

T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**WİLM’S TÜMÖR 1 (WT1), VASKÜLER ENDOTELYAL
BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF) , VASKÜLER ENDOTELYAL
BÜYÜME FAKTÖR RESEPTÖRÜ 2 (KDR/VEGFR2),
SURVİVİN (BIRC5) VE NÖROPİLİN1 (NRP1) GEN
EKSPRESYONUNUN MİNİMAL REZİDÜEL HASTALIK
TAKİBİNDE KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Tezi Hazırlayan
Hülya ŞIVGIN

Tezi Yöneten
Prof.Dr.Yusuf ÖZKUL

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Doktora Tezi

Eylül 2010
KAYSERİ

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

**WİLM’S TÜMÖR 1 (WT1), VASKÜLER ENDOTELYAL
BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF) , VASKÜLER ENDOTELYAL
BÜYÜME FAKTÖR RESEPTÖRÜ 2 (KDR/VEGFR2),
SURVİVİN (BIRC5) VE NÖROPİLİN1 (NRP1) GEN
EKSPRESYONUNUN MİNİMAL REZİDÜEL HASTALIK
TAKİBİNDE KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan
Hülya ŞIVGIN**

**Tezi Yöneten
Prof.Dr.Yusuf ÖZKUL**

**Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TSD 09-972 nolu
proje ile desteklenmiştir.**

**Eylül 2010
KAYSERİ**

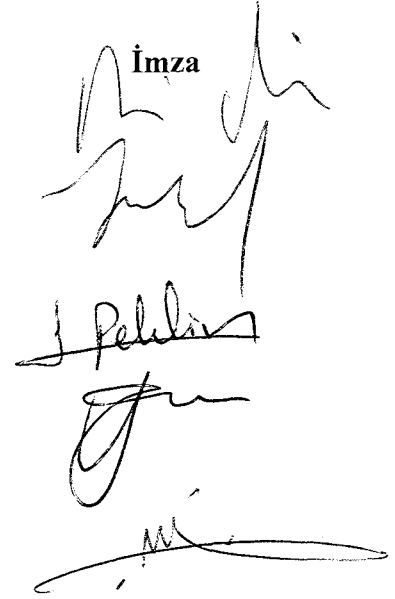
Prof.Dr.Yusuf ÖZKUL Danışmanlığında **Hülya ŞIVGIN** tarafından hazırlanan “**Wilm’s Tumor 1 (WTL), Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF), Vasküler Endotelial Büyüme Faktör Reseptörü 2 (KDR/VEGFR2), Survivin (BIRC5) ve Nöropilin1 (NRP1) Gen Ekspresyonlarının Minimal Residüel Hastalık Takibinde Kullanılabilirliğinin Araştırılması**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Genetik** Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

15 / 09 / 2010

JÜRİ

Başkan : Prof.Dr.Munis DÜNDAR
Üye : Prof.Dr.Yusuf ÖZKUL
Üye : Doç.Dr.Sacide PEHLİVAN
Üye : Doç.Dr.Bülent ESER
Üye : Yrd.Doç.Dr.Çetin SAATÇI

İmza

**ONAY**

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof.Dr.Saim ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans ve Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, çalışmalarımda bana her zaman destek ve yardımcı olan hocam Sayın

Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL'a,

Tavsiyeleri ve rehberliğiyle yolumu aydınlatan Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Munis DÜNDAR'a,

Sevinç ve üzüntülerimizi paylaşan, bilgilerinden faydalandığım değerli hocam, Sayın Yrd.Doç.Dr. Çetin SAATÇI'ye,

Değerli katkılarını ve tez çalışmamda gayretlerini hiçbir zaman esirgemeyen ve sonsuz enerjileriyle bana güç veren hocalarım; Sayın Doç. Dr. Sacide PEHLİVAN ve Sayın Doç. Dr. Mustafa PEHLİVAN'a,

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı Öğretim Üyeleri ve asistanlarına, Desteklerini ve sevgilerini her zaman yanımda hissettiğim Sevgili Anneme, Babama ve kardeşlerime

Ve biricik eşim Dr. Serdar Şıvgın'a

SONSUZ TEŞEKKÜRLER...

**WİLM'S TÜMÖR 1 (WT1), VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF) ,
VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖR RESEPTÖRÜ 2 (KDR/VEGFR2), SURVİVİN
(BIRC5) VE NÖROPİLİN1 (NRP1) GEN EKSPRESYONUNUN MİNİMAL REZİDÜEL
HASTALIK TAKİBİNDE KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

ÖZET

Akut lösemiler tüm kanserlerin yaklaşık olarak %3'ünü oluşturur. Amerika'da kanserden ölümlerin %1.2'si akut lösemi kaynaklıdır. Akut lösemilerin tedavisindeki ilerlemeler hastalardaki tedaviye yanıt oranlarını artırmakta ve pek çok hastada hastalıksız sağ kalımı uzatmaktadır. Ancak akut lösemilerde nüksün varlığı hala ciddi bir sorun olarak sürmektedir. Düzenli minimal rezidüel hastalık takibi ile nüksün erken tanınabileceği kabul gören bir yaklaşımdır. AML'de hastalıksız yaşam süresi rezidüel hastalığın kontrol altında tutulmasına bağlıdır. Bu nedenle MRH takibi önem kazanmaktadır. Son 10 yılda Wilm's tumor 1 gibi lösemide aşırı eksprese edildiği gösterilen genlerin MRH takibinde kullanılabilirliği ile ilgili çalışmalar yapılmıştır.

