
25. **Hasford J, Pfirmann M, Hehlmann R.** A new prognostic score for survival of patients with CML treated with IFNa. *J Natl Canc Inst* **1998**;90:850-58
26. **Fausel C.** Targeted chronic myeloid leukemia therapy: seeking a cure. *J Manag Care Pharm* **2007**;13:8-12.
27. **Druker BJ, Guilhot F, O'Brien S.** Long-term benefits of imatinib (IM) for patients newly diagnosed with chronic myelogenous leukemia in chronic phase (CML-CP): the 5-year update from the IRIS study. *J Clin Oncol* **2006**;24:338.
28. **Scheinfeld N.** *A comprehensive review of imatinib mesylate (Gleevec) for dermatological diseases* **2006**;5:117-22.
29. **Kantarjian HM, Sawyers C, Hochhaus A.** Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* **2002**;346:645-52.
30. **O'Hare T, Walters DK, Stoffregen EP, Jia T, Manley PW, Mestan J.** In vitro activity of BCR/ABL inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. *Cancer Res* **2005**;65:4500-05.
31. **Hochhaus A, Kantarjian HM, Baccarani M.** *Blood*. 2007 Mar 15;109(6):2303-9. Epub 2006 Nov 30. Erratum in: *Blood* **2007**;110(5):1438.
32. Imatinib: Results of the CA180013 'START-C' Study. *Journal of Clinical Oncology*, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I **2006**;24(18):6508.
33. **Stone MR, Kantarjian HM, Baccarani M.** *Efficacy of Dasatinib in Patients with Chronic-Phase Chronic Myelogenous Leukemia with Resistance or Intolerance to Imatinib: 2-Year Follow-Up Data from START-C (CA180-013)*. www.cmlsociety.org. Dasatinib-ASH December 11, **2007**.

34. **Kantarjian H, O'Brien S, Talpaz M.** Outcome of pts with ph+ CML post IM failure. *Cancer* **2007**;109:1556-60.
35. **Olivieri A, Manzione L.** Dasatinib: a new step in molecular target therapy. *Ann Oncol* **2007**; 6:42-46.
36. **Weisberg E, Manley PW, Breitenstein W.** Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant BCR/ABL. *Cancer Cell* **2005**;7:129-41.
37. **Sabrina P, Maurizio F, Marco F.** T315I-mutated BCR/ABL in chronic myeloid leukemia and imatinib: insights from a computational study. *Mol Cancer Ther* **2005**;4(8):1167-74.
38. **Adamson JW.** The Myeloproliferative Diseases. Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Martin JB, Fauci AS, Root RK, Eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. United States of America: The McGraw-Hill Companies **1991**;1563.
39. **Lister TA, Gallagher CJ.** Malignant Disease. Kumar P, Clark M, Eds. *Clinical Medicine*. United States of America: Elsevier Saunders **2005**;506.
40. **Wetzler M, Byrd JC, Bloomfield CD.** Acute and Chronic Myeloid Leukemia. Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. United States of America: The McGraw-Hill Companies **2005**;639.
41. **Demirer T, Buckner CD, Appelbaum FR.** Busulfan, cyclophosphamide and fractionated total body irradiation for allogeneic marrow transplantation in advanced acute and chronic myelogenous leukemia: phase I dose escalation of busulfan based on targeted plasma levels. *Bone Marrow Transplant* **1996**;17:341-46.
42. **Broxmeyer HE, Cooper S, Yoder M.** Human umbilical cord blood as a source of transplantable hematopoietic stem and progenitor cells. *Curr Top Microbiol Immunol* **1992**;177:195-204.
43. **Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML.** Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N Engl J Med* **1996**; 335:157-66.
44. **Larson RS, Wolff SN.** Chronic Myeloid Leukemia. Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM, Eds. *Wintrobe's Clinical Hematology Egypt: Middle East Edition* **1999**;2363.
45. **Shepherd JD, Gascoyne RD, Barnett MJ.** Polyclonal Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorder following autografting for chronic myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant* **1995**; 15:639-41.
46. **Rowley JD.** Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* **1973**; 243:290.
47. **Saglio G, Storlazzi CT, Giugliano E.** A 76-kb duplcon maps close to the BCR gene on chromosome 22 and the ABL gene on chromosome 9: possible involvement in the genesis of the Philadelphia chromosome translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002 Jul 23**;99(15):9882-7
48. **Goldman JM, Melo JV.** Chronic myeloid leukemia-Advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med* **2003**;349:1451-64.
49. **Laneuville P.** Abl tyrosine kinase. *Semin Immunol* **1995**;7:255-66.
50. **Akçora D.** İmatinib Tedavisi Alan Kronik Myeloid Lösemi Hastalarında T315I, E255K ve M351T Mutasyonlarının Saptanması. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, **2007**.

