

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya (sol yandaki gibi) olacak .

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HEMATOPOİETİK VE KANSER KÖK HÜCRELERİN
HİPOKSİK KOŞULLARDAKİ FONKSİYONEL VE
GENOMİK YANITLARI**

CAN VEYSEL ŞOROĞLU

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. SELÇUK SÖZER TOKDEMİR**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Can Veysel ŞOROĞLU

ITHAF

Tüm Miyeloproliferatif Neoplazi hastalarına ve ailelerine ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimine başlama kararı almamda büyük rolü olan, her türlü sürecimde anlayışıyla desteğini esirgemeyen danışmanım Selçuk Sözer Tokdemir'e,

Yüksek lisans eğitimim süresince her türlü yardım ve destekleri için laboratuvar arkadaşlarım İldeniz Uslu Bıçak, Hilal Hekimoğlu, Cemil Altunay, Burcu Sarya Tunç ve Tuğba Aydınтуğ Gürbüz'e,

Çalışmalarımındaki her türlü yardım ve destekleri için Abdullah Yılmaz, Aris Çakiris, Burcu Salman, Çağrı Güleç, Güven Toksoy ve Khusan Khodzhaev'e,

Bir aile olan ve son iki yılımda beni de içlerinden biri gibi kabul eden İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarım ve arkadaşlarıma,

Eğitimin en değerli miras olduğunu aşıl原因an ve bu yolda hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, merak ve sorgulama duygularımı en küçük yaşımdan beri destekleyen annem Nezahat Gülmez Şoroğlu ve babam Sabri Şoroğlu'na, en büyük öğretmenim olan kardeşim Emre Can Şoroğlu'na,

Her zaman temiz ve yumuşak tüyleri için kedi Reçel'e, müzik seven dalgacı Naruto'ya ve yamyam Meti'ye,

Belgesel, kazı, kitap, konser ve yol arkadaşım Ezgi Gizem Berkay'a,

Dağların derinlerini büyük tamahkarlıkla kazan, mahir madenciler olan Cüceler'e teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 30031

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	Xİİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kök Hücre	4
2.1.1. Hematopoetik Kök Hücre	4
2.1.2. Kanser Kök Hücresi	5
2.1.3. Kemik İliği ve Mikroçevre.....	6
2.1.4. Hipoksi ve Reaktif Oksijen Türleri	8
2.1.5. Hipoksi ve Kanser	9
2.2. Miyeloproliferatif Neoplaziler	10
2.2.1. Tarihçe	10
2.2.2. Miyeloproliferatif Neoplazilerde Görülen Genetik Varyasyonlar	12
2.2.3. Myeloproliferatif Neoplazi Tipleri.....	13
2.2.4. Flebotomi.....	15
2.2.5. JAK – STAT Sinyal İletim Sistemi	16
2.2.5.1. Janus Kinazlar.....	16
2.2.5.2. Sinyal İletici ve Transkripsiyon Artırıcılar	17
2.2.5.3. Sitokinler.....	17
2.3. Hipoksi ve MPN İlişkisi.....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
3.1. Gereç.....	19

3.1.1. Hasta Örnekleri	19
3.1.2. Kontrol Örnekleri.....	21
3.1.3. Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler	21
Tablo 3 – 2: Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	21
Tablo 3 – 3: Çalışmalarda Kullanılan Kitler	22
3.1.5. Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar	22
Tablo 3 – 4: Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar.....	22
3.1.6. Çalışmalarda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler.....	23
Tablo 3 – 5: Çalışmalarda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	23
3.2. Yöntem.....	24
3.2.1. Periferik Kandan Mononükleer Hücre İzolasyonu	24
3.2.2. Hücre Dondurma.....	25
3.2.3. Hücre Çözme.....	25
3.2.4. Hücrelerin Yüzey Belirteçleri ile Ayrılması	26
3.2.5. CD34 ⁺ ve CD34 ⁻ Mononükleer Hücrelerin CellASIC ONIX cihazı ile Farklı Oksijen Düzeylerinde Kültürü	27
3.2.5.1. CellASIC ONIX Mikroakışkan Platform.....	27
3.2.5.2. CellASIC ONIX M04S-03 Mikroakışkan Tabak.....	27
3.2.5. Hipoksi Uygulaması.....	29
3.2.7. İki Aşamalı Alele Özgü PZR	29
3.2.8. Agaroz Jel ile Görüntüleme	32
3.2.9. Mononükleer Hücrelerden RNA İzolasyonu	32
3.2.10. Ters Transkriptaz PZR ve Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR.....	32
3.2.11. Akım Ölçer Cihazı ile Hücre Yüzey Analizi	33
3.2.12. Annexin V Apoptoz Deneyi.....	34
3.2.13. Gen Anlatım Verilerine Ait İstatistiksel Analiz.....	34
4. BULGULAR.....	36
4.1. RNA İzolasyon Sonuçları	36
4.2. İki Aşamalı Nested PZR Sonuçları	37
4.3. Gen İfadesi Sonuçları.....	37
4.4. Annexin V – 7-AAD Apoptoz/Nekroz Deneyi.....	43
5. TARTIŞMA	44
KAYNAKLAR	48

ETİK KURUL KARARI	55
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	56
ÖZGEÇMİŞ	57



TABLOLAR LISTESİ

Tablo 2 – 1: Miyeloproliferatif Neoplaziler Tarihçesi.....	11
Tablo 2 – 2: Janus Kinaz ve STAT Ailesi.....	16
Tablo 2 – 3: Bağlandıkları Reseptör Tipine Göre Sitokinler.....	18
Tablo 3 – 1: Hastaların Klinik Parametreleri.....	19
Tablo 3 – 2: Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	21
Tablo 3 – 3: Çalışmalarda Kullanılan Kitler.....	22
Tablo 3 – 4: Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar.....	22
Tablo 3 – 5: Çalışmalarda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler.....	23
Akış Şeması 1: Periferik Kandan Mononükleer Hücre İzolasyonu.....	24
Tablo 3 – 6: Hücre Sayımında Kullanılan Formül.....	25
Akış Şeması 2: Mononükleer Hücrelerin Dondurulması.....	25
Akış Şeması 3: Mononükleer Hücrelerin Eritilmesi.....	25
Akış Şeması 4: CD34 Mikroboncuk Yöntemi ve Kolon İzolasyonu.....	26
Tablo 3 – 7: İki Aşamalı Alele Özgü PZR Primerleri.....	30
Tablo 3 – 8: İki Aşamalı Alele Özgü PZR Basamakları.....	30
Tablo 3 – 9: İki Aşamalı Alele Özgü PZR Bileşenleri.....	31
Tablo 3 – 10: UPL Prob Bilgileri.....	33
Tablo 3 – 11: <i>HIF1α</i> , <i>NOS3</i> ve <i>GAPDH</i> Primer Dizileri.....	33
Akış Şeması 5: Akım Ölçer Cihazı ile Hücre Yüzey Analizi.....	33
Akış Şeması 6: Annexin V Uygulaması Yapılan Gruplar.....	34
Tablo 4 – 1: Mononükleer Hücrelerden İzole Edilen RNA Örneklerinin Ölçüm Değerleri.....	36
Tablo 4 – 2: Hastaların Mutasyon Durumları.....	37

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3 – 1: CellASIC ONIX Mikroakışkan Platform (Gaz Karıştırıcı).....	27
Şekil 3 – 2: CellASIC ONIX M04S-03 Mikroakışkan Tabak.....	28
Şekil 3 – 3: M04S Hücre kültür tabağı inkübasyon alanı ve iç kanal yapısı.....	28
Şekil 3 – 4: Vakumlu kültür tabağı kapağı ve bağımsız gaz iletim kanalları.....	29
Şekil 4 – 1: PV Hastalarının Hipoksik Koşullardaki <i>HIF1α</i> Gen Anlatımı ($\Delta\Delta Ct$).....	38
Şekil 4 – 2: PV Hastalarının Anoksik Koşullardaki <i>HIF1α</i> Gen Anlatımı ($\Delta\Delta Ct$).....	38
Şekil 4 – 3: PV Hastalarının Hipoksik Koşullardaki <i>NOS3</i> Gen Anlatımı ($\Delta\Delta Ct$).....	39
Şekil 4 – 4: PV Hastalarının Anoksik Koşullardaki <i>NOS3</i> Gen Anlatımı ($\Delta\Delta Ct$).....	39
Şekil 4 – 5: ET Hastalarının Hipoksik Koşullardaki <i>HIF1α</i> Gen Anlatımı ($\Delta\Delta Ct$).....	40
Şekil 4 – 6: ET Hastalarının Hipoksik Koşullardaki <i>NOS3</i> Gen Anlatımı ($\Delta\Delta Ct$).....	40
Şekil 4 – 7: ET Hastalarının Anoksik Koşullardaki <i>HIF1α</i> ve <i>NOS3</i> Gen Anlatımı ($\Delta\Delta Ct$).....	41
Şekil 4 – 8: Diğer MPN Hastalarının Hipoksik Koşullardaki <i>HIF1α</i> Gen Anlatımı ($\Delta\Delta Ct$).....	41
Şekil 4 – 9: Diğer MPN Hastalarının Anoksik Koşullardaki <i>HIF1α</i> Gen Anlatımı ($\Delta\Delta Ct$).....	42
Şekil 4 – 10: Diğer MPN Hastalarının Hipoksik Koşullardaki <i>NOS3</i> Gen Anlatımı ($\Delta\Delta Ct$).....	42
Şekil 4 – 11: Diğer MPN Hastalarının Anoksik Koşullardaki <i>NOS3</i> Gen Anlatımı ($\Delta\Delta Ct$).....	43
Şekil 4 – 12: Annexin V ve 7 – AAD Apoptoz ve Nekroz Deneyi.....	43

SEMBOLLER / KISALTMALAR LISTESİ

- AML: Akut Miyeloid Lösemi
ARNT: Arylhydrocarbonnucleartranslocator
Bç: Baz çifti
BSA: Bovine Serum Albumin
CALR: Kalretikulin
CaR: Calcium sensing Receptors
ccf-DNA: Dolaşımdaki hücre dışı Deoksiribonükleik asit
CD: Cluster of Differentiation
cDNA: Tamamlayıcı Deoksiribonükleik Asit
DMSO: Dimetil sülfoksit
DPBS: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü
EB: Etidyum Bromür
EDTA: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EPO: Eritropoetin
ET: Esansiyel trombositoz
F: Fenilalanin
FACS: Flor ışını ile Etkinleşmiş Hücre Ayırıcı
FBS: Fetal Bovine Serum
G: Guanin
HEL: Human Erythroleukemia Cell Line
HIF: Hipoksiyle Uyarılan Faktörler
HKH: Hematopoetik Kök Hücre
IFN: İnterferon
IL: İnterlökin
IMDM: Iscove's Modified Dulbecco's Media
JAK: Janus Kinaz
KaKH: Kanser Kök Hücresi

Kİ: Kemik İliği
KK: Kordon Kanı
MNC: Mononükleer Hücre
MPL: Miyeloproliferatif Lösemi Virüsü
MPN: Miyeloproliferatif Neoplazi
NO: Nitrik Oksit
NOS: Nitrik Oksit Sentaz
ODDD: Oxygen-dependent Degradation Domain
PBMC: Periferik Kan Mononükleer Hücreleri
PBS: Fosfat Salin Çözeltisi, Phosphate Buffered Saline
Ph: Philadelphia Kromozomu
PI: Propidyum İyodür
PMF: Primer Miyelofibroz
PTB: Fosfotirozin Bağlanma Bölgesi
PV: Polisitemia Vera
PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qRT-PCR: Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA: Ribonükleik Asit
ROS: Reaktif Oksijen Ürünü
SET-2: Esansiyel Trombositöz Hücre Soyu
SH2: SRC homoloji-2
STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription
T: Timin
TAE: Tris Asetat EDTA
TLR: Toll Benzeri reseptör
TNF: Tümör Nekroz Faktörü
TYK2: Tirozin Kinaz 2
UPL: Universal Probe Library
V: Valin
WT: Wild Type (JAK2V617F)

ÖZET

Şoroğlu, CV. Hematopoitik ve Kanser Kök Hücrelerin Hipoksik Koşullardaki Fonksiyonel ve Genomik Yanıtları. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2019.

Amaç: Miyeloproliferatif Neoplazi (MPN), miyeloid seri hücrelerinde somatik mutasyonlar nedeniyle artmış proliferasyon ile karakterize bir kök hücre hastalığıdır. Polisitemia vera, Esansiyel trombositoz ve Primer Myelofibroz klasik MPN alt tipleridir. Bu araştırma ile, MPN'deki miyeloproliferatif bozukluğa kemik iliği mikro çevresinin hipoksik koşulları (~%1 pO₂) kaynaklı *HIF1α* ve *NOS3* gen anlatımındaki bir değişimin yol açıp açmadığının gösterilmesi amaçlanmaktadır.

Yöntem: Kemik iliği mikroçevre koşulları oksijen basıncına sahip hücre kültürü ortamında CellAsic ONIX cihazı kullanılarak farklı oksijen basıncı değerleri (%0, %1, %20) 16 MPN tanılı hastaya ve kontrol olarak 2 kordon kanına (KK) ait Hematopoetik ve Kanser Kök Hücrelerin (HKH-KaKH) CD34⁺ ve CD34⁻ alt gruplarına uygulanmıştır. 24 saatlik hücre kültürü sonrası RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR tekniği ile gen ifadelerindeki değişimler ve fonksiyonel test olarak da hipoksik koşullara KaKH ve KK'nın apoptoza yanıtı incelenmiştir.

Bulgular: MPN hastalarına ait KH'lerin CD34⁺ alt grubundan CD34⁻ gruplarına kıyasla daha yüksek konsantrasyonlu RNA örnekleri izole edildi. *HIF1α* ve *NOS3* gen anlatımları MPN alt grupları arasında farklılık göstermekte olup kontrol grubu hücrelerine göre artış göstermiştir. *JAK2V617F* heterozigot (monoalelik) ve yabancı tip alel taşıyan hücreler arasındaki farklılıklar anlamlı değildir. MPN türü tespit edilememiş grupta hipoksik koşullarda *JAK2V617F* heterozigot (monoalelik) olguda *NOS3* anlatımı kontrole göre azalmış olarak bulunmuştur.

Sonuç: Kemik iliği mikro çevresi veya kök hücre nişi, hematopoitik kök ve progenitör hücrelerin fonksiyonunu destekleyen kompleks bir sistemdir. Yapılan çalışma ile kanser tipine göre KaKH'nın hipoksi ve anoksiye yanıtlarının değerlendirilmesi gerektiği görülmüştür. MPN genotipi ve hipoksiye yanıtı hastalık tipine göre değerlendirilmelidir. Bu konuda daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğu açıktır.

Anahtar Kelimeler: Miyeloproliferatif Neoplazi, Hipoksi, Polisitemia vera, *HIF1α*, *NOS3*

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 30031

ABSTRACT

Şoroğlu, CV. Functional and Genomic Responses of Hematopoietic and Cancer Stem Cells in Hypoxic Conditions. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Genetics. Master of Science Thesis. İstanbul. 2019.

Purpose: Myeloproliferative neoplasia is a disease with increased proliferation of myeloid blood cells, caused by somatic mutations. In this study, it is aimed to show whether myeloproliferative disorders leads to a change in *HIF1α* and *NOS3* gene expression caused by hypoxic conditions of bone marrow microenvironment.

Materials-Methods: Bone marrow microenvironment was applied to healthy controls and healthy patients' the subgroups of Hematopoietic Stem Cells (HSC), CD34⁺ and CD34⁻ with different oxygen pressure values (0%, 1%, 5%) using the CellAsic ONIX device. cDNA synthesis and RNA isolation were performed after 24 hours of cell culture. Quantitative Real-Time PCR techniques were used to investigate the changes in gene expression.

Findings: Higher concentration of RNA samples were isolated from CD34⁺ subgroups from MPN patients compared to CD34⁻ groups. *HIF1α* and *NOS3* gene expressions increased in patients' stem cells than controls'. The differences between the heterozygous and wild-type allele for *JAK2V617F* exchange were not significant. In not classified MPN patients with *JAK2V617F* heterozygous allele, expression of *NOS3* under hypoxic conditions was found to be decreased compared to control.

Results: The bone marrow microenvironment or stem cell niche is a complex system that supports the function of hematopoietic stem and progenitor cells. According to the study, it was seen that the response to hypoxia and anoxia of CaSC should be evaluated according to the type of cancer. The MPN genotype and response to hypoxia should be evaluated according to the disease. It is clear that more comprehensive studies in this subject are needed.

Key Words: Myeloproliferative Neoplasia, Hypoxia, Polycythemia vera, *HIF1α*, *NOS3*

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No.30031

1. GİRİŞ VE AMAÇ

“...Cin fikirli Prometheus gelince, Zeus
Çözülmez zincirlere vurdu onu,
Boyunu iki kat aşan bir sütuna.
Sonra bir kartal saldı üstüne gergin kanatlı;
Ölümsüz karaciğerini yiyordu kartal,
Ve karaciğer geceleri büyüyordu yeniden
Gergin kanatlı kuşun gündüz yediği kadar...”

der Hesiodos, eseri Theogonia – İşler ve Günler’de [1]. Zeus, bir Titan olan Prometheus’a insanlara sunduğu ateş yüzünden vermiştir bu cezayı. Anlatının gerçekliği bir yana, bu betimlemede Antik Yunan devrinde karaciğerin kök hücreler ile kendini yenileme özelliğine dair bilgiler o dönemdeki tabiriyle o karşımıza çıkmaktadır.

Hematopoetik Kök Hücreler (HKH), kan ve bağışıklık sistemi hücrelerinin üretiminden sorumlu olup kendini yenileyebilme, hücre bölünmesi ve farklılaşma gibi yeteneklere sahip hücrelerdir. Yetişkin insanlarda HKH’ler, kemik iliğinin ardından en çok kordon kanı ve periferik kanda bulunur [2]. Miyeloproliferatif Neoplaziler (MPN), kan hücresi üretim süreçlerindeki hatalar nedeniyle bir ya da daha fazla sayıda kan hücre hattının aşırı miktarda çoğalması sonucu oluşan hastalıkların genel adıdır. Polisitemia vera (PV), Esansiyel trombositoz (ET) ve primer miyelofibrozis (PMF) Philadelphia kromozomu negatif (BCR-ABL1-negatif)/klasik miyeloproliferatif neoplaziler grubuna dahildir [3]. PV tek bir hematopoetik progenitör hücrede gerçekleşen somatik mutasyon sonucu oluşup, artmış hematokrit ve kan hacmiyle görülen bir MPN türüdür [4]. *JAK2* c.1849G>T mutasyonu MPN’ler içinde %95 oranında en çok PV hastalarında görülürken, yeni nesil dizileme çalışmaları ile yeni mutasyonların varlığı da açığa çıkmıştır. Son yıllarda MPN’ler içinde birçok somatik mutasyon tanımlansa da bunlardan yalnızca Janus Kinaz 2 (*JAK2*), Miyeloproliferatif Lösemi Virüs onkogeni (*MPL*) ve Kalretikulin’in (*CALR*) MPN fenotipine özgü olduğu görülmüştür. *CALR*, kalreticulin adlı oldukça korunmuş endoplazmik retikulum proteinini kodlar; hücre içi kalsiyum dengesi, sinyal iletimi, glikoproteinlerin doğru katlanması, apoptoz, farklılaşma ve immünolojik hücre ölümünde görev alan önemli bir gendir. Bu mutasyonlara MPN’de daha nadir görülen ancak tanı açısından önem taşıyan başka mutasyonlar da eşlik edebilir [5, 6].

