

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YENİ TANILI AKUT MİYELOİD LÖSEMİ HASTALARINDA
BİYOBELİRTEÇ POTANSİYELİ OLAN MİRNA'LARIN EKSPRESYONUNUN
ARAŞTIRILMASI**

MİNE KARACA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. JÜLİDE TOZKIR

EDİRNE-2025

Mine KARACA'nın hazırladığı “YENİ TANILI AKUT MİYELOİD LÖSEMİ HASTALARINDA BİYOBELİRTEÇ POTANSİYELİ OLAN MİRNA’LARIN EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI” başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında bir **Yüksek lisans tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad):

İmza

Doç. Dr. Hayriye ÇİFTÇİ ŞENTÜRK

Dr. Öğr. Üyesi Nihan Bilge KAMER

Tez Savunma Tarihi: 06/01/2025

Bu tezin Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Prof. Dr. Jülide TOZKIR

Tez Danışmanı

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

.....

Doç. Dr. Filiz UMAROĞULLARI

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI**

DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

06 / 01 / 2025

Mine KARACA

İmza

Yüksek Lisans Tezi

Yeni Tanılı Akut Miyeloid Lösemi Hastalarında Biyobelirteç Potansiyeli olan
miRNA'ların Ekspresyonunun Araştırılması

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

Akut Miyeloid Lösemi (AML), olgunlaşmamış miyeloid hücrelerin anormal çoğalmasıyla tanımlanır. MiRNA'lar, gen ekspresyonunu düzenler ve düzensizliklerinin AML gelişimine katkı sağladığı öne sürülmektedir. Bu çalışmada miR-216a-5p, miR-223-3p ve miR-490-3p'nin yeni tanı almış AML hastalarındaki ekspresyonları araştırılmıştır. Çalışmamızda miRNA'ların ekspresyonları yeni tanı almış 26 AML hastası ve 26 sağlıklı kontrolde RT PCR ile belirlenmiştir. Hastaların kemik iliği ve periferik kan örneği ile çalışılmış, sağlıklı kontrollerden kemik iliği alınması etik olmadığı için sadece periferik kan örneğindeki ekspresyonları incelenmiştir. Hastaların yaş ortalaması $61,88 \pm 15,24$; sağlıklı kontrollerin $50,12 \pm 7,08$ dir. Sonuçlar $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi ile hesaplanmıştır. Verilerin analizi için Mann-Whitney U Testi ve Wilcoxon Signed Ranks Testi kullanılmıştır. P değeri $<0,05$ 'ten küçük olduğunda anlamlı kabul edilmiştir. AML hastalarının kemik iliği ve periferik kan örneğindeki ekspresyon değerleri karşılaştırıldığında miR-216a-5p ($p=0,016$) ve miR-223-3p' ($p=0,006$) de anlamlı bir fark bulunmasından dolayı kemik iliği örneklerinin sağlıklı kontrol grubunun periferik kan örnekleri ile karşılaştırılması yapılmamıştır. MiR-490-3p'nin kemik iliği ve periferik kan örneğinin ekspresyonları ($p=0,551$) arasında anlamlı bir fark bulunmadığı için sağlıklı kontrollerle karşılaştırılması yapılmıştır. MiR-490-3p'nin kemik iliği ($p=0,0002$) ve periferik kan ($p=0,01$) örneğindeki ekspresyonu anlamlı olarak sağlıklı kontrollere göre daha yüksektir. AML grubunun periferik kan örneklerinde miR-216a-5p ifadesi sağlıklı kontrol örneklerine göre anlamlı olarak düşüktür ($p<0,0001$). MiR-223-3p ifadesi için AML periferik kan ve sağlıklı kontrol arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı

değildir. ($p=0,534$) MiR-216a-5p ve miR-490-3p'nin AML'deki fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir. AML hastalarında miR-216a-5p'nin neden daha düşük ifade edildiği, miR-490-3p'nin ise ekspresyonunun artışına neden olan sebepler araştırılmalıdır.

Yıl : 2025

Sayfa Sayısı : 80

Anahtar Kelimeler : Akut Miyeloid Lösemi, miR-216a-5p, miR-223-3p,

miR-490-3p

Master Thesis

Investigation of the Expression of miRNAs with Biomarker Potential in Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia Patients

Trakya University Institute of Natural Sciences

Biotechnology and Genetics

ABSTRACT

Acute Myeloid Leukemia (AML) is characterized by the abnormal proliferation of immature myeloid cells. MicroRNAs (miRNAs) regulate gene expression, and their dysregulation is suggested to contribute to AML development. In this study, the expression levels of miR-216a-5p, miR-223-3p, and miR-490-3p were investigated in newly diagnosed AML patients. MiRNA expressions were determined using RT-PCR in 26 newly diagnosed AML patients and 26 healthy controls. Bone marrow and peripheral blood samples were collected from patients, while only peripheral blood samples were available for healthy controls due to the inability to collect bone marrow samples. The mean age of the patients was 61.88 ± 15.24 years, and for the healthy controls, it was 50.12 ± 7.08 years. Results were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Data analysis was performed using the Mann-Whitney U Test and the Wilcoxon Signed Ranks Test, with statistical significance defined as $p < 0.05$. When comparing bone marrow and peripheral blood expression levels in AML patients, significant differences were found for miR-216a-5p ($p=0.016$) and miR-223-3p ($p=0.006$). Therefore, bone marrow samples of AML patients were not compared with the peripheral blood samples of the healthy controls. Since no significant difference was observed in miR-490-3p expression between bone marrow and peripheral blood samples ($p=0.551$), these samples were compared with those of the healthy controls. miR-490-3p expression was significantly higher in both bone marrow ($p=0.0002$) and peripheral blood ($p=0.01$) samples of AML patients compared to

healthy controls. In the peripheral blood samples of AML patients, miR-216a-5p expression was significantly lower than in healthy controls ($p < 0.0001$). No statistically significant difference was found for miR-223-3p expression between the peripheral blood samples of AML patients and healthy controls ($p = 0.534$). The functions of miR-216a-5p and miR-490-3p in AML are not yet fully understood. Further studies are required to investigate the mechanisms underlying the decreased expression of miR-216a-5p and the increased expression of miR-490-3p in AML patients.

Year : 2025

Number of Pages : 80

Keywords : Acute Myeloid Leukemia, miR-216a-5p, miR-223-3p,
miR-490-3p

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, değerli katkılarını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Jülide TOZKIR'a en derin teşekkürlerimi sunarım. Onun yol göstericiliği ve sabrı olmadan bu çalışmayı tamamlamak mümkün olmazdı.

Tez çalışmamın yürütülmesinde Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı'ndaki değerli Prof. Dr. Ahmet Muzaffer DEMİR hocama ve bana katkı sağlayan tüm öğretim üyeleri ile asistanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans eğitim sürecimde her türlü imkân ve desteği sağlayan Prof. Dr. Hakan GÜRKAN hocama ve yüksek lisans eğitimimin tamamlanmasında desteği olan Doç. Dr. Sinem YALÇINTEPE, Doç. Dr. Selma DEMİR, Doç. Dr. Emine İkbâl ATLI ve Dr. Öğr. Üys. Engin ATLI hocalarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında hastaların toplanması ve klinik süreçlerin düzenlenmesinde değerli katkılarını esirgemeyen Doç. Dr. Hakkı Onur KIRKIZLAR ve Dr. Öğr. Üyesi Tuğcan ALP KIRKIZLAR'a en içten teşekkürlerimi iletirim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında bana destek veren, bilgilerini ve deneyimlerini paylaşan Öğr. Gör. Drenushe ZHURI, Hazal SEZGİNER GÜLER'e ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İstatistiksel analizleri gerçekleştirmemizi sağlayan Prof. Dr. Necdet SÜT'e teşekkür ederim.

Çalışmamıza gönüllü olarak katılan herkese katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Laboratuvar alışmalarımdaki her adımda, bilgi ve deneyimlerini paylaşarak bana yol gösteren, takıldığım her konuda içtenlikle yardımcı olan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Dr. Ebru GÖNCÜ'ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım için TUBAP 2023/103 numarasıyla almış olduğum proje desteği için Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana verdikleri sevgi, destek ve inançla her zaman yanımda olan sevgili anneme ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Mine KARACA



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	x
SİMGELER DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	3
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hematopoez.....	3
2.2. Kanser	4
2.2.1 Lenfoma	5
2.2.2. Multipl Miyelom.....	5
2.2.3. Lösemi	6
2.2.3.1. Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)	6
2.2.3.2. Akut Miyeloid Lösemi (AML)	6
2.2.3.3. Kronik Lenfositik Lösemi (KLL).....	6
2.2.3.4. Kronik Miyeloid Lösemi (KML)	6
2.3. Akut Miyeloid Lösemi ve Sınıflandırılması	7
2.3.1. FAB Sınıflandırması	7
2.3.2. Avrupa Lösemilerin İmmünolojik Sınıflandırması Grubu Sınıflaması	8
2.3.3. WHO Sınıflandırması	9
2.4. AML’de Tanı	12
2.4.1. AML Tanısında Genetik Faktörler	15
2.4.1.1. <i>FLT3</i> Mutasyonu.....	15
2.4.1.2. <i>NPM1</i> Mutasyonu	15
2.4.1.3. <i>CEBPA</i> Mutasyonu	16

2.5. AML ve Risk Sınıflandırması	17
2.6. AML ve Biyobelirteçler	19
2.7. MiRNA.....	19
2.8. MiRNA ve Kanser.....	20
2.8.1. MiR-216a.....	21
2.8.2. MiR-223.....	22
2.8.3. MiR-490.....	22
BÖLÜM 3	24
MATERYAL METOT	24
3.1. Örneklem Grubunun Oluşturulması.....	24
3.2. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu	25
3.3. Etik Kurul ve TUBAB Onayı.....	25
3.4. Yöntem.....	26
3.4.1. MiRNA İzolasyonu.....	26
3.4.2. c-DNA Sentezi.....	29
3.4.3. Real-time PCR	30
3.5. Verilerin Analizi ve İstatistiği.....	32
BÖLÜM 4	33
BULGULAR	33
BÖLÜM 5	45
SONUÇLAR VE TARTIŞMA	45
KAYNAKLAR	52
EKLER.....	59
Ek-1 Bilgilendirilmiş Onam Formu	59
Ek-2 Etik Kurul Onay Formu.....	63
ÖZGEÇMİŞ	64

SİMGELER DİZİNİ

Kısaltmalar

ALL:	Akut Lenfoblastik Lösemi
AML:	Akut Miyeloid Lösemi
AML-MDS:	Miyelodisplastik Sendromlu Akut Miyeloid Lösemi
AML-MRC:	Miyelodisplaziye Bağlı Değişikliklere Sahip Akut Miyeloid Lösemi
AML-MR:	Miyelodisplazi ile İlişkili Akut Miyeloid Lösemi
bZIP:	Bazik Lössin Fermuar Alanı
CBF:	Çekirdek Bağlama Faktörü
CEBP α :	CCAAT Güçlendirici Bağlanma Proteini Alfa
CEBPA:	CCAAT Güçlendirici Bağlanma Proteini A
CEBPA ^{bZIP-inf} :	Çerçeve içi mutasyon - in-frame mutation
CHRM2:	Kolinerjik Reseptör Muskarinik 2
CT:	Döngü Eşiği
EDTA:	Etilendiamin Tetraasetik Asit
EGIL:	Avrupa Lösemilerin İmmünolojik Sınıflandırması Grubu
EL:	Eritrosit Lizis
ELN:	Avrupa Lösemi Ağı
ESCC:	Özofageal Skuamöz Hücreli Karsinom
FAB:	Fransız-Amerikan-İngiliz
FBXW7:	F-box ve WD tekrar domaini içeren 7
FES:	Kedi Sarkoma Viral Onkogen Homologu
FOS:	FBJ Fare Osteosarkoma Viral Onkogen Homologu

FLT3:	FMS-benzeri Tirozin Kinaz 3
GATA-1:	GATA Bağlanma Proteini 1
HL:	Hodgkin Lenfoma
HSC:	Hematopoetik Hücre
HOX:	Homeobox
ITD:	İnternal Tandem Duplikasyonlar
JM:	Juxtamembran
JUN B:	Jun B Proto-Onkogen
KIT:	Mast Hücre Büyüme Faktörü Reseptörü
Kİ:	Kemik İliği
KLL:	Kronik Lenfositik Lösemi
KML:	Kronik Miyeloid Lösemi
LncRNA:	Uzun Kodlamayan RNA
MAPK:	Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz
Mirna:	Mikro RNA
MLL:	Karışık Kökenli Lösemi
MPAL:	Karışık Fenotipli Akut Lösemi
MPL:	Miyeloproliferatif Lösemi Virüsü Onkogen
MRNA:	Mesajcı RNA
MYC:	Miyelositomatoz Viral Onkogen Homologu
NES:	Nükleer İhracat Sinyalleri
NGS:	Yeni Nesil Dizileme
NHL:	Hodgkin Olmayan Lenfoma
NoLS:	Nükleolar Lokalizasyon Sinyalleri
NPM1:	Nükleofosmin 1
N-RAS:	Nöroblastom RAS Viral Onkogen Homologu
PAK2:	p21 ile aktive olan kinaz 2
PK:	Periferik Kan
PU.1:	PU Kutusu Proteini 1

p53:	Tümör Proteini p53
pCT:	Tedavi sonrası
qPCR:	Real-time PCR
RAR- α :	Retinoik Asit Reseptörü- α
RB:	Retinoblastoma Proteini
RCC :	Böbrek hücreli karsinom
RNA :	Riboz Nükleik Asit
snRNA:	Küçük Nükleer RNA
TKD:	Tirozin Kinaz Alanı
VAF:	Varyant Allel Sıklığı
WHO:	Dünya Sağlık Örgütü
WNT:	Wingless/Int-1
WT1:	Wilms Tümörü 1
XPO1:	Exportin 1

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. HCS’lerin Farklılaşma Süreci.....	4
Şekil 4.1. AML Gruplar Arası miR-216a-5p Ekspresyon Ortalaması.....	42
Şekil 4.2. MiR-216a-5p Ekspresyonunun Gruplar Arası Ortalaması	42
Şekil 4.3. AML Gruplar Arası miR-223-3p Ekspresyon Ortalaması.....	43
Şekil 4.4. MiR-223-3p Ekspresyonunun Gruplar Arası Ortalaması	43
Şekil 4.5. MiR-490-3p Ekspresyonunun Gruplar Arası Ortalaması	44

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. AML FAB Sınıflaması	8
Çizelge 2.2. AML sınıflandırmasında WHO 5. ve ICC arasındaki önemli farklar	10
Çizelge 2.3. AML-MRC, AML-MR ve AML-MDS'nin Karşılaştırılması	12
Çizelge 2.4. AML Tanı Değerlendirmesinde Önerilen Akış	14
Çizelge 2.5. AML Risk Sınıflandırması	19
Çizelge 3.1. Kabul Kriterleri.....	25
Çizelge 3.2. Red Kriterleri	25
Çizelge 3.3. Real-time PCR'da Çalışılan, Primerler	26
Çizelge 3.4. Ters Transkripsiyon Reaksiyonu Mix Hazırlığı	30
Çizelge 3.5. RT PCR Sıcaklık	30
Çizelge 3.6. MiRCURY LNA miRNA PCR ASSAY Reaksiyon Mix	31
Çizelge 3.7. MiRCURY LNA miRNA PCR ASSAY PCR döngü koşulları.....	31
Çizelge 4.1. AML Hastalarının Somatik Mutasyonu ve Tanısı.....	34
Çizelge 4. 2. AML Hastaları Kemik iliğindeki $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Değerleri	36
Çizelge 4.3. AML Hastaları Periferik Kandaki $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Değerleri.....	37
Çizelge 4.4. Sağlıklı Kontrol Periferik Kandaki $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Değerleri	38
Çizelge 4.5. MiR-216a-5p, miR-223-3p ve miR-490-3p'nin Kemik İliği ve Periferik Kan Örneklerinin Karşılaştırması	39
Çizelge 4.6. AML Grubunun Kemik İliği Örneği ile Sağlıklı Kontrol Grubunun miR-490-3p için Anlamlılık Karşılaştırılması.....	39
Çizelge 4.7. AML Grubu miR-490-3p Kemik İliği Örneğinin Sağlıklı Kontrol Grubunun Periferik Kan Örneği ile Karşılaştırılması	40
Çizelge 4.8. AML Grubu Periferik Kan Örneği ile Sağlıklı Kontrol Grubunun Periferik Kan Örneğinin Anlamlılık Karşılaştırılması	40
Çizelge 4.9. AML Grubu ve Sağlıklı Kontrol Grubunun Periferik Kan Örneklerinin Karşılaştırması.....	41

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Akut miyeloid lösemi (AML), çoğunlukla erişkin bireylerde yaygın olarak görülen bir lösemi çeşididir (Yu vd., 2020). AML, olgunlaşmamış miyeloid hücrelerin anormal çoğalması ve farklılaşmasıyla ilerleyen hematopoietik bir hastalıktır. Klonal genişlemesi nedeniyle hızlı bir yayılım göstermektedir. AML tedavisindeki gelişmelere rağmen düşük sağ kalım oranına sahiptir (Amin vd., 2022). AML'nin tanısı, prognozu ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için biyobelirteçlere ihtiyaç vardır (Salehi, 2024). MikroRNA'lar (miRNA'lar) yaklaşık olarak 18-25 nükleotid uzunluğundan oluşan küçük, kodlama yapmayan tek zincirli RNA sınıfında yer almaktadır (Lu & Rothenberg, 2018; Salehi, 2024). Birçok kanser türünde olduğu gibi düzensizlikleri tümör oluşumuna neden olmaktadır (Li vd., 2020). Bu nedenle kanser türleri için iyi bir biyobelirteç niteliğindedir (Yu vd., 2020). MiRNA'ların çeşitli hücresel süreçlerde düzenleyici görevleri bulunmaktadır (Li vd., 2020). MiRNA'lar tümörün gelişmesinde ve farklılaşmasında rol alan genlerin ekspresyonunu kontrol etmektedir. MiRNA'ların aşırı ekspresyonu, onkogen veya tümör baskılayıcısı olarak hareket etmesini sağlayabilmektedir. Spesifik gen transkriptlerinin düzenlenmesinde etkili olduğundan miRNA'ların düzensizliği, tümör baskılayıcıları ya da hücre farklılaşmasında bulunan genleri aşağı yönde düzenlemesiyle AML' nin gelişmesine katkı sağlayabilmektedir (He vd., 2019). Bu nedenle çalışmamızda AML'ye spesifik miRNA'ları hedefleyip kemik iliği ve periferik kan örneğindeki ekspresyonlarını incelemeyi amaçladık. MiR-216a-5p, miR-223-3p ve miR-490-3p AML ile ilişkisinin olabileceğini düşündüğümüz miRNA'lardır. Bu incelemede seçilen miRNA'ların AML gelişimine katkısını,

ilerlemesindeki etkisini araştırıp tedavisinde, tanısında ve prognozunda iyi gelişmeler sağlamak amaçlanmıştır.

