

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

AKUT LÖSEMİLERDE Her-2/neu EKSPRESYONU

Dr. Hasan Atilla ÖZKAN

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

BURSA - 2007

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

AKUT LÖSEMİLERDE Her-2/neu EKSPRESYONU

Dr. Hasan Atilla ÖZKAN

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Rıdvan ALİ

BURSA - 2007

İÇİNDEKİLER

Özet.....	ii
Summary.....	iii
Giriş.....	1
Gereç ve Yöntem.....	7
Bulgular.....	10
Tartışma ve Sonuç.....	19
Ekler.....	26
Kaynaklar.....	31
Teşekkür.....	36
Özgeçmiş.....	37

ÖZET

B hücreli akut lenfoblastik lösemi'de (ALL) Her-2/neu ekspresyonunun olabileceği az sayıdaki çalışmalarda gösterilmiş olmakla birlikte, lösemnin diğer tiplerinde Her-2/neu ekspresyonu ve biyolojik önemi henüz yeterince araştırılmamıştır. Prospektif olarak yürütölen çalışmamızda, gerek lenfoid gerekse miyeloid lösemi tiplerinde Her-2/neu ekspresyon durumunun saptanması amaçlandı.

Çalışmamıza, 2006 Mayıs ve 2007 Şubat tarihleri arasında hasta alımı yapıldı. Akım sitometri aracılığı ile Her-2/neu spesifik monoklonal antikor (Becton Dickinson, CA, USA) kullanılarak, 38'i tanı ve 11'i nüks anında olmak üzere toplam 49 akut lösemi hastasının lösemik blastlarında Her-2/neu ekspresyonu analiz edildi. Her-2/neu ekspresyonunun analizi için kemik iliği aspirasyon örnekleri kullanıldı.

Olguların 41'i (%83,67) akut miyeloid lösemi (AML), 7'si (%14,29) B-ALL ve 1'i (%2,04) T-ALL olgusu idi. 41 AML olgusunun 32'si (%78,05) de novo AML ve 9'u (%21,95) sekonder AML olgusu idi. Yedi ALL olgusunun tümü de novo akut lösemiydi. De novo ya da sekonder AML tanısına sahip 41 olguda ve T-ALL tanısına sahip 1 olguda Her-2/neu ekspresyonu saptanmadı. Diğer taraftan 7 B-ALL olgusunun 1'inde (%14,29) Her-2/neu ekspresyonu tespit edildi.

Sonuç olarak, 49 akut lösemi olgusu içeren bu prospektif çalışmada, bazı ALL alt tiplerinde Her-2/neu'nun eksprese olabileceği gösterildi. Her-2/neu ekspresyonunun, akut lösemilerde prognostik öneme sahip olup olmadığı ve Her-2/neu odaklı tedavi stratejileri için potansiyel bir hedef olup olmadığı yeni çalışmalar ile araştırılması gerektiği kanaatine varıldı.

Anahtar kelimeler: Akut lösemi, Her-2/neu, akım sitometri, akut miyeloid lösemi, akut lenfoblastik lösemi

SUMMARY

Her-2/neu Expression in Acute Leukemias

Although, it has been demonstrated in a few studies that Her-2/neu expression can be detected on the blast cells from patients with subset of B-acute lymphoblastic leukemia (ALL), its expression and biological importance on blasts cells from other type of leukemias was not well studied yet. In this prospective study, we aimed to evaluate the incidence of Her-2/neu expression on both lymphoid and myeloid type leukemias.

The period of enrollment was between May 2006 and February 2007. We analyzed the expression of Her-2/neu on the leukemic blasts from 49 patients with acute leukemia, including 38 at diagnosis and 11 at relapse, by flow cytometry using a Her-2/neu specific monoclonal antibody (Becton Dickinson, CA, USA). Bone marrow aspiration samples were used to analyze Her-2/neu expression.

Forty one patients (%83,67) had acute myeloid leukemia (AML), 7 patients (%14,29) had B-ALL and 1 patient (%2,04) had T-ALL. Among 41 AML patients, 32 (%78,05) had de nova AML and 9 (%21,95) had secondary AML. All of the 7 ALL patients had a de nova acute leukemia. Her-2/neu expression was not detected in none of the 41 patients with de nova or secondary AML and 1 patient with T-ALL. On the other hand, Her-2/neu expression was detected in 1 (%14,29) of 7 B-ALL patients.

In conclusion, in this prospective study including 49 patients with acute leukemia, we showed that Her-2/neu may express on the leukemic blasts of the subset of ALL. We think that further studies are needed to evaluate whether Her-2/neu has a prognostic importance and could be used as potential target for the application of Her-2/neu directed treatment strategies in acute leukemias.

Key words: Acute leukemia, Her-2/neu, flow cytometry, acute myeloid leukemia, acute lymphoblastic leukemia

GİRİŞ

Akut miyeloid ve akut lenfoblastik lösemiler, olgunlaşma ve farklılaşma özelliğini kaybetmiş hematopoetik öncü hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile karakterize hastalıklardır. Batı ülkelerinde, erişkinlerde gözlenen tüm lösemilerin %25'ini akut miyeloid lösemi (AML) oluşturmaktadır ve bu nedenle erişkinlerde gözlenen en sık lösemi tipidir. Akut lenfoblastik lösemi (ALL) de ise durum biraz farklıdır. Çocukluk çağında görülen lösemilerin %80'ini ve tüm kanserlerin %30'unu ALL oluşturmaktadır. Avrupa'da yılda 75600 yeni lösemi olgusunun gelişeceği ve bunun tüm kanserler içinde %2,6'lık bir oranı temsil edeceği düşünülmektedir (1,2).

Son yıllarda, akut lösemilerin patogenezi geçmişe nazaran daha iyi anlaşılması ile agresif tedavilerin geliştirilmesine ve destek tedavilerinin daha iyi hale getirilmiş olmasına rağmen, tedavi sonuçları ne yazık ki yüz güldürücü değildir. Konvansiyonel kombinasyon tedavileri ile tedavi edilmiş primer AML hastalarının ancak %50-80'inde remisyon elde edilebilmektedir. Medyan tam remisyon süresi yaklaşık 1-2 yıl olup, bu hastaların %60-80'inde nüks gelişmektedir. Hali hazırda kabul gören transplantasyon programlarına rağmen, 55 yaşından genç AML hastalarının ancak %37'si 5 yıl ya da daha uzun süre yaşayabilmektedir (3, 4). Elli beş yaş üzerindeki AML hastaları ise, sitogenetik anomali insidanslarının daha yüksek olmasından dolayı daha kötü klinik seyre sahiptir (5). ALL'li hastalarda ise olguların ancak %70-85'inde tam remisyon elde edilebilmektedir. Hastaların %10-20'si remisyon indüksiyon sırasında kaybedilirken, %10'luk kısmı tedaviye refrakter kalmaktadır. Tam remisyon sağlanan hastaların yarısından fazlası ise nüks göstermektedir. Tüm modern tedavi yaklaşımlarına rağmen erişkin ALL hastalarının ancak %20-40'ında şifa sağlanabilmektedir (6).

Hastaliksız ve toplam yaşam sürelerini uzatabilecek tedavideki iyileştirmeler, hastalığın biyolojisinin anlaşılması ile yakından ilgilidir. Bu nedenle, son yıllarda çalışmalar lösemilerin patogenezinde rol oynayan ya da

prognostik öneme sahip belirteçleri bulmak üzerine yoğunlaşmıştır. Lösemilerde kabul gören prognostik faktörler kabaca klinik ve biyolojik faktörler olarak 2 gruba ayrılabilir. Tanı anındaki performans, yaş, lökosit ya da blast sayısı, tedaviye yanıt süresi, serum albümin, bilirubin ve kreatinin düzeyi gibi faktörler prognoz ile özellikle de tedaviye bağlı erken ölümler ile ilişkili olduğu bilinen klinik prognostik faktörler arasındadır. Buna karşın, tanı anındaki sitogenetik ve moleküler genetik bulguları halen en önemli prognostik belirteçlerdir (6, 7).

Akut lösemi hastalarının yaklaşık %50-70'inde tanı anında sitogenetik anomali saptanmaktadır. Kromozomal seviyedeki bu bulguları moleküler çalışmalar takip etmiştir ve bu çalışmalar sonucunda lökomogenezisde rol oynayan genler tanımlanabilmiştir. Sitogenetik bulgular, hastaların risklerini farklı şifa hızlarına sahip iyi, orta ve kötü olarak kategorize etmeye ve tedavi seçimine izin vermiştir (4, 8). Örneğin; t(8;21), inv(16) veya t(15;17) anomalisi gösteren AML hastalarının, kompleks karyotip veya inv(3) anomalisi gösteren AML hastalarına oranla daha uzun medyan sağkalıma sahip oldukları gösterilmiştir (6, 7). Benzer şekilde, erişkin ALL hastalarında del(12p), t(12p) ve t(10;14) anomalileri iyi prognoz göstergesi iken, t(9;22), t(4;11) ve trizomi 8 kötü prognozu işaret etmektedir (6). Buna karşın, her iki lösemi tipinde, özellikle iyi ve orta risk grubuna giren bazı hastaların klinik seyirleri farklılık gösterebilmektedir. Bu farklılığa primer kromozomal anomaliler ile üst üste gelmiş sekonder kromozomal anomalilerin (9), gen mutasyonlarının (10-12) ve regüle olmayan gen ekspresyonlarının (13, 14) etkili olduğu düşünülmektedir. Sitogenetik ve moleküler anomalilerin tanısal ve prognostik değere sahip olduklarının anlaşılması üzerine, Dünya Sağlık Örgütü 2001 yılında hematolojik malignitelerin yeniden sınıflamasını yapmıştır (15). Keza, immünofenotipik bulguların da prognostik öneme sahip olduğunu gösteren çalışmalar raporlanmıştır. Bazı çalışmalarda CD13, CD33 ve CD34 eksprese eden ALL blastlarının kötü prognoza sahip olduğuna ilişkin sonuçlar bildirilmiştir (16).