51. **Pane F, Frigeri F, Sindona M.** Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood* **1996**; 88:2410.
52. **Amabile M, Giannini B, Testoni N.** Real-time quantification of different types of BCR/ABL transcript in chronic myeloid leukemia. *Haematologica* **2001**;86:252-59.
53. **Baran Y.** Kronik myeloid lösemi genetiği. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci* **2007**;3:50-55
54. **Dunphy CH.** Applications of Flow Cytometry and Immunohistochemistry to Diagnostic Hematopathology. *Arch Pathol Lab Med* **2004**;128:1004-22.
55. **Laane E, Tani E, Björklund E.** Flow cytometric immunophenotyping including Bcl-2 detection on fine needle aspirates in the diagnosis of reactive lymphadenopathy and non-Hodgkin's lymphoma. *Cytometry Part B Clinical Cytometry* **2005**;64 B:34-42
56. **Mitchell S. Ward.** The Use Of Flow Cytometry In The Diagnosis And Monitoring Of Malignant Hematological Disorders, *Pathology* **1999**;31:382-92.
57. **Baran Y, Salas A, Senkal CE.** Alterations of ceramide/sphingosine 1-phosphate rheostat involved in the regulation of resistance to imatinib-induced apoptosis in K562 human chronic myeloid leukemia cells. *J Biol Chem* **2007**;282:10922-34.
58. 1st International Genetic Reference Panel for the quantitation of BCR/ABL translocation by RQ-PCR - White et al *Blood* **2010**.
59. **Crews LA, Jamieson CH.** Chronic myeloid leukemia stem cell biology. *Curr Hematol Malig Rep* **2012**;7(2):125-32.
60. **Zhang Y, Rowley JD.** Chronic myeloid leukemia: current perspectives. *Clin Lab Med* **2011**;31(4):687-98.
61. **Ernst T, La Rosée P, Müller MC.** BCR-ABL mutations in chronic myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* **2011**;25(5):997-1008.
62. **Cross NC, White HE, Müller MC.** Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. **2012 Apr 16**. doi: 10.1038/leu.2012.104.
63. **Sacha T, Zawada M, Czekalska S.** Standardization of quantitative detection of BCR-ABL gene expression by RQ-PCR in patients with chronic myeloid leukemia in cooperation with European Leukemia Net]. *Przegl Lek* **2010**; 67(7):454-9
64. **Branford S, Fletcher L, Cross NC.** Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. *Blood* **2008**;112(8):3330-8.
65. **Moravcová J, Rulcová J, Poláková KM.** Control genes in international standardization of real-time RT-PCR for BCR-ABL. *Leuk Res* **2009**; 33(4):582-4
66. **Muller MC.** Harmonization of BCR-ABL mRNA quantification using a uniform multifunctional control plasmid in 37 international laboratories. *Leukemia* **2008**;22:96-102.
67. **Wang YL, Lee JW.** Molecular monitoring of chronic myelogenous leukemia: identification of the most suitable internal control gene for real-time quantification of BCR-ABL transcripts. *J Mol Diagn* **2006**; 8:231-9.

68. **Baccarani M, Pane F, Saglio G.** Monitoring treatment of chronic myeloid leukemia. *Haematologica* **2008**; 93:161-9.
69. **Brazier RM, Shipp MA, Feldman AL.** Molecular Diagnostics. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2003**:279-93.
70. **Jilani I, Kantarjian H, Faraji H.** An immunological method for the detection of BCR/ABL fusion protein and monitoring its activation. *Leuk Res* **2008**;32:936-43.
71. **D'Alessio F, Mirabelli P, Mariotti E.** Miniaturized flow cytometry based BCR/ABL immunoassay in detecting leptomeningeal disease. *Leuk Res* **2011**;35:1290-3.
72. **Lucas CM, Fagan JL, Carter A.** Rapid diagnosis of chronic myeloid leukemia by flow cytometric detection of BCR/ABL1 protein. *Haematologica* **2011**; 96:1077-78.
73. **Raponi S, De Propriis MS, Wai H.** An accurate and rapid flow cytometric diagnosis of BCR/ABL positive acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* **2009**; 94:1767-70.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Bilal AYGÜN

Doğum Tarihi : 03.07.1977

Medeni Durumu : Evli

Adres : Güzelyalı Mah. T.Özal Bulvarı Yeşilköşe Sitesi A Blok K:9 D:17
Çukurova/ADANA

Telefon : 0 (505) 706 92 66

E-Posta : bilalaygun@yahoo.com

Mezun Olduğu Tıp Fakültesi: İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi

Varsa Mezuniyet Derecesi:

Görev Yerleri : Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları ABD,
Gülner Devlet Hastanesi, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji BD

Dernek Üyelikleri : Türk Hematoloji Derneği

Alınan Burslar :

Yabancı Diller : İngilizce

Diğer Hususlar :