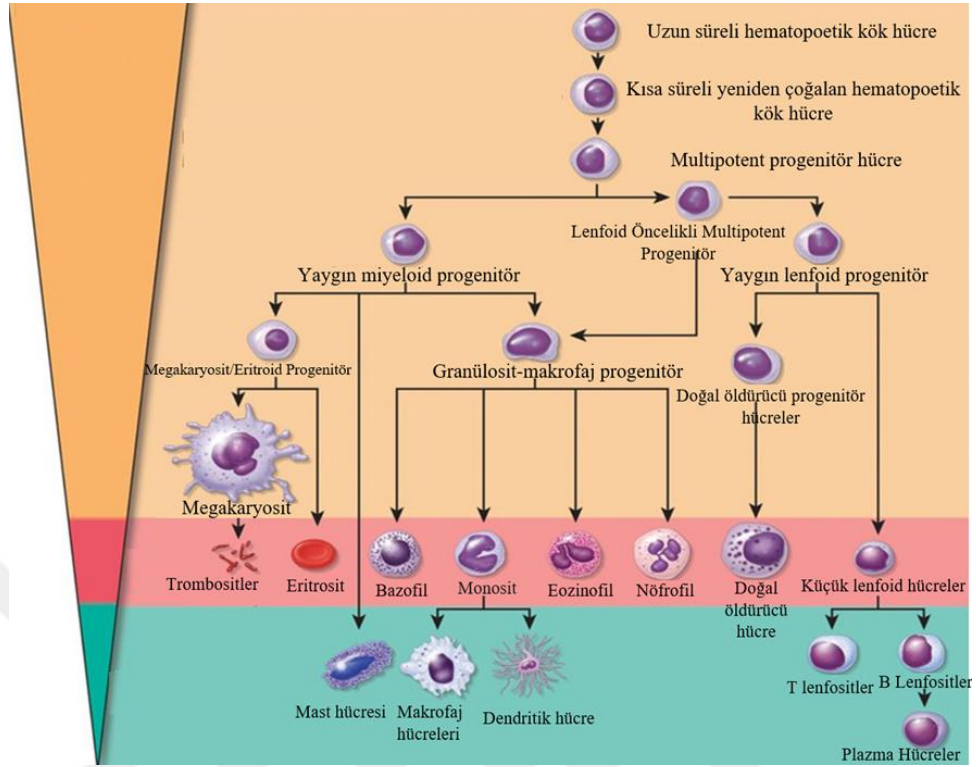


BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Hematopoez

Hematopoez, vücuttaki kan hücrelerinin yaşam boyu oluşturulma sürecini ifade etmektedir. Hematopoetik hücrelerin (Hematopoietic Stem Cell- HSC) ve progenitör hücrelerin koordineli bir şekilde hem kendini yenilemesini hem de farklılaşmasını ve çoğalmasını gerektiren bir gelişim sürecidir (Pasca & Gondek, 2021). HSC'ler, farklı tipte kan ve bağışıklık sistemi hücrelerinin üretimini gerçekleştirmektedir (Höfer & Rodewald, 2018). Her gün trilyonlarca hücrenin üretiminden sorumlu olan hematopoietik sistemde farklılaşmanın bozulması klinikte kanser ile ilişkilidir. HSC'lerin farklılaşma süreci Şekil 2.1. de gösterilmektedir (Hu & Shilatifard, 2016).



Şekil 1.1. HCS'lerin Farklılaşma Süreci

2.2. Kanser

Kanser, vücuttaki anormal hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve çoğalması ile yayılım gösteren oldukça yaygın bir hastalık grubudur. Farklı organ ve dokuları etkileyebilmekte ve çeşitli formları bulunmaktadır.

İki ana kanser kategorisi vardır.

- **Solid Tümör Kanserleri:** Dokularda veya organlarda oluşan kanserlerdir. En yaygın solid tümörler meme, prostat, akciğer ve kolorektal kanserlerdir (Najafi vd., 2021).
- **Hematolojik Kanserler:** Kan ve kemik iliği gibi hematolojik sistemi etkileyen kan kök hücrelerinin anormal farklılaşması sonucu meydana gelen kan kanserleridir. Lösemi, lenfoma ve multipl miyelom hematolojik kanserler arasındadır (Wang vd., 2023).

Hematolojik maligniteler veya kan kanserleri olarak da bilinen hematolojik kanserler; HSC'lerin anormal bir şekilde kendini yenilemesi ve farklılaşması ile oluşmaktadır. Bu başlık altındaki kanserlerde kan hücreleri, kemik iliği ve lenfatik sistem etkilenir (Wang vd., 2023). Hematolojik maligniteler, kan hücresi gelişiminin herhangi bir aşamasında ortaya çıkabilmekte ve enfeksiyonla mücadelede sorunlar göstererek kanamaya yatkınlık gibi sonuçlar ortaya çıkmaktadır. (Hu & Shilatifard, 2016).

Kemik iliğindeki HSC'ler, miyeloid veya lenfoid soyların olgunlaşmamış progenitör hücrelerine dönüşmektedir. Miyeloid kökenli hücreler, doğal bağışıklık sisteminin beyaz kan hücrelerinden nötrofiller, eozinofiller, bazofiller, monositler ve dendritik hücreleri içerir. Ayrıca miyeloid seriden eritrositler (kırmızı kan hücreleri) ve trombositler de köken alır, ancak bunlar bağışıklık hücreleri değildir. Lenfoid kökenden gelen hücreler ise adaptif immün sistemde görevli olan B ve T lenfositlerin üretimini sağlamaktadır (Hu & Shilatifard, 2016).

2.2.1 Lenfoma

Hematolojik kanser türlerinden birisi olan lenfoma, lenfatik sistem üzerinde etki gösteren bir kanserdir. Vücuttaki herhangi bir organı etkileyebilmekte ve çeşitli semptomlarla ortaya çıkabilmektedir (Armitage vd., 2017). Lenf düğümlerinde bulunan lenfositlerin, lenfatik ve bağışıklık sistemi üzerinde olumsuz etkileri olan bir dönüşümü sonucu oluşmaktadır. Hodgkin lenfoma (HL) ve Hodgkin olmayan lenfoma (NHL) olmak üzere iki ana lenfoma türü bulunmaktadır (Hu & Shilatifard, 2016).

2.2.2. Multipl Miyelom

Multipl miyelom, hematolojik malignitelerin yaklaşık olarak %10'unu oluşturan plazma hücrelerini etkileyen bir kanserdir (Firth, 2019). Bu kanser türünde anormal plazma hücreleri kemik iliğinde birikmekte ve normal kan hücrelerinin üretimini engellemektedir. Multipl miyelom öncelikli olarak kemikleri etkileme ve hastalarda osteolitik lezyonlar görülmektedir (Terpos vd., 2021).

2.2.3. Lösemi

Lösemi, kemik iliğinde anormal beyaz kan hücrelerinin aşırı üretilmesinden kaynaklanan bir kanser türüdür. Lösemi hücreleri olarak adlandırılan bu anormal hücreler, sağlıklı kan hücrelerine baskın gelerek normal işlevlerini bozmaktadır (Hu & Shilatifard, 2016). Lösemili hastalar için radyasyon, kemoterapi, monoklonal antikor ve hematopoietik kök hücre nakli gibi çeşitli tedavi seçenekleri bulunmaktadır (Azizidoost vd., 2023). Neoplastik hücrelerin kökenine ve klinik seyrine göre lösemi, dört ana sınıfa ayrılabilir (Hu & Shilatifard, 2016; Lanier vd., 2022).

2.2.3.1. Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)

Kemik iliğinde, periferik kanda, lenfatik ve lenfatik olmayan dokuda olgunlaşmamış lenfoid hücrelerin çoğalması ve birikmesiyle oluşan bir lösemi türüdür (Medinger vd., 2019).

2.2.3.2. Akut Miyeloid Lösemi (AML)

Hematopoietik kök hücrelerin kromozomal düzeyde yeniden şekillenmesiyle ve çoklu gen mutasyonlarının ortaya çıkması sonucu, hematopoietik kök hücrelerin etkilendiği heterojen bir lösemi grubudur (Rubnitz vd., 2010).

2.2.3.3. Kronik Lenfositik Lösemi (KLL)

Kanda, kemik iliğinde ve ikincil lenfoid organlarda olgun B lenfositlerin birikmesiyle oluşmaktadır (Ghia vd., 2007).

2.2.3.4. Kronik Miyeloid Lösemi (KML)

Granülositlerin aşırı üretimi ve Philadelphia kromozomunun varlığı ile karakterize edilir (Cortes vd., 2021).

2.3. Akut Miyeloid Lösemi ve Sınıflandırılması

AML, kemik iliği ve periferik kanda olgunlaşmamış miyeloid hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesiyle karakterize hematolojik bir malignitedir (Vago & Gojo, 2020; Wallace & O'Connell, 2017). AML çeşitli klinik tablolara, morfolojik özelliklere ve immünofenotiplere sahip heterojen bir hastalıktır. (Wallwitz vd., 2021; Olga K Weinberg vd., 2023).

AML alt tiplerinin sınıflandırmasına ilk olarak 1976 yılında Fransız-Amerikan-İngiliz (French-American-British - FAB) sınıflandırma sistemi ile başlanmıştır ve bu sistem 2008 yılında Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization-WHO) sınıflandırmasıyla tamamlanmıştır (Wallwitz vd., 2021). Daha sonraki yıllarda (2016 ve 2022) WHO sınıflandırmasına güncellemeler gelmiştir. AML sınıflandırmasının son hali 2022 yılında WHO ve Uluslararası Konsensus Sınıflandırması (International Consensus Classification-ICC) tarafından düzenlenmiştir. Son güncelleme ile bu iki sınıflama arasında bazı farklar bulunmaktadır. Her iki sınıflandırmada da ortak olarak sitogenetik ve moleküler genetiğe olan önemin artması ön plana çıkmıştır (DiNardo vd., 2023).

2.3.1. FAB Sınıflandırması

FAB sınıflandırma sistemi AML'nin alt tiplerini belirlemek için kullanılmıştır. Bu sınıflandırma morfolojik ve sitokimyasal boyanma özelliklerine göre AML'yi M0'dan M7'ye kadar olan alt tiplere gruplandırmıştır. FAB sınıflaması, immünofenotipleme, sitogenetik ve moleküler genetik olarak bir değerlendirme yapmamaktadır. (Wallwitz vd., 2021). AML FAB sınıflaması Çizelge 2.1.'de gösterilmiştir (Berghe, 1988).

Çizelge 2.1. AML FAB Sınıflaması

Alt Tip	Tanım
M₀	Eritroblastik farklılaşma eksikliğini tanımlar.
M₁	Genç miyeloblastların aşırı üretildiği ve farklılaşmanın görülmediği akut miyeloblastik lösemidir.
M₃	Promiyelositlerin aşırı üretildiği akut promiyelositer lösemidir.
M_{3v}	Akut varyant promiyelositer lösemiye temsil etmektedir.
M₄	Miyeloblastların yanı sıra monositlerin de bulunduğu akut miyelomonositer lösemidir.
M_{4Eo}	Akut eozinofilik miyelomonositer lösemiye ifade etmektedir.
M_{5a}	Monositlerin ağırlıklı olduğu akut monoblastik lösemidir.
M_{5b}	Monositlerin ağırlıklı olduğu akut monositer lösemidir.
M₆	Eritroid hücrelerin aşırı üretildiği akut eritrolösemidir.
M₇	Megakaryoblast hücrelerin aşırı üretildiği akut megakaryoblastik lösemiye tanımlar.

2.3.2. Avrupa Lösemilerin İmmünolojik Sınıflandırması Grubu Sınıflaması

Akut lösemilerde FAB sınıflamasının yeterli gelmemesi üzerine immünolojik sınıflandırmaya yönelik girişimler Avrupa Lösemilerin İmmünolojik Sınıflandırması Grubu Sınıflaması (European Group for the Immunological Classification of Leukaemias-EGIL) tarafından gerçekleştirilmiştir. EGIL, hücre yüzey antijenlerinin ekspresyonunu baz alarak akut lösemileri karakterize etmeyi ve kılavuzlar oluşturmayı hedeflemiştir. Hemopoyetik malignitelerin çeşitli alt tiplerinin tanısı için EGIL sınıflandırması tek tip bir temele dayanmaktadır. AML’de FAB sınıflandırmasına göre tanımlanan M₀, M₆ ve M₇ alt tipleri immünolojik belirteçlerle kesin olarak tanımlanabilmektedir (Bene vd., 1995).

2.3.3. WHO Sınıflandırması

WHO sınıflandırmasının kökeni FAB sınıflamasına dayanmaktadır. WHO sınıflandırması 2008 yılında tamamlanmıştır. Daha sonra 2016 yılında yenilenmiş ve 2017 yılında kitap halinde yayınlanmıştır (O. K. Weinberg vd., 2023). WHO sınıflandırmasında miyeloid neoplazmlar ve akut lösemilerin klinik öneme sahip sitogenetik ve moleküler genetik anormallikleri fark edilmiştir. Klinik açıdan anlamlı yeni oluşumları tanımlamak için 2016 yılındaki revizyonda; prognostik, morfolojik, immünofenotipik ve genetik araştırmalardaki ilerlemeler dahil edilmiştir (Wallwitz vd., 2021). Akut lösemilerin tanısı için blastik hücre sayısı %30'dan %20'ye indirilmiştir. WHO AML sınıflandırmasında AML alt tipleri, klinik morfolojik ve genetik özelliklere sahip dört alt grupta tanımlanmıştır (Wallwitz vd., 2021; O. K. Weinberg vd., 2023). Bu alt gruplar; tekrarlayan genetik anormalliklere sahip AML, miyelodisplaziye bağlı değişikliklere sahip AML, terapi ile ilişkili miyeloid neoplazmalar ve tanımlanan gruplara dahil olmayan AML'dir (Wallwitz vd., 2021).

ICC ve WHO tarafından AML sınıflandırması 2022 yılında bir kez daha güncellenmiştir. AML için her iki sınıflandırmada hastalığın tanımında sitogenetik ve moleküler anlamla ilerleyerek sınıflandırılması genişletilmiştir. Blastların eşiği güncellenmiş ve yeni genetik bulgular eklenmiştir (DiNardo vd., 2023). ICC ve WHO arasındaki yeni AML sınıflandırma sistemlerindeki temel farklılıklar Çizelge 2.2.' de ayrıntılı olarak gösterilmiştir (S. Shimony vd., 2023).

Çizelge 2.2. AML sınıflandırmasında WHO 5. ve ICC arasındaki önemli farklar

WHO 5. AML sınıflandırması (2022)	ICC AML sınıflandırması (2022)	Temel Farklar
Yapı		
Genetik ve moleküler anormallikleri içeren iki grup ile tanımlanır. 1-Genetik anormalliklerle tanımlanır. (mutasyonlar, gen füzyonları vb.) 2-Farklılaşma ile tanımlanan AML; Tanımlanmış genetik değişikliklere sahip AML'yi, karışık fenotipli akut lösemi (MPAL), miyeloid neoplazm pCT (tedavi sonrası) ve MPN'nin dışlaması ile tanımlanır.	Tekrarlayan genetik anormallikleri olan AML'nin hiyerarşik düzenlemesi -Mutasyonlu <i>TP53</i> (Varyant Allel Sıklığı (VAF)> %10) -Miyelodisplazi ile ilişkili gen mutasyonları olan AML -Miyelodisplazi ile ilişkili sitogenetik anormallikleri olan AML -Diğer alt gruplara uymayan tanımlanmamış AML	WHO'da iki grup tanımlaması vardır. ICC' de hiyerarşik düzen mevcuttur.
Blast Eşiği (Kemik İliği veya Periferik Kan)		
Genetik anormalliklerle tanımlanan AML' de blast eşiği yoktur. (<i>BCR::ABL1</i> 'li AML ve <i>CEPBA</i> mutasyonunda biallelik/tek Bazik Lösin Fermuar Alanı (bZIP) mutasyonları olan AML hariç tutulmuştur, %20 blast eşiği vardır.) Farklılaşmayla tanımlanan AML %20 blast eşiği vardır.	Tekrarlayan genetik anormallikleri olan AML %10 blast olması gereklidir. (<i>BCR::ABL1</i> 'li AML' de %20 blast olması gerekir.). Diğer alt gruplarda MDS/AML (%10-19 blast) veya AML (blastlar $\geq$ %20) olarak tanımlanır.	Farklı blast eşikleri vardır. MDS/AML, ICC'de farklı kriterlere sahiptir.

Miyelodisplazi ile ilişkili akut miyeloid lösemi (AML-MR) ve Miyelodisplaziye bağlı değişikliklere sahip akut miyeloid lösemi (AML-MRC)

Sitogenetik • del(5q)/t(5q) • -7/del(7q)/(t7q) • del(11q) • del(12p)/t(12p) • -13/del(13q) • del(17p)/t(17p)/iso(17q) • idic(X)(q13) veya Kompleks karyotip (≥ 3 anormallik). Moküler: <i>ASXL1</i>, <i>BCOR</i>, <i>EZH2</i>, <i>SF3B1</i>, <i>SRSF2</i>, <i>STAG2</i>, <i>UAKF2</i> ve <i>ZRSR2</i>. MDS ya da MDS/MPN geçmişi AML-MR'yi oluşturmaktadır.	Sitogenetik • del(5q)/t(5q)/add(5q) • -7/del(7q) • +8; • del(12p)/t(12p)/add(12p) • iso(17q), -17/add(17p) veya del(17p) • del(20q) • idic(X)(q13) veya Kompleks Karyotip (≥ 3 anormallik) Moleküler: <i>ASXL1</i>, <i>BCOR</i>, <i>EZH2</i>, <i>SF3B1</i>, <i>SRSF2</i>, <i>STAG2</i>, <i>U2AF1</i>, <i>ZRSR2</i> ve <i>RUNX1</i>. MDS veya MDS/MPN geçmişi, ayrı bir grup olarak değil, niteleyici olarak ele alınmalıdır.	Moleküler ve sitogenetik olarak büyük oranda farklılık yoktur. MDS geçmişinin önemi ve yorumlanmasında farklılıklar görülmektedir.
--	---	--

MDS veya MDS/MPN'nin Geçmişi, Sitotoksik Tedavisi ve Genetik Yatkınlık

Yukarıda tanımlanan AML gruplarından ayrı olarak ikincil miyeloid neoplazmin tanımlanması -Sitotoksik tedavi sonrası miyeloid neoplazmalar -Genetik yatkınlık ile ilişkili miyeloid neoplazmlar	AML grubuna ek tanısal belirteçler -Tedavi ile ilişkili -MDS ya da MDS/MPN'den ilerleme gösterme -Genetik yatkınlık	Klinik veya patolojik özelliklerin farklı gruplanması
---	--	--

WHO 2016 sınıflandırmasını da dahil ederek; AML-MRC, AML-MR ve AML-MDS ile ilişkili anormalliklerin sitogenetik ve genetik özelliklerinin karşılaştırılması Çizelge 2.3.'de gösterilmiştir (Della Porta vd., 2024).

Çizelge 2.3. AML-MRC, AML-MR ve AML-MDS'nin Karşılaştırılması

WHO (2016) AML-MRC	WHO (2022) AML-MR	ICC (2022) AML-MDS
Kompleks karyotip	Sitogenetik anomaliler	MDS ile ilişkili genetik anormallikler
Sitonegenetik anormallikler	○ Karmaşık karyotip	○ Kompleks karyotip
Dengesiz anormallikler	○ Del5q ya da 5q kaybı ○ -7,del7q ya da 7q kaybı ○ Del11q ○ Del12p ya da 12p kaybı ○ -13 ya da del13q ○ Del17p ya da 17p kaybı veya i17q ○ İdic(X)(q13)	○ Del(5q)/t(5q)/add(5q) ○ -7/del(7q) ○ +8 ○ Del(12p)/t(12p)/add(12p) ○ İ(17q),17/add(17p)/del(17p) ○ Del(20q) ○ İdic(X)(q13)
Dengeli anormallikler	Somatik Mutasyonlar ASXL1, BCOR, EZH2, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1, ZRSR	MDS ile ilişkili gen mutasyonları ASXL1, BCOR, EZH2, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1, ZRSR2, RUNX1

2.4. AML'de Tanı

AML, çoğunlukla yetişkinlerde karşımıza çıkan akut lösemi türüdür. Yaşlı hastalarda daha yüksek prevalansa sahip olmakla birlikte ortalama tanı yaşı 68 olarak belirlenmiştir (Shai Shimony vd., 2023; Wallwitz vd., 2021). AML, genellikle kemik iliği ve periferik kanda görünen ancak aynı zamanda ekstamedüller dokuda da ortaya çıkabilen heterojen bir hastalıktır. AML klinikte agresif bir ilerleme göstermektedir ve genel beş yıllık sağkalım oranı %25 civarındadır (Narayanan & Weinberg, 2020).