PV hastaları, hastalığa bağlı hücre artışı nedeniyle çokça sıkıntılar yaşarlar. Bunlar; kaşıntı, yorgunluk ve dalak büyümesi kaynaklı sıkıntılar, düşük yaşam kalitesi, artan sağlık hizmeti kullanımı kaynaklı mali yük, artmış trombotik eğilim ve kanama eğilimi riski, hastalığın Miyelofibroz'a (MF) veya Akut Miyeloid Lösemi'ye (AML) dönüşüm riski, sekonder solid malinitelerin gelişme potansiyeli ile tromboz ve kanama eğilimlerin yol açtığı ölüm oranı artışı şeklinde sıralanabilir.

Kemik iliği mikroçevresi ya da kök hücre nişi, hematopoietik kök ve progenitör hücrelerin fonksiyonunu destekleyen kompleks bir sistemdir. Yapılan çalışmalarda, kemik iliğindeki (Kİ) oksijen düzeyinin HKH biyolojisinde önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir. Kemik iliği endosteumu oldukça düşük oksijen düzeyine sahiptir (~%1 pO₂) ve HKH'ler için hipoksik nişi oluşturur [7]. Hücre kültürü ortamında HKH'ler ile normoksi (~%20 pO₂) şartlarında gerçekleşen çalışmalar, oksijen oranı son derece düşük olan kemik iliği çevre koşullarını doğru şekilde yansıtmayacağı için kullanılacak hava bileşimindeki oksijenin yüzdesinin kemik iliği mikroçevre koşullarına uygun olması önemlidir. Bu amaçla yapılacak çalışmalarda hipoksik ortam koşulları oluşturulması HKH biyolojisinin daha doğru bir biçimde ortaya konulmasına olanak sağlayacaktır [8].

Hipoksi İndükleyici Faktörler (HIF), hücreler için bir stres kaynağı olan düşük oksijen basıncında aktifleşerek oksijen alımını artırıcı düzenlemeler ile hücre hayatta kalımında önemli rol oynarlar. Çevre oksijen düzeyindeki değişimle hücredeki üretimi düzenlenen *HIF1α*'nın oksijen düzeyi belirleyici bir işlevi de vardır. Olgun HKH'lerde *HIF1α* düzeyinin yükseldiği ve glikolizi kontrol eden genlerin hipoksi uyarımlı anlatımının arttığı gösterilmiştir. HKH metabolizmasını değiştirip olgun Kİ hücrelerine kıyasla glukoz tüketimi ve laktat üretiminde artış sergiler; böylece mitokondriyal oksidatif fosforilasyon yerine glikolizizi kullanarak hipoksik mikroçevre koşullarına adaptasyon sağlar [6]. Mikroçevre ve hücre içi koşullar etkisiyle reaktif oksijen ürünleri miktarında artışlar görülür. Nitrik oksit (NO) bunlardan biri olup Endotel Nitrik Oksit Sentaz (*eNOS/NOS3*) tarafından oksijene bağlı yolla üretilir [9].

Mevcut tedavi seçenekleri, bazı hastaların hastalıkla ilişkili semptomlarının bazılarını etkin bir şekilde idare edebilir ancak konvansiyonel seçenekler semptomların birçok yönünü ele almaz. Bu durum, olayın doğal seyrini potansiyel olarak değiştirebilecek yeni tedavilere ihtiyaç duyulduğunu işaret etmektedir. Yeni tedaviler veya yeni

stratejiler, karşılanmamış ihtiyaçlara hitap edebilir ve MPN'li hastalarda iyileştirilmiş sonuçlarla birlikte hastalığın yarattığı sıkıntıların hafiflemesini sağlayabilir.

Bu araştırma kapsamında oluşturulan hipotez: MPN'de görülen miyeloproliferatif patogeneizde kemik iliği mikroçevresine ait, kanser kök hücrelerinde hipoksik koşullar kaynaklı *HIF1 α* ve *eNOS* gen anlatımlarındaki değişimlerin etkili olduğudur.

Bu hipotezi gerçekleştirmek üzere çalışmamızın amaçları;

Amaç 1: MPN hastalarından CD34⁺ hücrelerin eldesi ve *JAK2* c.1849G>T mutasyon varlığının belirlenmesi,

Amaç 2: Elde edilen Kanser Hematopoetik Kök Hücrelerde (CD34⁺/CD34⁻), anoksi (~%0 pO₂), hipoksi (~%1-3 pO₂), normoksi (~%20 pO₂) ortamlarındaki RNA anlatım düzeyleri arası ilişki,

Amaç 3: Oluşturulan hipoksik kültür koşullarında CD34⁺ MNC hücrelerinde Annexin V uygulaması yardımıyla apoptoz indüksiyonunun tespit edilmesidir.

Araştırmadan elde edilen bilgilerin tedavi stratejileri oluşturmada kanser kök hücre karakterini anlamamıza yardımcı olması beklenmektedir.

2. GENEL BILGILER

2.1. Kök Hücre

Alman biyolog Ernst Haeckel, ortak bir atayı paylaşan organizmaların evrimini anlatmak için çizdiği filogenetik ağaçları “Stambäume” (Stem-tree/kök ağaç/aile ağacı) olarak isimlendirmiş, yine bu kapsamda tüm çok hücreli organizmaların evrimleştiğini düşündüğü tek hücreli atasal organizmayı “Stamzelle” (Stem-cell/Kök hücre) olarak tanımlamıştır. *Anthropogenie* adlı eserinin gözden geçirilmiş 3. baskısında döllenmiş yumurtayı da bu tanımla ifade etmiştir. Bu eserde kök hücre tanımı, hem çok hücreli organizmaların atası olan tek hücreli organizma için hem de organizmanın tüm hücrelerini meydana getiren döllenmiş yumurta için kullanmıştır [10].

Birçok organizmada farklı özelliklere sahip temel çoğalan hücreler olsa da kök hücreleri sahip olduğu şu üç özellikte genelleyebiliriz:

1. Kendini yenileyebilme
2. Başka hücre çeşitlerine farklılaşabilme
3. Sonsuz bölünme potansiyeline sahip olma [11].

Ayrıldıkları alt gruplar ise vücutta farklılaşabildikleri hücre çeşidi sayısını ifade eden totipotent, pluripotent, multipotent, unipotent olarak tanımlanmalarını sağlar.

Organizmalardaki kök hücreler, bir veya birkaç hücre türüne farklılaşabilen kapasitede olabileceği gibi hematopoetik kök hücrelerdeki (HKH) gibi bütün kan – lenfoid seri hücrelerine köken olabilir.

2.1.1. Hematopoetik Kök Hücre

Erişkin bir insan günde $\sim 5 \times 10^{11}$ kan hücresi üretebilir ve bu rakam ihtiyaç anında 10-20 kat arası artış gösterebilir. Bu süreç tüm yaşam boyu kesintisiz şekilde devam etme yetkinliğindedir. Bu yetkinliğin devamlılığı HKH'nin kendini yenileyebilmesine ve sayısını korumasına bağlıdır. Oldukça az sayıda hücrenin tüm kan hücrelerini yeniden üretebilmesi kemik iliği nakillerinin de temel ilkesini oluşturur.

HKH, multipotent miyeloid ve lenfoid seri öncüsü kök hücrelerin kökenidir. Yuvarlak çekirdekli, dar sitoplazmalı morfolojileri ile lenfosit benzeyen öncü hücreler, kültür ortamına yapışmama özelliği sergiler. Bu benzerliklerin yanında kendilerine özgü bir

yapıları olmayışı mikroskopik incelemede tanınmalarını güçleştirir; bu amaçla, yüzey belirteçleri ile işaretlemeye dayalı çeşitli analiz yöntemleri kullanılır.

Prenatal dönemde başlayan kan hücresi üretim sürecinin ilk basamağı kalp ve damar gelişimidir. Embriyonal 21-22. günde ilkel kalbin kontraksiyonları başlamaktadır [2]. İnsan embriyosunda ~3. hafta ortalarında Hemanjiyoplast adlı mezenkimal kökenli hücre hematopoetik ve anjiyopoetik hücrelerin ortak atasıdır. Prenatal dönemde kan hücreleri sırasıyla yolk sak, fetal karaciğer ve kemik iliğinde üretilirken, postnatal süreçte ise kan hücresi üretimi kemik iliğinde yerleşim gösteren hücrelerin görevidir. Femurlar, kalça kemikleri, kaburgalar ve sternumun medulla bölgesi ise bu işlevin yoğun şekilde gerçekleştiği yerlerdir. Yetişkinlerde HKH'ler çoğunlukla uzun kemiklerin metafizindeki kemik iliğinde bulunur [11, 12].

Periferik kan, hematolojik bir malinite olmadığı takdirde az sayıda HKH içerir (1:100.000). Göbek kordonu da fetüse yalnızca besin ve oksijen taşımaz, içerdiği kan ve kan hücreleri nedeniyle aynı zamanda bir HKH kaynağıdır. 1972 yılında yapılan bir çalışmada bu hücrelerin lenfoblastik lösemi tedavisinde olumlu etkisi olduğu bildirilmiştir [13]. Sonraki yıllarda kordon kanından elde edilen kök hücrelerin hematolojik maligniteler (Fanconi anemisi tanılı 6 yaşında bir hastaya yeni doğan kardeşinden alınan kordon kanı nakli) ve kemoterapi sonrası ilik yetmezliği için tedavi amaçlı kullanımı başlamıştır [14, 15]. 2011 yılı itibarıyla görülmüştür ki, kordon kanı (KK), kök hücre kaynakları içerisinde en yaygın kullanılanıdır. Kolay bulunabilmesinin yanında diğer kök hücre kaynaklarıyla kıyaslandığında (özellikle embriyonik kök hücre) etik ve dini/politik açıdan daha geniş kesimlerce kabul görmesi de bunda önemli bir etkidir. HKH sayısı bakımından periferik kandan daha fakir olsa da daha az tartışmaya yol açtığı için HKH naklinde Kİ ve periferik kandan sonra üçüncü bir kaynak olarak görülmüştür.

2.1.2. Kanser Kök Hücresi

Kanser çalışmaları; kanserleşmenin, metastazların ve tedaviye karşı direnç oluşmasının sorumlusu olan, kendini yenileyebilen kanser kök hücresi (KaKH) kavramıdır. Bu kavramı ilk defa Mackillop 1983'te ortaya atmış ve her tümörün bir KaKH'sinin olduğunu ileri sürmüştür [16]. 1994 yılında akut myeloid lösemili hasta grubundan Lapidot ve arkadaşları tarafından ilk kez izole edilerek varlığı kanıtlanmıştır. Bu çalışmada hastalardan alınmış CD34⁺/CD38⁻ hücreler SCID farelere transfer edilmiş,

sonrasında lösemi hücrelerinde klonal artış gözlenmiş; fakat transfer edilen CD34⁺/CD38⁺ hücreleri sonrasında lösemi oluşmadığı gözlenmiştir [17]. Normal kök hücre ile arasındaki farklar, kendini yenileyebilmesi, çok yönlü farklılaşabilmesi, radyasyon, kemoterapik/kimyasal ajanlara dirençli olması ve apoptozdan kaçabilmesidir [18]. KaKH'nin öncü hücreler [19, 20], kök hücreler [21, 22] veya yetişkin dokulardaki farklılaşmış hücrelerden onkogenlerin etkisi, tümör baskılayıcı genlerin aktivitesinin azalması, bozulmuş metilasyon ve histon modifikasyonlarındaki hatalar gibi epigenetik etkiler sonucu ortaya çıktığı ileri sürülmektedir [23]. Klonal evrim modeli, kanserleşmeyi başlatacak hücrenin/hücrelerin ortaya çıkışı ve bunu takiben mutasyonların, genetik hataların ve epigenetik değişimlerin meydana gelmesiyle KaKH gelişimini açıklamaktadır. PI3K/Akt/mTOR, Bmi1, Wnt/ β -catenin, Shh ve Notch gibi embriyolojik dönemde de aktif olan yolların yetişkinde normal seyrinden çıkmasının KaKH oluşumunda etkili olduğu düşünülmektedir. Normal kök hücreler gibi KaKH de nişe ve buradaki sitokinlere ihtiyaç duymaktadır. Gelişimi için ayrıca bir nişe ihtiyaç duymadığı, normal kök hücrelerin bulunduğu nişler içerisine yerleştiği ve buralarda sessiz kalarak tedavi için kullanılan kimyasal ajanlardan kaçtığı düşünülmektedir. Hücre yüzey belirteçlerine göre akım ölçer, manyetik hücre ayrıştırma ve FACS gibi teknikler ile kanser tipine göre KaKH elde edilebilmektedir. Akut myeloid lösemilerde CD34⁺ ve CD38⁻ yüzey belirteçlerinin KaKH ile ilişkili olduğu bilinmektedir [25]. Yüzey reseptörlerine özel tedavilerle dirençlerin önüne geçmek, metastazları ve tümörün büyümesini önlemek adına çalışmalar umut vermektedir [11].

2.1.3. Kemik İliği ve Mikroçevre

R. Schofield, "Hem ilkel hem de kalıcı hematopoez, hücrelerin mikro çevresinden, yani nişten gelen uyarılara şiddetle gereksinim duyar." şeklindeki tanımı ile niş kavramını ilk kez kullanan kişi olmuştur [26]. Sözlük anlamı "girinti/oyuk" olan niş, kök hücrelerin farklı görev yapabilme becerisini kazandığı ve rollerinin gerçekleşebilmesi için gerekli olan mikro çevre koşullarının bulunduğu ortamdır. Scadden'ın tanımı ise "Nişin temel işlevi kök hücreleri farklılaşmamış düzeyde tutmaktır. Bunun yanında hücrelerin yaşamını da garanti altına almaya çalışır." şeklindedir [27].

Niş kavramı için çok çeşitli tanımlamalar mevcutsa da hepsinin ortak özelliği kemik iliğinin sahip olduğu fiziksel koşulları, komşu hücreleri/yapıları, kök hücreleri ve onlara eşlik eden hücrelerarası ortamın bir bütün olduğunu düşünerek üretilmiş olmalarıdır. Bir

veya birden çok hücre türü kök hücelere eşlik edebileceği gibi hücresiz bir niş de mümkündür [11].

20. yy başında A. Maximov, hematopoezin hücrel bir hiyerarşiye tabi olduğunu öne sürmüştür. İkinci Dünya Savaşı sonunda atom bombalarının hedefi olan Japon halkının karşılaştığı kitlesel ölümler ve çeşitli hematopoetik hastalıklar, iyonize radyasyonun kemik iliğine verdiği zararın ve kemik iliğinin kan üretimindeki önemini anlaşılmasını sağlamıştır. İyonize radyasyon mağduru bir kişi yalnızca radyasyona uğramamış vericilerden transplantasyon sonrası sağ kalabilmiştir. Kemik iliği kaybının kemik iliği nakli ile aşılabildiği ve kan hücrelerinin yeniden oluşturulmasındaki olumlu etkisi gözlenmesine rağmen, hangi serilerden kök hücreye ihtiyaç duyulduğu tam olarak anlaşılammıştır [28].

Kök hücrelerin sergiledikleri davranışlar açısından niş; sessiz kalma, yenilenme ve kararlanma kararlarının verildiği yaşam alanıdır. Bu davranışlar, hücre içi ve dışına ait tüm sinyallerin ortak kararıdır. İnsan vücudundaki yenilenme hızı yaşla birlikte azalsa da kan dokusu, beyin ve iskelet kası dokularında olduğundan daha sabit bir yenilenme hızına sahiptir. Ayrıca hareketli doğası, diğer kök hücre nişlerinde olmayan karmaşık bir ilişki ağı oluşturur. Bu ilişki ağı vücudun her bölgesinden çok farklı hücre tipleri ve farklı çevresel uyarılar ile girdikleri etkileşimlerin bir sonucudur ve HKH nişi bir arada incelemek için oldukça zordur.

Gelişmiş görüntüleme sistemleri ile yerleşim gösterdikleri bölgeler üzerine elde edilen veriler ışığında HKH'nin kemik içinde osteoblast, osteoklast ve stroma fibroblastlarından zengin olan endosteum bölgesinin (endosteal niş, osteoblastik niş) yakınlarında daha sessiz olduğunu göstermektedir [29].

2015 yılında yapılan bir çalışmada bölünen HKH'lerin bölünmeyenlere göre endosteuma daha yakın olduğu, bununla birlikte hem bölünen hem de bölünmeyen HKH'ler için farklı perisinüzoidal bölgelerin olabileceğini belirtilmiştir [30].

Kemik dokusundaki bu tarz bir konumlanmanın biyolojik açıdan nasıl bir fark yarattığına baktığımızda ilk olarak kemik doku matriksinin kalsiyum bileşiminin diğer mezoderm kökenli dokulardan farklı olduğu dikkati çeker. Yüksek mineral bileşimi osteoblast ve HKH hücre zarında kalsiyuma duyarlı reseptörleri (Calcium-sensing Receptors, CaR) gerektirir. Deneysel fare modelinde CaR yoksunu HKH'nin kemik iliğine yerleşimi başarısız olmakta ve kemik iliğindeki hücre sayısı azalmaktadır [11]. Lam ve arkadaşları, CaR uyarımının HKH'nin kemik iliğine dönüşünü (homing) ve

yerleşimini artırıcı etkisini ve kalsiyum iyonlarının HKH için kemoatraktan rolü olduğunu göstermiştir [31].

2.1.4. Hipoksi ve Reaktif Oksijen Türleri

HKH üzerine etkisi olan diğer bir etmen de dokudaki oksijen yüzdesi veya kısmi oksijen basıncıdır. HKH mikroçevresindeki oksijen miktarının optimum olduğu seviyeyi bulabilmek için Hoechst boyası ile oksijenin dokudaki perfüzyonu ölçüldüğünde, koyu boyalı hücrelerde oksijenin daha iyi perfüze olduğu; pimonizadol ile de dokudaki hipoksinin belirlendiği çalışmalar ile HKH'nin dokuda pimonizadol perfüzyonu olan bölgede yerleşim gösterdiği belirlenmiştir [11, 29].

Hipoksiye verilen hücresel yanıtın Hipoksiyle Uyarılan Faktörler (Hypoxia Inducible Factor, HIF) sorumludur. Hif1 α , mikro çevre düşük oksijen koşullarında artan bir transkripsiyon faktörüdür. Bu artış ile mitokondride oksidatif fosforilasyondan glikolize geçiş sağlar ve böylece hipoksik bir çevreye adaptasyon sağlanarak HKH hayatta kalımını artırır [30]. Bu durumun aksine, Hif1 α yokluğunun HKH çoğalmasına olumsuz etkisi olup artan hematopoetik strese yeterli cevap geliştirilemez ve HKH zamanla azalarak tükenir, ancak *HIF1 α* anlatımının sürekli sabit kalması da HKH'nin kaybına neden olur [32].

Eritrosit proliferasyonu ve hipoksiyle tetiklenen transkripsiyonu uyaran hormon olan Eritropoetin (*EPO*) geninin 3' düzenleyici/enhancer bölgesindeki Hipoksi Yanıt Elemanının (Hypoxia Response Element, HRE; 5'-RCGTG-3') tanımlanmasıyla HIF-1 keşfedilmiştir [33, 34]. Ardından gelen çalışmalarla HRE'ye bağlanan HIF-1 proteinin hipoksi varlığında görülen HIF-1 α ve sürekli anlatımı yapılan HIF-1 β alt birimlere sahip heterodimer yapısı gösterilmiştir [35]. HIF-1 β ARNT (aryl hydrocarbon nuclear translocator) olarak bilinen aril hidrokarbon reseptörüne bağlanır. HIF-1 α ve HIF-1 β basit sarmal-döngü-sarmal-Per-ARNT-Sim (bHLH-PAS) protein ailesine aittir. bHLH ve PAS motifleri HIF-1 α ve HIF-1 β alt birimleri arasındaki heterodimer yapısı için gereklidir.

