



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



AKUT MYELOİD LÖSEMİ (AML)
HASTALARINDA t(8;21) ve FLT3 MUTASYON
SIKLIĞI

Zeynep ÇELİK FIRAT
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOKİMYA Anabilim Dalı

Temmuz-2024
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AKUT MYELOİD LÖSEMİ (AML) HASTALARINDA t(8;21) ve FLT3 MUTASYON SIKLIĞI

Zeynep ÇELİK FIRAT

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyokimya Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Fatma ZİLİFDAR FOTO
Doç. Dr. Haktan Bağış ERDEM

2024, 68 Sayfa

Jüri

Dr. Öğr. Üyesi Fatma ZİLİFDAR FOTO
Doç. Dr. Emre ASLAN
Doç. Dr. Suray PEHLİVANOĞLU

Akut Myeloid Lösemi(AML); hematopoetik blast hücrelerinde tekrarlayan genetik, epigenetik ve metabolik anomalilikler ile karakterize heterojen bir malignitedir. AML'de en sık görülen genetik değişikliklerde t(15;17), t(8;21), inv16 çok sıklıkla tekrarlayan genetik anomalilikler olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu translokasyon değişimlerine eşlik eden en sık moleküler değişikliklerden biri de FLT3 mutasyonudur. Bu retrospektif çalışmada AML tanısı alan hastalardaki t(8;21) ve FLT3 mutasyonlarının görülme sıklığının araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada, 2022-2023 yılları arasında Ankara Etlik Şehir Hastanesi Tıbbi Genetik ve Hematoloji polikliniklerine başvurup Tıbbi Genetik laboratuvarına yönlendirilen AML ön tanılı 424 hasta yer aldı. FLT3 mutasyonu için Fragman analizi ve t(8;21) için ise RT-PCR yöntemi kullanılarak sonuçlar geriye dönük biçimde incelendi. Elde edilen sonuçlar ışığında mutasyon sıklığına dair istatistiksel değerlendirmeler yapıldı.

Yapılan retrospektif araştırmada 424 AML ön tanılı hastaların 283'ünde FLT3 mutasyonu, 299'unda ise t(8;21) incelendi. RT-PCR kullanılarak yapılan t(8;21) taraması sonucunda 20 (%6,68) hastada mutasyon saptanırken Fragman analizi kullanılarak yapılan FLT3 taraması sonucunda ise 32 (%11,3) hastada mutasyon saptandı. FLT3 mutasyonu saptanan 32 hastanın 22'sinde (%7,77) FLT3-ITD, 10'unda (%3,53) ise FLT3-TKD/D835 nokta mutasyonu görüldü. Tüm AML hastalarında erkekler daha yüksek sıklıkta bulunmasına karşın kadın:erkek oranının 1:0,9 gibi ufak bir farklılıkta olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte değerlendirilen AML grubunda FLT3 mutasyonlarının kadınlarda, t(8,21) mutasyonlarının ise erkeklerde daha yüksek sıklıkta görüldüğü tespit edilmiştir.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlarla her iki mutasyon tipi için saptanan pozitifliğin lösemi tanısı alan hastalarda göz ardı edilemeyecek düzeyde olduğu görülmüştür. Kötü prognozda yer alan FLT3 mutasyonunun iyi prognozdaki t(8;21) mutasyonuna göre daha sıklıkla pozitif sonuçlarda karşımıza çıktığı saptanmıştır. Yeni tanılı AML hastalarında tedavi hedefi olmasından ötürü FLT3 testinde diğer moleküler ve sitogenetik yöntemlere kıyasla Fragman analizi kullanılarak hastalık müdahalesinde gerekli 72 saat hedefi için en hızlı ve spesifik sonucun klinisyende olması sağlanabilir.

Anahtar Kelimeler : Akut Myeloid Lösemi(AML), FLT3-ITD, FLT3-TKD, Fragman Analizi, RT-PCR, t(8;21)

ABSTRACT

MS THESIS

T(8;21) and FLT3 MUTATION FREQUENCY in PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA (AML)

Zeynep ÇELİK FIRAT

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN BIOCHEMISTRY**

**Advisor: Dr. Öğr. Üyesi Fatma ZİLİFDAR FOTO
Doç. Dr. Haktan Bağış ERDEM**

2024, 68 Pages

Jury

**Dr. Öğr. Üyesi Fatma ZİLİFDAR FOTO
Doç. Dr. Emre ASLAN
Doç. Dr. Suray PEHLİVANOĞLU**

Acute Myeloid Leukemia (AML) is a heterogeneous malignancy characterized by recurrent genetic, epigenetic, and metabolic abnormalities in hematopoietic blast cells. Among the most common genetic alterations in AML are t(15;17), t(8;21), and inv16, which frequently recur. One of the most frequent molecular changes accompanying these translocation changes is the FLT3 mutation. This retrospective study aimed to investigate the frequency of t(8;21) and FLT3 mutations in patients diagnosed with AML.

The study included 424 patients with a preliminary diagnosis of AML who applied to the Medical Genetics and Hematology outpatient clinics of Ankara Etlik City Hospital between 2022 and 2023 and were referred to the Medical Genetics laboratory. Fragment sequencing was used for FLT3 mutation analysis, and RT-PCR was used for t(8;21) analysis. The results were retrospectively reviewed, and statistical evaluations were made regarding the frequency of mutations.

In the retrospective study, FLT3 mutation was examined in 283 and t(8;21) in 299 of 424 patients with pre-diagnosis of AML. While mutation was detected in 20 (6.68%) patients as a result of t(8;21) screening performed using RT-PCR, mutation was detected in 32 (11.3%) patients as a result of FLT3 screening performed using Fragment sequencing analysis. FLT3-ITD was seen in 22 (7.77%) of 32 patients with FLT3 mutation and FLT3-TKD/D835 point mutation was seen in 10 (3.53%). Although males were found to be more frequent in all AML patients, it was found that the female:male ratio was found to be a small difference of 1:0.9. However, it was determined that FLT3 mutations were seen more frequently in females and t(8;21) mutations were seen more frequently in males in the evaluated AML group.

The results of our study indicate that the 12.3% positivity rate found is significant and cannot be ignored in patients diagnosed with leukemia. It was observed that the FLT3 mutation, associated with poor prognosis, appeared more frequently in positive results compared to the t(8;21) mutation, which is associated with good prognosis. Due to the treatment target in newly diagnosed AML patients, using Fragment sequencing for FLT3 testing compared to other molecular and cytogenetic methods can provide the clinician with the fastest and most specific result necessary for the 72-hour intervention target.

Keywords: Acute Myeloid Leukemia (AML), FLT3-ITD, FLT3-TKD, Fragment Sequencing, RT-PCR, t(8;21)

ÖNSÖZ

Bir şey yaparken temele aldığım tek kriter; "Ne yaparsam Allah'ın rızasına mazhar olabilirim?". Niyetim hâlis olduğu zaman Rabbim elimi hiç boş döndürmedi elhamdulillah. Yıllar önce kurulan hayallerimin ve aldığım niyetlerimin zorlu çıkışlarının sonunda açılan aydınlık kapıya atılan ilk imza...

Bu sancılı süreçte danışmanlığımı yapan, destek ve bilgisini esirgemeyen, her koşulda öneri ve eleştirileri ile bana yön veren, inancı ve güleryüzü ile yol gösteren kıymetli danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Fatma ZİLİFDAR FOTO'ya;

Hem çalışma hem de yüksek lisans hayatım devam ederken gelişimime katkı sağlayıp pratik anlamda birçok imkanla tecrübe kazanmama ve bilgileriyle maddi sevgi dolu destekleriyle manevi yardımlarını esirgemeyen başta Ankara Etlik Şehir Hastanesi Techno Health ailesi ve Nalan DOKUMACI'ya, Tıbbi Genetik Birimi eğitim sorumlusu aynı zamanda eş danışmanlığımı kabul eden kıymetli hocam Doç. Dr. Haktan Bağış ERDEM'e, Genetik Laboratuvarı şefim ve ablam Merve Ulak'a, ekibimin güzide çalışanlarına;

Bütün eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen yolumu hep aydınlatan en değerlim annem Bircan ÇELİK ve biricik AİLEM'e;

Bu yoldaki her telaş ve endişemi paylaştığım, yorulduğumda sırtımı dayadığım, destek ve yardımlarıyla yanımda olduğunu hissettiren değerli eşim Mehmet FIRAT'a teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

İyi ki varsınız...

Zeynep ÇELİK FIRAT
KONYA-2024

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
TABLolar VE ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	5
2.1. Kanser	5
2.2. Lösemi	6
2.3. Akut Myeloid Lösemi (AML)	8
2.3.1. AML Tanı ve Teşhisinde Kullanılan Klinik Bulgular	8
2.3.2. AML Tanı ve Teşhisinde Kullanılan Laboratuvar Bulguları.....	9
2.3.3. Sınıflandırma	9
2.3.4. AML Tanı ve Teşhisinde Kullanılan Genetik Markerlar.....	11
2.4. t(8-21) Translokasyonu.....	12
2.4.1. AML’de t(8;21) Translokasyonunun Tespiti	13
2.4.2. Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Yöntemi	14
2.5. FLT3 Geni.....	15
2.5.1. AML’de FLT3 Geni Mutasyonları	15
2.5.1.1. FLT3-ITD Mutasyonu	16
2.5.1.2. FLT3-TKD.....	16
2.5.2. AML’de FLT3 Mutasyonunun Tespiti	17
2.5.3. Fragman Analizi ve Sanger Dizileme	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	19
3.1. Kullanılan Sarf Malzemeler	19
3.2. Kullanılan Kitler ve Kimyasallar	20
3.3. Kullanılan Cihazlar	20
3.4. AML ve ALL tanılı hastaların belirlenmesi	20
3.5. Hasta örneklerinin toplanması	21
3.6. DNA İzolasyonu	21
3.7. RNA İzolasyonu	21
3.7.1. Periferik Kandan RNA İzolasyonu	22
3.7.2. Kemik İliğinden RNA İzolasyonu	23
3.8. t(8-21) Translokasyonunun RT-PCR Yöntemi ile Saptanması	23
3.8.1. Deney Öncesi Hazırlık.....	24

3.8.2. RT-PCR Kurulumu	24
3.9. FLT3 Mutasyonunun Fragman Analizi Yöntemi ile Saptanması	25
3.9.1. Deney Öncesi Hazırlık	25
3.9.2. FLT3 Geni için PCR Kurulumu	25
3.9.3. SNP Cleavage Enzim Kesimi	26
3.9.4. FLT3 PCR Ürünlerini ABI-3500 Cihazında Yürütme	27
3.10. Analiz	27
3.10.1. t(8-21) Translokasyon Analizi	27
3.10.2. FLT3 Geni Mutasyon Analizi	28
3.10.3. İstatistiksel analizler	28
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA	29
4.1. AML Hastalarında Yaş Aralıkları Dağılımı	30
4.2. AML Hastalarında Cinsiyet Dağılımı	35
4.3. Çalışmalarda Kullanılan Numune Türü	39
4.4. AML Hastalarında Tespit Edilen Mutasyonlara Ait Veriler	40
4.4.1. t(8;21) Mutasyonunun Belirlenmesi	41
4.4.2. FLT3 Mutasyonunun Belirlenmesi	42
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	46
KAYNAKLAR	49
EKLER	55
ÖZGEÇMİŞ	58

SİMGELER VE KISALTMALAR

% : Yüzde

µL : Mikro Litre

°C: Santigrad

ALL : Akut Lenfositler Lösemi

AML : Akut Myeloid Lösemi

bp : Baz çifti

cDNA : Komplementer DNA

Ct : Cycle threshold / PCR Eşik Değeri

D835 : Aspartik Asit 835

DNA : Deoksiribonükleik Asit

dNTP : DNA nükleotid bazları

dsDNA: Çift zincirli DNA

FAB : Fransız-Amerikan-İngiliz (French-Amerikan-British)

FLT3 : FMS Benzeri Tirozin Kinaz 3

inv16 : İnversiyon 16

ITD : Internal Tandem Duplikasyonu

KLL : Kronik Lenfositler Lösemi

KML : Kronik Myeloid Lösemi

MDS : Myelodisplastik Sendrom

NCN : Nükleik Asit Konsantrasyon Değeri (Nucleic Acid Concentration)

NPM1 : Nukleofosmin

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)

RNA : Ribonükleik Asit

RTKIII : Reseptör Tirozin Kinaz 3

RT-PCR : Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

TM: Transmembran

t(8;21) : 8;21 Translokasyonu

WHO : Dünya Sağlık Örgütü

TABLolar VE ŞEKİLLER DİZİNİ

Tablolar Dizini

- Tablo 1.** AML Laboratuvar Bulguları
Tablo 2. AML'de FAB Sınıflandırması
Tablo 3. AML'de WHO sınıflandırması
Tablo 4. AML'de Genetik Markerlar
Tablo 5. RT-PCR Mastermix için gereken bileşenler
Tablo 6. RT-PCR termal döngü protokolü
Tablo 7. PCR Mastermix için gereken bileşenler
Tablo 8. Uygulanan I.PCR protokolü
Tablo 9. SNP Master Mix için gereken bileşenler
Tablo 10. Amplifikasyon II.PCR protokolü
Tablo 11. Çalışmaya Alınan Toplam AML Hastalarının Yaş Dağılımı
Tablo 12. t(8;21) Pozitif Olduğu Tespit Edilen AML Hastalarının Yaş Dağılımı
Tablo 13. t(8;21) Hastalarının Yaşa Bağlı İstatistiksel Analizi
Tablo 14. FLT3 Pozitif Olduğu Tespit Edilen AML Hastalarının Yaş Dağılımı
Tablo 15. FLT3 Hastalarının Yaşa Bağlı İstatistiksel Analizi
Tablo 16. AML Hastalarının Cinsiyet Dağılımı
Tablo 17. AML Hastalarının Cinsiyete Bağlı İstatistiksel Analizi
Tablo 18. AML Hastalarının Yaş ve Cinsiyet İlişkisi
Tablo 19. t(8;21) Pozitif Olduğu Tespit Edilen AML Hastalarının Yaş ve Cinsiyet İlişkisi
Tablo 20. FLT3 Pozitif Olduğu Tespit Edilen AML Hastalarının Yaş ve Cinsiyet İlişkisi

Şekiller Dizini

- Şekil 2.1.1.** Hematopoetik Kök Hücre Proliferasyonu
Şekil 2.1.2. Kanser Hücresinin Zamanla Değişimi
Şekil 2.2.1. Lösemi Hücresinde Periferik Yayma
Şekil 2.4.1. t(8-21) Kromozom Yapısı
Şekil 2.5. FLT3 Geni
Şekil 2.5.1.1. FLT3-ITD Bölgesi
Şekil 2.5.1.2. FLT3-TKD Bölgesi
Şekil 4.1. Çalışmaya Katılan AML Hastalarına Uygulanan Tarama Testleri
Şekil 4.1.1. Farklı Yaşlardaki İnsanlar Arasında Yıla Göre AML Görölme Oranı (Dong,2020)
Şekil 4.1.2. Çalışmaya Alınan Toplam AML Hastalarının Yaş Dağılımı
Şekil 4.1.3. Çalışmaya Alınan AML Hastalarının Yaşa Göre Mutasyon Dağılımı
Şekil 4.2.1. Çalışmaya Alınan AML Hastalarında Cinsiyet Dağılımı
Şekil 4.2.2. Çalışmaya Alınan AML Hastalarında Tespit Edilen Mutasyonlara Göre Yaş ve Cinsiyet İlişkisi
Şekil 4.4.1.1. Bio-Rad CFX96 Cihazında t(8;21) Tespiti

1. GİRİŞ

Kanser, kritik olan genlerin mutasyona uğraması sonucu hücrelerin anormal bir şekilde çoğalması ve doku işlevlerini bozacak ölçüde büyümesi ile ilgili kompleks bir hastalıktır. Bu süreç, normal hücre döngüsünün düzeninin bozulması ve kontrolsüz hücre çoğalması ile tetiklenir. Kimyasal ve radyoaktif maddelere maruz kalma, tütün kullanımı, genetik yatkınlık gibi çeşitli faktörler kanser gelişiminde rol oynayabilir.

Kanserin tedavisi, hastalığın teşhis edildiği aşamaya ve kanserin türüne bağlı olarak cerrahi, radyasyon ve kemoterapi gibi yöntemleri içerebilir. Ancak kanser toplumu tehdit eden bir sağlık sorunu olarak devam etmektedir ve tedavi protokolleri hala iyileştirilmeyi beklemektedir. Bu nedenle, araştırma ve geliştirme çalışmalarının yanı sıra erken teşhis ve önleyici tedbirlerin güçlendirilmesi kritik öneme sahiptir.

Lösemi, kemik iliğindeki kan hücrelerinin kontrolsüz çoğalması sonucu oluşan bir kan kanseri türüdür. Lösemi, akut ve kronik olmak üzere iki temel formda görülür. Akut lösemi, hızlı ilerleyen bir hastalık olup, kemik iliğindeki olgunlaşmamış blast hücrelerinin anormal bir şekilde çoğalması sonucu ortaya çıkar. Kronik lösemi ise yavaş ilerleyen bir hastalıktır ve olgunlaşmış, ancak işlevsel olmayan lenfosit veya miyelosit hücrelerinin aşırı miktarda üretilmesi ile karakterizedir.

Akut lenfoblastik lösemi (ALL) ve akut miyeloblastik lösemi (AML) en sık görülen akut lösemi tipleridir. Kronik miyeloid lösemi (CML) ve kronik lenfositik lösemi (CLL) ise en sık görülen kronik lösemi türleridir. Her lösemi türü belirli genetik mutasyonlarla ilişkilendirilmiş olup, bu mutasyonların hastalığın seyrini etkilediği bilinmektedir.

Akut Myeloid Lösemi (AML), kemik iliğinde başlayan ve genellikle kan hücrelerinin olgunlaşmasını engelleyerek aşırı miktarda anormal, genç (blast) hücre oluşumuna neden olan bir tür kan kanseridir. genellikle kemik iliğinde normal kan hücrelerinin yerine anormal blast hücrelerin birikmesi sonucunda beyaz kan hücreleri, kırmızı kan hücreleri ve trombositlerin normal üretiminin bozulmasına yol açar.

Bu anormal blast hücrelerinin kemik iliğinde ve kan dolaşımında birikmesi, normal kan hücrelerinin üretimini etkiler ve ciddi sağlık sorunlarına neden olabilir. AML genellikle hızlı bir seyir gösterir ve hızlı tedavi gerektirebilir.

AML, genetik mutasyonlar, çevresel faktörler ve diğer risk faktörleriyle ilişkilendirilebilir. Belirtileri arasında yorgunluk, halsizlik, kilo kaybı, ateş, kemik ağrısı, deri altında kanama veya morarmalar, enfeksiyonlara yatkınlık gibi genel semptomlar yer alabilir.

t(8;21), Akut Myeloid Lösemi (AML) hastalarında sıklıkla görülen bir kromozomal translokasyon tipidir. Bu translokasyon özellikle AML'nin M2 alt tipi olarak sınıflandırılan t(8;21)(q22;q22) kromozom anomalisi ile ilişkilidir. Bu durumda, kromozom 8'in uzun kolunda ve kromozom 21'in uzun kolunda bulunan belirli gen bölümleri birbiriyle yer değiştirir.

t(8;21) translokasyonunda en sık görülen genetik değişiklik, AML hastalarında sıklıkla gözlenen RUNX1-RUNX1T1 füzyon genidir. RUNX1 (runt-related transcription factor 1) ve RUNX1T1 (runt-related transcription factor 1 translocation partner 1) genleri arasında meydana gelen bu füzyon, normal hücre döngüsünün kontrolünde rol oynayan düzenleyici proteinlerin anormal bir şekilde birleşmesine neden olabilir, bu da hücrelerin anormal büyümesine ve çoğalmasına yol açabilir.

t(8;21) translokasyonunun varlığı genellikle hastanın kemik iliği hücreleri üzerinde yapılan sitogenetik analiz yoluyla tespit edilir. Sitogenetik inceleme, hastanın kromozomlarındaki yapısal ve sayısal anormallikleri belirlemek için kullanılan bir laboratuvar yöntemidir. Ayrıca moleküler genetik testler (PCR, FISH gibi) de füzyon genin varlığını teşhis etmek için kullanılabilir. Bu translokasyon, AML hastalarının prognozunu da etkileyebilir. Örneğin, t(8;21) pozitif AML vakalarının genellikle daha iyi bir yanıt verdiği ve tedavi sonrası sağkalım oranlarının daha iyi olduğu bildirilmiştir. RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), RNA moleküllerinden hedeflenen bir genin DNA kopyasının oluşturulması ve ardından bu DNA kopyasının amplifikasyonunun yapılması için kullanılan bir moleküler biyoloji tekniğidir. Bu teknik, ilk olarak RNA'yı ters transkribe ederek (reverse transkripsiyon) hedeflenen genin DNA kopyasını oluşturur ve daha sonra bu DNA kopyasını art arda yapılan sikluslarla kopyalayarak çoğaltır.

t(8;21) translokasyonunun tanısında RT-PCR, kromozom analizine (sitogenetik) alternatif bir yaklaşımdır. Bu translokasyon, AML (Akut Myeloid Lösemi) hastalarının yaklaşık %10'unda görülür ve t(8;21) pozitif olan hastalar genellikle daha iyi bir prognoza sahiptir. Bu nedenle, t(8;21) translokasyonunun hızlı ve doğru bir şekilde tespit edilmesi, hastaların tanısında ve tedavi planında önemli bir yol göstericidir.