AML hastaları sıklıkla lökositoz, anemi ve trombositopeni gibi anormal hematolojik laboratuvar sonuçları ile bilinmektedir. AML'nin tanısal çalışması, hastanın öyküsüne, klinik sunumuna ve laboratuvar sonuçlarına bakılarak değerlendirilmektedir. Bu tanısal çalışmalar, kemik iliği aspiratının ve periferik kan yaymasının morfolojik değerlendirilmesini, kemik iliği biyopsisini, immünohistokimyayı, akış sitometrisini, sitogenetik testleri ve moleküler mutasyon analizlerini içermektedir (Narayanan & Weinberg, 2020). AML, kromozomal yeniden düzenlemeler ile ilişkilendirilmiştir ancak son on yıldaki ilerlemelerle sitogenetik anormalliklerin yanı sıra gen mutasyonlarının da tümör oluşumunda etkin bir rolü olduğu belirlenmiştir. Tüm AML vakalarından yalnızca %3' lük çok küçük bir bölümü tanımlanabilen veya bilinen bir sürücü mutasyona sahiptir. Bu bilgi bize AML'nin genetik olarak çok çeşitli ve karmaşık bir hastalık olduğunu her hastanın farklı genetik profillere sahip olabileceğini göstermektedir (Wallwitz vd., 2021). AML'de t (8;21), t (15;17), inversiyon 16, trizomi 8 ve kromozom 5 veya 7'nin bir kısmının veya tamamının kaybı gibi bazı sitogenetik anormallikler en sık görünenler arasındadır. AML hastalarının bir kısmında kromozomal translokasyonlar sıkça görülmektedir. Kromozomal translokasyonlar, proto-onkogenlerin kritik bölgelerinin yeniden düzenlenmesi ile ilişkilendirilmiştir. Bu genlerdeki kritik bölgelerin translokasyonlar sonucu değişmesi, genellikle transkripsiyon faktörü veya hücresel büyüme ve farklılaşma sinyal yolunda yer alan bir proteini içeren anormal bir füzyon proteinini üretmektedir. Bu yeniden düzenlemeler proto-onkogenlerin normal işlevini bozarak AML'nin oluşmasına neden olmaktadır. Mutasyona uğramış bazı proto-onkogen örneklerinden çekirdek bağlama faktörü (*CBF*), retinoik asit reseptör- α (*RAR- α*), *HOX* (Homeobox) gen ailesi ve *MLL* (Karışık Kökenli Lösemi) genindeki mutasyonlar AML oluşumunu desteklemektedir. *FLT3* (FMS-benzeri Tirozin Kinaz 3) , *KIT* (Mast Hücre Büyüme Faktörü Reseptörü), *N-RAS* (Nöroblastom RAS Viral Onkogen Homologu) , *FES* (Kedi Sarkoma Viral Onkogen Homologu) , *FOS* (FBJ Fare Osteosarkoma Viral Onkogen Homologu), *GATA-1* (GATA Bağlanma Proteini 1), *JUN B* (Jun B Proto-Onkogen), *MPL* (Miyeloproliferatif Lösemi Virüsü Onkogen), *MYC* (Miyelositomatoz Viral Onkogen Homologu), *p53* (Tümör Proteini p53), *PU.1*(PU Kutusu Proteini 1), *RB* (Retinoblastoma Proteini), *WT1* (Wilms Tümörü 1), *WNT* (Wingless/Int-1 (bir grup sinyalizasyon molekülü)), *NPM1* (Nükleofosmin 1) ve *CEPBA* (CCAAT Güçlendirici Bağlanma Proteini Alfa)

genlerindeki mutasyonlarda AML’de diğer onkogenleri aktive eden mutasyonlar arasındadır. AML’de sıklıkla görülen bu mutasyonlar AML’nin farklı alt tiplerini ve hastalığın ilerlemesindeki risk gruplarını belirlemektedir (Prada-Arismendy vd., 2017).

AML şüphesi ile gelen bir hastaya tanı koyulabilmesi için morfolojik ve immünofenotipik olarak değerlendirmesi yapılmakta daha sonra karyotip analizi ve moleküler düzeyde incelenmesi yapılmaktadır. Gen yeniden düzenlenmelerini ve mutasyonları tespit edebilmek için Yeni Nesil Dizileme teknolojilerinden (NGS) yararlanılmaktadır. AML tanı değerlendirmesi için önerilen zaman çizelgesi Çizelge 2.4.’de yer almaktadır (Della Porta vd., 2024).

Çizelge 2.4. AML Tanı Değerlendirmesinde Önerilen Akış

Aynı gün	Morfoloji AML tanısı için kemik iliği veya periferik kan örneğinden blastların sayımı yapılmaktadır.
1-3 gün	İmmünofenotip Öncüller ve progenitörler : CD34, CD117 ve HLA-DR ayrıca CD38, CD133 ve CD123 belirteçlerinede bakılabilir. Miyeloid soy: CD33, CD13 ve sitoplazmik miyeloperoksidaz Miyeloid Olgunlaşma Belirteçleri: CD11b, CD15, CD64, CD14 ve CD65 Monositik Belirteçler: CD4, CD14, CD36 ve CD64 Eritroid Belirteçler: CD71, CD235a ve CD36 Mekaryositik Belirteçler: CD36, CD41 ve CD61
5-7 gün	Sitogenetik Analiz WHO sınıflandırmasına göre AML alt tiplerini tanımlamak ve prognozunu tanımlamak için sitogenetik bilgi gereklidir. Sitogenetik analiz için Floresan in-situ hibridizasyon yönteminden yararlanılmaktadır.
3-5 gün	Moleküler Genetik Prognozu belirlemek ve tedavi sürecinin düzenlenmesi için NGS çalışması yapılır. Gen düzenlemeleri: PML/RARA, RUNX1/RUNX1T1, CBFb/MHY11, BCR/ABL1 Gen Mutasyonları: NPM1, FLT3, IDH, IDH2 ASXL1,BCOR,CEBPA,EZH2,RUNX1,SF3B1,SRSF2,STAG2,TP53,U2AF1, ZRSR2 Hastanın geçmişine ve moleküler bulgularına göre germ hattı yatkınlık genlerindeki mutasyonlara bakılabilir.

2.4.1. AML Tanısında Genetik Faktörler

2.4.1.1. *FLT3* Mutasyonu

FLT3 geni, kromozomda 13q12² konumunda bulunmakta ve hematopoezi düzenlemekten sorumlu olan tip III reseptör tirozin kinazını kodlamaktadır (Jalte vd., 2023; Negotei vd., 2023). *FLT3* genindeki mutasyonlar AML patogenezinde önemli ölçüde katkı sağlamaktadır. *FLT3* mutasyonları, AML hastalarının yaklaşık %25'inde juxtamembran (JM) alanında görülen internal tandem duplikasyonlar (ITD) ve daha az görülen %7-10 oranında tirozin kinaz alanındaki nokta mutasyonu (TKD) olarak iki sınıfta incelenebilmektedir. (Negotei vd., 2023). Hücrel sinyalleşmeden sorumlu olan *FLT3* genindeki mutasyonlar, hücrel sinyal iletim yollarını anormal şekilde aktive ederek hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesine, çoğalmasına ve anormal farklılaşmaya neden olarak AML lökomogenezinde yol açabilmektedir. *FLT3* gen mutasyonu olan hastalarda, beyaz kan hücrelerinin fazla olması, yükselen blast oranı ve daha yüksek nüks beklenmekte ve olumsuz klinik ile ilişkilendirilmektedir. AML'de *FLT3* mutasyonunun moleküler mekanizmasının anlaşılması, hastalığın risk sınıflandırması, prognozu ve verilecek tedavinin planlanmasında son derece önemlidir (Jalte vd., 2023). AML'de *FLT3* inhibitörleri tedavi seçeneği olarak değerlendirilebilmektedir (Negotei vd., 2023). Birinci ve ikinci nesil *FLT3* inhibitörleri, yeni tanı almış AML hastalarında ilk tedavi olarak ya da hastalığın nüks ettiği veya direnç geliştirdiği durumlarda kullanılabilir. Hastalığın direncinin arttığı durumlarda daha etkili iyileşme sağlanması için yeni tedavi yaklaşımlarının araştırılması gerekmektedir (Zhao vd., 2022).

2.4.1.2. *NPM1* Mutasyonu

NPM1 geni, kromozom üzerinde 5q35'te bulunmakta ve 12 ekzondan oluşmaktadır (Hindley vd., 2021). *NPM1* geninin; ribozom biyogenezi, genomik stabilitenin sağlanması, hücrel büyüme ve stres yanıtı gibi birçok hücrel işlevi bulunmaktadır (Wang vd., 2022). *NPM1*'in işlevleri hücre içinde çekirdek ve sitoplazma arasında taşınabilme özelliği sayesinde kolaylaşmaktadır (Hindley vd., 2021). *NPM1*, N terminal alanı, merkez alan ve C terminal alanından oluşmaktadır. *NPM1* genel olarak çekirdekte bulunmaktadır, *NPM1*'in çekirdekten sitoplazmaya

geçişi N terminal alanda bulunan nükleer ihracat sinyalleri (Nuclear Export Signals-NES) tarafından gerçekleştirilmektedir. C terminal alanında bulunan nükleolar lokalizasyon sinyalleri (Nucleolar Localization Signals-NoLS), NPM1'in çekirdekdeki lokasyonu için önemlidir (Wang vd., 2022). NPM1'in çekirdeğe taşınması çekirdek plazmasından sitoplazmaya geçişi kolaylaştıran iki NES ve çekirdek taşıyıcısı exportin 1'in (XPO1) etkileşimi ile gerçekleşmektedir (Falini vd., 2020). *NPM1* de oluşan mutasyonlar, yeni bir C terminal NES'in oluşmasıyla daha etkili bir biçimde NPM1'in hücre çekirdeğinden sitoplazmaya taşınmasına neden olmaktadır. Triptofan kalıntıları, NPM1'in çekirdekten sitoplazmaya taşınmasının düzenlenmesinde görevlidir. NPM1 mutasyonunda 288 ve 290 numaralı triptofan kalıntılarının kaybı, NPM1'in çekirdekten sitoplazmaya daha kolay bir şekilde geçmesine yol açarak NPM1'in işlevlerini bozabilmektedir. NPM1'in mutasyona uğramış formu NPM1c olarak adlandırılmaktadır. NPM1c, miyeloid hücrelerin farklılaşmasında yer alan, hücre proliferasyonunu destekleyen ve DNA tamir mekanizmalarını bozan PU.1, FBW7γ ve APE1 gibi önemli proteinlerle etkileşime girerek hücresel işlevlerin bozulmasına neden olabilmektedir (Wang vd., 2022). NPM1 mutasyonlarına en çok ekzon 12'de rastlanmaktadır ve yaklaşık olarak 50 farklı NPM1 mutasyonu bildirilmiştir (Hindley vd., 2021). NPM1 mutasyonları AML' de olumlu prognoz olarak kabul edilmektedir (Wang vd., 2022). AML hastalarında genel sağ kalım oranı %40 civarında ve tam remisyon oranı yaklaşık olarak %80'dir. Ancak hastaların %50'sinde nüks görülebilmektedir. NPM1 mutasyonuna sahip AML hastalarına standart olarak "3+7" indüksiyon kemoterapisi ve konsolidasyon tedavisi planlanmaktadır. NPM1 mutasyonlu AML' de tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi hedeflenmektedir. NPM1c işlevini ve anormal taşınmasını engelleme, NPM1c yıkımını gerçekleştirme ve monoklonal antikorlar gibi immünoterapiyi destekleyen çalışmalar bulunmaktadır (Wang vd., 2022).

2.4.1.3. CEBPA Mutasyonu

CEBPA, 19q13.1 kromozom bölgesinde bulunan granülopoezin önemli düzenleyicilerinden olan CCAAT Güçlendirici Bağlanma Proteini α (CEBP α)'yı kodlayan bir gendir. CEBP α , hücre büyümesi, granülositlerin farklılaşması ve metabolizma düzenlenmesi gibi süreçlerde önemli olan bir transkripsiyon faktörüdür. (Su vd., 2022; Taube vd., 2022). CEBPA mutasyonu, *de novo* olarak meydana gelen

AML hastalarında yaygın görülürken ikincil veya tedaviyle ilişkili AML’de nadir görülmektedir. *CEBPA* mutasyonunun AML’deki insidansı yaklaşık olarak %5,1-18,9 arasında olmaktadır. (Tien & Hou, 2024). *CEBPA* geninde C terminal alanı ve N terminal alanı bulunmaktadır. C terminal alanında DNA bağlayıcı bZIP kısmı ve N terminal alanında iki transaktivasyon alanı (TAD), TAD1 ve TAD2 bulunmaktadır (Tien & Hou, 2024). *CEBPA* da N terminal alanında görülen mutasyonlar p30’un üretimine yol açmaktadır. P30, DNA’ya bağlanarak gen ekspresyonunu düzenleyen tam uzunluktaki p42 proteinine baskın gelen kısaltılmış bir formdur. P30’un üretilmesi p42’nin işlevlerini bozabilmektedir. C terminal alanında görülen mutasyonlar da CEBPα’nın DNA’ya bağlanmasını veya dimerleşmesini olumsuz olarak etkilemektedir. *CEBPA* mutasyonlarında yalnızca bir terminalde oluşan mutasyonlar *CEBPA* tek mutasyonu (*CEBPA*sm), iki terminal alanında birlikte görülen mutasyonlar *CEBPA* çift mutasyonları (*CEBPA*^{dm}) olarak bilinmektedir (Su vd., 2022). *CEBPA* mutasyonuna sahip AML hastalarının çoğunda N terminal TAD ve C terminal bZIP bölgesinde biallelik mutasyon görülmektedir. *CEBPA*^{dm}’nin *CEBPA*sm’ye göre genel sağ kalımı daha iyi olduğu bilinmektedir. *CEBPA*^{dm}, 2016 WHO sınıflandırmasında ve ELN önerilerinde olumlu risk grubunda yer almaktadır. Son çalışmalarla birlikte *CEBPA* mutasyonları *CEBPA*sm veya *CEBPA*^{dm} diye değerlendirilmeyip bZIP alanında çerçeve içi mutasyonu (*CEBPA*^{bZIP-inf} in-frame mutation) olan hastalar olumlu risk olarak değerlendirilmiştir. *CEBPA* biallelik mutasyonlarına sahip AML, 2022 WHO sınıflaması, 2022 ELN önerileri ve ICC güncellemeleri doğrultusunda çerçeve içi bZIP mutasyonlarını içeren AML olarak yeniden sınıflandırılmıştır. (Tien & Hou, 2024)

2.5. AML ve Risk Sınıflandırması

AML hastalarının risk sınıflandırması, hastanın prognozunu ve tedavi yaklaşımının belirlenmesinde önemlidir. AML’deki klinik kılavuzlar üç sitogenetik risk grubunu tanımlamaktadır (Çizelge 2.5.). Risk sınıflandırması hastalığın yayılma hızına, sahip olduğu genetik mutasyonlara, yaş ve genel sağlık durumuna bağlıdır. Avrupa Lösemi Ağı (European LeukemiaNet-ELN), 2017 yılındaki risk sınıflandırması 2022 yılında güncellenmiştir. Güncellenen 2022 risk sınıflandırmasındaki veriler yeni moleküler bulgular ve yoğun tedavi gören hastalar dikkate alınarak düzenlenmiştir (Shai Shimony vd., 2023).

Düşük risk grubu içerisinde t(8; 21)(q22; q22.1)/ *RUNX1::RUNX1T1*, inv(16)(p13.1q22) veya t(16; 16)(p13.1; q22)/ *CBFB::MYH11*, *FLT3* -ITD olmadan mutasyona uğramış *NPM1* ve bZIP çerçeve içi mutasyona uğramış *CEBPA* (CCAAT Güçlendirici Bağlanma Proteini A) bulunmaktadır (Appelbaum, 2023). Orta risk grubunu oluşturan hastalar t(9;11)(p21.3; q23.3)/ *MLLT3 :: KMT2A*, FLT-ITD ile mutasyona uğramış *NPM1*, FLT3-ITD wild tip *NPM1* genetik anormalliklerine sahip olmaktadır (DiNardo vd., 2023). Bunlar dışında normal sitogenetiğe, ya da olumlu veya olumsuz olarak sınıflandırılmamış sitogenetik veya moleküler anormalliklere sahip olabilmektedir. Bu hastalık grubu AML hastalarının %45'ini oluşturmaktadır. Bu gruptaki hastalar için tedavi yaklaşımları belirsizdir, tedavinin sonuçları hastalar arasında farklılık göstermektedir (Shai Shimony vd., 2023). Son olarak kötü prognoza sahip hastalar inv(3)(q21.3q26.2) veya t(3; 3)(q21.3; 26.2) *GATA2*, *MECOM* (*EVII*), t(9;22) (q34.1;q11.2)/ *BCR :: ABL1*, t(6; 9)(p23; q34.1)/ *DEK :: NUP214*, t(8;16)(s11; s13)/ *KAT6A :: CREBBP*, t(v; 11q23.3) *KMT2A* -yeniden düzenlenmesi (PTD hariç), t(3q26.2; v)/ *MECOM* (*EVII*)-yeniden düzenlenmesi, mutasyona maruz kalmış TP53, 5(q)ve 7(q) kromozom delesyonlarına veya karmaşık karyotipe sahip olabilmektedir (Appelbaum, 2023). Bu hastalar genellikle başlangıç tedavisine düşük yanıt vermekte ve önemli ölçüde nüks riski ile ilişkilendirilmektedir (Padmakumar vd., 2021). Ayrıca *ASXL1*, *BCOR*, *EZH2*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1* veya *ZRSR2* genlerinde de görülen mutasyonlar kötü prognoza sahip hastalarla ilişkilendirilmiştir (Prada-Arismendy vd., 2017; Shai Shimony vd., 2023). AML risk sınıflandırması Çizelge 2.5.'te özetlenmiştir (Appelbaum, 2023; DiNardo vd., 2023).

Çizelge 2.5. AML Risk Sınıflandırması

Olumlu	Orta	Olumsuz
t(8;21)(q22;q22.1)/RUNX1::RUNX1T1	t(9;11)(p21.3;q23.3)/ MLLT3 :: KMT2A	inv(3)(q21.3q26.2) veya t(3;3)(q21.3;26.2) GATA2 , MECOM (EVI1)
inv(16)(p13.1q22) veya t(16;16)(p13.1;q22)/ <i>CBFB::MYH11</i>	FLT3-ITD ile mutasyona uğramış NPM1	t(9;22)(q34.1;q11.2)/ <i>BCR :: AB L1</i>
FLT3 -ITD olmadan mutasyona uğramış NPM1	FLT3-ITD wild tip NPM1	t(6;9)(p23;q34.1)/ DEK :: NUP214
bZIP çerçeve içi mutasyona uğramış <i>CEBPA</i>	Olumlu veya olumsuz sınıflandırılma dahil olmayan diğer sitogenetik ve moleküler farklılıklar	t(8;16)(s11;s13)/ <i>KAT6A :: CREBBP</i>
		t(v;11q23.3) KMT2A -yeniden düzenlendi (PTD hariç)
		t(3q26.2;v)/ <i>MECOM (EVI1)</i> -yeniden düzenlendi
		Mutasyona uğramış TP53
		del5(q) ve del7(q)
		Kompleks karyotip

2.6. AML ve Biyobelirteçler

Biyobelirteçlerin tanımlanması kanserlerin teşhis ve tedavisi için önemlidir. (Yu vd., 2020). AML’inde dahil olduğu hematolojik malignitelerde miRNA’ların yaygın düzensizliği bulunmuştur (Liao vd., 2017). Yapılan araştırmalar, miRNA’ların kanda ve plazmada kararlı bir şekilde saptanabildiğini göstermiştir. AML ve diğer kanser türleri için miRNA’ların biyobelirteçler olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Yu vd., 2020).

2.7. MiRNA

MiRNA’lar gen ekspresyonunu post-transkripsiyonel olarak düzenleyen yaklaşık olarak 18-25 nükleotid uzunluğunda kısa, kodlamayan RNA’lardır. Hedef genlerin transkripsiyon sonrası susturulmasını düzenlemektedir. Bir miRNA, birçok mRNA’yı hedefleyerek birden fazla genin ifadesini etkileyebilmektedir. miRNA ekspresyonun değişmesi genlerin ifadesinde değişikliklere neden olmakta ve bu durum bilinen birçok kanser türü ile miRNA ekspresyonunun ilişkili olduğunu göstermektedir (Lu &

Rothenberg, 2018). Dolaşımdaki miRNA'lar yüksek özgüllükte ve kolay erişilebilir olduğundan tercih edilen biyobelirteçler arasındadır. Hastalığın teşhisinde ve prognozundaki önemi son yıllarda yapılan çalışmalarla desteklenmiştir (Ho vd., 2022)

2.8. MiRNA ve Kanser

Hücreler kontrolsüz bir şekilde çoğalmaya başladığında ve apoptoza uğraması gerektiği halde apoptoza uğramadığında genellikle kanser oluşumu görülmektedir (Saydam vd., 2011). MiRNA'lar hücre büyümesi, farklılaşması, apoptoz ve tümör anjiyogenezi gibi çeşitli biyolojik süreçlerde rol almaktadır (Yu vd., 2020).