HIF-1 α oksijene bağımlı bir degradasyon bölgesi (oxygen-dependent degradation domain, ODDD) de içerir [36]. Eritropoez ve glikoliz gibi oksijen yetersizliğinin olduğu durumları hızlıca önleyerek hipoksiye karşı oluşturduğu çoklu yanıtlarla uzun süreli çözümler sağlanmasında görevli olan HIF-1 α , insana ve fareye ait tüm dokularda anlatımı yapılan bir faktördür [37]. Eritropoez/demir metabolizması, glukoz

metabolizması, anjiyogenez, apoptoz, hücre proliferasyonu/hayatta kalımı *HIF-1 α* 'nın iş gördüğü başlıca yolak ve süreçlerdir.

HIF-2 α , *HIF-1 α* ile %48 amino asit ortak dizi paylaşımına ek olarak yapısal ve biyokimyasal benzerliklere (*HIF-1 β* ile heterodimer oluşturma, HRE'lere bağlanma) sahip hipoksiyle uyarılan bir faktördür. *HIF-1 α* 'nın aksine *HIF-2 α* ağırlıklı olarak akciğer, endotelium ve karotid cisimde anlatımı yapılır.

HIF-3 α , *HIF-1 β* ile dimerize olan, HRE'lere bağlanan ve farklı türdeki dokularda anlatımı yapılan bir diğer transkripsiyon faktörüdür. *HIF-3 α* kırılma varyantı olan inhibitör PAS'ın (IPAS), serebellumdaki Purkinje hücreleri ve kornea epitelinde anlatımı yapılmaktadır. IPAS, *HIF-1 α* 'ın N-terminal ucu ile etkileşime girer ve DNA'ya bağlanmasını engelleyerek HIF-1 için "dominant negative regülatör" olarak iş görür [38]. Kalp ve akciğer dokularında hipoksi uyarımı ile HIF-1 aktivitesi için negatif geri besleme döngüsünde yer alır [39]. *HIF-1 α* ve *HIF-2 α* daha kapsamlı olarak çalışılmışsa da *HIF-3 α* ve diğer HIF izoformları üzerine çalışmalar sınırlıdır.

Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species/ROS), hücre içindeki oksidasyon metabolizmasında oluşan toksik yan ürünlerdir. Her ne kadar, sinyal iletimi veya patojenlerle savaşma gibi bazı fizyolojik süreçlerde gerekli olsalar da hücrede belli bir düzeyin üzerindeki ROS, lipidleri, proteinleri, RNA ve DNA'yı ve sonuç olarak hücre işlevini olumsuz yönde etkiler. *JAK2V617F* değişiminin knock-in fare modelinde HKH kompartımanında ve *JAK2V617F* MPN'li hastalarda ROS birikimine yol açtığı Marty ve ark tarafından gösterilmiştir [40]. Kök hücrelerin korunması önemlidir ve bu nedenle yaşam boyu ROS hasarları en düşük seviyede tutulmalıdır. İnsanda görülen çeşitli kanser tiplerinde *HIF-1 α* ve *HIF-2 α* 'nın aşırı anlatımının genetik değişimler ve tümör içi hipoksinin sonucu olduğu bulunmuştur [41, 42].

2.1.5. Hipoksi ve Kanser

Yapılan çalışmalarda birçok primer malinite ve metastazlarda *HIF-1 α* 'nın artmış ekspresyonu tespit edilmiştir ve sağkalımı azaltıcı bir faktör olduğu gösterilmiştir [43, 44]. Bu sebeplerle sadece hematolojik maliniteler için değil, başka maliniteler için de hem bir biyobelirteç hem de tedavi stratejileri geliştirmede kullanılabilecek bir biyolojik molekül olduğu öne sürülmektedir [45, 46]. Tümöral dokulardaki hızlı hücre proliferasyonu ve artmış metabolizma hızı kaynaklı hipoksik ortam ve genetik varyasyonlar nedeniyle HIF genlerinin ekspresyonlarının arttığı düşünülmektedir [44,

47]. Normal dokularda Hif-1 α proteini saptanamaz iken, selim tümörlerde en az, habis tümörlerde daha fazla ve metastatik tümörlerde çok fazla olarak tespit edilmektedir [42, 48, 49]. Bu sonuçlar ışığında metastazda etkin olan anjiogenez ve tümöral dokuların ekspansiyonel olarak büyümesinde hipoksi ile birlikte HIF'lerin önemli birer faktör olduğu görülmektedir.

Yapılan bir çalışmada, meme kanseri tedavisinde kullanılan antianjiogenik ajanların tümör dokusunda hipoksik ortam oluşturduğu, bu durumun KaKH'ların aktivasyonuna yol açtığı ve sayılarını arttırdığı, bu durumun da HIF-1 α ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [50].

MPN hastalık grubunda sık görülen *JAK2V617F* varyantı pozitif hücrelerde ve periferik mononükleer hücrelerde hipoksik koşullarda *JAK2V617F* aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir. Hipoksik koşullarda *JAK2V617F* inhibisyonu ile hücre siklusunun primer negatif kontrolünü sağlayan p27/KIP1 ekspresyonunun arttığı, ilişkili inhibisyonun oluşmasında reaktif oksijen ürünlerinin *JAK2* aktivasyonunda etkin SHP-2'nin oksidasyonuna ve inhibisyonuna yol açarak rolü olduğu tespit edilmiştir [7].

2.2. Miyeloproliferatif Neoplaziler

2.2.1. Tarihçe

Miyeloproliferatif neoplaziler (MPN), HKH'lerde gerçekleşen somatik mutasyonlar sonucu bir veya daha fazla miyeloid seri hücrelerin artışı ile karakterize olan hastalıklara verilen genel addır [39].

Yaşam süresiyle orantılı olarak somatik hücrelerde genetik hatalara karşı duyarlılık oluşur. Genom bütünlüğü ve kanserleşmenin önlenmesi, diğer hücrelerin de kökenini oluşturan kök hücrelerde kanserleşme gibi daha ağır riskler barındırır. Mutasyonların buldukları hücredeki gen veya ürünlerinin ortaya koyduğu anlam bazen diğer hücrelere karşı çoğalma ve sağ kalım avantajları şeklinde sonuçlanabilir. MPN gibi bir veya daha fazla hücre soyunun aşırı çoğaldığı durumlarda avantajların yerini tümörleşmenin almamasının önündeki engeller, hücreyi DNA hasarından koruyan çeşitli mekanizmalardır. Bu durum, bazen bir üstünlük gibi görülse de ilerleyen yaşlarda tümör oluşumu açısından büyük problem yaratabilir. KH'lerde, hücreyi iç ve dış kaynaklı mutajenlerin etkisinden koruyan ve DNA hasarı meydana geldiğinde onaran çok sayıda mekanizma gelişmiştir. DNA hasarı onarılamayacak düzeydeyse hücre apoptoza veya yaşlanmaya girer.

Klinik, hematolojik, histolojik ve genetik etmenler dikkate alınarak 2016 yılında yayınlanan gözden geçirilmiş hematopoetik ve lenfoid doku tümörleri sınıflandırması ile MPN'ler Kronik Miyeloid Lösemi, BCR-ABL1-pozitif Kronik Nötrofilik Lösemi (CNL), Polisitemia Vera, Primer Miyelofibroz, Esansiyel Trombositemi, Kronik Eozinofilik Lösemi ve sınıflandırılmamış MPN olarak sınıflandırılmıştır. MPN'li hastalar genellikle ortaya çıkışı uzun yıllar alan sinsilikte, akut lösemi (Blast evresi) ve ilik yetmezliğine kadar varabilen kronik bir hastalıkla birlikte. Erişkin yaş hastalığı olmasının yanında nadiren genç yaşlarda da görülebilmektedir.

Tablo 2 – 1: Miyeloproliferatif Neoplaziler Tarihçesi

1951	William Dameshek, Kronik Miyeloid Lösemi (KML), Polisitemia Vera (PV), Esansiyel Trombositoz (ET), Miyelofibroz (MF) arasındaki klinik ve morfolojik benzerlikleri “Miyeloproliferatif Hastalıklar” olarak adlandırdı.
1960	Peter Nowell ve David Hungerford, keşfin yapıldığı yer ile adlandırdıkları Philadelphia kromozomunu (Ph) buldular.
1972	Janet Rowley Ph kromozomunun 9. ve 22. Kromozomlar arasındaki bir resiprokal translokasyon – t(9;22)(q34;q11) – ile karakterize olduğunu gösterdi.
1985-6	BCR-ABL1 transkripti ve ona ait ürün olan füzyon proteini p210 tanımlandı.
1990	p210, BCR-ABL ile HKH'nin retroviral enfeksiyonunun farede KML benzeri hastalığa neden olduğu gösterildi.
1996	Bir tirozin kinaz inhibitörü olan Imatinib'in keşfi (Nicholas Lydon) ve KML'de teröpatik kullanımı (Brian Duker) gösterildi.
2005	JAK2V617F mutasyonu (Vainchenker) keşfedildi.
2007	JAK2 ^{V617F} PV hastalarında diğer JAK2 gen mutasyonları tanımlandı.
2013	2013 yılında MPN'de gözlenen diğer bir sürücü mutasyon CALR

	tanımlandı.
--	-------------

2.2.2. Miyeloproliferatif Neoplazilerde Görülen Genetik Varyasyonlar

JAK2 (Janus Kinase 2; 9p24), *CALR* (Calreticulin, 19p13.2) ve *MPL* (Myeloproliferative leukemia virus oncogene, 1p34) gen varyasyonları MPN'de görülen sürücü mutasyonlardır. *JAK2* geninde 14. ekzon c.1849G>T somatik mutasyonu aktive edici mutasyon olup miyeloid seri farklılaşmış kan hücrelerinin hiperplazisine yol açar. Bazı istisnalar dışında *CALR* ve *MPL* mutasyonları PV'de görülmez, ET'de %20-25 ve %3-4 ve PMF'de %20-25 ve %6-7 oranlarında görülür. PMF veya ET hastalarının ~%10-15'i *JAK2*, *CALR* ve *MPL* mutasyonlarını taşımaz ve bu nedenle "üçlü negatif" olarak tanımlanırlar. Tanımlanan sürücü mutasyonlarına birden fazla MPN alt tipinde rastlanması ve üçlü negatif vakaların varlığı bu mutasyonların ayırıcı tanı için tek başlarına yeterli olmadıklarını gösterir. Bunun yanında yeni nesil dizileme çalışmaları ile çeşitli yatkınlık genleri tanımlanmış ve bu genlerin içerisinde yer aldığı MPN Panel Testleri oluşturulmuştur. MPN grubunda yalnızca KML, tanı kriteri olarak bir kromozomal anomaliye [t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR-ABL1 füzyon genine] ihtiyaç duyar. PV hastalarının >%95'inde *JAK2* ekzon 14 p.V617F varyasyonu gözlenirken ~%3'ünde ekzon 12 varyasyonu gözlenir; geri kalanlar ise nokta mutasyonları ve küçük insersiyon/delesyonlar kaynaklıdır. PV'li hastalardaki açıklanamayan kronik hematokrit/hemoglobin artışında *JAK2* mutasyonunun tanımlanması önemli olsa da PV hastalığına özgün bir belirteç değildir; PMF ve ET hastalarında ~%55 dolaylarında, miyelodisplastik sendromlarda ise daha az oranlarda gözlenmektedir. PMF hastalarında bu varyant ~%13 oranında homozigot (bialelik) olarak saptanmaktadır.

JAK2 ekzon 14 varyasyonu, Jak2 proteininin oto-inhibitör (baskılayıcı) JH2 psödokinaz bölgesini (domain) etkileyerek JAK/STAT sinyal yolağında *JAK2*'nin kesintisiz aktivasyonuna yol açarken, ekzon 12 *JAK2* varyasyonları daha güçlü ligandan bağımsız Jak2 sinyal ilişkisine sevk eder ve Jak2, Erk1 ve Erk2 seviyeleri artar. Ekzon 12 ve 14 varyasyonları kıyaslandığında kliniği etkilemeyen bazı hematolojik farklılıklar olabilmektedir.

JAK2V617F alel yükü PV'li hastalarda küçük yüzdelerden %100'e kadar değişebilmektedir. Bu oran %50'nin altında ise düşük alel yükü, üstüne ise yüksek alel yükü olarak sınıflandırılır. *JAK2V617F* alel yükü hematolojik ve klinik parametrelere

etkisi vardır. Varyantın heterozigot (monoalelik) olduğu durumlarda, mitoz sırasındaki hatalar ve homolog rekombinasyonlar nedeniyle alel homozigot (bialelik) hale gelmektedir. PV vakalarının %30'unda, PMF'de de gözlenen ancak ET hastalarında nadiren görülen 9p kromozomu için uniparental dizomiye izleyen homozigot (bialelik) *JAK2* mutasyonu görülmektedir [51].

JAK2 ekzon 12 mutasyonları daha az oranlarda saptanmakta olup; PV hastalarında %3; *JAK2V617F* varyantı tespit edilmemiş hastalarda ~%30 civarında görülmektedir [52, 53].

Ayrıca MPN hastalarında blastik dönüşüm ile ilişkilendirilen *LNK* mutasyonları [54], lösemi ile ilişkilendirilen *IKZF1* delesyonları, *EZH2* mutasyonları [55], farklı birçok kanserde de tespit edilen *TP53* mutasyonları [56, 57], MPN'lerde %15'lere kadar görülebilen *TET2* mutasyonları [58, 59, 60, 61, 62], ileri yaş MPN hastalarında tespit edilen *ASXL1* mutasyonları [63, 64, 65], *IDH1* ve *IDH2* mutasyonları [64] görülebilmektedir.

2.2.3. Myeloproliferatif Neoplazi Tipleri

BCR-ABL negatif klasik kronik MPN'ler PV, ET ve PMF'dir. PV'de, kalp yetersizliği, hipoksi veya oksijen miktarının az olduğu rakımı yüksek bölgeler nedeniyle dokulara oksijen aktarımındaki yetersizlikler nedeniyle kan yapımından sorumlu organlarda eritrosit üretiminde artış gözlenir. Sekonder polisitemi olarak adlandırılan bu durum eritrosit sayısı 6-7 milyon/mm³ gibi normalin ~%30 üzerinde seyrettiği bir tablo çizer. En yaygın hali olan *fizyolojik polisitemi*, 4000-5000 metre yükseklikte yaşayan yerlilerde sıkça görülür. Bu sayede solunumun güçleştiği bölgelerde dahi bireyler yüksek verimlilikte çalışabilirler.

Eritremi olarak da bilinen Polisitemia vera'da ise eritrosit sayısı 7-8 milyon/mm³, hematokrit değeri de %60-70'dir. Yavaş kan akışı kalbe venöz dönüş hızını azaltır, artmış kan hacmi ise venöz dönüşü artırır; PV'de bu regülasyon bozular. Kan hacminin artışı tüm damar sistemini dolgunlaşmasına neden olur. Bu yoğun kan ile tıkanan kapiller birçok komplikasyona neden olur. Venöz pleksus öncesi yavaşlayan kapiller akımı normalin üstündeki miktarda hemoglobinin deoksijene olması demektir. Deoksijene hemoglobin, oksijene hemoglobinin kırmızı rengini dengelemesi sonucu PV'li bireyin cilt rengi hafif mavi kırmızı görünümüdür [2].

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kriterlerine göre PV, yüksek hemoglobin (erkeklerde>18.5 g/dL, kadınlarda>16.5 g/dL) veya eritrosit (>25%) değerleri ile splenomegali, kemik iliğinde artmış hücre sayısı, düşük serum eritropoetin düzeyi, normal arteriyal oksijen saturasyonu ve mutant *JAK2* (yaklaşık %95 V617F - %4 ekzon 12) yanında serum eritropoetininin ve çeşitli sitokinlerden bağımsız şekilde artmış farklı soylara ait hücre proliferasyonu ile karakterizedir. PV hastalarında arteriyel ve venöz tromboz riski artmıştır. PV hastalarının ~%60'ında kaşıntı görülür, çoğunlukla su ile temas tetikler ve ciltte renk değişimine yol açar. PV için bildirilen yıllık insidans 2018 yılında 0,01/100,000 ve 2,61/100,000 arasında değişmektedir ve medyan yaş 61 olup hastaların %10'u 40 yaş altındadır [66]. 1545 bireyin incelendiği yakın tarihli bir çalışma ile ortalama hayatta kalım süresinin 14,1 yıl olduğu belirtilmiştir. Düşük riskli PV hastalarında dahi hayat kalitesi ve verimliliğini kısıtlayan önemli semptomlar bildirilmiştir [67].

ET'de kanda sayıca artan trombositler ($\geq 450.000/\mu\text{L}$) ve megakaryositik seri artışı ile ilişkilidir. MPN'ler içerisinde prognotik olarak daha iyi oluşuyla dikkat çeker. Eritrosit artışı pek görülmez. ET tanısında splenektomi, demir eksikliğine bağlı anemi, geçirilmiş cerrahi operasyonlar, enfeksiyon, bağ dokusu tutulumlu romatolojik hastalıklar, metastatik kanserler gibi reaktif yanıt ile trombosit artışı nedenleri dışlanmış olmalıdır [68].

PMF, retikülin ile ya da tek başına kollajen kaynaklı fibroz ile görülen megakaryositik seri artışı ve sıklıkla beraberinde eritroid seri azalması ile karakterizedir. İleri yaşta görülmesi (>65 yaş), anemi (<10gr/dl hemoglobin düzeyi), >30.000/ μl lökosit miktarı ve periferik dolaşımda %1 ve daha fazla blast tespit edilmesi PMF'te kötü prognostik faktörlerdir [68].

Türk Hematoloji Derneği'nin 2016 yılında yayınladığı BCR-ABL negatif klasik kronik MPN Ulusal Tanı ve Tedavi Kılavuzu'nda ilk aşamada MPN ön tanılı hastada *JAK2V617F* mutasyonu taranması önerilmiş, mutasyon + olgularda PV, ET veya PMF olasılığının yüksek olduğu ve sonrasında DSÖ kriterleri ile tiplendirme yapılması gerektiği söylenmiştir. Mutasyon – olgularda ise *CALR*, *MPL* ve *JAK2* ekzon 12 mutasyonlarına bakılması önerilmiştir [69].

2.2.4. Flebotomi

Hastalarda görülen artmış eritrosit yoğunluğu, hematokrit ve viskozitenin düzenlenmesi; hastalıkla ilişkili semptomlar ve komplikasyonların yönetimi için flebotomi bir tedavi yöntemi olarak uygulanmaktadır. Artmış demir depolanmasının herediter hemokromatozise veya eritrosit kütesinin MPN'ye eşlik ettiği hastalıklarda uygulanan klinik bir prosedürdür. Eritrositlerin içerdiği hemoglobin kaynaklı yüksek miktarlarda demir moleküllerinin dokularda artması, çeşitli yan etkilerle (karaciğer, kalp ve endokrin fonksiyon bozuklukları) kendisini gösterir. Hemoglobin düzeyi ve serum ferritin ölçümlerinin yönlendirdiği doğrultuda her 2-3 ayda bir flebotomiye ihtiyaç duyulmaktadır. Her bir flebotomide alınan bir ünite (450-500 ml) periferik kan ile 200-250 mg demir uzaklaştırılır. Tedavi amacıyla kullanımı için önerilen ferritin yoğunluğu kriterleri şunlardır:

1. >18 hastalar için cinsiyetten bağımsız olarak >200 ng/ml
2. Doğurganlık çağındaki kadınlar için >500 ng/ml
3. >18 yaş üstü erkekler için >300 ng/ml

Kontrollü bir çalışmada agresif flebotomi uygulamasının hematokriti %45 altında tuttuğunun gösterilmesi ile birlikte [70] flebotomi öncesi dönemde ortalama hayatta kalım süresi <2 yıl [71] iken günümüzde ~14 [72] yıla ulaşması da bu yöntemin önemini ortaya koymaktadır.