RT-PCR yöntemi, hedeflenen füzyon geninin (örneğin, RUNX1-RUNX1T1) varlığını tespit etmek için kullanılabilir. Bu füzyon gen, t(8;21) translokasyonunun sonucu olarak oluşur ve bu translokasyonun varlığını gösterir. RT-PCR ile bu füzyon geninin varlığı hızlı bir şekilde ve hassas biçimde tespit edilebilir, böylece hastaların tanısı ve prognozu belirlenebilir.

FLT3 (Fms-like tyrosine kinase 3) geni, hematopoetik hücrelerde bulunan bir tirozin kinaz reseptör genidir. Bu genin normal olarak fonksiyon görmesi, kan hücrelerinin olgunlaşması sürecinde önemli rol oynar. FLT3 geninde meydana gelen belirli mutasyonlar, Akut Myeloid Lösemi (AML) gibi kan kanserlerinin gelişiminde önemli bir rol oynayabilir.

FLT3 geninde en sık görülen mutasyonlar arasında iç tandem duplications (ITD) ve nokta mutasyonları (örneğin, D835Y) bulunmaktadır. FLT3 genindeki ITD mutasyonu, sitoplazmik domaininde yer alan juxtamembran (JM) bölgesindeki genin internal tandem dublikasyonların (ITD) çoğalmasıyla karakterizedir. Bu mutasyon, FLT3 proteininin aşırı aktive olmasına ve hücre büyüme kontrolünün bozulmasına neden olabilir, bu da kanser hücrelerinin anormal şekilde çoğalmasına yol açabilir.

FLT3 mutasyonlarının tespiti genellikle moleküler genetik testler kullanılarak yapılır. Polymerase Chain Reaction (PCR) ve fragment analysis gibi yöntemler, FLT3 genindeki ITD mutasyonlarını tespit etmek için sıklıkla kullanılan yöntemlerdir. Ayrıca Fragman analizi veya daha yeni ve hassas teknikler olan next-generation sequencing (NGS) yöntemleri de FLT3 genindeki diğer nokta mutasyonlarını tespit etmek için kullanılabilir.

FLT3 mutasyonları, AML hastalığının prognozunu etkileyebilir. Bu nedenle, FLT3 mutasyonlarının tespiti, hastalığın yönetiminde önemli bir rol oynar ve tedavi planının oluşturulmasında rehberlik eder. FLT3 geni ve mutasyonları hematolojik malignitelere (özellikle AML) önemli bir moleküler hedefi temsil eder ve hastaların tanısında, prognozunda ve tedavi yaklaşımlarında dikkate alınması gereken önemli bilgiler sağlar.

FLT3 genindeki mutasyonlar, akut myeloid lösemi (AML) gibi hematolojik malignitelerin gelişiminde önemli bir rol oynar. Örneğin, FLT3-ITD mutasyonunun varlığı, hastanın tedaviye yanıtını ve sağkalım süresini etkileyebilir. FLT3 mutasyonlarının doğru bir şekilde tespit edilmesi, hastaların daha iyi tanımlanmasına ve tedavi planlarının kişiselleştirilmesine olanak tanır. Bu nedenle, Fragman analizi gibi yöntemler FLT3 genindeki mutasyonların tespitinde ve karakterizasyonunda önemli bir rol oynar.

DNA dizi analizleri ya da sekanslama DNA birincil yapılarının tayininde ve nükleotid baz diziliminin belirlenmesinde kullanılan yöntemdir. Analiz bir nükleik asit dizisinin diğerine hibridizasyonuna dayanır. Bu hibridizasyon sırasında radyoaktif ya da radyoaktif olmayan maddelerle işaretleme yapılır. Sıklıkla gen mutasyonları (delesyon, insersiyon vb.) tespiti ya da rekombinant DNA oluşum yapılarının tayininde kullanılır.

İki dizi analiz çalışmaları 1960'lı yılların başında 75-80 nükleotitlik tRNA'larla başlanmıştır. İlk olarak maya alanin tRNA dizi analiz teknikleride gelişmektedir. Nükleotit dizilerin belirlenmesinde iki temel teknik kullanılmaktadır.

- Sanger (dideoksi) dizileme yöntemi
- Maxam-Gillbert kimyasal degradasyon yöntemi

Fragman analizleme ve Sanger dizileme, bir DNA örneğinin nükleotid dizisini belirlemek için kullanılan klasik bir DNA dizileme yöntemidir. Bu yöntem, bilim insanlarının DNA moleküllerindeki bazı çiftlerini belirleyerek DNA'nın tamamını veya belirli bir bölümünü sıralamalarına olanak tanır. Fragman analizi, uzun yıllar boyunca genetik araştırmalarda ve teşhis amaçlı moleküler biyolojide yaygın olarak kullanılmıştır.

FLT3 genindeki mutasyonların tespitinde Fragman analizi yöntemi, belirli mutasyonları doğrulamak ve karakterize etmek için kullanılabilir. Özellikle FLT3 genindeki nokta mutasyonlarını belirlemek için Fragman analizi yöntemi etkili bir araç olabilir. Bu mutasyonların varlığı, hastanın tanısında, prognozunda ve tedavi seçeneklerinde önemli bir rol oynayabilir.

AML (akut myeloid lösemi) hastaları arasında t(8;21) translokasyonu ve FLT3 gen mutasyonlarının sıklığı belirli alt gruplarda değişebilir. Genellikle, AML vakalarının yaklaşık %15'inde t(8;21) translokasyonu gözlemlenirken, FLT3 gen mutasyonları AML hastalarının yaklaşık %30-35'inde bulunabilir.

t(8;21) translokasyonu ve FLT3 gen mutasyonları, AML hastalarının genetik profillerinin belirlenmesi açısından önemli bir role sahiptir. Bu genetik değişiklikler, hastaların risk gruplarının belirlenmesinde, tedavi planlarının kişiselleştirilmesinde ve prognoz tahmin edilmesinde kritik bir rol oynar. Bu nedenle, bu genetik değişikliklerin sıklığı ve etkisi, AML hastalarının yönetiminde önemli bir rol oynar.

Bu retrospektif tez çalışmasında, 01.09.2022-25.08.2023 tarihleri arasında Ankara Etlik Şehir Hastanesi Tıbbi Genetik ve Hematoloji polikliniklerine başvurup Tıbbi Genetik laboratuvarına yönlendirilen AML ön tanılı 424 hastada t(8;21) ve FLT3 mutasyonlarının görülme sıklığının araştırılması amaçlanmıştır.

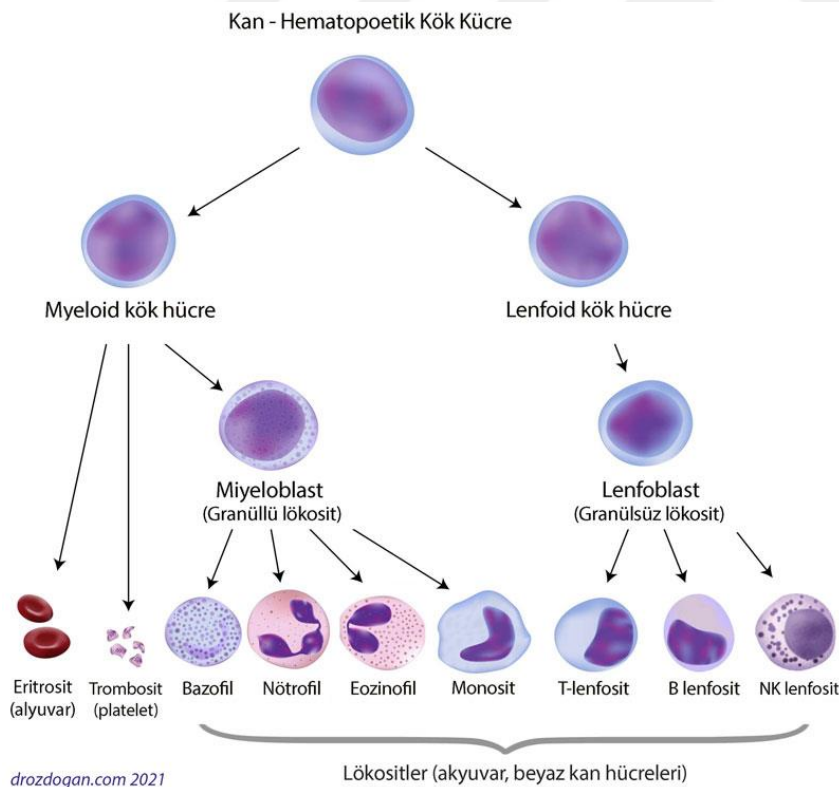
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kanser

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünerek çoğalması ile ortaya çıkan çevresel ve genetik faktörlerin etkisi ile oluşan hücresel seviyede genetik bir hastalıktır. Kanseler tek bir organı etkileyebildiği gibi uzaktaki organlara da metastaz yaparak etkisini gösterebilirler (Özcan, 2019).

Tıp biliminde bir oluşumun; 'kanser' olarak isimlendirilebilmesi için 5 niteliği taşıması gerektiği öngörülmüştür;

- Hücrelerde sınırsız poliferasyon özelliği
- Büyümesini baskılayan faktörlere duyarlı olmaması
- Hücrelerde apoptozis görülmemesi
- Damar oluşumlarını(angiyogenezis) tetiklemesi
- Hücrelerin doku dışında başka bölgelere sıçraması(metastaz)
- Hücrelerin doku içine tam bir şekilde girmesi(invazyon)(Altay, 2021)

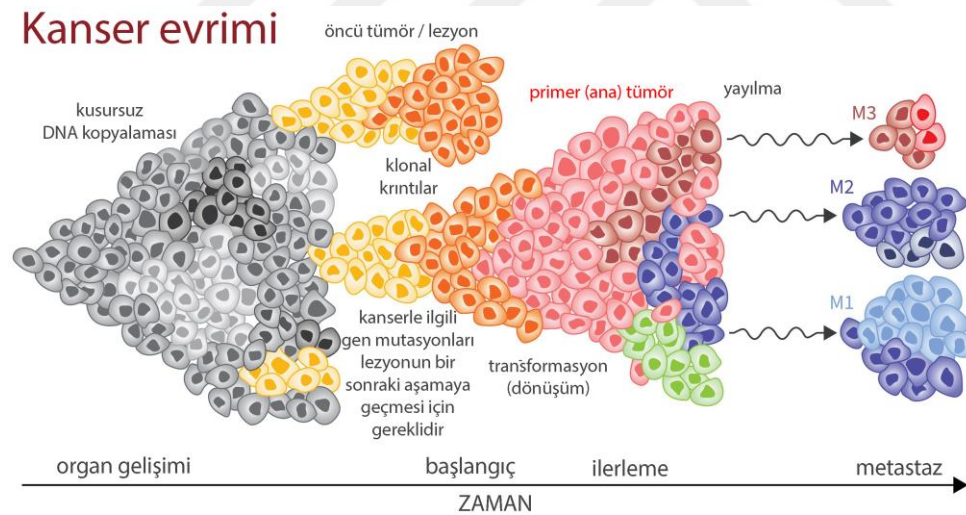


Şekil 2.1.1. Hematopoetik Kök Hücre Proliferasyonu

Kanserin en önemli özelliği kimi hücrelerin normal hücrelerden farklılaşarak kontrolsüz bölünme özelliği kazanması, yakınlarındaki doku ve organları istila etmesi,

dolaşım yolu ile uzak organ ve dokulara yayılmasıdır. Türk Kanser Derneği, kanser türlerini genel anlamda beş farklı grupta incelemektedir:

- Lösemi Kanser Türleri: Kemik iliğine benzer dokularda yani kan üretimi sağlayan dokularda ve hücrelerde başlayan ve ilerleyen kanser türleri olarak tanımlanmaktadır.
- Merkezi Sinir Sistemi Kanser Türleri: Omurilik ve beyin dokularında başlayan ve ilerleyen kanser türleri olarak tanımlanmaktadır.
- Lenfoma ve Miyelom Kanser Türleri: Bağışıklık sistemindeki dokularda ve hücrelerde başlayan ve ilerleyen kanser türleri olarak tanımlanmaktadır.
- Sarkoma Kanser Türleri: Kan damarlarında, kas, yağ, kıkırdak, kemik ve diğer destek ve bağ dokularında başlayan ve ilerleyen kanser türleri olarak tanımlanmaktadır.
- Karsinoma Kanser Türleri: İç organları çevreleyen ve kapsayan dokularda ve hücrelerde veya deri üzerinde başlayan ve ilerleyen kanser türleri olarak tanımlanmaktadır (Akkanat, 2022).

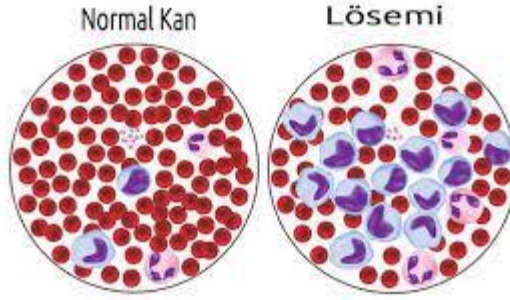


Şekil 2.1.2. Kanser Hücresinin Zamanla Değişimi

2.2. Lösemi

Hematopoez, vücudun kan hücrelerini üretme sürecidir. Bu süreç kemik iliği, lenf bezleri ve dalak gibi kan hücrelerinin oluşturulduğu organlarda gerçekleşir. Hematopoez süreci kök hücrelerden başlayarak olgunlaşmış kan hücrelerinin oluşumunu içerir.

Çocukluk çağı kanserleri, erişkinlerde görülen kanserlerle karşılaştırıldığında özellikle doku spesifitesi ve tümör agresyonu açısından farklılık göstermektedir. Erişkinlerde akciğer, kalın barsak, meme, mide, karaciğer ya da prostat kanserlerine daha sık rastlanırken, çocuklarda akut lösemiler, lenfomalar, merkezi sinir sistemi tümörleri, kemik ve yumuşak doku sarkomları daha sık bildirilmektedir. Çocukluk çağında en sık görülen kanser türü lösemilerdir (Özcan, 2019).



Şekil 2.2.1. Lösemi Hücresinde Periferik Yayma

Lösemi, genetik bir mutasyon sonucu hematopoetik hücrelerin bozulduğu bir tür kanserdir. Bu mutasyon sebebiyle normal olgunlaşma sürecinden ayrılan ve kontrolsüz şekilde çoğalan anormal beyaz kan hücreleri oluşur. Bu durum, kemik iliğinde normal kan hücrelerinin yerini alarak vücudu enfekte eder. Hematopoetik hücrelerdeki bu mutasyon, lösemiye neden olabilir ve hastalık ilerledikçe normal kan hücrelerinin üretimi azalır, anormal hücreler ise hızla çoğalır. Bu durum hemoglobin taşıyan kırmızı kan hücrelerinin, bağışıklık sistemi destekleyen beyaz kan hücrelerinin ve pıhtılaşmayı sağlayan trombositlerin düzgün üretimini engeller, vücuttaki kan hücrelerinin sağlıklı dengesini bozar.

Lösemiler; buldukları hücrenin tipine göre myeloid ve lenfoid, hücrelerin farklılaşma seviyelerine göre ise; akut veya kronik olarak sınıflandırılmaktadır. Daha çabuk kendini belli eden ve hızlı seyreden lösemiler “akut”, yavaş ilerleyip uzun yıllar süren lösemiler ise “kronik” olarak tanımlanır (Özcan, 2019).

Akut lösemiler, olgunlaşmamış kan hücrelerinin artışı sonucu oluşmaktadır. Akut lösemilerde kontrolsüz bir şekilde çoğalan hücreler lenfoid hücreler ise “akut lenfoblastik (lenfoid) lösemi (ALL)”, myeloid hücreler ise “akut miyelositik (miyeloid) lösemi (AML)” olarak tanımlanmaktadır (Terwilliger ve Abdul-Hay 2017).

2.3. Akut Myeloid Lösemi (AML)

AML, kemik iliğindeki myeloid seriye ait progenitör hücrelerin, kontrolsüz çoğalması ile karakterize heterojen bir malign hastalık grubudur. Erişkinlerde daha fazla görülmesine rağmen, çocukluk çağındaki akut lösemilerinin % 15-25'ini oluşturur. Çocukluk çağı lösemilerine bağlı ölümlerin ise %30'unu oluşturmaktadır.

2.3.1. AML Tanı ve Teşhisinde Kullanılan Klinik Bulgular

AML'li hastalarda, klinik belirti ve bulgular çok değişkendir. AML'de ortaya çıkan ana klinik belirtiler ALL'de olduğu gibidir. AML'li hastaların % 20'sinde lösemik hücrelerin infiltrasyonu sonucunda kemik ve eklem ağrıları, sinovit ve eklemlerde şişlik şikayetleri olabilir. AML'li hastalarda, myeloblastların en sık orbita, yüz kemikleri ve kafatasındaki periost altını infiltre etmesi sonucu, tümoral oluşumlar görülebilir. Bu oluşumlara Granülositik sarkoma ya da Klorama denir. Bu tümoral oluşumlar hastalığın ilk bulgusu olabilir (Hızlı Karabacak,2010).

Anemi: Kırmızı kan hücrelerinin azalması sonucu anemi gelişebilir, yorgunluk ve halsizlik hissedilebilir.

Ateş: Kemik iliğindeki patolojik değişiklikler nedeniyle enfeksiyon riski artabilir, ateş sık görülebilir.

Trombositopeni: Trombosit sayısında azalma olabilir, bu da kanamanın artmasına yol açabilir.

Lökositoz: Hastalık nedeniyle anormal beyaz kan hücrelerinin sayısında artış olabilir.

Kilo: Anemi, iştah azalması gibi nedenlerle kilo kaybı yaşanabilir.

Laboratuvar bulgularında ise;

Periferik kan incelemesi: Kan sayımı testlerinde anormal beyaz kan hücreleri, azalmış kırmızı kan hücreleri ve trombosit sayısında değişiklikler görülebilir.

Kemik iliği biyopsisi: Kemik iliğinden alınan biyopsi numunesinde lösemik hücrelerin varlığı tespit edilir.

Sitogenetik incelemeler: Genetik analizlerle hastalığın hangi genetik mutasyonlardan kaynaklandığı belirlenir.

Kimyasal testler: Kan ve kemik iliği örneklerinde belirli protein ve enzim düzeylerinin ölçülmesi ile hastalığın yaygınlığı ve şiddeti hakkında bilgi elde edilir.

ALL'den farklı olarak ekstremiteler tutulum en sık deri, dişeti, SSS, baş ve boyun bölgesinde olmaktadır. Kemik iliği tutulumuna bağlı olarak hastaların yaklaşık %20'sinde kemik ağrıları olmaktadır. Sitopeni ile ilişkili belirti ve bulgularla başvurular olabilir. Hastaların çoğunluğunda hemoglobin 9gr/dL'nin altındayken normokrom

normositer anemi görülür. Hastaların %75'inde trombosit sayısı 100.000/mm³ az olarak görülürken, bu durum kimi zaman gastrointestinal, pulmoner ve SSS kanamalarıyla bulgu verebilir. Morarma, peteşi, burun kanaması, dişeti kanaması, ya da menoraji hastalarda sıklıkla gözlenmektedir. Bu komplikasyonlar özellikle AML M3, M4 ve M5'te görülmektedir (Yöntem, 2018).

AML hastaları genellikle halsizlik, kilo kaybı, sık enfeksiyonlar gibi genel belirtilerle başvururlar. Tanı ve takip sürecinde klinik ve laboratuvar bulguları birlikte değerlendirilir ve tedavi planı buna göre oluşturulur.

2.3.2. AML Tanı ve Teşhisinde Kullanılan Laboratuvar Bulguları

AML hastalığının laboratuvar bulgularının tanısında artan lökosit sayısı, anemi ile sonuçlanan hematopoetik hücrelerin azalması, trombositopeni gibi durumlar mevcuttur. Artan poliferasyon sebebiyle biyokimyasal açıdan laktat dehidrogenaz (LDH) ve ürik asit değerlerinin yüksek çıkması da laboratuvar bulguları arasında sayılabilir. Bunlara ek olarak çeşitli bulguların tespiti durumunda; akciğer grafisi, batin görüntülemesi, MR, BT ve ekokaryografi gibi tetkiklerde gerekli olabilir.