Bu araştırmanın amacı Akut Myeloblastik Lösemi (AML) ve Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) hastalarından alınan Kİ/PK örneklerinde Wilm's Tümör 1 (WT1), Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) , Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör Reseptörü 2 (KDR/VEGFR2), Survivin (BIRC5) ve Nöropilin1 (NRP1) genlerinin ekspresyonlarının MRH takibi için kullanışlı bir markır olup olmayacağını araştırılmasıdır.

Erciyes ve Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahiliye Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı'ndan ALL ve AML tanısı alan hastalar çalışmaya dahil edildi. 15 AML, 10 ALL hastasından 92 periferik kan örneği ve 13 AML ve 4 ALL hastasından toplam 42 kemik iliği örneği toplandı. Hastalardan tanı anında, ilk remisyonda ve sonrasında ortalama 2-3 ay ara ile Kİ/PK örneği alındı. Kontrol grubu olarak 25 sağlıklı bireyden PK örneği toplandı. Örneklerden ilk olarak RNA izole edildi. RNA örneklerinden Real Time PZR metodu ile ekspresyon çalışması yapıldı.

Sonuç olarak akut lösemide hem Kİ hem de PK örneklerinden WT1 ekspresyonunun nüksü erken tespit etme açısından MRH tespitinde kullanılabileceği yönünde kuvvetli deliller elde edildi. Ayrıca erişkin ALL hastalarında başka moleküler markırların varlığı ya da yokluğunda, VEGF ekspresyonunun nüksün erken tanısında kullanılabilir bir MRH markırı olabileceğini sonucuna varıldı.

Yaptığımız çalışmanın VEGF ve reseptörleri ile Survivin'in hematolojik malignitelerin patofizyolojisini ve AML progresyonundaki rolünü anlamaya katkı sağlayacağına inanıyoruz. VEGF'ün minimal rezidüel hastalık (MRH) göstergesi olarak kabul edilmesi için çalışmamızı destekleyecek daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu kanısındayız.

Anahtar kelimeler: Akut lösemiler, MRH, WT1 ekspresyonu, survivin, VEGF

**THE INVESTIGATION OF AVAILABILITY OF WILMS' TUMOR GENE (WT1), VASCULAR
ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF), VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH
FACTOR RECEPTOR 2 (VEGFR2), SURVIVIN (BIRC5) AND NEUROFILAMENT (NF) GEN
EXPRESSIONS FOR THE FOLLOW-UP OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE
ABSTRACT**

Acute leukemias consist of approximately 3% of all cancers worldwide. In USA, 1.2% of cancer-originated deaths occur due to acute leukemias. Advanced strategies in treatment of acute leukemias rise response rates to treatment and also disease-free survival rates of the patients. Nevertheless, presence of relapse still remains as a serious problem. It is an accepted approach that early relapse might be detected by proper follow-up of minimal residual disease (MRD). In AML, disease-free survival depends on the control of the disease so the follow-up of MRD is important. In the last decade, some studies have been performed about availability of overexpressed genes in follow-up of MRD such as Wilm's tumor 1 and EVI 1 in leukemias.

The aim of this study was to determine the availability of WT1, VEGF, KDR/VEGR2, SURVIVIN(BIRC) and NF1 expressions in bone marrow/blood samples for follow-up of MRD in patients with AML and ALL.

Patients with AML and ALL were included in the study from Erciyes University Department of Hematology and Gaziantep University Department of Hematology. A total of 92 blood samples were collected from 15 patients with AML and 10 patients with ALL. Also, 42 bone marrow samples were collected from 13 patients with AML and 4 patients with ALL. The samples were collected at the time of diagnosis, first remission and repeatedly every 3 months. Blood samples of 25 healthy persons were collected as the control group. First, RNA isolations were performed and expressions were detected by real-time PCR.

As a result, we had significant evidence that WT1 expression in blood and bone marrow could be performed as a useful marker in the follow-up of MRD in acute leukemias. Also, in adult patients with ALL, together with or without other molecular markers, it was showed that VEGF expression could be used as a useful MRD marker in the diagnosis of early relapse.

We believe that this study could help us to understand the role of VEGF receptors and BIRC5 in progression of AML and pathophysiology of hematological malignancies. Further studies are required for agreement on the availability of VEGF as a marker of MRD.