PV veya ET hastalarında tromboz, kanama risklerinin veya semptomların kontrolü amacıyla aspirin veya sitoredüktif ilaç tedavisine gereksinim olabilmektedir. Hastanın tromboz riskinin kısa/uzun dönem ilaç yan etkisi ile ne kadar yüksek olduğunu belirlemek çok önemlidir. Ayrıca böbrek nakli, testosteron replasman terapisine yanıt olarak ve intramusküler testosteron kullanan kişilerde de polistemi görülebilmektedir. Bu açıdan flebotomi kararı alınırken bireye göre yaklaşım uygulanmalıdır.

Her ne kadar flebotomi ile düşen hematokrit düzeyinin kardiyovasküler morbidite ve tromboz olaylarının azaldığı bildirilse de, hematokrit yanıtın hastanın hayatta kalım artışıyla veya trombotik komplikasyonların azalmasıyla ilişkili değildir; aksine lökositoz ve trombositoz artmış ölüm ve tromboz riski ile ilişkilidir. Mevcut hematokrit düzeyiyle orantılı olarak, düzenli flebotomi hematokrit değerini etkili bir şekilde <45%'e kadar düşürmekte ve tromboz riskini azaltmaktadır. Tedavi amacıyla uygulanan

flebotominin PV hastalarına olan etkisinin belirlenebilmesi için detaylı şekilde incelenmesi gerekmektedir.

2.2.5. JAK – STAT Sinyal İletim Sistemi

JAK/STAT yolağı geniş çaplı bir sitokin grubu ve büyüme faktörü için temel sinyal iletimi yolağıdır [73]. Sinyal iletici ve transkripsiyon artırıcı (Signal transducer and activator of transcription) ailenin bir üyesidir, diğer üyesi de Janus Kinazlar olarak bilinen reseptörlerdir.

Tablo 2 – 2: Janus Kinaz ve STAT Ailesi

JanusKinaz Ailesi		STAT Ailesi	
JAK1		STAT1	STAT2
JAK2		STAT3	STAT4
JAK3		STAT5A	STAT5B
TYK2		STAT6	

2.2.5.1. Janus Kinazlar

Memelilerde tanımlanan 4 adet Janus Kinaz bulunur: JAK1, JAK2, JAK3 ve TYK2. Özgün yapılıdır, yapısındaki psödokinaz bölgesinden önce gelen C-terminal uçta katalitik olarak aktif kinaz bölgesini içerir. JAK'ların kilit görevi, N-terminal aracılı sitokin reseptörleriyle olan ilişkisidir. Tip I ve II reseptörlere ligandın bağlanması reseptör altbirimlerini birbirine yakınlaştırır, bunun sonucunda JAK'lar yakınlaşır, fosforillenir ve birbirlerini aktive ederler.

Etkinleşme sonrası, SRC homoloji-2 (SH2) veya fosfotirozin bağlanma (PTB) bölgesi proteinlerin çekilmesini sağlayan JAK'ların tirozin bakiyeleri üzerindeki reseptör altbirimleri fosforillenir. Bu proteinler JAK'lar tarafından da fosforillenebilir. Fosforilasyon birtakım biyokimyasal yolağın etkinleşmesi ile sonuçlanır. Sitokin reseptörlerinin fosforillenmesi SH2 içeren transkripsiyon faktörleri sınıfı için bir bağlanma alanı yaratır.

JAK2 geninin susturulması embriyonik dönemde ölümcül olmaktadır, eritropoetin işlevi için temeldir, eksikliği ile farelerde kan oluşumu durur. Ayrıca, JAK2 diğer sitokinlerin

sinyal iletiminde de önemlidir. JAK'ların önemi birçok lösemi ve lenfomadaki mutasyonlarla da doğrulanmıştır. JAK'ın psödokinaz bölgesindeki mutasyon, çoğu PV vakasının temelini oluşturur.

TYK2'nin fonksiyon kaybı mutasyonları da immün yetersizlikle ilişkilidir.

2.2.5.2. Sinyal İletici ve Transkripsiyon Artırıcılar

DNA'ya bağlanan STAT ailesi üyeleri hücre yüzeyindeki sitokin reseptöründen gen transkripsiyonun düzenlendiği nukleusa sinyal iletiminden sorumludur. Farklı STAT'lar özgün sitokin reseptörlerine bağlanır. STAT'lar JAK aracılı tirozinlerce fosforillenir ve STAT dimerizasyonunu başlatır. Nukleusa geçen STAT'lar DNA'ya bağlanır ve transkripsiyonu düzenler. Memelilerde 7 çeşit STAT vardır: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B ve STAT6.

2.2.5.3. Sitokinler

Sitokinler, hücreler arasındaki iletişimi, sinyal alışverişini sağlayan protein, peptid ya da glikoprotein yapıda olabilen moleküllerdir. Lökositlerden salgılanan ve bu hücre grubu arasında iletişimi sağlayan interlökinler ve hücrelerin kemotaksisini uyaran kemokinler olarak kaynaklandıkları hücreye ve hedeflerine göre ikiye ayrılırlar. Hematopoez, inflamasyon için hücrelerin oluşması ve çağırılmasında etkindirler. Sitokinler, immün sistemde yer alan ve almayan birçok hücrenin gelişimi ve işlevinin kontrolünde öncü rol oynar. Sitokin terimi, lenfoid ve lenfoid olmayan hücreler tarafından üretilip hücreler arası iletişimin düzenlenmesinde görevli küçük moleküllere verilen isimdir.

Lenfokin, lenfosit ile ilişkili sitokin olarak tanımlanabilir. İnterlökinler ise lökositler arasında iletişimden sorumlu özel moleküllerdir. İnterlökinlerin bu tanımının aksine bazı durumlarda spesifik interlökinler lökositler dışında hücreler tarafından da üretilir.

Sitokinlerin bir kısmı farklı disiplinlerden araştırmacılar tarafından keşfedildiği için gözlenen ilk fonksiyonu ile adlandırılmış/sınıflandırılmış, asıl biyolojik görevini tanımlamaktan uzak kalan örnekler ise sitokinleri anlamının önünde bir engel oluşturmuştur.

Sitokinleri farklı şekillerde sınıflandırmak mümkün ancak bağlandıkları reseptör tipine göre 6 farklı gruba ayrılırlar. 6 grup kemokinler olarak bilinen ayrı bir aile oluşturur ve 7 transmembran bölge reseptörüne bağlanır.

Sitokinler immün sistemdeki ve dışındaki hücreler arasındaki iletişimde temel bir konumdadır. Sitokinlerin sayısının fazlalığı yanında birçoğunun henüz keşfedilmeyi

beklediği de muhtemeldir. Bunun yanında sitokinler ve sitokin sinyal iletimindeki bozuklukların hastalıklara yol açtığını anlayabiliyoruz. Sitokin ve antisitokin terapileri klinikte başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Sitokinlerin immünoyoloji anlaşıldıkça kullanımları da artacaktır.

Tablo 2 – 3: Bağlandıkları Reseptör Tipine Göre Sitokinler

Tip I (hematopoetin ailesi) ve Tip II (interferon ailesi) sitokin reseptörleri
Tümör Nekroz Faktörü (TNF) ailesi reseptörler
İnterlökin-1 (IL-1) reseptörü ve ilişkili Toll-benzeri reseptörler (TLR'ler)
IL-17 reseptörler
Tirozin kinaz reseptörler
TGF-beta ailesi reseptör serin kinazlar

2.3. Hipoksi ve MPN İlişkisi

Kan hücrelerinin yerleştiği farklı niş bölgelerinde farklı oksijen yoğunlukları mevcuttur. Bu da beraberinde hipoksi düzeyini ve gen ekspresyon dağılımlarını değiştirmektedir. Kemik iliğindeki en hipoksik alan endosteal niş iken, kan damarlarında yakın bölgelerdeki vasküler nişler daha iyi oksijenize olmaktadır [74]. Solid tümör çeşitlerinde de olduğu gibi MPN ve hematolojik malinitelerde de kanserin ilerlemesinde temel bir faktör olan yeni damar oluşumunun temel nedeni HIF'ler olarak görülmektedir [75]. B ve T hücreli akut lenfositik lösemi, akut myelositik lösemi, lenfoma ve multipl myelom gibi hematolojik malinitelerin hipoksi ile ilişkisinin tespiti açısından çokça çalışma olmasına rağmen, MPN grubu hastalıklar adına literatürde yeterli veri bulunmamaktadır [76]. MPN grubu hastalıklarda sık görülen *JAK2V617F* ekspresyonunun hipoksik koşullarda azaldığı bilinmektedir [7].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Bu yüksek lisans tezi kapsamındaki proje, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 13.10.2017 tarihli 16 sayılı toplantısındaki onay ile başlamış olup İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 30031 nolu proje ile maddi olarak desteklenmiştir. Proje kapsamındaki çalışmalar İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. Hasta Örnekleri

Bu çalışmada, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bölümü'nde Miyeloproliferatif Neoplazi tanısı konulan 16 hastadan (7 PV, 2 ET, 1 Hodgkin Lenfoma, 1 Koagülasyon bozukluğu, 2 Hairy Cell Lösemi, 3 alt grubu tespit edilmemiş MPN) flebotomi yolu ile alınan periferik kan mononükleer hücreleri kullanıldı. İlgili gruptaki hastalar, bilgilendirilmiş onam formunu okuyup onayladıklarını belirten imzalar sonrasında çalışmaya dahil edildiler. Çalışmada yer alan hastalara ait klinik değerler ve hastalık bilgileri Tablo 3-1'de yer almaktadır.

Tablo 3 – 1: Hastaların Klinik Parametreleri

Polisitemia Vera			
Hasta No.	Yaşı	Tanı Yaşı	Tedavi
H17	31	27	Flebotomi - Asetilsalisilik Asit
H25	39	-	Flebotomi
H28	56	48	Flebotomi - Hidroksiüre - Ürikoliz
H35	71	-	Flebotomi
H37	55	49	Flebotomi - Asetilsalisilik Asit

H39	48	41	Flebotomi - Hidroksiüre - Asetilsalisilik Asit- Ürikoliz
H43	65	54	Flebotomi - Hidroksiüre - Asetilsalisilik Asit- Ürikoliz
Esansiyel Trombositemi			
Hasta No.	Yaşı	Tanı Yaşı	Tedavi
H13	54	44	Flebotomi - Asetilsalisilik Asit - Hidroksiüre
H22	70	66	Flebotomi - Hidroksiüre - Asetilsalisilik Asit- Ürikoliz
Hodgkin Lenfoma (Klasik Tip)			
HastaNo.	Yaşı	Tanı Yaşı	Tedavi
H14	52	46	Flebotomi
Koagülasyon Bozukluğu			
Hasta No.	Yaşı	Tanı Yaşı	Tedavi
H16	62	-	Flebotomi
Hairy Cell Lösemi			
Hasta No.	Yaşı	Tanı Yaşı	Tedavi
H24	63	54	Flebotomi - Asetilsalisilik Asit
H56	55	55	Flebotomi - Asetilsalisilik Asit
MPN Alt Grubu Henüz Tespit Edilmemiş Hastalar			

Hasta No.	Yaşı	Tanı Yaşı	Tedavi
H38			Flebotomi - ?
H55			Flebotomi - ?
H58			Flebotomi - ?

3.1.2. Kontrol Örnekleri

Çalışmada MPN hastalarının kontrol grubu olarak kordon kanı mononükleer hücreleri kullanıldı.

JAK2V617F değişimine neden olan c.1849G>T nokta mutasyonuna ait alel bilgisini belirlemek amacıyla bu değişimi heterozigot (monoalelik) olarak taşıyan SET-2 hücre soyuna ait DNA örnekleri kullanıldı. qRT-PCR optimizasyonunda *JAK2* genini yabancı tip taşıyan HUVEC ve daha önce çalıştığı bilinen hasta ve sağlıklı bireylerin RNA'ları kullanıldı.

3.1.3. Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler Tablo 3-2'de gösterilmiştir.

Tablo 0 – 2: Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler

IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) (Gibco)	Etil Alkol (Merck)
DPBS (Fosfat Tamponu Çözeltisi) (Gibco)	İzopropanol (Merck)
Fikol (GE Healthcare)	Etidyum Bromür (M. Biotech)
FBS (Fetal Bovine Serum)	Steril Su
EDTA (Gibco)	Propidyum İyodür
CD34 Micro Beads, İnsan (MACS)	CD34 PE (8G12) Antikor (BD Pharming)
FcR Blocking Reagent, İnsan (MACS)	Universal Probe Library qPCR Probe 60 (Roche)

DMSO (DiMetil Sülfoksit)	Universal Probe Library qPCR Probe 64 (Roche)
Tris baz (Bio Chemika)	Universal Probe Library qPCR Probe 67 (Roche)
Agaroz (Sigma)	DNase I

3.1.4. Çalışmalarda Kullanılan Kitler

Kullanılan kitler Tablo 3-3'te gösterilmiştir.

Tablo 0 – 3: Çalışmalarda Kullanılan Kitler

CD34 Micro Bead Kit, İnsan (MACS)
Quick gDNA Micro Prep (Zymo Research) (D3025)
RNA Purification Kit (Jena Bioscience) (PP-210L)
SCRIPT cDNA Synthesis Kit (Jena Bioscience) (PCR-511S)
RNA Clean & Concentrator 5 (Zymo Research)

3.1.5. Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

Çalışmalarda kullanılan cihazlar Tablo 3-4'te gösterilmiştir.

Tablo 0 – 4: Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

Buz Makinesi (Cornelius)	Soğutmalı Santrifüj (Beckman Coulter)
Jel Görüntüleme Sistemi (UVP)	Masaüstü Mini Santrifüj (Beckman Coulter)
Otoklav (Kermanlar)	Su Banyosu (Memmert)
Vorteks (Kermanlar)	Laminer Akım Kabini (Nuair)
Otomatik Pipetler (Eppendorf)	Mikroskop (Olympus)

PZR Cihazı (Thermo Cycler – Bio-Rad T100)	Mikrodalga Fırın (Arçelik)
Buzdolabı ve Derin Dondurucular (+4°C, -20°C, -80°C) (Samsung, Haier,Haier)	Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR Cihazı (LightCycler 480 II - Roche)
Güç Kaynağı (E-C Apparatus Corp.)	Elektroforez Cihazı (Bio-Rad)
Distile Su Cihazı (Millipore)	Mikroakışkan Platform (Cellasic ONIX)
Nanodrop (NanoDrop Technologies)	Hücre Ayırım Birimi (FACSAria Akım Ölçer Cihazı, BD Bioscience)

3.1.6. Çalışmalarda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

Çalışmalarda kullanılan tampon ve çözeltiler Tablo 3-5'te gösterilmiştir.

Tablo 0 – 5: Çalışmalarda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

MACS	500 ml PBS + % 0,5 (7.5 M) BSA + 2 mM (0.5 M) EDTA → Filtreli Medya Kabı Kullanılır.
Propidyum İyodür (PI)	10 µl PI, MACS ile 10 ml'ye tamamlanır.
Hücre Dondurma Solüsyonu 1	% 80 FBS + % 20 DMSO (Hacmen) → 0,2 µm filtre kullanılır.
Hücre Dondurma Solüsyonu 2	% 80 IMDM + %20 FBS (Hacmen) → 0,2 µm filtre kullanılır.
Hücre Kültür Besiyeri	% 70 IMDM + % 30 FBS (Hacmen) → 0,2 µm filtre kullanılır.
Hücre Çözme Solüsyonu	% 2 FBS + % 98 IMDM (Hacmen)→ 0,2 µm filtre kullanılır.
%70'lik Etil Alkol	70 ml Etil Alkol, steril distile su ile 100ml'ye tamamlanır

50X TAE (Tris-Asetik asit-EDTA)	242 g Tris baz + 57,1 g Glasiyal Asetik asit + 100 ml EDTA (0,5 M) →Distile su ile 1 l'ye tamamlanıp otoklav ile steril edilir.
---------------------------------	---

3.2. Yöntem

3.2.1. Periferik Kandan Mononükleer Hücre İzolasyonu

İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bölümü'nde takip edilen Miyeloproliferatif Neoplazi grubundaki 16 gönüllüden flebotomi yöntemi ile alınan periferik kan ve kontrol olarak alınan kordon kanı örneklerinden mononükleer hücre izolasyonu, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda Akış Şeması-1'deki adımlar izlenerek gerçekleştirildi.

Akış Şeması 1: Periferik Kandan Mononükleer Hücre İzolasyonu

1. Flebotomi ile toplanan kan 500 ml steril medya kabında PBS (1X) ile 1:1 oranında seyreltilir.
2. 50 ml plastik santrifüj tüpü içindeki 15 ml Fikol üzerine 35 ml kan yavaş yavaş eklenir.
3. Santrifüj cihazının hızlanma ve yavaşlama ivmesi en düşük değerde olacak şekilde 2000 rpm – 30 dakika şeklinde santrifüjlenir.
4. Fikol – Gradient yöntemi ile elde edilen görüntü Şekil 3.1'deki gibidir.
5. Fazlarına ayrılan kan – PBS süspansiyonundan serolojik pipet ile toplanan mononükleer hücreler, içlerinde 15 ml MACS bulunan plastik santrifüj tüplerinde biriktirilir.
6. Hastaya ait serum ve granülosit örnekleri ilerideki çalışmalar için ayrılır ve saklanır.
7. 15 ml MACS içerisinde biriktirilen MNC'ler santrifüjlenir (2000 rpm – 15 dakika).
8. Üst sıvılar uzaklaştırıldıktan sonra pelletler 10'ar ml IMDM içinde çözündürülür.
9. IMDM içerisindeki hücreler, "10 µl hücre süspansiyonu + 90 µl IMDM" oranıyla ardışık seyreltilmelere tabi tutularak sırasıyla 10 kat, 100 kat ve 1000 kat seyreltilir. (Şekil 3.2)
10. Seyreltilen hücrelerden 10 µl alınarak 10 µl trifen mavisi ile "Hematositometre" üzerinde hücre sayımı yapılır. Sayım için kullanılan formül Tablo 3-6'da gösterilmiştir.

Tablo 0 – 6: Hücre Sayımında Kullanılan Formül

$\text{Hücre sayısı/ml} = (\text{Dört Karedeki Hücre Sayısı Ortalaması}) \times 10^4 \times (\text{Seyreltme Oranı}) \times 2$
--

3.2.2. Hücre Dondurma

Periferik kandan mononükleer hücre izolasyonu sonrası belirlenen hücre sayısına göre hücre dondurma işlemi Akış Şeması-2'ye göre gerçekleştirildi.

Akış Şeması 2: Mononükleer Hücrelerin Dondurulması

1. “Hücre Dondurma Solüsyonu 1 ve 2” eşit hacimde hazırlanır.
2. “Hücre Dondurma Solüsyonu 1” hazırlanır ve 20 dakika buzda bekledikten sonra kullanıma hazır hale gelir.
3. Hücreler “Hücre Dondurma Solüsyonu 2” ile çözündürülmeden önce IMDM’in uzaklaştırılması için 2000 rpm – 15 dakika santrifüjlenir.
4. “Hücre Dondurma Solüsyonu 2” ile hücreler çözülür.
5. “Hücre Dondurma Solüsyonu 1” damla damla eklenir.
6. Gerekli sayıda 2 ml ve 5 ml’lik dondurma tüpleri hazırlanır ve isimlendirilir.
7. Tüpler izopropanol içeren soğutma kapları içerisinde bir gece -80° C’de bekletildikten sonra sıvı azot tankına aktarılır.

