

← 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-CERRAHPAŞA  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

AKUT MİYELOİD LÖSEMİ HASTALARINDA  
MİKRORNA-210 VE BCL-2 EKSPRESYON  
SEVİYELERİNİN SİTOGENETİK BULGULARI İLE  
KARŞILAŞTIRILMASI

HANDENUR GÖKTAN

DANIŞMAN  
DOÇ. DR. DUYGU GEZEN AK

II. DANIŞMAN  
PROF. DR. AYHAN DEVİREN

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2019

**TEZ ONAYI**

Bu çalışma 09.04.2019 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı Yüksek Lisans  
Tezi olarak kabul edilmiştir.

**TEZ JÜRİSİ**

Doç. Dr. Duygu Gezen Ak  
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa  
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Yelda Tarkan Argüden  
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa  
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Sema Sırma  
İstanbul Üniversitesi  
İstanbul Tıp Fakültesi

## 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 haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

HANDENUR GÖKTAN



## İTHAF

Her zaman destekçim olan sevgili aileme ithaf ediyorum,

## TEŞEKKÜR

Tezimin başlangıcından bitimine kadar her aşamasında bana güvenen, beni cesaretlendiren, yardımını hiçbir zaman esirgemeyen ve tecrübeleriyle bana yol gösteren sevgili danışman hocam Doç. Dr. Duygu GEZEN AK'a

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, bilimsel gelişimime büyük katkıda bulunan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Ayhan DEVİREN'e

Çalışmalarım sırasındaki kıymetli yardım ve destekleri için Doç Dr. Erdinç DURSUN'a

Danıştığım her konuda yardımlarını eksik etmeyen, mesleki gelişimime katkıda bulunan değerli Sitogenetik Laboratuvarı ekibinden; Dr. Şükriye Yılmaz'a, Dr. Dilhan KURU'ya, Doç. Dr. Ayşe ÇIRAKOĞLU'na ve Doç Dr. Yelda TARKAN ARGÜDEN'e ,

Mesleki deneyimlerini benimle paylaşan Doç. Dr. Onur BAYKARA'ya

Her anımda yanımda olan ve yardımına koşan sevgili arkadaşım Arş. Gör. Seda SÜSGÜN'e ve yine her zaman bana yardımcı olan sevgili arkadaşlarım M.Sc. Başak ÇAKMAK'a, PhD. Hilal ŞAHİN'e, M.Sc. Narmin BAKHSHALİYEVA'ya, İlknur YALDIR'a ve M.Sc. Aslı Karacan'a

İlgisi, anlayışı ve en yoğun anlarında bile bana zaman ayırdığı için başta Arş. Gör. Merve ALAYLIOĞLU olmak üzere, M.Sc. Ebru KESKİN'e, Pelin SORDU'ya, M.Sc. Büşra ŞENGÜL'e ve tüm Beyin ve Nörodejeneratif Hastalıklar Laboratuvarı ekibine,

Hayatım boyunca beni maddi manevi destekleyen, her zaman yanımda olan ve beni bugünlere getiren sevgili annem Emine GÖKTAN'a, sevgili babam Bülent GÖKTAN'a ve her zaman bana örnek olan sevgili abim Onur GÖKTAN'a

Manevi desteğini her zaman hissettiğim, bu zorlu süreçte beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan Oğuz KURT'a sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 22771





## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	3
BEYAN.....	4
İTHAF.....	5
TEŞEKKÜR.....	6
İÇİNDEKİLER .....	8
TABLolar LİSTESİ.....	11
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	12
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	13
ÖZET .....	15
ABSTRACT.....	16
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	17
2. GENEL BİLGİLER .....	19
2.1. Hematopoez .....	19
2.2. Lösemiler .....	20
2.3. Akut Miyeloid Lösemi .....	20
2.3.1. Sınıflaması .....	20
2.3.2. İnsidansı .....	24
2.3.3. Etiyolojisi .....	24
2.3.4. Prognozu .....	25
2.3.4.1. Yaş.....	25
2.3.4.2. Önceden Geçirilmiş Hematolojik Hastalıklar .....	26
2.3.4.3. Sitotoksik Terapiler .....	27
2.3.4.4. Diğer Klinik Faktörler .....	27
2.4. AML'nin Genetiği .....	27
2.4.1. Sitogenetiği .....	27
2.4.2. AML'nin Moleküler Genetiği .....	29
2.4.2.1. FLT3 Mutasyonu ( <i>Fms-like Tyrosine Kinase 3</i> ).....	32
2.4.2.2. NPM1 Mutasyonu ( <i>Nucleophosmin 1</i> ).....	32
2.4.2.3. CEBPA Mutasyonu ( <i>CCAAT Enhancer Binding Protein</i> ).....	32
2.4.2.4. KIT Mutasyonu .....	33

2.4.2.5. DNMT3A Mutasyonu ( <i>DNA Methyltransferase 3A</i> ).....	33
2.5. Apoptoz ile İlişkili Genler .....	33
2.5.1. BCL-2 Gen Ailesi .....	35
2.6. mikroRNA'lar .....	37
2.6.1. miRNA biyogenezi .....	37
2.6.2. miRNA ve Hastalık İlişkisi .....	38
2.6.3. miRNA ve Kanser .....	38
2.6.4. miRNA ve AML .....	39
2.6.5. miR-210 .....	40
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	43
3.1. Gereç .....	43
3.1.1. Çalışma Grubu .....	43
3.2. Yöntem.....	43
3.2.1. Konvansiyonel Sitogenetik Yöntemi .....	43
3.2.2. Moleküler Yöntemler .....	45
3.2.2.1. RNA İzolasyon Yöntemleri.....	45
3.2.2.2. RNA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi .....	48
3.2.2.3. mRNA'dan cDNA Sentezi .....	48
3.2.2.4. cDNA'ların Sulandırılması .....	49
3.2.2.5. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) .....	49
3.2.2.6. miRNA'dan cDNA Sentezi.....	51
3.2.2.7. qRT-PCR Deneylerinin Analizi .....	52
3.3. Kullanılan Gereçler .....	52
3.3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler .....	54
3.3.2. Kullanılan Solüsyonlar.....	54
3.3.2.1. Periferik Lenfosit Kültürü İçin Kullanılan Solüsyonlar.....	54
4. BULGULAR.....	56
4.1. Konvansiyonel Sitogenetik Bulguları .....	56
4.2. miRNA-210 ve BCL-2 gen ekspresyon analizi sonuçları.....	58
5. TARTIŞMA .....	62
KAYNAKLAR .....	68
ETİK KURUL KARARI .....	76
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	77

ÖZGEÇMİŞ.....	78
---------------	----



## TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: FAB sınıflandırması ve İnsidansları (5).....	20
Tablo 2-2 : AML’de WHO Sınıflandırması (5).....	22
Tablo 2-3: AML’de ELN Sınıflandırması (25).....	23
Tablo 2-4: AML Oluşumuna Neden Olan Risk Faktörleri (6) .....	24
Tablo 2-5 : AML hastalarında yapılan 3 farklı çalışmada görülen sitogenetik bulgular ve prognoza etkileri (32).....	28
Tablo 2-6: AML’de görülen sitogenetik ve moleküler değişimler ve prognoza etkileri (20).....	30
Tablo 2-7 : BCL-2 gen ailesi üyeleri ve hücre içi lokasyonları (12) .....	35
Tablo 2-8: AML’de görülen kromozom anomalileri ve miRNA ilişkisi (66) .....	39
Tablo 2-9: Kanser çeşitlerine göre miR210’un rolü ve ekspresyon seviyesi (69).....	41
Tablo 3-1: RNA konsantrasyonlarının belirlenmesi sırasında kullanılan standart ve örneklerin hazırlanması.....	48
Tablo 3-2 : mRNA’dan cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon karışımının hazırlanması: .....	49
Tablo 3-3: mRNA’dan cDNA sentezi için kullanılan ısı döngüleri .....	49
Tablo 3-4: mRNA ekspresyon analizi için hazırlanan qRT-PCR reaksiyon karışımı ....	50
Tablo 3-5: mRNA ekspresyon analizi için kullanılan qRT-PCR ısı döngüleri .....	50
Tablo 3-6: miRNA’dan cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon karışımının hazırlanması .....	51
Tablo 3-7: miRNA ekspresyon analizi için hazırlanan qRT-PCR reaksiyon karışımı ...	51
Tablo 3-8: miRNA ekspresyon analizi için kullanılan qRT-PCR ısı döngüleri .....	52
Tablo 4-1: Olgulara ait yaş, cinsiyet ve tanı bilgileri .....	56
Tablo 4-2: Olguların konvansiyonel sitogenetik analizi sonuçları .....	57
Tablo 4-3: Kontrol grubuna ait konvansiyonel sitogenetik analiz sonuçları .....	57

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Hematopoez (18).....	19
Şekil 2-2 : İntresik ve ekstrinsik apoptoz yolakları (46) .....	34
Şekil 2-3: miRNA biyogenezi (59).....	38
Şekil 4-1: AML’li ve sağlıklı bireylerdeki BCL-2 ekspresyon seviyesi .....	58
Şekil 4-2: AML’li ve sağlıklı bireylerdeki miR-210ekspresyon seviyesi .....	59
Şekil 4-3: BCL-2 ve miR-210 ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması .....	59



## SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- AHD:** Önceden geçirilmiş hematolojik hastalık
- ALL:** Akut Lenfoblastik Lösemi
- AML:** Akut Miyeloid Lösemi
- CALGB:** Cancer and Leukemia Group B
- CEBPA:** CCAAT Enhancer bağlayıcı protein  $\alpha$
- DIABLO:** Direct IAP-Binding protein with Low PI
- DISC:** Ölümü indükleyen sinyal kompleksi
- DNMT3A:** DNA Metiltransferaz 3A
- ECOG:** Doğu Kooperatifi Onkoloji Grubu
- ELN:** Avrupa Lösemi Ağı
- FAB:** Fransız-Amerikan-İngiliz Sınıflandırması
- FLT3:** FMS benzeri tirozin kinaz 3
- GTL:** Giemsa-Tripsin-Leishman
- HIF-1-  $\alpha$ :** Hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa
- HRM:** Hipoksi ile Regüle miRNA'lar
- HSC:** Hematopoetik Kök Hücre
- KLL:** Kronik Lenfoblastik Lösemi
- KML:** Kronik Miyeloid Lösemi
- MCL-1 :** Induced myeloid leukemia cell differentiation protein
- MDS:** Miyelodisplastik Sendrom
- miRNA-miR:** mikroRNA
- MRC:** Medical Research Council / Tıbbi Araştırma Konseyi
- NPM1:** Nükleofosmin 1
- PARP:** Poli-ADP riboz polimeraz
- RISC:** RNA-induced silencing
- RT-PZR / PCR:** Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
- SHIP-1:** Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat 5-fosfataz 1
- SMAC:** Second Mitochondria-Derived Activator of Caspases

**SWOG:** Güneybatı Onkoloji Grubu

**TNF:** Tümör Nekroz Faktör

**WHO:** Dünya Sağlık Örgütü



## ÖZET

GÖKTAN, H. (2019). İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Akut Miyeloid Lösemi Hastalarında mikroRNA-210 ve BCL-2 Ekspresyon Seviyelerinin Sitogenetik Bulguları İle Karşılaştırılması İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Akut Miyeloid Lösemi'nin başlaması ve ilerlemesinde mikroRNA'lar önemli rol oynamaktadır. mikroRNA-210'un AML'nin prognozuna etkisi ve AML gelişimdeki etki ettiği yolaklar araştırılan bir konudur. Çalışmamızda AML hastalarında miRNA-210 ve BCL-2'nin ekspresyonlarının prognoza etkisini ve birbirleriyle korelasyonunu incelemekle birlikte sitogenetik bulgularla bu verileri karşılaştırmayı amaçladık.

Çalışma İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji kliniğinde AML tanısı almış ve henüz tedavi başlanmamış 7 hastanın kemik iliği ve sağlıklı 7 bireyin perifer kanı materyalinde yapıldı. Her iki grubun kan ve kemik iliği materyallerine RNA izolasyon kiti ile RNA izolasyonu yapıldı ve daha sonra qRT-PCR ile miRNA-210 ve BCL-2 ifadesi belirlendi. Ayrıca her iki gruba da konvansiyonel sitogenetik yöntem uygulanarak karyotip analizi yapıldı ve mevcut kromozom anomalileri belirlendi.

Elde ettiğimiz verilere göre AML hastalarının kemik iliği materyalinde artmış miR-210 ekspresyonunun BCL-2 ekspresyonunun artışı ile korele olduğu görülmüştür. Bulgularımız AML'de miR-210'un BCL-2 ekspresyonunu hedefleyerek apoptoza etki ettiğini düşündürmektedir. Ayrıca miR-210'un hastalığın tanı ve tedavisinde biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Sitogenetik bulgularımız da aşırı miR-210 ve BCL-2 ekspresyonunun kötü prognoza etkisini destekler niteliktedir. Bu verilerin ışığında AML'de miR-210'un BCL-2'yi etkilediğini düşündüğümüz apoptoz mekanizmasının aydınlatılmasına ihtiyaç vardır. Sonuçların uygunluğunun belirlenebilmesi için yüksek sayıda hasta grubu ve daha kapsamlı testlerin yapılması gerektiği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** AML, miRNA-210, BCL-2, Sitogenetik, Prognoz

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 22771



## ABSTRACT

GÖKTAN, H. (2019). Comparison of microRNA-210 and BCL-2 Expression Levels with Cytogenetic Findings in Acute Myeloid Leukemia Patients. Istanbul University, Institute of Health Science, Department Of Medical Biology. Master's Thesis. Istanbul.

MicroRNAs play an important role in the initiation and progression of Acute Myeloid Leukemia. The effect of microRNA-210 on the prognosis of AML and its pathways in the development of AML is a research topic. In this study, we aimed to compare the affects of miRNA-210 and BCL-2 expression on prognosis and correlate with each other, and to compare these data with cytogenetic findings.

The study was performed in 7 patient's bone marrow materials who diagnosed AML in the İstanbul University Cerrahpaşa medical faculty department of internal Medicine Hematology clinic and who had not started treatment yet. Peripheral blood material of 7 healthy individuals were studied as control group. RNA isolation was performed with RNA isolation kit from both groups and the expression of miRNA-210 and BCL-2 were determined by qrt-PCR. For two groups karyotype analysis was performed by conventional cytogenetic method and present kromosom abnormalities was determined.

Our findings shows that in AML patient's bone marrow materials, miR-210 expression is increased and it's correlate with BCL-2 expression increase. According to our data, miR-210 effects apoptosis by targeting to BCL-2 expression in AML. It also shows that miR-210 can be used as a biomarker in the diagnosis and treatment of the disease. Our cytogenetic findings also support the effect of excessive miR-210 and BCL-2 expression on poor prognosis. Based on these data, there is a need to clarify the mechanism of apoptosis, which we think miR-210 affects BCL-2 in AML. In order to determine the suitability of the results, it is thought that a large number of patient groups and more comprehensive tests should be performed.

**Key Words:** AML, microRNA-210, BCL-2, Cytogenetics, Prognosis

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 22771

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akut miyeloid lösemi (AML) bir hematopoetik kök hücre bozukluğudur. Hematopoetik hücrelerde meydana gelen bu malign değişim sonucu hücrelerde fonksiyon kaybı olur (1). Hastalık tedavi edilmediğinde hızlı ilerleme gösterir ve klinik seyrine göre ölümlerle sonuçlanır (2). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından sitogenetik ve moleküler özellikler baz alınarak yapılan sınıflamaya göre AML'ler 4 gruba ayrılır (3). AML 65 yaş üzeri hastalarda daha sık görülmekle birlikte tüm yaşlarda da oluşabilmektedir (4). İnsidansı yılda yaklaşık olarak 3.7/100,000 dir. Son on yılda AML'nin insidansı oldukça artmıştır (5).

AML kemik iliğinde %20'nin üzerinde miyeloid blast hücrelerinin birikmesi ile karakterizedir (6). Bununla birlikte t(15;17), t(8;21), inv(16) veya t(16;16) sitogenetik anomalilerin varlığında blast sayısı %20'nin altında olsa bile AML tanısı konulabilmektedir (1). AML'nin sınıflandırılması ve prognozunun belirlenmesinde sitogenetik bulgular önemli parametrelerdendir ve yeni tanılı hastaların yaklaşık %55'inde kromozom anomalisine rastlanır (7, 8).

MikroRNA'lar hedef mRNA'nın 3' UTR bölgelerine bağlanmak suretiyle gen ekspresyonunu düzenleyen, küçük, protein kodlamayan, 19-25 nükleotidlik RNA molekülleridir (9). miRNA regülasyonundaki bozukluklar kanser gelişimi ve ilerlemesinde etkilidir. Bu düzensizlikler normal dokular ve kanserli dokular arasında farklı miRNA profilleri görülmesine neden olur. Görülen farklı profiller, kanser teşhis ve prognozu ile miRNA'lar arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir (10). Son yıllarda bazı spesifik miRNA ekspresyonlarının AML ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu miRNA'ların ekspresyonları AML'nin prognoz, tedavi yanıtı ve klinik uygulamaları üzerinde oldukça etkilidir. miRNA-210 da AML prognozunu etkileyen miRNA'lardan biridir. miRNA-210'un aşırı ekspresyonu AML hastalarında kötü prognoza işaretir (11).

BCL-2 proteini apoptozun inhibitörü olup mitokondri dışı membranı, endoplazmik retikulum ve nükleus zarında yer alır (12). BCL-2 onkogeni 18. Kromozom üzerinde bulunur. Bu BCL-2 lokusu 14. kromozom üzerinde bulunan IgH lokusu ile transloke olur ve bu olay BCL-2'nin aşırı ifadesi ile sonuçlanır (13). BCL-2'nin aşırı ekspresyonu kemoterapi sonrası düşük tam remisyon oranı ve daha kısa sağ

kalım ile ilişkilendirilmiştir (14). BCL-2'nin aşırı ekspresyonu Foliküler Lenfoma, KLL ve AML gibi bazı hematolojik kanserlerde düşük tedavi yanıtı ile ilişkilidir (15). miRNA-210'un tümör baskılayıcı olarak işlev gören hedef genlerinden biri de BCL-2 dir (16).