Tablo 1. AML Laboratuvar Bulguları

Bulgu	Sıklık (%)
Ateş	30
Kanama	33
Kemik ve eklem ağrısı	18
Splenomegali	16-18
Hepatomegali	19-21
Kloroma	2-16
MSS tutulumu	6-25
Lökosit sayısı < 25.000/mm ³	54-60
Lökosit sayısı > 100.000/mm ³	13-18
Hemoglobin < 9 gr/dL.	56
Trombosit sayısı < 100.000/mm ³	70-72
Koagülopati	13-17

AML'de blast sayısının %20-30 oranının üstünde seyretmesi kesin kriter olarak değerlendirilebilir ve bu durumda kemik iliği aspirasyonu yapılmalıdır (Anak, 2011).

2.3.3. Sınıflandırma

AML'de kullanılan iki sınıflandırma sistemi mevcuttur. Bunlardan biri, morfoloji temelli Fransız-Amerikan-İngiliz (FAB) sınıflandırması (Tablo 1), diğeri ise klinik,

morfolojik bulgular ve karyotip/moleküler değişiklikler temelli Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflandırmasıdır (Tablo 2) (Gönül, 2016).

FAB sınıflamasında akut myeloid lösemiler, morfolojik ve sitokimyasal boyanma özelliklerine göre gruplanmıştır. Fakat immüfenotipleme, elektron mikroskobu, sitogenetik, moleküler biyolojik tetkik yöntemlerini ve nadir lösemi tiplerini içermeyen bir sınıflama yapılmıştır (Tablo 2).

Tablo 2. AML'de FAB Sınıflandırması

FAB Sınıflandırma	Morfoloji
AML-M0	Minimal Farklılaşmış AML
AML-M1	Az Farklılaşmış (maturasyon yok) AML
AML-M2	Matürasyonun olduğu AML
AML-M3	Akut Promyelositik Lösemi
AML-M4	Akut Myelomonositik Lösemi
AML-M4 Eo	Akut Myelomonositik Eozinofilik Lösemi
AML-M5	Akut Monositik Lösemi
AML-M6	Akut Eritrolösemi
AML-M7	Akut Megakaryositik Lösemi

Akut lösemide sitogenetik ve moleküler genetik anomalilerin bariz bir hale gelmesi ve bunların prognostik önem arz etmesi nedeni ile, yeni bir sınıflandırma ihtiyacı olduğu gözlenmiştir. 2001 yılında Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) akut lösemiler de dahil olmak üzere hemopoietik ve lenfoid blastları içeren yeni bir sınıflama yapmıştır. WHO sınıflamasında; morfoloji, immüfenotipleme, sitogenetik ve moleküler biyolojik özelliklerle birlikte akut lösemi tanısı için blastik hücre sayısı %30'dan %20'ye indirilmiş ve nadir lösemi tipleri de dahil edilmiştir (Altay, 2021).

Tablo 3. AML'de WHO sınıflandırması

1.Tekrarlayan genetik anomalilerle seyreden AML

- t(8;21)(q22;q22), (AML1/ETO) ile AML
- inv(16)(p13;q22) veya t(16;16)(p13;q22), (CBFβ/MYH11) ile seyreden AML
- APL t(15;17)(q22;q22), (PML/RARA)
- 11q23 (MLL) ile seyreden AML

2.Çoğul seri displazisi ile seyreden AML

- Önceden Myelodisplastik Sendromlu (MDS'li) tip
- Önceden MDS'li olmayan tip

3.Tedaviye ikincil AML ve MDS

- Alkilleyici ajanlarla ilişkili tip
- Topoizomeraz II ile ilişkili tip

4.Tanımlanan gruplara girmeyen AML

- Minimal farklılaşma gösteren AML
- Olgunlaşma göstermeyen AML
- Akut miyelofibrozis ile panmyelozis lösemi
- Granülositik olgunlaşma gösteren AML
- RARA rearrajmanı göstermeyen APL
- Akut Myelomonositer Lösemi
- Akut Monoblastik ve Monositer Lösemi
- Akut Eritrolösemi
- Akut Megakaryoblastik Lösemi
- Akut Bazofilik Lösemi
- Myeloid Sarkom

2.3.4. AML Tanı ve Teşhisinde Kullanılan Genetik Markerlar

İyi prognoz olarak kategorize edilen hastalar klasik kemoterapi alırlar. Kötü prognoz allojeneik kemik iliği tansplantasyon adayıdır. Tedavide en kompleks grup orta risk grubudur. AML hastalarının %40-50'si orta risk grubudur ve karyotipleri normaldir (KN). Moleküler belirteçler arasında, bugünün AML pratiğinde, NPM1, CEBPA ve FLT3 mutasyonları ön plandadır ve normal karyotipi olan (KN-AML) için yönlendiricidir. European LeukemiaNet (ELN) sınıflamasına göre FLT3 ITD negatif hastada NPM1 mutasyonu iyi prognoz grubunu, karyotip normal ancak FLT3 ITD pozitif hastalar orta prognoz grubunu oluştururlar. Orta ve kötü prognoz ise sitogenetik klasifikasyonla örtüşmektedir. Halen AML prognozunda etkin pek çok moleküler belirteç tanımlanmış durumdadır (Gönül, 2016).

Tablo 4. AML'de Genetik Markerlar

Tekrarlayan Genetik Anomallier	MDS/AML
1. RUNX1-RUNX1T1 t(8:21) (q22;q22)	1. Kompleks karyotip (3 ilişkisiz anomali)
2. PML-RARA t(15;17)(q22;c12)	2.7/del(7q), 5/del(5q)
3. CBI B-MYH11 'nv(16)(p ² .1c22) or t(16;16)(p13.;c22)	3. 13/del(13q), del(11q), del(12p)/t(12p), del(9q)
4. MLLT3-MLL/KMT2A t(9;11)(q22;q23)	4. i(17q)/t(17p), idic(X)(q13)
5. DEK-NUP214 t(6;9)(p23;q34)	5. t(5;12)(q33;p12), t(5;7)(q33;q11.2)
8. RPN-CV 1 'nv(3)(c21q26.2) veya t(3;3)(q21;q26.2)	6. t(5;17)(q33;p13), t(5;10)(q33;q21)
7. RBM15-MKL1 t(1;22)(p13;q13)	7. t(1;3)(p36.3;q21.2), t(3;5)(q25;q34)
8. NPM1 gen mutasyonu	8. t(11;16)(q23;p13.3), t(3;21)(q26.2;q22.1)
9. CEBPA gen mutasyonu	9. t(2;11)(p21;q23)

- **Kromozom Anomalileri:** AML hastalarında çeşitli kromozom anormallikleri sık görülmektedir. En yaygın olanları:

t(8;21): RUNX1-RUNX1T1 füzyon genini oluşturur.

t(15;17): PML-RARA füzyon genini oluşturur. Bu genetik değişiklik APL (Akut Promyelositik Lösemi) ile ilişkilidir.

inv(16): CBF β -MYH11 füzyon genini oluşturur.

- **Gen Mutasyonları:**

FLT3: FLT3 geninde meydana gelen mutasyonlar, kötü prognoz ile ilişkilidir. FLT3-ITD (internal tandem duplication) mutasyonu en yaygın olanıdır.

NPM1: NPM1 genindeki mutasyonlar, genellikle iyi prognoz ile ilişkilendirilir.

CEBPA: CEBPA mutasyonları da genellikle iyi bir prognoz gösterir.

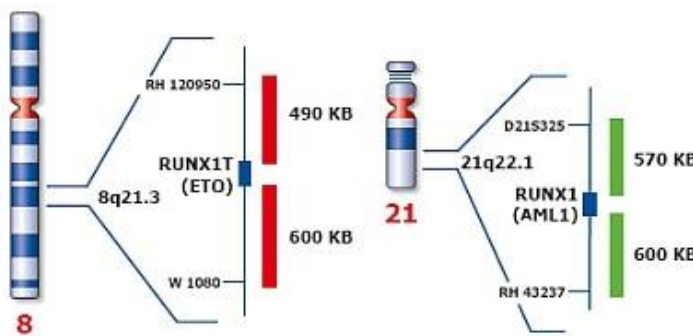
- **Diğer Belirteçler:**

TP53: TP53 genindeki mutasyonlar, kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir.

ASXL1: ASXL1 genindeki mutasyonlar, kötü prognoz ile ilişkilendirilebilir (Rezaei, 2017).

2.4. t(8-21) Translokasyonu

RUNX gen ailesi önemli çekirdek bağlama faktörlerinin alt birimlerini kodlayan bir gen ailesidir. RUNX transkripsiyon faktörleri, bir Runt alanı aracılığıyla DNA'ya bağlanan RUNX1, RUNX2 ve RUNX3 genleri tarafından alfa alt birimini kodlamaktadır. 21. kromozomda yer alan ve hematopoetik gelişim, hematopoetik kök hücre homeostazı ve çeşitli kan malignitelerinde birçok önemli fonksiyonda görev alan bir genidir. Bunun yanında üzerinde bulunan RHD veya Runt alanı hematopoetik sistemde özellikle DNA'yı bağlama ve diğer transkripsiyon faktörleriyle etkileşime girme görevi görür. RUNX1'de meydana gelen mutasyonlar AML geliştirme eğilimi olan trombositopeniye neden olur (Cohen, 2009)



Şekil 2.4.1. t(8-21) Kromozom Yapısı

t(8;21) sonucunda ortaya bir süper gen olan RUNX-RUNX1T1 füzyon geni oluşur. Oluşan bu gen RUNX1-ETO füzyon proteinini meydana getirir. Oluşan füzyon geni RUNX1'in bağlanma bölgelerini bloke ederek transkripsiyonu engeller. Bu durum hücre farklılaşmasını önler ve hücrelerin farklılaşma yeteneklerini kaybederek çoğalmasında etkilidir ve sonuçlanarak lösemiye teşvik eder (Wang ve ark., 1998). RUNX1-ETO fare modellerinde tek başına lösemiye indüklemese de füzyon proteini lösemide kritik bir noktada yer alır (Yuan ve ark., 2001).

Tüm AML'ler içinde %5-12 oranında görülmektedir. t(8;21) (q22;q22) AML'deki en yaygın kromozomal düzensizliklerden biridir. FAB M2 grubunda sık görülür (Tablo 2). AML1 gen ürünü DNA bağlama özelliğindedir. AML1-CBF β transkripsiyon faktörü kompleksinin bir parçasıdır. ETO geni ise bir "zinc finger" protein kodlamaktadır. Translokasyon neticesinde 21. kromozomdaki AML1 geni ve 8. kromozomdaki ETO geninden oluşan bir füzyon proteini ortaya çıkar. Oluşan bu AML1/ETO füzyon geni AML1'in DNA bağlayan kısmını ve ETO geninin tamamını içerir (Şekil 2.4.1.).

Genellikle kemoterapiye yanıt iyidir ve konsolidasyon fazında "cytarabine" ile tedavi edildiğinde uzun süreli sağkalım ve tam remisyon oranı yüksektir. Olgun nötrofillerde auer cisimleri görülebilir. Anormal nükleer segmentasyonu ve histokimyasal boyamalarda anormallikler görülebilir. Nadiren kemik iliği blast oranı %20'nin altına inebilir. Bunların dışında cinsiyet kromozomu kaybı ve del(9)(q22) gibi genetik anomaliler sık görülmektedir. CD56 ekspresyonu artışı ek prognostik faktör olarak sayılabilir (ÖZBEK & COŞKUNPINAR, 2008).

2.4.1. AML'de t(8;21) Translokasyonunun Tespiti

t(8;21) translokasyonunun tespiti için genellikle sitogenetik analizler ve moleküler genetik testler kullanılır. Bu translokasyonun tespit edilmesi için yaygın olarak kullanılan yöntemler:

1. Sitogenetik İncelemeler: Bu yöntemle hastanın kemik iliği hücreleri incelenir ve kromozomlar mikroskop altında incelenerek anormallikler aranır. t(8;21) translokasyonu, kromozomlardaki belirli bantlarda değişikliklerle ilişkilidir. Sitogenetik analizler bu translokasyonu tespit etmek için yaygın olarak kullanılır.
2. FISH (Floresan in situ Hibridizasyon) Yöntemi: FISH yöntemi, genetik materyali etiketlenmiş floresanlı probalarla hedeflenen DNA bölgesine bağlayarak belirli genetik anormallikleri tespit eder. t(8;21) translokasyonunun

varlığını doğrulamak ve belirlemek için FISH testi kullanılabilir (Solmaz Medeni Ş, 2015).

3. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Testi: PCR, belirli genetik materyalin çoğaltılmasını sağlayan bir moleküler biyoloji tekniktir. t(8;21) translokasyonu üzerindeki genetik değişiklikleri saptamak için spesifik RT-PCR testleri kullanılabilir (BAŞER, 2013).

2.4.2. Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Yöntemi

Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR); hücrelerden izole edilen RNA moleküllerinin retrovirüslerden izole edilen Revers transkriptaz enzimi yardımıyla komplementer DNA (cDNA) sentezini gerçekleştirmesi sonucu, gen ekspresyonu analizlerinin yapılabildiği hızlı ve hassas bir yöntemdir. Bu yöntemle ile çok az miktarda RNA ile oluşan mesajlar saptanabilir, ekspresyon miktarı da tespit edilebilir. Oluşan RT-PCR ürünleri klonlama da vektör olarak kullanılabilir, bu ürünlerden cDNA kütüphaneleri oluşturulur ki bunlar daha sonra gen kütüphaneleri olarak değerlendirilir.

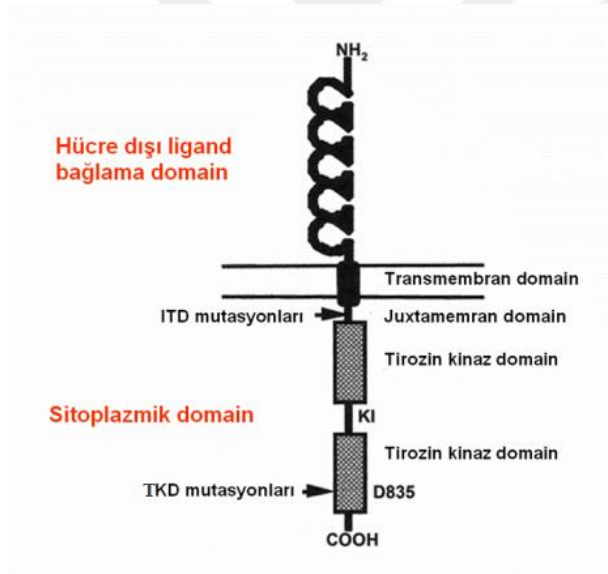
Tek adımlı PCR'da revers transkripsiyon ve PCR aynı tüpte optimize edilen koşullarda gerçekleşir. Bu yöntem fazla miktarda RNA örneği varken daha kullanışlıdır. cDNA sentezi ve amplifikasyon arasında tüplerin kapatılmasına gerek yoktur çünkü adımın azaltılması kontaminasyon riskini en aza indirir. Kantitatif PCR'a uygundur. Revers transkriptaz ile amplifikasyon enzimleri birlikte çalışır ve yüksek hassasiyetlidir. Uygun RT-PCR sonuçlarına ulaşabilmek için; deneysel işlem adımlarının dikkatli yapılması, uygun enzimlerle çalışılması, uygun primer seçilmesi, farklı tampon ve ilave ajanların kullanılması, döngü parametrelerinin iyi ayarlanması ve en önemlisi yüksek kalite ve saflıkta kalıpların (örneklerin) hazırlanması gerekmektedir.

RT-PCR, son yılların İnsan Genom Projesiyle kullanım amaçları giderek artan bir tekniktir. Mikroarraylerin kullanım alanlarından olan gen ekspresyon çalışmalarında çıkış noktası mRNA'dır çünkü ekspresyon düzeyindeki tüm farklılıklar bu şekilde saptanabilir. Gen ekspresyon çalışmaları genel olarak kanser ve SNP (Tek Nokta Polimorfizmler) gibi insan sağlığını olumsuz etkileyen durumları en iyi açıklayan çalışmalardır. Mikroarraylerde prob olarak kullanılan mRNA RT-PCR'la cDNA'ya çevrilir ki cDNA'lar daha sonraki aşamalara daha dayanıklıdır (işaretleme, hibridizasyon). Aynı anda kantitasyonda yapılabildiği için RT-PCR'a verilen önem

giderek artmaktadır. Ayrıca sistemin hassasiyeti ve güvenilirliği de kullanım oranını artmaktadır (OKUTUCU & PEHLİVAN, 2003).

2.5. FLT3 Geni

İnsan FLT3 geni kromozom 13q12'de bulunur. Kodlanan Fms benzeri tirozin kinaz-3 (FLT3), aile üyeleri arasında KIT, FMS ve PDGF reseptörü bulunan bir tip III reseptör tirozin kinazdır. FLT3'ün yapısı; hücre dışı bölgede beş immüno globulin benzeri alan, bir juxtamembran (JM) alan, bir kinaz ek parçası ile ayrılmış bir tirozin kinaz (TK) alanı ve hücre içi bölgede bir C-terminal alandan oluşur. İnsan FLT3'ünün iki formu vardır: 158–160 kDa glikozlanmış form ve 130–143 kDa glikozlanmamış form. Normal koşullar altında, FLT3 yalnızca CD34 + hematopoietik kök/progenitor hücrelerde ifade edilir ve hematopoietik kök hücrelerin, dendritik hücre progenitorlerinin, B hücresi progenitorlerinin ve doğal öldürücü hücrelerin gelişiminde iyi tanımlanmış bir rol oynar (Chen,2017).



Şekil 2.5. FLT3 Geni

13. kromozomda yer alan (13q22.2) FLT3 geni, sınıf III reseptör tirozin kinaz protein ailesine ait bir proteini kodlamakta, bu proteinin ekstraselüler domainin aktivasyonu ise hücrede apoptoz, proliferasyon ve kemik iliğinde hematopoietik hücrelerin farklılaşmasında görev almaktadır (ŞİMŞEK,).

2.5.1. AML'de FLT3 Geni Mutasyonları

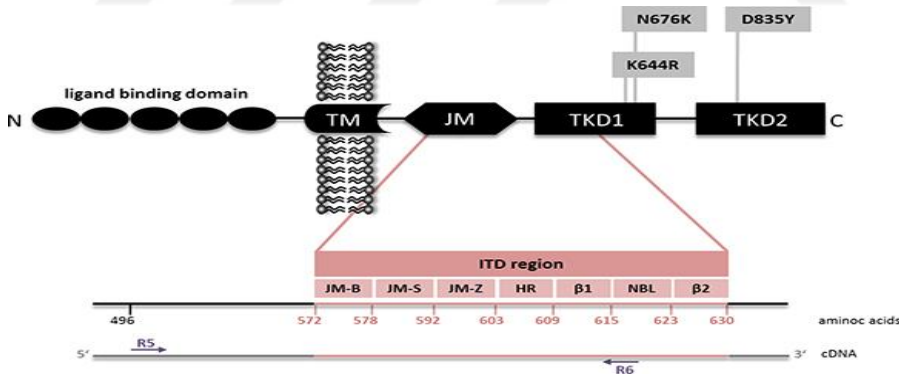
FLT3 genindeki en yaygın mutasyon, FLT3 reseptörünün juktamembran alanını kodlayan bölgenin dahili tandem duplikasyonudur (FLT3-ITD). FLT3-ITD mutasyonu olan hastalarda yüksek blast sayıları, sık relaps ve genel sağ kalımda azalma

görülmüştür. Bu mutasyon normal karyotip, t(15;17), (q22;q12) ve t(6;9)(p23;q34) ile birlikteliği sık saptanmakla birlikte NPM1 mutasyonu ile birlikte de saptanmaktadır (Abdel-Aziz, 2023; Coleman, 2023).

Bildirilen diğer bir mutasyon, FLT3 geninin tirozin kinaz alanındaki (TKD) yanlış anlamlı mutasyondur. Bu mutasyon ayrıca reseptörün yapısal fosforilasyonunu da teşvik eder. En sık görülen mutasyonlar, genin ikinci TKD'sinde 835/836 kodonlarının nokta mutasyonları ve delesyonlarıdır. AML hastalarında FLT3-TKD mutasyonu %7-10 civarı bulunmaktadır. FLT3-ITD mutasyonun aksine FLT3-TKD mutasyonunun prognoz ile ilişkisi tam olarak saptanamamıştır (CEYLAN, 2021).

2.5.1.1. FLT3-ITD Mutasyonu

FLT3 ITD Mutasyonu Ekzon 14'te kopya sayılarındaki artıştır. Kopya sekanslarının büyüklükleri 14 ile 200 nükleotid arasında değişir. İnternal tandem duplikasyon (FLT3-ITD), ilk olarak FLT3 ekspresyonu için primer lösemi örnekleri reverse transcriptase-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile taranırken, amplifiye edilen ürünlerin birçok hastada beklenenden uzun olması ile saptanmıştır. FLT3 geninde ekson 14'de, bazende ekson 15'de bulunur ve DNA sekansı uzunluğu 3 ile 400 bp arasında değişir (Hızlı Karabacak, 2010).