3.2.3. Hücre Çözme

Daha önce dondurulan hasta ve kordon kanı mononükleer hücreleri sıvı azot tankından alındıktan sonra Akış Şeması-3’deki adımlar izlenerek çözündürüldü.

Akış Şeması 3: Mononükleer Hücrelerin Eritilmesi

1. Azot tankından alınan hücreler hızlıca su banyosunda (37° C) eritilir.
2. Hücre süspansiyonuna %10’u kadar DNaz (1 mg / 1 ml olarak hazırlanır) eklenir ve 90 saniye su banyosunda (37° C) bekletilir.

3. Hücre süspansiyonu 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldıktan sonra üzerine 10 ml Hücre Çözme Solüsyonu damla damla eklendikten sonra 1500 rpm – 6 dakika santrifüjlenir.
4. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra pellet, ilk süspansiyon hacminin %7'si kadar DNaz ile çözüldükten sonra yeniden 10 ml Hücre Çözme Solüsyonu damla damla eklendikten sonra 1500 rpm – 6 dakika santrifüjlenir.
5. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra pellet, ilk süspansiyon hacminin %4'ü kadar DNaz ile çözüldükten sonra her 100 milyon hücre için 5 ml MACS eklenir.
6. MACS ile çözülen hücreler, "10 µl hücre süspansiyonu + 90 µl MACS" oranı ile ardışık seyreltilmelere tabi tutularak sırasıyla 10 kat, 100 kat ve 1000 kat seyreltilir.
7. Hücreler sayıldıktan sonra uygun konsantrasyonlara getirilerek çalışmalarda kullanılır.

3.2.4. Hücrelerin Yüzey Belirteçleri ile Ayrılması

Elde edilen mononükleer hücreler CD34 antikoru kullanımıyla taşıdığı hücre reseptörüne göre CD34⁺ ve CD34⁻ olarak iki ayrı gruba ayrıldı. Bu amaçla MACS kolon yardımıyla ayırım veya akım ölçer kullanıldı. Manyetik ayırıcı da Akış Şeması 4'e göre kullanıldı.

Akış Şeması 4: CD34 Mikroboncuk Yöntemi ve Kolon İzolasyonu

1. Hücre sayımının ardından MACS içinde yer alan hücreler 1700 rpm – 10 dakika santrifüjlenir. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra pellet 300 µl MACS ile çözülür.
2. Her 10 ⁸ hücre için 100 µl "FCR Blocking Reagent" eklendikten sonra pipetlenerek örnekle homojen karıştırılır.
3. Her 10 ⁸ hücre için 100 µl CD34 Mikroboncuk eklenir, iyice karıştırılır ve 30 dakika buzda bekletilir.
4. 30 dakikanın ardından 3,5 ml MACS ile yıkanan hücreler 1700 rpm – 10 dakika santrifüjlenir. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra pellet 500 µl MACS ile çözülür.
5. Manyetik ayırma geçilir.
6. "LS" kolonlar, "MACS Separator" üzerindeki manyetik alana yerleştirilir.
7. Kolon, manyetik alanın etkisi ile hücre süspansiyonu içerisinde mikroboncukları yüzey reseptörleriyle yakalamış hücreleri (CD34 ⁺) tutar, diğer hücreleri (CD34 ⁻) geçirir.
8. Kolon, hücreler kolona aktarılmadan önce 3 ml MACS ile yıkanır.
9. Hücreler aktarıldıktan sonra tekrarlı yıkamalarla önce CD34 ⁻ hücreler, ardından CD34 ⁺ hücreler ayrı tüpler içerisinde toplanır.

10. Toplanan hücreler sayıldıktan sonra boyama ve saflık analizine geçilir. CD34 PE boyası ile boyanan ve boyanmayan 10^5 sayıda hücre, 20 dakika buzda bekletilir.
11. 20 dakika ardından kalan boyayı uzaklaştırmak için 1700 rpm – 10 dakika santrifüjlenir.
12. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra pellet PI çözeltisi ile çözülür.
13. Akım Ölçer cihazında hücrelerin canlılık ve boyanma analizi gerçekleştirilir.

3.2.5. CD34⁺ ve CD34⁻ Mononükleer Hücrelerin CellASIC ONIX cihazı ile Farklı Oksijen Düzeylerinde Kültürü

3.2.5.1. CellASIC ONIX Mikroakışkan Platform

CellASIC ONIX Mikroakışkan Platform (Merck), hücrelere özgü mikro çevre (niş) koşullarını oluşturmak amacıyla kullanılan bir hücre kültürü elemanıdır. Ayarlanabilir gaz bileşimi (Azot, Hava, Karbondioksit) ve farklı uyaranların çeşitli kombinasyonlarla uygulanmasına olanak verir. Bu çalışma kapsamında, HKH'lerin (CD34^{+/+}) hipoksik koşullardaki yanıtlarını incelemek için kullanılmıştır.

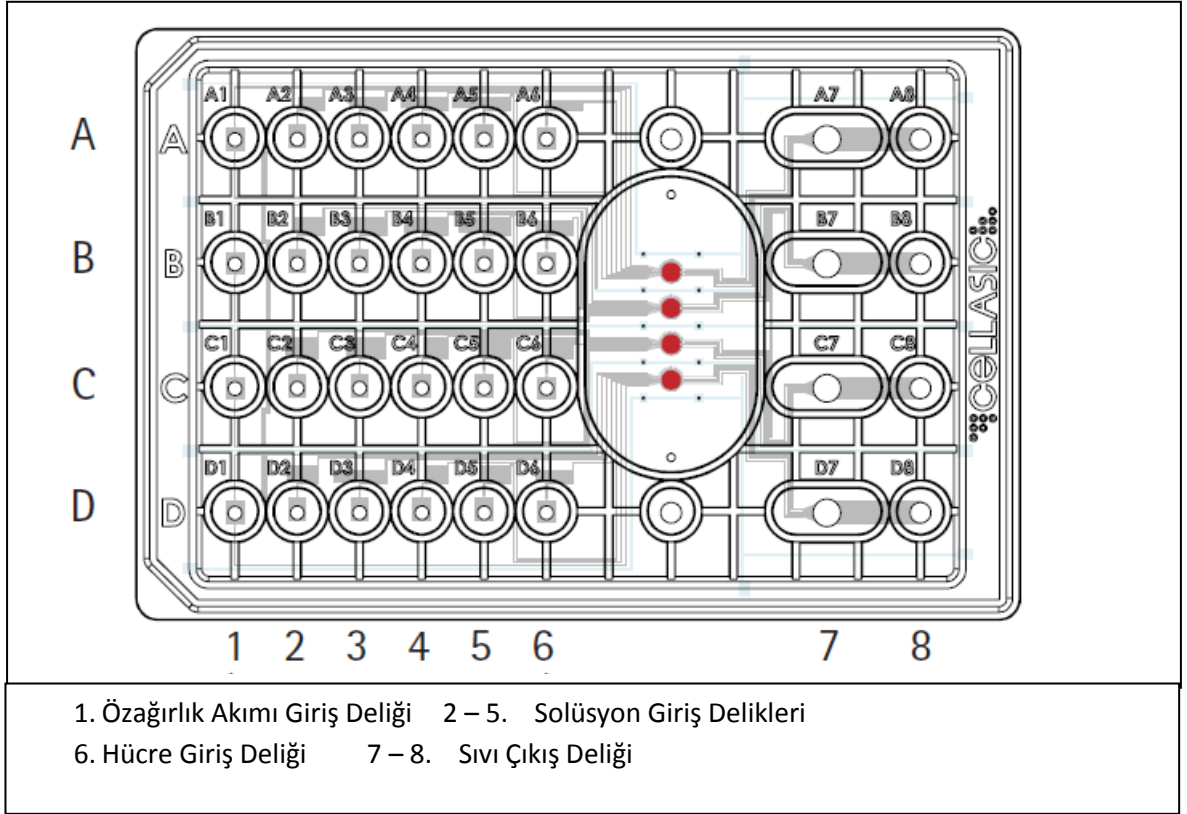
Şekil 3 – 1: CellASIC ONIX Mikroakışkan Platform (Gaz Karıştırıcı)



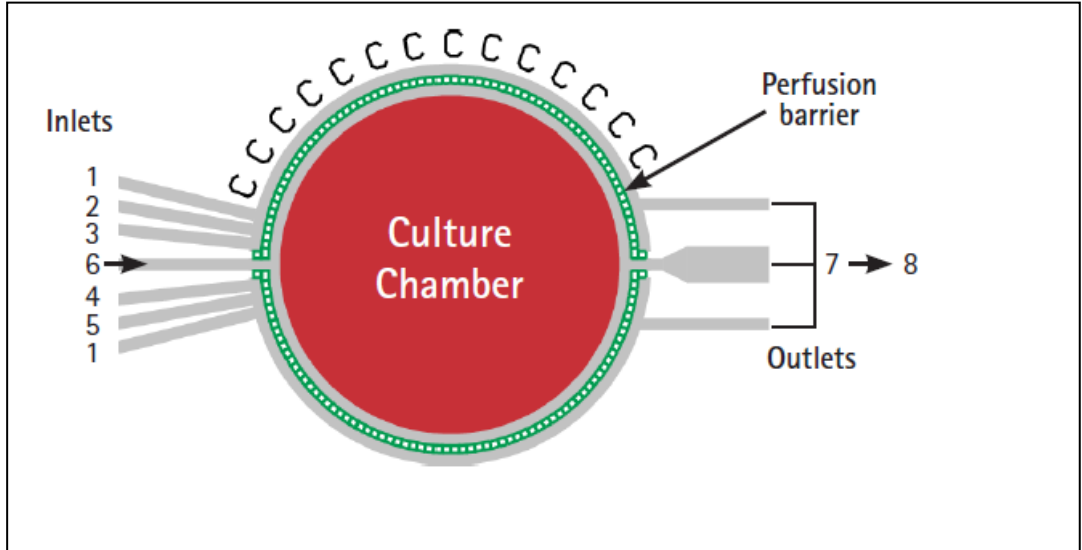
3.2.5.2. CellASIC ONIX M04S-03 Mikroakışkan Tabak

CellASIC ONIX M04S-03 Mikroakışkan Tabak (Merck), üzerinde birbirinden bağımsız dört ayrı kanal sistemi bulunan ve bu sayede aynı tabak üzerinde dört ayrı koşul oluşturmaya imkan veren bir mikroinkübatör sistemidir.

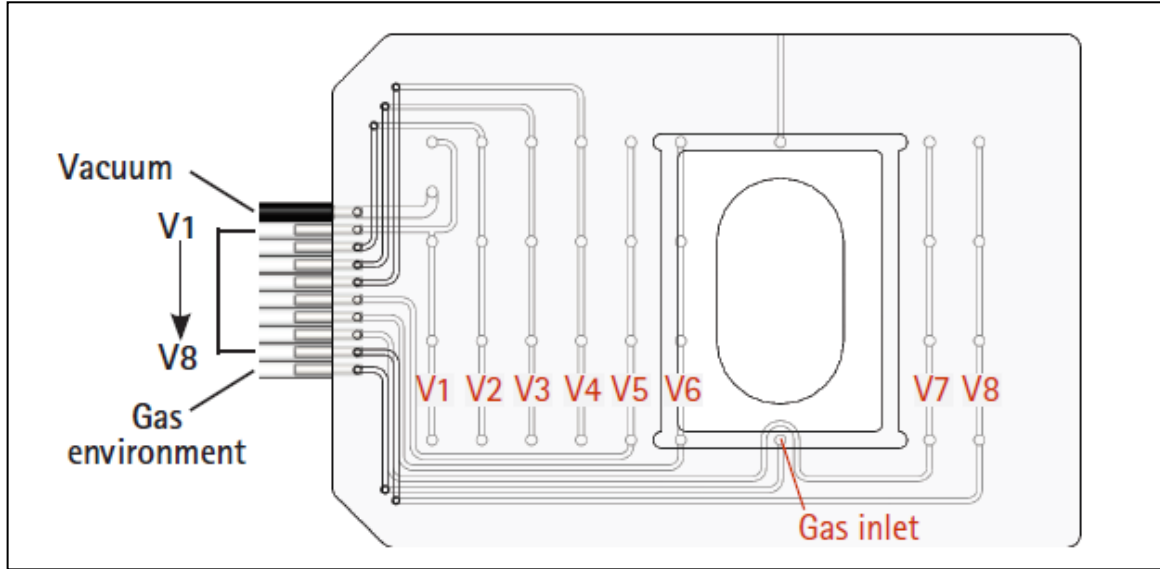
Şekil 3 – 2: CellASIC ONIX M04S-03 Mikroakışkan Tabak



Şekil 3 – 3: M04S Hücre kültür tabağı inkübasyon alanı ve iç kanal yapısı



Şekil 3 – 4: Vakumlu kültür tabağı kapağı ve bağımsız gaz iletim kanalları



3.2.5. Hipoksi Uygulaması

Özel hücre kültür tabağı içerisindeki kanallarda ve kuyularda yer alan PBS çözeltileri kaldırılarak kültür kabı besiyeri ve hücre transferi için hazır hale getirildi. 1, 6 ve 7 numaralı kuyuların iç halkaları tamamen boşaltıldıktan sonra 6 numaralı kuyunun iç halkasına 10 µl hücre süspansiyonu eklendi, 30 dakikalık inkübasyonun ardından kültür medyumunu eklendi ve hipoksik kültür başlatıldı.

3.2.6. Mononükleer Hücrelerden DNA İzolasyonu

MPN ve kontrol gruplarından toplanan kan örneklerinden izole edilen MNH'lerden "Zymo Research – Quick gDNA Micro Prep" kiti ve protokolü kullanılarak DNA izolasyonları gerçekleştirildi. Kullanılacağı zamanın uzak veya yakın oluşuna göre +4°C ya da -20°C'de saklandı.

3.2.7. İki Aşamalı Alele Özgü PZR

Alele özgü PZR, farklı iki primer çifti tasarımı ile çoğaltılmak istenen bölgede bulunan baz değişimlerinin neden olduğu farklı DNA dizileri içerisinde istenen diziyeye sahip bölgenin çoğaltılmasına imkan veren bir PZR yöntemidir. Bu çalışmada, MPN hastalarında *JAK2* c.1849G>T değişiminin tespiti için kullanıldı. İlk primer çifti, *JAK2* c.1849G>T değişimine sahip PZR ürünleri oluşturur. Mutant ve yabancıl tip alelleri taşıyan PZR ürünlerini birbirinden ayırabilmek amacıyla ikinci aşamada mutant

varyanta özgü primer kullanılır. İlgili primerlere ait dizi bilgileri Tablo 3-7’de gösterilmiştir.

Tablo 0 – 7: İki Aşamalı Alele Özgü PZR Primerleri

İlk Aşamada Kullanılan Primerler ve Dizileri		
P1(F)	5'-GATCTCCATATTCCAGGCTTACACA-3'	
P2(R)	5'-TATTGTTTGGGCATTGTAACCTTCT-3'	
İkinci Aşamada Kullanılan Primerler ve Dizileri		
P3(F)	5'-CCTCAGAACGTTGATGGCA-3'	Mutant Alele Özgü Primerler
P4(R)	5'-ATTGCTTTCCTTTTTTCACAAGA-3'	
P5(F)	5'-AGCATTGGTTTTAAATTATGGAGTATATG-3'	WT Alele Özgü Primerler
P6(R)	5'-GTTTTACTTACTCTCGTCTCCACAAAA-3'	

Tablo 3-8’de reaksiyona ait protokol bilgisi verilmiştir.

Tablo 0 – 8: İki Aşamalı Alele Özgü PZR Basamakları

İki Aşamalı Alele Özgü PZR – İlk Aşama		
94°C	1 dakika	
95°C	30 saniye	35 Döngü
60°C	30 saniye	
72°C	30 saniye	
72°C	2 dakika	

İki Aşamalı Alele Özgü PZR – İkinci Aşama		
94°C	1 dakika	
95°C	30 saniye	35 Döngü
59°C	25 saniye	
72°C	25 saniye	
72°C	2 dakika	

İki aşamalı alele özgü PZR bileşenleri Tablo 3-9’da gösterilmiştir.

Tablo 0 – 9: İki Aşamalı Alele Özgü PZR Bileşenleri

İlk Aşama		İkinci Aşama	
İçerik	Miktar	İçerik	Miktar
Sigma PZR Mix	10 µl	Sigma PZR Mix	10 µl
P1 (F)	1 µl	P3 (F)	0,8µl
P2 (R)	1 µl	P4 (R)	0,8µl
Kalıp DNA	2 µl	P5 (F)	0,8µl
H ₂ O	20 µl’ye tamamlanır	P6 (R)	0,8µl
		Kalıp DNA*	2µl
		H ₂ O	20 µl’ye tamamlanır

*: İlk aşamadaki PZR ürünü 40 kat seyreltilir.

3.2.8. Agaroz Jel ile Görüntüleme

1 g agarozun 1X TAE ile 50 ml'ye tamamlanması ile oluşturulan elektroforez jeli ile DNA örnekleri baz uzunluklarına göre birbirlerinden ayrılır. *JAK2* mutant alele sahip ürünler 279 baz çifti (bç) uzunluktaiken yabancı tip alele sahip ürünler ultraviyole ışık altındaki agaroz jelde 229 bç uzunluğunda bant görüntüsüne sahiptir.

3.2.9. Mononükleer Hücrelerden RNA İzolasyonu

MPN ve kontrol gruplarına ait CD34⁺ ve CD34⁻ hücreler, hücre kültürü sonrası RNA izolasyonu için “Jena Bioscience – Total RNA Pürifikasyon Kit” ve protokolü kullanıldı. Hücre lizati elde edildikten sonra kolon kullanılarak ardışık yıkama ve santrifüj aşamaları ile RNA örnekleri elde edildi. Kullanılacağı zamanın uzak veya yakın oluşuna göre -20°C ya da -80°C’de saklandı.

3.2.10. Ters Transkriptaz PZR ve Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR

Elde edilen RNA örneklerinden komplementer DNA (cDNA) elde etmek amacıyla “Jena Bioscience – Script cDNA Sentez Kiti” ve protokolü kullanıldı.

cDNA sentezi sonrasında *HIF1α* ve *NOS3* genlerinin anlatımındaki değişimlerin MPN ilerleyişi üzerinde etkisi olabileceği düşüncesinden yola çıkarak ilgili genlerin anlatımları incelendi. Gerçekleştirilen kıyaslamalı ölçümlerde prob olarak “Roche – Universal Prob Library (UPL)” kullanıldı. Gen anlatım analizi için referans olarak *GAPDH* geni seçildi. Ticari problara ait bilgiler Tablo 3 – 10’da gösterilmiştir.

Tablo 3 – 10: UPL Prob Bilgileri

Gen	Transkript Varyantı	Amplikon Boyu (nt)	UPL Prob no
<i>HIF1α</i>	ENST00000337138.8	90	64
<i>NOS3</i>	ENST00000297494.7	107	67
<i>GAPDH</i>	ENST00000229239.9	66	60

İlgili genlere ait primer dizi bilgileri Tablo 3 – 11’de gösterilmiştir.