Bahsedilen özellikler nedeniyle; immünofenotipik, sitogenetik ve moleküler genetik yaklaşımlar hematolojik malignitelerin tanısında, prognozu ve tedavi ilişkili toksisiteleri önceden öngörmeye kullanılmaya başlanmıştır. Bununla birlikte bu yaklaşımlar, akut lösemilerin patogenezinde rol oynayan yeni yolların ve potansiyel tedavi hedeflerinin ortaya konmasında da yararlanılmaya başlanmıştır. Yeni bir BCR-ABL özgün tirozin kinaz inhibitörü olan imatinib mesylate'ın (Glivec^R) kronik miyeloid lösemi'lerin (KML) tedavisinde kullanıma girmesi ve sağladığı başarıdan dolayı Ph⁺ ALL hastalarında devam eden birçok çalışma ile araştırılıyor olması bu duruma güzel bir örnektir (17, 18). Bir diğer örnek de, PML/RAR α pozitif akut promiyelositer lösemilerde all-trans retinoik asitin gösterdiği etkinliktir (19).

Akut lösemiler de dâhil birçok hematolojik kanserlerde sitotoksik ajanların yan etkilerinden kaçınmak, cevap ve sağkalım hızını arttırabilmek için, antikor odaklı immünoterapiler gibi yeni ilaçlar denenmektedir ve bunların bir kısmı da kullanıma girmiştir. Bir anti-CD20 kimerik monoklonal antikor olan rituximab, folliküler ve diffüz büyük B hücreli lenfomalarda başarıyla kullanılmaktadır (20). Anti-CD52 etkinliğinde bir monoklonal antikor olan alemtuzumab gösterdiği etkinlik ile nüks etmiş kronik lenfositik lösemi (KLL) hastalarında kullanıma girmiştir (21). Diğer yandan CD19, CD22, CD33 ve CD25 antijenlerine karşı geliştirilen immünotoksinlerin etkinliğini araştıran çalışmalar devam etmektedir (22, 23). Özellikle anti-CD33 antikorunu olan gemtuzumab ozigomycin ile ilgili olan çalışmaların sonuçları umut vaat etmektedir (24).

Her-2/neu (insan epidermal büyüme faktörü reseptörü), diğer adıyla c-erbB-2 proteininin yüzey reseptörü de hedefe yönelik planlanan bir kanser tedavi hedefidir. Her-2/neu geni kromozom 17q21 alanında lokalize olup, hücre içi tirozin kinaz aktivitesine sahip 185-kilodalton ağırlığında bir transmembran glikoproteini kodlamaktadır (25). Proteininin artmış ekspresyonu ya da gen amplifikasyonu sonucunda aktivite kazanmaktadır. Bu transmembran glikoproteininin hücre içi kısmı hücrelerin büyümesinde ve

farklılaşmasında düzenleyici rol oynamaktadır (26). Hücre dışında kalan kısmı ise, diğer HER ailesi üyeleri ile iletişime girerek homodimerizasyon (aynı reseptörler arasında dimerizasyon) ya da heterodimerizasyon (farklı HER ailesi üyesi ile dimerizasyon) oluşturarak sinyalizasyonu ve proteinin aktive olmasını sağlamaktadır. Her-2/neu heterodimerleri, homodimerlere göre daha stabildir ve mutajenik sinyallerin iletilmesinde daha fazla kapasiteye sahiptir (27). Yakın geçmişte yapılan deneysel çalışmalarda, Her-2/neu'yü nötralize eden antikörlerin vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) geninin baskılanması aracılığı ile yeniden damarlanmayı azalttığına dair bulgular saptanmıştır (28).

Her-2/neu aşırı ekspresyonunun, hem agresif seyirli meme kanserine işaret ettiği hem de meme kanseri tedavisi için iyi bir hedef olabileceğinin anlaşılması ile, Her-2/neu yüzey reseptörüne karşı humanize edilmiş monoklonal antikor olan trastuzumab (Herceptin^R) geliştirilmiştir. Trastuzumab, Her-2/neu reseptörüne bağlandıktan sonra antikora veya komplemana bağlı sitotoksikite etkisinin yanı sıra, Her-2 dimerizasyonunun engellemesi, hücre döngüsünde rol oynayan sinyal ve düzenleyici yolları etkilemesi, kemoterapi sonrası hücre tamiri kapasitesini azaltması ve yeni neoplastik damar oluşumunu engellemesi gibi çeşitli mekanizmalar ile anti-tümör etkisi göstermektedir (29-31). Trastuzumab'ın meme kanserinde tek başına ya da diğer antineoplastik ajanlarla kombine kullanımı ile önemli bir teröpatik etki gösterdiği görülmüştür (32, 33). Her-2/neu aşırı ekspresyonu olan 469 metastatik meme hastasında kombinasyon kemoterapisine trastuzumab eklenmesi, yanıt oranlarını arttırırken aynı zamanda sağkalım avantajı sağlaması, ilacın bu grup hastalarda standart tedavi olmasını sağlamıştır (34).

Ancak, böylesine etkin bir hedefe yönelik tedavisi bulunan Her-2/neu'nun hematolojik malignitelerdeki ekspresyonu ve rolü ne yazık ki yeterince araştırılmamıştır ve bu konuda fazla sayıda literatür bilgisi yoktur. Hodgkin ve non-Hodgkin lenfomalarda Her-2/neu ekspresyonu

immünohistokimyasal yöntem kullanılarak araştırılmış ancak ekspresyon tespit edilememiştir (35, 36). Musolini ve ark.'nın (37) KLL tanılı 40 hastanın periferik kan örneğinde florösan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi ile Her-2/neu gen amplifikasyonunu araştırdıkları çalışmada, hiçbir olguda amplifikasyon tespit edilememiştir. Potti ve ark. (38) 31 multipl miyelom olgusunda konvansiyonel immünohistokimyasal yöntem ile Her-2/neu ekspresyonunu araştırmışlardır. 31 hastanın 4'ünde (%13) Her-2/neu ekspresyonu tespit etmişlerdir. Ancak, olgu sayısının yetersiz olması nedeniyle hastalığa etkisi konusunda yorum yapamamışlardır. Utikal ve ark. (39) da Sezary sendromu tanılı hastaların bir kısmında Her-2/neu gen kopyalarının varlığını ve Her-2/neu protein ekspresyonu olduğunu göstermişlerdir.

Lösemilerde, Her-2/neu ekspresyonu ile ilgili ilk ve bu konu üzerinde yapılan araştırmalara yön veren çalışma Bühring ve ark. (40) tarafından yapılmıştır. Bühring ve ark. (40), normal hematopoetik hücrelerin ve lösemik blastların düşük düzeylerde Her-2 mRNA eksprese ettiğini, B-ALL blastlarının yüzeylerinde ise saptanabilir düzeyde Her-2/neu proteini olduğunu ilk kez göstermişlerdir. Bu bulgu, Her-2/neu ekspresyonunun bazı lösemi alt tiplerinin gelişiminde onkojenik rol oynayabileceğini akla getirmiştir. Müller ve ark. (41) da B-ALL blastlarında Her-2/neu ekspresyonunun yanı sıra, ALL blastlarının Her-2/neu ürünü peptid spesifik sitotoksik T hücreleri ile parçalanabileceğini saptamışlardır. Bu bulgular, Her-2/neu'yü hedef alan aşılama gibi tedavi stratejilerinin araştırılması gerektiğini akla getirmiştir. 2004 yılında Chevallier ve ark. (42), bazı B-ALL alt tiplerinin blast hücre yüzeylerinde Her-2/neu ekspresyonunu saptadıkları gibi, ekspresyonun kemorezistans ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir.

Sonuç olarak, malign hastalıkların tedavisinde monoklonal antikörlerin, tirozin kinaz inhibitörlerinin veya hücrel immünoterapilerin kullanılmasında elde edilen gelişmeler, Her-2/neu'nun önemli bir terapötik hedef olabileceğini ortaya koymuştur. Biz de çalışmamızda, gerek miyeloid gerekse lenfoid akut

lösemili olgularımızda Her-2/neu ekspresyon durumunu, hangi alt tiplerde daha fazla eksprese olduğunu ve nüks ile ilişkisini saptamayı amaçladık ve araştırdık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Mayıs 2006 – Şubat 2007 tarihleri arasında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı ve Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı işbirliği ile gerçekleştirildi. Çalışmamızda, Hematoloji Bilim Dalı'nda primer ya da sekonder akut lösemi tanısını yeni alan veya lösemi tanısı olup da nüks etmiş olguların kemik iliği aspiratları kullanıldı. Çalışmamız için hastalardan ek kemik iliği aspirasyonu yapılmadı. Tanı ve nüks anında zaten yapılması gerekli olan kemik iliği aspirasyonu sırasında çalışmamız için örnek kemik iliği aspiratı alındı. Kemik iliği aspirasyonu öncesinde tüm hastalar bilgilendirildi ve imzalanmış onam formu alındı (Ek-2). Kemik iliği aspirasyonu ile yeterince aspirat örneği alınamayan hastalar çalışmaya dahil edilmedi.

Kemik iliği aspirasyonu, sternum ya da arka üst krista iliak kemikten lokal anestezi altında kemik iliği aspirasyon veya biyopsi seti kullanılarak yapıldı. Alınan 2-4 cc kadar pıhtılaşmamış örnek EDTA içeren tüpe konuldu. EDTA'lı tüpte toplanmış olan kemik iliği hücreleri 6 saat içinde analiz edilecek şekilde hazırlandı.

Akım Sitometri ve Her-2/neu Ekspresyonunun Analizi

Lösemik blastik hücrelerde Her-2/neu ekspresyon tespiti, multi-color akım sitometre kullanılarak yapıldı. Lösemik blastik hücre ayrımı için hücre yüzey antijenleri olan CD45, CD34, ve CD38 kullanıldı. Boyamalar ayrı tüpte hazırlanan kontrol monoklonal boyamalar ile yapıldı. Birinci tüpte izotipik kontrol yapıldı. İkinci tüpte; dörtlü boyama CD34 - flourescein isothiocyanate (FTIC), CD38 - phycoerythrin (PE), CD45 - peridin chlorophyl protein (PerCP) ve Her-2/neu – allophycocyanin (APC) (Becton Dickinson, San Tose, CA, USA) ile yapıldı. Üçüncü tüpte; dörtlü boyama CD19 FTIC, CD10 PE, CD45 PerCP ve Her-2/neu APC ile yapıldı. Her tüpte 10^6 lökosit olacak şekilde dörtlü kombine boyalar ile inkübasyon yapıldı. Inkübasyon süresi 15 dakika

olup, karanlık ortam ve oda ısısında yapıldı. İnkübasyonun ardından tüplere lize edici 2 ml solüsyon (15% formaldehide ve 50% diethylene glycol) konuldu. Otuz dakikalık inkübasyondan sonra hücreler 2 defa saline solüsyonu ile yıkandı. Paraformaldehid 0,5 ml 1% solüsyonu resüspande edilerek fikse edildi. Örnekler, argon ion lazer'e sahip akım sitometreden (FACS Calibur, Becton Dickinson) geçirilerek analiz edildi. Neoplastik progenitör hücreler "tipik forward / side scatter" karakteristiği ve özel fenotiplerine (CD34⁺, CD45dim⁺, CD38⁻) (CD10⁺, CD19⁺, CD45dim⁺) göre tespit edildi. Bu tespit edilmiş popülasyonda Her-2/neu ekspresyonu belirlendi. CD34⁺ hücreler ISHAGE protokolünde (43) belirtilen kapılama algoritmeleri temeline dayanılarak yapıldı.