Yapılan çalışmalarla miRNA'ların kanserli ve normal dokular arasındaki ekspresyon farklılıklarının belirlenmesi, miRNA ekspresyonunun kanserin oluşumuna ve ilerlemesine katkıda bulunduğunu göstermiştir (Yu vd., 2020). MiRNA'lar bağlanmış oldukları mRNA'ların yolaklarda bulunan rol ve özelliklerine bağlı olarak onkogenik veya tümör süpresör özellikler göstermektedir. Tümör süpresör miRNA'lar hedefledikleri mRNA'ları baskılayarak veya düzenleyerek anormal hücre büyümesini kontrol altına almaya çalışmaktadırlar. Tümör süpresör olarak görev yapan miRNA'ların ekspresyonunun azalması onkogenlerin ekspresyonunun artmasına ve kanser gelişimine neden olmaktadır (Saydam vd., 2011).

MiRNA'lar tümör taşıyan hastaların plazma ve serum örneklerinde belirgin bir şekilde tespit edilebilmektedir. MiRNA'ların bu özellikleri belirli kanserlerin teşhisinde invaziv olmayan biyobelirteçler olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Yu vd., 2020). Gen düzenlemede etkin rolü bulunduğu için işlevini yerine getiremeyen miRNA'lar anormal hücresel büyümelere ve farklılaşmadan kaynaklı hastalıklara neden olabilmektedir. Calin ve arkadaşlarının 2001 yılında KLL hastaları üzerine yaptığı çalışmada, kanserleşme sürecine miRNA'ların katkıda bulunduğu görülmüştür. MiR15 ve miR16, KLL hastalarının büyük bir kısmında 13q14 kromozomunda delesyona uğramış bir bölgede bulunmaktadır. KLL hastalarında miRNA ekspresyon seviyelerine bakıldığında mir-15a ve mir-16 -1'nin belirgin bir şekilde azaldığı görülmüştür (Calin vd., 2002). AML için yapılan araştırmalarda da gen ifadesini düzenleyen miRNA'ların transkripsiyon sonrası düzenlemede değişiklikler olduğu rapor edilmiştir (Liao vd., 2017).

AML hastaları ve sağlıklı kontroller ile yapılan bir çalışmada miR-181 ve miR-221'in ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Hastaların kemoterapiden önce ilk AML tanısı aldıklarındaki ekspresyon değerleri, kemoterapiden sonra tam remisyona ulaştığındaki ekspresyon değerlerinden önemli ölçüde yüksektir. MiR-221 proliferasyonunun inhibisyonundan sonra tam remisyon gösteren AML hastalarında aşağı yönde regüle edildiği görülmüştür. (Lee vd., 2019). Yapılan araştırmalarla AML ile ilişkisi olduğu görülen miR-155, miR-210 ve miR-126-5p'nin yukarı yöndeki regülasyonu AML hastalarında olumsuz prognoz ile ilişkilendirilirken; miR-370, miR-328 ve miR-204'ün yüksek ekspresyonu olumlu prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Yu vd., 2020). Tez çalışmamızda AML de ekspresyon değerlerini inceleyeceğimiz üç adet miRNA bulunmaktadır. MiR-216a-5p'nin AML ile ilişkisini gösteren çalışmalara literatürde rastlanmamıştır. MiR-216'nın etkileştiği sinyal yollarının AML ile ilişkili olmasından dolayı biyobelirteç olarak potansiyeli olabileceği düşünülmüştür. Araştırmak istediğimiz diğer bir miRNA olan MiR-223'ün AML ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Bizim çalışma grubumuzda yer alan yeni tanıli AML hastalarındaki ifadesini görmek için seçtiğimiz bir miRNA'dır. Çalışmamız için seçilen son miRNA olan miR-490-3p, literatür taramasında AML ile ilişkisinin olabileceği gösterilmiştir fakat sınırlı sayıda çalışmaya erişilebilmiştir. MiR-490-3p'nin AML ile ilişkisinin yeni tanı alan hastalarda biyobelirteç olarak potansiyelini araştırmak amacıyla çalışmaya miR-490-3p dahil edilmiştir.

2.8.1. MiR-216a

MiR-216a ailesinden olan miR-216a-5p, 2q16.1 kromozomal bölge tarafından kodlanan yeni tanımlanmış miRNA'lar arasındadır (Chai & Yang, 2019). Çeşitli kanser türlerinde miR-216a-5p'nin kanserin gelişmesi ve metastazında etkili olduğu bildirilmiştir. MiR-216a-5p ekspresyonu bazı kanser türlerinde yüksek görülürken bazı kanser türlerinde düşük olarak görülmüştür (Chen vd., 2018). MiR-216a ailesi, hücrel süreçlerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamakta, otofaji ve apoptoz süreçlerini kontrol ederek tümör ilerlemesinde etkili olmaktadır. Ayrıca, miR-216a, hücre içi sinyal iletiminden görevli JAK/STAT ve MAPK (Mitogenle Aktive Edilen Protein Kinaz) sinyal yollarını düzenleyerek kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve hayatta kalmasını etkileyebilmektedir. (Hamidi vd., 2023). AML'nin ilerlemesinde de bu sinyal yollarının

etkisinin olduğuna dair kanıtlar sunulmuştur (Sha vd., 2021; Wang vd., 2020). Aynı zamanda tümörün gelişimiyle ilgili olarak transkripsiyon faktörleri miR-216a için moleküler hedefler olmaktadır. MiR-216a; KLF12, YBX1, HMGB3, SOX5, ZEB1, RUNX1 transkripsiyon faktörlerini düzenlemektedir. Düzenlediği transkripsiyon faktörlerinden birisi olan RUNX1, hematopoezde önemlidir ve AML hastalarında mutasyonları görülmektedir (Della Porta vd., 2024; Hamidi vd., 2023). MiR-216a ailesine ait olan miR-216a-5p, AML'nin patogeneziyle ilgili potansiyel bir hedef niteliği taşımaktadır.

2.8.2. MiR-223

MiR-223 granülopoez ile ilişkili miRNA'lar arasındadır ve süreci düzenlemektedir (Pulikkan vd., 2010). MiR-223, öncelikli olarak miyeloid hücrelerde ifade edilmektedir. Olgunlaşma ve granülositik fonksiyonun sürdürülmesinde önemli olup granülositik diferansiyonu tetikleyebilmektedir. Ayrıca eritrositler gibi diğer kan hücrelerine doğru olan diferansiyonu da bloke edebilmektedir (Eyholzer vd., 2010). MiR-223'ün miyeloid transkripsiyon faktörlerinden olan CEBPA ve PU.1 tarafından düzenlendiği gösterilmiştir. CEBPA ve PU.1, miyeloid hücrelerde önemli bir rol oynamakta ve hematopoezde yer almaktadır. MiR-223 düzensizliği AML'nin de arasında bulunduğu bazı kanser türlerinde bildirilmiştir (Osiriphan vd., 2024). MiR-223'ün AML ile ilişkisini içeren çalışmalar literatürde yer almaktadır ve bu çalışmaların sonucunda miR-223'ün AML'nin teşhisi ve prognoz tahmini için yeni bir biyobelirteç olabileceği düşünülmüştür (Xiao vd., 2016). Ancak bu potansiyelin geçerlilik kazanabilmesi ve kullanılabilir hale gelmesi için doğrulanması gerekmektedir. Bu amaçla bizim hasta grubumuz dahilindeki örneklerde miR-223 ekspresyonunun düzeyinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

2.8.3. MiR-490

MiR-490, kromozomun 7q33 bölgesinde kolinerjik reseptör muskarinik 2 (CHRM2) geninde yer almakta ve bu genin intronundan transkripsiyonu gerçekleşmektedir. MiR-490-5p ve miR-490-3p miR-490 ailesine ait düzensiz ifade düzeyleri kanserin gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkili bulunan miRNA'lardır. MiR-490-5p ve miR-490-3p, ekspresyon seviyelerinin tümörlerin çoğunda düşük olduğu

gösterilmektedir. Düşük miR-490-3p ekspresyon seviyelerine sahip tümör tipleri arasında AML de yer almaktadır (Li vd., 2021). MiR-490'nın hedefleri arasında hücrelerin çoğalması, göçü, invazyonu ve apoptozisini düzenleyen kanserleşme süreciyle ilişkili olan bir dizi gen bulunmaktadır. MAPK1, AML' de miR-490-3p'nin hedef genleri arasında yer almaktadır. (Vinchure & Kulshreshtha, 2021). AML gelişimi ve ilerlemesinde miR-490-3p hedef genleri üzerinde düzenleyici bir etki göstererek AML patogenezi ile ilişkili bir hedef olabilir.



BÖLÜM 3

MATERYAL METOT

3.1. Örneklem Grubunun Oluşturulması

Tez çalışmamız 18-65 yaş aralığındaki gönüllü hastalardan ve sağlıklı kontrollerden oluşmaktadır. Yeni AML tanısı almış ve başka bir kanser öykü olmayan hastalar dahil edilmiştir. Çalışmaya katılmayı kabul eden ve onam formunu imzalayan hastaların rutin testleri için alınan kemik iliği ve kan örneklerinde, rutin testler yapıldıktan sonra, artan ve atılacak olan örnekleri deneyler için kullanılmıştır. Çalışma için hastalardan ayrıca kemik iliği örneği alınmamıştır. Kabul ve red kriterleri sırasıyla Çizelge 3.1. ve Çizelge 3.2.'de belirtilmiştir. Yeni tanı alan AML hastalarının sonuçlarını karşılaştırmak için gönüllü sağlıklı bireylerden periferik kan örneği alınmıştır. Sağlıklı kontrollerden kemik iliği örneği alınmamıştır. Çalışmadaki parametrelerin ekspresyon düzeylerine ilişkin kapsamlı bir literatür taraması yapılmıştır. Literatür taramasının sonucunda, miR-216-5p, miR-223-3p, ve miR-490-3p'nin ekspresyon değerleri baz alındığında gruplar arasında büyük düzeyde etki büyüklüğü değeri hesaplanmaktadır. Çalışmamızda gruplar arasında hedeflenen miRNA'ların ekspresyon değerinde büyük etki büyüklüğü düzeyindeki ($d=0.8$) farkı %5 yanılma payı ve %80 güç değeriyle test edebilmek için 26 hasta ve 26 sağlıklı kontrol olmak üzere toplam 52 bireyin çalışmaya alınması gerektiği hesaplanmıştır. Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Hematoloji Kliniğine gelen ve kabul kriterlerine uyan 26 hastanın periferik kan ve kemik iliği örneği ile çalışılmıştır. Hasta ve sağlıklı bireyler çalışmaya alınırken cinsiyet dağılımına da dikkat edilmiştir, 12

kadın-14 erkek yeni tanı AML hastası ve aynı şekilde 12 kadın 14 erkek sağlıklı kontrolden oluşan örneklem grubu oluşturulmuştur.

Çizelge 3.1. Kabul Kriterleri

Kabul Kriterleri
1. 18 yaş ve üzeri olmak
2. AML tanısı almış olmak
3. Başka bir kanser tanısı almamış olmak
4. AML ile ilgili bir tedaviye başlamamış olmak
5. Hastanın gönüllü olması ve dosya bilgilerinin tam olması

Çizelge 3.2. Red Kriterleri

Red Kriterleri

1. 18 yaşından küçük olmak
2. AML tanısı almamış olmak
3. AML dışında herhangi bir kanser öyküsüne sahip olmak
4. Farklı bir kanser türünün tedavisiyle ilişkili olarak gelişen AML hastası olmak
5. AML ile ilgili bir tedaviye başlamış olmak
6. Hastanın gönüllü olmaması ve eksik dosya bilgisi

3.2. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

Araştırmanın gönüllülere anlayabileceği net bir şekilde anlatıldığı, gönüllü kişinin rızasının olmadan herhangi bir işlem yapılamayacağını açıklandığı ve araştırmaya girmeye karar verdikten sonra vazgeçildiğinde araştırmanın herhangi bir zaman diliminde neden belirtmeksizin çıkabileceğini anlatan Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu çalışmaya dahil edilecek gönüllülerden alınmıştır (Ek 1).

3.3. Etik Kurul ve TÜBAP Onayı

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulunun 24.04.2023 tarihli toplantısında; TÜTF-GOBAEK 2023/185 protokol numarasıyla

kaydedilen ve 07/75 karar numaralı belge ile çalışmaya etik kurul onayı verilmiştir (Ek 2).

3.4. Yöntem

Çalışmamıza dahil AML hastalarından oluşan gönüllülerin periferik venöz kan ve kemik iliği numuneleri etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) antikoagülanlı tüplere alınmıştır, örneklerden rutin testler yapıldıktan sonra artan örnekler kullanılmıştır. Sağlıklı kontrol grubumuzdaki gönüllülerden sadece periferik venöz kan numunesi EDTA antikoagülanlı tüplere alınmıştır. Numuneler alındıktan sonra RNA izolasyonu 1-6 saat içinde gerçekleştirildi. RNA izolasyonu gerçekleştirilene kadar +4° C’de saklandı. RNA izolasyonundan sonra reverse transtriptaz enzimi kullanılarak elde edilen RNA’lar c-DNA’ ya çevrildi. Daha sonra ekspresyon düzeylerine bakmak istediğimiz miRNA’ların primerleri (Çizelge 3.3.) kullanılarak Real-time PCR cihazında çalışıldı.

Çizelge 3.3. Real-time PCR’da Çalışılan, Primerler

Ürün Adı	Katalog no	Ürün grubu	Lot no	miRNA dizisi
hsa-miR-216a-5p	YP00204167	miRCURY LNA miRNA PCR Assay	312005 18-1	UAAUCUCAGCUGGCAAC UGUGA
hsa-miR-223-3p	YP00205986	miRCURY LNA miRNA PCR Assay	409010 49-3	UGUCAGUUUGUCAAUAC CCCA
hsa-miR-490-3p	YP00205999	miRCURY LNA miRNA PCR Assay	201705 050390 -1	CAACCUGGAGGACUCCA UGCUGCUG

Çalışmada Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi Laboratuvarındaki cihazlar ve ekipmanlar kullanılmıştır. Kullanılan kitler üreticinin direktiflerine uygun olarak aşağıdaki sırayla uygulanmıştır.

3.4.1. MiRNA İzolasyonu

Çalışmamızda ~200 nükleotidden küçük olan miRNA’ları izole etmek amacıyla kullanmış olduğumuz miRNeasy Mini Kit kullanılmıştır.

MiRNA izolasyonuna başlamadan önce kit içerisinde çıkan RWT ve RPE konsantrelerine protokolde belirtilen miktarda etanol (%96-100) eklendi. RWT solüsyonuna 30 ml etanol (%96-%100), RPE solüsyonuna 44 ml etanol (%96-%100) eklendi.

- 1 hacim kemik iliği / venöz periferik kan üzerine 5 hacim eritrosit lizis (EL) tamponu eklendi ve 15 ml vida kapaklı steril falkon tüpte karıştırıldı. Eritrositlerin parçalanması sağlandı.
- Buz üzerinde 20 dakika bekletildi. İnkübasyon sırasında tüpler 5 dakikada bir vortekslendi.
- Eritrositler parçalanıp süspansiyon yarı saydam bir hale geldiğinde 4°C'de 15 dakika 400xg'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra tüpün alt kısmında pellet görüldü. Tüpün üzerindeki sıvı kısım uzaklaştırıldı.
- 1 hacim üzerine 2 hacim olacak şekilde EL buffer eklendi. Pelletin tüpün içerisinde karışması için vortekslendi ve buz üzerinde 10 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sırasında 5. Dakikada vortekslendi.
- 10 dakikanın sonunda tüpler 4°C'de 10 dakika 400xg'de santrifüj edildi.
- Santrifüj ile pellet tüpün alt kısmına çöktürüldü. Üst sıvı pelleti dağıtmadan dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.
- Pellet üzerine 700 µl QIAzol Reaktifi eklendi. QIAzol Parçalama Reaktifi; hücrelerin parçalanmasını kolaylaştıran, RNazları inhibe eden ve hücrel DNA ve proteinlerin çoğunu organik ekstraksiyon yoluyla lizattan ayırmak için üretilmiş monofazik bir fenol ve guanidin tiyosiyanat çözeltisidir. QIAzol Reaktifi eklendikten sonra homojenize etmek için önce vortekslendi daha sonra 22 gauge uçlu 2ml enjektör yardımıyla lizat birkaç kez enjektöre çekilip bırakılarak lökosit hücrelerinin parçalanması sağlandı. Bazı homojenatlar -80°C'de bir sonraki aşamaya kadar saklandı.
- Homojenat oda sıcaklığında (15-25°C) 5 dakika inkübe edildi.
- Homojenatın üzerine 140 µl kloroform eklendi ve tüp sıkıca kapatıldı. 15 saniye iyi bir şekilde vortekslendi.
- Oda sıcaklığında 2-3 dakika inkübasyonu yapıldı.
- Örnekler 4°C'de 12000g'de santrifüjlendi.

- Kloroform eklendikten sonra santrifüj yapılarak homojenatın fazlara ayrılması sağlandı. En üstte renksiz RNA içeren sulu faz, orta kısımda beyaz faz ve en alt kısımda kırmızı renkte olan organik faz bulunduğu görüldü.
- Üst kısımda bulunan renksiz sulu faz (yaklaşık 350 µl) kit içeriğinde bulunan yeni bir toplama tüpüne aktarıldı.
- Üzerine 1,5 hacim (genellikle 525 µl) %100 etanol eklendi ve pipetaj yapılarak iyice karıştırıldı. 18 nükleotidden büyük tüm RNA molekülleri için uygun bağlanmak koşullarının sağlanması için etanol eklenmesi yapıldı.
- Kit içerisindeki Rneasy Mini döndürme kolonuna, toplama tüpü içerisinde bulunan çökeltide dahil olacak şekilde 700 µl'ye kadar olan numune aktarıldı. Aktarılan toplam RNA kolondaki membrana bağlanır. Bu sayede fenol ve diğer kirletici maddeler yıkanarak uzaklaştırılmış olur.
- Oda sıcaklığında 28000g'de 15 saniye santrifüj edildi.
- Kolon yeni bir kolon altına yerleştirildi, kolon altı atıldı.
- 700 µl RWT solüsyonu, Rneasy Mini döndürme kolonuna eklendi ve 8000g'de 15 saniye santrifüj edildi. Kolon altı atılarak Rneasy Mini döndürme kolonu yeni bir kolon altına yerleştirildi.
- 500 µl RPE solüsyonu, Rneasy Mini döndürme kolonuna eklendi ve 8000g'de 15 saniye santrifüj edildi. Kolon altı atılarak Rneasy Mini döndürme kolonu yeni bir kolon altına yerleştirildi.
- 500 µl RPE solüsyonu Rneasy Mini döndürme kolonuna eklendi ve 8000g'de 2 dakika santrifüj edildi. Kolon altı atılarak Rneasy Mini döndürme kolonu yeni bir kolon altına yerleştirildi.
- Rneasy Mini döndürme kolonunda RPE solüsyonunun tamamen uzaklaşması için kolon 1 dakika bir şey eklenmeden boş olarak santrifüj edildi. Kolon altı atılarak Rneasy Mini döndürme kolonu yeni 1.5 ml toplama tüpüne aktarıldı.
- Rneasy Mini döndürme kolonundaki RNA'nın 1.5 ml yeni toplama tüpüne geçmesi için 30 µl Rnaz içermeyen su kolon membranının tam ortasına gelecek şekilde kolona eklendi ve 8000g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüjden sonra 1.5 ml toplama tüpüne bir işlem yapılmadı. 20 µl Rnaz içermeyen su Rneasy Mini döndürme kolon membranının tam üzerine eklendi ve 8000g'de 1 dakika santrifüj edildi.

- Rneasy Mini döndürme kolonundaki RNA'nın 1.5 ml toplama tüpüne geçmesi sağlandıktan sonra Rneasy Mini döndürme kolonu atıldı.
- Elde etmiş olduğumuz RNA'nın konsantrasyonu, NanoDrop™ 2000/2000c Spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific, USA) kullanılarak ölçüldü. Örnekler bir sonraki aşama olan cDNA sentezine kadar -80°C 'de saklandı.

3.4.2. c-DNA Sentezi

c-DNA sentezi için miRCURY LNA RT Kit kullanıldı. miRCURY LNA RT Kit teslim alındıktan sonra $(-30^{\circ}\text{C}) - (-15^{\circ}\text{C})$ 'de saklandı. RNA'nın bozulma riski yüksek olduğundan tüm reaksiyonlar soğuk blok üzerinde hazırlandı. Kit içeriğinde bulunan RNA Spike-in; RNA izolasyonu, ters transkripsiyon ve amplifikasyon süreçlerini kontrol etmek için kullanılır. Laboratuvar çalışmalarında cihaz veya kimyasal arızaları ya da test kurulumundaki hataları ve inhibitörlerin varlığını tespit etmeyi amaçlar. Böylece daha güvenilir ve verimli sonuçlar elde etmeyi sağlar.