Tablo 3 – 11: *HIF1 α* , *NOS3* ve *GAPDH* Primer Dizileri

Gen	Primer	Primer Dizisi
<i>HIF1α</i>	İleri Primer	5’ GATAGCAAGACTTTCCTCAGTCG 3’
	Geri Primer	5’ TGGCTCATATCCCATCAATTC 3’
<i>NOS3</i>	İleri Primer	5’ GACTGAAGGCTGGCATCTG 3’
	Geri Primer	5’ CCATGTTACTGTGCGTCCAC 3’
<i>GAPDH</i>	İleri Primer	5’ AGCCACATCGCTCAGACAC 3’
	Geri Primer	5’ GCCCAATACGACCAAATCC 3’

3.2.11. Akım Ölçer Cihazı ile Hücre Yüzey Analizi

MPN ve kontrol gruplarına ait CD34⁺ ve CD34⁻ hücreler, manyetik ayırım işleminin başarı yüzdesi aşağıdaki Akış Şeması – 5 ile değerlendirildi.

Akış Şeması 5: Akım Ölçer Cihazı ile Hücre Yüzey Analizi

1. Manyetik ayırımla elde edilen CD34 ⁺ ve CD34 ⁻ hücrelerden 50.000 – 100.000 hücre sayıldıktan sonra pelet haline getirilir.
2. İncelenecek her örnek için biri boyalı diğeri boyasız hücrelerden oluşan tüpler hazırlanır.
3. Boyanacak hücreler CD34 PE antikoruna eklenerek karanlıkta ve buzda 20 dakika bekletilir.
4. 500 μ l MACS ile yıkanan hücreler 500 μ l PI tampon ile çözdürüldükten sonra akım ölçer cihazına okutulur.
5. PI ile ölü hücreler elimine edilir ve CD34 antikoruna eklenerek CD34 ⁺ hücrelerinin oranı

belirlenir.

3.2.12. Annexin V Apoptoz Deneyi

MPN ve kontrol gruplarına ait CD34⁺ ve CD34⁻ hücreler hipoksik hücre kültürü ertesinde Annexin V ve 7 – AAD ile muamele edilerek (Akış Şeması – 6) apoptoz yüzde değerleri ölçüldü.

Uygulanan protokolde, hipoksik hücre kültürü çalışması sonrasında mikro çevre cihazına ait hücre kültürü tabağından alınan hücreler PBS ile iki defa yıkandı. Sonrasında hücreler (~1.000.000 hücre) 1 ml bağlanma tamponu ile çözüldü. 100 µl (~100.000 hücre) çözünmüş hücrelerin olduğu süspansiyondan alındı ve boyama çalışmasının yapılacağı tüplere aktarıldı. Bir tüpte boyasız hücreler, bir tüpte Annexin V boyalı hücreler, bir tüpte 7 – AAD boyalı hücreler ve bir tüpe de her iki boyayı içeren hücreler olacak şekilde hazırlandı. Bu hücre süspansiyonlarına 5 µl her bir boyadan eklendi. Son aşamada üzerilerine 400 µl bağlanma tamponu eklendi ve akım ölçer cihazında incelendi. Boyasız olan hücreler kalibrasyon amaçlı kullanıldı.

Akış Şeması 6: Annexin V Uygulaması Yapılan Gruplar

Hücre İşaretleme Yöntemi	PV MNC Alt Grubu	
	CD34 ⁺	CD34 ⁻
Boyasız	10 ⁵ /ml	10 ⁵ /ml
Annexin V	10 ⁵ /ml	10 ⁵ /ml
7-AAD	10 ⁵ /ml	10 ⁵ /ml
Annexin V + 7 - AAD	10 ⁵ /ml	10 ⁵ /ml
5µl Boya + 15 dk İnkübasyon + Akım Ölçer cihazında İnceleme		

3.2.13. Gen Anlatım Verilerine Ait İstatistiksel Analiz

Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR işleminde her bir örnek üçlü şekilde çalışıldı. *HIF1α* ve *NOS3* gen ifadelerindeki değişim *GAPDH* geni referans alınarak incelendi.

$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(Ct_{Hasta}-Ct_{Referans})-(Ct_{Sağlıklı}-Ct_{Referans})}$ yöntemi ile hesaplamalar gerçekleştirildi. İstatistiksel anlamlılık için, nonparametrik t testi ve tek yönlü ANOVA kullanıldı.



4. BULGULAR

4.1. RNA İzolasyon Sonuçları

Hasta kanlarından izole edilen MNC'lerden yapılan RNA izolasyonu sonrasında NanoDrop cihazı ile gerçekleştirilen RNA ölçümleri Tablo 4-1'de gösterilmiştir. Örneklerin ng/μl değerleri tabloda belirtilmiştir. RNA konsantrasyonu ve saflığı düşük örnekler gen anlatımı çalışmasına dahil edilmedi. H22, H24, H28 ve H56'ya ait RNA örneklerinin konsantrasyonunu artırmak amacıyla ticari kit kullanılmıştır.

Tablo 0 – 1: Mononükleer Hücrelerden İzole Edilen RNA örneklerinin ölçüm değerleri (ng/μl)

Hasta No	Normoksi		Anoksi		Hipoksi	
	CD34 ⁺	CD34 ⁻	CD34 ⁺	CD34 ⁻	CD34 ⁺	CD34 ⁻
H13	18,8	4,0	14,4	6,0	4,0	3,0
H14	28,7	6,1	26,7	7,5	8,3	7,1
H16	13,75	5,5	17,35	4,9	5,2	2,85
H17	8,05	3,95	7,15	2,8	2,5	2,35
H22	-	-	-	-	29,4	32,7
H24	-	-	-	-	28,7	14,4
H25	29,4	44,6	47,55	48,25	5,4	47,4
H28	-	-	-	-	16,3	15,4
H35	21,6	17,1	41,0	41,55	4,6	5,9
H37	47,65	31,8	62,05	64,7	8,0	18,8
H38	-	-	-	-	6,2	-
H39	38,95	47,45	36,1	36,35	9,05	3,5
H46	5,0	-	-	-	3,7	-
H55	26,3	31,6	37,0	33,6	25,7	26,2
H56	-	-	-	-	15,2	16,8
H58	28,4	23,2	36,75	32,0	36,5	53,9
KK-1	-	-	-	-	7,0	-
KK-2	6,0	-	-	-	4,9	-

4.2. İki Aşamalı Nested PZR Sonuçları

Hastaların mutasyon durumlarının tespit edilmesi için yapılan iki aşamalı alel spesifik PZR sonuçları Tablo 4-3'te verilmiştir. Çalışmada kullanılan hasta örneklerinden 6 tanesinin JAK2V617F, 9 tanesinin ise yabancı tip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4-2).

Tablo 0 – 2: Hastaların Mutasyon Durumları

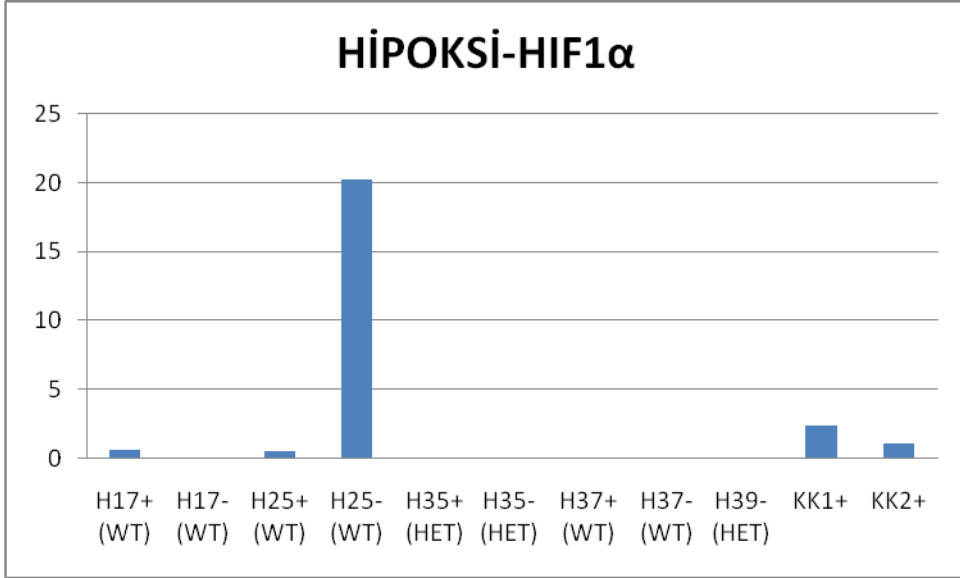
Hasta Numarası	Mutasyon Durumu (JAK2)	Hasta Numarası	Mutasyon Durumu (JAK2)
Polisitemia vera		Hodgkin Lenfoma	
H17	Yabancı Tip	H14	Yabancı Tip
H25	Yabancı Tip	Koagülasyon Bozukluğu	
H28	JAK2V617F Heterozigot allel	H16	Yabancı Tip
H35	JAK2V617F Heterozigot allel	Hairy Cell Lösemi	
H37	Yabancı Tip	H24	Yabancı Tip
H39	JAK2V617F Heterozigot allel	H56	Yabancı Tip
H43	JAK2V617F Heterozigot allel	MPN Alt Grubu Henüz Belirlenmemiş	
Esansiyel Trombositemi		H38	JAK2V617F Heterozigot allel
H13	JAK2V617F Heterozigot allel	H55	Yabancı Tip
H22	Yabancı Tip	H58	Yabancı Tip

4.3. Gen İfadesi Sonuçları

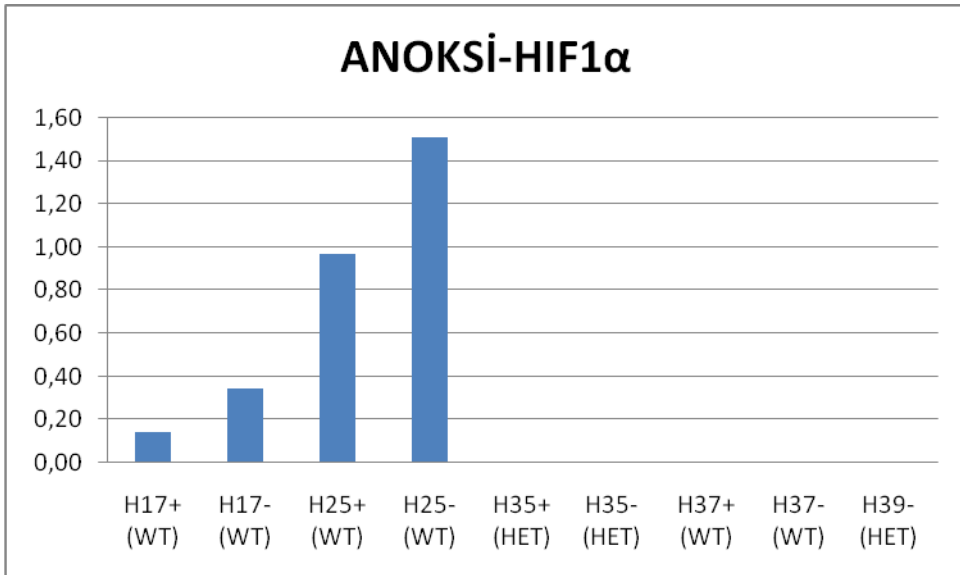
Hipoksik ve anoksik koşullardaki hasta ve KK MNC'lerin CD34⁺ ve CD34⁻ hücre gruplarının normalize gen anlatım değerleri Şekil 4 – 1, 11'de gösterilmiştir. Anoksik, hipoksik ve normoksik koşullarda kültüre edilen CD34⁺ ve CD34⁻ MNC'lere ait Light Cycler 480 cihazında elde edilen okuma değerlerinin ortalaması ve standart sapması alındıktan sonra uygun olmayan Ct değerlerine sahip örnekler analize dahil edilmedi. *GAPDH* geni ile normalize edilen ayrı koşullardaki *HIF1 α* ve *NOS3* gen ifade değerleri, deney kontrolü olarak kullanılan normoksi grubuna normalize edilerek anoksik ve

hipoksik koşullara ait normalize değerler elde edildi. MPN alt gruplarındaki hasta sayılarının az oluşu nedeniyle istatistik analiz için iki grubun (hipoksi/anoksi) ortalamasına göre karşılaştırma yapıldı.

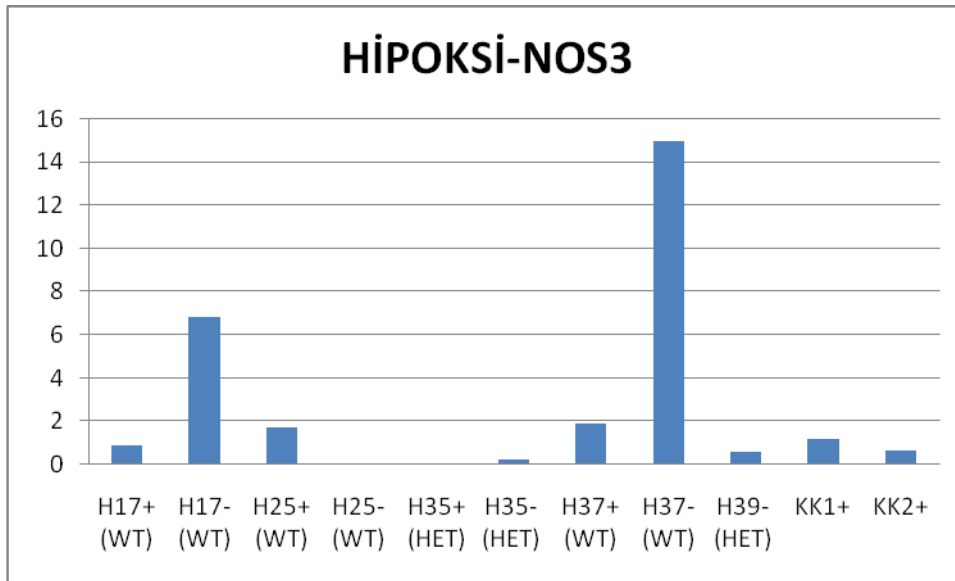
Şekil 4 – 1: PV Hastalarının Hipoksik Koşullardaki HIF1 α Gen Anlatımı ($\Delta\Delta Ct$)



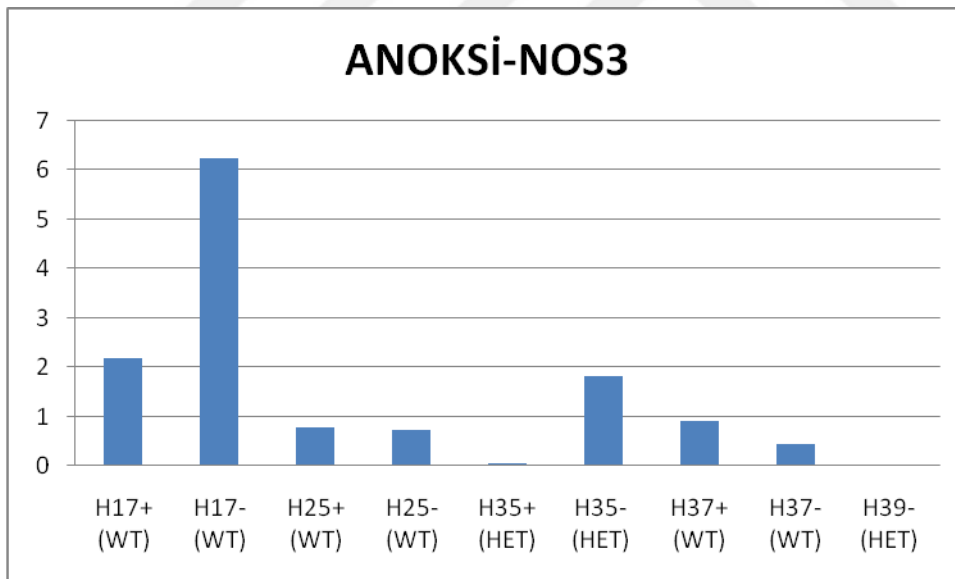
Şekil 4 – 2: PV Hastalarının Anoksik Koşullardaki HIF1 α Gen Anlatımı ($\Delta\Delta Ct$)



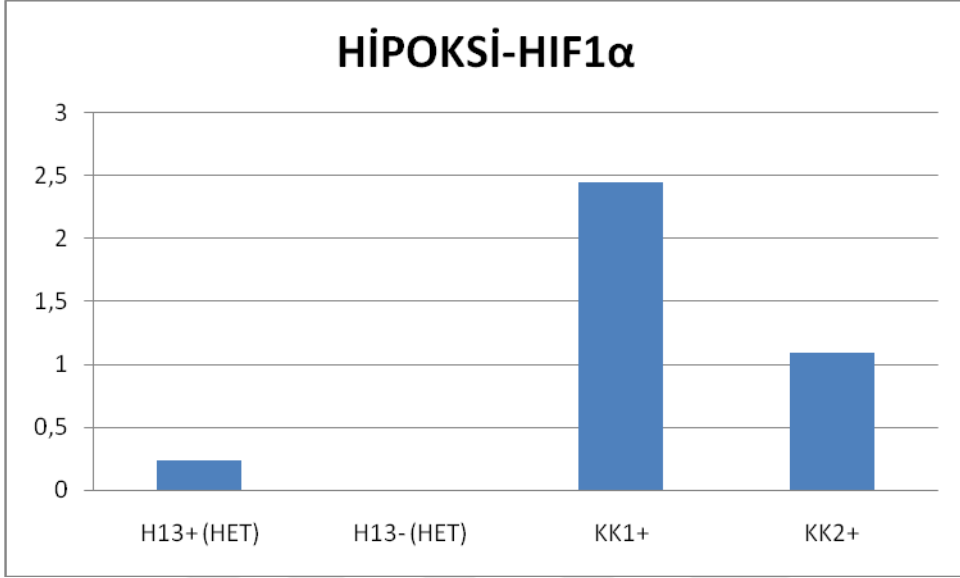
Şekil 4 – 3: PV Hastalarının Hipoksik Koşullardaki NOS3 Gen Anlatımı ($\Delta\Delta Ct$)



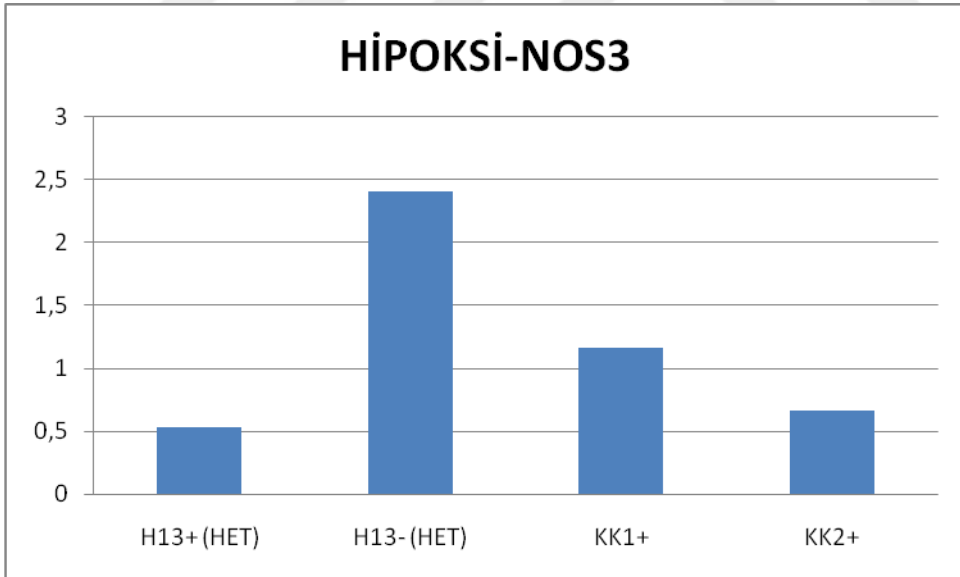
Şekil 4 – 4: PV Hastalarının Anoksik Koşullardaki NOS3 Gen Anlatımı ($\Delta\Delta Ct$)