CD34⁺/CD45⁺ (öncü/blast), CD34⁺/CD38⁻/CD45⁺ ve CD10⁺/CD19⁺/CD45⁺ hücrelerde eksprese olan Her-2/neu'nun akım sitometrik sonuçları, reaktif hücrelerin yüzdeleri ve ortalama "flouresan intensite" (MFI)'si şeklinde ifade edildi.

Flörosan In Situ Hibridizasyon Analizi

FISH analizi için heparinize edilmiş kemik iliği hücre örnekleri çalışıldı. Her-2/neu geni DNA amplifikasyonu bakılmak üzere kullanılan iki renkli FISH yöntemi için 17. kromozom sentromer bölgesi (yeşil işaretli) ve Her-2/neu geni loküsünü (kırmızı işaretli) içeren "PathVysion" prob kiti (Vysis, Downers Grove, IL, USA) kullanıldı. Hücreler önce 70 % formamide/2x standart salin sitrat (2xSSC) solüsyonunda denature edildi. Probların denatürasyonu da aynı şekilde gerçekleştirildi. Daha sonra, 17. kromozom sentromer bölgesi ve Her-2/neu geni loküsünü içeren prob, hücreler üzerine uygulanarak 16 saat hibridize edildi. Hibridizasyon sonrası 0.4x SSC/NP40 0.3% pH 7, (72 °C, 2dk) ve 2xSSC/NP40 0.1 pH 7, (37 °C 1 dk) solüsyonları ile yıkama işlemleri yapıldı ve hücreler "4,6-diamidine, 2-phenylindol" (DAPI) ile boyandı. İyi hibridize olan, üst üste gelmemiş kaliteli sinyaller değerlendirilmeye alınarak

preperatlar “Quips Görüntüleme Sistemi (Applied Biosystem, UK), Nikon E 600 (Japan) epiflörösan mikroskop” ve filtre seti sisteminde (üçlü; dapi/kırmızı/yeşil, ikili; kırmızı/yeşil, tek kırmızı ve tek yeşil, Vysis, USA) analiz edildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan olguların toplamı 49 idi. Olguların demografik özellikleri Tablo-1’de özetlenmiştir.

Tablo-1: Olguların demografik özellikleri

Olgu No	Yaş/Cins	Lökosit sayısı	Tanı	Alt Tip	Hastalık durumu	Sitogenetik Anomali	İzlem süresi (hf)	Survival
1	54, E	1930	m-AML	M2	Yeni		45	Y
2	39, E	49800	deAML	M2	Yeni	+	4	Y
3	69, K	33700	deAML	M4	Yeni	-	9	Y
4	31, E	104000	deAML	M1	Yeni	-	41	Y
5	53, K	126000	k-AML	M2	Yeni	+	3	V
6	23, K	34100	deAML	M4	Nüks	-	7	Y
7	40, E	10700	deAML	M1	Yeni	-	9	Y
8	70, E	1700	m-AML	M0	Yeni	-	8	Y
9	54, K	183000	k-AML	M2	Yeni	+	5	V
10	43, K	8200	deAML	M5	Nüks	+	2	V
11	76, E	2350	deAML	M2	Yeni	-	6	Y
12	50, E	62600	deAML	M7	Yeni	-	5	V
13	52, K	197000	deAML	M0	Yeni	-	6	V
14	70, K	107000	deAML	M1	Yeni	-	1	V
15	63, K	9600	deAML	M2	Yeni	+	22	Y
16	45, E	141000	deAML	M4	Yeni	-	24	V
17	50, E	4800	deAML	M4	Nüks	-	17	Y
18	61, E	155000	deAML	M5	Yeni	+	4	Y
19	57, E	298000	k-AML	M2	Yeni	+	2	V
20	69, K	3100	deAML	M3	Yeni	+	12	Y
21	24, E	96200	m-AML	M2	Nüks		9	Y
22	50, K	158000	deAML	M5	Nüks	+	4	Y
23	75, E	18700	deAML	M0	Yeni	-	30	Y
24	37, E	12700	deAML	M3	Nüks	+	1	Y
25	73, E	50500	m-AML	M1	Yeni	-	1	Y
26	50, E	170000	deAML	M1	Yeni		21	V
27	66, E	2300	m-AML	M2	Yeni	+	21	V
28	59, E	2000	deAML	M0	Yeni	+	6	V
29	53, K	50400	deAML	M5	Yeni		13	Y
30	18, K	113400	deAML	M2	Nüks	-	2	Y
31	55, E	16900	deAML	M0	Nüks	-	7	V
32	62, E	56200	deAML	M1	Yeni		14	V

33	73, E	58400	deAML	M0	Yeni		3	Y
34	61, K	198000	deAML	M5	Yeni		8	Y
35	47, K	58000	deAML	M4	Yeni	-	1	Y
36	68, E	31000	deAML	M2	Yeni	-	1	Y
37	65, K	27000	deAML	M2	Yeni	+	34	Y
38	43, E	43000	deAML	M0	Yeni		1	Y
39	64, E	56000	deAML	M2	Yeni		1	Y
40	74, E	71000	m-AML	M5	Yeni	+	3	Y
41	60, E	2200	deAML	M0	Yeni		8	Y
42	22, K	44800	deALL	T	Nüks		26	Y
43	37, E	1200	deALL	B	Yeni	-	11	Y
44	29, K	700	deALL	B	Nüks		10	Y
45	26, K	3750	deALL	B	Yeni	+	40	Y
46	20, E	9320	deALL	B	Yeni	+	10	V
47	42, E	11700	deALL	B	Yeni		3	V
48	70, K	128000	deALL	B	Yeni	+	26	Y
49	21, E	1600	deALL	B	Nüks		8	V

E: Erkek K: Kadın Y: Yaşıyor V: Vefat etti

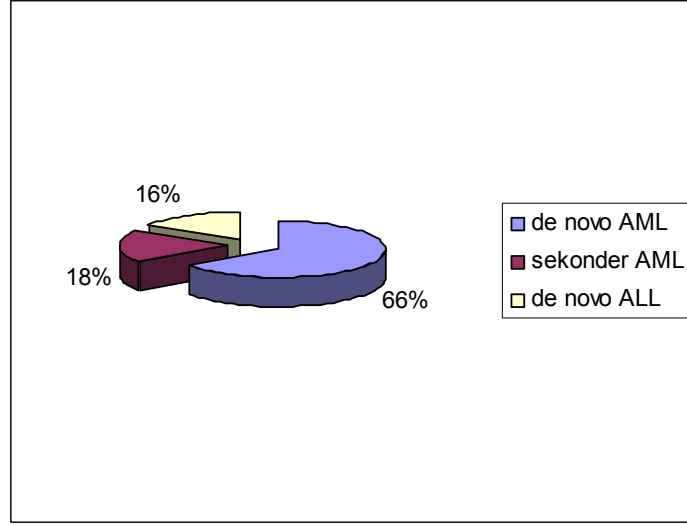
m-AML: Miyelodisplastik sendrom'dan transforme akut miyeloblastik lösemi

k-AML: Kronik miyelositer lösemi'den transforme akut miyeloblastik lösemi

T-ALL: T hücreli akut lenfoblastik lösemi

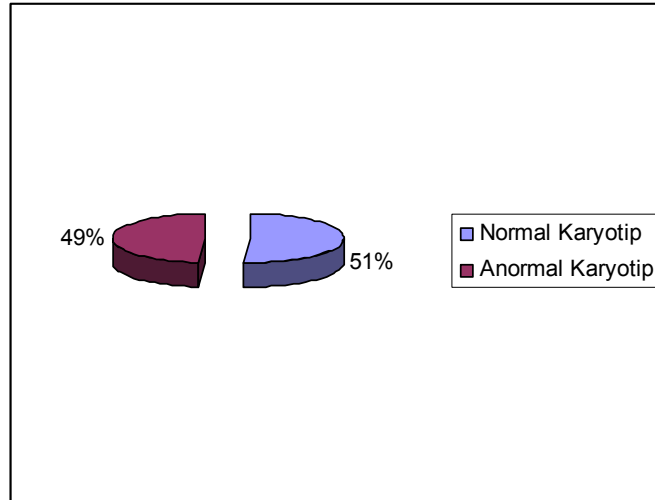
B-ALL: B hücreli akut lenfoblastik lösemi

49 olgunun 29'u (%59,20) erkek, 20'si (%40,80) kadındı. Olguların yaş ortalaması $51,29 \pm 2,41$ (18 – 76) idi. 38 olgu (%77,55) ilk tanı aşamasında, 11 olgu (%22,45) ise nüks aşamasında çalışmaya alındı. 32 olgu (%65,31) primer (de novo) AML, 3 olgu (%6,12) miyeloid blastik krizde KML, 6 olgu (%12,25) myeloid blastik krizde myelodisplastik sendrom (MDS), 1 olgu (%2,04) T-ALL ve 7 olgu (%14,29) B-ALL tanısına sahipti (Grafik-1).