1. Bir önceki aşamada -80°C 'de sakladığımız RNA'lar, UniSp6 RNA ve 5x miRCURY RT Reaksiyon Tamponu soğuk blok üzerinde çözündürüldü. Çalışmaya başlamadan hemen önce 10x miRCURY RT Enzimi $(-30^{\circ}\text{C}) - (-15^{\circ}\text{C})$ olan dondurucudan çıkarıldı. Tüpler çözündükten sonra hafifçe karıştırıldı ve tüplerin kenarlarında kalan sıvının aşağı inmesi için spin atıldı. Buz üzerine koyuldu.
2. UniSp6 RNA'yı süspanse etmek için tüpe 80 μl nükleaz içermeyen su eklendi. Vorteksleyerek karışması sağlandı. RNA spike-in'i tamamen çözünmesi için buz üzerinde 20 dakika daha bekletildi. Vorteksleyerek karıştırıldı ve aşağı doğru döndürüldü. RNA spike-in sürekli olarak dondurulup çözülmesini önlemek için alikotlanıp dondurucuya kaldırıldı.
3. Şablon RNA'lar 5 ng/ μl 'ye ayarlandı. Her şablon RNA'yı Serum/plazmadan izole edilen RNA için, 20 μl -RT reaksiyonu için kullanılacak 16 μl numuneden izole edilene eşdeğer RNA miktarını hesaplandı.
4. Ters transkripsiyon reaksiyonu için soğuk blok üzerinde Çizelge 3.4.'e göre mix hazırlandı. Hazırlanan karışım 8 μl olacak şekilde soğuk blok üzerinde boş PCR tüplerine eklendi. Daha sonra şablon RNA 2 μl olacak

şekilde karışımın olduğu PCR tüplerinin üzerine eklendi. Karışması için ve damlaların inmesi için vortekslenip spin atıldı. Totalde PCR için 10 µl'lik bir hacim elde edildi.

Çizelge 3.4.Ters Transkripsiyon Reaksiyonu Mix Hazırlığı

Ters Transkripsiyon Reaksiyon Bileşenleri	Miktarları
5x miRCURY RT Reaksiyon Tamponu	2 µl
Rnaz içermeyen su	4.5 µl
10x miRCURY RT Enzimi	1 µl
RNA spike-in	0.5 µl
Şablon RNA	2 µl

5. Uygun PCR programının ayarlaması yapıldı. 42°C'de 60 dakika inkübe edildi. Ters Transkriptaz Enzimini etkisiz hale getirmek için 95°C'de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon bittikten sonra sıcaklık 4°C'ye geldiğinde örnekler PCR cihazından alındı. Real-time PCR çalışmasına kadar örnekler-20°C''de muhafaza edildi.

Çizelge 3.5. RT PCR Sıcaklık

Aşamalar	Zaman	Sıcaklık
Ters Transkripsiyon Basamağı	60 dakika	42°C
Reaksiyonun İnaktivasyonu	5 dakika	95°C
Saklanması	∞	4°C

3.4.3. Real-time PCR

Real-time PCR (qPCR), miRNA ekspresyonunu belirlemek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. U6 küçük nükleer RNA (snRNA) hücrelerde genel olarak aynı ekspresyon seviyesine sahiptir ve dış etkenlere karşı da kararlı olduğundan miRNA ekspresyon analizlerinde referans olarak tercih edilmektedir.

Real-time PCR çalışmamız için miRCURY LNA SYBR Green PCR kiti kullanıldı. Kitler teslim alındıktan sonra (-30°C) – (-15°C) 'de saklandı. Çalışmaya

başlamadan önce çözünmesi için dondurucudan çıkarıldı. Kit içeriğindeki 2x miRCURY SYBR Green Master Mix, oda sıcaklığında aktif olmayan QuantiNova DNA polimerazını içermektedir. QuantiNova DNA Polimerazının aktive olabilmesi için PCR’da 95°C’de 2 dakika süren bir inkübasyonla başlandı.

Liyofilize olarak gelen miRCURY LNA PCR Assay tüpleri ilk kullanımdan önce vorteks yapıldı ve protokolde belirtilen talimat doğrultusunda 220 µl nükleaz içermeyen su eklendi. Vortekslenip kısa süre santrifüj edildi. Oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi.

Çizelge 3.6’da belirtilen miktarlara göre soğuk blok üzerinde 4 miRCURY LNA PCR Assay için ayrı ayrı 4 tane mix hazırlandı. Soğuk blok üzerine 0.1 ml Strip PCR tüpleri yerleştirildi ve karışımlar 7 µl olacak şekilde dağıtıldı. Daha sonra 3 µl cDNA örneği eklendi. Totalde 10 µl hacim elde edildi. Real-time PCR cihazında Çizelge 3.7.’de verilen PCR programı ayarlanarak örnekler cihaza yüklendi. Çalışmamız her bir hasta için hem kemik iliği hem de periferik kandan 3 tekrarlı olacak şekilde çalışıldı.

Çizelge 3.6. miRCURY LNA MiRNA PCR ASSAY Reaksiyon Mix

Bileşenler	Miktarlar
2x miRCURY SYBR Green Master Mix	5 µl
miRCURY LNA PCR Assay	1 µl
cDNA	3 µl
Rnaz içermeyen su	1 µl
Total Hacim	10 µl

Çizelge 3.7. MiRCURY LNA miRNA PCR ASSAY PCR döngü koşulları

Aşamalar	Zaman	Sıcaklık
PCR başlangıç ısı aktivasyonu	2 dakika	95°C
Denatürasyon	10 saniye	95°C
Bağlanma / Uzama	60 saniye	56°C
Döngü sayısı	40	

3.5. Verilerin Analizi ve İstatistiği

Realtime PCR cihazı ile çalışıldıktan sonra elde edilen veriler $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanılarak hesaplandı. İlk olarak 3 tekrarlı çalışıldığı için Ct (döngü eşiği) değerlerinin ortalaması alındı. Daha sonra ΔCt değerleri hesaplandı. Kontrol grubu için ana kontrol hesaplaması yapıldı. Her miRNA ve referans için kontrol grubu Ct değerleri, kontrol grubu sayısına bölünerek ana kontrol hesaplaması yapıldı. Daha sonra ana kontrolün ΔCt değeri hesaplandı. $\Delta\Delta Ct$ değerinin hesaplanması için hedef miRNA'nın ΔCt değerinden ana kontrolün ΔCt değeri çıkarıldı. Elde edilen değer, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü kullanılarak miRNA ekspresyonunun katsayı değişiminin hesaplanması ve istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığının değerlendirilmesi yapıldı.

Hastalar için ΔCt değeri formülü

$$\Delta Ct = Ct(\text{hedef miRNA}) - Ct(\text{referans gen})$$

$$\text{Ana kontrol} = (\text{hedef miRNA/referans}) / \text{kontrol grubu sayısı}$$

Ana kontrol için ΔCt değeri formülü

$$\Delta Ct = Ct(\text{Ana kontrol hedef miRNA}) - Ct(\text{ana kontrol referans gen})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{hedef miRNA}) - \Delta Ct(\text{ana kontrol})$$

$$\text{Kat değişimi} = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$$

BÖLÜM 4

BULGULAR

Tez çalışmamız Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmamıza, Trakya Üniversitesi Sağlık Eğitim Araştırma ve Uygulama Merkezi Hematoloji Kliniğine başvuran yeni tanı almış ve daha önce tedavi görmemiş 26 AML hastası dahil edilmiştir. Çalışmamızda hastaların kemik iliği ve periferik kan örnekleri kullanılmıştır. AML hastalarının yaş ortalaması $61,88 \pm 15,24$ 'dir. Çalışmaya 14 erkek-12 kadın AML hastası katılmıştır. Erkeklerin kendi içinde yaş ortalaması $63,79 \pm 14,47$ ve kadınların yaş ortalaması $59,67 \pm 17,04$ 'dir. AML hastaları 26 sağlıklı gönüllü ile karşılaştırılmıştır. Sağlıklı kontrollerin genel yaş ortalaması $50,12 \pm 7,08$ 'dir. Cinsiyet dağılımı 14 erkek 12 kadın şeklindedir. Sağlıklı erkek kontrollerin yaş ortalaması $52,14 \pm 7$ 'tür ve sağlıklı kadın kontrollerin yaş ortalaması $47,75 \pm 6,69$ 'tir. Sağlıklı kontrollerden sadece periferik kan örneği alınmıştır. Kişisel verilerinin gizliliği korumak için deneylerde kullanılan örnekler için hasta ve sağlıklı kontroller numaralandırılmıştır.

Yeni tanı almış AML hastalarımızın somatik mutasyonları ve tanısı Çizelge.4.1.'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1. AML Hastalarının Somatik Mutasyonu ve Tanısı

Hasta Numaraları	Somatik Mutasyon	Tanı
1	NM_002168.4(IDH2):c.419G>A (p.Arg140Gln) NM_002520.6(NPM1):c.860_863dupTCTG	NPM1 Mutasyonu ile AML
2	NM_004119.3(FLT3):c.2503G>T (p.Asp835Tyr) NM_002520.6(NPM1):c.860_863dupTCTG	NPM1 Mutasyonu ile AML
3	NM_006758.3(U2AF1):c.101C>T (p.Ser34Phe) TET2 c4353delIG	Miyelodisplazi Gen Mutasyonları ile İlişkili MDS/AML
4	NM_022552.5(DNMT3A):c.2644C>T (p.Arg882Cys) NM_005896.4(IDH1):c.394C>T (p.Arg132Cys) NM_001754.5(RUNX1):c.958C>T (p.Arg320Ter) NM_002524.5(NRAS):c.181C>A (p.Gln61Lys) NM_002524.5(NRAS):c.38G>A (p.Gly13Asp) NPM1 c.773_774insTATT	Akut Miyelomonositik Lösemi
5	NM_001195427.2(SRSF2):c.284C>G (p.Pro95Arg) NM_005896.4(IDH1):c.394C>T (p.Arg132Cys)	Miyelodisplazi Gen Mutasyonları ile İlişkili MDS/AML
6	NM_022552.5(DNMT3A):c.2645G>A (p.Arg882His) NM_004119.3(FLT3):c.2503G>T (p.Asp835Tyr) NM_199185.3(NPM1):c.773_776dup (p.Trp259fs)	NPM1 Mutasyonu ile AML
7	NM_001754.5(RUNX1):c.497G>A (p.Arg166Gln) NM_002524.5(NRAS):c.38G>T (p.Gly13Val) FLT3 c.1798_1799ins, NM_004119.3(FLT3):c.1773_1793dup (p.Tyr597_Glu598insAspValAspPheArgGluTyr) ASXL1 c1777dupG	Miyelodisplazi Gen Mutasyonları ile İlişkili MDS/AML
8	TET2 c.3854_3856delTCT TET2 c.3344delC	Miyelodisplazi Gen Mutasyonları ile İlişkili MDS/AML
9	NM_005896.4(IDH1):c.394C>T (p.Arg132Cys) NPM1 c.773_776 TCTG,	NPM1 Mutasyonu ile AML
10	FLT3 c.1770_1793dup NM_199185.3(NPM1):c.773_776dup (p.Trp259fs) NM_002524.5(NRAS):c.35G>A (p.Gly12Asp) NM_012433.4(SF3B1):c.1998G>C (p.Lys666Asn) CBL c.1151G>C	NPM1 Mutasyonu ile AML
11	RUNX1 c.915_916insG SF3B1 c.2342A>G	Miyelodisplazi Gen Mutasyonları ile İlişkili MDS/AML
12	PTPN11 c.214G>A	Miyelodisplazi Gen Mutasyonları ile İlişkili MDS/AML
13	NM_002834.3(PTPN11):c.1382C>G (p.Ala461Gly)	NPM1 Mutasyonu ile AML
14	BCORL1 c.2452_2453insGAAGGGCC	Miyelodisplazi Gen Mutasyonları ile İlişkili MDS/AML

15	DNMT3A c.2435dupA NM_002168.4(IDH2):c.419G>A (p.Arg140Gln)	Maturasyon ile AML
16	NM_022552.5(DNMT3A):c.2645G>A (p.Arg882His) NM_199185.3(NPM1):c.773_776dup (p.Trp259fs) FLT3 c.1798_1799ins, FLT3 c.1794_1795ins	NPM1 Mutasyonu ile AML
17	TET2 c2746C>T NM_001195427.2(SRSF2):c.284C>G (p.Pro95Arg) NM_022552.5(DNMT3A):c.2645G>A (p.Arg882His) TET2 NM_001127208.3 c.4797delC	Sitogenetik Anomalili Miyelodisplazi ile İlişkili MDS/AML
18	-	Akut Promiyelositik Lösemi
19	NM_022552.5(DNMT3A):c.2644C>T (p.Arg882Cys) FLT3 c.1798_1799ins FLT3 c.1794_1795ins	Akut Miyelomonositik Lösemi
20	NM_002524.5(NRAS):c.34G>A (p.Gly12Ser) TET2 c.3710delC NM_199185.3(NPM1):c.773_776dup (p.Trp259fs)	NPM1 Mutasyonu ile AML
21	NM_004364.5(CEBPA):c.175G>T (p.Glu59Ter) CEBPA c949_950insGTC	Bialelik CEBPA Mutasyonu ile AML
22	NM_199185.3(NPM1):c.773_776dup (p.Trp259fs)	NPM1 Mutasyonu ile AML
23	NM_000215.4(JAK3):c.1970G>A (p.Arg657Gln) CEBPA c.925_927dupAG, NM_004119.3(FLT3):c.2503G>T (p.Asp835Tyr)	Bialelik CEBPA Mutasyonu ile AML
24	NM_199185.3(NPM1):c.773_776dup (p.Trp259fs)	NPM1 Mutasyonu ile AML
25	NM_199185.3(NPM1):c.773_776dup (p.Trp259fs) FLT3 c.1798_1799ins FLT3 c.1794_1795ins	NPM1 Mutasyonu ile AML
26	-	Miyelodisplazi Gen Mutasyonları ile İlişkili MDS/AML

Real-time PCR ile ekspresyon çalışması sonrası elde ettiğimiz verilerimiz Çizelge 4.2., Çizelge 4.3. ve Çizelge 4.4'te yer almaktadır.

Çizelge 4. 2. AML Hastaları Kemik iliğindeki $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Değerleri

$2^{-\Delta\Delta C_t}$ AML- Kemik iliği	miR-216a-5p	miR-223-3p	miR-490-3p
1	0,16	13,47	5,06
2	0,44	4,63	11,03
3	0,27	24,29	5,48
4	0,17	1,11	1,02
5	2,06	18,28	1,74
6	0,18	7,15	0,59
7	0,03	11,02	0,66
8	0,58	7,30	7,13
9	0,01	0,30	8,27
10	0,80	10,53	415,30
11	0,16	30,53	97,88
12	0,38	21,59	99,59
13	0,12	70,62	11,86
14	0,32	24,54	12,24
15	0,85	94,16	6,56
16	0,20	68,69	4,18
17	0,11	54,64	1,86
18	0,02	5,27	2,47
19	0,17	18,53	0,90
20	0,21	172,69	1,62
21	0,19	11,89	26,87
22	0,10	25,94	0,37
23	0,78	330,16	7,88
24	0,67	0,64	4554,26
25	0,19	24,45	2,56
26	0,14	59,59	0,72

Çizelge 4.3. AML Hastaları Periferik Kandaki $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Değerleri

$2^{-\Delta\Delta C_t}$ AML- Periferik	miR-216a-5p	miR-223-3p	miR-490-3p
1	0,21	17,65	10,18
2	0,23	0,45	1,69
3	0,60	18,28	13,96
4	0,09	4,06	0,27
5	4,36	20,63	1,91
6	0,39	16,82	0,60
7	0,10	8,65	9,90
8	0,97	6,48	2,84
9	0,08	0,05	15,43
10	0,55	23,30	19,40
11	0,14	137,85	2,62
12	1,37	69,17	1,38
13	0,06	185,72	2,07
14	0,74	49,94	500,77
15	1,90	108,53	16,54
16	0,60	73,87	41,73
17	0,26	64,76	1,85
18	0,23	63,21	0,23
19	0,25	67,51	2,33
20	0,62	761,13	0,50
21	0,07	48,07	12,28
22	0,47	16,47	2579,72
23	0,97	119,59	1,92
24	0,02	20,00	14,35
25	0,13	35,93	0,15
26	0,17	54,08	0,26

Çizelge 4.4. Sağlıklı Kontrol Periferik Kandaki $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Değerleri

$2^{-\Delta\Delta C_t}$ KONTROL	miR-216a-5p	miR-223-3p	miR-490-3p
1	1,36	4,26	0,56
2	0,98	3,44	0,93
3	1,06	14,95	0,21
4	0,39	8,59	0,54
5	1,40	15,00	3,34
6	3,52	26,39	62,38
7	0,80	80,56	1,29
8	1,55	102,68	0,74
9	1,53	90,01	4,95
10	1,09	41,41	0,20
11	0,88	4,18	0,33
12	0,72	41,56	0,31
13	0,60	33,29	0,17
14	0,74	49,42	1,02
15	2,36	142,22	0,61
16	1,21	77,55	2,39
17	0,38	15,16	0,39
18	0,69	55,02	0,56
19	0,67	38,64	0,50
20	0,25	73,62	1,14
21	0,79	52,24	0,90
22	1,18	134,08	0,81
23	1,44	275,71	0,54
24	1,71	217,07	2,64
25	1,60	59,80	15,54
26	1,39	70,86	Çalışmadı

İlk olarak Wilcoxon Signed Ranks Testi kullanılarak, hastalarının periferik kan ve kemik iliği örnekleri istatistiki olarak karşılaştırılmıştır. Bu test genellikle normal dağılım göstermeyen verilerde medyan değeri baz alınarak istatistiksel analiz gerçekleştirmek için kullanılır. Z değeri, iki grup arasındaki farkın ne kadar anlamlı

olduğunu gösterir. Negatif bir değer, periferik kan (PK) örneklerindeki miRNA ekspresyonunun kemik iliği (Kİ) örneklerine göre daha düşük olduğunu gösterir. P değeri ile de bu iki grup arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığına karar verilir.

Hastalarda bu üç miRNA'nın ekspresyonları kemik iliği ve periferik kan örneklerinde karşılaştırıldığında miR-216a-5p ($p=0,016$) ve miR-223-3p'nin ($p=0,006$) ifadeleri farklıdır. MiR-490-3p'nin ifadesi istatistiksel olarak anlamlı değildir. MiR-216a-5p ve miR-223-3p'nin ifadesi kemik iliği ve periferik kan örneklerinde incelendiğinde anlamlı fark gösterdiği için bu miRNA'ların kemik iliğindeki ifadesi ile sağlıklı kontrol grubu karşılaştırılmamıştır. MiR-490-3p'nin ifadesi kemik iliği ve periferik kan örneğinde farklı bulunmadığı için sağlıklı kontrol grubunun periferik kan örneğiyle karşılaştırılması yapılmıştır. İstatistiki analizin verileri Çizelge 4.5.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. miR-216a-5p, miR-223-3p ve miR-490-3p'nin Kemik İliği ve Periferik Kan Örneklerinin Karşılaştırması

	miR-216a-5p_PK miR-216a-5p_Kİ	miR-223-3p_PK miR-223-3p_Kİ	miR-490-3p_PK miR-490-3p_Kİ
Z	-2.400 ^b	-2.730 ^b	-.597 ^c
P	0,016	0,006	0,551

MiR-490-3p'nin hasta grubundaki kemik iliği örneği ile sağlıklı kontrollerin periferik kan örnekleri arasındaki karşılaştırma Mann-Whitney U Testine göre anlamlı bulunmuştur ($p= 0,0002$).

Çizelge 4.6. AML Grubunun Kemik İliği Örneği ile Sağlıklı Kontrol Grubunun miR-490-3p için Anlamlılık Karşılaştırılması

	miR-490-3p_Kİ
Mann-Whitney U	129,500
Wilcoxon W	454,500
Z	-3,684
P	0,0002

MiR-490-3p-için hastalardaki kemik iliği örneği, kontrol grubunun periferik kan örneği ile karşılaştırıldığında, miR-490-3p kemik iliği medyan değerinin kontrol grubunun periferik kan medyan değerinden belirgin şekilde yüksek olduğu görülmektedir (Çizelge 4.7.). AML hastalarında kemik iliği örneğindeki miR-490-3p ifadesi, kontrol grubunun periferik kan örneklerinden daha yüksektir.