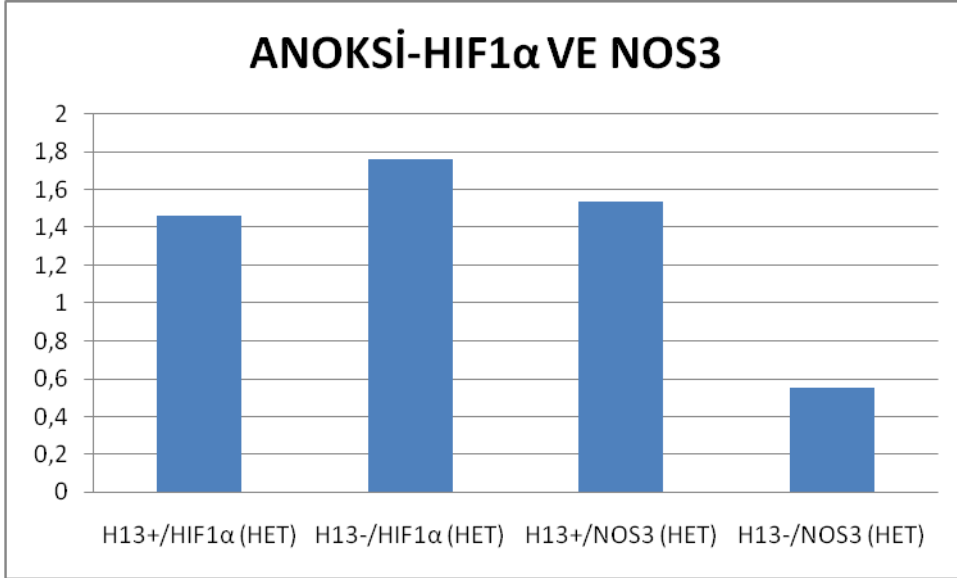
Şekil 4 – 5: ET Hastalarının Hipoksik Koşullardaki HIF1 α Gen Anlatımı ($\Delta\Delta Ct$)



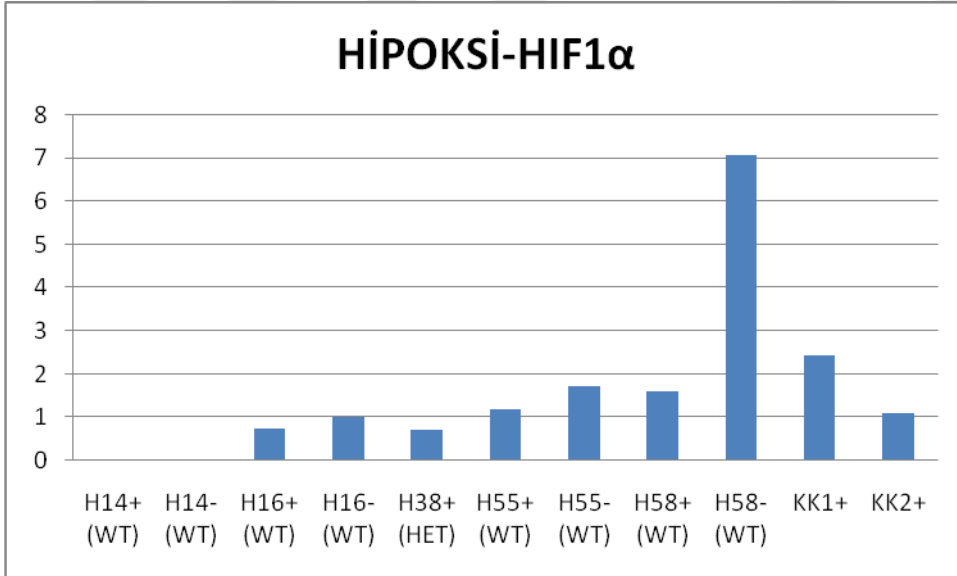
Şekil 4 – 6: ET Hastalarının Hipoksik Koşullardaki NOS3 Gen Anlatımı ($\Delta\Delta Ct$)



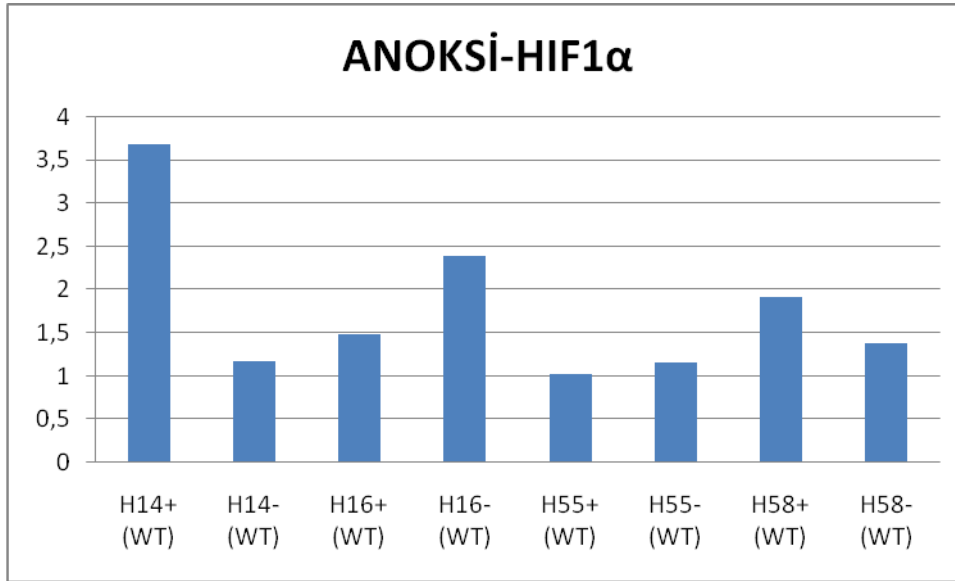
Şekil 4 – 7: ET Hastalarının Anoksik Koşullardaki HIF1 α ve NOS3 Gen Anlatımı ($\Delta\Delta Ct$)



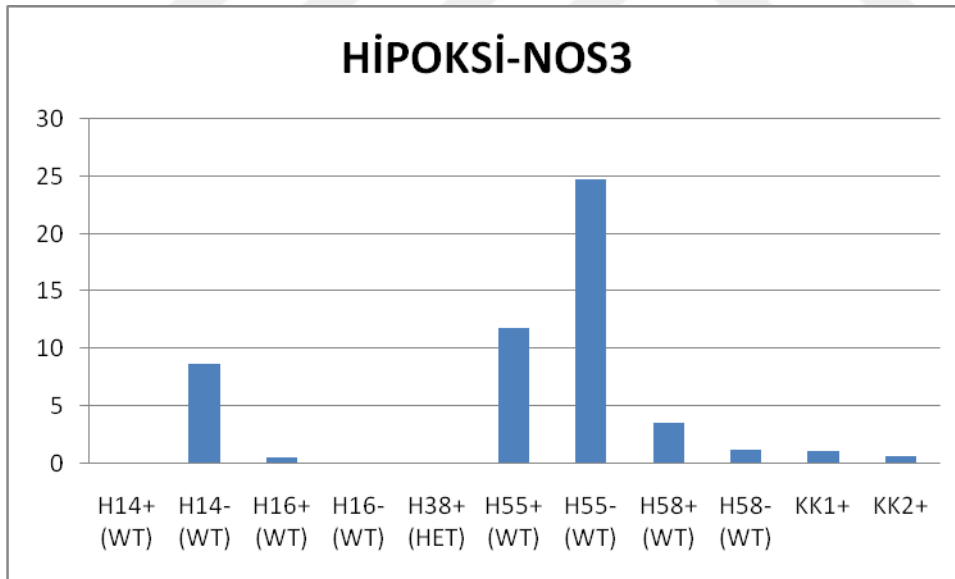
Şekil 4 – 8: Diğer MPN Hastalarının Hipoksik Koşullardaki HIF1 α Gen Anlatımı ($\Delta\Delta Ct$)



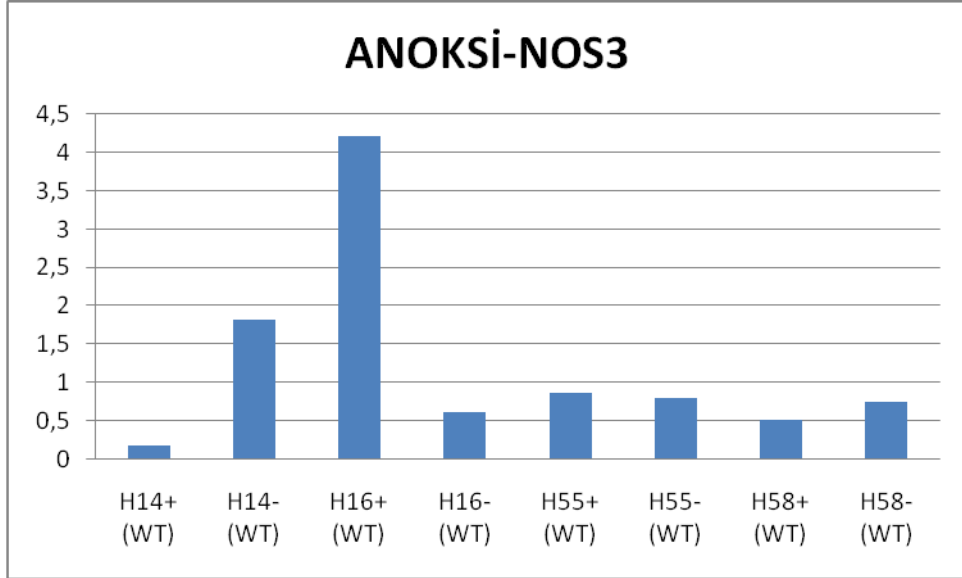
Şekil 4 – 9: Diğer MPN Hastalarının Anoksik Koşullardaki HIF1 α Gen Anlatımı ($\Delta\Delta Ct$)



Şekil 4 – 10: Diğer MPN Hastalarının Hipoksik Koşullardaki NOS3 Gen Anlatımı ($\Delta\Delta Ct$)



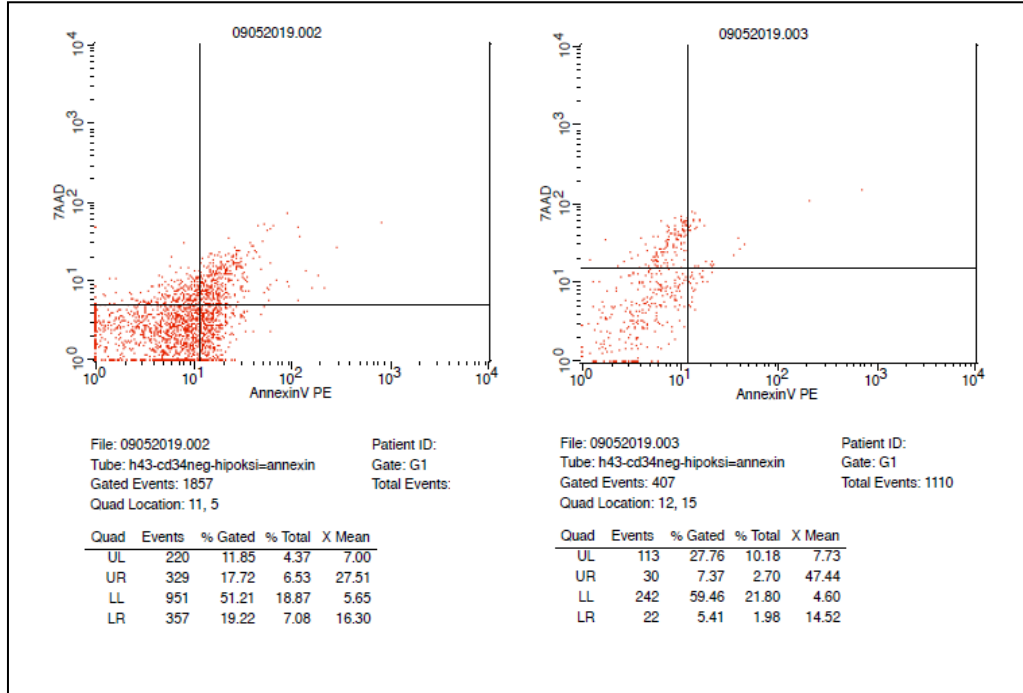
Şekil 4 – 11: Diğer MPN Hastalarının Anoksik Koşullardaki NOS3 Gen Anlatımı ($\Delta\Delta Ct$)



4.4. Annexin V – 7-AAD Apoptoz/Nekroz Deneyi

Çalışma kapsamında yapılan analiz sonuçları Şekil 4 – 12’de gösterilmiştir.

Şekil 4 – 12: Annexin V/7 – AAD Apoptoz/Nekroz Deneyi



5. TARTIŞMA

Reaktif oksijen türleri (ROS), hücre metabolizmasında elektron taşıma zincirinde bir yan ürünü olup; hücredeki ROS üretimi birçok enflamatuvar hastalığın ilerleyişinde ve konak savunma yanıtının merkezinde hem bir sinyal molekülü hem de enflamasyon medyatörü olarak rol alır. Yüksek konsantrasyonları hücreler için toksik olsa da düşük konsantrasyonları – kesin değerlerin hala tanımlanmaya ihtiyacı olsa da – sinyal molekülü olarak iş görür [40, 77].

JAK2V617F mutasyonu BCR-ABL negatif MPN’de en sık rastlanan sürücü mutasyon olsa da *JAK2V617F* negatif vakaların varlığı ve diğer majör sürücü mutasyonların yer almadığı (üçlü negatif) MPN’ler de mevcuttur.

MPN hastalarına ait Kİ ve PK hücrelerinde anjiyogenik genler (*HIF1α*, *eNOS*, *VEGF*) ve *JAK2V617F* alel yükü etkisinin incelendiği bir çalışmada; *eNOS* mRNA düzeyleri MPN hastalarındaki granüositlerde artış gösterirken *HIF1α* ve *VEGF* gen anlatımları azaldığı gösterilmiştir. Dahası VEGF ve eNOS protein düzeyleri birbirleriyle uyuma sahip ve artarken *HIF1α* negatif yönde bir uyuma sahiptir [77].

Çalışma kapsamında 16 MPN hastası ve kontrol olarak 2 kordon kanı örneği incelenmiştir. Çalışmada iki farklı hücre ayırma tekniği kullanılmıştır. Akım ölçer cihazı ile gerçekleştirilen hücre ayırımı, hücreleri büyüklük ve yüzey reseptörü özelliklerini kullanarak daha hassas bir ayırım sağlar. Manyetik ayırım prensibi ile çalışan “MACS Ayırıcı” ile yapılan ayırım işlemi sonrasında CD34 antikoru ve PI solüsyonu kullanılarak yapılan canlılık ve saflık analizi ile manyetik ayırımın başarısı ölçüldüğünde Akım ölçer yönteminin ayırım yüzdesinden daha düşük değerler ölçülmüştür. Çalışma optimize edildikten sonra karşılaşılan bu duruma kolon ile ayırıda kolona takılabilen CD34⁺ hücreler ve kolondan geçerek CD34⁺ hücre popülasyonuna dahil olan CD34⁻ hücreler neden olmaktadır.

Kolon ile ayrılan CD34⁺ ve CD34⁻ hücreleri anoksik, hipoksik ve normoksik koşullarda yapılan hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Literatürdeki bir çalışmada hipoksinin *JAK2V617F*-pozitif MPN hücrelerinin büyümesini ROS düzeyini artırarak baskıladığı bulunmuştur, ancak bu çalışmadaki hipoksik koşulu %95 N₂ (azot) koşulu ile oluşturulmuştur [7]. Bu çalışmada kullanılan mikro çevre cihazı hipoksik kültür koşulları, %1 O₂, %5 CO₂ ve %90 N₂’dir. Çalışma hipoksik ortam koşullarının temsil edilmesi noktasında doğal mikro çevre koşullarını daha başarılı yansıtmaktadır [7].

CellASIC ONIX mikro akışkan kültür platformuna özgü hücre kültür tabaklarının 10 µl hücre süspansiyonu ile çalışmaya izin vermektedir ve çalışma kapsamında hipoksik kültür çalışmaları bu platform ile gerçekleştirilmiş, her örnek tipinden 50.000 hücre/10 µl kullanılmıştır. Mikro çevre cihazının 10 µl hücre süspansiyonu ile çalışmaya izin vermesi çalışmanın kısıtlayıcı faktörüdür. Bu nedenle cDNA sentezinde kullanılan RNA örnekleri arasında en düşük konsantrasyon değerleri hipoksik kültür koşullarına maruz kalan örneklerde ölçülmüştür. Bu koşullarda elde edilen RNA ürünlerinin kalitesi her örnek için gen anlatım çalışmasına izin vermemiştir. Yeterli RNA kalitesine sahip örneklerden düşük konsantrasyon değerli olanlar kantitatif Gerçek Zamanlı PZR çalışmasında tüm RNA örneklerinin aynı konsantrasyonda çalışılmasına engel olmuştur. Anoksik ve hipoksik koşullarda HKH'lerin apoptoza uğramaları, normoksik koşullara göre hücre ölümünün daha fazla olması ve düşük RNA kalitesi nedeniyle bu koşullar incelenmek istendiğinde ileri çalışmalar açısından anoksik ve hipoksik koşullarda kültüre alınmış daha yüksek hücre sayısına ihtiyaç duyulmaktadır.

Gen anlatımı çalışmasında CT değerleri arasındaki farkın 1'den fazla olduğu veriler gen anlatımı analizinden çıkarılmıştır. H22, H24, H28 ve H58 örneklerine ait gen anlatım çalışmasında düşük RNA konsantrasyonu nedeniyle flor ışımada anlamlı bir artış tespit edilememiştir. Bu hastalar için RNA Clean&Concentrator (ZymoResearch) kiti kullanılarak RNA saflığı artırıldığında da yeni bir sonuç elde edilememiştir.

Hipoksik koşullarda hücrede gözlenen *HIF1α* ve *NOS3* gen anlatımı artışı beklenen bir etkidir ve çalışmada kullanılan mikro çevre inkübatörü içerisinde hücrelerin hipoksik şartlara maruz kalışının deneysel kontrolü olmuştur [32, 35].

Çalışmaya dahil edilen ve iki aşamalı alele özgü PZR yardımıyla *JAK2V617F* mutasyon varlığı ve alel tipi incelenen MPN hastaları içerisinde *JAK2* ekzon 14 mutasyonunu yabanıl tip olarak taşıyan hastaların varlığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada yer alan hastalardaki MPN patogenezine yol açan genetik değişimin kesin olarak belirlenmesi hastaların kliniklerinin açıklanması, tedavilerinin doğru yönetilmesi ve bu çalışma kapsamında farklılıkların detaylı değerlendirilebilmesi için çok önemlidir. Literatürde yer alan mutasyonlar taranarak oluşturulan gen panellerinin kullanımı [6] ve saptanan değişimlerin Sanger Dizileme yöntemi ile doğrulanması; bu sayede Türk toplumundaki mutasyon sıklıklarının belirlenmesi açısından önemlidir.

Yapılan apoptoz çalışmaları ticari kit protokolüne uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Mikro çevre cihazına yüklenen 100.000 hücre, hipoksik kültür sonrası alınarak

apoptoz/nekroz belirteçleri ile boyandıktan sonra hücre sayısının olması gereken hücre sayısının çok altında yer aldığı; bunun da apoptoz çalışması için mikro çevre kültür ortamındaki hücre sayısının optimizasyona ihtiyaç duyduğunu göstermiştir. Apoptoz analizi için daha az hücre sayısına ihtiyaç duyulan ELISA tabanlı bir çalışma daha uygun olacaktır.