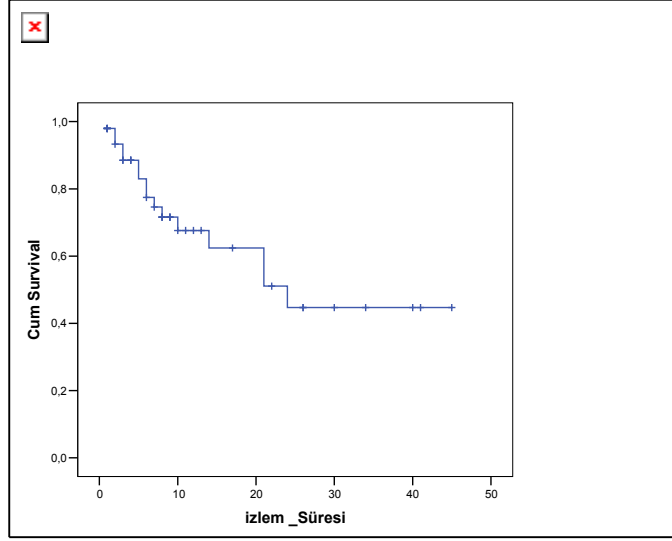
Grafik-1: Akut lösemi olgularımızın tanılarına göre dağılımı

49 olgunun 14'ünde konvansiyonel sitogenetik analiz üreme olmadığından veya örnek uygun olmadığından dolayı yapılamadı. Konvansiyonel sitogenetik analiz yapılan 35 olgunun 18'inde (%51,43) normal karyotip, 17'sinde (%48,57) ise anormal karyotip tespit edildi (Grafik-2).



Grafik-2: Normal ve anormal karyotip oranlarını gösteren grafik

Olguların ortalama izlem süresi $26,40 \pm 3,39$ (%95 güven aralığı, 19,79 – 33,11) hafta idi. Çalışma süresince, 49 olgunun 33'ü (%67,35) son takiplerinde hala hayatta iken, geriye kalan 16 olgu (%32,65) ise vefat etmişti (Şekil – 1).



Şekil – 1. İzlem süresi ve sağkalım arasındaki ilişki

Lösemik blastların hücre yüzeylerindeki Her-2/neu ekspresyon durumu analiz edildiğinde; primer AML (32 olgu, %65,31), sekonder AML (9 olgu, %18,37) ve T-ALL (1 olgu, %2,04) olgularının hiçbirinde Her-2/neu ekspresyonu saptanmaz iken, B-ALL (7 olgu, %14,29) olgularının yalnızca 1'inde (%14,29) Her-2/neu ekspresyonu tespit edildi (Tablo-2,3) (Grafik-3). Her-2/neu ekspresyonu negatif olarak değerlendirilen bir olgumuzun akım sitometri örneği şekil-2'de gösterilmiştir.

Tablo–2: Lösemik blastlarda Her-2/neu ekspresyon durumu

Blast	Pozitif/Toplam
AML	0/32
T-ALL	0/1
B-ALL (CD10 ⁺ , CD19 ⁺)	1/7
KML-BK-M	0/3
MDS-BK-M	0/6

AML: Akut miyeloid lösemi ALL: Akut lenfoblastik lösemi
KML: Kronik miyeloid lösemi BK-M: Miyeloid blastik kriz
MDS: Miyelodisplastik sendrom

Tablo-3: Her-2/neu ekspresyon durumunun olgulara göre dağılımı

Olgu No	Yaş/Cins	Tanı	Alt Tip	Hastalık durumu	Her-2/neu
1	54, E	m-AML	M2	Yeni	-
2	39, E	deAML	M2	Yeni	-
3	69, K	deAML	M4	Yeni	-
4	31, E	deAML	M1	Yeni	-
5	53, K	k-AML	M2	Yeni	-
6	23, K	deAML	M4	Nüks	-
7	40, E	deAML	M1	Yeni	-
8	70, E	m-AML	M0	Yeni	-
9	54, K	k-AML	M2	Yeni	-
10	43, K	deAML	M5	Nüks	-
11	76, E	deAML	M2	Yeni	-
12	50, E	deAML	M7	Yeni	-
13	52, K	deAML	M0	Yeni	-
14	70, K	deAML	M1	Yeni	-
15	63, K	deAML	M2	Yeni	-
16	45, E	deAML	M4	Yeni	-
17	50, E	deAML	M4	Nüks	-
18	61, E	deAML	M5	Yeni	-
19	57, E	k-AML	M2	Yeni	-
20	69, K	deAML	M3	Yeni	-
21	24, E	m-AML	M2	Nüks	-
22	50, K	deAML	M5	Nüks	-
23	75, E	deAML	M0	Yeni	-
24	37, E	deAML	M3	Nüks	-
25	73, E	m-AML	M1	Yeni	-
26	50, E	deAML	M1	Yeni	-
27	66, E	m-AML	M2	Yeni	-
28	59, E	deAML	M0	Yeni	-

29	53, K	deAML	M5	Yeni	-
30	18, K	deAML	M2	Nüks	-
31	55, E	deAML	M0	Nüks	-
32	62, E	deAML	M1	Yeni	-
33	73, E	deAML	M0	Yeni	-
34	61, K	deAML	M5	Yeni	-
35	47, K	deAML	M4	Yeni	-
36	68, E	deAML	M2	Yeni	-
37	65, K	deAML	M2	Yeni	-
38	43, E	deAML	M0	Yeni	-
39	64, E	deAML	M2	Yeni	-
40	74, E	m-AML	M5	Yeni	-
41	60, E	deAML	M0	Yeni	-
42	22, K	deALL	T	Nüks	-
43	37, E	deALL	B	Yeni	-
44	29, K	deALL	B	Nüks	-
45	26, K	deALL	B	Yeni	-
46	20, E	deALL	B	Yeni	+
47	42, E	deALL	B	Yeni	-
48	70, K	deALL	B	Yeni	-
49	21, E	deALL	B	Nüks	-

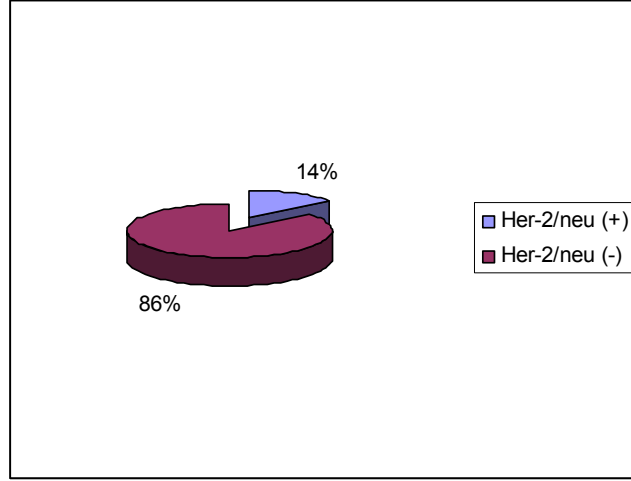
E: Erkek K: Kadın

m-AML: Miyelodisplastik sendrom'dan transforme akut miyeloblastik lösemi

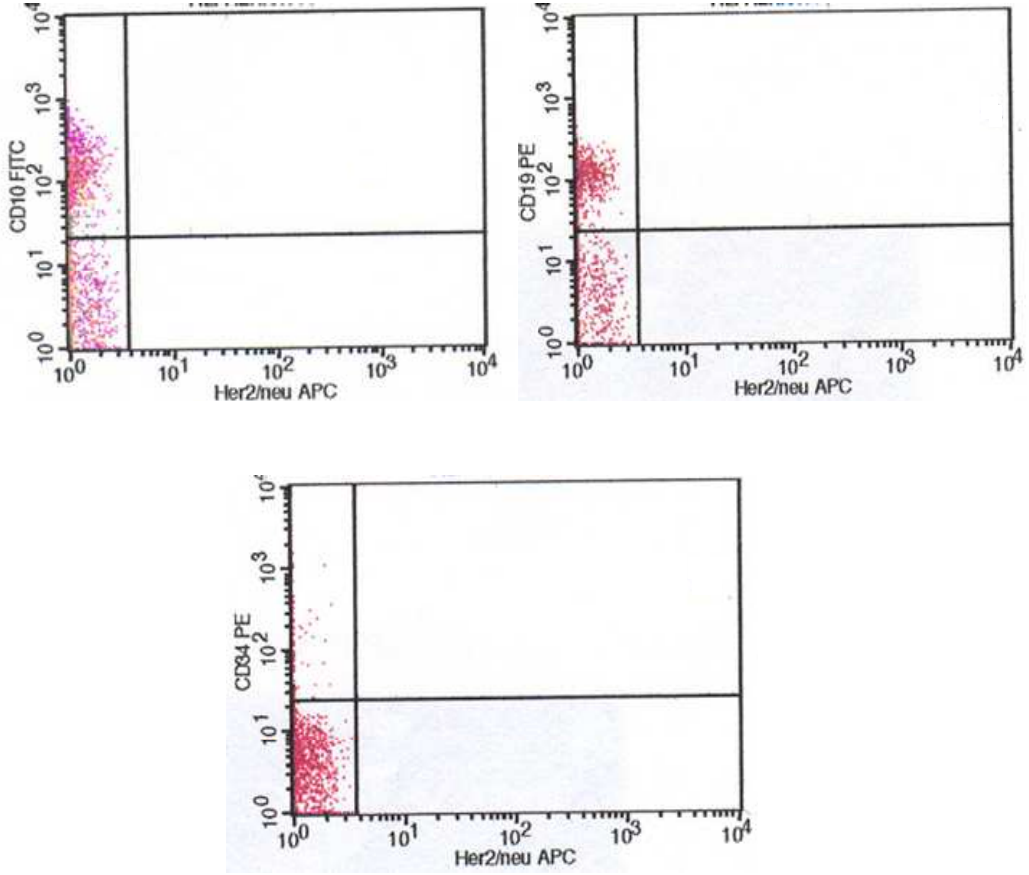
k-AML: Kronik miyelositer lösemi'den transforme akut miyeloblastik lösemi

T-ALL: T hücreli akut lenfoblastik lösemi

B-ALL: B hücreli akut lenfoblastik lösemi



Grafik-3: B hücreli akut lenfoblastik lösemi olgularımızda Her-2/neu ekspresyon durumu