Çizelge 4.7. AML Grubu miR-490-3p Kemik İliği Örneğinin Sağlıklı Kontrol Grubunun Periferik Kan Örneği ile Karşılaştırılması

miR-490-3p		
AML Kemik İliği	Örneklem büyüklüğü	26
	Ortalama	203,3874
	Standart Sapma	891,27231
	Medyan	5,2658
	Minimum	0,37
	Maximum	4554,26
Sağlıklı Kontrol Periferik Kan	Örneklem büyüklüğü	25
	Ortalama	4,1191
	Standart Sapma	12,52666
	Medyan	0,7412
	Minimum	0,17
	Maximum	62,38

Çizelge 4.8.'de gösterilmektedir. miR-223-3p için anlamlı bir fark bulunmamaktadır. MiR-216a-5p (p=0,000) ve miR-490-3p (p=0,010) için anlamlı fark bulunmaktadır.

Çizelge 4 8. AML Grubu Periferik Kan Örneği ile Sağlıklı Kontrol Grubunun Periferik Kan Örneğinin Anlamlılık Karşılaştırılması

	miR-216a-5p_PK	miR-223-3p_PK	miR-490-3p_PK
Mann-Whitney U	117,500	304,000	189,000
Wilcoxon W	468,500	655,000	514,000
Z	-4,036	-0,622	-2,563
P	0,000	0,534	0,010

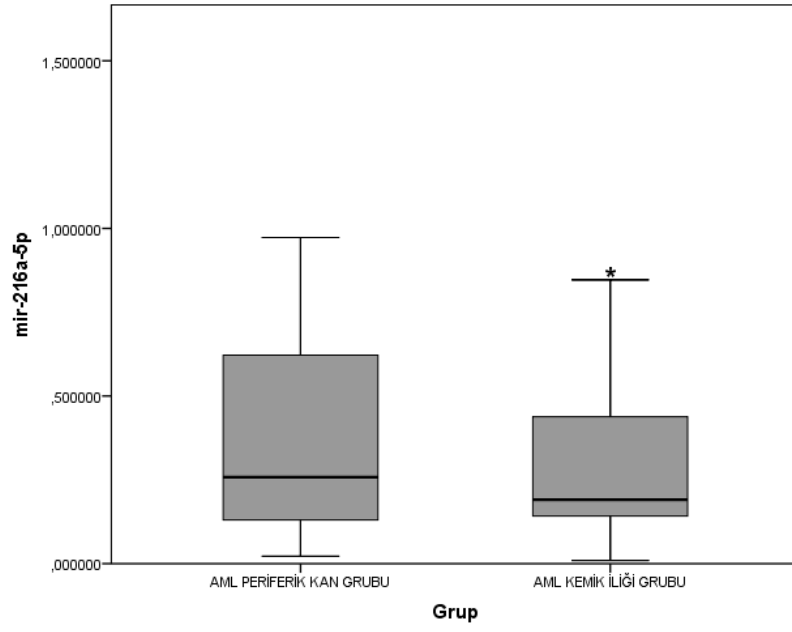
AML hastaları ile sağlıklı kontrol grubunun periferik kan örneklerindeki miRNA seviyeleri karşılaştırılmıştır ve sonuçlar Çizelge 4.9'da sunulmuştur. MiR-216a-5p, AML hastalarının periferik kan örneklerinde sağlıklı kontrol grubuna kıyasla daha düşük seviyede ifade edilirken, MiR-490-3p ifadesi ise AML hastalarında sağlıklı bireylere göre belirgin şekilde daha yüksek seviyede tespit edilmiştir.

Çizelge 4.9. AML Grubu ve Sağlıklı Kontrol Grubunun Periferik Kan Örneklerinin Karşılaştırması

		miR-216a-5p_PK	miR-490-3p_PK
AML Grubu Periferik Kan	N	26	25
	Ortalama	0,5997	27,0076
	Standart Sapma	0,88900	99,15428
	Medyan	0,2579	2,3343
	Minimum	0,02	0,15
	Maximum	4,36	500,77
Sağlıklı Kontrol Periferik Kan	N	26	25
	Ortalama	1,1646	4,1191
	Standart Sapma	0,68095	12,52666
	Medyan	1,0737	0,7412
	Minimum	0,25	0,17
	Maximum	3,52	62,38

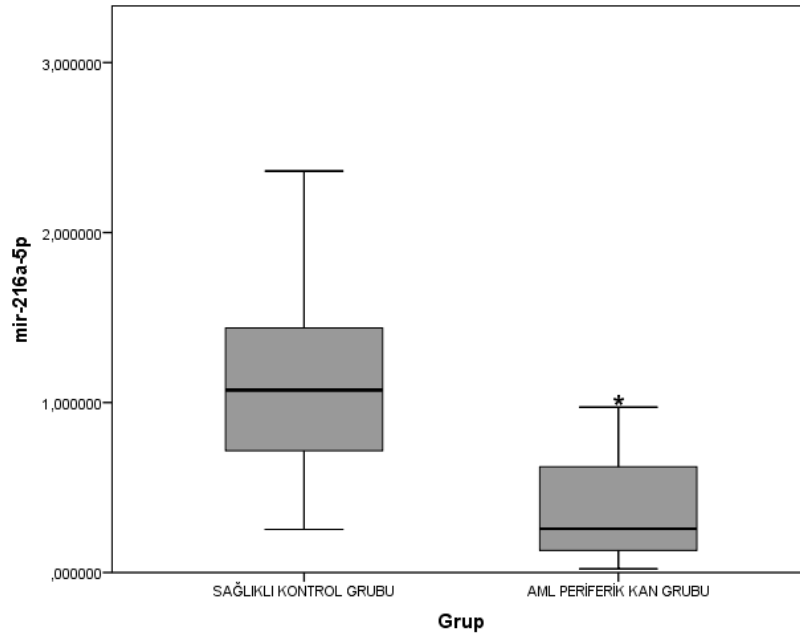
AML grubundaki miR-216a-5p ve miR-223-3p'nin kemik iliği ve periferik kan örneklerindeki ekspresyonların karşılaştırılması sırasıyla Şekil 4.1. Şekil 4.3. özetlenmiştir.

MiR-216a-5p, miR-223-3p ve miR-490-3p için elde edilen ekspresyon değerlerini özetleyen grafikler sırasıyla Şekil 4.2., Şekil 4.4., ve Şekil 4.5.'de gösterilmiştir.



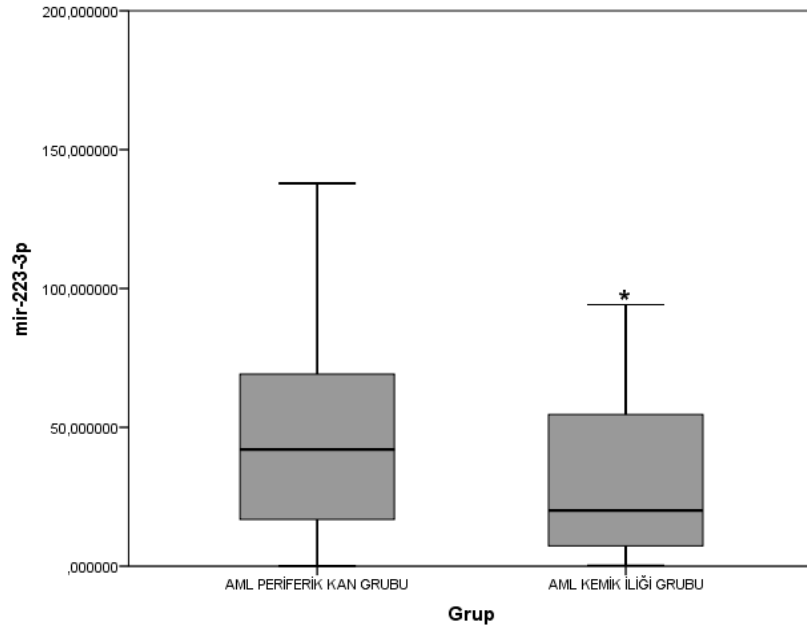
Şekil 4.1. AML Gruplar Arası miR-216a-5p Ekspresyon Ortalaması

*($p < 0,05$; $p = 0,016$)



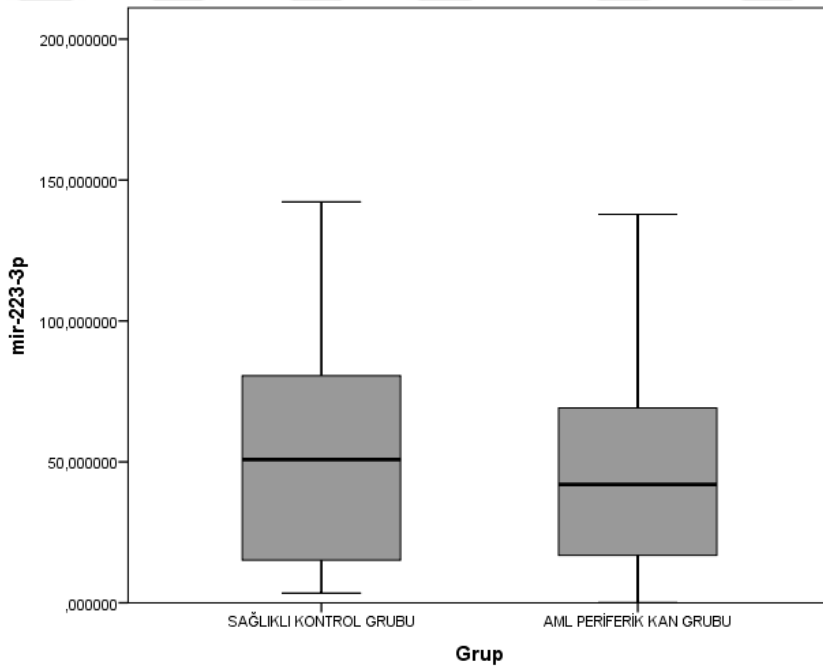
Şekil 4.2. MiR-216a-5p Ekspresyonunun Gruplar Arası Ortalaması

*($p < 0,05$; $p = 0,00005$)



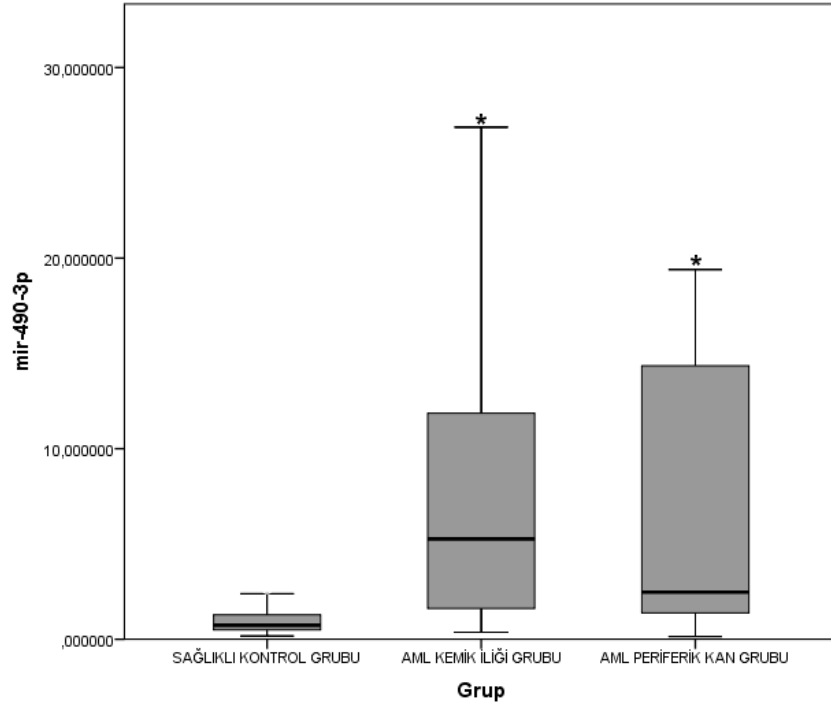
Şekil 4.3. AML Gruplar Arası miR-223-3p Ekspresyon Ortalaması

*($p < 0,05$; $p = 0,006$)



Şekil 4.4. MiR-223-3p Ekspresyonunun Gruplar Arası Ortalaması

($p < 0,05$; $p = 0,534$)



Şekil 4.5. MiR-490-3p Ekspresyonunun Gruplar Arası Ortalaması

*($p < 0,05$; $p = 0,551$; $p = 0,010$)

BÖLÜM 5

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

AML, hematopoietik kök hücrelerin malign dönüşümü sonucunda meydana gelen ve hastalar arasında farklı genetik ve moleküler alt yapılar sergileyen heterojen hematolojik bir kanserdir. Bu heterojenlik AML'nin prognozunu, tedaviye yanıtını ve hastalığın seyrinde önemli ölçüde etkilemektedir. Hastalığın genetik yapısı, kromozomal anormallikler ve somatik mutasyonlar gibi çok çeşitli genetik parametreleri içermektedir.

Bu çalışmada, yeni tanı almış AML hastaları ile sağlıklı kontrol grubunun miRNA ekspresyon seviyeleri karşılaştırılarak, hastalığın moleküler yapısı ve potansiyel biyobelirteçler araştırılmıştır. MiR-216a-5p, miR-223-3p ve miR-490-3p'nin ekspresyon düzeyleri incelenmiş ve farklılaşmaların AML'nin tanı ve tedavi süreçlerine olası katkıları değerlendirilmiştir.

Sonuçlar, AML hastalarında miR-216a-5p'nin sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı şekilde düşük ($p=0,00005$), miR-490-3p'nin ise belirgin şekilde yüksek ($p=0,010$) olduğunu göstermiştir. MiR-223-3p için ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,534$). Ayrıca, miR-490-3p'nin kemik iliği ve periferik kan arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir ($p=0,551$).

AML'de miRNA'ların ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler, hücrel büyüme, farklılaşma ve apoptoz gibi temel süreçleri etkileyerek hastalığın gelişiminde ve ilerlemesinde kritik bir rol oynamaktadır. MiRNA'lar, onkogen ya da tümör baskılayıcı olarak işlev görebilmekte ve bu rolleri, AML'nin patogeneğinde önemli bir etkiye sahip olma potansiyeli taşımaktadır. MiRNA'ların transkripsiyonel ve post-

transkripsiyonel düzenlenmede önemini vurgulayan çalışmaların sayısı giderek artmaktadır. AML hastalarında kemik iliği ve periferik kan örneklerinde tespit edilen miRNA ekspresyon farklılıkları, lösemik mikroçevre, hücre yapısı ve hastalığa özgü biyolojik süreçlerin miRNA regülasyonu üzerindeki etkileri teşhis ve tedavi açısından önemli olabilecek biyobelirteçlerin ortaya konmasını sağlayabilir.

AML, diğer kanser türleri ile karşılaştırıldığında daha az sıklıkla görülmektedir ve kanserler arasında yaklaşık olarak %1'lik bir görülme oranına sahiptir (Stubbins vd., 2022). Akut lösemiler arasında ise yaygın görülen bir lösemidir. Yaşın ilerlemesi ile birlikte görülme olasılığı da artmaktadır (Infante vd., 2018). Hastaların büyük bir kısmını 50 yaşın üzerindeki bireyler oluşturmaktadır ve medyan yaş 68'dir (Stubbins vd., 2022). AML'deki tedavilerin gelişmesine rağmen düşük sağ kalım oranına sahiptir ve 5 yıllık sağ kalımı %20 olarak belirlenmiştir (Hindley vd., 2021). Hastalar tam remisyona ulaştıktan sonra ilaç direnci gelişmesi sağ kalımı etkilemektedir (Osiriaphan vd., 2024).

MiRNA'ların kanser patogenezi ile ilişkili olduğu ve potansiyel bir biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir (Prada-Arismendy vd., 2017). Transkripsiyon sonrası düzenleyicisi olan miRNA'ların ilaç direnci mekanizmalarına ve lösemik kök hücrelerin düzenlenmesine katıldığı gösterilmiştir (Prada-Arismendy vd., 2017). MiRNA'ların AML'deki düzensizlikleri, hastalığın gelişmesinde ve ilerlemesinde etkili olabilmektedir. Bu nedenle AML'deki mekanizmalarının anlaşılması hastalığın seyrini ve tedaviye nasıl yanıt vereceğini tahmin etme konusunda önemli bir katkı sağlamaktadır (Osiriaphan vd., 2024). MiR-216a-5p, miR-223-3p ve miR-490-3p AML ile ilişkisini araştırdığımız miRNA'lardır.

AML hastalarına yapılan genetik analizler sonucunda FLT3 ve NPM1 en sık rastlanan mutasyonlar arasında yer almaktadır. Normal kromozom yapısına sahip AML hastalarında (tüm AML hastalarının yaklaşık %45'i) FLT3 ve NPM1 mutasyonları tüm AML hastalarında bulunan mutasyonların yaklaşık olarak %80'lik büyük bir kısmını oluşturmaktadır. NPM1 mutasyonu %50-60 arasında FLT3 mutasyonu %20 ve CEBPA mutasyonu %10 oranında görülmektedir (Trinh & Pham, 2018). AML hastalarında görülen mutasyonların türünün önemi hastalığın prognozunu belirlenmesini ve hangi tedavinin uygulanacağını yönlendirebilmektedir. Bu nedenle AML hastalarındaki

mutasyonların tipi önemlidir (Hindley vd., 2021). Bizim çalışmamızdaki AML grubunda da NPM1, FLT3 ve CEBPA mutasyonu diğer mutasyonlarla karşılaştırıldığında daha fazla görülmüştür.

Çalışmamızda yer alan miR-216a-5p, bazı kanser türlerinde onkogen bazı kanser türlerinde ise tümör baskılayıcı işlevi bildirildiği halde (Hamidi vd., 2023), AML ile arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle miR-216a-5p'nin ilişkili olabileceği diğer parametreler açısından bakıldığında uzun kodlanmayan RNA'lardan HCP5 ve CDC42 gibi moleküllerin kanser hücre hatlarında arttığı gösterilmiştir. miR-216a-5p ile etkileşen HCP5/miR-216a-5p/CDC42 etkileşimi serviks kanserlerinde incelendiğinde hücre çoğalması ve göçünü desteklediği ortaya konmuştur. HCP5'in onkogen olarak hareket ettiği ve miR-216a-5p'yi baskılayarak CDC42'nin ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir. Bu tarzdaki miR-216a-5p ile ilişkili olabilecek diğer moleküler yolların AML patogenezinde ve hastalığın alt gruplarında aydınlatılması gerekmektedir (Li vd., 2022).

MiR-216a-5p'nin pankreas kanserinde incelendiğinde kanser dokularında ve hücre hatlarında aşağı yönde düzenlendiği görülmüştür. miR-216a-5p'nin ekspresyonunun azalması *in vitro* ve *in vivo* olarak pankreas kanseri hücresinin büyümesini ve ilerlemesini desteklemiştir (Zhang vd., 2020). MiR-216a-5p ekspresyonunun hem meme kanseri dokularında hem de hücre hattında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında azaldığı görülmüştür (Zhang vd., 2019). Serin/treonin protein kinaz ailesine ait olan, hematopoietik ve progenitör hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını düzenleyen p21 ile aktive olan kinaz 2'nin (PAK2) ile miR-216a-5p arasında da ilişki olabileceğine dair bulgular bulunmaktadır (Zeng vd., 2015). miR-216a-5p'nin yukarı regülasyonu PAK2'nin ekspresyonunu azaltarak meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını ve metastazını kontrol eden bir tümör baskılayıcı olarak işlev görmektedir (Quan vd., 2020). MiR-216a-5p ile PAK2 arasındaki ilişkiye dair AML'de bulgu bulunmamaktadır. Ancak miR-216a-5p'den bağımsız olarak PAK2, AML'de çalışılmış ve yüksek ekspresyonu iyi prognoz olarak bildirilmiştir. (Quan vd., 2020).

MiR-216a-5p'nin tümör baskılayıcı olarak işlevleri bildirilmiştir fakat onkogen olarak görev yaptığı Böbrek hücreli karsinom (RCC)'da miR-216a-5p'nin RCC dokularında yüksek oranda ekspresyonu görülmüştür (Chen vd., 2018). Bu

Çalışmalardan anlaşılmaktadır ki miR-216a-5p farklı doku türlerinde oluşan kanserlerde  lerletici veya baskılayıcı etkileri bulunmaktadır.