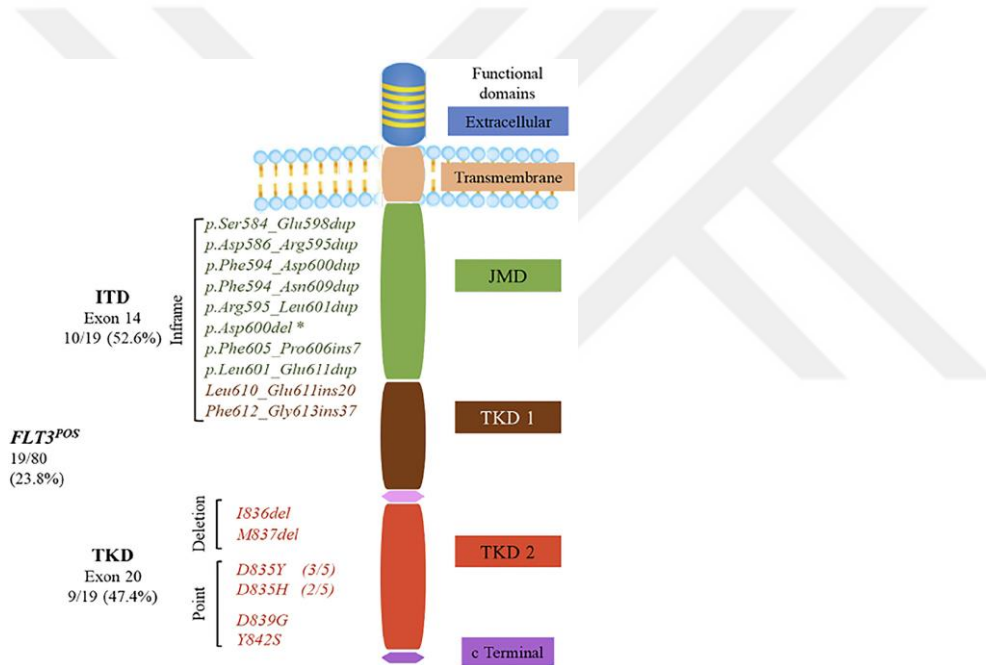
Şekil 2.5.1.1. FLT3-ITD Bölgesi

FLT3 reseptörünün JM domaininde in-frame internal tandem duplikasyon mutasyonu, FLT3 ilişkili AML vakalarında en yüksek frekansa sahiptir. FAB sınıflamasının en sık M3 (promyelositik) ve en düşük oranda M2 gruplarında olmak üzere tüm sınıflandırmalarda saptanmıştır (Rezaei et al., 2017).

2.5.1.2. FLT3-TKD

AML hastalarında, FLT3'ün aktivasyon loop bölgesindeki tirozin kinazlarda da mutasyon gözlenmektedir (Yamamoto et al., 2001). Bu mutasyon, ikinci tirozin kinaz

domainin 20. exonundaki aspartik asit 835 (D835) ve isoleüsin 836 (D836) noktalarında amino asit yer değişimi ve araya girmesi olarak tanımlanmaktadır (Griffith et al., 2004). Aktivasyon loop bölgesi , tirozin kinazlarla ortak bir bölgedir. Tirozin kinaz inaktifken bu loop Adenosine Three Phosphate (ATP) ve substrat girişini durdurur. Bu durum ATP'leri kinaz bölgesine yönlendirir. Tirozin kinaz aktif duruma geçtiğinde ise loop'taki spesifik bir tirozin rezidüsü fosforilize olur. Loop bölgesinde bir konfigürasyon değişikliği oluşur ve aktifleşir. Böylece kinazlar için ATP ve substrat girişlerini serbest kılar. TKD mutasyonları, FLT3 reseptöründeki 2. tirozin kinaz bölgesinin inhibitör etkisini bozar. Sonuç olarak; yapısal kinaz aktivasyonuna neden olur. Bu etki, ITD mutasyonlarında gözlenen otoinhibitör mekanizmasının ortadan kalkması ile aynı sonucu doğurur. Yani kinaz aktivasyonu ile sonuçlanır (AKFIRAT, 2005).



Şekil 2.5.1.2. FLT3-TKD Bölgesi

2.5.2. AML'de FLT3 Mutasyonunun Tespiti

Akut myeloid lösemi (AML) hastalarında FLT3 mutasyonları, çeşitli yöntemler kullanılarak tespit edilebilir. Bu yöntemler arasında şunlar bulunmaktadır:

1. **PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu):** FLT3 genindeki mutasyonları tespit etmek için en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Özellikle, FLT3-ITD (internal tandem duplication) ve FLT3-TKD (tyrosine kinase domain) mutasyonları için spesifik primerler kullanılarak PCR uygulanabilir. PCR

sonrası yapılan jel elektroforezi ile FLT3 mutasyon tespiti yapılır ve örnekler analiz için dizilenir (ÖZBEK, 2008).

2. **Sanger Sekanslama:** FLT3 genindeki belirli bölgelerin dizilimini belirlemek için Sanger sekanslama yöntemi kullanılabilir. Bu yöntem, özellikle daha küçük örnek boyutları ile çalışıldığında ve kesin mutasyon tespiti gerektiğinde etkilidir (Doğan, 2017).
3. **Next-Generation Sequencing (NGS):** Çoklu gen mutasyonlarını aynı anda tespit etmek için NGS teknikleri kullanılabilir. Bu yöntem, genellikle FLT3'nın yanı sıra diğer kanserle ilişkili genler için kapsamlı analiz sağlar.
4. **Moleküler FISH (Fluoresan İn Situ Hibridizasyon):** FLT3 geninin durumu ve yapısal değişiklikleri belirlemek için kullanılabilir. Ancak daha nadir olarak tercih edilen bir yöntemdir. Bugün için yeni tanı almış AML hastalarının yaklaşık %50 - 55'inde blastik hücrelerde klonal kromozom anomalileri tespit edilebilmekte, ancak %45'inde ise FISH (Floresan In Situ Hibridizasyon) ile bile, herhangi bir anormal karyotip bulgusuna rastlanmamakta, bu hastalarda ilgili genetik bozukluğun tanımlanması ve prognostik değerlendirme oldukça zor olmaktadır (ÇETİNGÜL, 2009).
5. **Real-Time PCR:** FLT3-ITD mutasyonunun varlığını belirlemek için kantitatif PCR yöntemleri de kullanılabilir. Bu yöntem, spesifik mutasyonların hızlı bir şekilde tespit edilmesine olanak tanır (OKUTUCU, 2003).

2.5.3. Fragman Analizi ve Sanger Dizileme

Sanger ve arkadaşları 1977 yılında, 3'OH grubu dehidroksile edilmiş olan nükleotidleri (dideoksinükleotidler (ddNTP)) kullanarak DNA zincir uzamasının durdurulması prensibine dayalı bir DNA dizileme yöntemi geliştirmişlerdir. 1986 yılında Mullis ve arkadaşları tarafından temel olarak DNA'nın belirli bir bölgesinin in vitro olarak çoğaltılması işlemi olan PCR'ın keşfinden sonra ise DNA dizi analizinin kullanımı iyice yaygınlaşmaya başlamıştır. Dizi analizi yönteminde ilk zamanlarda DNA sentezinin başlaması için DNA polimeraza bir başlangıç noktası oluşturmak amacıyla, bir ucundan radyoizotop ile işaretlenmiş primerler kullanılmaktayken, günümüzde bu radyoaktif parçaların insan sağlığı açısından oluşturacağı olumsuz etkileri azaltmak amacıyla floresan boyalarla işaretlenmiş primerler kullanılmakta ve görüntülemeler de buna uygun olarak geliştirilmiş bilgisayar sistemleri tarafından biyoinformatik cihazlarla otomatik olarak yapılmaktadır. Floresan boyayla işaretli

dideoksi nükleotid trifosfatların (ddNTP) kullanıldığı Sanger yöntemiyle çok sayıda örnek aynı anda dizilenebilmekte, her bir yürütmede 400-800 bazlık bir uzunluğa sahip olan DNA dizileri yüksek doğrulukla okunabilmektedir. Bu yöntem günümüze kadar en çok kullanılan DNA dizileme yöntemi olmuştur (Doğan, 2017).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu retrospektif tez çalışması, Ankara Etlik Şehir Hastanesi Tıbbi Genetik Laboratuvarı'nda yürütüldü. Çalışmada, 01.09.2022-25.08.2023 tarihleri arasında Ankara Etlik Şehir Hastanesi Tıbbi Genetik ve Hematoloji polikliniklerine başvurup rutin tanı/kontrol amaçlı t(8;21) ve FLT3 mutasyon taraması için Tıbbi Genetik laboratuvarına yönlendirilen AML ön tanılı 424 hasta yer aldı.

Çalışmaya alınan hastaların seçimi herhangi bir kriter olmadan AML test istemine bakılarak yapıldı. Araştırma için gereken olgu parametreleri; cinsiyet, yaş, numune türü ile analize ait görsel bulgular Ankara Etlik Şehir Hastanesi sistemi (LİOS), BioRad CFX96 ve Applied Biosystems 3500 cihaz arşivlerinden elde edildi.

Bu retrospektif çalışma, Ankara Etlik Şehir Hastanesi 1 Nolu Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylandı (AESH-EK1-2023-513).

3.1. Kullanılan Sarf Malzemeler

- Falkon tüp (15 ml ve 50 ml)
- Mikrosantrifüj tüpleri
- 0,2 ml PCR tüpü
- Mikropipet Uçları
- Ependorf Tüp (1,5 ve 2 ml)
- Elüsyon Tüp
- Collection Tüp
- Asetat kalem
- Etiket
- Cooler rack
- Atık şişesi
- Peçete
- Contasız enjektör
- Buz aküsü
- 8'li beyaz strip tüp

- 8'li şeffaf strip kapağı
- 96 kuyucuklu şeffaf plate
- Şeffaf seal

3.2. Kullanılan Kitler ve Kimyasallar

- A.B.T.TM RNA Purification Kit
- RiboEx
- Etanol
- Nuclease free-water
- Kloroform
- geneMAPTM Translocation Detection Kits for Leukemia AML1-RT24/t(8;21)(q22;q22) RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO)
- .Seqline FLT3 Mutasyon Analiz Kiti
- HI-DI Formamide
- LIZ-500 Size
- FragmentAnalysis50_POP7
- Dye Set G5

3.3. Kullanılan Cihazlar

- Isı bloğu
- Qiagen Rotor Gene
- BioRad T100 Thermal Cyclers
- BioRad CFX96 RT-PCR System
- Çeker ocak kabini
- Mikro Santrifüj
- Qubit 4 DNA ölçüm cihazı
- Vorteks-Spin
- Mikropipetler, 10 µl, 100 µl, 1000 µl (Eppendorf)
- Buzdolabı (+4 ve -20 °C)
- Applied Biosystem-I 3500

3.4. AML ve ALL tanılı hastaların belirlenmesi

Hematoloji ve Genetik bölümlerine gelen hastalardan klinik bulgular için anamnez taraması yapıldı. Farklı yaş gruplarındaki AML ve ALL tanılı hastalar belirlenerek çalışılacak hasta sayısı kaydedildi.

3.5. Hasta örneklerinin toplanması

Hastanenin numune alma biriminden gelen kan ve kemik iliği örnekleri izolasyon yapılmak üzere toplandı.

3.6. DNA İzolasyonu

FLT3 gen mutasyon paneli için DNA izolasyonu yapıldı. Hastalardan alınan EDTA'lı kan tüplerindeki periferik kan veya kemik iliği numuneleri manuel olarak aşağıdaki işlem basamakları izlenerek izole edildi.

- İzolasyon için numaralandırılan eppendorf tüplere 20 µl proteinaz K eklendi.
- Hastalardan alınan periferik ve kemik iliği numunelerinden 200 µl örnek alınarak proteinaz K üzerine eklendi.
- 200 µl BL buffer eklenerek 5-10 sn vorteksleme ardından spin yapıldı.
- 56°C ısı bloğunda 10 dakika bekletildi.
- Isı bloğundan alınan numunelere 200 µl saf etanol eklenerek vorteks ve spin yapıldı.
- Numuneler ayırım için özel sarı kapaklı spin column tüplerine aktarıldı.
- 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek alttaki tüpte biriken süpernatant atıldı.
- Filtre temiz toplama (collection) tüpüne takılarak 600 µl BW buffer eklendi.
- 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı.
- Filtre temiz toplama (collection) tüpe takılarak üzerine 700 µl TW buffer eklendi.
- 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı.
- Filtre temiz toplama (collection) tüpe takılarak 16000 xg'de 3,5 dakika boş olarak santrifüj edildi.
- Filtreler hasta isimlerinin yazılı olduğu ilk eppendorf tüplere takılarak filtrede toplanan DNA'yı tüpe aktarabilmek için üzerine 100 µl AE buffer eklendi.
- En yüksek xg değerinde 1,5 dakika santrifüj yapıldı. Filtreler atıldı, tüpte kalan DNA'ların miktarı Nanodrop cihazında ölçüldü.

3.7. RNA İzolasyonu

t(8-21) translokasyonu analizi için RNA izolasyonu yapıldı. Hastalardan alınan EDTA'lı kan tüplerindeki periferik kan veya kemik iliği numuneleri iki ayrı protokolde manuel olarak izole edildi.

3.7.1. Periferik Kandan RNA İzolasyonu

- Hastalardan alınan EDTA'lı tüplerdeki tüm periferik kan alt üst edilip 50 ml'lik falkon tüplere aktarıldı.
- Tüplerdeki kanın 3-4 katı kadar 1x RLB solüsyonu da falkonlara dikkatlice eklendikten sonra falkonlar alt-üst edilerek çalkalandı. Buz üzerinde 10 dakika bekletildi.
- Falkonlara uygun cihazda 4°C ve 600 g'de 15 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra falkon kenarında kalan atıklar da pellete zarar vermeden yavaşça temizlendi.
- Beyaz renkte dibe çöken pellet üzerinden izolasyon devam etti.
- Pellet üzerine 1 ml 1x RL buffer eklendi, pipetaj yapılarak pellet çözdürülüp temiz bir eppendorf tüpe aktarıldı. Kalan işlemlere çeker ocak kabininde devam edildi.
- Tüpler en yüksek devirde 2 dakika santrifüj yapıldı, süpernatant atıldı.
- Pellet üzerine 750 µl RiboEx eklendikten sonra pipetajla pellet çözdürüldü.
- Üzerine 200 µl kloroform eklendi ve mat pembe renk görülünceye kadar vorteks yapıldı.
- Oda sıcaklığında 12000g'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda tüpün en altında koyu pembe, ortada açık pembe ve en üstte şeffaf olarak 3 faz oluştu.
- Üstteki şeffaf fazdan 300 µl alınarak sarı filtreli tüpe aktarıldı.
- Sarı tüp 10000g'de 30 saniye santrifüj edildi, sarı filtre atıldı.
- Toplama tüpünde kalan süpernatanta 600 µl RB1 solüsyonu eklenerek pipetaj yapıldıktan sonra mavi filtreli tüpe aktarıldı.
- 10000g'de 30 saniye santrifüj edildi, toplama tüpü atılarak mavi filtreler yeni collection tüpe takıldı. Süpernatant atıldı.
- Üzerine 500 µl RBW eklendi ve 10000g'de 30 saniye santrifüj edildi.
- Filtreler yeni collection tüpe takıldı.
- Üzerine 500 µl RNW eklendi ve 10000g'de 30 saniye santrifüj edildi.
- Filtreler yeni collection tüpe takıldıktan sonra boş olarak 10000g'de 3 dakika santrifüj edildi.
- Son aşamada filtreler hasta isimlerinin yazılı olduğu 1,5 ml'lik eppendorf tüplerine takıldı.
- Üzerine 50 µl nükleaz free-water eklendi.
- 11000g'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra filtre atıldı.

- Tüpte kalan süpernant içindeki RNA'ların miktarı Nanodrop cihazında ölçülerek belirlendi.

3.7.2. Kemik İliğinden RNA İzolasyonu

Kemik iliği numunelerinden RNA izolasyonu manuel olarak başlayıp Qiagen Rotor Gene cihazında robotik sistemle yapıldı.

- Hastalardan alınan EDTA'lı tüpteki kemik iliği numunesi alt üst edilip falkon tüpe aktarıldı.
- Üzerine 4-5 katı kadar 2X ER buffer eklendi ve 15-20 dakika buz üzerinde bekletildi.
- Tüpler 4°C 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonrakımlar uzaklaştırıldı.
- 2X ER bufferdan falkona 15 ml'ye kadar doldurulup kuvvetlice çalkalanarak pellet çözdürüldü. Ardından 10 dakika buz banyosunda bekletildi.
- Tüpler 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atık şişesine süzdürülüp pıhtılı tüp kabine alındı.
- Pellet üzerine 600 µl RLT eklendi.
- Bu aşamada contasız enjektör kullanıldı.
- Enjektörle 7-8 kere pipetaj yapılarak pellet solüsyonda çözdürüldü.

Not: Hemen cihaza yüklenme olmayacağı durumlarda izolasyon bu aşamada kesilerek numune -20 °C'de saklandı.

- İzolasyonun bundan sonraki aşamaları Qiagen Rotor Gene cihazında devam etti. Cihazın izolasyon kitinden çıkan mor ve beyaz filtreli tüpler, 1000 µl'lik gri pipet uçları, RW1 buffer, RFW, RPE buffer ve EtOH cihaza yerleştirildi. 2 ml'lik Biofil kan tüplerine 650 µl kemik iliği RNA örneği aktarıldı. Tüpler hasta isimlerine dikkat edilerek cihaza takılarak RNA izolasyon aşamaları otomatik olarak gerçekleştirildi.
- İzole edilen RNA'ların çalışmaya alınmak üzere ölçümleri yapıldı.

3.8. t(8-21) Translokasyonunun RT-PCR Yöntemi ile Saptanması

t(8-21) translokasyonu taraması için ilk aşama olarak RNA izolasyonu yapıldı. Tarama için geneMAP™ Translocation Detection Kits for Leukemia AML1-RT24/t(8;21)(q22;q22) RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO) kiti kullanılarak BioRad CFX96 cihazında RT-PCR deneyleri yürütüldü. RT-PCR yöntemi iki aşamadan oluşur; ilk aşama RNA gibi kırılğan yapıdaki molekülü daha kararlı ve sağlam yapıda olan cDNA'ya çevrilmesi, ikinci aşama ise gen ifadesinin tespit edilmesidir. BioRad CFX96

cihaz programı ve kit içerisindeki enzyme mix'te bulunan ters transkriptaz enzimi ile aynı tüpte RNA'dan cDNA sentezi yapılabildiği için ayrı olarak cDNA sentez aşaması yapılmadı.

3.8.1. Deney Öncesi Hazırlık

- Kit içerisindeki Quantitect Probe PCR Mix, 5x One-Step qRT-PCR Buffer, RNase Free Water, Transcript Positive Control ve 5x Translocation Primer-Probe Mix oda sıcaklığına getirilerek eritildi. OneStep qRT-PCR Enzyme Mix hassas olduğu için buz üzerinde bekletildi. Tüm kit bileşenleri vorteks yapılmadan sadece kısa santrifüj edildi.
- Pozitiflik değerini ölçmek için kalibratör kullanıldı.
- Transcript Positive Control RUNX1-RUNX1T1, t(8-21) için pozitif kontrol olarak kullanıldı.
- Master mix hazırlanırken kullanılan RNase Free Water, t(8-21) için negatif kontrol olarak kullanıldı.

3.8.2. RT-PCR Kurulumu

t(8-21) translokasyonu için BioRad CFX96 cihazında RT-PCR basamakları yürütüldü.

Tablo 5. RT-PCR Mastermix için gereken bileşenler

<u>Mastermix Bileşenleri</u>	<u>Örnek Başı Miktar (µl)</u>
5X Translocation PPM	4 µl
5X OneStep PCR Buffer	4 µl
RNase Free Water	5,4 µl
OneStep Enzyme Mix	1,6 µl
Toplam Hacim	15 µl

- Çalışmada RNA kullanıldığı için deney soğuk blok üzerinde yürütüldü.
- Soğuk blok üzerine hasta örnek sayısı, pozitif kontrol, kalibratör ve negatif kontrol için beyaz renkli 8'li 0,2 ml'lik strip tüpler dizildi.
- Tüplere örnek başına 15 µl mastermix dağıtıldı, hastalar için ayrılan kuyucukların üzerlerine 5'er µl RNA örnekleri eklendi. Son kuyucuklara kitten çıkan pozitif kontrol, kalibratör ve negatif kontrol eklendi.
- BioRad CFX96 üstten okuma yaptığı için striplere şeffaf kapaklar takıldı.
- Cihaza hasta bilgileri girilerek BioRad CFX96 RT-PCR protokolü uygulandı.