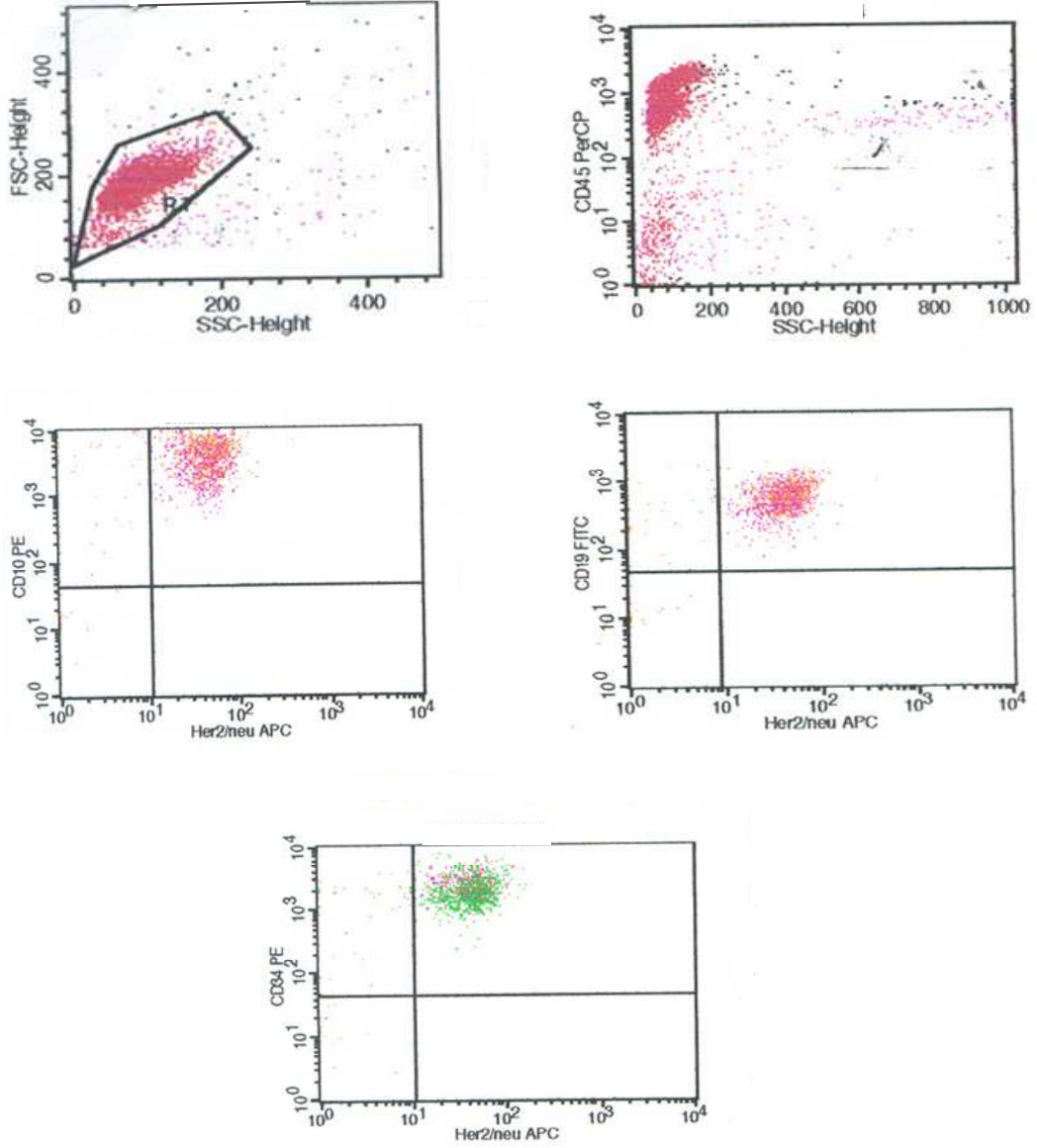


Şekil-2: Her-2/neu ekspresyonu negatif olarak değerlendirilen bir olgumuzun akım sitometri analizi.

Akut miyeloblastik lösemi tanılı 41 olgu incelendiğinde; 8 olgunun nüks, 33 olgunun ise tanı aşamasında çalışmaya alındığı görüldü. 6 olgu MDS'den, 3 olgu ise KML'den AML'ye transforme olmuştu. KML'den AML'ye transforme olan 3 olgu da çalışma periyodu içinde vefat etti. MDS'den AML'ye transforme olan 6 olgunun ise 1'i vefat etti. 32 de novo AML olgu alt grubu incelendiğinde; 9 olgunun çalışma periyodu içinde vefat ettiği görüldü. 32 de novo AML olgusunun 8'inde sitogenetik anomali saptanırken, 15 olguda normal karyotip tespit edildi. Dokuz olguda ise sitogenetik analiz yapılamadı. Sitogenetik anomalisi olan 8 olgunun 2'si, normal karyotipe sahip 15 olgunun ise 5'i çalışma periyodu içinde vefat etti.

Her-2/neu negatif 6 B-ALL'li olgu alt grubu incelendiğinde; 2 olgunun nüks, 4 olgunun ise tanı anında çalışmaya dahil edildiği görüldü. 5 olgu standart remisyon indüksiyon tedavisi aldı. Dört olguda tam remisyon sağlanırken, 1 olgu remisyon değerlendirilemeden infeksiyon nedeniyle kaybedildi. Konvansiyonel sitogenetik analizlerine göz atıldığında; 2 olguda anormal karyotip tespit edilirken, 3 olguda üreme olmadığından sitogenetik analiz yapılamadı. Bir olguda ise normal karyotip tespit edildi. Anormal karyotipe sahip olan 2 olgu da çalışma sonunda halen hayatta idi.

Her-2/neu ekspresyonu tespit ettiğimiz tek olgu 21 yaşında, primer B hücreli ALL (CD10⁺, CD19⁺) tanısı yeni konulan bir erkek hastaydı (olgu 46). Bu hastada, Her-2/neu ekspresyonu CD34⁺ hücrelerin %94,60'ında, CD10⁺ hücrelerin %94,71'inde ve CD19⁺ hücrelerin %89,08'inde tespit edildi (Şekil-3). Her-2/neu ekspresyonunun MFI'sı 40,85 olarak bulundu. Konvansiyonel sitogenetik analizde kompleks kromozomal anomali (46 XY; 46 XY, -14, +15; 46 XY, inversiyon(14)(q11.2-323)) tespit edildi. Standart birinci basamak ALL tedavisine yanıt vermeyen bu olgu, takibinin 10. haftasında infeksiyöz kaynaklı sebepten vefat etti.



Şekil-3: Her-2/neu ekspresyonu pozitif saptanan olgumuzun (olgu 46), akut lenfoblastik lösemi blastları üzerinde Her-2/neu ekspresyonunun akım sitometrik analizi; blast hücreleri tipik akut lenfoblastik lösemi belirteçleri olan CD34, CD10 ve CD19 ile boyanarak karakterize edilmiştir; CD10+, CD19+ ve CD34+ akut lenfoblastik lösemi blastlarındaki Her-2/neu ekspresyonu gösterilmiştir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Her-2/neu'nun, memeli hayvanların gelişimdeki rolü uzun zamandır bilinmektedir. Gelişmekte olan tavşan ve insan fetuslarında evre ve dokuya bağlı olarak Her-2/neu ekspresyonu varlığı gösterilmiştir (44). Her-2/neu ve Her4 eksikliği bulunan farelerde, kardiyak ve periferik sinir sistemi gelişimindeki aksaklıklar embriyonel ölüm ile sonlanmaktadır. Bu bulgular, HER reseptör ailesinin gestasyonel gelişimdeki gereklilik rolünü göstermektedir (45). Her-2/neu, Schwann hücre miyelinizasyonunun kontrolünde rol oynadığı gösterilen ilk sinyal molekülüdür (46). HER ailesi, normal meme dokusunun büyümesinde, farklılaşmasında ve apoptozisinde onkojenik olmayan birçok rol oynamaktadır (47, 48). Bunlara ek olarak fetal böbrek, mide, bağırsak, kalp, cilt, kas, kıkırdak ve kadın genital sistem epitelinde de Her-2/neu ekspresyon varlığı gösterilmiştir (44). Her-2/neu ekspresyonu zamanla azalma gösterse de fetal hayattan erişkin hayata kadar devam etmektedir.

Her-2/neu aşırı ekspresyonunun biyolojik ve terapötik önemi geçen zaman içinde daha iyi anlaşılmıştır. Deneysel çalışmalarda, Her-2/neu aşırı ekspresyonunun tümör hücrelerinin onkojenik transformasyonuna ve metastatik potansiyeline katkıda bulunduğu anlaşılmıştır (49). Çeşitli klinik çalışmalarda ise (26, 49, 50-52), başta meme ve over kanserleri olmak üzere birçok epitelyal tümörde Her-2/neu aşırı ekspresyonu ispatlanmıştır. Meme kanserlerinin %20-35'inde Her-2/neu'nun aşırı eksprese olduğu, kötü prognoz ve agresif seyir ile korelasyon gösterdiği saptanmıştır (53). Meme kanserleri üzerinde yapılan prelinik çalışmalar, Her-2/neu'nun baskı altında tutulmasının kanser hücrelerinde bulunan Her-2/neu ekspresyonunun malign fenotipini baskıladığını göstermiş olup, bu da Her-2/neu'nun çok iyi bir tedavi hedefi olabileceğine işaret etmiştir (54, 55). Bu bulgular ışığında, Her-2/neu glikoproteininin yüzey reseptörüne karşı humanize edilmiş bir monoklonal antikor olan trastuzumab (Herceptin^R) geliştirilmiştir. Trastuzumab'ın Her-2/neu eksprese eden ileri evre meme kanserlerindeki yararı klinik çalışmalar

ile kanıtlanmıştır (32-34). Günümüzde, Her-2/neu'yü hedef alan aşılama ve tirozin kinaz inhibitörleri gibi anti-reseptör tedaviler üzerinde çalışmalar devam etmektedir (53).

Hematopoetik dokularda Her-2/neu ekspresyonu hakkında mevcut bilgiler, bu konuda yapılmış az sayıdaki çalışmalardan gelmektedir. Örneğin, literatürde lösemilerde Her-2/neu ekspresyonunun araştırıldığı yalnızca 3 çalışma bulunmaktadır (40-42). Lösemi dışındaki diğer hematolojik kanserlerde de yapılmış çok az çalışma bulunmaktadır (35-39). Hodgkin ve non-Hodgkin lenfomalarda Her-2/neu ekspresyonu immünohistokimyasal yöntem kullanılarak araştırılmış, ancak ekspresyon tespit edilememiştir (35, 36). Musolini ve ark.'nın (37) KLL tanılı 40 hastanın periferik kan örneğinde FISH yöntemi ile Her-2/neu gen amplifikasyonunu araştırdıkları çalışmada, hiçbir olguda amplifikasyon tespit edilememiştir. Potti ve ark. (38) 31 multipl miyeloma olgusunda konvansiyonel immünohistokimyasal yöntem ile Her-2/neu ekspresyonunu araştırmışlardır. 31 hastanın 4'ünde (%13) Her-2/neu ekspresyonu tespit etmişlerdir. Ancak, olgu sayısının yetersiz olması nedeniyle hastalığa etkisi konusunda yorum yapamamışlardır. Utikal ve ark. (39) da Sezary sendromu tanılı hastaların bir kısmında Her-2/neu geni kopyalarının varlığını ve Her-2/neu proteininin ekspresyonunu göstermişlerdir.