Çalıştığımız hasta grubunda AML hastalarının periferik kan örneklerindeki miR-216a-5p ekspresyonunun sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür. Bu bulgu miR-216a-5p'nin tümör baskılayıcı işlevi olabileceğine dair bulguları desteklemektedir. AML patogenezi için miR-216a-5p'nin ekspresyonunun artmasının ne anlama geldiği, gen etkileşimleri ve genetik düzenleyici rolleri hakkında fonksiyonel çalışmalar yapılmalıdır.

Literatürde miR-223' n AML  zerindeki etkisini araştıran çalışmalar bulunmaktadır. Xiao ve arkadaşları, yeni tanılı AML hastalarında miR-223' n aşağı regüle edildiğini ve bu mikroRNA'nın hedeflerinden birinin F-box ve WD tekrar domaini içeren 7 (FBXW7) olduğunu biyoenformatik analizlerle  ne sürmüşlerdir. Ayrıca miR-223' n FBXW7'yi baskılayarak hücre apoptozunu artırdığını göstermişlerdir (Xiao vd., 2016). Gentner ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada, AML vakaları genetik risk gruplarına ayrılmış ve miR-223 düzeylerinin olumlu prognozlu gruplarda daha yüksek olduğu, kötü prognozlu hastalarda ise daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Gentner vd., 2015). Yu ve arkadaşları ise, serum miR-223'  invaziv olmayan bir prognostik biyobelirteç olarak araştırmış ve AML hastalarında serum miR-223 seviyelerinin anlamlı şekilde düşük olduğunu, bunun da kötü prognozla ilişkili olabileceğini rapor etmişlerdir (Yu vd., 2020). Pulikkan ve arkadaşları AML'de ve gran lopoezde mikroRNA-223' n CEBP  aracılı E2F1 inhibisyonu ile ilişkili işlevi araştırılmıştır. CEBP , miR-223'  düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür ve hücrede ifadesini arttırmaktadır. MiR-223 ise hücre döngüsünden sorumlu olan E2F1'in mRNA'sına bağlanarak translasyonel inhibisyonuna neden olmaktadır. AML patogenezinde önemli bir rol oynayan E2F1, kontrolsüz ekspresyonu durumunda anormal hücre proliferasyonunu desteklemektedir. Aynı zamanda E2F1 de miR-223'  hedef olarak transkripsiyonunu baskılamaktadır. Çalışmada AML hastalarında miR-223 seviyelerinin düşük olduğunu bildirilmiştir. Bu durum, E2F1'in kontrolsüz ekspresyonuna ve hücre çoğalmasına yol açabilmektedir Aynı çalışmada farklı mutasyon tiplerine sahip AML hastalarında miR-223' n ekspresyonları incelenmiştir. Ayrı ayrı değerlendirilen t(8;21) ve t(15;17) translokasyonlarına sahip AML hastaları, FLT3 ve CEBPA mutasyonlu AML hastaları ve karmaşık karyotipe sahip AML

hastaları normal karyotipe sahip AML hastaları ile karşılaştırıldığında miR-223'ün ekspresyon seviyesinin düşük olduğu tespit edilmiştir. Özellikle CEBPA mutasyonlu AML hastalarında ek mekanizmaların olabileceği öne sürülmüştür (Pulikkan vd., 2010).

Çalışmamızdaki miR-223-3p ifade düzeyi literatürdeki bu bulgular ile benzer değildir. MiR-223-3p ekspresyonun AML hastaları ve sağlıklı kontrol karşılaştırılmasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,534$). Hastalar mutasyon tipine göre gruplandırıldığında alt gruplardaki sayıların küçük olmasından dolayı veriler AML hastalarının mutasyon tipine göre değerlendirilmemiştir. Daha büyük çalışma gruplarında AML hastalarının mutasyon tipine göre analiz yapılması gerekmektedir.

MiR-490-3p'nin ekspresyon seviyeleri çoğu kanser türünde düşük olarak bildirilmiştir. AML ve birçok solid kanserde miR-490-3p düşük ekspresyon seviyesine sahip olarak gösterilmiştir. Kolorektal kanser, mide kanseri, akciğer kanseri, prostat kanseri, yumurtalık kanseri, endometriyal kanser, meme kanseri, kolanjiyokarsinom ve osteosarkom miR-490-3p ekspresyonun düşük olarak gösterildiği kanser türleri arasında yer almaktadır. Fakat miR-490-3p'nin yüksek düzeyde ifade edildiği kanserlerde vardır (Hamfjord vd., 2012; Li vd., 2021). Multipl miyelom, hepatosellüler karsinom, deri skuamöz hücreli karsinom, tiroid karsinom ve akciğer kanserinde miR-490-3p'nin yüksek ifade düzeyleri bildirilmiştir (Li vd., 2021). MiR-490-3p ile ilgili yapılan çalışmalarda biyoenformatik analiz sonrası yapısal benzerliklerden dolayı MAPK1'e bağlanabileceği ve MAPK1'i baskılayabileceği öne sürülmektedir. MAPK1 ve miR-490-3p ilişkisi AML, özofageal skuamöz hücreli karsinom (ESCC) ve mide kanserinde gösterilmiştir (Luo & Liang, 2020; Wang vd., 2020; Zabihula vd., 2019). MiR-490-3p'nin in siliko olarak ilişkili olduğu gösterilen MAPK'ler serin/treonin kinaz ailesindendir ve hücre yüzeyinde bulunan reseptörler sayesinde hücre çekirdeğine sinyal iletebilen sinyal yolu olarak görev yapmaktadır. MAPK1 hücrelerde bulunan ~42 kD'lik bir proteindir ve hücrede büyüme, diferansiyon, hücre bölünmesi, apoptoz, stres yanıtı, enflamasyon, sinyal iletimi, hücre göçü ve invazyon gibi biyolojik süreçlerde yer almaktadır. Kanser hücrelerinde sıkça karşılaşılmaktadır ve hücrede onkogen olarak hareket etmektedir (Zabihula vd., 2019). Mide kanseri üzerine yapılan bir çalışmada, LINC00483'ün miR-490-3p ekspresyonunu engelleyerek MAPK1 ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. MiR-490-3p mide kanseri çalışmasında miR-490-3p/MAPK1

etkileşimi ile dolaylı olarak düzenleyici bir görev yapmaktadır (Luo & Liang, 2020). Kanser Genom Atlası veri tabanına bakıldığında miR-490-3p'nin ESCC dokularında düşük ifadesi bulunmaktadır. miR-490-3p ekspresyonunun artması MAPK1'i baskılayarak apoptozu başlatmakta ve proliferasyonun önüne geçmektedir. MiR-490-3p baskılandığında ise kanser hücrelerinin proliferasyonunun arttığı gösterilmiştir. (Zabihula vd., 2019). AML'de de miR-490-3p'nin MAPK sinyal yolu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu sinyal yolağı ile ilişkisi lncRNA'lerden birisi olan CCAT1 aracılığı ile düzenlenmektedir. Yapılan çalışmada AML'de CCAT1 ekspresyonu yukarı düzenlenirken miR-490-3p'nin ekspresyonu aşağı düzenlenmiştir. Benzer hasta grubu ve sağlıklı kontrollerin çalışıldığı laboratuvarımızdaki başka bir çalışmada CCAT1 ve c-Myc ekspresyonu yeni tanı almış AML hastalarında sağlıklı kontrol grubuna göre yüksek çıkmıştır fakat istatistiki olarak anlamsızdır (Göncü, 2024). Wang ve arkadaşlarının yeni tanı almış AML hastalarında ve AML hücre hatlarında yaptığı çalışmaya göre lncRNA CCAT1/miR-490-3p/MAPK1/c-Myc ilişkisinde, miR-490-3p'nin aşağı regülasyonu, MAPK1 ve c-Myc'nin yukarı regülasyonuna yol açmakta, bu da CCAT1 ekspresyonunu arttırmakta ve tümör oluşumunu hızlandırmaktadır (Wang vd., 2020). Bu veriler, AML patogenezinde CCAT1/miR-490-3p/MAPK1/c-Myc etkileşiminin önemli olabileceğini ortaya koymaktadır. miR-490-3p'nin AML hastalarında önemli ölçüde aşağı regüle edildiğini ve aşırı eksprese edilmiş miR-490-3p'nin çoğalma, göç ve istilayı baskılayarak AML'nin ilerlemesini bloke ettiği gösterilmiştir (Wang vd., 2020).

Tez çalışmamızda AML hastalarında miR-490-3p'nin ekspresyon düzeyleri kemik iliği ve periferik kan örneklerinde incelenmiştir ve miR-490-3p ekspresyonu hem kemik iliği hem de periferik kan örneklerinde belirgin bir şekilde AML hastalarında yüksek olduğu görülmüştür. Bu sonuçlarımız, Wang ve arkadaşlarının miR-490-3p'nin AML hastalarında aşağı regüle olduğu ve tümör baskılayıcı rol oynadığına dair sonuçlarıyla çelişmektedir. AML hastalarında miR-490-3p ekspresyonunu etkileyen mekanizmalar daha ayrıntılı olarak incelenmelidir. Çalışmamızın sonuçları, miR-490-3p'nin AML'de onkogen veya tümör baskılayıcı olarak işlev görebileceğini işaret etmektedir. miR-490-3p'nin AML patogenezindeki rolünü netleştirmek için hastalarının mutasyon tipi de dikkate alınarak daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmanın sınırlamaları arasında 26 AML hastası ve 26 sağlıklı kontrolden oluşan sınırlı örneklem büyüklüğü ile mutasyon tiplerine göre ayırım yapılmaması yer almaktadır. Gelecekte daha geniş örneklem grupları ve kapsamlı genetik analizlerle bu bulguların doğruluğu ve uygulanabilirliği artırılabilir. Bu çalışma, AML'de miRNA'ların potansiyel biyobelirteç olarak kullanılabileceğini vurgulamaktadır.



KAYNAKLAR

- Amin, A. H., Sharifi, L. M. A., Kakhharov, A. J., Opulencia, M. J. C., Alsaikhan, F., Bokov, D. O., Majdi, H. S., Jawad, M. A., Hammid, A. T., Shalaby, M. N., Mustafa, Y. F., & Siahmansouri, H. (2022). Role of Acute Myeloid Leukemia (AML)-Derived exosomes in tumor progression and survival. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 150, 113009. doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113009
- Appelbaum, F. R. (2023). WHO, what, when, where, and why: New classification systems for acute myeloid leukemia and their impact on clinical practice. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 36(4), 101518. doi.org/10.1016/j.beha.2023.101518
- Armitage, J. O., Gascoyne, R. D., Lunning, M. A., & Cavalli, F. (2017). Non-hodgkin lymphoma. *The lancet*, 390(10091), 298-310.
- Azizidoost, S., Nasrolahi, A., Sheykhi-Sabzehpoush, M., Anbiyaiee, A., Khoshnam, S. E., Farzaneh, M., & Uddin, S. (2023). Signaling pathways governing the behaviors of leukemia stem cells. *Genes & Diseases*, 11(2), 830-846.
- Bene, M. C., Castoldi, G., Knapp, W., Ludwig, W. D., Matutes, E., Orfao, A., & van't Veer, M. B. (1995). Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*, 9(10), 1783-1786.
- Berghe, H. V. d. (1988). Morphologic, immunologic, and cytogenetic (MIC) working classification of the acute myeloid leukemias. Report of the Workshop held in Leuven, Belgium, September 15-17, 1986. Second MIC Cooperative Study Group. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 30(1), 1-15.
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., & Rai, K. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 99(24), 15524-15529.
- Chai, L., & Yang, G. (2019). MiR-216a-5p targets TCTN1 to inhibit cell proliferation and induce apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 24(1), 46. doi.org/10.1186/s11658-019-0166-9

- Chen, P., Quan, J., Jin, L., Lin, C., Xu, W., Xu, J., Guan, X., Chen, Z., Ni, L., Yang, S., Chen, Y., & Lai, Y. (2018). miR-216a-5p acts as an oncogene in renal cell carcinoma. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(4), 4039-4046. doi.org/10.3892/etm.2018.5881
- Cortes, J., Pavlovsky, C., & Saußele, S. (2021). Chronic myeloid leukaemia. *The Lancet*, 398(10314), 1914-1926.
- Della Porta, M. G., Martinelli, G., Rambaldi, A., Santoro, A., & Voso, M. T. (2024). A practical algorithm for acute myeloid leukaemia diagnosis following the updated 2022 classifications. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 198, 104358. [doi.org/https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2024.104358](https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2024.104358)
- DiNardo, C. D., Erba, H. P., Freeman, S. D., & Wei, A. H. (2023). Acute myeloid leukaemia. *The Lancet*, 401(10393), 2073-2086. [doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)00108-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)00108-3)
- Eyholzer, M., Schmid, S., Schardt, J. A., Haefliger, S., Mueller, B. U., & Pabst, T. (2010). Complexity of miR-223 regulation by CEBPA in human AML. *Leukemia Research*, 34(5), 672-676. [doi.org/https://doi.org/10.1016/j.leukres.2009.11.019](https://doi.org/10.1016/j.leukres.2009.11.019)
- Falini, B., Brunetti, L., Sportoletti, P., & Martelli, M. P. (2020). NPM1-mutated acute myeloid leukemia: from bench to bedside. *Blood*, 136(15), 1707-1721. doi.org/10.1182/blood.2019004226
- Firth, J. (2019). Haematology: multiple myeloma. *Clinical Medicine*, 19(1), 58-60. doi.org/10.7861/clinmedicine.19-1-58
- Gentner, B., Pochert, N., Rouhi, A., Boccalatte, F., Plati, T., Berg, T., Sun, S. M., Mah, S. M., Mirkovic-Hösle, M., Ruschmann, J., Muranyi, A., Leierseder, S., Argiropoulos, B., Starczynowski, D. T., Karsan, A., Heuser, M., Hogge, D., Camargo, F. D., Engelhardt, S., . . . Kuchenbauer, F. (2015). MicroRNA-223 dose levels fine tune proliferation and differentiation in human cord blood progenitors and acute myeloid leukemia. *Experimental Hematology*, 43(10), 858-868.e857. doi.org/10.1016/j.exphem.2015.05.018
- Ghia, P., Ferreri, A. M., & Caligaris-Cappio, F. (2007). Chronic lymphocytic leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 64(3), 234-246. doi.org/10.1016/j.critrevonc.2007.04.008
- Göncü, E. (2024). Yeni Tanılı Erişkin Akut Miyeloid Lösemili Hastalarda Hücre Proliferasyonu, Hücre Farklılaşması ve Apoptozis Üzerine Etkili Uzun Kodlamayan RNA'ların Araştırılması. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Hamfjord, J., Stangeland, A. M., Hughes, T., Skrede, M. L., Tveit, K. M., Ikdahl, T., & Kure, E. H. (2012). Differential expression of miRNAs in colorectal cancer:

- comparison of paired tumor tissue and adjacent normal mucosa using high-throughput sequencing. *PLoS One*, 7(4), e34150. doi.org/10.1371/journal.pone.0034150
- Hamidi, A. A., Taghehchian, N., Zangouei, A. S., Akhlaghipour, I., Maharati, A., Basirat, Z., & Moghbeli, M. (2023). Molecular mechanisms of microRNA-216a during tumor progression. *Cancer Cell International*, 23(1), 19. doi.org/10.1186/s12935-023-02865-2
- He, C., Luo, B., Jiang, N., Liang, Y., He, Y., Zeng, J., Liu, J., & Zheng, X. (2019). OncomiR or antioncomiR: Role of miRNAs in Acute Myeloid Leukemia. *Leukemia&Lymphoma*, 60(2), 284-294. doi.org/10.1080/10428194.2018.1480769
- Hindley, A., Catherwood, M. A., McMullin, M. F., & Mills, K. I. (2021). Significance of NPM1 Gene Mutations in AML. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18). doi.org/10.3390/ijms221810040
- Ho, P. T. B., Clark, I. M., & Le, L. T. T. (2022). MicroRNA-Based Diagnosis and Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13). doi.org/10.3390/ijms23137167
- Hu, D., & Shilatifard, A. (2016). Epigenetics of hematopoiesis and hematological malignancies. *Genes & Development*, 30(18), 2021-2041. doi.org/10.1101/gad.284109.116
- Infante, M. S., Piris, M. Á., & Hernández-Rivas, J. Á. (2018). Alteraciones moleculares en leucemia mieloide aguda y sus implicaciones clínicas y terapéuticas. *Medicina Clínica*, 151(9), 362-367. [doi.org/https://doi.org/10.1016/j.medcli.2018.05.002](https://doi.org/10.1016/j.medcli.2018.05.002)
- Jalte, M., Abbassi, M., El Mouhi, H., Daha Belghiti, H., Ahakoud, M., & Bekkari, H. (2023). FLT3 Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Unraveling the Molecular Mechanisms and Implications for Targeted Therapies. *Cureus*, 15(9), e45765. doi.org/10.7759/cureus.45765
- Lanier, O. L., Pérez-Herrero, E., D'Andrea, A. P., Bahrami, K., Lee, E., Ward, D. M., Ayala-Suárez, N., Rodríguez-Méndez, S. M., & Peppas, N. A. (2022). Immunotherapy approaches for hematological cancers. *Isience*.
- Lee, Y.-G., Kim, I., Oh, S., Shin, D.-Y., Koh, Y., & Lee, K.-W. (2019). Small RNA sequencing profiles of mir-181 and mir-221, the most relevant microRNAs in acute myeloid leukemia. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 34(1), 178.
- Li, M., Cui, X., & Guan, H. (2020). MicroRNAs: pivotal regulators in acute myeloid leukemia. *Annals of Hematology*, 99(3), 399-412. doi.org/10.1007/s00277-019-03887-5

- Li, X., Chen, B., Huang, A., Ren, C., Wang, L., Zhu, T., Xiong, J., Ding, W., & Wang, H. (2022). LncRNA HCP5 enhances the proliferation and migration of cervical cancer via miR-216a-5p/CDC42 axis. *Journal of Cancer*, 13(6), 1882-1894. doi.org/10.7150/jca.64730
- Li, Y., Tian, D., Chen, H., Cai, Y., Chen, S., & Duan, S. (2021). MicroRNA-490-3p and -490-5p in carcinogenesis: Separate or the same goal? *Oncology Letters*, 22(3), 678. doi.org/10.3892/ol.2021.12939
- Liao, Q., Wang, B., Li, X., & Jiang, G. (2017). miRNAs in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*, 8(2), 3666.
- Lu, T. X., & Rothenberg, M. E. (2018). MicroRNA. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(4), 1202-1207.
- Luo, M., & Liang, C. (2020). LncRNA LINC00483 promotes gastric cancer development through regulating MAPK1 expression by sponging miR-490-3p. *Biological Research*, 53(1), 14. doi.org/10.1186/s40659-020-00283-6
- Medinger, M., Heim, D., Lengerke, C., Halter, J. P., & Passweg, J. R. (2019). [Acute lymphoblastic leukemia - diagnosis and therapy]. *Therapeutische Umschau. Revue therapeutique*, 76(9), 510-515.
- Najafi, M., Majidpoor, J., Toolee, H., & Mortezaee, K. (2021). The current knowledge concerning solid cancer and therap, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 35(11), e22900. doi.org/10.1002/jbt.22900
- Narayanan, D., & Weinberg, O. K. (2020). How I investigate acute myeloid leukemia. *International Journal of Laboratory Hematology*, 42(1), 3-15.
- Negotei, C., Colita, A., Mitu, I., Lupu, A. R., Lapadat, M. E., Popovici, C. E., Crainicu, M., Stanca, O., & Berbec, N. M. (2023). A Review of FLT3 Kinase Inhibitors in AML. *Journal of Clinical Medicine*, 12(20). doi.org/10.3390/jcm12206429
- Osiriphan, M., Insukhin, C., Anuchapreeda, S., Khamphikham, P., & Duangmano, S. (2024). MicroRNA-223 overexpression suppresses protein kinase C ϵ expression in human leukemia stem cell-like KG-1a cells. *Molecular and Clinical Oncology*, 21(1), 48. doi.org/10.3892/mco.2024.2746
- Padmakumar, D., Chandrababha, V. R., Gopinath, P., Vimala Devi, A. R. T., Anitha, G. R. J., Sreelatha, M. M., Padmakumar, A., & Sreedharan, H. (2021). A concise review on the molecular genetics of acute myeloid leukemia. *Leukemia Research*, 111, 106727. doi.org/10.1016/j.leukres.2021.106727
- Prada-Arismendy, J., Arroyave, J. C., & Röthlisberger, S. (2017). Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia. *Blood Reviews*, 31(1), 63-76.