Örnekleme sayısının ayrıntılı istatistiksel analiz için sayıca az olması nedeniyle analizler MPN alt grupları yerine tüm hastalıklarda CD34⁺/CD34⁻ ve hipoksi/anoksi koşulları temel alınarak yapılmıştır. Varyans analizi sonucunda PV hasta grubunda hipoksi için *HIF1α* ve *NOS3* gen anlatımlarının kontrol grubu (normoksi) hücrelerine göre artmış olduğu gösterilmiştir (*HIF1α* için p=0,0001 ve *NOS3* için p=0,0062). Çalışma hipotezinden farklı olarak CD34⁻ hücrelerde ilişkili gen anlatımları CD34⁺ hücrelere göre daha fazla bulunmuştur. Anoksik koşullarda da *HIF1α* gen anlatımı CD34⁻ hücrelerde CD34⁺ hücrelerden daha fazladır (p=0,1931). *NOS3* gen anlatımı incelendiğinde iki hastada CD34⁻ hücrelerde CD34⁺ hücrelerden dikkat çekici oradanda daha fazla iken, iki olguda da CD34⁺ hücrelerde artmış anlatım gözlenmiştir.

ET grubunda bulunan iki hastada hipoksik koşullarda *HIF1α* anlatımı kontrol hücrelerinden daha az olmakla birlikte, CD34⁺ hücrelerde CD34⁻ hücrelere göre anlatımın daha fazla olduğu gözlenmiştir. *NOS3* anlatımında ise bu durum tam tersi olmaktadır, CD34 yüzey belirteci negatif olan hücrelerde pozitiflere göre artmış anlatım mevcuttur. Anoksik koşullarda *HIF1α* anlatımı CD34⁻ hücrelerde fazla iken, *NOS3* geni anlatımı CD34⁺ hücrelerde fazladır.

Diğer MPN hastalarının gen anlatım verileri incelendiğinde, hipoksik koşullarda *HIF1α* gen anlatımında CD34⁻ hücrelerde CD34⁺ hücrelere göre artış olduğu saptanmış; bu durumun aynı hücre tipi için yabani tip varyant taşıyan hücrelerde heterozigot (monoalelik) *JAK2*V617F alel bulunan hastalara göre de fazla olduğu görülmüştür. *JAK2* geninin hücre içi sinyal trafiğindeki rolü nedeniyle bazı kritik yollar üzerine olan önemli etkileri, *JAK2* ekzon 14 mutasyonu yabani tipli variant taşıyan hücrelere kıyasla birtakım dezavantajlar doğuruyor olabilir; bu da mutasyonu taşımayan CD34⁻ hücrelerin CD34⁺ hücrelerden yüksek anlatım göstermesinin nedeni olabilir. *NOS3* gen anlatımlarının hipoksik koşullarda kontrol hücrelerinden daha fazla olduğu görülmüştür. Anoksik koşullarda ise her iki gen için de, iki hastada negatif hücre grubunda anlatım fazla iken; diğer iki hastada bu durum pozitif hücreler için geçerli bulunmuştur.

Çalışamadaki örnek sayısının azlığı ve kültüre edilmiş toplam hücre sayısının az olması nedeni ile düşük konstrasyonlarda RNA eldesi çalışmanın kısıtlayıcı faktörleridir. Literatürdeki farklı kanser tiplerine ait KaKH yüzey belirteçleri ile izole edilmiş hücrelerin hipoksik koşullardaki çalışmalarından farklı sonuçların da elde edilmiş olması CD34 ile hipoksi/anoksi çalışmalarının eksikliğini de göz önüne sermiştir [18, 20]. Daha geniş kapsamlı ve literatür açısından çalışmalara ihtiyaç duyulan MPN CD34^{+/-} hücreler yapılacak ile geniş kapsamlı çalışmalar, bu hasta gruplarında sağkalımı artırıcı tedavi protokolleri, gen anlatım durumuna ve moleküler etkilere göre yeni tedavi edici ajanların geliştirilmesi açısından oldukça önemlidir ve ses getirici olacaktır. MPN dışındaki hematolojik maliniteler ile yapılmış kapsamlı çalışmalarda yeni tedavi stratejileri olarak *HIF1α*'nın hedeflenmesi ile KaKH sayısının ve aktivitesinin azaltılacağı gösterilmiştir [75, 76]. Hücre fizyolojisi ile yapılan çalışmalarda da oksijen homeostazının hücre gelişimi ve farklılaşması için önemli olduğu, bu kapsamda *HIF1α* ve *NOS3* gibi bu yollarda etkin genlerin majör roller üstlendikleri bilinmektedir [2, 8, 27, 29, 31]. Tümör mikro çevresi kavramının ortaya çıkmasında rol oynayan ve hematolojik malinitelerde olası KaKH'lerin yuvası olan niş kavramı ile yapılacak ayrıntılı çalışmalar ve mikro çevrenin anlaşılması kanser ile savaşta önemlidir [18, 20]. Tüm bu bilgilerin ışığında MPN hastalık grubunda ve bu grubun farklı patojenik genetik varyasyonların tespiti ile yapılacak çalışmalarla hastalık tipine ve genotipe özgü tedavi/yaklaşım ve protokoller geliştirilmesi gerekliliği açıktır. MPN gibi sağkalımın uygun tedavi protokolleri ile dramatik şekilde arttığı gösterildiği kanser tiplerinde yeni gelişmeler yüz güldürücü olacaktır. Ayrıca hematolojik maliniteler dışında da farklı birçok kanser tipinde bu çalışmalar metastazı, tedaviye direnç gelişimini ve kanser ilerlemesini engelleyici/yavaşlatıcı olası yeni antikanser ajanların bulunmasına ışık tutacak güçtedir.

KAYNAKLAR

1. Hesiodos, *Theogonia*. (Çev. Azra Erhat, Selahattin Eyübođlu), Türkiye İş Bankası Yayınları, 2016, İstanbul.
2. Guyton A., Hall J. *Medical Physiology*. 10th edition; 2001.
3. Cario H. ve ark. Familial polycythemia vera with Budd-Chiari syndrome in childhood. *Brit. J. Haemat.* 2003; **123**: 346-352,.
4. Vannucchi, A.M. ve ark. Philadelphia chromosome negative chronic myeloproliferative neoplasms: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2015; **26**: 85-99.
5. Nangalia J. ve ark. Somatic *CALR* Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated *JAK2*. *N Engl J Med* 2013; **369**: 2391-2405
6. Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: *JAK2*, *MPL*, *TET2*, *ASXL1*, *CBL*, *IDH* and *IKZF1*. *Leukemia*. 2010 Jun; **24(6)**: 1128–1138.
7. Mitsumori T. ve ark. Hypoxia inhibits *JAK2*V617F activation via suppression of *SHP-2* function in myeloproliferative neoplasm cells. *Exp Hematol*. 2014 Sep; **42(9)**: 783-92.e1.
8. Eliasson P., Jonsson J.I. The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice placeto be. *J Cell Physiol*. 2010 Jan; **222(1)**: 17-22.
9. Klampfl T. ve ark. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *New England Journal of Medicine*. 2013; **369(25)**: 2379-2390.
10. Haeckel E. *Anthropogenie oder Entwicklungsgeschichte des Menschen*. 1874.
11. Can A. *Kök Hücre: Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları*. Akademisyen Tıp Kitabevi, 2014, Ankara.
12. Morrison S.J., Uchida N., Weismann I.L. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1995;**11**: 35-71.
13. Ende M., Ende N. Hematopoietic transplantation by means of fetal (cord) blood. A new method. *Va Med Mon*. 1972 Mar; **99(3)**: 276-80.

14. Gluckman A. ve ark. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood form an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*. 1989 Oct 26; **321(17)**: 1174-8.
15. Slatter M.A. ve ark. Use of two unrelated umbilical cord stem cell units in stem cell transplantation for Wiskott-Aldrich syndrome. *Pediatr Blood Cancer*. 2006 Sep; **47(3)**: 332-4.
16. Mackillop W.J., Ciampi A., Till J.E., Buick R.N. A stem cell model of human tumor growth, implications for tumor cell clonogenic assays. *J Natl Cancer Inst*. 1983; **70**: 9-16.
17. Lapidot T. ve ark. A cell initiating human acute leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994; **367**: 645-648.
18. Ural A.U. *Cancer stem cells: Current concepts and therapeutic implications. Adults and Embryonic Stem Cells*. Turksen K (ed.), Humana Press, pp:227-235, 2012.
19. Kucia M., Ratajczak M.Z. Stem cells as a two edged sword—from regeneration to tumor formation. *J Physiol Pharmacol*. 2007; **57(7)**: 5-16.
20. Li F., Tiede B., Massague J., Kang Y. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Res*. 2007; **17**: 3-14.
21. Hope K.J., Jin L., Dick J.E. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat Immunol*. 2004; **5**: 738-743.
22. Allan A.L., Vantyghem S.A., Tuck A.B., Chambers A.F. Tumor dormancy and cancer stem cells: implications for the biology and treatment of breast cancer metastasis. *Breast Dis*. 2006; **26**: 87-98.
23. Takahashi K. ve ark. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; **131**: 961-872.
24. Yu J. ve ark. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007; **318**: 1917-1920.
25. Bonnet D., Dick J.E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*. 1997; **3**: 730-737.
26. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and hemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978; **4(1-2)**: 7-25.

27. Scadden D.T. The stem cell niche as an entity of action. *Nature*. 2006 Jun 29; **441(7097)**: 1075-9.
28. Lorenze E., Uphoff D., Reid T.R., Shelton E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst*. 1951; **12**: 197-201.
29. Acar M. Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal. *Nature*. 2015 Oct 1; **526(7571)**: 126-30.
30. Lam B.S., Cunningham C., Adams G.B. Pharmacologic modulation of the calcium-sensing receptor enhances hematopoietic stem cell lodgment in the adult bone marrow. *Blood*. 2011 Jan 27; **117(4)**: 1167-75.
31. Şimşek T. ve ark. The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell*. 2010 Sep 3; **7(3)**: 380-90.
32. Takubo K. ve ark. Regulation of the HIF-1 alpha level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010 Sep 3; **7(3)**: 391-402.
33. Goldberg M.A., Dunning S.P., Bunn H.F. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science*. 1988 Dec 9; **242(4884)**: 1412-5.
34. Semenza G.L., Koury S.T., Nejfelt M.K., Gearhart J.D., Antonarakis S.E. Cell-type-specific and hypoxia-inducible expression of the human erythropoietin gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Oct 1; **88(19)**: 8725-9.
35. Wang G.L., Semenza G.L. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*. 1995 Jan 20; **270(3)**: 1230-7.
36. Pugh C.W., O'Rourke J.F., Nagao M., Gleadle J.M., Ratcliffe P.J. Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem*. 1997 Apr 25; **272(17)**: 11205-14.
37. Semenza G.L. ve ark. Hypoxia-inducible factor 1: from molecular biology to cardiopulmonary physiology. *Chest*. 1998 Jul; **114(1 Suppl)**: 40S-45S.
38. Makino Y. ve ark. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature*. 2001 Nov 29; **414(6863)**: 550-4.

39. Makino Y., Kanopka A., Wilson W.J., Tanaka H., Poellinger L. Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3 α locus. *J Biol Chem.* 2002 Sep 6; **277(36)**: 32405-8.
40. Marty C. ve ark. A role for reactive oxygen species in JAK2V617F myeloproliferative neoplasm progression. *Leukemia.* 2013; **27**: 2187-2195.
41. Zhong E. ve ark. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.* 1999 Nov 15; **59(22)**: 5830-5.
42. Talks K.L. ve ark. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol.* 2000 Aug; **157(2)**: 411-21.
43. Bruick R.K., McKnight S.L. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science.* 2001; **294**: 1337-1340.
44. Brusselmans K. ve ark. Hypoxia-inducible factor 2- α (HIF-2 α) is involved in the apoptotic response to hypoglycemia but not to hypoxia. *J Biol Chem.* 2001; **276**: 39192-39196.
45. Chen C., Pore N., Behrooz A., Ismail-Beigi F., Maity A. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem.* 2001; **276**: 9519-9525.
46. Conway E.M., Collen D., Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res.* 2001; **49**: 507-521.
47. Sodhi A., ve ark. The Kaposi's sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor upregulates vascular endothelial growth factor expression and secretion through mitogen-activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor 1 α .. *Cancer Res* 2000; **60**: 4873-4880.
48. Stiehl D.P., Jelkmann W., Wenger R.H., Hellwig-Burgel T. Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1 α by insulin and interleukin-1 β involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *FEBS Lett.* 2002; **512**: 157-162.
49. Tian H., McKnight S.L., Russell D.W. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* 1997; **11**: 72-82.

50. Conley S.J. ve ark. Antiangiogenic agents increase breast cancer stem cells via the generation of tumor hypoxia. *Proc Natl Acad U S A*. 201; **109(8)**: 2784-2789.
51. Hinds D.A. ve ark. Germ line variants predispose to both JAK2 V617F clonal hematopoiesis and myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2016; **128(8)**: 1121-1128.
52. Scott L.M. ve ark. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2007; **356(5)**: 459-468.
53. Pietra D. ve ark. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood*. 2008; **111(3)**: 1686-1689.
54. Pardanani A., Lasho T., Finke C., Oh S.T., Gotlib J., Tefferi A. LNK mutation studies in blast-phase myeloproliferative neoplasms, and in chronic-phase disease with TET2, IDH, JAK2 or MPL mutations. *Leukemia*. 2010; **24(10)**: 1713-1718.
55. Ernst T. ve ark. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet*. 2010; **42(8)**: 722-726.
56. Shounan Y., MacKenzie K., Dolnikov A., Miller M., Symonds G. Myeloproliferative disease and myelodysplastic syndrome induced by transplantation of bone marrow cells expressing mutant p53. *Leukemia*. 1997; **11(10)**: 1641-1649.
57. Harutnunyan A., Klampfl T., Cazola M., Kralovics R. p53 lesions in leukemic transformation. *N Engl J Med*. 2011; **364(5)**: 488-490.
58. Tefferi A. ve ark. Detection of mutant TET2 in myeloid malignancies other than myeloproliferative neoplasms: CMML, MDS, MDS/MPN and AML. *Leukemia*. 2009; **23(7)**: 1343-1345.
59. Langemeijer S.M. ve ark. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*. 2009; **41(7)**: 838-842.
60. Jankowska A.M. ve ark. Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2009; **113(25)**: 6403-6410.
61. Delhommeau F. ve ark. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*. 2009; **360(22)**: 2289-2301.

62. Abdel-Wahab O. ve ark. Genetic characterization of TET1, TET2 and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood*. 2009; **114(1)**: 144-147.
63. Carbuccia N. ve ark. Mutations of ASXL1 gene in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2009; **23(11)**: 2183-2186.
64. Abdel-Wahab O. ve ark. Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. *Cancer Res*. 2010; **70(2)**: 447-452.
65. Abdel-Wahab O. ve ark. Concomitant analysis of EZH2 and ASXL1 mutations in myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2011; **25(7)**: 1200-1202.
66. Arber D.A. ve ark. The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016: blood-2016-2003-643544.
67. Clarke M.F. ve ark. Cancer Stem Cells—Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells. *Cancer Res*. 2006; **66**: 9339–9344.
68. Barbui T., Thiele J., Gisslinger H. Finazzi G., Vannucchi A.M., Tefferi A. The 2016 revision of WHO classification of myeloproliferative neoplasms: Clinical and molecular advances. *Blood Rev* 2016.
69. Türk Hematoloji Derneği. *BCR-ABL Negatif Klasik Kronik Myeloproliferaif Neoplaziler Tanı ve Tedavi Kılavuzu* (İnternette) 2016. Erişim <http://www.thd.org.tr/thdData/Books/69/bolum-ii-bcr-abl-negatif-klasik-kronik-miyeloproliferatif-neoplaziler.pdf>
70. Marchioli R. ve ark. Cardiovascular events and intensity of treatment in polycythemia vera. *N Eng J Med*. 2013; **368(1)**: 22-33.
71. Chievitz E., Thiede T. Complications and causes of death in polycythemia vera. *Acta Med Scand*. 1962; **172**: 513-523.
72. Tefferi A. ve ark. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis. *Blood*. 2014; **124**: 2507-2513. quiz 2615.

73. Majoros A., Platanitis E., Kernbauer-Hölzl E., Rosebrock F., Müller M., Decker T. Canonical and Non-Canonical Aspects of JAK-STAT Signaling: Lessons from Interferons for Cytokine Responses. *Front Immunol.* 2017; Jan 26; **8**: 29.
74. Sipkins D.A. ve ark. In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumor engraftment. *Nature.* 2005; **435**: 969-973.
75. Colla S. ve ark. Low bone marrow oxygen tension and hypoxia-inducible factor-1 alpha overexpression characterize patients with multiple myeloma: role on transcriptional and proangiogenic profiles of CD138(+) cells. *Leukemia.* 2010; **24**: 1967-1970.
76. Irigoyen M., Garica-Ruiz J.C., Berra E. The hypoxia signalling pathway in haematological malignancies. *Oncotarget.* 2017; **8(22)**: 36832-36844.
77. Suboticki T. ve ark. Angiogenic factors are increased in circulating granulocytes and CD34⁺ cells of myeloproliferative neoplasms. *Molecular Carcinogenesis.* 2017; **56**: 567-579.

ETİK KURUL KARARI

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 1157

Konu: Yard. Doç. Dr. Selçuk Sözer TOKDEMİR hk.


Tarih : 19.10.2017

Sayın Yard. Doç. Dr. Selçuk Sözer TOKDEMİR
Genetik Anabilim Dalı

İlgi : Genetik Anabilim Dalının 06/10/2017 gün ve 373472 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Yüksek Lisans Öğrencisi Can Veysel ŞOROĞLU' nun yürüteceği 2017/1126 dosya numaralı "Hematopoietik ve Kanser Kök Hücrelerin Hipoksik Koşullardaki Fonksiyonel ve Genomik Yanıtları" başlıklı çalışma kurulumuzun 13/10/2017 tarih ve 16 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.


Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

HEMATOPOİETİK VE KANSER KÖK HÜCRELERİN HİPOKSİK KOŞULLARDAKİ FONKSİYONEL VE GENOMİK YANITLARI

ORIJİNALLIK RAPORU

%9 BENZERLİK ENDEKSİ	%5 İNTERNET KAYNAKLARI	%2 YAYINLAR	%8 ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
--------------------------------	-------------------------------------	-----------------------	-------------------------------

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%4
2	Submitted to Uludag University Öğrenci Ödevi	%1
3	Submitted to Haliç Üniversitesi Öğrenci Ödevi	%1
4	Submitted to Fatih University Öğrenci Ödevi	%1
5	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<%1
6	acikerisim.istanbulbilim.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
7	www.thd.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	www.anadoluissagligi.com İnternet Kaynağı	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Can Veysel	Soyadı	ŞOROĞLU
Doğ.Yeri	Fatih	Doğ.Tar.	15.11.1991
Email	cveysels@gmail.com	Uyruğu	T.C.

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	İÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik	2015
Lise	Cağaloğlu Anadolu Lisesi	2009

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	YÖKDİL Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Orta	İyi	83.750	
Almanca	Orta	Orta	Orta		A2

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	80,85582	82,18040	82,54902

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Python	Başlangıç
R	Başlangıç

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

13. Uluslararası Balkan Genetik Kongresi Poster Sunumu

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Müzik – Edebiyat