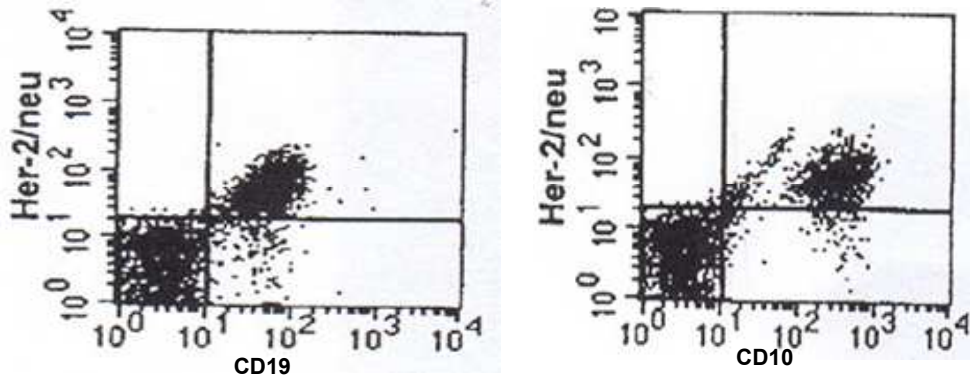
Önceleri, trombosit kökenli büyüme faktörü reseptörlerinin (TBF-R) ve epidermal büyüme faktörü reseptörlerinin yalnızca hematopoetik olmayan doku ve tümörlerde eksprese olduğu düşünülmekteydi. Ancak Tsai ve ark. (56) yakın tarihli çalışmalarında α -TBF-R mRNA'sının bazı B hücreli lenfoblastik hücre kültürlerinde eksprese olduğunu saptamışlardır. Bu bulgu, hematopoetik olmayan dokularda sık olarak eksprese olduğu bilinen tirozin kinaz reseptörlerinin bazı lösemi hücre tipleri yüzeylerinde de bulunabileceğini düşündürmüştür. Tsai ve ark.'nın (56) çalışması yayınlandıktan 1 yıl sonra, Bühring ve ark.'nın (40) lösemi hücrelerinde Her-2/neu ekspresyonunun ilk kez araştırıldığı çalışma yayınlanmıştır. Bu

çalışmada; ALL, AML, KLL ve KML hastalarının lösemik blastlarında ve sağlıklı donörlerin periferik kan ve kemik iliği hücrelerinden elde edilen hematopoetik hücre kültürlerinde, Her-2/neu mRNA ve Her-2/neu protein ekspresyonu araştırılmıştır. Araştırmacılar, AML, T-ALL, KLL ve miyeloid lösemi transformasyonu gösteren KML olgularının hiç birinde Her-2/neu ekspresyonu tespit edememiştir. Buna karşılık, Her-2/neu'nun yalnızca B hücreli lenfoblastik lösemisinin bazı alt tiplerinde eksprese olduğunu belirlemişlerdir. 36 B-ALL olgusunun 12'sinde (%33) Her-2/neu ekspresyonu tespit etmişlerdir. Aynı zamanda, CD10⁺ lenfoblastik lösemi transformasyonu gösteren 4 KML olgusunun 3'ünde Her-2/neu ekspresyonu saptamışlardır.

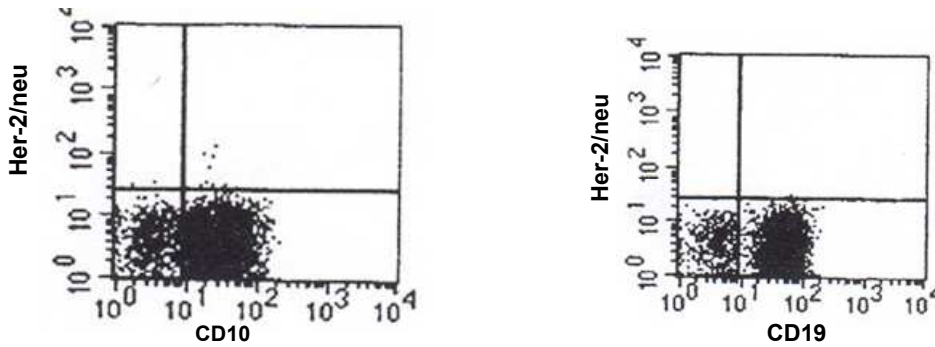
Bizim çalışmamızda, 41 olguyu oluşturan; de nova AML (32 olgu), miyeloid transformasyon gösteren KML (3 olgu) ve miyelodisplastik sendrom (6 olgu) ile T hücreli ALL (1 olgu) olgusunun hiç birinde Her-2/neu ekspresyonu saptanmadı. Çalışmamızda bulunan 7 B-ALL olgusunun tümü CD10⁺, CD19⁺ olup sadece 1'inde (%14,29) Her-2/neu ekspresyonu tespit edildi (Tablo 1). Her-2/neu ekspresyonunun MFI'sı 40,85 bulundu (Şekil 1). Bulgularımız, Bühring ve ark. (40) ile benzerdir. Çalışmalar arasındaki Her-2/neu ekspresyon insidansındaki fark (%33 vs %16,7), çalışmamızdaki B-ALL olgu sayısının daha az olmasına bağlı olabilir.

Müller ve ark. (41) da çalışmalarında Bühring ve ark. (40) ile benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Müller ve ark. (41) 2003 yılında yaptıkları çalışmalarında, Her-2/neu özgü monoklonal antikor kullanarak 33 B-ALL olgusunun blastlarında Her-2/neu ekspresyonunu analiz etmişlerdir. Otuz üç olgunun 5'inde (%15) Her-2/neu ekspresyonu saptadıklarını rapor etmişlerdir (Şekil-4, 5). Aynı zamanda, bu 5 olgunun tümünün erken nüks ya da standart tedaviye yanıtızsızlık gibi kötü sonlanım gösterdiklerini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da, Her-2/neu ekspresyonu saptanan tek olgu standart ilk basamak tedaviye yanıt vermemiş ve akabinde infeksiyon nedeniyle kaybedilmiştir. Standart remisyon indüksiyon tedavisi alan ve remisyon durumu değerlendirilebilen Her-2/neu negatif 4 B-ALL olgumuzda ise tam

remisyon elde edilmişti. Gerek bizim gerekse Müller ve ark.'nın (41) çalışmalarında, Her-2/neu ekspresyonu gösteren olgular kötü sonlanım göstermiş olsalar bile hem vaka sayısının azlığı hem de diğer konvansiyonel prognostik belirteçler ile ilişkisi analiz edilmediği için, Her-2/neu ekspresyonunun prognostik önemi olup olmadığı konusunda yorum yapılabilme zordur. Müller ve ark. (41) aynı zamanda, Her-2/neu ürünü peptide spesifik sitotoksik T hücreleri ile Her-2/neu pozitif ALL blastlarının parçalanabileceğini göstermişlerdir. Müller ve ark. (41) bu bulguları ile aşılama gibi Her-2/neu'yü hedef alan tedavilerin ALL hastalarında uygulanabileceğini ileri sürmüşlerdir.



Şekil-4: Müller ve ark.'nın (41) çalışmasında, Her-2/neu ekspresyonu pozitif olarak değerlendirilen bir olgunun akım sitometri örneği



Şekil-5: Müller ve ark.'nın (41) çalışmasında, Her-2/neu ekspresyonu negatif olarak değerlendirilen bir olgunun akım sitometri örneği

Akut lösemilerde Her-2/neu ekspresyonu ile ilgili yapılmış olan en yakın tarihli çalışma 2004 yılında Chevallier ve ark. (42) tarafından gerçekleştirilmiştir. Chevallier ve ark.'nın (42) çalışması; 87'si B hücreli, 13'ü T hücreli olmak üzere toplam 100 ALL olgusu içermektedir. 93 olgu yeni tanı, 7 olgu ise nüks aşamasında iken çalışmaya dâhil edilmişti. Chevallier ve ark. (42) da Bühring ve ark. (40), Müller ve ark. (41) ve bizim çalışmamızda olduğu gibi akım sitometri yöntemi ile blast yüzeylerindeki Her-2/neu ekspresyonunu analiz etmeyi amaçlamışlardır. Chevallier ve ark. (42) çalışmalarında, 13 T-ALL olgusunun hiçbirinde Her-2/neu ekspresyonu tespit edemezken, 87 B-ALL olgusunun 15'inde (%17) Her-2/neu ekspresyonu tespit edebilmişlerdir. Her-2/neu ekspresyonun yalnızca B-ALL olgularında ve ancak %17'sinde tespit edebilmiş olmaları, bizim çalışmamız ve diğer araştırmacıların (40, 41) sonuçları ile son derece benzerlik göstermektedir. Chevallier ve ark. (42) çalışmalarında Her-2/neu ekspresyonunun kemoterapiye rezistans ile ilişkili olduğunu saptamışlardır (%50 karşılık %11, $p=0,03$). Bu çalışma, lösemilerde Her-2/neu ekspresyonun kemoterapiye rezistans ile ilişkili olduğunu gösteren ilk çalışmadır. Ayrıca, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da Her-2/neu pozitifliğinin refrakter hastalık (%41 karşılık %11, $p=0,08$) ve nüks (%55 karşılık %36, $p=0,08$) ile uyumluluk eğilimi gösterdiğini belirlemişlerdir. Her-2/neu ekspresyonu gösteren ve göstermeyen gruplarda konvansiyonel prognostik özelliklerin benzer olması da bulgularının güvenilir olduğunu desteklemektedir. Araştırmacılar, tespit ettikleri bu önemli bulgular ışığında Her-2/neu ekspresyonunun B-ALL için kötü prognoz göstergesi olabileceğini ve bu tür olgularda anti Her-2/neu monoklonal antikor tedavisinin terapötik faydası olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Solid organ tümörlerinde, Her-2/neu ekspresyonunun analizinde çoğunlukla immünohistokimyasal ya da FISH yöntemi kullanılmıştır. Bizim çalışmamız ve diğer 3 çalışmada da (Bühring, Müller ve Chevallier ark. (40-42)) Her-2/neu spesifik monoklonal antikor içeren akım sitometri yöntemi kullanılmıştır. Akım sitometri yöntemi, lösemiler de dahil olmak üzere birçok