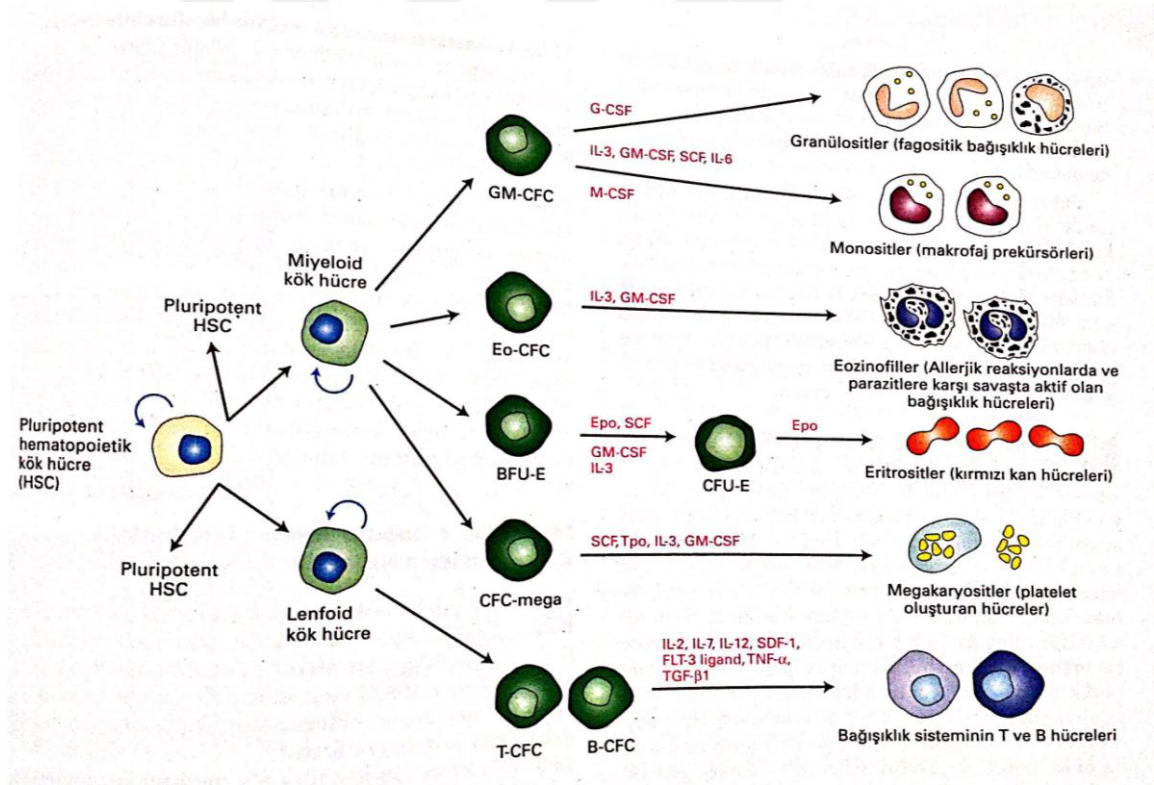
Bu çalışmada AML hastalarındaki kromozom anomalilerinin tespit edilip, miR-210 ve BCL-2 ekspresyon seviyeleri ile ilişkilendirilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen veriler sağlıklı kontrol grubundaki bireylerden elde edilen verilerle karşılaştırılmıştır. Bu sayede tedavi ve prognoz bakımından ortaya konulacak farklılıklarla, miRNA-210'un bir biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağı değerlendirilmiştir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Hematopoez

Hematopoez, eritrositler, trombositler, immün hücreler ve lenfositler dahil olmak üzere organizmada bulunan tüm farklılaşmış kan hücrelerinin üretimidir. Hematopoez, yetişkinlerde kemik iliğinde bulunan bir hematopoetik kök hücre (HSC) popülasyonu tarafından gerçekleştirilir (17). Bu HSC'ler başka hücelere dönüşme yeteneği daha kısıtlı olan lenfoid ve miyeloid kök hücreleri oluşturur (Şekil 2-1). Lenfoid ve miyeloid kök hücreler sitokinler olarak adlandırılan büyüme faktörlerinin etkisiyle kendini yenileyemeyen farklı hücreler üretirler. Oluşan hücreler sitokinlerin çeşidi ve miktarına göre farklılık gösterir. Miyeloid kök hücreden granülositler, monositler, eozinofiller, eritrositler ve megakaryositler üretilebilirken, lenfoid kök hücreden T ve B lenfositler üretilir (18).



Şekil 2-1: Hematopoez (18)

## 2.2. Lösemiler

Lösemler anormal beyaz kan hücrelerinin kanda veya kemik iliğinde aşırı birikmesiyle oluşur. Kan hücrelerindeki bu malign değişiklik genellikle myeloid ya da lenfoid öncüllerinden sadece birinde gerçekleşir fakat nadiren de olsa her iki öncülde de malign değişiklik gerçekleşebilir. Lösemilerin, akut lenfoblastik lösemiler (ALL), akut miyeloid lösemiler (AML), kronik lenfoblastik lösemiler (KLL) ve kronik miyeloid lösemiler (KML) olmak üzere dört tipi vardır. Hastalığın başlangıç hızı ve gelişimine göre değerlendirildiğinde; yavaş başlangıçlı ve uzun süreli olan tipi “kronik lösemiler” ve hızlı başlangıçlı ve kısa süreli olan tipi ise “akut lösemiler” olarak adlandırılır (3).

## 2.3. Akut Miyeloid Lösemi

Akut Miyeloid Lösemi hematopoez sürecinde hematopoetik kök hücre farklılaşmanın durması ile karakterize olan heterojen klonal bir hastalıktır. Farklılaşma yeteneğini yitiren hücrelerden blastlar veya neoplastik hücreler oluşur (1).

Yaklaşık olarak her 100.000 kişiden 3 ya da 4’ü AML tanısı alır. Çocuklarda ve erişkinlerde nadir görülmekle birlikte insidansı ilerleyen yaşla artar (19). Medyan yaşı yaklaşık 70’tir. Erkeklerde görülme oranı kadınlardan daha fazladır (20).

### 2.3.1. Sınıflaması

AML ilk olarak 1976 yılında Fransız-Amerikan-İngiliz sınıflandırması (FAB) ile morfolojik özelliklerine göre sınıflandırılmıştır ( Tablo 2-1)(21).

**Tablo 2-1: FAB sınıflandırması ve İnsidansları (5)**

FAB SINIFLANDIRMASI	İnsidans
M0 :Minimal farklılaşma gösteren lösemi	%5
M1 : Olgunlaşma göstermeyen myeloblastik lösemi	%20
M2 :Olgunlaşma gösteren myeloblastik lösemi	%30
M3 : Hipergranüler Promiyelositik Lösemi	%10
M4 : Miyelomonositik Lösemi	%20
M4Eo :Varyant: Anormal kemik iliği eozinofil artışı	
M5: Monositik Lösemi	%10

M6 : Eritrolösemi (Diguglielmo Hastalığı)	%4
M7 – Megakaryoblastik Lösemi	%1

Bu sınıflamaya göre M0 alt tipinde görülen blastlar granülsüzdür ve Auer cisimi görülmez. Bu tip genellikle 60 yaş üzerindeki hastalarda görülmektedir. M0'da tam remisyon ve sağ kalım oranı genellikle çok düşüktür ve sitogenetik olarak da kötü prognoz ile ilişkilendirilebilecek anomalilere rastlanır (22).

M1 alt tipinde 2 çeşit blast vardır. Bu blastlardan biri granül içermezken diğer tip blastlar granül içermektedir. Bunlar eritroid olmayan hücrelerin %90 'ından fazlasını oluştururlar (3). Auer cisimleri her zaman görülmez. AML vakalarından %10 ila %20'si bu gruptadır ve genelde yetişkinlerde görülür (22).

M2 alt tipinde ise blastlar eritroid olmayan hücrelerin %30 ila %90 'ını oluşturur ve bir sonraki evrede olgunlaşma göstereceğine dair kanıtlar mevcuttur. Auer cisimleri yaygın olarak görülür (3). Sitogenetik anomalisi olan vakaların %30 ila %40'ında t(8;21)(q22;q22) görülür ve M2 alt tipi ile ilişkilidir (22).

M3 alt tipinde hücreler çok granüllü promiyeloditlerdir. Çoğunlukla auer cisimi kümeleri ile birlikte bulunurlar. M3 ün varyant tipi olan M3v'de ise hücreler hipogranülerdir. Damar içi pıhtılaşma sorunu hem M3 hem de M3v'de oldukça sık rastlanır (3). Genellikle erişkinlerde görülür. Vakaların %95'inde hücreler t(15;17) veya 17. kromozom üzerinde bulunan RAR- $\alpha$  geninin yeniden düzenlenmesini içerir (23).

M4 alt tipinin karakteristik özelliği miyelomonositik morfolojidir. Monositoz bu tipte yaygın olarak görülür. M4Eo M4 alt tipinin bir varyantıdır. %5 ten fazla eozinofil görüldüğünde fark edilir (3). Bu varyanttaki lösemik hücreler genellikle kromozom 16'nın inversiyonuna veya translokasyonuna sahiptir (23).

M5 alt tipinde lösemi hücreleri büyüktür ve sitoplazma ince granüller barındırır (23). M5'in M5a ve M5b olmak üzere iki varyantı vardır. Eritroid olmayan hücrelerin %80'inden fazlası monoblast ise M5b, %80'inden azı monoblast ise M5a varyantı olarak adlandırılmaktadır (3). M5 genellikle çocuk ve genç erişkinlerde oluşur. 11q23 yeniden düzenlenmesi ve bebeklerde t(4;11) yaygın olarak görülür (23).

M6 alt tipinde malignite eritroid soyuna bağlı kök hücrelerde gerçekleşir. Bu grupta eritroid olmayan hücrelerin %30 undan fazlası tip I ve tip II blastlardır. Ayrıca tüm kemik iliği hücrelerinin yarısından fazlasını eritroblastlar oluşturur (3). Pansitopeni tanı koymak için önemli bir bulgudur (23).

M7 alt tipinde malign değişim megakaryosit soyundaki kök hücrelerde gerçekleşir. Bu alt tipte büyük polimorfik blastlar ve kemik iliği fibrozu karakteristik olarak görülür (3). Sitogenetik anomalilere AML'nin diğer alt tiplerine göre daha sık rastlanır. Genelde yetişkinlerde kompleks karyotip görülür(23).

FAB sınıflaması yapıldıktan sonra yıllar boyunca çeşitli düzenlemeler ve modifikasyonlara uğramış ve yaygın olarak kullanımı sürdürülmüştür (3). Sonraki tarihlerde sitogenetik ve moleküler tekniklerin gelişmesiyle birlikte, AML'de tekrar eden genetik anomaliler keşfedilmiştir. Bu keşif hem hastalığın sınıflanması hem de hastalığın prognozu ve tedavisi açısından önemlidir (21). Lösemide malign dönüşümlerin moleküler mekanizmalarının anlaşılması önemli olduğundan daha iyi bir sınıflandırmaya ihtiyaç duyulmuştur. Bahsedilen prognoz, tedavi, moleküler ve sitogenetik özellikler göz önünde bulundurularak yapılan ilk sınıflandırma 2000 yılında yapılan Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflandırmasıdır ve 2008 yılında güncellenerek son güncel halini almıştır (3). Günümüzde WHO tarafından sitogenetik ve moleküler özellikler baz alınara yapılan AML sınıflanması kabul edilmektedir (Tablo 2-2)(21).

**Tablo 2-2 : AML'de WHO Sınıflandırması (5)**

<b>WHO Sınıflandırması</b>
<b>1. Tekrarlayan genetik anomalilerle seyreden AML</b>
❖ t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1/RUNX1T1</i>
❖ Anormal kemik iliği eozinofilleri ile seyreden AML
❖ [inv(16)(p13q22) veya t(16;16)(p13;q22); <i>CBFB/MYH11</i> ]
❖ Akut promiyelositik lösemi[t(15;17)(q22;q12) ( <i>PML/RARA</i> ) ve varyantları]
❖ 11q23 ( <i>MLL</i> ) anomalileri ile seyreden AML
<b>2. Miyelodisplazi ile seyreden AML</b>
<b>3. AML ve miyelodisplastik sendromlar,</b>
❖ Tedavi ile ilişkili
❖ Alkilleyici madde ile ilişkili

- ❖ Topoizomeraz tip II inhibitörü ile ilişkili
- ❖ Diğer çeşitler

#### 4. Tanımlanan Gruplara Girmeyen AML

- ❖ Minimal Farklılaşmış AML
- ❖ Olgunlaşma Görülmeyen AML
- ❖ Olgunlaşma Görülen AML
- ❖ Akut Miyelomonositik Lösemi
- ❖ Akut Monoblastik ve Monositik Lösemi
- ❖ Akut Eritroid Lösemi
- ❖ Akut Megakaryoblastik Lösemi
- ❖ Akut Bazofilik Lösemi
- ❖ Akut Miyelofibrozu Panmiyeloz
- ❖ Miyeloid Sarkom

2010 yılında, Avrupa Lösemi Ağı (ELN), genetik anormalliklerin NPM1, CEBPA ve FLT3 genlerinin hem sitogenetik hem de mutasyon analizlerini içeren klinik sonuçlarla raporlanması için standart bir sistem önermiştir. Bu sisteme göre AML dört gruba ayrılmıştır; düşük, orta-I, orta-II ve yüksek risk grubu (Tablo 2-3)(24).

**Tablo 2-3: AML’de ELN Sınıflandırması (25)**

Genetik Grup	Moleküler ve Sitogenetik Anomaliler
Düşük Risk	t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
	inv(16)(p13.1;q22) veya t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
	<i>FLT3-ITD</i> olmadan <i>NPM1</i> mutasyonu (normal karyotip)
	<i>CEBPA</i> mutasyonu (normal karyotip)
Orta-I Risk	<i>NPM1</i> ve <i>FLT3</i> mutasyonu
	Yabancı tip <i>NPM1</i> ve <i>FLT3</i>
	Yabancı tip <i>FLT3</i> olmadan <i>NPM1</i>
Orta-II Risk	t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i>



	İyi veya kötü olarak sınıflandırılmayan sitogenetik anomaliler
Yüksek Risk	inv(3)(q21q26) veya t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPNI-EVII</i>
	t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>
	t(v;11)(v;q23); <i>MLL</i> yeniden düzenlenmesi
	-5 veya del(5q); -7; abnl(17p); kompleks karyotip

### 2.3.2. İnsidansı

Akut lösemilerin görülme sıklığı tüm kanserlerin %3'ünden daha azdır. Buna rağmen çocuklarda ve 39 yaşının altındaki bireylerde kansere bağlı ölümlerin başlıca nedenlerinden biridir (6). AML'nin insidansı yılda yaklaşık 3.7/100.000'dir (5). Dünyada en çok ABD, Avusturalya ve Batı Avrupa'da görülür ve batı ülkelerinde yaşayan bireylerde tüm lösemilerin %25'ini oluşturur (6). Erkeklerde görülme sıklığı kadınlara göre daha fazladır (26). İnsidansı yaş ile birlikte artış gösterir. 65 yaşının altındaki bireylerde görülme sıklığı 1.9 iken 65 yaş üstü bireylerde bu oran 18.6'ya yükselmektedir. AML'nin insidasında son yıllarda belirgin bir artış görülmüştür (5).

### 2.3.3. Etiyolojisi

AML'nin etiyolojisi tam anlaşılacakla birlikte, oluşumunda etkili olan çeşitli risk faktörleri tespit edilmiştir (6, 25). Yaş, daha önce geçirilmiş olan hematolojik hastalıklar, genetik bozukluklar, radyasyon, virüslere maruziyet, daha önce kemoterapi tedavisi görmüş olmak ve mesleki maruziyetler tanımlanan risk faktörlerindedir (Tablo 2-4). Fakat bu etkenler sonucu hastalık gözlenen az sayıda vaka vardır. Çoğu vakada malignite de novo ortaya çıkar ve hiçbir lökojenik maruziyet görülmez. AML'nin farklı alt tiplerinde etkili olabilecek risk faktörleriyle nedensel ilişki kurulabilir (6).

**Tablo 2-4: AML Oluşumuna Neden Olan Risk Faktörleri (6)**

Genetik Hastalıklar	Down Sendromu
	Klinefelter Sendromu
	Patau Sendromu
	Ataksi Talenjektizi

	Schwachman Sendromu
	Kostman Sendromu
	Nörofibromatozis
	Fankoni Anemisi
	Li-Fraumani Sendromu
Fiziksel ve Kimyasal Etkenler	Benzen
	Piporoman Benzeri İalçlar
	Pestisitler
	Sigara Kullanımı
	Herbisitler
Kemoterapi	Alkilleyici Ajanlar
	Topoizomeraz III İnhibitörleri
	Antrasiklinler
Radyoaktif Etkenler	Terapötik ve Terapötik Olmayan Radyasyon

#### 2.3.4. Prognozu

AML'nin birçok klinik ve patolojik özelliği prognoz ile uyumlu olsa da, sadece birkaç prognostik özellik evrensel kabul edilir ve pratikte etkili olur. Bu prognostik özellikler arasında yaş, hematolojik hastalıklar, sitotoksik terapiler ve diğer klinik faktörler gelmektedir. Buna rağmen gelecekte yeni biyolojik belirteçlerin eskilerinin yerini alması muhtemeldir (6).

##### 2.3.4.1. Yaş

AML için en önemli prognostik etkenlerden biri yaştır (27). AML'de 60 ve üzeri yaş, kötü prognozla sebep olan etkenlerden yaşın ayırt edilmesini zorlaştırır. 60 yaştan sonra geçen her on yılda prognoz daha kötüye gitmektedir. Fakat 60 yaşın altındaki kişilerde yaşın olumsuz bir faktör olarak görülmesi zordur. Mayer ve arkadaşları tarafından yapılan sitarabin doz yoğunluğu deneyinde resmasyon oranı 40 yaş altı hastalarda %75, 40-60 yaş aralığındakilerde %68 iken hastalık olmaksızın sağkalım

oranları sırasıyla %32 ve %29.1'dir (28). Benzer şekilde, yapılan diğer bir çalışmada da Zittoun ve arkadaşları 10-59 yaş aralığındaki bireylerde artan yaşın hastaliksız sağ kalım üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığını göstermiştir (29). Bu bulguların aksine hem Tıbbi Araştırma Konseyi (MRC) hem de Güneybatı Onkoloji Grubu ve Doğu Kooperatifi Onkoloji Grubu (SWOG / ECOG) yaptıkları çalışmalarda 18-55 yaş aralığında AML'li bireylerde yaptıkları çalışmalarda yaş artımının sağ kalımı olumsuz etkilendiğini gösteren bulgular elde etmişlerdir. 60 yaş altı hastalarda yaşın prognoz üzerindeki etkisinin belirsiz olduğu ileri sürülmektedir (30, 31). Diğer taraftan kötü prognoz ile ilişkili sitogenetik anomaliler artan yaşla birlikte çoğalmaktadır. Bir çalışmada iyi prognozla ilişkili sitogenetik bulguların yüzdesi 56 yaşından küçüklerde %17 iken 75 yaşından büyüklerde %4'tür. Kötü prognoz ile ilişkili sitogenetik bulgular ise tam tersi şekilde 75 yaş üzerindeki hastalarda artış göstermiştir (1).

#### **2.3.4.2. Önceden Geçirilmiş Hematolojik Hastalıklar**

Miyelodisplastik Sendrom (MDS) ve KML gibi bazı hematolojik hastalıklar ilerlediğinde akut lösemiye dönüşür. Fakat polistemia vera, aplastik anemi, myeloid metaplazili myelofibroz gibi diğer hematolojik hastalıklarda her zaman akut lösemiye dönüşüm gerçekleşmeyebilir. Fakat akut lösemiye dönüşebilen tüm hematolojik hastalıklar mevcut tedavilerle eşit derecede kötü prognoza sahiptirler. Bu sebeple akut lösemi tedavisi için yapılan birçok klinik çalışmada daha önceden geçirilmiş hematolojik hastalığı (AHD) olan hastalar çalışmaya dahil edilmemektedir. Remisyon, kronik hastalığa sahip kişilerde hastalık aktivitesinin olmadığı durumları ifade eder. AHD'li hastalar hariç tutularak yapılan bir çalışmada yüksek dozda sitarabinin, düşük doz ile kıyaslandığında remisyon sonrası sağ kalımı arttırdığı görülmüştür. Yapılan diğer bir çalışmada ise daha önce kemoterapi gibi sitotoksik ajanlara maruz kalan AHD'li hastaların diğer gruplarla ayırt edici bir özelliği bulunamamıştır. Bununla birlikte bazı klinik çalışmalar AHD'li hastaları da AML çalışmalarına dahil etmektedirler (32). Yapılan bir çalışmada AHD'li 44 hasta ile öyküsünde AHD olmayan 152 hasta retrospektif olarak incelenmiştir. AHD'li olanlarda remisyon oranı %41 iken olmayanlarda bu oran %73 olarak bulunmuştur. Fakat yaş ve sitogenetik bulguların da olması sebebiyle, sadece AHD'lerin olumsuz prognostik etkilerinin olduğu kesin olarak söylenememektedir (31).