- Pulikkan, J. A., Dengler, V., Peramangalam, P. S., Peer Zada, A. A., Müller-Tidow, C., Bohlander, S. K., Tenen, D. G., & Behre, G. (2010). Cell-cycle regulator E2F1 and microRNA-223 comprise an autoregulatory negative feedback loop in acute myeloid leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 115(9), 1768-1778.
- Quan, L., Cheng, Z., Dai, Y., Jiao, Y., Shi, J., & Fu, L. (2020). Prognostic significance of PAK family kinases in acute myeloid leukemia. *Cancer Gene Therapy*, 27(1-2), 30-37. doi.org/10.1038/s41417-019-0090-1
- Rubnitz, J. E., Gibson, B., & Smith, F. O. (2010). Acute myeloid leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 24(1), 35-63. doi.org/10.1016/j.hoc.2009.11.008
- Salehi, A. (2024). A novel therapeutic strategy: the significance of exosomal miRNAs in acute myeloid leukemia. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, 41(2), 62. doi.org/10.1007/s12032-023-02286-1
- Saydam, F., Değirmenci, İ., & Güneş, H. V. (2011). MikroRNA'lar ve kanser. *Dicle Tıp Dergisi*, 38(1).
- Sha, C., Jia, G., Jingjing, Z., Yapeng, H., Zhi, L., & Guanghui, X. (2021). miR-486 is involved in the pathogenesis of acute myeloid leukemia by regulating JAK-STAT signaling. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 394(1), 177-187. doi.org/10.1007/s00210-020-01892-4
- Shimony, S., Stahl, M., & Stone, R. M. (2023). Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American Journal of Hematology*, 98(3), 502-526.
- Stubbins, R. J., Francis, A., Kuchenbauer, F., & Sanford, D. (2022). Management of Acute Myeloid Leukemia: A Review for General Practitioners in Oncology. *Current Oncology*, 29(9), 6245-6259. doi.org/10.3390/curroncol29090491
- Su, L., Shi, Y. Y., Liu, Z. Y., & Gao, S. J. (2022). Acute Myeloid Leukemia With CEBPA Mutations: Current Progress and Future Directions. *Frontiers in Oncology*, 12, 806137. doi.org/10.3389/fonc.2022.806137
- Taube, F., Georgi, J. A., Kramer, M., Stasik, S., Middeke, J. M., Röllig, C., Krug, U., Krämer, A., Scholl, S., Hochhaus, A., Brümmendorf, T. H., Naumann, R., Petzold, A., Mulet-Lazaro, R., Valk, P. J. M., Steffen, B., Einsele, H., Schaich, M., Burchert, A., . . . Thiede, C. (2022). CEBPA mutations in 4708 patients with acute myeloid leukemia: differential impact of bZIP and TAD mutations on outcome. *Blood*, 139(1), 87-103. doi.org/10.1182/blood.2020009680
- Terpos, E., Zamagni, E., Lentzsch, S., Drake, M. T., García-Sanz, R., Abildgaard, N., Ntanasis-Stathopoulos, I., Schjesvold, F., de la Rubia, J., & Kyriakou, C. (2021). Treatment of multiple myeloma-related bone disease: Recommendations from

the Bone Working Group of the International Myeloma Working Group. *The Lancet Oncology*, 22(3), e119-e130.

- Tien, F. M., & Hou, H. A. (2024). CEBPA mutations in acute myeloid leukemia: implications in risk stratification and treatment. *International Journal of Hematology*. doi.org/10.1007/s12185-024-03773-5
- Trinh, P. L., & Pham, Y. (2018). Establishment of a Multiplex PCR-Based Procedure for Detection of Most Common Mutations in NPM1, FLT3 in Acute Myeloid Leukemia Patients. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 48(1), 35-39.
- Vago, L., & Gojo, I. (2020). Immune escape and immunotherapy of acute myeloid leukemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 130(4), 1552-1564. doi.org/10.1172/jci129204
- Vinchure, O. S., & Kulshreshtha, R. (2021). miR-490: A potential biomarker and therapeutic target in cancer and other diseases. *Journal of Cellular Physiology*, 236(5), 3178-3193. doi.org/10.1002/jcp.30119
- Wallace, J. A., & O'Connell, R. M. (2017). MicroRNAs and acute myeloid leukemia: therapeutic implications and emerging concepts. *Blood*, 130(11), 1290-1301. doi.org/10.1182/blood-2016-10-697698
- Wallwitz, J., Aigner, P., & Stoiber, D. (2021). Tumor suppressors in acute myeloid leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, 62(10), 2320-2330. doi.org/10.1080/10428194.2021.1907372
- Wang, C., Chen, F., Fan, Z., Yao, C., & Xiao, L. (2020). lncRNA CCAT1/miR-490-3p/MAPK1/c-Myc positive feedback loop drives progression of acute myeloid leukaemia. *Journal of Biochemistry*, 167(4), 379-388. doi.org/10.1093/jb/mvz107
- Wang, R., Xu, P., Chang, L. L., Zhang, S. Z., & Zhu, H. H. (2022). Targeted therapy in NPM1-mutated AML: Knowns and unknowns. *Frontiers in Oncology*, 12, 972606. doi.org/10.3389/fonc.2022.972606
- Wang, W.-J., Xu, T.-T., & Bao, J. (2023). N6-methyladenosine in hematological malignancies: a concise review. *Current Opinion in Hematology*, 30(1), 4-13. doi.org/10.1097/moh.0000000000000741
- Weinberg, O. K., Porwit, A., Orazi, A., Hasserjian, R. P., Foucar, K., Duncavage, E. J., & Arber, D. A. (2023). The International Consensus Classification of acute myeloid leukemia. *Virchows Archiv : an International Journal of Pathology*, 482(1), 27-37. doi.org/10.1007/s00428-022-03430-4
- Weinberg, O. K., Porwit, A., Orazi, A., Hasserjian, R. P., Foucar, K., Duncavage, E. J., & Arber, D. A. (2023). The International Consensus Classification of acute

- myeloid leukemia. *Virchows Archiv : an International Journal of Pathology*, 482(1), 27-37.
- Xiao, Y., Su, C., & Deng, T. (2016). miR-223 decreases cell proliferation and enhances cell apoptosis in acute myeloid leukemia via targeting FBXW7. *Oncology Letters*, 12(5), 3531-3536. doi.org/10.3892/ol.2016.5115
- Yu, G., Yin, Z., He, H., Zheng, Z., Chai, Y., Xuan, L., Lin, R., Wang, Q., Li, J., & Xu, D. (2020). Low serum miR-223 expression predicts poor outcome in patients with acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 34(3), e23096.
- Zabihula, B., Yiliyasi, M., Lu, Y., & Salai, A. (2019). MicroRNA-490-3p inhibits proliferation and stimulates apoptosis of ESCC cells via MAPK1 downregulation. *Oncology Letters*, 18(3), 3170-3176. doi.org/10.3892/ol.2019.10636
- Zeng, Y., Broxmeyer, H. E., Staser, K., Chitteti, B. R., Park, S.-J., Hahn, S., Cooper, S., Sun, Z., Jiang, L., Yang, X., Yuan, J., Kosoff, R., Sandusky, G., Srouf, E. F., Chernoff, J., & Clapp, D. W. (2015). Pak2 Regulates Hematopoietic Progenitor Cell Proliferation, Survival, and Differentiation. *Stem Cells*, 33(5), 1630-1641. doi.org/10.1002/stem.1951
- Zhang, J., Gao, S., Zhang, Y., Yi, H., Xu, M., Xu, J., Liu, H., Ding, Z., He, H., Wang, H., Hao, Z., Sun, L., Liu, Y., & Wei, F. (2020). MiR-216a-5p inhibits tumorigenesis in Pancreatic Cancer by targeting TPT1/mTORC1 and is mediated by LINC01133. *International Journal of Biological Sciences*, 16(14), 2612-2627. doi.org/10.7150/ijbs.46822
- Zhang, Y., Lin, P., Zou, J. Y., Zou, G., Wang, W. Z., Liu, Y. L., Zhao, H. W., & Fang, A. P. (2019). MiR-216a-5p act as a tumor suppressor, regulating the cell proliferation and metastasis by targeting PAK2 in breast cancer. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 23(6), 2469-2475. doi.org/10.26355/eurrev_201903_17394
- Zhao, J. C., Agarwal, S., Ahmad, H., Amin, K., Bewersdorf, J. P., & Zeidan, A. M. (2022). A review of FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia. *Blood Reviews*, 52, 100905. doi.org/10.1016/j.blre.2021.100905

EKLER

Ek-1 Bilgilendirilmiş Onam Formu

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Bir araştırma projesine davet edilmektesiniz.

Bu araştırmanın yürütülmesi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'nun 24.04.2023 tarih ve 07/25 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Araştırmaya katılmaya karar vermeden önce araştırmanın neden ve nasıl yapılacağını anlamanız çok önemlidir.

Araştırmaya katılım tamamen gönüllülük ilkesine bağlı olup katılmayı reddetmeniz herhangi bir cezaya ya da elde edilecek herhangi bir yararın kaybedilmesine kesinlikle yol açmayacaktır.

Aynı şekilde araştırmaya katılmayı kabul ettikten sonra da araştırmanın herhangi bir yerinde hiçbir neden göstermeksizin herhangi bir zarar ya da elde edilmesi beklenen bir yarar kaybına yol açmadan araştırmadan çekilebilirsiniz.

Araştırma kapsamında yapılan işlemlerin mali giderleri araştırmacılar ya da destekleyici (Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi) tarafından karşılanacak olup size ya da sosyal güvenlik kurumunuza hiçbir mali yük getirmeyecektir.

Aşağıdaki bilgileri dikkatlice okuyun ve araştırmaya katılmak isteyip istemediğinize karar vermek için lütfen biraz düşünün.

- Araştırmanın bilimsel adı:** Yeni Tanılı Akut Miyeloid Lösemi Hastalarında Biyobelirteç Potansiyeli Olan miRNA'ların Ekspresyonunun Araştırılması
- Araştırmanın anlaşılabilir basit adı:** Yeni Tanılı Akut Miyeloid Lösemi Hastalarında miRNA'ların Araştırılması
- Sorumlu Araştırmacının adı ve görev yeri:**
Prof. Dr. Jülide TOZKIR, Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Mine KARACA, Biyoteknoloji ve Genetik Yüksek Lisans Öğrencisi
Prof. Dr. Ahmet Muzaffer DEMİR, İç Hastalıkları Hematoloji Bilim Dalı
- Araştırmanın amacı:** Yeni tanı almış AML hastalarında miRNA'ların ekspresyon seviyelerini inceleyerek, heterojen yapıya sahip bu hastalığın patogeneze dair yeni bilgiler edinmektir.
- Araştırmanın niteliği (klinik, laboratuvar, epidemiyolojik, tez çalışması vb.):** Yüksek Lisans Tez Çalışması
- Araştırmanın başlama tarihi ve öngörülen süresi:** Haziran 2023- Aralık 2023
- Araştırmaya katılması beklenen gönüllü sayısı:** 60
- Araştırma sırasında gönüllüye uygulanacak yöntem, girişim ve tedavilerin tümü:** Gönüllüler herhangi bir tedavi girişimi ve bir işlem uygulanmayacaktır. Rutin tetkikler sırasında alınan kemik iliği ve periferik kan örneklerinden fazla kalan kısım kullanılacaktır.
- Katılımcının araştırmaya dahil edilme nedeni:** Yeni tanı almış AML hastası olması, 18 yaşını doldurmuş olması ve başka bir kanser öyküsünün bulunmaması

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

- **Araştırmadan doğrudan gönüllü için beklenen yarar:** AML'nin araştırılmasına katkı sağlayıp ileride kullanılmak üzere literatüre AML ile ilgili yeni bilgiler kazandırmış olacaktır. Bu sayede diğer AML hastaları için umut edici yeni gelişmeler sağlanabilir.
- **Gönüllünün sorumlulukları:** Gönüllünün herhangi bir sorumluluğu bulunmamaktadır.
- **Gönüllünün (araştırma hamilelerde veya lohusalarda yapılacaksa ise embriyo, fetüs veya süt çocuklarının da) maruz kalabilecekleri riskler veya rahatsızlıklar:** Gönüllülere hastaneden istenen rutin tetkikler dışında herhangi bir işlem uygulanmayacaktır.
- **Risklere karşı alınan önlemler:** Araştırma kapsamında hastaneden istenen işlemler dışında herhangi bir girişimde bulunulmayacağı için oluşan bir risk faktörü yoktur.
- **Gönüllünün araştırmaya katılımının sona erdirilmesini gerektirecek durumlar veya nedenler:** Gönüllünün araştırma kriterlerine uymaması veya gönüllünün araştırmadan çıkmak istemesi
- **Araştırma sonunda gönüllülere bilgi verilecek mi?** Gönüllüler araştırma ile ilgili bilgi edinmek isterse gerekli bilgi verilecektir.
- **Gönüllülerin araştırma hakkında, kendileri hakkında ya da araştırmayla ilgili herhangi bir beklenmedik olay hakkında daha fazla bilgi edinebilmesi için temasa geçebileceği kişi ve kendisine günün 24 saatinde erişebileceği telefon numarası:**
Mine KARACA 05-
Jülide TOZKIR 05-
- **Gönüllülerden elde edilecek olan biyolojik materyallerin hangi amaçlarla kullanılacağı:** AML hastalığının patogenezinin incelenmesi amacıyla alınan örneklerden miRNA izolasyonu yapılarak Real-time PCR cihazı ile ekspresyonları incelenecektir.

Yukarıda açıkça tanımlanan çalışmanın ne amaçla, kimler tarafından ve nasıl gerçekleştirileceği anlayabileceğim bir ifade ile bana anlatıldı.

Bu araştırmadan elde edilen bilgilerin bana ve başka insanlara sağlayacağı yararlar bana anlatıldı.

Araştırma sırasında meydana gelebilecek riskler ve rahatsızlıklar bana anlayabileceğim bir dille anlatıldı.

Araştırma sırasında oluşabilecek zarar durumunda gerçekleştirilecek işlemler bana anlatıldı.

Araştırmanın yürütülmesi sırasında olası yan etkiler, riskler ve zararlar ve haklarım konusunda 24 saat bilgi alabileceğim bir yetkilinin adı ve telefonu bana verildi.

Araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik ve testler ile tıbbi bakım hizmetleri için benden ya da bağlı bulunduğum sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyeceği bana anlatıldı.

Araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama altında olmaksızın gönüllü olarak katılıyorum.

Araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahip olduğum bana bildirildi.

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu (TÜ_BAEK)
Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu
18 Ocak 2022 v.2.0

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Sorumlu araştırmacı / hekime haber vermek kaydıyla, hiçbir gerekçe göstermeksizin istediğim anda bu çalışmadan çekilebileceğimin bilincindeyim.

Bu çalışmaya katılmayı reddetmem ya da sonradan çekilmem halinde hiçbir sorumluluk altına girmediyimi ve bu durumun şimdi ya da gelecekte gereksinim duyduğum tıbbi bakımı hiçbir biçimde etkilemeyeceğini biliyorum.

Çalışmanın yürüttüğü olan araştırmacı / hekim ya da destekleyen kuruluş, çalışma programının gereklerini yerine getirmedeki ihmali nedeniyle, benim onayımı almadan beni çalışma kapsamından çıkarabileceğini biliyorum.

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'nun gerekli gördüğünde, gizliliğimin korunması ilkesine uygun olarak, araştırma konusuyla ilişkili orijinal tıbbi kayıtlarıma doğrudan erişimde bulunabileceğini biliyorum

İlgili yasal düzenlemeler gereğince kimliğimi ortaya çıkaracak kayıtların gizli tutulacağı bana açıklandı.

Yukarıda yer alan ve araştırmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu adlı metni okudum. Aklıma gelen bütün soruları sorma olanağı tanındı ve sorularıma doyurucu cevaplar aldım. Yukarıda konusu belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen araştırmacı tarafından yapıldı.

Bu koşullarla, söz konusu araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu'nun tam imzalı bir kopyasını aldım.

• **Gönüllünün; (El yazısı ile)**

Adı- Soyadı:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya faks numarası):

.....
.....

Tarih:

• **Velayet ya da vesayet altında bulunanlar için; (El yazısı ile)**

Veli ya da Vasinin Adı- Soyadı:

İmzası:

Tarih:

Adresi (varsa telefon ve/veya faks numarası):

.....

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu (TÜ_BAEK)
Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu
18 Ocak 2022 v.2.0

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

.....
Tarih:

- **Açıklamaları yapan araştırmacının**

Unvanı, Adı- Soyadı: (El yazısı ile)

Görev yaptığı bölüm:

İmzası:

Tarih:

Ek-2 Etik Kurul Onay Formu

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI		
GİRİŞİMSEL OLMAYAN BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU Edirne, Türkiye		
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTF-GOBAEK 2023/185
	PROTOKOL ADI	Yeni Tanılı Akut Miyeloid Lösemi Hastalarında Biyobelirteç Potansiyali Olan miRNA'ların Ekspresyonunun Araştırılması
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Doç. Dr. Jülide TOZKIR
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	
	DESTEKLEYİCİ	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez Ulusal
KARAR BİLGİLERİ	6arar No:07/25	Tarih:24.04.2023
	Üniversitemiz Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Öğretim Üyesi Doç. Dr. Jülide TOZKIR'ın sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Yüksek Lisans Öğrencisi Mine KARACA'nın tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş; araştırmaya ilişkin giderlerin gönüllü ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödendiği koşullarda ve veri toplanacak yerlerden gerekli izinler alındıktan sonra gerçekleştirilmesinde etik bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜTF-GOBAEK Yönergesi	

ÜYELER						
Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Dr. Öğr. Üyesi Fatma Gülşüm ÖNAL Başkan	Tıp Tarihi ve Etik	T.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	E H	E H	
Prof. Dr. Hakan GÜRKAN Başkan Yardımcısı	Tıbbi Genetik	T.Ü.T.F. Tıbbi Genetik A.D.	E	E H	E H	
Doç. Dr. Selçuk KORKMAZ Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. Biyoistatistik A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Mehmet Erdal VARDAR Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Ruh Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Hasan ÜMIT Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Sernaz TOPALOĞLU Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	K	E H	E H	
Doç. Dr. Sezgi SARIKAYA SOLAK Üye	Deri ve Zührevi Hastalıklar	T.Ü.T.F. Deri ve Zührevi Hastalıklar A.D.	K	E H	E H	
Doç. Dr. Oktay KAYA Üye	Fizyoloji	T.Ü.T.F. Fizyoloji A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Galip EKUKLU Üye	Halk Sağlığı	T.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Filiz TÖTÜNCÜLER KÖKENLİ Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	K	E H	E H	
Dr. Öğr. Üyesi Sinan ATEŞ Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Sevtap HEKİMOĞLU ŞAHİN Üye	Anestezi ve Reanimasyon	T.Ü.T.F. Anestezi ve Reanimasyon A.D.	K	E H	E H	
Doç. Dr. Doğan ALBAYRAK Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E H	E H	
Doç. Dr. Burhan Can ÇANAKÇI Üye	Endodonti	T.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi	E	E H	E H	
Doç. Dr. Hilal KEKLİCEK Üye	Protez-Ortez ve Biyomekani	T.Ü. Sağlık Bilimleri Fakültesi	K	E H	E H	
Avukat Emine NURLU Üye		T.Ü. Rektörlüğü	K	E H	E H	
Emekli Öğretmen Sinan SEÇKİN Üye	Emekli Öğretmen	Serbest Üye	E	E H	E H	

*Araştırma ile ilişki

**Toplantıda Bulunma

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler:
Yabancı Dil: İngilizce

Eğitim:

Lisans eğitimini Trakya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik bölümünde 2017-2021 yılları arasında tamamladım. Yüksek lisans eğitimime ise Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında 2021 yılında başladım ve hâlen devam etmekteyim.

TEZ İLE İLGİLİ BİLİMSEL FAALİYETLER

"Yeni Tanılı Akut Miyeloid Lösemi Hastalarında Biyobelirteç Potansiyeli Olan miRNA'ların Ekspresyonunun Araştırılması" adlı poster sunumu, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi ve Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği düzenlediği "Kanserle Mücadelede Geleceğe Yönelik Stratejiler" Sempozyum (Poster Sunumu)