hematolojik kanserde uzun yıllardır tanısal amaçlı güvenle kullanılan bir yöntem olmasına karşın, Her-2/neu ekspresyonu ile ilgili yapılmış çok az çalışma olduğundan bu konudaki güvenilirliği şüphe uyandırabilir. Ancak, Lostumbo ve ark.'nın (57) 4 farklı meme kanseri hücre kültürü ve 1 normal meme epitelyal hücre kültürü üzerinde, akım sitometri yöntemi ile Her-2/neu ekspresyonu varlığını göstermeleri ve buna ek olarak ekspresyonunun diğer konvansiyonel yöntemler kullanılarak saptanan ekspresyon paternleri ile korelasyon göstermesi, bu şüphenin yersiz olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, çalışmamızda ve diğer 3 çalışmada da (Buhring, Müller ve Chevallier ark. (40-42)) Her-2/neu ekspresyon sıklıklarının benzer olması analizlerin teknik açıdan güvenilir olduğunu göstermektedir.

Meme kanserinde Her-2/neu protein aşırı ekspresyonunun, Her-2/neu gen amplifikasyonu yoluyla gerçekleştiği bilinmektedir (53). Diğer bazı solid kanserlerde ise, Her-2/neu protein aşırı ekspresyon sıklığı farklılıklar göstermekte ve genellikle ekspresyon gen amplifikasyonuna oranla daha belirgin olmaktadır (50-52). Bu bulgular meme kanseri dışındaki diğer bazı epitelyal tümörlerde, Her-2/neu protein aşırı ekspresyonunun gen amplifikasyonundan çok gen deregülasyonu yoluyla geliştiğini düşündürmektedir. Her-2/neu pozitif B-ALL olguları için de bu teori ile paralel olarak, Her-2/neu ekspresyonunun gen amplifikasyonu yolu ile değil de, transkripsiyonel aktivasyon ya da gen derüglasyonu veya post-translasyon modifikasyonları gibi farklı mekanizmalar ile gerçekleştiği düşünülebilir.

Bizim çalışmamızda ayrıca, akım sitometri yöntemi ile Her-2/neu protein ekspresyonu saptadığımız olguda FISH yöntemi ile Her-2/neu gen amplifikasyonu da araştırıldı. FISH analizi negatif olarak saptandı. Bizim çalışmamıza benzer şekilde, Chevallier ve ark. (42) da çalışmalarında Her-2/neu pozitif 15 B-ALL olgusuna FISH analizi yapmışlar ve olguların hiçbirinde gen amplifikasyonu tespit edememişlerdir.

Sonuç olarak çalışmamızda, bu konu ile ilgili literatürde bulunan az sayıdaki çalışma sonuçları ile paralellik olduğu, Her-2/neu'nun B hücreli lenfoblastik lösemilerin bazı alt tiplerinde (CD10⁺, CD19⁺) eksprese olabileceği ve AML olgularında Her-2/neu ekspresyonunun olmadığı gösterildi. Olgu sayımızın azlığı ve kısa izlem süreleri nedeniyle Her-2/neu ekspresyonunun prognostik önemi ve diğer konvansiyonel prognostik faktörler ile olan ilişkisi hakkında yorum yapılamadı. Her-2/neu ekspresyonu gösteren olgumuzun standart tedaviye yanıt vermemesi Her-2/neu ekspresyonunun kemoterapiye rezistans ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Son olarak, Her-2/neu ekspresyonunun lösemilerin (özellikle B-ALL) patogenezindeki rolünün, prognostik öneminin ve lösemi tedavisindeki yerinin belirlenebilmesi için geniş çaplı çalışmalara ihtiyaç olduğu kanısındayız.

GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME METNİ**ÇALIŞMANIN BAŞLIĞI:** Akut Lösemilerde Her2/neu ekspresyonu**GÖNÜLLÜNÜN ADI:** _____**1. BU ÇALIŞMANIN İÇERİK VE AMACI**

Her2/neu diğer adıyla C-erb-B2 isimli madde vücuttaki hücrelerin büyümesinden sorumlu faktör ailesinden kanser oluşturucu bir öncül proteindir. Bu proteinin aşırı salınımı hücrenin kansere dönüşümüyle ve kanserin yayılma potansiyeli ile ilişkili bulunmuştur. Bu çalışmanın amacı kan kanserinde kanser hücrelerinin her2/neu salgılayıp salgılamadıklarının araştırılmasıdır. Ayrıca eğer salgıladıkları gösterilirse bunun kan kanserinin tipine göre, kanserin tanısının yeni konmuş olmasına veya nüks etmiş kanser olmasına göre değişkenlik gösterip göstermediği de araştırılacaktır.

2. İZLENECEK OLAN YÖNTEMLERİN AÇIKLANMASI**A. DENEYSEL İŞLEMLER VE TEDAVİ**

Çalışmaya Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalına başvuran kan kanseri ön tanısı olan veya bilinen kan kanseri varlığında nüks olduğu düşünülen her hastadan kesin tanının konulabilmesi ve kan kanserinin alt tipinin belirlenebilmesi için kemik iliğinden 2-3 cc kadar örnek alınmaktadır. Kemik iliği aspirasyonu olarak adlandırılan bu işlem o bölgenin cilt altına yapılan uyuşturucu ilaç ile uyuşturulması sonrasında kalça kemiğinden veya sternumdan yapılmaktadır. Bu işlem Bilim Dalımızda her kan kanseri ön tanısı ile araştırılan hastaya yapılan rutin bir işlemdir. Bu alınan kemik iliği örneğinden rutin olarak çalışılan testlere ek olarak Her2/neu isimli madde bakılacaktır. Bu çalışma için size ek bir tanı işlemi yapılmayacaktır.

B. ÇALIŞMANIN TAHMİN EDİLEN SÜRESİ VE KATILMASI BEKLENEN GÖNÜLLÜ SAYISI

Çalışma tahmini olarak 9 ay sürecektir ve çalışmaya 60 hastanın dâhil edilmesi planlanmaktadır.

3. YUKARIDA AÇIKLANAN ÇALIŞMA ESNASINDA UYGULANACAK OLAN İŞLEM VE TEDAVİLERİN GÖNÜLLÜYE GETİREBİLECEĞİ EK RİSK VE RAHATSIZLIKLAR

Çalışma amacıyla uygulanacak yöntem, normal uygulamalardan her hangi bir fark içermemektedir ve gönüllüye ek risk ya da rahatsızlık getirmeyecektir.

4. BU ÇALIŞMANIN GETİREBİLECEĞİ OLUMLU NOKTALAR

Bu çalışma kapsamında yapılan ek laboratuvar tetkikleri için sizden veya kurumunuzdan ücret talep edilmeyecektir veya size ek bir ücret ödenmeyecektir. Bu çalışmaya katkılarınız sonucu elde edilen veriler toplanıp değerlendirildiğinde hastalığın erken nüks etmesinde veya verilen kemoterapi ilaçlarına dirençle ilişkili olup olmadığına göre yeni tedavi yöntemleri için yapılacak çalışmalara fayda sağlayacaktır. Dolayısıyla bu bilgiler gelecekte kan kanseri hastalarının yararına kullanılabilir.

5. KATILMA VE ÇIKMA

Bu çalışmaya katılmakta veya katılmamakta özgürsünüz. Katılmamanız halinde kliniğimiz veya polikliniğimizde takiplerinize uygulanmakta olan tanısal girişimler ve tedavi değişmeyecek, aynı şekilde devam edecektir. Katılmanız halinde dilediğiniz zaman çalışmadan

ayrılabilirsiniz. Ayrılmanız halinde rutin takibiniz kliniğimizde aynen devam ettirilecektir. Ayrıca, sorumlu doktor uygun gördüğü durumlarda çalışma dışında bırakılabileceksiniz.

6. MASRAFLAR

Yapılan çalışmada kullanılan laboratuvar tetkikleri için sizden veya kurumunuzdan herhangi bir ücret talep edilmeyecek veya size bir ücret ödenmeyecektir.

7. GİZLİLİK

Kanuni zorunlulukların ortaya çıktığı durumlar dışında kimlik bilgileriniz sorumlu doktordan ve onay alınmasına tanıklık eden kuruluş görevlisinden başka kimse tarafından (teknisyenler dâhil) bilinmeyecek ve çalışmanın yayınlandığı veya sunulduğu yerlerde gizli tutulacaktır. Ancak, kanuni zorunlulukların ortaya çıktığı durumlarda size ait kimlik bilgileri yetkili kurum ve/veya kuruluşlar tarafından incelenebilecektir.

BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU

Ben, (gönüllünün adı), yukarıdaki metni okudum ve katılmam istenen çalışmanın kapsamını ve amacını, gönüllü olarak üzerime düşen sorumlulukları tamamen anladım. Çalışma hakkında soru sorma ve tartışma imkanı buldum ve tatmin edici yanıtlar aldım. Bana, çalışmanın muhtemel riskleri ve faydaları açıklandı. Bu çalışmayı istediğim zaman ve herhangi bir neden belirtmek zorunda kalmadan bırakabileceğimi ve bıraktığım zaman tedavimi üstlenenlerin herhangi bir ters tutumu ile karşılaşmayacağımı anladım.

Bu koşullarda söz konusu Klinik Araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

GönüllününAdı-

Soyadı:.....

İmzası:.....

.....

Adresi (varsa Telefon No, Faks No):.....

.....

.....

Tarih (gün/ay/yıl):...../...../.....

Velayet veya Vesayet Altında Bulunanlar İçin
Veli veya Vasisinin
Adı

Soyadı:.....

.....

İmzası:.....

.....

Adresi:.....

.....

Tarih (gün/ay/yıl):...../...../.....