Miyelodisplastik sendromdan AML 'ye dönüşüm olan hastalar de-novo AML'ye göre tedaviye daha çok direnç gösterir ve tedaviye yanıt süresi oldukça kısadır (2, 32).

Bazı hastalarda AHD olmamasına karşın, tanı aşamasında kemik iliğinde displastik değişiklikler görülmektedir. Bu hastalarda prognoz bu tarz morfolojik değişimleri olmayan hastalarinkine göre daha kötüdür (32).

### **2.3.4.3. Sitotoksik Terapiler**

Malign veya malign olmayan durumlar sebebi ile radyoterapi veya sitotoksik kemoterapi tedavisi alan hastalar sekonder AML oluşumu açısından risk altındadır. Sekonder AML'si olan hastalar bilinen tedavilerle kötü prognoz göstermektedir ve bu hastalarda çoğunlukla klonal sitogenetik anomalilere rastlanmaktadır. Bununla birlikte bazı sekonder lösemiler diğerlerine göre daha iyi prognoz göstermektedir (32). Örneğin sekonder AML'de t(8;21) ve inv (16) iyi prognoza işaret etmektedir (2). Fakat bu hastaların prognozu de novo ve iyi sitogenetik bulgulara sahip AML hastaları ile karşılaştırıldığında daha kötüdür, diğer sekonder AML hastaları ile karşılaştırıldığında ise daha iyidir (32).

### **2.3.4.4. Diğer Klinik Faktörler**

Yapılan bazı çalışmalar yüksek beyaz kan hücresi seviyesinin kötü prognoz ile ilişkili olduğunu düşündürse de, diğer çalışmalarda bu iddiayı çürütecek bulgular mevcuttur. Yapılan bir çalışma, AML'li Afrikalı ve Amerikalı erkekler ve kadınların diğer hastalara kıyasla anlamlı derecede kötü remisyon oranı ve sağkalıma sahip olduğu bulgusu ile ırkın prognostik bir faktör olabileceğini göstermiştir. Ayrıca yüksek laktat dehidrogenaz seviyesi ve ciddi anemisi olan hastalarda sağ kalım oranı oldukça düşüktür (32). Bunun yanı sıra lökopeni ve/veya trombositopenisi olan hastalarda tam remisyon oranı düşüktür (5). Yine yapılan büyük çaplı çalışmalardan elde edilen verilere göre hastaneye başvurma ve hastalığa tanı koymadaki gecikmeler sağ kalımı olumsuz yönde etkilemektedir (32).

## **2.4. AML'nin Genetiği**

### **2.4.1. Sitogenetiği**

Sitogenetik analiz AML'nin yönetiminde oldukça önemlidir. Sitogenetik anomalilerin varlığı ya da yokluğu, hem pediatrik hem de erişkin AML hastalarında önemli bir prognostik belirteçtir (5). Farklı yaş gruplarındaki AML hastalarında

sitogenetik değişiklikler de farklılık gösterebilir. Orta ve ileri yaştaki hastalarda genellikle t(1;3)(p36;q21), t(4;12)(q12;p13) ve kompleks karyotiple birlikte 5 ve 7 numaralı kromozomlarının tamamında veya bir parçasında kayıplar görülürken, genç erişkinlerde t(3;5)(q25;q35), t(6;9)(p22;q34) ve t(7;11)(p15;p15) bulguları tipiktir (20).

Aşağıdaki tabloda AML hastalarında yapılan 3 farklı çalışmada görülen sitogenetik değişiklikler ve prognoza etkileri gösterilmiştir (Tablo 2-5)(32). t(15;17) olan AML hastaları çok iyi prognoz gösterirken t(8;21) ve inv(16) iyi prognoza işaret etmektedir. Sitogenetik olarak anomalisi olmayanların prognozu orta derecede olumlu prognoza sahiptir. t(6;9), inv(3) veya 7 ve kompleks karyotipli hastalar ise çok zayıf prognoz gösterirler (5).

**Tablo 2-5 : AML hastalarında yapılan 3 farklı çalışmada görülen sitogenetik bulgular ve prognoza etkileri (32)**

	SWOG/ECOG	MRC	CALGB
Hasta Sayısı	584	1612	1213
Düşük Risk	inv(16), t(16;16) del(16q) Eksik t(8;21) del(9q)veya kompleks karyotip t(15;17)	inv(16), t(16;16) del(16q) t(8;21) t(15;17)	inv(16), t(16;16) t(8;21) del(9q) (eğer sadece kök hücre transplantı ile tedavi edildiyse) [t(15;17) dahil edilmedi.]

Orta Risk	Normal Karyotip +Y -8 +6 del(12p)	Normal Karyotip 11q23 anomalileri +8 del(9q) del(7q) +21 +22 Diğerleri	Normal Karyotip -Y del(5q) 7q kaybı t(9;11) +11 del(11q) abn(12p) +13 del(20q) +21
Yüksek Risk	Kompleks Karyotip 3q anomalileri t(6;9) -5,del(5q) -7del(7q) t(9;22) 9q anomalileri 11q anomalileri 20q anomalileri 21q anomalileri 17p anomalileri	Kompleks Karyotip 3q anomalileri T(6;9) -5, del (5q) -7 t(9;22)	Kompleks Karyotip inv(3),t(3;3) t(6;9) t(6;11) -7 -8 t(11;19(q23;p13.1))
Bilinmeyen risk	Diğerleri	Bilinmiyor	Bilinmiyor

#### 2.4.2. AML'nin Moleküler Genetiği

Genetik AML'nin sınıflandırılmasında ve hastalığın yönetiminde önemli rol oynamaktadır. AML risk değerlendirmesi ve sınıflaması önceleri sadece sitogenetik çalışmalara dayanmaktaydı. Moleküler yöntemler geliştikçe, gen mutasyonlarının bu yöntemlerle belirlenmesi, sınıflandırma ve risk değerlendirmesi için kullanılmaya başlanmıştır. Moleküler testler sitogenetik analizleri tamamlayıcı rol oynarlar. AML alt gruplarında prognozu düzeltmeye yardımcı olmak için sitogenetik bulgular moleküler bulgular ile desteklenir (Tablo 2-6). AML'de FLT3 NPM1, CEBPA ve KIT mutasyonları normal karyotip ve orta risk grubunda olan hastaları sınıflandırmada yardımcı olan ilk bulgulardır (7, 33).

**Tablo 2-6: AML’de görülen sitogenetik ve moleküler değişimler ve prognoza etkileri (20)**

Sitogenetik Değişimler	Moleküler Genetik Özellikler	Cinsiyet	Medyan Yaşı	Karakteristik Özellikleri	Prognoz
t(1;3)(p36q21)	RPN1-PRDM16	F=M	60	M4,dismegakaryositopoez	Kötü
t(1;22)(p13;q13)	RBM15-MKL1	F>M	<1	M7,miyelofibroz, Down sendromunda görülmez	Orta/Kötü
der(1;7)(q10;p10)		M>F	60	Değişken morfoloji, t-AML	Kötü
t(1;11)(q21;q23)	MLL-MLLT1	F>M	<1	M4 veya M5	Kötü?
t(2;3)(p11-23;q23-28)	EVI1 ekspresyonu	F=M	50	M2, dismegakaryositopoez	Kötü
inv(3)(q21q26)	EVI1,GATA2 ve RPN1/EVI1 ekspresyonu	F=M	50	Değişken morfoloji, dismegakaryositopoez	Kötü
t(3;5)(q25;q35)	NPM1-MLF1	F=M	30	Değişken morfoloji, M6, Trilineage displazi	Kötü?
t(3;12)(q26;p13)	ETV6/EVI1 ve EVI1 ekspresyonu	M>F	50	Değişken morfoloji, dismegakaryositopoez	Kötü
t(3;21)(q26;q22)	RUNX1-MDS1/ EVI1/RPL22PI	M>F	60	Sınıflandırılmayan morfoloji, M2 veya M4, t-AML	Kötü
Trizomi 4	KIT mutasyonları	F>M	55	M2 veya M4	Orta/ Kötü
t(4;12)(q12;p13)	CHIC2/ETV6 ve GSX2 ekspresyonları	M>F	60	M0 veya M1, Trilineage displazi, Bazofili	Kötü
t(4;11)(q21;q23)	MLL-AFF1	F>M	<1	M4 veya M5, t-AML	Kötü
-5/del(5q)		F=M	65	Değişken morfoloji,M0 veya M6, t-AML	Kötü
t(5;11)(q31;q23)	MLL-ARHGAP26	M>F	<1	M4 veya M5	İyi?
t(5;11)(q35;p15)	NUP98-NSDI	F=M	<15	M1, M2 veya M4	Kötü
t(5;17)(q35;q21)	NPM1-RARA	F=M	<15	M3v, Auer cisimleri yok	İyi
t(6;9)(p22;q34)	DEK-NUP214	F=M	30	M1,M2 veya M4,displazi, auer cisimleri var	Kötü
t(6;11)(q27;q23)	MLL-MLLT4	F=M	40	M4 veya M5	Kötü
-7/del(7q)		M>F	55	Değişken morfoloji, M0 veya M6, t-AML	Kötü

t(7;11)(p15;p15)	NUP98-HOXA9/ HOXA11/HOXA 13	M>F	40	M2 veya M4, Trilineage displazi, Auer cisimleri var	Kötü
t(7;12)(q36;p13)	MNX1-ETV6 ve MNX1 ekspresyonları	F>M	<1	Değişken morfoloji, M0 veya M1	Kötü
Trizomi 8		F=M	50	Değişken morfoloji, M1,M2,M3 veya M4	Orta/Kötü
t(8;16)(p11;q13)	MYST3- CREBBP	F>M	45	M4 veya M5 , hemofagositoz, DIC,EML	Kötü
t(8;21)(q22,q22)	RUNX1- RUNX1T1	M>F	30	M2, granülositik displazi, Auer cisimleri, EML	İyi
t(9;11)(p21;q23)	MLL-MLLT3	F=M	20	M5, EML, t-AML	İyi/Orta
Del(9q)		M>F	50	M1, M2 veya M4, Auer cisimleri	Orta
t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL1	M>F	45	M1 veya M2 , bifenotipik	Kötü
t(10;12)(p12;q14)	PICALM- MLLT10	F=M	20	Değişken morfoloji, M0 veya M1, bifenotipik	Kötü
10p12/11q23	MLL-MLLT10	M>F	2	M5	Kötü
Trizomi 11	MLL ve FLT3 ITD	M>F	60	M1, M2 veya M4, trilineage displazi, Auer cisimleri	Kötü
inv(11)(p15;q22)	NUP98-DDX10	M>F	45	Değişken morfoloji, t- AML	Kötü?
t(11;20)(p15;q12)	NUP98-YOP1	F>M	25	Değişken morfoloji, M2 veya M5,t-AML	Kötü
t(11;17)(q23;q25)	MLL- MMMT6/LASP1/ ACACA	M>F	15	M4 veya M5	Kötü?
t(11,17)(q23;q21)	ZBTB1-RARA	M>F	55	Atipik M3, Pelger benzeri hücreler, DIC	Orta/kötü
T(11;17)(q23;q25 )	MLL-SEPT9	F=M	25	M4 veya M5, t-AML	Kötü?
t(11;19)(q23;p13. 1)	MLL-ELL	F=M	50	M4 veya M5, t-AML	Kötü
t(11;19)(q23;p13. 3)	MLL-MLLT1	F=M	<1	M4 veya M5(ALL veya bifenotipik), t-AML	Kötü
Trizomi 13	FLT3 ekspresyonu- RUNX1 mutasyonu	M>F	65	Farklılaşmamış, M0 veya M1,Trilineage displazi	Kötü
t(15,17)(q22;q21)	PML/RARA	F=M	40	M3 veya M3v, DIC, Auer cisimleri	İyi
inv(16)(p13q22)	CBFB/MYH11	F=M	35	M4Eo, Auer cisimleri	İyi
t(16;21)(p11;q22)	FUS/ERG	M>F	25	Değişken morfoloji, eozinofili,	Kötü



				hematofagositoz	
i(17)(q10)		M>F	65	Değişken morfoloji,	Kötü
del(20q)		M>F	60	Değişken morfoloji,	Orta/Kötü
Trizomi 21	RUNX1 mutasyonu	M>F	35	Değişken morfoloji, M0, M1 veya M2	Orta/Kötü
Trizomi 22		M>F	30	Değişken morfoloji, M4, eozinofili	Orta/Kötü
Y kromozomu kaybı		M	60	Değişken morfoloji, Auer cisimleri	Orta

#### 2.4.2.1. FLT3 Mutasyonu (*Fms-like Tyrosine Kinase 3*)

FLT3 geni kromozom 13q12'de lokalize olmuştur. Hematopoetik progenitör hücrelerin yüzeyinden eksprese edilir ve hematopoezde multipotent kök hücrelerin hayatta kalması ve farklılaşmasında görevlidir (34). FLT3 çoğunlukla AML'de mutasyona uğrayan bir reseptör tirozin kinazdır. FLT3'te yaygın olarak görülen iki mutasyon vardır. Bunlardan biri juxtamembran domaininde internal tandem duplikasyonu olan ITD, diğeri ise tirozin kinaz domainindeki nokta mutasyonu olan TKD'dir. FLT3 ITD tüm AML vakalarının yaklaşık %20'sinde görülür ve FLT3 TKD'ye göre daha kötü bir prognoz ile ilişkilidir. Ayrıca normal karyotip ile birlikte FLT3 ITD mutasyonu olan AML daha kötü prognoz gösterir (7).

#### 2.4.2.2. NPM1 Mutasyonu (*Nucleophosmin 1*)

NPM1 mutasyonu AML'de en çok görülen 3 mutasyondan biridir (35). NPM1 bir fosfoprotein kodlar ve bu fosfoprotein ribozom biyogenezinde, mitozda sentrozom duplikasyonunda, hücre proliferasyonunda ve apoptozda rol oynar (7). Bu mutasyon erişkin AML vakalarının %35'inde görülür. Tekrarlayan sitogenetik anomalileri olanlarda ise insidansı daha düşüktür (23). NPM1 mutasyonu genellikle FLT3, DNMT3A ve IDH mutasyonları ile birlikte görülür (7). FLT3 ITD mutasyonu olmayıp NPM1 mutasyonu olan AML hastaları genel olarak iyi prognoz gösterir (36).

#### 2.4.2.3. CEBPA Mutasyonu (*CCAAT Enhancer Binding Protein*)

CEBPA bir transkripsiyon faktörüdür ve nötrofil farklılaşmasında rol oynar. AML vakalarının yaklaşık %10'unda görülür. Normal karyotipli veya 9q delesyonu bulunanlarda daha sık gözlenir (37). AML'de monoallelik ve biallelik CEBPA mutasyonu görülebilir. Yapılan çalışmalar biallelik CEBPA mutasyonlarının monoallelik olanlara göre daha iyi prognoz ve daha uzun sağ kalım süresiyle uyumlu

olduğunu göstermiştir (38). İyi prognozla ilişkili CEBPA mutasyonlu AML vakalarının yaklaşık yarısı kadarında del(9q) pozitifdir. Bu nedenle del(9q)'nun bulunması en azından orta riskli grup için olumlu bir bulgu olarak görülmüştür (20).

#### **2.4.2.4. KIT Mutasyonu**

KIT hücre proliferasyonu, farklılaşması ve sağkalımında rol alan bir reseptör tirozin kinazdır (7). AML hastalarının yaklaşık %5'inde KIT'in aktivasyonunu sağlayan Asp816 mutasyonu bulunur (39). KIT mutasyonları çoğunlukla ekzon 8 ve 17'yi etkiler (7). KIT ekzon 8 mutasyonları inv(16) ve t(8;21) anomalileri bulunan AML hastalarının yaklaşık %24'ünde bulunur. inv(16) bulunan hastalarda KIT mutasyonları daha yüksek relaps (nüks) oranıyla ilişkilendirilmiştir (40).

#### **2.4.2.5. DNMT3A Mutasyonu (*DNA Methyltransferase 3A*)**

DNMT3A, bir DNA metiltransferazdır ve metilasyon yolu ile genomun epigenetik düzenlenmesinde rol oynar. Bu mutasyon AML de oldukça yaygın görülmektedir. Genelde FLT3 ITD ve NPM1 mutasyonları ile birlikte görülür (41). Yapılan çalışmalar DNMT3A mutasyonlarını kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (42).

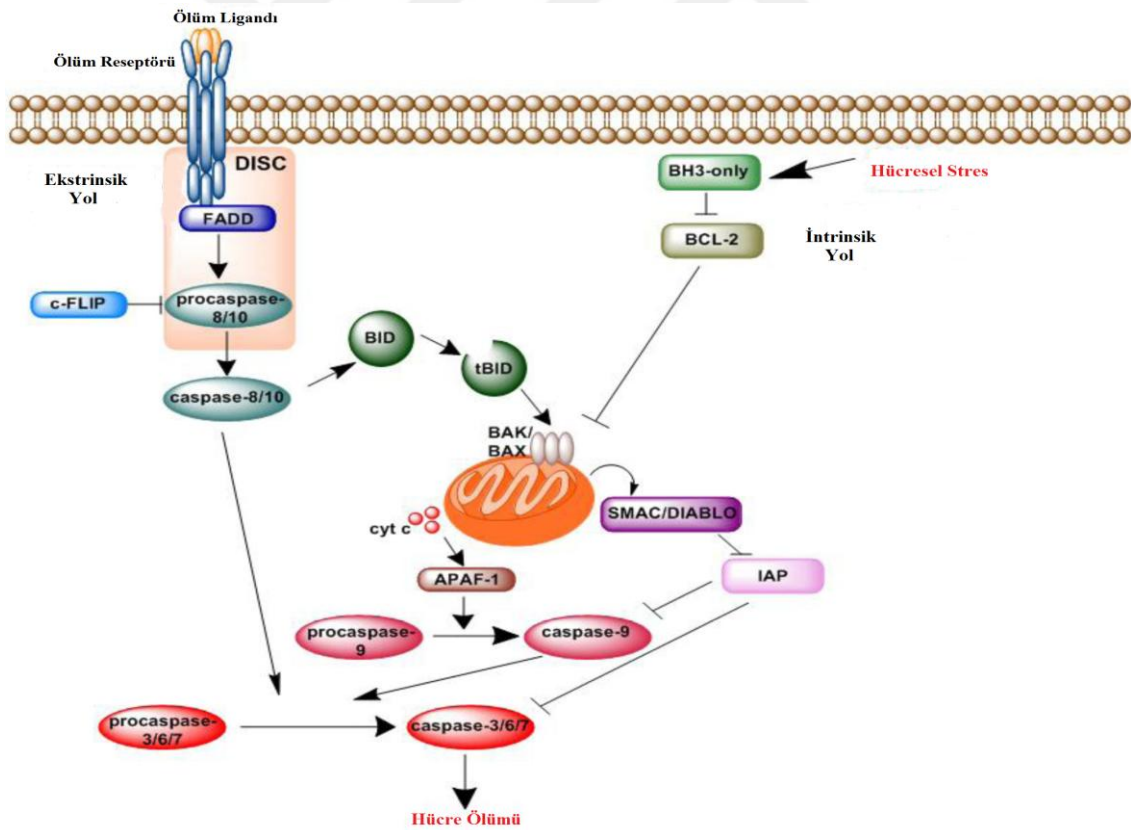
### **2.5. Apoptoz ile İlişkili Genler**

Apoptoz , ilk defa Andrew Wyllie tarafından 1972 yılında tanımlanmıştır. Bu tanım morfolojik ve biyokimyasal olarak diğer hücre ölümlerinden farklı olarak hücrenin kendi ölümüne katılmasını ifade eder (13). Apoptoz embriyonik gelişim ve doku homeostazı için gerekli bir yoldur (43). DNA hasarı gibi birçok uyarana fizyolojik bir cevap olarak gerçekleşir (44). Hücre içi proteazlardan olan kaspazların aktivasyonu sonucu apoptoz meydana gelir (45). Hücre ölümü, başlatıcı (kaspaz-2, 8, 9, 10) ve yürütücü (kaspaz-3, 6, 7) olan kaspazları içerir. Bu kaspazlar, hücre içi sinyaller (DNA hasarı, büyüme faktörü ve sitokin yokluğu gibi) veya enfekte ya da hasar görmüş hücrelere yanıt olarak sitotoksik T hücreleri tarafından üretilen hücre dışı ölüm indükleyici sinyaller tarafından aktive edilir (46). Bu yollardan ilki farklı tipte hücresel strese yanıt vermek için kullanılan intirinsik (mitokondriyal) yoldur ve BCL-2 protein ailesi tarafından regüle edilir. İkinci yol ise ekstrinsik veya ölüm reseptörü yolu olarak adlandırılır ve ölüm reseptörlerinden tümör nekroz faktör (TNF) ailesini içerir (22, 27). Ölüm kaspazları aktive edildiklerinde , poli-ADP riboz polimeraz (PARP) ve

kazpaz ile aktive DNAz inhibitörü gibi substratları parçalayarak hücre ölümüne yol açarlar(46).

