

TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRLERİYLE TEDAVİ EDİLEN KRONİK MİYELOİD LÖSEMİLİ HASTALARIN BCR-ABL TRANSKRİPTLERİNİN KANTİTATİF PCR YÖNTEMİYLE İZLENMESİ

A. Selim Yavuz

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, İstanbul

Kronik miyeloid lösemili (KML) hastalarda 1960 yılında Philadelphia kromozomunun (Ph) gösterilmesinden sonraki 30 yıllık dönem içinde kemik iliğinde Ph pozitif metafazların gösterilmesi veya bunların kantitatif olarak tayini, tanının confirmasyonu ve tedaviye yanıtın monitorizasyonu için değerli bilgiler vermiştir. Son 15 yıl içinde bcr-abl transkriptlerinin özellikle allojeneik kemik iliği nakli, interferon- α ve tirozin kinaz inhibitörlerinin kullanıldığı KMLli hastalarda gösterilmesi ve bu transkriptlerin kantitatif olarak tayinleri ile daha ayrıntılı bir takip olanağı doğmuştur. Hastaların belli aralıklarla bcr-abl transkript tayini ile monitorizasyonu hastalıkta progresyon gelişebilecek kişileri tanımlamada yardımcı olmaktadır(1).

BCR-ABL transkriptlerinin tayini için kullanılan yöntemler son yıllarda gelişmeler göstermiştir. İlk önceleri tek aşamalı PCR ile tayin yapılırken daha sonraları 2 aşamalı "nested" amplifikasyon metodu kullanılmıştır(2). 1993 yılında kompetitif PCR tekniğine dayanarak BCR-ABL transkript sayıları verilmeye çalışılmış ve bu teknik daha sonraları "real-time PCR" teknolojisine adapte edilmiştir(3-5). 2003 yılından beri ise "real-time" kantitatif PCR (RQ-PCR) ile elde edilen BCR-ABL transkript tayini sonuçlarının standardizasyonu ile ilgili çalışmalar sürdürülmektedir(6). 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 materyeli ve son olarak da sonuçların uluslararası bir skala içinde verilmesi konusu görüşülmüştür (1).

Standardizasyon için kontrol genlerinin seçimi

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(7,8). Bcr-abl kantitasyonu için araştırılmış ve uygun bulunmuş 3 kontrol geni BCR, ABL ve β -glukuronidaz (GUSB)dır. Bunlardan ABL en yaygın kullanılandır.

RQ-PCR metodolojisinin optimizasyonu

Analiz ve RNA ekstraksiyonu için uygun örneğin toplanması: 5-10 mL periferik kan örneği içinde $1-2 \times 10^7$ çekirdekli hücre olması hedeflenir. Hücre ayırımında Ficoll kullanımı yerine eeritrosit lizisi tercih edilir. Kronik fazdaki hastalarda klinik yanıtın araştırılmasında periferik kan örneklerinin kullanılması uygundur(9). 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.

Revers transkripsiyon (RT): Rasgele (random) primerler 25 μ M final konsantrasyonunda kullanıldıklarında duyarlılık artar (7). RT için Moloney murine leukemia virüsü (MMLV) 4-8 U/ μ L konsantrasyonunda veya Superscript (200 U/ μ L) kullanılabilir. Başka enzim kaynakları da kabul edilebilir. Gelen örneği RNA ekstraksiyon safhasından itibaren çift çalışmak yerine RT safhasından itibaren çift çalışmak daha kolaydır.

RQ-PCR reaksiyonun dizaynı: Hidroliz ve hibridizasyon problemlerine dayanan teknolojilerin her ikisi de kullanılabilir(-10). Primer ve problemler hazırlanırken BCR 13. ekson deki polimorfik bölüm ve ABL 2. ve 3. ekson arasındaki kısa intron bölgesinin genomik DNA'dan kolayca amplifiye olabileceği dikkate alınmalıdır. Primer ve problemler RNA'ya spesifik olmalı ve genomik DNA ile denenmelidir.



TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRLERİYLE TEDAVİ EDİLEN KRONİK MİYELOİD LÖSEMİLİ HASTALARIN BCR-ABL TRANSKRİPTLERİNİN KANTİTATİF PCR YÖNTEMİYLE İZLENMESİ

Tablo. Herhangi bir laboratuarda elde edilen BCR-ABL değerlerinin dönüşüm faktörü kullanılarak (DF) "uluslararası skala"ya çevrilmesi (1).