Tablo 6. RT-PCR termal döngü protokolü

<u>Sıcaklık</u>	<u>Süre</u>	<u>Döngü</u>	<u>Veri Okuma</u>
50°C	30 dk	1	FAM,VIC
95°C	15 dk	1	
95°C	15 sn	45	
62°C	1 dk		

- VIC boyası ABL1 yani kontrol geni ifadesini, FAM boyası ise t(8-21) translokasyonu ifadesini göstermiştir.

3.9. FLT3 Mutasyonunun Fragman Analizi Yöntemi ile Saptanması

FLT3 gen panelini çalışmak için ilk aşama olarak DNA izolasyonu yapıldı. FLT3 mutasyonu taraması için Seqline FLT3 Mutasyon Analiz Kiti kullanılarak BioRad T100 Thermal Cycler cihazında deneyler yürütüldü. Yöntem iki PCR'dan oluşmaktadır. I.PCR'da Taq polimeraz enzimi ile FLT3 gen bölgesi çoğaltıldı, II.PCR'da SNP enzim kesimi yapıldı.

3.9.1. Deney Öncesi Hazırlık

- Hotstart Taq DNA polimeraz haricindeki bileşenler oda sıcaklığında çözündürüldü.
- Probe mix ve diğer PCR kimyasalları vortekslendi ve spin atıldı.
- Enzim sadece pipetajla karıştırılıp kısa spin atıldı.
- DNA örnekleri, eşit miktarda reaksiyona girilmesi için 10 ng/μl'ye seyreltildi.

3.9.2. FLT3 Geni için PCR Kurulumu

FLT3 geni amplifikasyonu için BioRad T100 Thermal Cycler cihazında I.PCR basamakları yürütüldü. Kit iki farklı probe mix içerir bu nedenle her probe için birer master mix hazırlandı ve her örnek başına ikişer PCR tüpü kullanıldı.

Tablo 7. PCR Mastermix için gereken bileşenler

<u>Mastermix Bileşenleri</u>	<u>Örnek Başı Miktar (μl)</u>
PCR Mix	5 μl
PCR Grade Water	3 μl
FLT3 Probe Mix	1 μl
HotStart Taq Pol.(5U/μl)	0,1 μl
Toplam Hacim	9 μl

- Master Mix'ler vorteks ardından spin yapıldı.
- Master Mix'lerin (Probe Mix 1 ve 2 ile ayrı ayrı hazırlanmış) 9 µl'si her bir örnek için 0,2 ml'lik PCR tüplerine transfer edildi.
- Hazırlanan her tüpe 1 µl DNA örneği (10 ng/µl) eklendi.
- Her PCR tüpü vorteks ve spin yapıldıktan sonra amplifikasyon için PCR cihazına yerleştirildi.

Tablo 8. Uygulanan I.PCR protokolü

Basamak	Aşama	Sıcaklık	Süre
1	Aktivasyon	95 °C	10 dk
2	Amplifikasyon	96 °C	30 sn
3		60 °C	1 dk
4		72 °C	40 sn
5	Uzama-Bağlanma	72 °C	20 dk
6	Bekleme	4 °C	∞

- Amplifikasyon sonrasında elde edilen Probe Mix 1 PCR ürünleri yürütme aşamasına kadar 4 °C'de saklandı.

3.9.3. SNP Cleavage Enzim Kesimi

- FLT3 SNP Cleavage 10X Buffer buzda çözdürüldü.
- Kesim(Cleavage) enzimi pipetajla nazikçe karıştırıldı.
- Probe Mix 2 ile amplifiye edilen PCR ürünlerini vorteksledi.
- Kesim(Cleavage) 10X Buffer ve Kesim(Cleavage) enzimi ile her örnek için aşağıdaki tarife göre master mix hazırlandı.

Tablo 9. SNP Master Mix için gereken bileşenler

Bileşen	Örnek Başma Hacim
FLT3 SNP Cleavage 10X Buffer	1 µl
FLT3 SNP Cleavage Enzyme	0,25 µl
Toplam	1,25 µl

- Master mix vortekslenip spin atıldı.
- Probe Mix 2 ile hazırlanmış PCR ürünlerine her örnek için 1,25 µl master mix eklendi.
- PCR tüpleri vortekslenip spin atıldı ve PCR cihazına yerleştirildi.

Tablo 10. Amplifikasyon II.PCR protokolü

<u>Basamak</u>	<u>Aşama</u>	<u>Sıcaklık</u>	<u>Süre</u>
<u>1</u>	Aktivasyon	37 °C	90 dk
<u>2</u>	İnaktivasyon	70 °C	10 dk
<u>3</u>	Bekleme	4 °C	∞

3.9.4. FLT3 PCR Ürünlerini ABI-3500 Cihazında Yürütme

Amplifikasyon sonucu elde edilen PCR ürünleri üzerinde ABI-3500 cihazında FragmentAnalysis50_POP7, Dye Set G5 run modülleri kullanılarak fragman analizi yapıldı.

- EYS-5DYE matriks standart ve 5-boya fragman analizli Data Collection program yürütmeden önce cihaza yüklendi.
- Standard olarak LIZ 500 Size yürütme için kullanıldı.
- Her örnek için 10 µl HI-DI Formamit ve 0,1 µl LIZ-500 Size standart karışımı hazırlanıp reaksiyonun gerçekleşeceği plate kuyucuklarına 9 µl olarak dağıtıldı.
- Her örnek için HI-DI formamit + Liz Size Standart karışımına 1 µl Probe Mix 1 ile hazırlanmış PCR ürünü ve 1 µl Probe Mix 2 ile hazırlanmış kesim(Cleavage) ürünü eklendi.
- Plate, seal ile sıkıca kapatılıp kısa bir spin atıldıktan sonra cihaza yüklendi.
- FLT3 yürütme protokolüne uygun olan program başlatılarak okuma gerçekleştirildi.

3.10. Analiz

3.10.1. t(8-21) Translokasyon Analizi

TaqMan teknolojisi kullanılarak, eşik üzerinde bir sinyal saptamak için gerekli PCR döngüsü sayısına eşik döngüsü (Ct) denir ve reaksiyon başında bulunan hedef miktarıyla doğrudan orantılıdır.

Translokasyon kopya sayısı (CN) değerlerinin oranı normalize kopya numarasını (NCN) verir:

$$NCN = [t(8;21)CN \times 100] \div (ABL)CN$$

- t(8-21) translokasyonu BioRad CFX96 cihazından alınan verilerle yukarıdaki denklem kullanılarak pozitif-negatif olarak analiz edildi.

- FAM bölgesinde görülen pikler pozitif hastaları gösterirken tüm hastalarda VIC bölgesinde pik görülmesi beklenir.
- Deney sırasında kullanılan kalibratör ile mutasyon varlığı tespit edilen hastalarda pozitiflik yüzdesi hesaplandı.

3.10.2. FLT3 Geni Mutasyon Analizi

- Yürütme sonrası elde edilen veriler Genemapper programına aktarıldı.
- Hasta verileri, LİZ 500-Size baz alınarak üzerine oturtuldu.
- Tüm hastalarda çalışmayı kabul etmek için gri alanlarda pik görülürken FLT3 gen mutasyonu olan hastaların kırmızı alanlarında pik görüldü. Pikler boylarına veya alanlarına göre pozitiflik sonucu hesaplandı.

3.10.3. İstatistiksel analizler

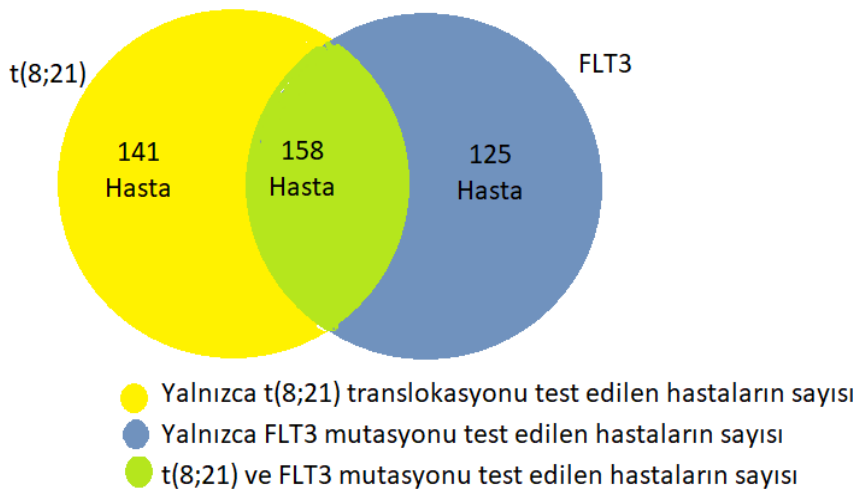
- Bu çalışmada hastaların cinsiyet, yaş ve mutasyon tarama verileri GraphPad Prism 5 paket programı ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.
- Verilerin değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistiksel metotların (ortalama, standart sapma) yanı sıra normal dağılım gösteren değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmalarında tek yönlü varyans analizi, normal dağılım göstermeyen değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmalarında Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.
- Sonuçlar %95 ($p < 0.05$) anlamlılık düzeyinde değerlendirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Akut miyeloid lösemi cinsiyet, yaş ve karakteristik özelliklere bağlı olarak değişkenlik gösterebilen heterojen malign bir hastalıktır. t(15;17), FLT3, NPM1 ve CEBPA gibi genetik mutasyonlar ise AML'de kemoterapi tedavisine cevabı ve toplam sağ kalımı gösteren önemli prognostik belirteçlerdendir.

Akut miyeloid lösemi hastalığı için yapılan taramalarda genellikle çoklu testleri içeren paneller kullanılmaktadır. Bunun yanında ilkin laboratuvar verilerinden alınan sonuçlar klinik bulgular ile karşılaştırılarak tanı kesinleşmektedir. Bazı durumlarda klinik verileri destekleyen laboratuvar sonuçları bulunamadığı durumlarda ek testler yardımıyla tanı koyulabilmektedir. Bu aşamadan sonra tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde laboratuvar bulguları oldukça önemli bilgiler sunmaktadır. Ankara Etlik Şehir Hastanesi Tıbbi Genetik Laboratuvarında AML hastalarında tanı koyulması için PCR biriminde t(15;17), t(8;21), inv16, NPM1, WT1 testlerinin bulunduğu ilkin tarama olan AML paneli kullanılmaktadır. Bu panelin yanında tedavi stratejisi belirlemek için FLT3 genindeki mutasyonlar gibi çeşitli genetik markerlar test edilmektedir.

Yapılan tez çalışmamızda, 01.09.2022-25.08.2023 tarihleri arasında Ankara Etlik Şehir Hastanesi Tıbbi Genetik ve Hematoloji polikliniklerine başvurup Tıbbi Genetik laboratuvarına yönlendirilen AML ön tanılı 424 hastada t(8;21) ve FLT3 mutasyonlarının görülme sıklığının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda toplam 424 hasta ile çalışılmış ve 283 hastada FLT3 mutasyonları, 299 hastada t(8;21) translokasyonu taranmıştır. Bunlardan 141 hastada sadece t(8;21) mutasyon tarama testi, 125 hastada sadece FLT3 mutasyon tarama testi ve 184 hastada hem t(8;21) hem de FLT3 mutasyon tarama testi ortak olarak yapılmıştır. (Şekil 4.1.)

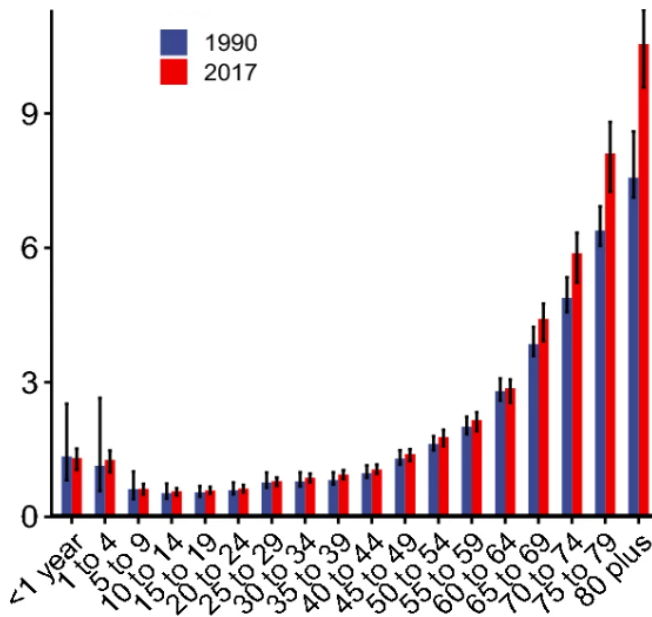


Şekil 4.1. Çalışmaya Katılan AML Hastalarına Uygulanan Tarama Testleri

Böylelikle yapılan retrospektif çalışmada AML hastalarında FLT3 genindeki mutasyonların sıklığı ve çeşidi; t(8;21) mutasyonunun sıklığı ve her iki test açısından değerlendirilmiş olan hastalarda AML ile ilişkili iki genetik markerın bir arada görülme sıklığının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Hastalara ait sonuçlar ayrıca yaş, cinsiyet ve numune türü baz alınarak da değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmektedir.

4.1. AML Hastalarında Yaş Aralıkları Dağılımı

AML hastalığı teorik olarak her yaşta görülebilmekle birlikte, genellikle erişkin orta çağın hastalığı olarak bilinmektedir. Kanadalı araştırmacı Dr. Chantal Reyna ve çalışma arkadaşlarına göre; AML %80 oranı ile yetişkinlerde en sık görülen akut lösemidir. Görülme sıklığı 40 yaşına kadar artmakta ve 40 yaşından sonra her yaşta katlanarak artış göstermektedir. On yaşın altındaki çocuklarda AML, akut lösemi olgularının %12'sini, 10-15 yaş arasında %28'ini, erişkinlerde ise %80-90'ını oluşturmaktadır (CEYLAN,2021). Tüm bu veriler ve özellikle AML vakalarının dünya genelinde yayılımını gösteren 1990-2017 verilerini içeren dünya çapında yapılan geniş bir çalışmanın bildirdiğine göre AML insidansı şeklinde grafiklenmektedir (Şekil 4.1.1.). Yani erken çocukluk döneminde çocukluk dönemindeki en yüksek görülen insidans geç çocukluk döneminde azalmakta ve orta yetişkinlikten itibaren yaşla birlikte dramatik olarak artmaktadır (Dong,2020).



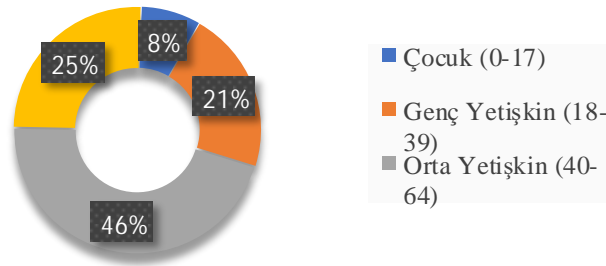
Şekil 4.1.1. Farklı Yaşlardaki İnsanlar Arasında Yıla Göre AML Görülme Oranı (Dong,2020)

Yaptığımız çalışmada test edilen AML tanısı almış toplam 424 hastadan 34'ünün çocuk kategorisinde, 89'unun 18-39 yaş aralığında genç yetişkin kategorisinde, 195'inin 40-64 yaş aralığındaki orta yetişkin kategorisinde, 106'sının ise 65 yaş üzeri yaşlı kategorisinde olduğu görülmektedir. Çalışma grubundaki hastaların yaş aralığı 0-87 yaş olup ortalama yaşları $49,4 \pm 20,03$ 'tür.

Tablo 11. Çalışmaya Alınan Toplam AML Hastalarının Yaş Dağılımı

Yaş aralığı	Hasta sayısı(n)	% oranı
Çocuk (0-17)	34	%8
Genç yetişkin (18-39)	89	%21
Orta yetişkin (40-64)	195	%46
Yaşlı (≥ 65)	106	%25
Toplam	424	100

Toplam AML Hasta Yaş Grupları



Şekil 4.1.2. Çalışmaya Alınan Toplam AML Hastalarının Yaş Dağılımı

2020 yılında Dong ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada lösemi vakalarının insidansları ve epidemiyolojik verileri derlenmiştir. Bu çalışmaya göre tüm lösemi vakalarının %23 kadarı AML olup, AML vakaları en düşük oranda 10-14 yaş arası görülürken, yetişkin grupta yaşla doğru orantılı olarak arttığı rapor edilmiştir (Dong, 2020). Liu ve arkadaşlarının 2024 yılında akut lösemideki (AL) epidemiyolojik verileri derledikleri çalışmada tüm akut lösemilerin %63 kadarının AML vakası olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte tüm AML hastalarının yaş dağılımları incelendiğinde yetişkin dönem hastalarının yalnızca %12'si genç yetişkin (18-39 yaş), %36'sı 40-64 yaş aralığında ve 65 yaş sonrası yaşlı grubunda ise %25'lik dilimi oluşturduğu

görülmektedir (Liu, 2024). Schneider ve arkadaşlarının 2008’de yaptığı çalışmada; benzer şekilde AML hastalarının pozitif prognostik grubunun oranının 40-60 yaş arasında arttığı ve sonrasında azalma olduğu görülmüştür (Schneider, 2008).

AML’nin Türk popülasyonunda görüldüğü yaş aralığına bakıldığında ise yapılan çalışmalar bizim çalışmamız ile paralel olarak yetişkin dönemde en yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca yine bizim çalışmamızda da görüldüğü gibi AML sıklığının en fazla olduğu yaş grubunun genç yetişkinlik dönemi olduğu dikkat çekmektedir. 2011 yılında 44 AML hastası ile yapılan bir çalışmada geç yetişkin grup %43, 60 yaş üstü yaşlı grup %17’lik bir oran ile temsil edilmiştir (Gündüz,2016). Dünya genelinde yetişkinlikte yaşla paralel olarak AML olgularında artış görüldüğü rapor edilirken bizim çalışmamızda olduğu gibi Türkiye örneklerinde yaşlı grubun orta yetişkin gruptan daha düşük AML insidansına sahip olduğu dikkat çekmektedir. Çalışmamızda çocukluk çağında düşük olan insidans %46 ile en yüksek orta yetişkin dönemde bulunmuştur. Literatürde AML vakalarının ortalama görülme yaşı 67 olarak belirtilmekle birlikte hasta sayılarındaki ve popülasyonlardaki değişime göre farklı rakamlar da görülebilmektedir (Roboz,2011). Türk popülasyonundaki çalışmalara bakıldığında Fırat’ın 24 hasta ile yaptığı çalışmada ortalama yaş 37,5; Alı ve arkadaşlarının 165 hasta ile yaptığı çalışmada Marmara bölgesindeki AML hastalarının ortalama yaşı 46 olarak saptanmıştır. Bununla birlikte Sayan’ın 147 hasta ile yaptığı çalışmada 53,7; Ceylan’ın 99 hasta ile yaptığı çalışmada 58,5; Başakın’ın 96 hastayla yaptığı çalışmada, 54,2 ve Kahya’nın 875 hastayla yaptığı çalışmada ortalama 52,2 olarak tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda bulunan ortalama 49,4 yaş da orta yetişkin grup bölgesinde olup literatürü doğrular niteliktedir.

299 AML hastasından t(8;21) pozitif olduğu tespit edilen 20 hastanın yaş dağılımı Tablo 12’de verilmiştir. Çalışma grubundaki t(8;21) pozitif hastaların yaş aralığı 11-82 olup ortalama yaşları 32,2’dir. Buna göre t(8;21) translokasyonun en yüksek oranda genç yetişkin grupta (%50) görülürken en düşük oranın 65 yaş üstü yaşlı grupta (%10) olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızın sonuçlarına göre bu mutasyonun genç yetişkin gruba özgü olduğu görülmüştür. Ancak bu sonucun toplam AML vakalarındaki yaş dağılımı ile paralellik arz etmemesi dikkat çekmektedir. Buna sebep olarak t(8;21) translokasyonun iyi prognozla ilişkilendirilmiş bir genetik hasar olması ve hasta sayısının nispeten yetersiz olması gösterilebilir. Kahya’nın yapmış olduğu çalışmada bizim sonuçlarımızın tersine t(8,21) mutasyonuna sahip yetişkin hastaların yaş arttıkça mutasyonu taşıma oranlarının da arttığı bildirilmiştir.

Tablo 12. t(8;21) Pozitif Olduğu Tespit Edilen AML Hastalarının Yaş Dağılımı

Yaş aralığı	Hasta sayısı	% oranı
Çocuk (0-17)	5	%25
Genç yetişkin (18-39)	10	%50
Orta yetişkin (40-64)	3	%15
Yaşlı (≥ 65)	2	%10
Toplam	20	100

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda translokasyon pozitif olan hastaların yaşları ile negatif olan hastaların yaşları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmektedir. Bu durum translokasyonun test edilen grup için genç yetişkin grupta daha sık görüldüğünü göstermektedir (Tablo 13.).