İntrinsik yol hücrel stresle aktive edildiğinde sadece BH3 homologisi olan proapoptotik proteinler antiapoptotik BCL-2'yi inhibe eder ve BAK/BAX oligomerizasyonunu, mitokondrinin permeabilizasyonunu sağlar, sitokrom c ve SMAC/DIABLO salınımını indükler. Sitokrom c kaspaz-9 ve APAF-1 ile kompleks oluşturarak kaspaz-9'un aktivasyonunu sağlar. Kaspaz-9 yürütücü kaspazları aktive eder ve hücre ölümü indüklenmiş olur (Şekil 2-2) (46).

Ekstrinsik yolda ölüm ligandı ölüm reseptörünü aktive eder. Ölüm reseptörü ölümü indükleyen sinyal kompleksi (DISC) ile kompleks oluşturur ve kaspaz-8 ve 10'u aktive eder. Bu iki kaspaz ise kaspaz-3'ün aktivasyonunu sağlar. Bazı hücrelerde ekstrinsik yol intrinsik yol ile kesişebilir. tBID BAK/BAX oligomerizasyonunu aktive eder ve mitokondriyal yol boyunca apoptozu indükler (Şekil 2-2)(46).



Şekil 2-2 : İntrinsik ve ekstrinsik apoptoz yolları (46)

BCL-2 ailesinin proapoptotik (BAX, BAK) ve antiapoptotik (BCL-2, BCL-X<sub>L</sub> ve MCL-1 gibi) üyeleri mitokondrilerden apoptoza neden olan proteinlerin salınmasını düzenler (47).

### 2.5.1. BCL-2 Gen Ailesi



BCL-2 protoonkogeni, apoptozu engelleyen bir proteini kodlar. Bu gen ilk defa foliküler B Hücreli Lenfoma'da, 14 ve 18 numaralı kromozomlar arasındaki, translokasyon kırılma noktalarında keşfedilmiştir (48). BCL-2 geni hematopoetik hücrelerin sağ kalımını destekler. Yapılan çalışmalarda t(14,18) translokasyonu olmasada lenfoproliferatif bozukluklar ve kemik iliği gibi lenfoid olmayan dokularda BCL-2'nin ekspresyonuna rastlanmıştır (13). BCL-2 ailesinin üyeleri korunmuş BH domainlerinde yüksek dizi benzerliklerine sahiptir. Bunlar homodimer veya heterodimer oluşturarak birbirleri veya başka proteinlerle etkileşime girdikleri BH1, BH2, BH3 ve BH4 bölgeleridir. BCL-2 gen ailesi pro veya antiapoptotik işlevine göre ve homoloji derecesine göre 3 gruba ayrılır. Birinci grup antiapoptotiktir. BCL-2, BCL-X<sub>L</sub>, BCL-W, MCL-1 ve BFL-1/A1 bu gruptadır. Dört domaine de homoloji gösterir. İkinci grup proapoptotiktir. BAK, BAX ve BOK bu gruptadır ve BH1-3 te homoloji gösterirler. Üçüncü grup da proapoptotiktir. BAD, BID, BIK, BMF, BIM, HRK, NOXA ve PUMA bu grubun üyesidir ve kısa BH3 bölgesine homoloji gösterirler. BCL-2 ailesinin antiapoptotik üyeleri endoplazmik retikulum mitokondri veya nükleer membran ile ilişkili proteinleridir. Proapoptotik üyeler ise endoplazmik retikulum, golgi ve mitokondride bulunabilir. Tablo 2-7'de BCL-2 gen ailesi üyeleri ve hücre içinde buldukları yerler detaylı olarak gösterilmiştir (12, 13, 24, 49).

**Tablo 2-7 : BCL-2 gen ailesi üyeleri ve hücre içi lokasyonları (12)**

Protein	Lokalizasyon									
	ER	NE	TGN	Sitozol	MOM	MM	MIM	Sito- iskelet	Plazma Membranı	Nukleus
BCL-2	XX				XX					
BFL-1										
BCL-X <sub>L</sub>					XX					
BCL-W										
MCL-1					XX					
BCL-G					XX					
BAX				XX	XX					
BAK					XX					
BOK	XX									
BMF										
BIM										
BID				XX						
PUMA					XX					
NOXA					XX					
HRK					XX					
BAD				XX						
BIK	XX									
BECLIN-1	XX									
BNIP										
SPIKE				XX						
BAP31	XX									
BCL-G										
BFK				XX						
BCL-Rambo					XX					

#### Abbreviations

ER	Endoplazmik Retikulum
NE	Nukleus Zarı
MOM	Mitokondri Dış Membranı
MIM	Mitokondri İç Membranı
MM	Mitokondriyal Matris
TGN	Trans Golgi Ağı

	Normal Koşullarda
	Apoptotik Koşullarda
XX	Baskın Lokalizasyon

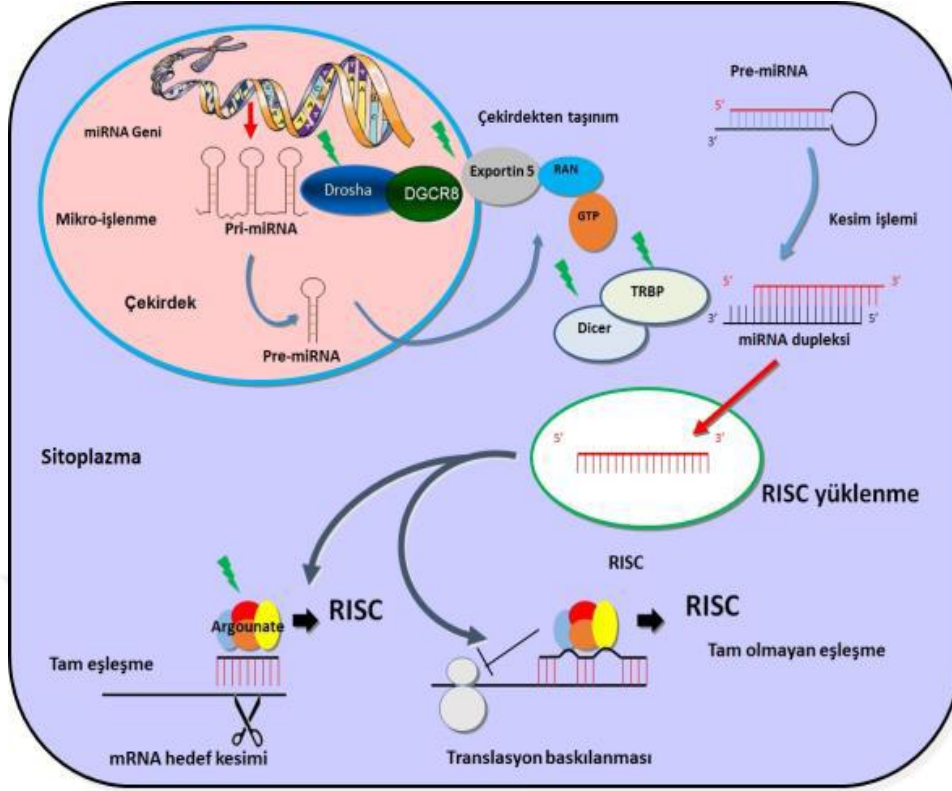
AML hücrelerinde BCL-2 ve diğer antiapoptotik proteinlerin aşırı ekspresyonu görülür (22). BAX-BAX homodimerleri hücre ölümünün aktivasyonunda etkili olurken , BCL-2 ve BAX heterodimer oluşturarak hücre ölümünün baskılanmasında önemli rol oynarlar (13). BCL-2-BAX protein oranının yüksek olması AML'de düşük remisyon oranı ve sağ kalımın düşüklüğü ile ilişkilidir (22). AML'de yüksek BCL-2 ekspresyon seviyesinin kemoterapiye düşük yanıtla ilişkili olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. BCL-2 ekspresyonu analiz edildiğinde BCL-2 pozitif hücre sayısının AML M4 ve M5'te ve beyaz kan hücresi sayısı artmış hastalarda daha fazla olduğu görülmüştür (14). Kötü prognozla ilişkili sitogenetik bulguları olan (örneğin monozomi 5 veya 7) AML hastalarında, BCL-2 baskın olan elemandır ve iyi sitogenetik bulgulara sahip olan (örneğin inv(16), t(8;21)) hastalara kıyasla BCL-X<sub>L</sub>'nin BCL-X<sub>S</sub>'ye oranı daha yüksektir (50).

## 2.6. mikroRNA'lar

mikroRNA'lar ya da kısaca miRNA'lar ökaryotlarda bulunan yaklaşık 19-24 nükleotidlik küçük RNA molekülleridir ve gen ekspresyonunun negatif düzenlenmesinde rol alırlar (51). miRNA'ların keşfi 1990'ların başında *C. elegans*'ta lin-4'ün bulunmasıyla gerçekleşmiştir ve 2000 yılında insanlarda da bulunduğu ortaya çıkarılmıştır (52).

### 2.6.1. miRNA biyogenezi

miRNA'lar genom içinde kodlanırlar (53). miRNA'lar RNA polimeraz II aracılığı ile uzun bir primer transkript olan pri-miRNA olarak farklı genomik bölgelerden transkribe edilir. Bunlar serbest kodlanmayan RNA'lar veya protein kodlayan genlerin intronlarında gömülü halde veya polisistronik transkriplerde kümelenmiş halde bulunurlar (54). pri-miRNA'nın olgun aktif bir miRNA olabilmesi için öncelikle pre-miRNA'ya dönüşmesi gerekir. Bu dönüşüm RNAaz III ailesinin endonükleazı olan Drosha ve kofaktörü olan Pasha (DGCR8) tarafından gerçekleştirilir (55, 56). pri-miRNA Drosha yardımı ile bölünür. Oluşan pre-miRNA ortalama 70 nükleotid uzunluğundadır (55). Ardından Ekspörtin 5 ile Ran-GTPaz bağımlı şekilde nukleustan sitoplazmaya çıkartılır (57). Sitoplazmada Dicer pre-miRNA'nın ilmek bölgesini ayırır ve sonuçta çift iplikli yaklaşık 21 nükleotidlik bir miRNA oluşur (Şekil 2-3). RISC kompleksi argonaute proteini içerir. Oluşan iki iplikten kararlı olan argonaute proteini yardımıyla RISC kompleksine katılır, diğeri ise indirgenir. Degrade olan iplik yıldız ipliği olarak adlandırılır ve bunu belirtmek için miRNA adının sonuna \* işareti eklenir (miR145\* gibi). Bazı miRNA'larda her iki iplik de RISC kompleksine katılabilir. miRNA'lar RISC kompleksine katıldıklarında mRNA'nın yıkımına ya da protein translasyonunun durdurulmasına neden olurlar (53). Gen ifadesinin susturulması miRNA'lar mRNA ile tam uyum gösterdiğinde, mRNA'yı parçalamasıyla gerçekleşir. Eğer tam uyum gerçekleşemezse, mRNA indirgenmez ancak translasyon baskılanır (58).



**Şekil 2-3: miRNA biyogenezi (59)**

### 2.6.2. miRNA ve Hastalık İlişkisi

miRNA'lar gen ekspresyonunun düzenlenmesinde etkilidir. miRNA'larda meydana gelecek herhangi bir değişiklik ekspresyon profilini de değiştireceğinden hastalıklarla ilişkilendirilebilirler. miRNA'lar aracılığı ile tanı, hasta örneklerinden hastalık hakkında klinik olarak anlamlı bilgiler edinmek için önemli bir moleküler yaklaşımdır. Bu moleküller hücre tipine özgül olmaları, çok miktarda ve stabil olmaları sebebiyle biyobelirteç olarak kullanılabilirler. miRNA'lar teşhis, hastalığın sınıflandırılması, kaynağının belirlenmesi, prognozunu ve tedaviye direncini belirlemede kullanılabilir (51).

Yapılan gen ekspresyon profili çalışmaları sonucunda bir çok hastalıkta miRNA ekspresyon seviyelerinde farklılıklar olduğu görülmüştür. Çoğu durumda, miRNA disregülasyonu ile hastalığın ilerlemesi arasında nedensel ilişki kurulmuştur (53).

### 2.6.3. miRNA ve Kanser

miRNA'lar eğer onkogenleri hedef alıyorsa, onları baskılayarak tümör oluşumunu engellerler. Bu miRNA'lar tümör baskılayıcı olarak isimlendirilirler. Tümör baskılayıcı genlerin inhibitörü olan miRNA'lar ise onkogenik miRNA adını alır.

Kanserde ekspresyon artışı gösteren onkogenik miRNA'lar onkomiR olarak adlandırılır (60).

miRNA'ların kanser oluşumundaki rolü ilk olarak 2001 yılında Calin ve arkadaşları tarafından KLL üzerine yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. KLL de yaygın görülen bir anomali olan 13q14 delesyon bölgesinde, mir-15-a ve mir-16-1 genlerinin varlığı keşfedilmiştir. Yapılan deneylerin sonucunda bu iki miRNA'nın KLL hastalarının çoğunda ekspresyonlarının çok az seviyede ya da hiç olmadığı görülmüştür. Ayrıca bulguların hastalığın kliniğinde de etkili olduğu bulunmuştur (61).

#### 2.6.4. miRNA ve AML

Yapılan çalışmalar AML'li hastalarda anormal miRNA ekspresyonu olduğunu göstermiştir. Zhu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada AML hastalarında mir-29a ekspresyon seviyesinin sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede düşük olduğu ve klinik olarak pediyatrik AML hastalarında kötü prognoz ile ilişkili olduğu bulunmuştur (62). AML hastalarında miR-124-1'in düşük ekspresyon seviyesinin iyi prognozla ilişkili olabileceğini Chen ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmadan elde ettikleri sonuçlara göre öngörmüşlerdir (63). AML'de ve özellikle M2 alt tipinde miR-378'in ekspresyonu aşırı artış göstermektedir ve bu da prognoz üzerinde negatif bir etkiye sahiptir (64). Dixon-Mclver ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada t(8;21) , inv(16) t(15;17) gibi iyi sitogenetik bulguları olan AML hastalarında miR-let7b ve miR-9 ekspresyonları düşük seviyede bulunmuştur (65).

AML'de görülen sitogenetik anomaliler ile miRNA'lar arasında bir etkileşim vardır.Tablo 2-8'de bunlardan bazılarına yer verilmiştir (66) .

**Tablo 2-8: AML'de görülen kromozom anomalileri ve miRNA ilişkisi (66)**

Kromozom Anomalileri	Seviyesi artan miRNA'lar	Seviyesi azalan miRNA'lar
t(15;17)	miR-127	miR-17
	miR-299	miR-126
	miR-323	
	miR-368	
	miR-382	



t(8;21)	miR-126/mir-126*	miR-133
İnv(16)		
t(11q23)/MLL	miR-326 miR-219 miR-17-92 miR-196a	miR-29s miR-34a miR-16
Trizomi 8	miR-124a miR-30d	

Miyeloid lösemi oluşumu ile en ilgili görülen miRNA'lar; miR-155, miR-196b, miR-29 ve miR-223'tür. Bunlardan miR-155 ve miR-196b'nin seviyesi artarken, miR-223 ve miR-29b-1'nin seviyesi azalmaktadır (66).

### 2.6.5. miR-210

miR-210 intronik bir miRNA'dır ve transkript AK123483'ün genomik lokusunda yer alır (67).

Hipoksi tümör mikroçevresinde ortak olarak görülür ve çoğu tümör tipinde olumsuz bir faktör olarak kabul edilir. Hipoksi ile regüle edilen miRNA'lar (HRM'ler) düşük oksijen ortamında hücre sağ kalımında önemli rol oynarlar. miR-210'da HRM'lerden biridir ve hipoksi ile indüklenebilir. miR-210 ayrıca hücre döngüsünün durdurulması, proliferasyon, protein modifikasyonu ve taşınması, mitokondriyal metabolizma, DNA hasar tamiri ve anjiyogenez gibi fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde de rol oynar (11, 16). miR-210 hem onkogen hem de tümör supresör görevi görür (68).

miR-210'un aşırı ekspresyonu akciğer karsinomu, meme kanseri, baş ve boyun kanseri, pankreas kanseri gibi birçok solid tümörde görülür (Tablo 2-9)(69)

**Tablo 2-9: Kanser çeşitlerine göre miR210'un rolü ve ekspresyon seviyesi (69)**

Kanser	MiR-210'un Rolü
Adrenokortikal Tümörler	Benign adenomlara göre daha yüksek ekspresyon seviyesi
Meme	Yüksek ekspresyon seviyesi-Kötü prognosis
Difüz Büyük B hücreli Lenfoma	Serumda artış
Glioblastoma	Artış-Kötü prognosis ile ilişkili
Baş ve Boyun	Artmış ekspresyon-kötü prognosis
Hepatosellüler Karsinom	Up-regüle
Akciğer	Primer küçük hücreli ve adenokarsinomda normale göre artış
Melanom	Artış-Prognozla ilişkili değil
Yumurtalık	Birçok epitelyal yumurtalık kanserinde ekspresyonuna rastlanmadı
Pankreas	Artış(serum ve plazmada)-Kötü prognosis
Pediyatrik Osteosarkoma	Artış-Kötü prognosis ile ilişkili
Prostat	Aşırı ekspresyon
Renal	Tümör alt tipinin sınıflandırılması- Artış-Kötü prognosis ile ilişkili
Yumuşak Doku Sarkomu	Ekspresyonu tümör başlangıç yaşı ve kötü prognosis ile ilişkili

Çoğu kanser türünde miR-210'un aşırı ekspresyonu kötü prognosis ile ilişkilendirilmiştir. Bunun aksine miR-210'un düşük ekspresyon seviyesi ALL'de nüks

ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (70). AML’de miR-210’un etkisi ilk olarak 2015 yılında Tang ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda AML hastalarından alınan kemik iliği örneklerinde miR-210 seviyesi sağlıklı kontrollere göre anlamlı oranda yüksek bulunmuştur ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (11).