Laboratuvar	MMR ^{Eq} , %	0.1%/MMR ^{Eq} = dönüşüm faktörü	Elde edilen değer in uluslararası skala cinsinden verilmesi (BCR-ABL ^L xDF=BCR-ABL ^{IS})
Adelaide	0.08	0.1/0.08=1.25	BCR-ABL ^L x 1.25
Mannheim	0.12	0.1/0.12=0.83	BCR-ABL ^L x 0.83
Londra	0.045	0.1/0.045=2.22	BCR-ABL ^L x 2.22

BCR-ABL^L: Laboratuarda bulunan BCR-ABL değeri, MMR^{Eq}: IRIS çalışmasındaki gibi saptanmış olan MMR'ı gösteren BCR-ABL^L değeri, BCR-ABL^{IS}: Uluslararası skala ile verilen BCR-ABL değeri

Kontaminasyonun önlenmesi: Kontaminasyonun önlenmesi için 1) Plazmid dilüsyonlarının hazırlandığı alan, 2) RNA ekstraksiyonunun yapıldığı ve PCR "master mix"ine 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 silinmelidir (1).

Uygun standartlar ve PCR amplifikasyon etkinliğinin etkisi: 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 olacaktır (1).

RQ-PCR reaksiyonunun güvenilirliğinin ölçülmesi: Sonuçların "reproducible" olduğunun gösterilebilmesi için RNA ekstraksiyonundan RQ-PCR'a kadar tüm reaksiyon aşamaları farklı kişiler tarafından tekrarlanmalıdır (1).

Kabul edilebilir duyarlılık ve tayin edilemeyen BCR-ABL düzeyi: Genel duyarlılık, primer hücre solüsyonundaki hücre sayısına, kontrol gen transkriptlerinin sayısına ve PCR reaksiyonuna bağlıdır ve yapılan her PCR reaksiyonu için değişkenlik gösterir (1).

KAYNAKLAR

1. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. Blood. 2006;108:28-37.

Sonuçların verilmesinde kullanılan yöntemler

BCR-ABL transkript sayısının mikrogram RNA'ya oranlanarak verilmesi RNA konsantrasyonunun tayini güvenilir olmadığı için yanlış sonuçlar verebilir.

BCR-ABL transkript sayısının kontrol geni transkript sayısına oranı en sık kullanılan yöntemdir. Her laboratuvar tedavi edilmiş hastalarda saptadığı BCR-ABL transkript seviyelerine dayanarak hesaplanan baz bir değere göre tedavi alan hastalarda izlemeler esnasında sırasında log₁₀ skalasına göre kaç logaritmalık düşüşler olduğunu bildirmelidir. Yukarıda bahsedilen baz değerler o laboratuara başvuran belli bir hasta sayısına dayandığı ve standart olarak kabul edildiği için izlemeler için her hastanın tedavi öncesi değerine ihtiyaç yoktur (1).

Sonuçların uluslararası bir skala halinde verilmesi

IRIS çalışmasında saptanan standart baz değer in uluslararası skalada %100'ü temsil etmesi benimsenmiştir. Bu standart değerden 3 log aşağısı ise 0.10% olarak kabul edilmiştir ve majör moleküler yanıt (MMR) varlığını gösterir.

Bu amaç için her laboratuvarın kendisine ait "uluslararası skala dönüşüm faktörünü" belirlemesi gerekmektedir. 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 skala olarak BCR-ABL düzeyini verecektir (1).

2. Hughes TP, Morgan GJ, Martiat P, Goldman JM. Detection of residual leukemia after bone marrow transplantation: role of PCR in predicting relapse. Blood. 1991;77: 874-878.
3. Cross NCP, Lin F, Chase A, Bungey J, Hughes TP, Goldman JM. Competitive PCR to estimate the number of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia patients after bone marrow transplantation. Blood. 1993;82: 1929-1936.



4. Mensink E, van de Locht A. Quantitation of minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia patients using real-time quantitative RT-PCR. *Br J Haematol.* 1998;102: 768-774
5. Branford S, Hughes TP, Rudzki Z. Monitoring chronic myeloid leukaemia therapy by real-time quantitative PCR in blood is a reliable alternative to bone marrow cytogenetics. *Br J Haematol.* 1999;107: 587-599.
6. Hughes TP, Kaeda J, Branford S, et al. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2003;349: 1423-1432.
7. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, et al. Standardization and quality control studies of "real-time" quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia: a Europe Against Cancer program. *Leukemia.* 2003;17: 2318-2357
8. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using "real-time" quantitative reversetranscriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR): a Europe against cancer program. *Leukemia.* 2003;17: 2474-2486.
9. Stock W, Yu D, Karrison T, et al. Quantitative real time PCR monitoring of BCR-ABL in CML shows lack of agreement in blood and bone marrow samples: Cancer and Leukemia Group B Study 29801. *Int J Oncology.* 2006;28: 1099-1103.
10. Silvy M, Mancini J, Thirion X, Sigaux F, Gabert J. Evaluation of real-time quantitative PCR machines for the monitoring of fusion gene transcripts using the Europe against cancer protocol. *Leukemia.* 2005;19: 2305-2307.