Tablo 13. t(8;21) Hastalarının Yaşa Bağlı İstatistiksel Analizi

		n	Yaş (ort \pm std sap)	p
t(8;21)	negatif	279	51,27 \pm 20,25	0,0002*
	pozitif	20	32,45 \pm 20,03	

Toplam 283 AML hastasından FLT3 mutasyonu açısından pozitif olduğu tespit edilen 32 hastanın yaş dağılımı Tablo 13’de verilmiştir. Bu verilere göre FLT3 mutasyonun en yüksek oranda orta yetişkin grupta (%40,6) görülürken, en düşük olarak çocuk grubunda (%6,25) olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç FLT3 mutasyonunun tüm hasta grubunun yaş dağılımı ile paralellik arz edecek şekilde dağıldığını göstermektedir. FLT3 mutasyonu görülen 32 kişilik hasta grubunda (3-79) yaş ortalaması 47,1 olarak belirlenmiştir. Fırat’ın yaptığı çalışmada bu ortalama 26 iken, Şimşek’in yaptığı çalışmada 47,6 bulunmuştur.

Tablo 14. FLT3 Pozitif Olduğu Tespit Edilen AML Hastalarının Yaş Dağılımı

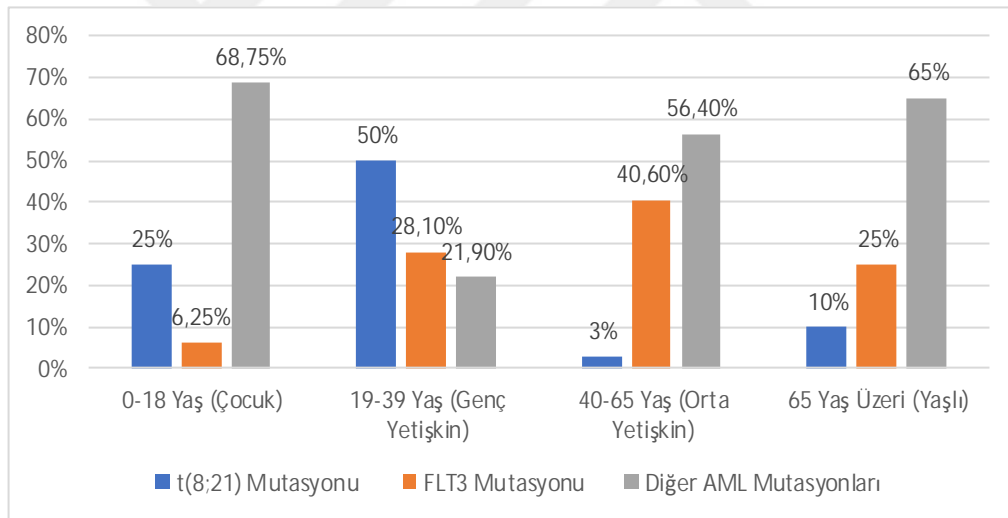
Yaş aralığı	Hasta sayısı	% oranı
Çocuk (0-17)	2	%6,25
Genç yetişkin (18-39)	9	%28,1
Orta yetişkin (40-64)	13	%40,6
Yaşlı (≥ 65)	8	%25
Toplam	32	100

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda FLT3 pozitif olan hastaların yaşları ile negatif olan hastaların yaşları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmektedir. Mutasyonun yaşa özgü bir özellik göstermediği söylenebilir (Tablo 15.).

Tablo 15. FLT3 Hastalarının Yaşa Bağlı İstatistiksel Analizi

		n	Yaş (ort±std sap)	p
FLT3	negatif	251	50,25±19,31	0,8439
	pozitif	32	46,41±19,18	

Hem FLT3 hem de t(8;21) mutasyonu tespit edilen 1 hasta orta yetişkin grupta olup yaşı 50 olarak belirlenmiştir. Ancak yaş ile iki mutasyonun bulunması arasındaki bağlantı sayının yetersiz oluşu nedeniyle istatistiksel olarak değerlendirilememiştir.



Şekil 4.1.3. Çalışmaya Alınan AML Hastalarının Yaşa Göre Mutasyon Dağılımı

Tez çalışmasında yer alan mutasyonların diğer AML mutasyonlarıyla yaşa bağlı görülme oranı Şekil 4.1.3'deki grafikte gösterilmiştir. Buna göre çocuk ve yaşlı gruplarında test edilen FLT3 ve t(8;21) mutasyonları görülme sıklığı diğer AML ile ilişkili mutasyonlara göre oldukça düşüktür. Bununla birlikte genç ve orta yetişkin dönem hastaların test edilen mutasyonların en sık görüldüğü hasta grubu olduğu söylenebilir. Özellikle genç yetişkin grupta iyi prognozla ilişkilendirilen t(8;21) mutasyonu baskın olarak görülürken, orta yaş grubunda tam tersine kötü prognozla ilişkilendirilen FLT3 mutasyonunun baskın olarak görülmesi dikkat çekicidir. Bu veri

AML ön tanısı ile gelmiş olan hastaların yaş grubuna bakılarak gerekli testlerin istenmesi ve tedavi sürecinin yönetilmesi açısından faydalı olacaktır. Bu veri ayrıca çalışmamızda ve literatürde genel olarak görülen FLT3 ve t(8;21) mutasyonlarının birbirine eşlik etme oranının düşük olmasını da açıklamaktadır.

Türk popülasyonunda AML hastalarında FLT3 ve t(8;21) mutasyonlarının tarandığı çalışmalara bakıldığında, çalışmamızla paralellik arz edecek şekilde FLT3 mutasyonlarının çocukluk çağı AML vakalarında oldukça düşük düzeyde tespit edildiği görülmektedir. (Hızlı Kocabaş, 2010; Coşkunpınar, 2008)

4.2. AML Hastalarında Cinsiyet Dağılımı

AML çok hızlı şekilde belirti veren ve gerekli tedavi sağlanmadığında ölümcül olabilen bir hastalıktır. AML, akut lösemisinin yetişkinler arasında en sık görülen alt tipidir. Dünya genelinde yapılan birçok çalışmaya göre AML, kadınlara kıyasla erkeklerde daha baskın olarak görülmektedir ve kadınlarda tedavi başarısı çok daha yüksektir. 2016 yılı itibari ile yapılan çalışmalarda erkeklerin kadınlara göre 1,6 kat daha fazla AML tanısı aldığı bildirilmiştir (YOKUŞ, 2022).

424 hasta ile yaptığımız retrospektif çalışmada cinsiyet için genel dağılıma baktığımızda 217 erkek hasta (%51,18), 207 kadın hasta (%48,82) olduğu görülmüş, erkek/kadın oranı ise 1:0,9 olarak bulunmuştur.

Tablo 16. AML Hastalarının Cinsiyet Dağılımı

Hasta grubu	Toplam hasta sayısı	Erkek		Kadın		Erkek/Kadın Oranı
		Hasta sayısı	%	Hasta sayısı	%	
AML hastası	424	217	%51,2	207	%48,8	1:0,9
FLT3 mutasyonu	32	13	%40,6	19	%59,4	1:0,6
t(8;21) mutasyonu	20	13	%65	7	%35	1:1,8
FLT3 ya da t(8;21) mutasyonu	52	26	%50	26	%50	1:1
FLT3 ve t(8;21) mutasyonu	1	0	0	1	%100	-

Literatürde AML hastaları ile yapılan çalışmalarda genellikle erkeklerin kadınlara göre daha yüksek oranda hastalığa yakalandıkları görülmekle birlikte durumun yaş ve ırk faktörlerinden etkilendiği de görülmektedir. Yahia Moualla ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda AML hastalarının yaklaşık %60'ı erkeklerden oluşurken, %40'ı kadınlardan oluşmaktadır. Yine Türk popülasyonunda yapılan çalışmalara bakıldığında

bir kısmında erkeklerin daha yüksek sıklıkla AML'ye yakalandıkları bazılarında ise oranın neredeyse eşit olduğuna dair veriler bulunmaktadır. Solmaz ve ark., (2015) yılında yaptığı çalışmada erkek/kadın oranı 1,05; Demir ve arkadaşlarının (2020) yaptıkları çalışmada 1,28; Alı ve arkadaşlarının (2002) yaptığı çalışmada ise 1,4 olarak bulunmuştur.

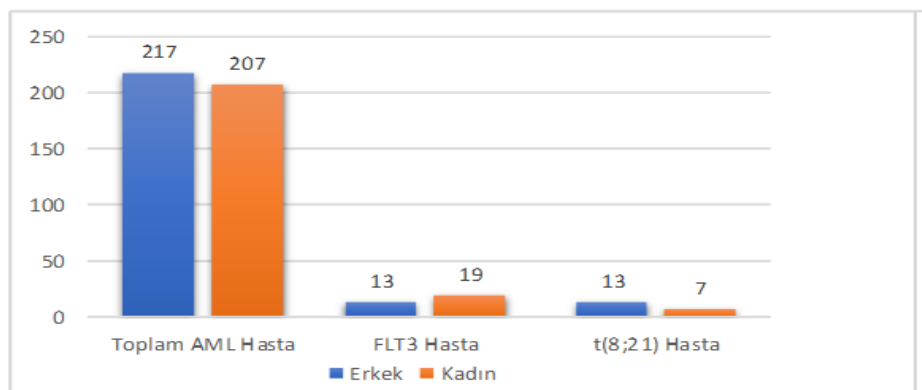
AML ile genel olarak yaş ve cinsiyet arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirildiğinde ne yaş ne de cinsiyetle arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

Benzer durum FLT3 mutasyonu taşıyan hastalar için de geçerliken, translokasyon taşıyan yalnızca erkek hastaların tüm AML hastalarından daha genç yaşta olduğu dikkat çekmektedir (Tablo 17.).

Tablo 17. AML Hastalarının Cinsiyete Bağlı İstatistiksel Analizi

Hasta grubu	Toplam hasta sayısı	Erkek		p	Kadın		p
		Hasta sayısı	Yaş ortalaması		Hasta sayısı	Yaş ortalaması	
AML hastası	424	217	50,12±20,87		207	48,54±19,12	
FLT3 mutasyonu	32	13	52,31±17,44	0,8418	19	44±20,66	0,3785
t(8;21) mutasyonu	20	13	26,67±18,15	<u>0,0003*</u>	7	41,13±20,70	0,1913

Test edilen herhangi bir mutasyonu taşıyan toplam 52 (%12,3) kişilik hasta grubunda ise 26 (%50) kadın, 26 (%50) erkek hasta gözlemlendi. Bu bağlamda mutasyon taşıma ve cinsiyet arasında herhangi bir bağlantı bulunamamıştır.



Şekil 4.2.1. Çalışmaya Alınan AML Hastalarında Cinsiyet Dağılımı

Bununla birlikte FLT3 mutasyonu taşıyan hastalar içerisinde kadınların, t(8;21) mutasyonu taşıyan hastalar arasında ise erkeklerin oranı daha yüksektir. Her ne kadar

AML görülme sıklığı açısından erkekler yüksek sıklık gösterse de literatürdeki meta-analiz çalışmalarında *FLT3* mutasyonlarının kadın baskın olarak izlendiği bildirilmiştir (Hellesoy ve ark, 2021). Bu durum bizim çalışmamızla da paralellik göstermektedir.

Aida Mahmoudi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; bizim çalışmamıza tezat olacak şekilde *FLT3* mutasyonlarının erkeklerde kadınlara göre daha yaygın olduğu bildirilmiştir.

Türk popülasyonunda yapılan çalışmalarda da buna benzer sonuçlar bildirilmiştir (Altay, 2021; Ceylan, 2021; Şimşek 2023). Ancak Türk popülasyonunda yapılan çalışmalarda *FLT3* mutasyonu taşıyan hastalarda bizim çalışmamızla paralellik arz edecek şekilde kadın hastaların oranının daha yüksek olduğuna dair veriler de mevcuttur (Fırat, 2005; Hızlı Kocabaş, 2010).

Tablo 18. AML Hastalarının Yaş ve Cinsiyet İlişkisi

Yaş aralığı	N:424	cinsiyet
Çocuk (0-17)	%8	K:%3,8 E:%4,2
Genç yetişkin (18-39)	%21	K:%10,2 E:%10,8
Orta yetişkin (40-64)	%46	K:%25,7 E:%19,8
Yaşlı (≥ 65)	%25	K:%9,2 E:%16,8

AML hastalarının yaş ve cinsiyet dağılımları Tablo 15’de görülmektedir. Tüm AML hastalarının çocuk ve genç yetişkin grubu içinde cinsiyet açısından bir farklılık görülmezken, orta yetişkin grupta kadınların, 65 yaş üstü hastalarda ise erkeklerin insidansının daha yüksek olduğu görülmektedir.

Tablo 19. t(8;21) Pozitif Olduğu Tespit Edilen AML Hastalarının Yaş ve Cinsiyet İlişkisi

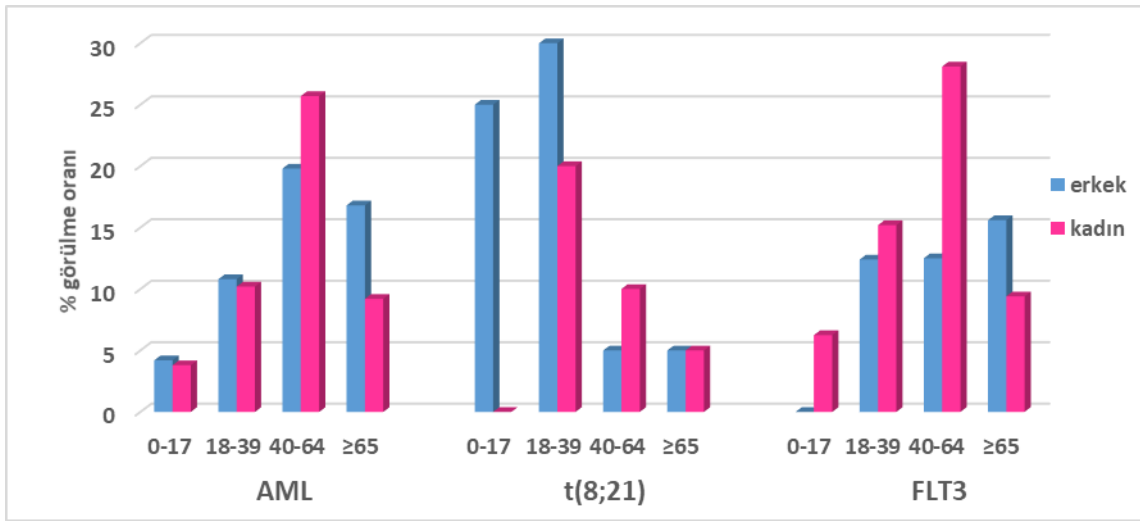
Yaş aralığı	N:20	cinsiyet
Çocuk (0-17)	%25	K:%0 E:%25
Genç yetişkin (18-39)	%50	K:%20 E:%30
Orta yetişkin (40-64)	%15	K:%10 E:%5
Yaşlı (≥65)	%10	K:%5 E:%5

t(8;21) pozitif olduğu tespit edilen AML hastalarının yaş ve cinsiyet ilişkisi Tablo 16'da verilmiştir. Buna göre çocuk ve genç yetişkin grupta erkeklerin frekansı yüksekken, orta yetişkin grupta kadın hastaların sayısı daha fazladır. Yaşlı grupta ise kadın erkek oranı eşit bulunmuştur. t(8;21) mutasyonu açısından yaş ile cinsiyet arasında dikkat çekici bir farklılık gözlenmemiştir.

FLT3 pozitif olduğu tespit edilen AML hastalarının yaş ve cinsiyet dağılımları Tablo 17'de görülmektedir. Buna göre FLT3 mutasyonları 65 yaş üstü hastalar dışında tüm yaş gruplarında kadınlarda daha yüksek oranda görülürken, 65 yaş üstünde erkeklerde daha yüksek sıklıkta görülmüştür. 65 yaş üstü grupta AML vakalarının erkeklerde sık görülmesine rağmen FLT3 mutasyonu taşıyanların kadınlardan oluşması dikkat çekicidir. Bu durum 65 yaş grubundaki mutasyonların FLT3 ya da t(8;21) dışında başka mutasyonların baskın olduğunu göstermektedir.

Tablo 20. FLT3 Pozitif Olduğu Tespit Edilen AML Hastalarının Yaş ve Cinsiyet İlişkisi

Yaş aralığı	N:32	cinsiyet
Çocuk (0-17)	%6,25	K:%6,25 E:%0
Genç yetişkin (18-39)	%28,1	K:%15,2 E:%12,4
Orta yetişkin (40-64)	%40,6	K:%28,1 E: %12,5
Yaşlı (≥65)	%25	K:%9,4 E: %15,6



Şekil 4.2.2. Çalışmaya Alınan AML Hastalarında Tespit Edilen Mutasyonlara Göre Yaş ve Cinsiyet İlişkisi

4.3. Çalışmalarda Kullanılan Numune Türü

AML (akut miyeloid lösemi) tanısında ve taramasında kullanılan numune türleri genellikle kan ve kemik iliği örnekleridir. İlk aşamada kan testleri ile başlanabilir çünkü lösemnin klinik bulgularına bakılarak kan dolaşımındaki belirtileri görülebilir. Kan testleri genellikle lösemi hücrelerinin varlığını veya belirli kan değerlerindeki değişiklikleri tespit etmeye yardımcı olabilir.

Kesin tanıda kemik iliği aspirasyonu önemlidir. Kemik iliği aspirasyonu ağır trombositopenide bile yapılabilir. Gerekirse kemik iliği biyopsisi uygulanabilir. WHO sınıflamasına göre kemik iliğinde blastların sayısı %20'nin üzerinde ise (çocuklarda bazı çalışma gruplarında >%30) AML tanısı konur. AML alt tiplerinin belirlenmesinde morfolojik (FAB), sitokimyasal, sitogenetik, immunfenotipleme ve moleküler çalışmalar gereklidir.

Yapılan literatür araştırmalarında deneyler kemik iliği örnekleriyle yapıldığı görülmüştür. Lösemi öncelikle kemik iliğinde aspire olan bir hastalık olsa da klinik bulgular değerlendirilirken kanda taşınımı sonucunda belirtiler ortaya çıkar. Bu nedenle yaptığımız tez çalışmasında t(8;21) ve FLT3 mutasyon deneylerini hem periferik kan hem de kemik iliği numuneleri kullanarak gerçekleştirdik. Ajeta Dash ve arkadaşları tarafından yapılan yayındaki veriler de göz önüne alınca bulgularımızla örtüştüğünü tespit ettik. Sonuç olarak mutasyonların periferik kan numunelerine göre kemik iliği numuneleriyle yapılan testlerde yaklaşık % 10,34 oranla daha net ve çoğunlukta olduğunu gözlemledik.

Kemik iliği aspirasyonu ufak cerrahi işlem gerektiren bir numune alım yöntemi olduğu için damar yoluna göre daha spesifik ve dikkatli olunması gerekir. Moleküler genetik yöntemleri kullanılarak yapılan testlerde mor kapak EDTA'lı kan tüpleri kullanılırken sitogenetik ve FISH yöntemleri için yeşil kapak heparinli kan tüpleri kullanılır. Tez çalışmamız esnasında çocuk kemik iliği numunelerinde bazı RT-PCR deneylerinde primer bağlanmama sıkıntısı yaşandı. Geriye dönük kontroller yapıldığında numune alımları yapılırken hem moleküler genetik hem de sitogenetik testlerin beraber bakılmasının istendiği hastalarda heparinli tüpe alınan kemik iliği numunesinin daha sonradan EDTA'lı tüpe paylaştırıldığı şüphesi yaşandı. Gerekli araştırmalar sonucunda heparin, antikoagülan bir ilaç olduğu için PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) gibi moleküler genetik tekniklerinde kullanılan enzimlerin aktivitesini etkileyebileceği görüldü. Heparin, DNA polimeraz enzimlerinin inhibisyonuna neden olabilir ve PCR verimliliğini düşürebilir. Bu durum, heparin içeren numunelerin doğru sonuçlar alınması açısından problem oluşturabilir.