Nöroblastoma hücrelerinde yapılan bir çalışmada miR-210 un spesifik bağlanma elemanlarının BCL-2 mRNA’sının 3’ UTR bölgesinde olduğu bulunmuştur. Elde edilen veriler hipoksinin HIF-1-a aracılı bir mekanizma ile miR-210 ekspresyonunu indükleyebileceğini ve miR-210’un BCL-2 ekspresyonunu hedefleyerek apoptozda kritik rol oynadığını göstermiştir (71).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Gereç

##### 3.1.1. Çalışma Grubu

Bu tez çalışmasında 2016-2018 tarihleri arasında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı'nda AML tanısı almış ve henüz tedavi almamış 7 hastadan rutin analizler için alınan kemik iliği materyali ve içlerinden 5 hastanın perifer kanı çalışılmıştır. Kontrol grubu olarak gönüllü olarak çalışmaya katılan sağlıklı 7 bireyin kan örneği alınıp, sonuçlar hasta grubun sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Çalışma Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Sitogenetik Laboratuvarları ve aynı anabilim dalında konumlu Beyin ve Nörodejeneratif Hastalıklar Araştırma Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir. Hasta ve kontrol grubundan alınan örneklerle konvansiyonel sitogenetik ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) yöntemleri uygulanmıştır. Konvansiyonel sitogenetik yöntemi kullanılarak genel kromozom analizi yapılmış, qRT-PZR metodu ile miR-210 ve BCL-2 ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir.

#### 3.2. Yöntem

##### 3.2.1. Konvansiyonel Sitogenetik Yöntemi

Yeni tanılı AML hastalarından heparinli enjektöre alınan kemik iliği materyalleri 24 saatlik ve 48 saatlik kültür işlemine tabi tutuldu. Sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubundan alınan kan örnekleri 72 saatlik kültür yöntemi uygulandı. Kültür odasında steril ortamda vidalı kapaklı tüplere 5'er ml RPMI-1640 Medyum A konuldu. Medyum içerisine materyalin yoğunluğuna göre 6-8 damla kemik iliği ekildi. Kontrol grubunun kan örnekleri için 5 ml Phytomehagglutinin bulunan RPMI-1640 Medyum B içerisine 10-12 damla perifer kanı ekildi. Tüpler 37°C'lik etüve kaldırıldı.

Kemik iliği kültür tüplerinden 24 saatlik kültür yapılacak olanlara 22. , 48 saatlik kültür yapılacak olanlara 46. saatte, perifer kanı içeren tüplere kültürün 70. saatinde, bölünmeyi metafaz aşamasında durdurmak amacıyla iğ ipliklerini bloke eden Colcemid (Colchicine) maddesinden 50 µl ilave edildi. Tüpler ters yüz edilerek tekrar etüve kaldırıldı.

Tüpler kültür süresinin tamamlanmasından yarım saat önce etüvden alınarak çıkış işlemine geçildi. Çıkış aşaması için etüvden alınan tüpler oda sıcaklığında, 1300 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi.

Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatant dikkatlice döküldü ve tüpün dibinde kalan pellete tüp vorteks üzerindeyken pastör pipeti yardımıyla 6 ml 37°C 0.075 M KCl eklendi. Kemik iliği tüpleri 27 dakika, kan tüpleri 8 dakika 37°C etüvde inkübe edilip, hücrelerin hipotonik şok etkisiyle şişirilmesi sağlandı.

İnkübasyon süresi tamamlandığında tüpler etüvden alındı. Tüplere pre-fiksasyon amacıyla 1-2 damla Carnoy fiksatif (3 metanol-1 asetik asit) damlatıldı ve 1300 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi.

Santrifüj sonrasında süpernatant döküldü ve tüpte kalan pellete, tüpler vorteks üzerindeyken fiksasyon amacıyla 6 ml Carnoy fiksatif damla damla eklendi. Çıkış işlemi bu aşama ile tamamlandı ve tüpler bir gece +4°C'de bekletildi.

1 gün sonra tüpler +4°C deki buzdolabından alınarak yıkama işlemine başlandı. Tüpler ilk olarak 1300 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pelet üzerine vorteks eşliğinde 6 ml Carnoy fiksatif eklendi. Bu işlem 3 kez daha tekrarlandı ve yıkama işlemi tamamlandı. Tüpler +4°C deki buzdolabına kaldırıldı.

Yayma işlemi yapılacağına tüpler buzdolabından alınıp 1300 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi ve pelet üzerine birkaç damla Carnoy fiksatifinden eklenerek yoğunluğu ayarlandı. Oda sıcaklığında ve %50-52 oranında nemli ortamda temiz lamlar üzerine 4-5 damla örnek yayıldı. Lam üzerine birkaç damla Carnoy fiksatif damlatılıp oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlar hava sıcaklığı ve nem göz önünde bulundurularak uygun süre ve sıcaklıkta hotplate üzerinde yaşlanmaya bırakıldı.

Yaşlandırma işlemi tamamlanan lamlara GTL bantlama işlemi yapıldı. Preparatlar, içerisinde tripsin bulunan PBS çözeltisinde 1-3 saniye bekletildikten sonra tampon çözelti ile muamele edildi. Daha sonra 30-60 saniye süresince 1:5 oranında hazırlanan Leissman boyası ile boyandı. Akan su ile fazla boyası giderilen preparatlar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

Preparatlar ışık mikroskobunda 10X büyütmede uygun metafaz bulabilmek için tarandı. Değerlendirilebilecek kalitede olan metafazlar immersiyon yağı konularak 100X büyütmede, mikroskoptaki kamera yardımıyla karyotipleme programına aktarıldı.

Her hasta ve kontrole kromozom analizi yapıldı. Analizler ISCN 2017'ye göre değerlendirildi ve sonuç formülleri yazıldı.

### 3.2.2. Moleküler Yöntemler

#### 3.2.2.1. RNA İzolasyon Yöntemleri

##### A. Kemik İliği Materyalinden RNA İzolasyon Yöntemi

Hastalardan EDTA'lı tüpe alınan kemik iliği materyalinden MİRCURY dokudan RNA İzolasyon Kiti (Exiqon, 300110) kullanılarak RNA izolasyonu yapılmıştır. Kit protokolüne göre 7 hasta için aşağıdaki işlemler gerçekleştirilmiştir;

- I. Her bir örnek için 300 µl lizis solüsyonu mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve üzerine çeker ocak altında 3µl β-merkaptoetanol eklendi.
- II. 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpü içerisine 150 µl kemik iliği materyali konuldu, pipetleme ile karıştırıldı.
- III. Üzerine önceden hazırlanan lizis solüsyon konuldu, pipetleme ile karıştırıldı.
- IV. 600 µl RNAz içermeyen su eklendi, 5-10 sn vorteks ile karışması sağlandı.
- V. 20 µl Proteinaz K konuldu.
- VI. 55°C'de 15 dakika inkübe edildi.
- VII. İnkübasyon sırasında her 3-4 dakika da bir 10 saniye vorteksle karıştırma işlemi yapıldı.
- VIII. İnkübasyon sonrasında 14.000 g'de 1 dk santrifüj işlemi yapıldı.
- IX. Üst sıvı temiz bir 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
- X. Üzerine 450 µl absöü etanol eklendi ve vorteksleme işlemi yapıldı.
- XI. Kit içerisinden çıkan toplama tüpünün içerisine filtreli kolon tüp yerleştirildi.
- XII. 650 µl'lik karışım tüpün kenarlarına değdirilmeden filtre üzerine mikropipet yardımıyla konuldu.
- XIII. 14.000 g'de 1 dakika santrifüj yapıлып alttaki sıvı döküldü ve bu işlem 3 kez tekrar edildi.
- XIV. Filtre üzerine 400 µl yıkama tamponu eklendi.
- XV. 14.000g'de 2 dakika santrifüj yapıldı.

- XVI. Alttaki toplama tüpü atılıp filtreli kolon tüp yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- XVII. Filtre üzerine 400 µl yıkama tamponu eklendi.
- XVIII. 14.000 g'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
- XIX. Toplama tüpüne geçen sıvı dökülüp, filtre üzerine tekrar 400 µl yıkama tamponu eklendi.
- XX. 14.000 g'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
- XXI. Filtreli kolon tüp temiz bir 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpü içerisine yerleştirilip üzerine 50 µl elution tamponu eklendi ve 2 dakika bekletildi.
- XXII. Önce 200 g'de 2 dakika, daha sonra 14.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- XXIII. RNA konsantrasyonunu arttırmak üzere alta geçen sıvı tekrar filtre üzerine konulup 2 dakika bekletildi.
- XXIV. Önce 200 g'de 2 dakika, daha sonra 14.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- XXV. Elde edilen RNA'lar daha sonra RNA ölçümü ve gerçek zamanlı PZR işleminde kullanılmak üzere önce -20 daha sonra -80 derecelik buzdolabına kaldırıldı.

## **B. Kandan RNA İzolasyon Yöntemi**

Hastalardan EDTA'lı tüpe alınan perifer kanı Qiagen RNA İzolasyon Kiti (Qiagen, 52304) kullanılarak RNA izolasyonu yapılmıştır. Kit protokolüne göre 5 hastanın ve 7 sağlıklı kontrol grubundan alınan perifer kanı için aşağıdaki işlemler gerçekleştirilmiştir;

- I. 1 ml K3-EDTA'lı kan örnekleri 15ml'lik santrifüj tüpüne alınarak buz üzerine yerleştirildi.
- II. Üzerine eritrosit lizis solüsyonundan 5 ml eklendi ve 1 dakika kuvvetlice çalkalandı, 20 saniye vortekslendi.
- III. Buz üzerinde 20 dakika inkübe edildi.
- IV. İnkübasyon süresi boyunca her 5 dakikada bir kuvvetlice çalkalandı ve vortekslendi.
- V. İnkübasyon süresi sonunda +4°C'de 400 g 10 dakika santrifüjlendi, üst sıvı atıldı.
- VI. Üzerine 2 ml eritrosit lizis solüsyonu eklendi, kuvvetlice çalkalanıp vortekslendi.

- VII. +4°C'de 400g 10 dakika santrifüjlendi, üst sıvı atıldı.
- VIII. Aynı bir santrifüj tüpü içerisine her bir örnek için 600 µl RLT tamponu konulup üzerine çeker ocak altında 6 µl β-merkaptoetanol eklendi ve vortekslendi.
- IX. Pellet üzerine hazırlanan RLT tamponu eklendi ve vortekslendi.
- X. Filtreli QIAshredder spin kolon tüpüne lizat eklendi.
- XI. 18.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi, filtre atıldı.
- XII. Toplama tüpünde biriken sıvıya %70'lik etanolden 1 hacim eklendi ve iyice pipetaj yapıldı.
- XIII. Lizat maksimum 700 µl olacak şekilde filtreli QIAamp spin kolon tüpüne kondu.
- XIV. 11.000 rpm'de 15 saniye santrifüj yapıldı.
- XV. Alta geçen sıvı dökülüp, filtre üzerine geri kalan lizat konuldu.
- XVI. 11.000 rpm'de 15 saniye santrifüj yapıldı.
- XVII. Filtre yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- XVIII. Kit içinden çıkan RW1 yıkama tamponundan 700 µl filtre üzerine eklendi.
- XIX. 11.000 rpm'de 15 saniye santrifüj yapıldı.
- XX. Filtre yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- XXI. Kit içinden çıkan RPE yıkama solüsyonundan 500 µl filtre üzerine eklendi.
- XXII. 11.000 rpm'de 15 saniye santrifüj yapıldı.
- XXIII. Alt sıvı döküldü ve RPE yıkama solüsyonundan 500 µl filtre üzerine eklendi.
- XXIV. 15.000 rpm'de 3 dakika santrifüj yapıldı
- XXV. Alta geçen sıvı dökülüp 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
- XXVI. Filtreli tüp 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
- XXVII. Üzerine 40 µl RNAz içermeyen su eklendi ve 10 dakika inkübe edildi.
- XXVIII. 11.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- XXIX. RNA konsantrasyonunu arttırmak üzere alta geçen sıvı mikropipet ile alınıp tekrar filtreye konuldu ve 10 dakika inkübe edildi.



XXX. 11.000 rpm’de 1 dakika santrifüj yapıldı.

XXXI. Elde edilen RNA’lar daha sonra RNA ölçümü ve gerçek zamanlı PZR işleminde kullanılmak üzere önce -20 daha sonra -80 derecelik buzdolabına kaldırıldı.

### 3.2.2.2. RNA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Örneklerin RNA konsantrasyonları, Qubit RNA HS Assay kiti (Invitrogen, Q32852) kullanılarak aşağıdaki protokole göre belirlendi.

1. Qubit RNA reaktifi, Qubit RNA Tamponu içerisinde 1:200 oranında sulandırılarak Qubit Çalışma Solüsyonu hazırlandı. Her bir standart ve örnek için 200 µl Qubit Çalışma Solüsyonu hazırlandı.
2. Her bir standart ve örnek Qubit Çalışma Solüsyonu içerisinde aşağıda belirtilen şekilde sulandırılarak 0.5 ml’lik Qubit Assay tüpü (Invitrogen, Q32856) içerisine kondu.
3. Standartlar ve örnekler 2-3 saniye vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonrası standartlar ve örneklere ait tüpler Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies) cihazına yerleştirilerek ölçüldü.

**Tablo 3-1:** RNA konsantrasyonlarının belirlenmesi sırasında kullanılan standart ve örneklerin hazırlanması

Hacim	Standartlar	Örnekler
Qubit Çalışma Solüsyonu	190 µl	199 µl
Standartlar	10 µl	-
Örnekler	-	1 µl
Final Hacim	200 µl	200 µl

### Normalizasyon

RNA konsantrasyonlarının belirlenmesinden sonra, her bir RNA örneğinden eşit miktarda (Kan örnekleri için 50 ng, kemik iliği örnekleri için 150 ng) olacak şekilde hesaplama yapılarak cDNA sentezleri gerçekleştirildi.

### 3.2.2.3. mRNA’dan cDNA Sentezi

mRNA’dan cDNA sentezi, iScript cDNA synthesis kit (Biorad, 170-8891) kullanılarak aşağıdaki protokole göre gerçekleştirildi (Tablo 3-2).

**Tablo 3-2 : mRNA'dan cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon karışımının hazırlanması:**

Reaksiyon bileşenleri	Hacim
5x i-Script Reaksiyon karışımı	4.0 µl
i-Script ters transkriptaz enzimi	1.0 µl
dH <sub>2</sub> O	ölçüm sonuçlarına göre her birey için hesaplanmıştır
RNA (40 ng)	ölçüm sonuçlarına göre her birey için hesaplanmıştır
TOPLAM	20 µl

Ters transkripsiyon reaksiyonu aşağıdaki ısı döngüleri kullanılarak gerçekleştirildi.

**Tablo 3-3: mRNA'dan cDNA sentezi için kullanılan ısı döngüleri**

Süre	Sıcaklık
5 dakika	25°C
30 dakika	42°C
5 dakika	85°C
∞	4°C

Reaksiyon sonrası cDNA örnekleri -20°C'de saklandı.

#### 3.2.2.4. cDNA'ların Sulandırılması

cDNA'lar, mRNA ekspresyon analizi öncesi 2 katı kadar sulandırıldı.

#### 3.2.2.5. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

mRNA ekspresyonu, Lightcycler 480 Probe Master Mix kiti (Roche, 04707494001), BCL2 genine uygun dizayn edilmiş primerler ve Universal Probe Library (UPL) prob (Prob #75, Roche, 04688988001) kullanılarak LightCycler 480 (Roche) cihazında gerçekleştirildi. BCL2 mRNA ekspresyonunun doğru bir şekilde belirlenebilmesi için aktin beta (ACTB) genine ait primer ve UPL probe karışımı

(ACTB Gene Assay, Roche, 05532957001) kullanılarak 2. normalizasyon işlemi yapıldı.

qRT-PCR deneyleri, her bir cDNA örneği ikişer kez konarak aşağıdaki protokole göre gerçekleştirildi.

PCR reaksiyon karışımı aşağıdaki tabloya göre hazırlandı (Tablo 3-4).

**Tablo 3-4: mRNA ekspresyon analizi için hazırlanan qRT-PCR reaksiyon karışımı**

Reaksiyon bileşenleri	Hacim
LC480 Probe Master Mix (2X)	5.0 µl
Probe	0.1 µl
Primer 1	0.2 µl
Primer 2	0.2 µl
dH <sub>2</sub> O	2.0 µl
TOPLAM	7.5 µl

1. PCR reaksiyon karışımı mikropipet yardımıyla karıştırıldı.
2. 96 kuyulu plakanın her bir kuyusuna 7.5 µl PCR reaksiyon karışımından kondu.
3. Her bir kuyudaki PCR reaksiyonu karışımı üzerine 2.5 µl sulandırılmış cDNA kalıbı eklendi.
4. 96 kuyulu plakanın üzeri kaplama yapışkanı ile kapatıldı.
5. 96 kuyulu plaka kısaca santrifüjlendikten sonra LightCycler 480 cihazına kondu ve aşağıdaki ısı döngüleri kullanılarak reaksiyon gerçekleştirildi (Tablo 5).

**Tablo 3-5: mRNA ekspresyon analizi için kullanılan qRT-PCR ısı döngüleri**

	Pre-inkübasyon	Amplifikasyon			Soğutma
Sıcaklık (°C)	95	95	60	72	40
Süre (dakika:saniye)	10:00	00:10	00:30	00:01	00:10
Sıcaklık eğişim oranı (°C/sn)	4.4	4.4	2.2	4.4	1.5
Döngü sayısı	1	45			1
Analiz tipi	-	Kantitatif değerlendirme			-

### 3.2.2.6. miRNA'dan cDNA Sentezi

miRNA'dan cDNA sentezi, miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR kiti (Exiqon, 203301) kullanılarak aşağıdaki protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Bu protokol 2 aşamadan oluşmaktadır;

1. cDNA sentezi
2. qRT-PCR analizi

cDNA sentezi aşağıdaki basamaklar takip edilerek yapılmıştır;

- RNA örneklerinin her biri nükleaz içermeyen su ile 5 ng/μL'lik bir konsantrasyona sabitlendi.
- Aşağıdaki tabloda belirtilen karışım hazırlandı.