Açıklamaları Yapan Araştıracının (Doktorun) Adı-

Soyadı:.....

İmzası:.....

.....

Tarih (gün/ay/yıl):...../...../.....

Onay Alma İşlemine Başından Sonuna Kadar Tanıklık Eden Kuruluş

Görevlisinin

Adı-

Soyadı:.....

.....

İmzası:.....

.....

Görevi:.....

.....

Tarih (gün/ay/yıl):...../...../.....

KAYNAKLAR

1. Deschler B, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer* 2006; 107: 2099-107
2. Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 2005; 16: 481-88
3. Appelbaum FR, Rowe JM, Radich J, Dick JE. Acute myeloid leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2001: 62-86
4. Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relaps, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* 2002; 100: 4325-36
5. Leith CP, Kopecky KJ, Godwin J, et al. Acute myeloid leukemia in the elderly: assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetics distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy. A Southwest Oncology Group Study. *Blood* 1997; 89: 3323-9
6. Bassan R, Gatta G, Tondini C, Willemze R. Adult acute lymphoblastic leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 50: 223-61
7. Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 2006; 368: 1894-907
8. Mrozek K, Heinonen K, Bloomfield CD. Clinical importance of cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001; 14: 19-47
9. Schlenk RF, Benner A, Krauter J, et al. Individual patient data-based meta-analysis of patients aged 16 to 60 years with core binding factor acute myeloid leukemia: a survey of the German Acute Myeloid Leukemia Intergroup. *J Clin Oncol* 2004; 15: 3741-50
10. Care RS, Valk PJ, Goodeve AC, et al. Incidence and prognosis of c-KIT and FLT3 mutations in core binding factor (CBF) acute myeloid leukaemias. *Br J Haematol* 2003; 121: 775-77
11. Schnittger S, Kohl TM, Haferlach T, et al. KIT-D816 mutations in AML1-ETO positive AML are associated with impaired event-free and overall survival. *Blood* 2006; 107: 1791-9
12. GFCH. Cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia: correlations with hematologic findings outcome. A Collaborative Study of the Group Francais de Cytogenetique Hematologique. *Blood* 1996; 87: 3135-42
13. Bullinger L, Valk PJM. Gene expression profiling in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2005; 23: 6296-305

14. Bienz M, Ludwig M, Leibundgut EO, et al. Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1416-24
15. Yanada M, Suzuki M, Kawashima K, et al. Long-term outcomes for unselected patients with acute myeloid leukemia categorized according to the World Health Organization classification: a single center experience. *Eur J Haematol* 2005; 74: 418-23
16. Boucheix C, David B, Sebban C, et al. Immunophenotype of adult acute lymphoblastic leukemia clinical parameters, and outcome: an analysis of a prospective trial including 562 tested patients (LALA87). French Group on Therapy for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood* 1994; 84: 1603-12
17. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, et al. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 2001; 344: 1038-42
18. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2002; 344: 1031-37
19. Huang M, Ye YC, Chen S, et al. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1988; 72: 567-72
20. Coiffier B, Lepage E, Briere J, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002; 346: 235-42
21. Keating MJ, Flinn I, Jain V, et al. Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: results of a large international study. *Blood* 2002; 99: 3554-61
22. Gökbuğet N, Hoelzer D. Novel antibody-based therapy for acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006; 19: 701-13
23. Amadori S, Stasi R. Monoclonal antibodies and immunoconjugates in acute myeloid leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006; 19: 715-36
24. Van der Heiden PLJ, Jedema I, Willemze R, Barge RMY. Efficacy and toxicity of gemtuzumab ozogamicin in patients with acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* 2006; 76: 409-13
25. Bargmann CL, Hung MC, Wienberg RA. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 1986; 319: 226-30
26. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235: 177-82

27. Tzahar E, Waterman H, Chen X, et al. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 5276-87
28. Petit AM, Rak J, Hung MJ, et al. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and erbB-2/neu receptor kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo. Angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol* 1997; 151: 1523-30
29. Henson ES, Hu X, Gibson SB. Herceptin sensitizes ErbB2-overexpressing cells to apoptosis by reducing antiapoptotic Mcl-1 expression. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 845-53
30. Pegram MD, Lopez A, Konecny G, Slamon DJ. Trastuzumab and chemotherapeutics: drug interactions and synergies. *Semin Oncol* 2000; 27 (Suppl 11): 21-5
31. McKeage K, Perry CM. Trastuzumab: a review of its use in the treatment of metastatic breast cancer overexpressing HER2. *Drugs* 2002; 62: 209-43
32. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2 overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2639-48
33. Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim YM, Mendelsohn J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin TM) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against Her2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res* 1998; 58: 2825-31
34. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpress HER2. *N Engl J Med* 2001; 344: 783-92
35. Luftner D, Genvresse I, Geppert R, et al. Lack of Her-2/neu overexpression in non-Hodgkin's lymphoma. *Anticancer Res* 2004; 24: 3233-7
36. Bairey O, Pazgal I, Okon E, Shaklai M, Morgenshtern S. Lack of Her-2/neu expression in Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126: 574-76
37. Musolini A, Bozzetti C, Pezzuolo D, et al. Lung cancer in patients with chronic lymphocytic leukemia: Does the HER-2 oncogene play a role. *Lung Cancer* 2005; 50: 419-20
38. Potti A, Ganti AK, Koch M, Levitt R, Mehdi SA. Immunohistochemical identification of HER-2/neu overexpression and CD117 (c-kit) expression in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 2002; 43: 2427-30

39. Utikal J, Poenitz N, Gratchev A, et al. Additional Her 2/neu gene copies in patients with Sezary syndrome. *Leuk Res* 2006; 30: 755-60
40. Bühring HJ, Sures I, Jallal B, et al. The receptor tyrosine kinase p185^{HER2} is expressed on a subset of B-lymphoid blasts from patients with acute lymphoblastic leukemia and chronic myeloid leukemia. *Blood* 1995; 86: 1916-23
41. Müller MR, Grünebach F, Kayser K, et al. Expression of Her-2/neu on acute lymphoblastic leukemias: implications for the development of immunotherapeutic approaches. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 3448-53
42. Chevallier P, Robillard N, Wuilleme-Toumi S, et al. Overexpression of Her2/neu is observed in one third of adult acute lymphoblastic leukemia patients and is associated with chemoresistance in these patients. *Haematologica* 2004; 89: 1399-401
43. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematother* 1996; 5: 213-26
44. Pres MF, Cordon-Cardo C, Slamon D. Expression of the Her-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene* 1990; 5: 953-62
45. Lee KF, Simon H, Chen H, et al. Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* 1995; 378: 394-8
46. Britsch S, Li L, Kirchhoff S, et al. The ErbB2 and ErbB3 receptors and their ligand, neuregulin-1, are essential for development of the sympathetic nervous system. *Genes Dev* 1998; 12: 1825-36
47. Sebastian J, Richards RG, Walker MP, et al. Activation and function of the epidermal growth factor receptor and erbB-2 during mammary gland morphogenesis. *Cell Growth Differ* 1998; 9: 777-85
48. Yang Y, Spitzer E, Meyer D, et al. Sequential requirement of hepatocyte growth factor and neuregulin in the morphogenesis and differentiation of the mammary gland. *J Cell Biol* 1995; 131: 215-26
49. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the Her-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science (Wah. DC)* 1989; 244: 707-12
50. Goebel SU, Iwamoto M, Raffeld M, et al. Her-2/neu expression and gene amplification in gastrinomas: correlations with tumor biology, growth and aggressiveness. *Cancer Res* 2002; 62: 3702-10
51. Latif Z, Watters AD, Bartlett JM, Underwood MA, Aitchison M. Gene amplification and overexpression of HER2 in renal cell carcinoma. *BJU Int* 2002; 89: 5-9
52. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Franklin VA, et al. Evaluation of HER2/neu gene amplification and protein expression in non-small cell lung carcinomas. *Br J Cancer* 2002; 86: 1449-56

53. Menard S, casalini P, Campiglio M, Pupa SM, Tagliabue E. Role of HER2/neu in tumor progression and therapy. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 2965-78
54. Yu D, Liu B, Tan M, et al. Over expression of c-erbB-2/neu I breast cancer cells confers increased resistance to Taxol via mdr-1-independent mechanisms. *Oncogene* 1996; 13: 1359-65
55. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer International (Ludwig) Breast Cancer Study. *J Clin Oncol* 1992; 10: 1049-56
56. Tsai LH, White L, Raines E, et al. Expression of platelet-derived growth factor and its receptors by two pre-B acute lymphoblastic cell lines. *Blood* 1994; 83: 51-5
57. Lostumbo A, Mehta D, Setty S, Nunez R. Flow cytometry: A new approach for the molecular profiling of breast cancer. *Exp Mol Pathol* 2006; 80: 46-53

TEŞEKKÜR

Hematoloji yan dalı eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleri ile eğitimime katkıda bulunan, başta Prof. Dr. Ahmet Tunalı olmak üzere tüm Hematoloji Bilim Dalı Öğretim üyelerine ve çalışma arkadaşlarıma; tezimin oluşmasında bana yol gösteren, desteğini esirgemeyen ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tez danışmanım Prof. Dr. Rıdvan Ali'ye; Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Güher Göral nezdinde tüm öğretim üyelerine ve çalışanlarına; tezimin oluşmasında çok önemli katkıları bulunan Uzman Biyolog Selçuk Sözer'e ve Uzman Biyolog Ferah Budak'a; Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'ndan Yard. Doç. Dr. Tuna Gülten'e, Doç. Dr. Tahsin Yakut'a ve tüm araştırma görevlilerine ve Bioistatistik Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. İlker Ercan'a teşekkür ederim. Bana olan desteklerini esirgemeyen sevgili eşim Melekber Özkan'a, aileme ve dostlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

ÖZGEÇMİŞ

02.01.1974 yılında İstanbul'da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Adana'da tamamladıktan sonra, 1990 yılında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde doktorluk eğitimime başladım ve 1997 yılında tıp doktoru unvanı ile mezun oldum. 1998 yılı Mayıs – Ağustos ayları arasında Rize'de pratisyen hekim olarak çalıştım. Aynı yıl Eylül ayında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak göreve başladım. 2003 Eylül ayında İç Hastalıkları Uzmanı unvanını kazandım. Kasım 2003 tarihinde Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı'nda yan dal uzmanlığına başladım.