4.4. AML Hastalarında Tespit Edilen Mutasyonlara Ait Veriler

Akut miyeloid lösemi (AML) tanısında FLT3 gen mutasyonlarının ve translokasyonların tespiti için çeşitli moleküler biyoloji teknikleri kullanılmaktadır. Aşağıda AML'de FLT3 ve translokasyon deneylerinde yaygın olarak kullanılan bazı yöntemler bulunmaktadır:

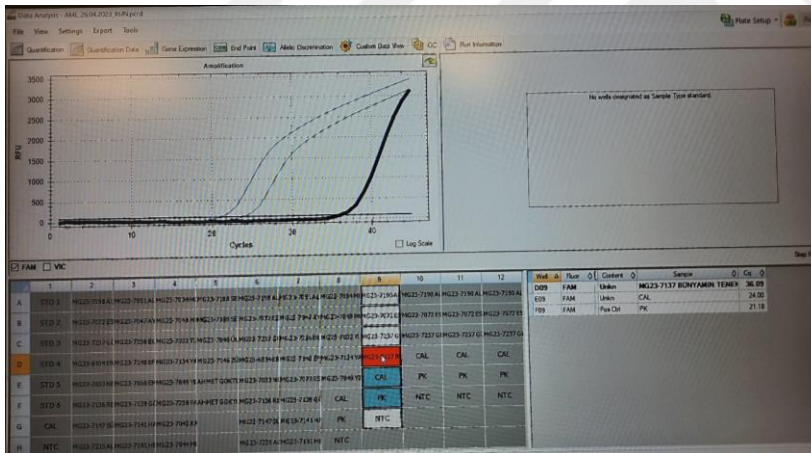
- **PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu):** FLT3 gen mutasyonlarının ve translokasyonların tespitinde PCR sıkça kullanılan bir yöntemdir. FLT3 içeren spesifik primerler kullanılarak mutasyonlu gen parçalarının amplifikasyonu yapılabilir.
- **Sanger Dizileme:** PCR ürünleri genellikle Sanger dizileme tekniği ile dizilir. Bu yöntem sayesinde FLT3 genindeki mutasyonların belirlenmesi mümkün olabilir.
- **FISH (Floresan in situ Hibridizasyon):** Translokasyonların tespitinde FISH tekniği kullanılabilir. Bu yöntemde floresan etiketli özel problemler, hücrelerdeki belirli genetik değişiklikleri tespit etmeye yardımcı olabilir.

- **RT-PCR (Ters Transkriptaz PCR):** Bazı translokasyonlar mRNA seviyesinde ifade edilebilir. Bu durumda, RT-PCR kullanılarak hedef translokasyonları tespit etmek mümkün olabilir.

Tez kapsamında yaptığımız deneylerde t(8;21) mutasyonu tespiti için RT-PCR, FLT3 mutasyonunun tespiti için ise PCR ve ardından Fragman analizi yöntemlerini kullandık.

4.4.1. t(8;21) Mutasyonunun Belirlenmesi

RT-PCR yöntemi kullanılarak Bio-Rad CFX-96 cihazında yapılan testlerde hastaların pozitif olduğunu raporlamak için gereken eşik değeri bulunur. Deney yapılırken t(8;21) translokasyonunun pozitiflik değeri bilinen bir pozitif kontrol PCR'a dahil edilerek yüzdelik sonuç verilir. Yaptığımız çalışmada t(8;21) kontrol bölgesinde (VIC) tüm hastalardan pik görmemiz gerekir. Mutasyon bölgesinde (FAM) ise sadece translokasyonun olduğu hastalarda pik görülmelidir. Kontrol bölgesinde görülen pik yüksekliği ile mutasyon bölgesinde görülen pik yüksekliği oranlanarak hastaların pozitiflik yüzdesi raporlanmıştır (Şekil 4.4.1.1).



Şekil 4.4.1.1. Bio-Rad CFX96 Cihazında t(8;21) Tespiti

RT-PCR kullanılarak yapılan t(8;21) taraması sonucunda 20 (%6,7) hastada mutasyon saptandı. Translokasyon varlığı tespit edilen 20 hastada çalışmaya alınan numune türlerinden 2 hastanın periferik kan numunesinde, 18 hastanın ise kemik iliği numunesinde pozitiflik görülmüştür.

t(8;21) mutasyonu AMLnin M2 sınıfı ile özdeşleşmiş olup, literatüre göre tüm AML vakaları içerisinde bu mutasyonu taşıyan hastaların oranının ortalama %4-8 olduğu görülmektedir (Reikvam, 2011).

Coşkunpınar ve ark. (2008) yaptığı 50 çocuk hasta ile yaptığı çalışmada t(8;21) mutasyonu taşıyan hastaların oranı %24 olarak bir hayli yüksek bulunmuştur. 2013 yılında 86 hasta ile yapılan bir başka çalışmada bu oran % 2,3 olarak bulunmuştur. Sayan ve arkadaşlarının 2013 yılında 147 yetişkin hasta ile yaptıkları çalışmada oran 0,7 gibi ufak bir değer olarak bulunurken, 2023 yılında 875 hasta ile yapılan bir diğer çalışmada %8 olarak belirlenmiştir. Bu değerler yorumlanırken hasta sayısı ve hastaların yaş aralıklarının oldukça önemli olduğu belirtilmelidir. Bizim çalışmamızda da ortaya çıktığı ve vurgulandığı gibi AML de görülen anomaliler yaş ile birlikte oldukça farklı sonuçlar ortaya koyabilmektedir. t(8;21) mutasyonunda olduğu gibi olumlu sitogenetik anormalliklere sahip AML insidansının yaşla birlikte azaldığı bilinir. t(8;21) mutasyonu genç hastalarda en yaygın olan ancak 60 yaşın üzerindeki hastalarda nadir olarak görülmektedir. Geniş bir yaş aralığında hastayı içeren çalışmamızda sonuçlarımız t(8;21) mutasyonu açısından %6,7 oranı ile literatürü doğrular nitelikte bulunmuştur. Yine literatürü doğrular şekilde çocuk ve genç yetişkin grupta bu mutasyonun oranının yaşlı gruba göre oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Bu mutasyon açısından yaş grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı fark görülmesi durumu doğrulamaktadır.

4.4.2. FLT3 Mutasyonunun Belirlenmesi

FLT3 mutasyon tespitinde genellikle PCR, jelde görüntüleme, Sanger dizi analizi, Fragman analizi ve NGS testleri kullanılır. Literatür araştırması esnasında Mohamed Amin Mekawy ve arkadaşlarının çalışmaları dahil FLT3 için yapılan deneylerde çoğunlukla jelde yürütme yöntemlerinin kullanıldığı görüldü. Literatürden farklı olarak ilk kez bizim yaptığımız tez çalışmasında FLT3 mutasyon tespiti için önce PCR ardından Fragman analizi yöntemleri kullanılarak biyoinformatik sistemle daha hızlı ve spesifik sonuçlar alındı. Bu çalışmayla birlikte kötü prognozda yer alan FLT3 mutasyonunda sağ kalımı arttırmak amaçlı Fragman analizinin verimli ve etkili bir yöntem olduğu savunuldu.

Fragman analizi yöntemiyle ABI-3500 cihazında yürütülen FLT3 PCR ürünleri yazılımsal olarak sonuç verir. Burada önemli olan hastanın kontrol ve mutasyon bölgelerinde pik görülmesidir. Kontrol bölgesinde (gri alan) görülen pikler çalışmaya alınan hastaların numunelerinde sorun olmadığını ve doğru bir şekilde PCR adımlarının yapıldığını gösterir.

FLT3 mutasyonu saptanan hastaların çalışmaya alınan numune türlerinde 3 hastanın periferik kan numunesinde pozitiflik görülürken 29 hastanın kemik iliği numunesinde pozitiflik görülmüştür.

FLT3 mutasyonları AML olgularında en sık görülen somatik mutasyondur. Kötü prognoz ile ilişkili olan bu mutasyonlar hastalığın tedavisi sırasında klinisyene önemli bilgiler sunmaktadır. Literatürde AML olgularının %20-25'sinde bu gene ait somatik mutasyon bulunduğu bildirilmektedir (Kennedy, 2020). Ancak farklı hasta gruplarında yapılan çalışmalarda bu oranın literatürden saptığı da görülmektedir (papaemanil,2016; Welch,2016). Türk popülasyonunda yapılan çalışmalarda da hasta sayısı ve yaşının değişimine bağlı olarak bu oranın oldukça değişken olduğu görülmüştür. Leblebisatan (2008), Fırat (2005) ve Coşkunpınar (2008) tarafından Çocuk hastalarla yapılan çalışmalarda AML hastalarında FLT3 mutasyonu frekansı %25, %20,8 ve %6 gibi oldukça farklı veriler bildirilmiştir. Bununla birlikte bizim çalışmamızda olduğu gibi geniş yaş aralığıyla yapılan çalışmalarda oran %10-53 aralığında seyretmektedir. (Şimşek 2023, Kahya, 2023, Başakın, 2022, Altay, 2021, Sayan, 2016). Bizim çalışmamızda PCR ve Fragman analizi yöntemleri birlikte kullanılarak yapılan FLT3 taraması sonucunda 32 (%11,3) hastada mutasyon saptandı. Literatürle karşılaştırıldığında çalışmamızda FLT3 görülme sıklığının düşük olduğu görülmektedir. FLT3 mutasyonları içerisinde en çok karşılaşılan 2 mutasyon tipi FLT3-ITD ve FLT3-TKD/D835 mutasyonlarıdır. Bu mutasyonlar FLT3'ün yüksek aktivasyonu ile sonuçlanır. FLT3-ITD, reseptörün jukstamembran alanındaki (JM) tandem duplikasyonları (ITD'ler), FLT3-TKD/D835 ise ikinci tirozin kinaz alanındaki (TKD) aktive edici nokta mutasyonlarını belirtmektedir (Leung ve diğerleri, 2013). Hem Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı kılavuzu hem de Avrupa Lösemi Derneği yönergeleri, tedavi seçenekleri değerlendirilirken FLT3 genetik testinin yapılması gerekliliğini önerir. Ayrıca Avrupa Lösemi Derneği; genel olarak birçok merkezde yapılan FLT3-ITD taraması ile birlikte, klinisyenlerce teknik sorunlar nedeniyle yapılması daha az tercih edilen D835 gibi nokta mutasyonlarının da değerlendirilmesini önerir (Daver, 2019). Literatürde AML'li hastalarda yapılan çalışmalarda genel olarak bu mutasyonlardan FLT3-ITD'nin %20-25 oranında, FLT3-TKD/D835'nin ise %5-10 oranında görüldüğü rapor edilmiştir (Sohort, 2010).

Bizim çalışmamızda FLT3 mutasyonu saptanan 32 hastanın 22'sinde (%68,75) FLT3-ITD, 10'unda (%31,25) ise FLT3-TKD/D835 nokta mutasyonu görüldü. Tüm AML

vakaları içerisinde FLT3-ITD mutasyonunun %7,77 oranında görülürken, FLT3-TKD/D835 mutasyonunun %3,53 oranında görüldüğü belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar FLT3 mutasyonlarının toplam görülme sıklığında olduğu gibi literatürden oldukça düşük oranda görülmüştür. Bununla birlikte literatürle paralellik arz edecek şekilde çalışmamızda da FLT3-ITD mutasyonunun FLT3-TKD/D835 mutasyonuna oranla daha sık olduğu da gösterilmiştir. Türk popülasyonunda yapılan bazı çalışmalarda bizim çalışmamızla benzer şekilde bu mutasyonların literatürden daha düşük oranda görüldüğüne dair veriler de söz konusudur. Altay'ın 2021 yılında 71 hasta ile yaptığı çalışmada FLT3-ITD taşıyan hastalar %5,6 ve FLT3-TKD/D835 taşıyan hastalar %2,8 oranında bulunurken; Kahya'nın 2023 yılında 875 hasta ile yapmış olduğu çalışmada FLT3-ITD taşıyan hastaların %7,6 ve FLT3-TKD/D835 taşıyan hastaların ise %2,4 oranında olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızda ayrıca FLT3-ITD pozitif 22 hastanın 3'ünde nadir olarak karşılaşılan mutant bölgede 2 pozitif pik görülmüştür. Bu durum karşısında primer temin edilen firma ve sorumlu doktorlarımıza danışılarak hastaya 2 farklı ITD pozitif yüzdeler sonucunu verilmiştir. Böyle bir mutasyon sonucunda hastanın kötü prognozda yer aldığı, klinisyene hızlı sonuç verilerek hastaya erken kemoterapik tedavinin başlanması gerektiği, ayrıca NGS ile hastaya farklı bir test yöntemi uygulanarak devamlı takibe alınmasının önemi söz konusudur.

AML hastalarında farklı prognozda yer alan mutasyonlar beraber görülebilmektedir. Örneğin NPM1, inv16, t(8;21) testleri pozitif çıkan hastalarda aynı zamanda FLT3 mutasyonu da pozitif sonuç verebilir. Torsten Haferlach ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; AML nokta mutasyonu olan NPM1 ve FLT3 mutasyonlarının birlikte pozitif görülme oranlarının negatif sonuçlara göre artarak ilerlediğini göstermiştir. Yaptığımız retrospektif çalışmada yer alan 184 ortak hastadan sadece 1 hastada (%0,7) hem FLT3 mutasyonu hem de t(8;21) translokasyonu beraber pozitif olarak görülmüştür. Elde edilen bu sonuca göre taranan popülasyon açısından FLT3 ve t(8;21) mutasyonlarının birlikte görülme sıklığının düşük olduğu söylenebilmektedir. Literatürde iki mutasyonun eşlikçi olma sıklığının değerlendirildiği çalışmalar sınırlı olmakla birlikte FLT3 mutasyonları, t(8;21) hastalarının nispeten düşük sıklıkta olduğu ve bu hastaların kötü prognoza sahip olduğu rapor edilmiştir. (Al-harbi, 2020). Yapılan çalışmalarda FLT3-ITD %5, FLT3-TKD % 3-7 oranında translokasyonla bağlantılı bulunmuştur (Mrózek,2008; Paschka,2009). Duployez ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada t(8;21) taşıyan AML vakalarının %96'sının ek sitogenetik veya mutasyonel anormallikler

taşıdığını ve FLT3-ITD eşlikçi olma oranının %26 olduğunu rapor etmiştir. Kahya ve arkadaşlarının 2023 yılında 875 hasta ile yaptıkları çalışmada ise FLT3 ve t(8;21) mutasyonlarının birlikte görülme sıklığı %8 olarak belirlenmiştir.



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamız 01.09.2022 - 25.08.2023 tarihleri arasında AML ön tanısı alan 424 hastanın t(8;21) ve FLT3 mutasyon sıklığını ve iki mutasyonun bir arada görülme olasılığının belirlenmesini amaçlamaktadır. Elde ettiğimiz önemli sonuçlar aşağıda özetlenmiş ve bu sonuçlara göre bazı önermeler yapılmıştır.

- t(8;21) translokasyonunun test edilen 299 AML hastası içinde görülme sıklığı % 4,7 (20 hasta), FLT3 mutasyonunun ise test edilen 283 AML hastasında görülme sıklığı % 7,5 (32 hasta) bulunmuştur.
- FLT3 mutasyonu saptanan 32 hastanın 22'sinde (%7,77) FLT3-ITD , 10'unda (%3,53) FLT3-TKD/D835 nokta mutasyonu görüldü.
- t(8;21) mutasyonu açısından pozitiflik saptanan hastaların %4,3 oranında erkek, %2,3 oranında kadın olduğu belirlenmiş olup literatürle uyumludur.
- FLT3 mutasyonu açısından pozitiflik saptanan hastaların %4,59'u erkek, %6,71'i ise kadın hastalardan oluşmaktadır ve literatürü destekler nitelikte sonuçlardır.
- t(8;21) mutasyonu açısından pozitiflik saptanan hastaların
 - yaş ortalaması **32,45±20,03**
 - %65 oranında erkek
 - %35 oranında kadın olduğu belirlenmiştir. Bu mutasyonu taşıyan hastaların tipik AML hastalarından daha genç olduğu dikkat çekmektedir.
- FLT3 mutasyonu açısından pozitiflik saptanan hastaların
 - yaş ortalaması **46,41±19,18**
 - %41'i erkek
 - %59'u kadın hastalardan oluşmaktadır. Bu mutasyonu taşıyan hastaların sonuçları literatürü destekler niteliktedir.
- Çalışmamızda ayrıca FLT3-ITD pozitif 22 hastanın 3'ünde nadir olarak karşılaşılan mutant bölgede 2 pozitif pik görülmüştür. Bu tip sonuçlar alınan hastaların mutasyonun tipinin belirlenmesine yönelik ek testlerle değerlendirilmesi gerektiği ve protokollerin buna yönelik ilerletilmesi gerekliliği vurgulanmıştır.
- Çalışmamızda FLT3 ve t(8;21) mutasyonları arasında bağlantı kurmaya yetecek kadar hasta olmadığı için bu tip bir durumun hastalığın seyri ve tedavi

planlaması ile ilgili yorum yapılamamıştır. Ancak elde ettiğimiz sonuç biri iyi diğeri kötü prognozla bağlantısı bilinen iki mutasyonun bir arada bulunma sıklığının düşük oluşuyla ilgili literatüre katkı sağlamaktadır. Daha çok hasta sayısının olduğu çalışmalar ile hastalığın seyrinin bu tip bir durumda nasıl ilerleyeceği ile ilgili daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Sonuç olarak, AML'deki t(8;21) ve FLT3 mutasyonu varlığı hasta prognozunu etkilediği için şüphe duyulan her ön tanımlı AML hastasının en hızlı yöntemlerle tespit edilmesi gerekmektedir. Özellikle kötü prognozda yer alan FLT3 mutasyonu varlığı tespit edilen AML hastaların, tedaviye erken başlanması gerektiği için 3 gün içerisinde sözlü veya raporlu olarak sonuçlarının mutlaka doktoruna bilgi verilmesi gerekmektedir. Mutasyonun pozitiflik yüzdesi hastaya uygulanacak tedavide ilaç kullanımını etkileyeceğinden tarama analizi yapılırken hassas ve kontrollü çalışma gerçekleştirilmelidir.

Hastalarda pozitiflik yüzdesinin kemik iliği ile yapılan taramalarda daha yüksek çıktığı görülmüştür. Bu nedenle AML şüphesi olan hastalardan mümkün olduğunca kemik iliği numunesi alınarak tarama yapılmasının sonuçlarda daha doğru ve tespit edilebilirliği yüksek değerler elde edilmesini sağlayacaktır.