**Tablo 3-6: miRNA'dan cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon karışımının hazırlanması**

Reaksiyon bileşenleri	Hacim (μl)
5x Reaksiyon Tamponu	2
Nükleaz içermeyen su	4.5
Enzim karışımı	1
Sentetik RNA Spike (opsiyonel)	0.5
RNA örneği (konsantrasyonu ayarlanmış)	2
TOPLAM	10

- Karışım hazırlandıktan sonra 42°C'de 60 dakika, sonrasında 95°C'de 5 dakika inkübe edildi.
  - Hızla 4 °C'ye soğutuldu ve örnekler -20°C'de saklandı.
2. aşama olan qRT-PCR analizi aşağıdaki adımlar takip edilerek yapıldı;
- Hazırlanan cDNA örnekleri 80x nükleaz içermeyen su ile seyreltildi.
  - 96'lık plaka'nın her kuyucuğuna aşağıdaki bileşenler eklendi;

**Tablo 3-7: miRNA ekspresyon analizi için hazırlanan qRT-PCR reaksiyon karışımı**

Reaksiyon bileşenleri	Hacim (μl)
PCR Master Mix	5

PCR Primer Mix	1
Seyreltilmiş cDNA örneği	4
TOPLAM	10

- 96 kuyulu plakanın üzeri kaplama yapışkanı ile kapatıldı.
- Plaka 1500g'de 1 dakika santrifüj edildi ve LightCycler 480 cihazına konuldu.
- Aşağıdaki ısı döngüleri kullanılarak reaksiyon gerçekleştirildi;

**Tablo 3-8: miRNA ekspresyon analizi için kullanılan qRT-PCR ısı döngüleri**

	Polimeraz Aktivasyonu/Denatürasyon	Amplifikasyon	
Sıcaklık (°C)	95	95	60
Süre (dakika:saniye)	10:00	00:10	1:00
Döngü sayısı		45	
Analiz tipi	-	Erime eğrisi analizi	

### 3.2.2.7. qRT-PCR Deneylerinin Analizi

Örneklerin ekspresyon seviyesini belirlemek üzere qRT-PCR deneylerinden elde edilen Ct değerleri  $\Delta CT = 2^{(\text{referans Ct'si} - \text{hedef gen Ct'si})}$  formülüne kondu. Hesaplamalar ve grafik çizimleri Microsoft Office Excel 2016 programında yapıldı. Her bir gruba ait ham veriler GraphPad InStat DTCCG 3.06 yazılımı kullanılarak Kruskal Wallis ve sonrasında Dunn's çoklu karşılaştırma testleri ile istatistiksel olarak değerlendirildi.  $p < 0.05$  olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### 3.3. Kullanılan Gereçler

- Buzdolabı +4°C : Arçelik 4042 T Plus
- Derin Dondurucu -20°C: Arçelik
- Derin Dondurucu -80°C : Sanyo
- Etüv: Memmert

- Görüntüleme Sistemleri:
  - ❖ Karyotipleme için Applied Images (Nicon)
  - ❖ Ankagen Karyotyping programı (Leica)
- Hassas Terazı: Precisa xB 220 A
- Hotplate: Selecta
- Heat Block: Wealtec Corp., HB-2
- Manyetik Karıştırıcı: Are Velp Scientifica
- Mikropipetler:
  - ❖ Medispec-Plus,
  - ❖ Discovery Comfort
  - ❖ Jencons Sealpette
- Mikroskoplar:
  - ❖ Nikon Eclipse E600
  - ❖ Leica DM 2500
- pH Kağıdı: Isolab
- Santrifüj:
  - ❖ Hettich Rotafix 32A masaüstü santrifüj
  - ❖ Hettich mikro 22 santrifüj
  - ❖ Beckman Coulter, Allegra X-20R soğutmalı santrifüj
  - ❖ Cleaver Scientific Ltd. , c1301p-230v mini santrifüj
- Su banyosu:
  - ❖ Kottermann Labortechnik
  - ❖ Memmert
- Vorteks:
  - ❖ Dragon Lab MX-S
  - ❖ Labnet vortex mixer
- PCR Cihazı:
  - ❖ Techne, Tc-3000g PCR Termal Cycler
  - ❖ Roche, Lightcycler 480 II RT-PCR
- Balon joje
- Beher
- Eldiven

- Enjektör
- Eppendorf
- Erlenmayer
- Kronometre
- Lam: Menzel-Glaser Superfrost ground edges 90
- Lamel: Menzel-Glaser 100 Deckglaser
- Mezür
- Pastör pipeti
- Pipet uçları
- Termometre
- Vidalı kapaklı tüp

### 3.3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- Asetik Asit: Merck
- Colsemid: KaryoMAX
- HCl: Merck
- İmmersiyon yağı: Biostain
- KCl: Merck
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : Merck
- Ksilol: Tekkim
- NaCl: Carlo Erba
- Metanol: Merck
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : Merck
- Parafilm
- RPMI 1640: Biochrome (Medyum A ve B)
- $\text{triNaCitrat} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : Appli Chem
- %96 Ethanol: Merck

### 3.3.2. Kullanılan Solüsyonlar

#### 3.3.2.1. Periferik Lenfosit Kültürü İçin Kullanılan Solüsyonlar

- **Carnoy fiksatifi:** Metanol:Asetik Asit (3:1)
- **Colcemid:** 10  $\mu\text{g/ml}$  Colcemide içeren hazır Colcemide solüsyonu (Biochrome L-6221)

- **Hipotonik Şok çözeltisi:** 0,075M KCL çözeltisi
- **Kültür vasatı:** %20 fetal bovin serum, L-glutamin, penisilin, streptomisin ve phytohemagglutinin içeren RPMI 1640 hazır kromozom medyumu (Biochrome F-5023)
- **Leishman Boya:** 0,3 gr Leishman boyası 200 ml metanol içinde çözülerek hazırlanır.
- **Salin:** %9'luk NaCl çözeltisi
- **Tampon Çözelti:** 0,025 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> çözeltisi (pH:6.8)
- **Tripsin:** %9'luk NaCl çözeltisi içinde 0,15 mg Tripsin çözülerek hazırlanır





## 4. BULGULAR

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesinde yürütülen bu yüksek lisans tez çalışmasında, 2017-2018 tarihleri arasında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı'nda yeni Akut Miyeloid Lösemi tanısı almış olan 7 hasta'nın kemik iliği materyali ve 7 gönüllüden oluşan kontrol grubunun perifer kanı Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Sitogenetik Laboratuvarında, konvansiyonel sitogenetik yöntemiyle karyotip analizi yapılmıştır. Aynı anabilim dalında bulunan Beyin ve Nörodejeneratif Hastalıklar Araştırma Laboratuvarları'nda qRT-PZR yöntemiyle miRNA-210 ve BCL-2 ekspresyon analizleri yapılmıştır.

### 4.1. Konvansiyonel Sitogenetik Bulguları

Olgulardan FAB sınıflandırması bilinen hastalardan 1 tanesi AML M2, 2 tanesi AML M4 ve 1 tanesi AML M5 tanılıdır. Diğer 3 hastanın FAB sınıflandırmasına göre tanısı bilinmemektedir (Tablo 4-1). Hastaların yaş ortalaması ise  $49,4 \pm 22,4$ 'tür.

**Tablo 4-1: Olgulara ait yaş, cinsiyet ve tanı bilgileri**

OLGU NO	YAŞ	CİNSİYET	TANI
OLGU 1	24	ERKEK	AML M2
OLGU 2	21	ERKEK	AML M4
OLGU 3	62	ERKEK	AML M4
OLGU 4	52	KADIN	AML M5
OLGU 5	42	KADIN	AML
OLGU 6	61	ERKEK	AML
OLGU 7	84	ERKEK	AML

Olgu grubunu oluşturan 7 AML hastasının kemik iliği materyalinde yapılan konvansiyonel sitogenetik yöntemler sonucunda elde edilen karyotip sonuçları Tablo 4-2'de gösterilmektedir.

**Tablo 4-2: Olguların konvansiyonel sitogenetik analizi sonuçları**

OLGU NO	KARYOTİP
1	46,XY[4] *NKSA[2]
2	41~44,XY,-18[3],-21[3],-22[3][cp6]/46,XY[5]
3	40~47,XY,+4[2],-5[3],-9[3],inv(9)(p11q13)[8],add(21)(p11)[3],-22[3],+mar1[3],+mar2[2][cp9]/46,XY,inv(9)(p11q13)[10]
4	**DMB
5	46,XX[2] *NKSA[3]
6	25~27,X,+2[3],+5[2],+9[2],+12[2],+20[2][cp3]/35~44,XY,-6[4],-8[4],-9[3],-21[3][cp6]/46,XY[7]
7	27~34,X,+2[2],+6[2],+13[2],+18[2],+21[2],+22[2][cp2]/39~45,XY,-16[4],-21[3][cp7]/46,XY[16]

\*nkasa: Non klonal sayı anomalisi

\*\*dmb: Değerlendirilecek metafaz bulunamadı

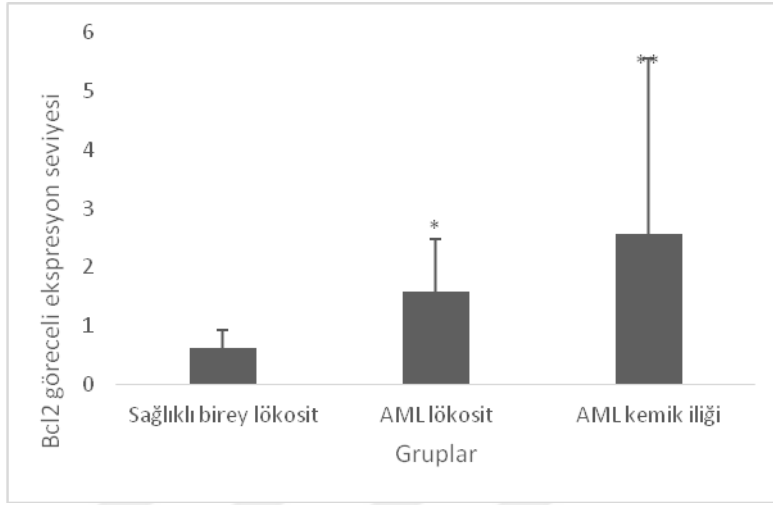
Gönüllü 7 bireyden oluşan kontrol grubunun perifer kanı da konvansiyonel sitogenetik yöntemiyle çalışılarak karyotip analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4-3'te gösterilmektedir.

**Tablo 4-3: Kontrol grubuna ait konvansiyonel sitogenetik analiz sonuçları**

KONTROL NO	İNCELENEN METAFAZ SAYISI	KARYOTİP
1	20	46,XX
2	20	46,XY
3	20	46,XY

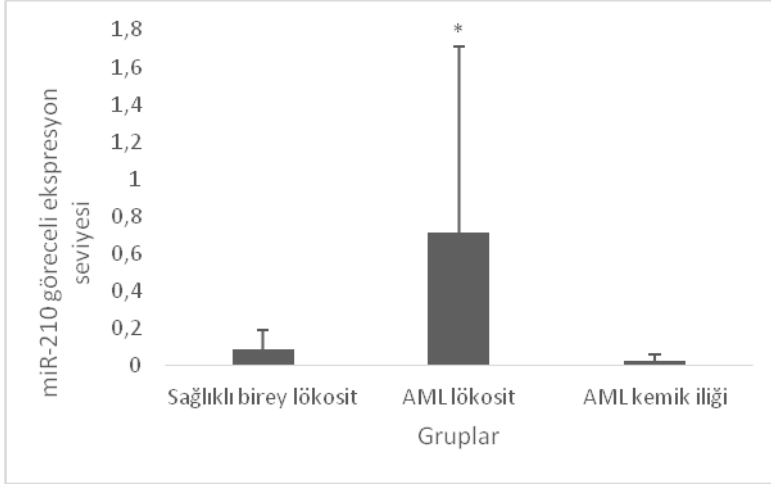
4	20	46,XX
5	20	46,XX
6	20	46,XX
7	20	46,XX

#### 4.2. miRNA-210 ve BCL-2 gen ekspresyon analizi sonuçları



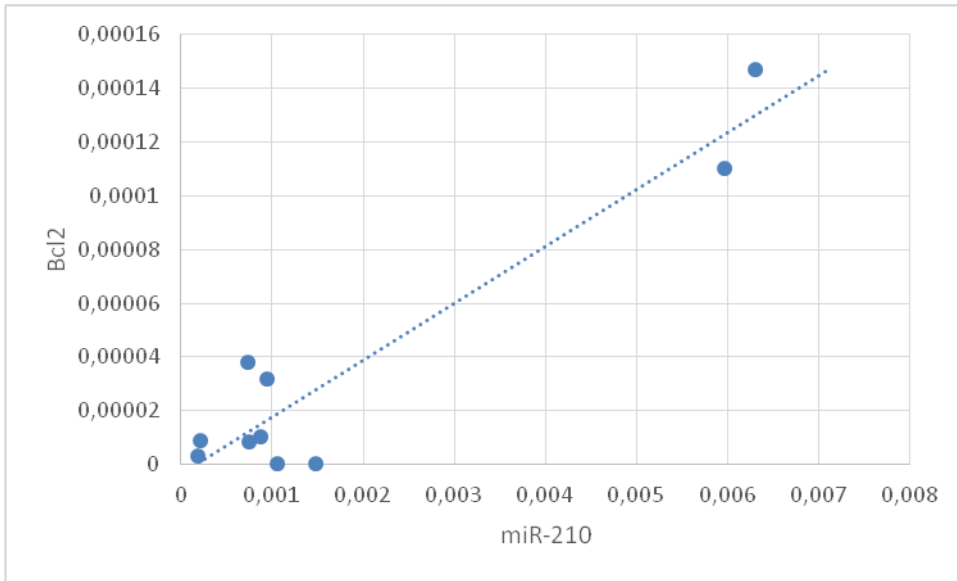
**Şekil 4-1: AML'li ve sağlıklı bireylerdeki BCL-2 ekspresyon seviyesi**

Tüm grupları birarada değerlendiren Kruskal-Wallis testi sonrası elde edilen p değeri 0.0141'dir. Dunn's multiple comparison testi ile anlamlılığın nerden kaynaklandığı belirlendiğinde AML lökositlerinden elde edilen Bcl-2 mRNA ekspresyon seviyesinin sağlıklı bireylere göre anlamlı derecede yüksek olduğu ( $p<0.05$ ) ve yine AML kemik iliğinden elde edilen Bcl-2 mRNA ekspresyon seviyesinin sağlıklı bireylere göre anlamlı derecede yüksek olduğu ( $p<0.05$ ) saptandı (Şekil 4-1).



**Şekil 4-2: AML’li ve sağlıklı bireylerdeki miR-210ekspresyon seviyesi**

Tüm grupları birarada değerlendiren Kruskal-Wallis testi sonrası elde edilen p değeri 0.0186’dir. Dunn’s multiple comparison testi ile anlamlılığın nerden kaynaklandığı belirlendiğinde AML lökositlerinden elde edilen miR-210 ekspresyon seviyesinin, AML kemikiliğinden elde edilen verilere göre anlamlı derecede yüksek olduğu ( $p < 0.05$ ) ancak ekspresyon seviyesi yüksek olmasına rağmen sağlıklı bireylerle arasında istatistiksel derecede bir anlamlılık olmadığı saptandı (Şekil 4-2). Bunun sebebi büyük olasılıkla grupların yüksek SD değerlerine sahip olmalarıdır. Bir hastaya ait lökosit ve kemik iliği örneklerinde miR-210 ekspresyon seviyesi belirlenemeyecek kadar düşüktü.



**Şekil 4-3: BCL-2 ve miR-210 ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması**

Bcl2 ve miR-210 ekspresyonları arasında korelasyon testi yapıldığından, AML hastalarının kemik iliğindeki Bcl2 ve miR-210 ekspresyonlarının birbirleri ile yüksek oranda korele olduğu ( $r=0.94$ ; %95 güvenlik aralığı 0.77-0.99;  $r^2=0.89$ ;  $p<0.0001$ ) (Şekil 4-3), fakat diğer grupların arasında böyle bir korelasyon bulunmadığı saptandı.

**Olgu 1:** AML M2 tanısı almış 24 yaşındaki erkek hastanın kemik iliği materyaline yapılmış olan G bantlama ile elde edilen metafazlar incelenmiştir. İncelenen metafazlardan 4 tanesinde 46,XY kromozom yapısı gözlenmiştir. İki metafazda klonal olmayan sayı düzensizlikleri görülmüştür.

**Olgu 2:** AML M4 tanısı almış 21 yaşındaki erkek hastanın kemik iliği materyaline yapılmış olan G bantlama ile elde edilen metafazlar incelenmiştir. İncelenen metafazlardan 5 tanesinde 46,XY kromozom yapısı gözlenirken 6 metafazda kompleks karyotip görülmüştür. 3 metafazda 18, 21 ve 22 numaralı kromozomların monozomisi tespit edilmiştir.

**Olgu 3:** AML M4 tanısı almış 62 yaşındaki erkek hastanın kemik iliği materyaline yapılmış olan G bantlama ile 20 metafaz incelenmiştir. İncelenen tüm sahalarda inv(9)(p11q13) sitogenetik bulgusu görülmüştür. Konstitüsyonel olduğu düşünülen bu bulgu literatürde polimorfizm olarak kabul edilmektedir. İncelenen 10 sahada 46,XY,inv(9)(p11q13) karyotipine rastlanmıştır. Analiz edilen 2 sahada trizomi 4, 3 sahada 5, 9 ve 22 numaralı kromozomların monozomisi görülmüştür. 3 sahada add(21)(p11) kromozom yapısına rastlanmıştır. Ayrıca marker kromozomlar da gözlenmiştir.

**Olgu 4:** AML M5 tanısı almış 52 yaşındaki kadın hastanın kemik iliği materyaline yapılmış olan G bantlama ile sitogenetik analiz inceleme yapılmış, değerlendirilecek kalitede ve sayıda metafaz bulunamamıştır.

**Olgu 5:** AML tanısı almış 42 yaşındaki kadın hastanın kemik iliği materyaline yapılmış olan G bantlama ile elde edilen metafazlar incelenmiştir. İncelenen metafazların 2'sinde 46,XX kromozom yapısı görülmüştür. Klonal olmayan yapı düzensizlikleri gözlenen üç metafazda hipodiploid seviyede (40-45) kromozom sayısı tespit edilmiştir.

**Olgu 6:** AML tanısı almış 61 yaşındaki erkek hastanın kemik iliği materyaline yapılmış olan G bantlama ile 17 metafaz incelenmiştir. İncelenen metafazların 7'sinde

46,XY kromozom yapısı görülmüştür. Haploid seviyede olan 3 sahadan 3'ünde 2 numaralı kromozomun artışı görülürken, 2 sahada 5, 9, 12 ve 20 numaralı kromozomların artışı görülmüştür. Hipodiploid seviyedeki 6 sahadan 4'ünde 6 ve 8 numaralı kromozomun monozomisi görülürken, 3 sahada 9 ve 21 numaralı kromozomların monozomisi görülmüştür.

**Olgu 7:** AML tanısı almış 84 yaşındaki erkek hastanın kemik iliği materyaline yapılmış olan G bantlama ile 28 metafaz incelenmiştir. İncelenen metafazlardan 16 tanesinde 46,XY kromozom yapısı saptanmıştır. Haploid seviyedeki 2 sahada 2, 6, 13, 18, 21 ve 22 numaralı kromozomların artışı görülmüştür. Diploid seviyedeki 7 metafazın 4'ünde 16. kromozomun monozomisi görülürken, 3 sahada 21. kromozomun monozomisi görülmüştür. İncelenen 12 metafazda bir ya da birden fazla kromatid kırıkları ve kromozom gapleri gözlenmiştir. Bunlardan chsg(2)(p10), chsg(3)(q27) ve chtb(10)(q22) noktalarındaki kırık ve gapler birden fazla metafazda tespit edilmiştir.

## 5. TARTIŞMA

Akut miyeloid lösemi (AML), hematopoetik kök hücrelerin farklılaşmasındaki bozulma ile karakterize, olgunlaşmamış anormal hücrelerin aşırı birikmesi ve sağlıklı olgun kan hücrelerinin azalmasına neden olan malign bir hastalıktır (72).

Lösemilerin oluşması ve ilerlemesinde çeşitli iç ve dış faktörler etkili olmaktadır. Bu faktörlerden biri miRNA'lardır. miRNA'lar onkogen veya tümör baskılayıcı rol oynamaktadır. miRNA'ların hematopoezin yönetimiyle ilişkili olduğu ve lösemilerin patogenezinde kilit rol oynadıkları ileri sürülmektedir. miRNA düzenlenmesinin bozulması hematopoetik sistemde bozulmaya yol açar ve lösemi oluşumuna sebep olabilir (73).

Popülasyon taramalarında lösemilerin tespiti ve hastalık bulunan bireylerde hastalığın sınıflandırılması ve tedaviye karar verilebilmesi için duyarlı ve spesifik biyobelirteçlere ihtiyaç vardır. Farklı lösemi tipleri ve onların alt tipleri, belli miRNA ekspresyon profili gösterirler (74). Farklı iki araştırmacı grubu tarafından yapılan çalışmalar miRNA'ların ifadesinin genel sağkalım ve nüksüz sağkalım ile ilişkisini, lösemilerin prognozu ve lösemili hastalarda semptomların önceden tahmini için biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermiştir (75, 76).

Yapılan çalışmalarda AML ile birçok miRNA'nın ekspresyonundaki değişiklikler ilişkilendirilmiştir. F. Wang ve arkadaşları miR-142-3p ve miR-29a'nın AML'de düşük ekspresyon seviyesi ve kötü prognoz ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (77). miR-217, miR-96 ve miR-186'nın da AML'de düşük ekspresyon seviyesi gösterdiği görülmüş ve düşük tedavi yanıtı, kötü prognoz gibi sonuçlar ile ilişkilendirilmiştir (76, 78, 79). Bunun yanı sıra miR-335, miR-331 ve miR-362-5p'nin AML'de aşırı ekspresyonun olduğu gösterilmiştir (80-82). Biz de bu çalışmada yeni tanı almış ve henüz tedavi başlanmamış AML hastalarının perifer kanı ve kemik iliği materyalinde miRNA-210'un ekspresyon seviyesini inceledik.

miR210'un hedef genleri başlıca DNA hasar tamiri, hücre döngüsünün düzenlenmesi, mitokondriyal metabolizma, tümör büyümesi, apoptoz ve anjiyogenez gibi olaylarda rol oynar. Kanser tipine göre tümör baskılayıcı veya onkogen olarak görev yaptığı, yapılan çalışmalar ile desteklenmiştir (83). Onkogenik rolü; meme, baş ve

boyun, pankreas, difüz büyük B hücreli lenfoma, akciğer kanseri ve glioblastom gibi pek çok kanserde görülür, ekspresyonu sıklıkla yükselir (16, 84-86). Araştırmaların çoğu kanserli dokulardaki yüksek miR-210 seviyesinin kötü prognoz ile ilişkili olduğunu göstermiştir (87-91). Bununla birlikte, tam tersi sonuçları gösteren çalışmalar da mevcuttur (67, 84, 87, 88, 92). Bu nedenle bulguları özetlemek ve miR-210'un ekspresyonunun önemini anlamak için meta-analizlere ihtiyaç vardır.

Hematolojik malignitelerde miR-210'un rolü ile ilgili literatürde sınırlı sayıda çalışma vardır. Bu çalışmalardan biri MDS'de miR-210'un aşırı ekspresyonunun SHIP-1 (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat 5-fosfataz 1) protein ekspresyonunun kaybına yol açacak bir yolakta etkili olduğunu ve bu proteinin kaybının hastalık üzerindeki negatif etkisini göstermektedir (93). Pediatrik ALL hastalarında yapılan iki çalışmada miR-210 ekspresyon seviyesi sağlıklı bireylere göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ve kötü tedavi yanıtı ile ilişkilendirilmiştir (70, 94). Yine pediatrik ALL hastalarında yapılan bir çalışmada diğer çalışmaları destekler nitelikte bir sonuç elde edilmiş, iyi prognoz gösteren hastalarda yüksek miR-210 seviyesi tespit edilmiştir (95). Literatürde AML hastalarında miR-210'un ekspresyonunun gösterildiği tek bir çalışma bulunmuştur. Bu çalışmada AML hastalarının perifer kanı ve kemik iliği materyalindeki miR-210 ekspresyon seviyesi incelenmiştir. Elde edilen bulgular AML hastalarının miR-210 ekspresyon seviyelerinin sağlıklı kontrol grubuna göre hem serum hem de kemik iliğinde aşırı ekspresyonu görülmüştür. Serum miR-210 düzeyi ile yaş, cinsiyet, beyaz kan hücresi miktarı ve tam remisyon arasında bir ilişki bulunamamıştır. Sitogenetik bulgular ve FAB sınıflaması ile ise ilişkili olduğu bulunmuştur. Bunun yanı sıra yüksek miR-210 seviyesi görülen hastalarda genel sağ kalım oranının daha kötü olduğu ve relapsız sağ kalım oranının da daha kötü olduğu tespit edilmiştir. Bulgular miR-210'un AML için prognostik bir belirteç olabileceğini göstermiştir (96).

Bizim çalışmamızda AML hastalarının perifer kanından tespit edilen miR-210 ekspresyon seviyesi, kemik iliğinden elde edilen sonuçlara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur, fakat sağlıklı bireyler ile karşılaştırıldığında ekspresyon seviyesi artmış olmasına rağmen istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunamamıştır. Bu sonuç literatür ile tam uyumlu değildir. Bizim çalışmamızdaki sonuçlarda görülen uyumsuzluğun sebebi hasta sayısının düşük olmasından kaynaklanıyor olabilir.



BCL-2 geni, BCL-2 gen ailesinin üyesidir. BCL-2 gen ailesinin proteinleri apoptoz, farklılaşma, proliferasyon gibi çeşitli hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde etkilidir. Bu ailenin üyeleri proapoptotik ve antiapoptotik rol oynayanlar olmak üzere iki ana grupta incelenirler. BCL-2 geni ise antiapoptotik işlevi olan grupta yer alır (97). BCL-2 geninde oluşacak bir hasarın lenfoma başta olmak üzere birçok kansere neden olduğu yapılan çalışmalar ile gösterildiğinden onkogen olarak sınıflandırılır (98). Devam eden çalışmalar BCL-2 hasarının hücre ölümüne yol açtığını göstermektedir. Ayrıca BCL-2'nin kemoterapötik maddelere direnç geliştirilmesinde rol oynadığı bilinmektedir (99).

BCL-2 ekspresyonundaki değişimler birçok kanser türünde görülmektedir. BCL-2'nin aşırı ekspresyonu mesane karsinogenezinin ilk aşamasında oldukça sık görülür (100). Yapılan çalışmalarla BCL-2 ekspresyonun daha iyi prognozla ilişkili olduğu görülen kanserler; kolorektal kanser (101), küçük hücreli akciğer kanseri (102, 103), meme kanseri (104), yumuşak doku kanseri (105), yumurtalık kanseri (106) , mide kanseridir (107). Yine yapılan diğer çalışmalarla BCL-2 ekspresyonunun kötü prognoz ile ilişkili olduğu görülen kanserler; Non Hodgkin Lenfoma (108), AML (109), meme kanseri (110), prostat kanseridir (111). Ayrıca yapılan birkaç çalışmada daha önceki bulguların tersine NHL (112), ALL (113) ve küçük hücreli akciğer kanserinde (114) BCL-2 ekspresyonu ile korelasyon tespit edilememiştir. Buradan yola çıkarak farklı malignitelerde farklı BCL-2 ekspresyonu görülmesinde apoptozon yanı sıra diğer mekanizmaların da (ek genetik defektler, hormonlar, sitokinler gibi) etkili olduğunu gösterir (115).

AML'de, BCL-2'nin aşırı ekspresyonu, kemoterapiye direnç ve genel olarak düşük sağ kalım oranlarının görülmesi ilk olarak Campos ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada incelenmiştir (109). Daha sonraki yıllarda yapılan başka bir çalışmadan elde edilen veriler BCL-2'nin ekspresyonu ve hastalık üzerindeki rolü ile ilgili bazı noktalara ışık tutmuştur. İncelenen vakaların çoğunda BCL-2 ekspresyonu anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ve kötü klinik prognoz ve yoğun kemoterapi sonrası zayıf yanıt ile ilişkilendirilmiştir. Yüksek BCL-2 ekspresyon seviyesi apoptotik mekanizmanın tümörogeneze katkıda bulunduğu hipotezini destekler niteliktedir. Ayrıca BCL-2 proteinindeki anomalinin kanserli hücrelerin daha uzun süre sağ kalımına sebep olduğu, dolayısıyla beyaz kan hücrelerinde artış ile ilaç direnci ve kemoterapi yanıtını olumsuz

yönde etkilediği görülmüştür. Bunun yanı sıra deneyler sonucu elde edilen veriler BCL-2'nin fonksiyonel rolünün hücre çoğalmasını etkilemeden apoptozu bloke etmekte olduğunu düşündürmüştür (116). Bu verileri destekler nitelikte başka çalışmalar da literatürde mevcuttur (117, 118). Bizim yaptığımız çalışmada yeni tanımlı AML hastalarından alınan kemik iliği materyalindeki BCL-2 ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Ayrıca hastalardan alınan periferik kandaki BCL-2 ekspresyon seviyesi de kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Elde ettiğimiz veriler literatürdeki veriler ile uyumludur. Kemik iliği ve periferik kandaki BCL-2 ekspresyon seviyesi karşılaştırıldığında kemik iliğinde ifadesinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu da BCL-2'nin yüksek ekspresyonunun kemik iliği gibi daha fazla apoptoz gerçekleşen dokularda görülmesinden kaynaklanabilir (119). Olgularımızda kemik iliğinde daha yüksek BCL-2 ekspresyonu görülmesi bu açıdan literatürle uyumludur.

miR-210'un hedef genleri arasında, miRNA hedef genlerini gösteren veri tabanları incelendiğinde, BCL-2 bulunmamıştır. Çalışmamızda miR-210 ve BCL-2'nin AML'de korele bir artış gösterip göstermediği incelenmiştir. Literatürde bu konuyla ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında birlikte artış teorisini destekler nitelikte bir çalışmaya rastlanmıştır. Farelerde hücre kültürü ile PC12 hücre hattında nöronlar üzerinde yapılan çalışmada elde edilen veriler miR-210'un aşırı ekspresyonunun artmış BCL-2 seviyesi ile korele bir biçimde apoptozu baskıladığını göstermiştir (120). Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler AML hastalarının kemik iliğindeki BCL-2 ekspresyonu ve miR-210 ekspresyonunun yüksek oranda korele olduğunu göstermiştir. miR-210 ve dolayısıyla BCL-2'nin artması AML'de apoptozu baskılayarak lösemi hücrelerinin artmasına ve bu nedenle hastalıkta kötüye gidiş olması teorisini doğrular niteliktedir. Bu mekanizmanın daha net aydınlatılabilmesi için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

AML'nin prognozunda sitogenetik bulgular oldukça önemli rol oynamaktadır. AML hastalarında yapılan bir çalışmada sadece +21'in varlığı veya ek anomalilerle birlikte +21'in varlığı kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur. Özellikle sadece +21'in olduğu 60 yaş üzeri AML hastaları için daha kötü bir prognoz öngörülmüştür (121). Bizim çalışmamızda bir hastada klonal +21 bulgusuna rastlanmıştır. Ayrıca bu hastada başka sayısal kromozom anomalileri de görülmüştür. Bulgularımız literatürle uyumlu

olmakla birlikte, hastamızın yaşının 84 olması, 60 yaş üzeri hastalarda kötü prognoz öngörüsünü destekler niteliktedir.

Yapılan çalışmalarda AML-M2 alt tipi görülen hastaların %92'sinde ve bazı AML-M4 alt tipine sahip hastalarda t(8;21)(q22;q22) translokasyonuna rastlanmıştır (122). Bizim çalışmamızda 1 hasta M2 ve 2 hasta M4 alt tipine sahiptir. Fakat bu hastalarda t(8;21)(q22;q22) bulgusuna rastlanmamıştır.

Çalışmamızda incelenen 3 hastanın kemik iliği materyalinde 21 numaralı kromozomun monozomisine klonal olarak rastlanmıştır. Fakat -21 bulgusu tek başına değil birkaç sayısal kromozom anomalisi ile birlikte görülmüştür. Literatürde AML'de ve diğer hematolojik hastalıklarda (MM ve MDS gibi) yalnız -21'in monozomisinin görüldüğü vakalar mevcuttur (123). Bir makalede MDS'de 21 numaralı kromozomun kaybı ya da artışının orta seviyede bir prognoza sebep olacağı öngörülmüştür (124). MDS AML'ye dönüşme potansiyeli olan bir hematolojik hastalıktır. Bu nedenle bizim çalışmamızda incelenen vakalarda görülen -21 anomalisi prognoz açısından anlamlı olabilir.

Literatürden elde edilen verilere göre monozomi ve kompleks karyotipe sahip olan hastalar kötü prognoz ile ilişkilidir. Kötü prognoz veya kompleks karyotipe sahip olan hastalardan monozomi karyotipine sahip olan hastalar, olmayan hastalara göre daha kötü prognoza sahip olurlar. Daha önce yapılmış olan çalışmalardan elde edilen verilere göre -17, -5, -7, -21, -8, -22 numaralı kromozomlar monozomisi en sık görülen kromozomlardır (125). Çalışmamızda bazı vakalarda -5, -8, -21 ve -22 kromozomlarının monozomisine rastlanmıştır. Bu vakalarda hem monozomi karyotipi hem de kompleks karyotip tespit edilmiştir. Özellikle bir vakada hastalık tanıdan çok kısa bir süre sonra hızla ilerlemiş, hastaneye yatış ve ardından ölümlü sonuçlanmıştır. Bu hastada kötü prognoz beliteci olan monozomi karyotipi (- 8 monozomisi de mevcut) ve kompleks karyotip bulguları birarada görülmektedir. Aynı zamanda hasta 60 yaş üzerinde olduğundan 60 yaş üzeri AML hastalarında kötü prognoz görülmesi savını desteklemektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda AML'de kemik iliği materyalinde miR-210 ve BCL-2 artmış ekspresyon seviyeleri görülmüş ve bu artışın korele gerçekleştiğini gösteren bulgular elde edilmiştir. Bu artışın apoptoz mekanizmasında bozulmaya sebep olabileceği ve prognoz üzerindeki olumsuz etkileri olabileceği sonucuna varılmıştır.

Ayrıca elde ettiğimiz veriler sonucunda miR-210 ve BCL-2'nin ekspresyonlarının AML hastalığı için biyobelirteç olarak kullanımının faydalı olabileceği kanısındayız. Bunun yanı sıra elde edilen sitogenetik bulguların da prognoz değerlendirmesi açısından faydalı olacağını düşünmekteyiz. Özellikle AML'de miR-210 ve BCL-2'nin apoptoz yolağı üzerindeki etkilerinin ve bu mekanizmanın aydınlatılması ve kesin sonuçlar elde edilebilmesi için daha fazla örnek sayısına ve daha geniş kapsamlı testlere ihtiyaç olduğu kanısındayız.



## KAYNAKLAR

1. Shipley JL, Butera JN. Acute myelogenous leukemia. *Exp Hematol.* 2009;37(6):649-58.
2. Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *The Lancet.* 2006;368(9550):1894-907.
3. Mughal TI. *Understanding Leukemias, Lymphomas and Myelomas*: CRC Press; 2017.
4. Ferrara F, Schiffer CA. Acute myeloid leukaemia in adults. *The Lancet.* 2013;381(9865):484-95.
5. Dray N. *Harrison's Hematology and Oncology. The Yale Journal of Biology and Medicine.* 2011;84(1):64-.
6. Estey EH, Faderl SH, Kantarjian HM. *Hematologic Malignancies: Acute Leukemias*: Springer Berlin Heidelberg; 2007.
7. Yohe S. Molecular Genetic Markers in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Med.* 2015;4(3):460-78.
8. Mrozek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev.* 2004;18(2):115-36.
9. Gao HY, Wang W, Luo XG, Jiang YF, He X, Xu P, et al. Screening of prognostic risk microRNAs for acute myeloid leukemia. *Hematology.* 2018;23(10):747-55.
10. Harrandah AM, Mora RA, Chan EKL. Emerging microRNAs in cancer diagnosis, progression, and immune surveillance. *Cancer letters.* 2018;438:126-32.
11. Tang X, Chen L, Yan X, Li Y, Xiong Y, Zhou X. Overexpression of miR-210 is Associated with Poor Prognosis of Acute Myeloid Leukemia. *Medical Science Monitor.* 2015;21:3427-33.
12. Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ.* 2018;25(1):65-80.
13. Irvine AE, McMullin MF, Ong YL. Bcl-2 family members as prognostic indicators in AML. *Hematology.* 2002;7(1):21-31.
14. Campos L, Rouault J, Sabido O, Oriol P, Roubi N, Vasselon C, et al. High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood.* 1993;81(11):3091-6.
15. Wojcik I, Szybka M, Golanska E, Rieske P, Blonski JZ, Robak T, et al. Abnormalities of the P53, MDM2, BCL2 and BAX genes in acute leukemias. *Neoplasma.* 2005;52(4):318-24.
16. Qin Q, Furong W, Baosheng L. Multiple functions of hypoxia-regulated miR-210 in cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2014;33:50.
17. Konieczny J, Arranz L. Updates on Old and Weary Haematopoiesis. *International journal of molecular sciences.* 2018;19(9).
18. Lodish HF. *Molecular Cell Biology* 6 Ed: W. H. Freeman and Company; 2008.
19. Munker R, Hiller E, Glass J, Paquette R. *Modern hematology: biology and clinical management*: Springer Science & Business Media; 2007.
20. Heim S, Mitelman F. *Cancer Cytogenetics: Chromosomal and Molecular Genetic Aberrations of Tumor Cells*: Wiley; 2015.
21. Fortina P, Londin E, Park JY, Kricka LJ. *Acute myeloid leukemia : methods and protocols.* 2017.

22. Arber DA, Glader B, List AF, Means RT, Paraskevas F, Rodgers GM. *Wintrobe's clinical hematology*: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
23. Kaushansky K, Lichtman MA, Prchal JT, Levi M, Press OW, Burns LJ, et al. *Williams hematology*: McGraw-Hill Education; 2016.
24. Andreeff M. *Targeted Therapy of Acute Myeloid Leukemia*: Springer New York; 2016.
25. Saba HI, Mufti G. *Advances in Malignant Hematology*: Wiley; 2011.
26. Greer JP, Arber DA, Glader B, List AF, Means RT, Paraskevas F, et al. *Wintrobe's Clinical Hematology*: Wolters Kluwer Health; 2013.
27. Karp JE. *Acute Myelogenous Leukemia*: Humana Press; 2009.
28. Mayer RJ, Davis RB, Schiffer CA, Berg DT, Powell BL, Schulman P, et al. Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. *Cancer and Leukemia Group B. The New England journal of medicine*. 1994;331(14):896-903.
29. Zittoun RA, Mandelli F, Willemze R, de Witte T, Labar B, Resegotti L, et al. Autologous or allogeneic bone marrow transplantation compared with intensive chemotherapy in acute myelogenous leukemia. *European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) and the Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) Leukemia Cooperative Groups. The New England journal of medicine*. 1995;332(4):217-23.
30. Cassileth PA, Harrington DP, Appelbaum FR, Lazarus HM, Rowe JM, Paietta E, et al. Chemotherapy compared with autologous or allogeneic bone marrow transplantation in the management of acute myeloid leukemia in first remission. *The New England journal of medicine*. 1998;339(23):1649-56.
31. Wheatley K, Burnett AK, Goldstone AH, Gray RG, Hann IM, Harrison CJ, et al. A simple, robust, validated and highly predictive index for the determination of risk-directed therapy in acute myeloid leukaemia derived from the MRC AML 10 trial. *United Kingdom Medical Research Council's Adult and Childhood Leukaemia Working Parties. British journal of haematology*. 1999;107(1):69-79.
32. Sekeres MA, Kalacyio M, Bolwell B. *Clinical Malignant Hematology*: McGraw-Hill Education; 2007.
33. Dohner K, Dohner H. Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2008;93(7):976-82.
34. Whitman SP, Archer KJ, Feng L, Baldus C, Becknell B, Carlson BD, et al. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study. *Cancer research*. 2001;61(19):7233-9.
35. DiNardo CD, Cortes JE. Mutations in AML: prognostic and therapeutic implications. *Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2016;2016(1):348-55.
36. Dohner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rucker FG, Corbacioglu A, et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood*. 2005;106(12):3740-6.
37. Martelli MP, Sportoletti P, Tiacci E, Martelli MF, Falini B. Mutational landscape of AML with normal cytogenetics: biological and clinical implications. *Blood Rev*. 2013;27(1):13-22.
38. Li HY, Deng DH, Huang Y, Ye FH, Huang LL, Xiao Q, et al. Favorable prognosis of biallelic CEBPA gene mutations in acute myeloid leukemia patients: a meta-analysis. *European journal of haematology*. 2015;94(5):439-48.