KAYNAKLAR

- Abdel-Aziz, A. K., Dokla, E. M. E., & Saadeldin, M. K. (2023). FLT3 inhibitors and novel therapeutic strategies to reverse AML resistance: An updated comprehensive review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 191, 104139. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2023.104139>
- Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, et al. Identification of novel FLT3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukemia. *Br J Haematol* 2001;113:983-988
- Açar İH, Dinçyürek HD, Sönmezler Ö, Bişgin A, Menziletoğlu Yıldız Ş, Güvenç B. Investigating FLT3 Mutations in Acute Myeloid Leukemia: A Single-Center Real-World Data Study on Patient Outcomes and Treatment Strategies. *DEU Tıp Derg.* 2023;37(2):191-8. - Açar İH, Dinçyürek HD, Sönmezler Ö, Bişgin A, Menziletoğlu Yıldız Ş, Güvenç B. Akut Miyeloid Lösemide FLT3 Mutasyonlarının İncelenmesi: Hasta Sonuçları ve Tedavi Stratejileri Üzerine Tek Merkezli Gerçek Dünya Veri Çalışması. *DEÜ Tıp Derg.* 2023; 37(2):191-8.
- Adan, A., & Ersöz, N. Ş. (2020). Cytotoxic Effects of Resveratrol and Its Combinations with Ceramide Metabolism Inhibitors on FLT3 Positive Acute Myeloid Leukemia [Resveratrol ve Seramid Metabolizması Enzim İnhibitörleri İle Kombinasyonlarının FLT3 Pozitif Akut Miyeloid Lösemideki Sitotoksik Etkileri]. *Erzincan University Journal of Science and Technology*, 13(3), 1205-1216. <https://doi.org/10.18185/erzifbed.764085>
- Akkanat Karagil, F. M. ve Harmancı, H. (2022). Kanser tanısı alan birey ve ailesinde ruh sağlığı. *Karatay Sosyal Araştırmalar Dergisi*, (9), 63-90. DOI: <https://doi.org/10.54557/karataysad.1172368>
- AKFIRAT, H., & UYSAL, A. (2005). Akut Miyeloblastik Lösemi'li Hastalarda Flt3 Duplikasyon Ve Mutasyonlarının Saptanması.
- Alı R, Özkalemkaç F, Özkocaman V, Özçelik T, Ozan Ü, Tunali A, Tıp Fakültesi Geç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı U, Üniversitesi Tıp Fakültesi Geç Hastalıkları Hematoloji Bilim Dalında U. Güney Marmara Bölgesi Akut Miyeloid Löseminin Epidemiyolojik Özellikleri. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Derg.* 2002; 28: 33-37.
- Altay, G. (2021). Akut myeloid lösemi hastalarında FLT3 ve NPM1 gen mutasyonlarının sıklığının belirlenmesi ve klinik öneminin araştırılması Kocaeli Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü].
- Anak, S., & Uysalol, E. (2012). Akut Miyeloid Lösemi AML. *Journal of Child*, 12(4), 153-158.
- Armstrong SA, Mabon ME, Silverman LB, et al. FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2004;103:3544-3546
- Bachman, J. (2013). Chapter Two - Reverse-Transcription PCR (RT-PCR). In J. Lorsch (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 530, pp. 67-74). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420037-1.00002-6>
- Başakın,Z.,(2022),YAŞLI AKUT MİYELOİD LÖSEMİ HASTALARINDA FLT3, NPM1 VE CEBPA MUTASYONLARININ SIKLIĞI, SAĞ KALIM VE KEMOTERAPİ YANITINA ETKİSİ,46.
- BAŞER, S. (2013). Pediyatrik AML hastalarında FMS like tyrosin kinase 3 (FLT3) ve nücleophosmin 1 (NPM1) mutasyonları / Fms-like thyrosine kinase 3 (FLT3) and nucleophosmin 1 (NPM1) mutations in pediatric AML. (Ankara Üniversitesi / Tıp Fakültesi / Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı), 188 s.
- Baykara, O. (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(3), 154-165.
- Baysal, M., Alkis, N., & Baysal, S. (2021). Experience with FLT3 Inhibitor Midostaurin in Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia Patients. *Turkish Journal of*

- Internal Medicine, 3(Supplement 1), 17-19.
<https://doi.org/10.46310/tjim.873515>
- Bloom, L.-F., Klinefelter, D.-B., & Shwachman-Diamond, K. ÇOCUK VE GENÇLERDE AKUT MİYELOİD LÖSEMİDE TANI VE TEDAVİ REHBERİ.
- Ceylan, G.S., (2021). Akut Myeloid Lösemi Tanılı Olgularda Yeni Nesil Dizileme'de Myeloid Panel Analizi İle Saptanan Mutasyon Profili, İmmunhistokimyasal Belirteçler Ve Klinikopatolojik Korelasyon Değerlendirmeleri, 172.
- Chen, Y., Pan, Y., Guo, Y., Zhao, W., Ho, W. T., Wang, J., Xu, M., Yang, F. C., & Zhao, Z. J. (2017). Tyrosine kinase inhibitors targeting FLT3 in the treatment of acute myeloid leukemia. *Stem cell investigation*, 4, 48.
<https://doi.org/10.21037/sci.2017.05.04>
- Choudhary C, Müller-Tidow C, Berdel WE, et al. Signal transduction of oncogenic FLT3. *Int J Hematol* 2005;82:93-99
- Coleman, D. J. L., Keane, P., Luque-Martin, R., Chin, P. S., Blair, H., Ames, L., Kellaway, S. G., Griffin, J., Holmes, E., Potluri, S., Assi, S. A., Bushweller, J., Heidenreich, O., Cockerill, P. N., & Bonifer, C. (2023). Gene regulatory network analysis predicts cooperating transcription factor regulons required for FLT3-ITD+ AML growth. *Cell Reports*, 42(12), 113568.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113568>
- ÇETİNGÜL, B. D. P. D. N. (2009). Çocukluk çağı lösemilerinde FLT3 ve WT1 mutasyonları / Çocukluk çağı lösemilerinde FLT3 ve WT1 mutasyonları. (Tıpta Uzmanlık), 64 s.
- Dave BJ, Wiggins M, Higgins CM, Pickering DL, Perry D, Aoun P, Abromowich M, Vetten MD, Sanger WG. 9q34 Rearrangements in BCR/ABL fusion-negative acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005 Oct; 162(1):30-37.
- Daver N, Schlenk RF, Russell NH, Levis MJ. Targeting FLT3 mutations in AML. review of current knowledge and evidence. *Leukemia.* 2019; 33(2): 299-312.
- Roboz, G.J., Novel approaches to the treatment of acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2011. 2011: p. 43-50.
- Demir, A. (2014). Çocukluk çağı akut lösemilerinin retrospektif olarak değerlendirilmesi.
- Demir D, Vural F, Özsan N, Demir E, Keklik F, PaÇayev T, Soyer NA, Hekimgil M, Saydam G, Üniversitesi E, Fakültesi T, Patoloji T, Dalı A, Dalı HB, Dalı KA. Ege Üniversitesi hastanesi veri tabanında kayıtlı erişkin akut lösemi olgularının epidemiyolojik ve genel sağkalım özelliklerinin retrospektif olarak değerlendirilmesi. *Ege Tıp Derg.* 2020; 59: 79-88.
- Drexler HG, Quentmeier H. FLT3: Receptor and ligand. *Growth factors* 2004;22:71-73
- Doğan, M., Eröz, R., Yüce, H., & Özmerdivenli, R. (2017). Yeni Nesil Dizileme (YND) hakkında bilinenler (literatür taraması). *Duzce Medical Journal*, 19(1), 27-30.
- Dong, Y., Shi, O., Zeng, Q., Lu, X., Wang, W., Li, Y., & Wang, Q. (2020). Leukemia incidence trends at the global, regional, and national level between 1990 and 2017. *Experimental hematology & oncology*, 9, 14.
<https://doi.org/10.1186/s40164-020-00170-6>
- Duployez N, Marceau-Renaut A, Boissel N, et al. Comprehensive mutational profiling of core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood.* 2016; 127(20):2451-2459
- Ersöz, N. Ş., & Adan, A. (2020). Resveratrol ve Seramid Metabolizması Enzim İnhibitörleri İle Kombinasyonlarının FLT3 Pozitif Akut Miyeloid Lösemideki Sitotoksik Etkileri. *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(3), 1205-1216. <https://doi.org/10.18185/erzifbed.764085>

- Gönül, O. (2016). Akut Miyeloid Lösemi ve Moleküler Genetik Belirteçler. *Türkiye Klinikleri J Med Genet-Special Topics*, 1(1), 125-132.
- Griffith, J., Black, J., Faerman, C., Swenson, L., Wynn, M., Lu, F., Lippke, J., & Saxena, K. (2004). The Structural Basis for Autoinhibition of FLT3 by the Juxtamembrane Domain. *Molecular Cell*, 13(2), 169-178. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00505-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00505-7)
- Gündüz C, Tezcanlı Kaymaz B, Bozok Çetintaş V, Tetik Vardarlı A, Yılmaz Süslüer S, Aygüneş D, Şahin F, Aydınok Y, Küçükaşlan AŞ, Balcı T, Kayabaşı Ç, Özmen Yelken B, Selvi Günel N, Biray Avcı Ç, Kosova B, Eroğlu Z, Aksoylar S, Çetingül N, Balkan C, Yılmaz D, Kavaklı K, Töbü M, Tombuloğlu M, Büyükkeçeci F, Saydam G. Lösemilerde t(9;22) BCR-ABL Translokasyonunun Real-Time RT-PCR ile 10 Yıllık Sonuçlarının Retrospektif Değerlendirilmesi. *J DEU Med*. 2016;30(2):55-9.
- Hellesøy M, Engen C, Grob T, et al. Sex disparity in acute myeloid leukaemia with FLT3 internal tandem duplication mutations: implications for prognosis. *Mol Oncol* 2021;15:2285–2299. doi:10.1002/1878-0261.13035.
- Hızlı Karabacak, B. (2010). Çocukluk çağı lösemilerinde FLT-3 mutasyonları ve prognoz ile ilişkileri.
- Iwai T, Yokota S, Nakao M, et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene and clinical evaluation in childhood acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1999;13:38-43
- Kahya, H.F.(2023). Yetişkin akut miyeloid lösemili hastalarda çalışılan moleküler testlerin retrospektif olarak değerlendirilmesi / Retrospective evaluation of molecular tests studied in adult acute myeloid leukemia patients,97s.
- Kaya, T. (2009). Myelodisplastik sendromlu hastaların retrospektif değerlendirilmesi.
- Kennedy VE, Smith CC. FLT3 Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Key Concepts and Emerging Controversies. *Front Oncol* 2020;10:612880. doi:10.3389/fonc.2020.612880.
- Kottaridis D, Gale RE, Linch DC. FLT3 mutations and leukemia. *Br J Haematol* 2003;122:523-538
- Kumar, D., Mehta, A., Panigrahi, M. K., Nath, S., & Saikia, K. K. (2018). NPM1 mutation analysis in acute myeloid leukemia: Comparison of three techniques- sanger sequencing, pyrosequencing, and real-time polymerase chain reaction. *Turkish journal of hematology*, 35(1), 49.
- Laura J. Anderson, Mariam Girguis, Elise Kim, Jitesh Shewale, Megan Braunlin, Winifred Werther, Juliana E. Hidalgo-Lopez, Faraz Zaman & Christopher Kim (27 Jun 2024): A temporal and multinational assessment of acute myeloid leukemia (AML) cancer incidence, survival, and disease burden, *Leukemia & Lymphoma*, DOI: 10.1080/10428194.2024.2360536
- Leblebisatan G, Kılınç Y. Çocukluk Çağı Akut Lösemilerinde FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3) Mutasyonları. *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Yandal Uzmanlık Tezi* 2008
- Liang DC, Shih LY, Hung IJ, et al. FLT3-TKD mutation in childhood acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2003;17:883-886
- Li Y, Shao H, Fu B. Coexistence of t(5;17)/NPM1-RARA and t(9;22)/BCR-ABL1 in chronic myeloid leukemia at initial diagnosis. *Ann Hematol*, 2019; 98: 13191321.
- Long, J., Chen, X., Shen, Y., Lei, Y., Mu, L., Wang, Z., Xiang, R., Gao, W., Wang, L., Wang, L., Jiang, J., Zhang, W., Lu, H., Dong, Y., Ding, Y., Zhu, H., Hong, D., Sun, Y. E., Hu, J., & Liang, A. (2023). A combinatorial therapeutic approach to

- enhance FLT3-ITD AML treatment. *Cell Reports Medicine*, 4(11), 101286. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2023.101286>
- Lyman, S. D., James, L., Zappone, J., Sleath, P. R., Beckmann, M. P., & Bird, T. (1993). Characterization of the protein encoded by the *flt3* (*flk2*) receptor-like tyrosine kinase gene. *Oncogene*, 8(4), 815–822.
- Metzeler KH, Bloomfield CD. Clinical relevance of RUNX1 and CBFβ alterations in acute myeloid Leukemia and other hematological disorders. *Adv Exp Med Biol*, 2017; 962: 175-199.
- Meyer SE, Qin T, Muench DE, Masuda K, Venkatasubramanian M, Orr E, Suarez L, Gore SD, Delwel R, Paietta E, Tallman MS, Fernandez H, Melnick A, Le Beau MM, Kogan S, Salomonis N, Figueroa ME, Grimes HL. DNMT3A Haploinsufficiency Transforms FLT3ITD Myeloproliferative Disease into a Rapid, Spontaneous, and Fully Penetrant Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Discov*, 2016; 6: 501-515.
- Mitterbauer M, Kusec R, Schwarzingler I, Haas OA, Lechner K, Jaeger U. Comparison of karyotype analysis and RT-PCR for AML1/ETO in 204 unselected patients with AML. *Ann Hematol*, 1998; 76: 139-143.
- Motyko, E., Kirienko, A., Kustova, D., Prygunova, M., Uspenskaya, O., Karyagina, E., Shuvaev, V., Voloshin, S., Sidorkevich, S., & Martynkevich, I. (2023). AML-395 Genomic Landscape of Acute Myeloid Leukemia With t(8;21) and inv(16). *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, 23, S295-S296. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2152-2650\(23\)01051-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2152-2650(23)01051-0)
- Mrózek K. and Bloomfield C. D., Clinical significance of the most common chromosome translocations in adult acute myeloid leukemia, *Journal of the National Cancer Institute—Monographs*. (2008) no. 39, 52–57, 2-s2.0-52149092181, <https://doi.org/10.1093/jncimonographs/lgn003>.
- OKUTUCU, B., & PEHLİVAN, S. (2003). Reverz-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve Uygulama Alanları. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 12(2).
- ÖZBEK, D. U., & COŞKUNPINAR, E. M. (2008). ÇOCUKLUK ÇAĞI AKUT MYELOİD LÖSEMİ HASTALARINDA KROMOZOMAL DEĞİŞİKLİKLER VE.
- Özcan, G. A. (2019). Çocukluk çağı lösemilerinde sitogenetik ve moleküler sitogenetik bulguların retrospektif olarak değerlendirilmesi Necmettin Erbakan University (Turkey)].
- Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2016;374:2209–2221. doi:10.1056/NEJMoa1516192.
- Paschka P, Du J, Schlenk R. F. et al., Mutations in the Fms-related tyrosine kinase 3 (FLT3) gene independently predict poor outcome in acute myeloid leukemia (AML) with t(8;21): a study of the outcome in acute myeloid leukemia (AML) with t(8;21): a study of the German-Austrian AML Study Group (AMLSG), *ASH Annual Meeting Abstracts*. (2009) 114, no. 22, abstract no 825.
- Pelcovits A, Niroula R. Acute Myeloid Leukemia: A Review. *R I Med J* (2013), 2020; 103: 38-40.
- Peterson L. F., Boyapati A., Ahn E. Y., Biggs J. R., Akiko J. O., Lo M. C., Yan M., and Zhang D. E., Acute myeloid leukemia with the 8q22;21q22 translocation: secondary mutational events and alternative t(8;21) transcripts, *Blood*. (2007) 110, no. 3, 799–805, 2-s2.0-34547941839, <https://doi.org/10.1182/blood-2006-11-019265>.

- Rhoades KL, Hetherington CJ, Harakawa N, Yergeau DA, Zhou L, Liu L-Q, Little MT, Tenen DG, Zhang D-E. Analysis of the role of AML1-ETO in leukemogenesis, using an inducible transgenic mouse model. *Blood*, 2000; 96: 2108-2115.
- Rocquain J, Carbuccia N, Trouplin V, Raynaud S, Murati A, Nezri M, Tadrst Z, Olschwang S, Vey N, Birnbaum D, Gelsi-Boyer V, Mozziconacci M-J. Combined mutations of ASXL1, CBL, FLT3, IDH1, IDH2, JAK2, KRAS, NPM1, NRAS, RUNX1, TET2 and WT1 genes in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *BMC Cancer*, 2010; 10: 401.
- Schessl C., Rawat V. P. S., Cusan M., Deshpande A., Kohl T. M., Rosten P. M., Spiekermann K., Humphries R. K., Schnittger S., Kern W., Hiddemann W., Quintanilla-Martinez L., Bohlander S. K., Feuring-Buske M., and Buske C., The AML1-ETO fusion gene and the FLT3 length mutation collaborate in inducing acute leukemia in mice, *Journal of Clinical Investigation*. (2005) 115, no. 8, 2159–2168, 2-s2.0-23644454231, <https://doi.org/10.1172/JCI24225>.
- Schneider, F., Hoster, E., Unterhalt, M., Schneider, S., Dufour, A., Benthaus, T., Mellert, G., Zellmeier, E., Bohlander, S. K., Feuring-Buske, M., Buske, C., Braess, J., Heinecke, A., Sauerland, M. C., Berdel, W. E., Buechner, T., Hiddemann, W., & Spiekermann, K. (2008). Age-Dependent Frequencies of NPM-1/FLT3-ITD Mutations in Patients with Normal Karyotype AML. *Blood*, 112(11), 2531. <https://doi.org/https://doi.org/10.1182/blood.V112.11.2531.2531>
- Short NJ, Kantarjian H, Ravandi F, Daver N. Emerging treatment paradigms with FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia. *Therapeutic Advances in Hematology*. 2019; 10.
- Shuojie Liu, Bin Hu & Jiaqin Zhang (2024) Epidemiological characteristics and influencing factors of acute leukemia in children and adolescents and adults: a large population-based study, *Hematology*, 29:1, 2327916, DOI: 10.1080/16078454.2024.2327916
- Solmaz Medeni Ş, S. Ö., Acar C, Türkyılmaz D, Yiğit Kaya S, Tunalı S, Alacacıoğlu İ, Pişkin Ö, Demirkan F, Özsan GH, Özcan MA, Ündar B. (2015). Akut Myeloid Lösemi Hastalarımızın Retrospektif Değerlendirilmesi. *DEU Tıp Derg.*, 29(2), 65-69.
- Şimşek, B.,(2023). Akut Myeloid Lösemi (Aml) Ve Myelodisplastik Neoplazi (Mds) Olgularında Yeni Nesil Dizileme (Ynd-Ngs) Yöntemi İle Genetik Değişikliklerin Saptanması, Dökümlenmesi Ve Klinik Bulguları İle Karşılaştırılması.
- Uçunoğlu, N. (2011). Akut miyeloid lösemili hastalarda NPM1 ve FLT3 genlerindeki moleküler değişikliklerin araştırılması Sağlık Bilimleri Enstitüsü].
- Ulaş BB, Topçuoğlu P. Akut miyeloid lösemi tedavisinde yeni ilaçlar. *LLM Dergi* 2019;3(4):67-75.
- Üstek, D., Abacı, N., Sırma, S., Çakiris, A. (2011). Yeni Nesil DNA Dizileme. *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 1(1), 11-18.
- Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 2009; 114: 937-951.
- Waack, K., Andernacht, K., Walter, C., Schneider, M., Von Neuhoff, N., Hahn, S., Awada, A., & Reinhardt, D. (2022). Molecular Relapse in Pediatric AML: Clinical Relapse May be Predicted By Increasingin MRD Level - Experiences from Real-World Data in Patients with Inv(16), t(8;21), t(9;11), t(10;11) or

- NPM1. *Blood*, 140, 6326-6327. <https://doi.org/https://doi.org/10.1182/blood-2022-169495>
- Wallace, L. K., Peplinski, J. H., Ries, R. E., Huang, B. J., Ma, X., Furlan, S. N., Kirkey, D. C., & Meshinchi, S. (2023). Identification of a Relapse Signature in t(8;21) Pediatric AML. *Blood*, 142, 4318. <https://doi.org/https://doi.org/10.1182/blood-2023-189817>
- Wang YY, Zhao LJ, Wu CF, Liu P, Shi L, Liang Y, Xiong SM, Mi JQ, Chen Z, Ren R, Chen SJ. C-KIT mutation cooperates with full-length AML1-ETO to induce acute myeloid leukemia in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011; 108: 2450-2455.
- Welch JS, Petti AA, Miller CA, et al. TP53 and Decitabine in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med* 2016;375:2023–2036. doi:10.1056/NEJMoa1605949.
- Yamamoto, Y., Kiyoi, H., Nakano, Y., Suzuki, R., Kidera, Y., Miyawaki, S., Asou, N., Kuriyama, K., Yagasaki, F., Shimazaki, C., Akiyama, H., Saito, K., Nishimura, M., Motoji, T., Shinagawa, K., Takeshita, A., Saito, H., Ueda, R., Ohno, R., & Naoe, T. (2001). Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*, 97(8), 2434-2439. <https://doi.org/10.1182/blood.v97.8.2434>
- Yanada M, Matsuo K, Suzuki T, et al. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations for acute myeloid leukemia: a meta analysis. *Leukemia* 2005;19:1345-1349
- Yöntem, A., & Bayram, İ. (2018). Çocukluk Çağında Akut Myeloid Lösemi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 27(2), 127-135.
- YOKUŞ, Z. B. D. D. O. (2022). Yaşlı akut miyeloid lösemi hastalarında FLT3, NPM1 ve CEBPA mutasyonlarının sıklığı, sağ kalım ve kemoterapi yanıtına etkisi / Frequency of FLT3, NPM1 and CEBPA mutations in elderly acute myeloid leukemia patients, effect on survival and chemotherapy response. (Sağlık Bilimleri Üniversitesi / Bağcılar Eğitim ve Araştırma Hastanesi / İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı / İç Hastalıkları Bilim Dalı), 58 s.
- Yuan Y, Zhou L, Miyamoto T, Iwasaki H, Harakawa N, Hetherington CJ, Burel SA, Lagasse E, Weissman IL, Akashi K, Zhang DE. AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001; 98: 10398-10403
- Yümlü, K. (2009). Çocukluk çağı akut lösemi vakalarının retrospektif olarak değerlendirilmesi.
- Zeisig BB, Kulasekararaj AG, Mufti GJ, Eric So CW. SnapShot: Acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*, 2012; 22:.
- Zhang, Z., Yin, J., Lian, G., Bao, X., Hu, M., Liu, Z., Yu, Y., Mi, R., Zuo, Y., Shi, P., Zheng, W., Jiang, Q., Chao, H., Xiao, P., Yu, W., Han, Y., Wu, Y., Zeng, Y., Wu, D., . . . Chen, S. (2024). A multicenter retrospective comparison between systemic mastocytosis with t(8;21) AML and KIT mutant t(8;21) AML. *Blood Advances*, 8(4), 889-894.

EKLER**EK-1** Olgu Takip Formu**OLGU RAPOR TAKİP FORMU****Tarih:****Protokol No:****Yaş:****Cinsiyet:****İstem Yapan Poliklinik:****Endikasyon:****FLT3 Mutasyon Bölgeleri**

D835	
ITD	
D835del(CAT)	
D836	

AML Şüphesi Olan Translokasyonlar

t(9;22) p210	
t(9;22) p190	
t(15;17)	
t(8;21)	
inv16	