39. Noguera NI, Breccia M, Divona M, Diverio D, Costa V, De Santis S, et al. Alterations of the FLT3 gene in acute promyelocytic leukemia: association with diagnostic characteristics and analysis of clinical outcome in patients treated with the Italian AIDA protocol. *Leukemia*. 2002;16(11):2185-9.
40. Care RS, Valk PJ, Goodeve AC, Abu-Duhier FM, Geertsma-Kleinekoort WM, Wilson GA, et al. Incidence and prognosis of c-KIT and FLT3 mutations in core binding factor (CBF) acute myeloid leukaemias. *British journal of haematology*. 2003;121(5):775-7.
41. Ibrahem L, Mahfouz R, Elhelw L, Abdsalam EM, Soliman R. Prognostic significance of DNMT3A mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Blood cells, molecules & diseases*. 2015;54(1):84-9.
42. Patel JP, Gonen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2012;366(12):1079-89.
43. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*. 1972;26(4):239-57.
44. Sperandio S, de Belle I, Bredesen DE. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(26):14376-81.
45. Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology*. 2003;15(6):725-31.
46. Zaman S, Wang R, Gandhi V. Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma*. 2014;55(9):1980-92.
47. Ouyang Y-B, Giffard RG. Cellular neuroprotective mechanisms in cerebral ischemia: Bcl-2 family proteins and protection of mitochondrial function. *Cell Calcium*. 2004;36(3):303-11.
48. Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science*. 1985;229(4720):1390-3.
49. Sengupta P, Chattopadhyay S, Chatterjee S. G-Quadruplex surveillance in BCL-2 gene: a promising therapeutic intervention in cancer treatment. *Drug Discov Today*. 2017;22(8):1165-86.
50. Deng G, Lane C, Kornblau S, Goodacre A, Snell V, Andreeff M, et al. Ratio of bcl-xshort to bcl-xlong is different in good- and poor-prognosis subsets of acute myeloid leukemia. *Molecular Medicine*. 1998;4(3):158-64.
51. Gustafson D, Tyryshkin K, Renwick N. microRNA-guided diagnostics in clinical samples. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2016;30(5):563-75.
52. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-54.
53. Hammond SM. An overview of microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;87:3-14.
54. Pillai RS. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA*. 2005;11(12):1753-61.
55. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425(6956):415-9.
56. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2009;10(2):126-39.

57. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 2004;303(5654):95-8.
58. Karaboz I CC. Antisens teknolojisi. *Or-lab on-line Mikrobiyo Der* 2007;5 (2):( ):14-30.
59. HİTİT M, Kurar E, GÜZeloĞLu A. MikroRNA Biyogenezi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*. 2015;10(3).
60. Xing Z, Li D, Yang L, Xi Y, Su X. MicroRNAs and anticancer drugs. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2014;46(3):233-9.
61. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15524-9.
62. Zhu C, Wang Y, Kuai W, Sun X, Chen H, Hong Z. Prognostic value of miR-29a expression in pediatric acute myeloid leukemia. *Clinical biochemistry*. 2013;46(1-2):49-53.
63. Chen XX, Lin J, Qian J, Qian W, Yang J, Ma JC, et al. Dysregulation of miR-124-1 predicts favorable prognosis in acute myeloid leukemia. *Clinical biochemistry*. 2014;47(1-2):63-6.
64. Qian J, Lin J, Qian W, Ma JC, Qian SX, Li Y, et al. Overexpression of miR-378 is frequent and may affect treatment outcomes in patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia research*. 2013;37(7):765-8.
65. Dixon-McIver A, East P, Mein CA, Cazier JB, Molloy G, Chaplin T, et al. Distinctive patterns of microRNA expression associated with karyotype in acute myeloid leukaemia. *PLoS One*. 2008;3(5):e2141.
66. Marcucci G, Mrozek K, Radmacher MD, Garzon R, Bloomfield CD. The prognostic and functional role of microRNAs in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2011;117(4):1121-9.
67. Giannakakis A, Sandaltzopoulos R, Greshock J, Liang S, Huang J, Hasegawa K, et al. miR-210 links hypoxia with cell cycle regulation and is deleted in human epithelial ovarian cancer. *Cancer biology & therapy*. 2008;7(2):255-64.
68. Dang K, Myers KA. The role of hypoxia-induced miR-210 in cancer progression. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(3):6353-72.
69. Gee HE, Ivan C, Calin GA, Ivan M. HypoxamiRs and cancer: from biology to targeted therapy. *Antioxid Redox Signal*. 2014;21(8):1220-38.
70. Mei Y, Gao C, Wang K, Cui L, Li W, Zhao X, et al. Effect of microRNA-210 on prognosis and response to chemotherapeutic drugs in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Sci*. 2014;105(4):463-72.
71. Chio CC, Lin JW, Cheng HA, Chiu WT, Wang YH, Wang JJ, et al. MicroRNA-210 targets antiapoptotic Bcl-2 expression and mediates hypoxia-induced apoptosis of neuroblastoma cells. *Arch Toxicol*. 2013;87(3):459-68.
72. Luppi M, Fabbiano F, Visani G, Martinelli G, Venditti A. Novel Agents for Acute Myeloid Leukemia. *Cancers*. 2018;10(11):429.
73. Fathollahzadeh S, Mirzaei H, Honardoost MA, Sahebkar A, Salehi M. Circulating microRNA-192 as a diagnostic biomarker in human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer gene therapy*. 2016;23(10):327-32.
74. Mi S, Lu J, Sun M, Li Z, Zhang H, Neilly MB, et al. MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(50):19971-6.



75. Yingchun L, Rong Z, Kun Y, Ying Y, Zhuogang L. Bone Marrow MicroRNA-335 Level Predicts the Chemotherapy Response and Prognosis of Adult Acute Myeloid Leukemia. *Medicine*. 2015;94(33):e0986.
76. Zhao J, Lu Q, Zhu J, Fu J, Chen YX. Prognostic value of miR-96 in patients with acute myeloid leukemia. *Diagnostic pathology*. 2014;9:76.
77. Wang F, Wang XS, Yang GH, Zhai PF, Xiao Z, Xia LY, et al. miR-29a and miR-142-3p downregulation and diagnostic implication in human acute myeloid leukemia. *Molecular biology reports*. 2012;39(3):2713-22.
78. Yan J, Wu G, Chen J, Xiong L, Chen G, Li P. Downregulated miR-217 expression predicts a poor outcome in acute myeloid leukemia. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*. 2018;22(1):73-8.
79. Zhang TJ, Wang YX, Yang DQ, Yao DM, Yang L, Zhou JD, et al. Down-Regulation of miR-186 Correlates with Poor Survival in de novo Acute Myeloid Leukemia. *Clinical laboratory*. 2016;62(1-2):113-20.
80. Lin X, Wang Z, Zhang R, Feng W. High serum microRNA-335 level predicts aggressive tumor progression and unfavorable prognosis in pediatric acute myeloid leukemia. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*. 2015;17(5):358-64.
81. Butrym A, Rybka J, Baczynska D, Tukiendorf A, Kuliczowski K, Mazur G. Expression of microRNA-331 can be used as a predictor for response to therapy and survival in acute myeloid leukemia patients. *Biomarkers in medicine*. 2015;9(5):453-60.
82. Ma QL, Wang JH, Yang M, Wang HP, Jin J. MiR-362-5p as a novel prognostic predictor of cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Journal of translational medicine*. 2018;16(1):68.
83. Huang X, Le QT, Giaccia AJ. MiR-210--micromanager of the hypoxia pathway. *Trends in molecular medicine*. 2010;16(5):230-7.
84. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *British journal of haematology*. 2008;141(5):672-5.
85. Wang J, Zhao J, Shi M, Ding Y, Sun H, Yuan F, et al. Elevated expression of miR-210 predicts poor survival of cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2014;9(2):e89223.
86. Malzkorn B, Wolter M, Liesenberg F, Grzendowski M, Stuhler K, Meyer HE, et al. Identification and functional characterization of microRNAs involved in the malignant progression of gliomas. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. 2010;20(3):539-50.
87. Camps C, Buffa FM, Colella S, Moore J, Sotiriou C, Sheldon H, et al. hsa-miR-210 Is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(5):1340-8.
88. Gee HE, Camps C, Buffa FM, Patiar S, Winter SC, Betts G, et al. hsa-mir-210 is a marker of tumor hypoxia and a prognostic factor in head and neck cancer. *Cancer*. 2010;116(9):2148-58.
89. Ho AS, Huang X, Cao H, Christman-Skieller C, Bennewith K, Le QT, et al. Circulating miR-210 as a Novel Hypoxia Marker in Pancreatic Cancer. *Translational oncology*. 2010;3(2):109-13.

90. Zhao A, Li G, Peoc'h M, Genin C, Gigante M. Serum miR-210 as a novel biomarker for molecular diagnosis of clear cell renal cell carcinoma. *Experimental and molecular pathology*. 2013;94(1):115-20.
91. Qiu S, Lin S, Hu D, Feng Y, Tan Y, Peng Y. Interactions of miR-323/miR-326/miR-329 and miR-130a/miR-155/miR-210 as prognostic indicators for clinical outcome of glioblastoma patients. *Journal of translational medicine*. 2013;11:10.
92. McCormick RI, Blick C, Ragoussis J, Schoedel J, Mole DR, Young AC, et al. miR-210 is a target of hypoxia-inducible factors 1 and 2 in renal cancer, regulates ISCU and correlates with good prognosis. *British journal of cancer*. 2013;108(5):1133-42.
93. Lee DW, Futami M, Carroll M, Feng Y, Wang Z, Fernandez M, et al. Loss of SHIP-1 protein expression in high-risk myelodysplastic syndromes is associated with miR-210 and miR-155. *Oncogene*. 2012;31:4085.
94. Mei Y, Li Z, Zhang Y, Zhang W, Hu H, Zhang P, et al. Low miR-210 and CASP8AP2 expression is associated with a poor outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Oncology letters*. 2017;14(6):8072-7.
95. Mei YY, Li ZG, Zhang Y, Zhang WL, Zhang PW, Wang N, et al. [Prognostic Significance of Joint Detection of miR-210 and Minimal Residual Disease in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia]. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi*. 2017;25(1):66-71.
96. Tang X, Chen L, Yan X, Li Y, Xiong Y, Zhou X. Overexpression of miR-210 is Associated with Poor Prognosis of Acute Myeloid Leukemia. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2015;21:3427-33.
97. Lisachev PD, Pustyl'nyak VO, Shtark MB. Expression of Bcl2 family genes in the early phase of long-term potentiation. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2014;158(1):77-9.
98. Reed JC. Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood*. 2008;111(7):3322-30.
99. Thomas S, Quinn BA, Das SK, Dash R, Emdad L, Dasgupta S, et al. Targeting the Bcl-2 family for cancer therapy. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2013;17(1):61-75.
100. Gazzaniga P, Gallucci M, Gradilone A, Gandini O, Vincenzoni A, Gianni W, et al. Detection of BCL-2 RNA in low grade tumours of the urinary bladder. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 1995;31a(12):2119-20.
101. Leahy DT, Mulcahy HE, O'Donoghue DP, Parfrey NA. bcl-2 protein expression is associated with better prognosis in colorectal cancer. *Histopathology*. 1999;35(4):360-7.
102. Ishida H, Irie K, Itoh T, Furukawa T, Tokunaga O. The prognostic significance of p53 and bcl-2 expression in lung adenocarcinoma and its correlation with Ki-67 growth fraction. *Cancer*. 1997;80(6):1034-45.
103. Manne U, Myers RB, Moron C, Poczatek RB, Dillard S, Weiss H, et al. Prognostic significance of Bcl-2 expression and p53 nuclear accumulation in colorectal adenocarcinoma. *International journal of cancer*. 1997;74(3):346-58.
104. Joensuu H, Pylkkanen L, Toikkanen S. Bcl-2 protein expression and long-term survival in breast cancer. *The American journal of pathology*. 1994;145(5):1191-8.
105. Nakanishi H, Ohsawa M, Naka N, Uchida A, Ochi T, Aozasa K. Immunohistochemical detection of bcl-2 and p53 proteins and apoptosis in soft tissue sarcoma: their correlations with prognosis. *Oncology*. 1997;54(3):238-44.
106. Henriksen R, Wilander E, Oberg K. Expression and prognostic significance of Bcl-2 in ovarian tumours. *British journal of cancer*. 1995;72(5):1324.

107. Aizawa K, Ueki K, Suzuki S, Yabusaki H, Kanda T, Nishimaki T, et al. Apoptosis and Bcl-2 expression in gastric carcinomas: correlation with clinicopathological variables, p53 expression, cell proliferation and prognosis. *International journal of oncology*. 1999;14(1):85-176.
108. Hermine O, Haioun C, Lepage E, d'Agay MF, Briere J, Lavignac C, et al. Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). Blood*. 1996;87(1):265-72.
109. Campos L, Rouault JP, Sabido O, Oriol P, Roubi N, Vasselon C, et al. High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood*. 1993;81(11):3091-6.
110. Sierra A, Lloveras B, Castellsague X, Moreno L, Garcia-Ramirez M, Fabra A. Bcl-2 expression is associated with lymph node metastasis in human ductal breast carcinoma. *International journal of cancer*. 1995;60(1):54-60.
111. Bubendorf L, Sauter G, Moch H, Jordan P, Blochlinger A, Gasser TC, et al. Prognostic significance of Bcl-2 in clinically localized prostate cancer. *The American journal of pathology*. 1996;148(5):1557-65.
112. Logsdon MD, Meyn RE, Jr., Besa PC, Pugh WC, Stephens LC, Peters LJ, et al. Apoptosis and the Bcl-2 gene family -- patterns of expression and prognostic value in stage I and II follicular center lymphoma. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1999;44(1):19-29.
113. Coustan-Smith E, Kitanaka A, Pui CH, McNinch L, Evans WE, Raimondi SC, et al. Clinical relevance of BCL-2 overexpression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1996;87(3):1140-6.
114. Pezzella F, Turley H, Kuzu I, Tunjekar MF, Dunnill MS, Pierce CB, et al. bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma. *The New England journal of medicine*. 1993;329(10):690-4.
115. Papakonstantinou G, Verbeke C, Hastka J, Bohrer M, Hehlmann R. bcl-2 expression in non-Hodgkin's lymphomas is not associated with bcl-2 gene rearrangements. *British journal of haematology*. 2001;113(2):383-90.
116. Zhou J, Chen Y, Li C, Liu W. The protein expression of Bcl-2, Bax, Fas/Apo-1 in acute myeloid leukemia. *Journal of Tongji Medical University = Tong ji yi ke da xue xue bao*. 1998;18(1):42-5.
117. Mehta SV, Shukla SN, Vora HH. Overexpression of Bcl2 protein predicts chemoresistance in acute myeloid leukemia: its correlation with FLT3. *Neoplasma*. 2013;60(6):666-75.
118. Del Poeta G, Venditti A, Del Principe MI, Maurillo L, Buccisano F, Tamburini A, et al. Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2003;101(6):2125-31.
119. Yogarajah M, Stone RM. A concise review of BCL-2 inhibition in acute myeloid leukemia. *Expert review of hematology*. 2018;11(2):145-54.
120. Qiu J, Zhou XY, Zhou XG, Cheng R, Liu HY, Li Y. Neuroprotective effects of microRNA-210 against oxygen-glucose deprivation through inhibition of apoptosis in PC12 cells. *Molecular medicine reports*. 2013;7(6):1955-9.
121. Lu Y, Yuan J, Wang H, Pei R, Chen Z, Jin J. [Clinical features and prognosis of acute myeloid leukemia with acquired trisomy 21]. *Zhonghua yi xue yi chuan xue za zhi = Zhonghua yixue yichuanxue zazhi = Chinese journal of medical genetics*. 2017;34(4):554-8.

122. Kumari P, LingappaKavitha B, Obula Reddy C, Mangalagowri M, Madhumathi DS, Mahadeva Prasad M, et al. A rare cytogenetic presentation of acute myeloid leukemia (AML-M2). *Acta medica Iranica*. 2012;50(12):827-30.
123. Freitas PC, Carvalho-Salles AB, Mendiburu CF, Ricci O, Jr., Fett-Conte AC. Clonal monosomy of chromosome 21 in a case of myelodysplastic syndrome. *Genetics and molecular research : GMR*. 2011;10(4):2718-20.
124. Bacher U, Schanz J, Braulke F, Haase D. Rare cytogenetic abnormalities in myelodysplastic syndromes. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*. 2015;7(1):e2015034.
125. Li Z, Wei H, Lin D, Zhou CL, Liu BC, Wang Y, et al. [Cytogenetic and prognostic characteristic of acute myeloid leukemia with monosomal karyotype]. *Zhonghua xue ye xue za zhi = Zhonghua xueyexue zazhi*. 2016;37(5):366-71.



## ETİK KURUL KARARI

Tarih ve Sayı: 07/09/2016-327301



T.C.  
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI  
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu



Sayı :83045809-604.01.02-  
Konu :Yüks.Lis.Öğr.Handenur Göktaş'ın  
etik kurul kararı

## TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

İlgi : 22.08.2016 tarih, 66018902-050.99-308118 sayılı yazı

Anabilim Dalınız öğretim üyesi Prof.Dr.Ayhan DEVİREN'in danışmanlığında Yüksek Lisans Öğrencisi Handenur GÖKTAN'ın yürütücülüğünde Uzm.Dr.Ayşe SALİHOĞLU'nun yardımcılığında "Akut Miyeloid Lösemi Hastalarında MiroRNA-210 ve BCL-2 Ekspresyon Seviyelerinin Sitogenetik Bulguları ile Karşılaştırılması" başlıklı Yüksek Lisans Tezinin (Araştırma Fonu) Prof.Dr.Ayhan DEVİREN'in işlerinin yoğunluğu nedeniyle tez danışmanlığına Doç.Dr.Duygu Gezen AK 'ın getirilmesi hakkında ilgi yazınız ve ekleri 06 Eylül 2016 tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup; etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-İmza  
Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR  
Başkan

[Doğrulamak için:http://194.27.128.66/envision.Sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BEL5L4634](http://194.27.128.66/envision.Sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BEL5L4634)

Ayrıntılı bilgi için irtibat : Güler SOYDANER Dahili : 22300

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa/ İSTANBUL

Tel : 0 (212) 414 30 00 21107- 21108 Fax : 0 (212) 632 00 33

e-posta : ctfpersonel@istanbul.edu.tr Elektronik Ağ : www.istanbul.edu.tr

**İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI****AKUT MİYELOİD LÖSEMİ HASTALARINDA MİKRORNA-210  
VE BCL-2 EKSPRESYON SEVİYELERİNİN SİTOGENETİK  
BULGULARI İLE KARŞILAŞTIRILMASI****ORJİNALLİK RAPORU****%3**

BENZERLİK ENDEKSİ

**%2**İNTERNET  
KAYNAKLARI**%1**

YAYINLAR

**%1**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

**TÜM KAYNAKLARI EŞLEŞTİR ( SADECE SEÇİLİ OLAN KAYNAĞI YAZDIR)**

%1

★ Submitted to Istanbul University

Öğrenci Ödevi

Alıntıları çıkart

üzerinde

Eşleşmeleri çıkar

&lt; 5 words

Bibliyografyayı Çıkart

üzerinde

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Handenur	<b>Soyadı</b>	Göktan
<b>Doğ.Yeri</b>	Ankara	<b>Doğ.Tar.</b>	02.08.1992
<b>Uyruğu</b>	TC	<b>TC Kim No</b>	19511181580
<b>Email</b>	handenurgoktan@hotmail.com.tr	<b>Tel</b>	+90 537 736 86 86

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Doktora</b>		
<b>Yük.Lis.</b>		
<b>Lisans</b>	Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü (Yan Dal)	2014
<b>Lise</b>	Vehbi Koç Vakfı Lisesi	2010

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Klinik Araştırma Saha Görevlisi	Monitor Medikal Araştırma ve Danışmanlık TİC. LTD	2017-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi	71,250	

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok İyi

### Yayımları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

**Özel İlgil Alanları (Hobileri):** Kitap okumak, müzik dinlemek, seyahat etmek.