Key words: Acute leukemias, MRD, WT1 expression, survivin, VEGF.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
İÇ KAPAK.....	I
KABUL ONAY SAYFASI	II
TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
ABSTRACT... ..	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
TABLO LİSTESİ.....	VIII
ŞEKİL LİSTESİ.....	IX
KISALTMALAR.....	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1.AKUT LÖSEMİLER	5
2.2.ETİYOLOJİ	6
2.3.PATOGENEZ.....	7
2.4.AKUT MYELOİD LÖSEMİ	8
2.5.AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ	10
2.6.LÖSEMİLERDE MİNİMAL REZİDÜEL HASTALIK TAKİBİ.....	12
2.7. MRH ‘IN İZLENMESİNDE OVEREKSPRESE GENLER	14
2.8. MRH TAKİBİNİN KLİNİK DEĞERİ	14
2.9. AML’DE MRH TESPİTİ	15
2.10. ALL’DE MRH TESPİTİ	17
2.11.MRH’IN SAPTANMASINDA PZR İÇİN YENİ HEDEFLER	18
2.12.WILMS’ TÜMÖR 1 GENİ	19
2.13.AKUT LÖSEMİLİ HASTALARDA ANJİOGENEZİS.....	22
2.14.VASKÜLER ENDOTEL BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF), AİLENİN ÜYELERİ, YAPISI VE SENTEZİ	23
2.15.VEGF EKSPRESYONU	25
2.16.VEGFA.....	26
2.17.VEGF RESEPTÖRLERİ	26
2.17.1. VEGFR2 (KDR/FLK1)	27
2.17.2. Nöropilinler.....	28
2.18.ALL VE AML HASTALARINDA ANJİOGENEZ GENLERİNİN EKSPRESYONU.....	29
2.19.ANTİANJİOGENİK TEDAVİLER	30
2.20.APOPTOZİS.....	31
2.21.APOPTOZİS İNHİBE EDİCİ PROTEİN AİLESİ (İAP).....	31
2.21.1.SURVİVİN	33
2.22.KANTİTATİF REAL TİME PZR YÖNTEMİ (QRT-PZR) VE MRH TAKİBİNDE KULLANIMI.....	34

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
3.1. GEREÇLER.....	36
3.1.1 Demirbaş Malzemeler	36
3.1.2 Sarf Malzemeler ve Kimyasal Maddeler	37
3.2.KAN VE KEMİK İLİĞİ ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI	37
3.3.GEN EKSPRESYONU ÇALIŞMA YÖNTEMİ.....	37
3.3.1.RNA İzolasyonu.....	37
3.3.2.cDNA Sentezi	38
3.3.3.Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu	39
3.3.3.1.Real-Time PZR Reaksiyon Protokolü.....	40
3.4. İSTATİSTİK ANALİZLER.....	41
4. BULGULAR.....	43
4.1. WT1 GEN EKSPRESYON BULGULARI	44
4.2. BIRC5 GEN EKSPRESYON BULGULARI.....	46
4.3. VEGFA GEN EKSPRESYON BULGULARI.....	47
4.4. KDR GEN EKSPRESYON BULGULARI	48
4.5. NRP1 GEN EKSPRESYON BULGULARI	49
4.6. KONTROL GRUBU ÖRNEKLERİNDE WT1, NRP1, BIRC5, VEGFA VE KDR GEN EKSPRESYON SONUÇLARI	51
4.7.AML VE ALL HASTALARI TANI ANI ÖRNEKLERİNDE WT1, BIRC5, VEGFA, KDR, NRP GEN EKSPRESYON BULGULARI.....	52
4.8.AML HASTALARININ KEMİK İLİĞİ ÖRNEKLERİNDE WT1, NRP1, BIRC5, VEGFA VE KDR GEN EKSPRESYON BULGULARI	55
4.9.ALL HASTALARI KEMİK İLİĞİ ÖRNEKLERİNDE WT1, NRP1, BIRC5, VEGFA VE KDR GEN EKSPRESYON BULGULARI	56
4.10.AML HASTALARI PERİFERİK KAN ÖRNEKLERİNDE WT1, NRP1, 2.BIRC5, VEGFA VE KDR GEN EKSPRESYON BULGULARI	57
4.11.ALL HASTALARI PERİFERİK KAN ÖRNEKLERİNDE WT1, NRP1, BIRC5, VEGFA VE KDR GEN EKSPRESYON BULGULARI	60
4.12.NÜKS EDEN HASTALARIN WT1, BIRC5, VEGFA, KDR, NRP GEN EKSPRESYON BULGULARI.....	61
4.13.AML VE ALL HASTALARINDA WT1, BIRC5, VEGFA, KDR, NRP GEN EKSPRESYONU CUT OFF DEĞERLERİ VE ROC EĞRİLERİ	62
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	67
6. KAYNAKLAR	79

ÖZGEÇMİŞ

EKLER

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1.	AML’de sık görülen genetik değişiklikler.....	9
Tablo 2.2.	ALL’de sık görülen genetik değişiklikler.....	11
Tablo 2.3.	Hematolojik malignitelerde RT-PZR ile MRH bulunması.....	13
Tablo 2.4.	AML’de MRH Değerlendirmede Farklı PZR Hedefleri	18
Tablo 3.1.	Ekspresyon çalışılan genlerin primer dizileri	42
Tablo 4.1.	Çalışmaya alınan hastaların klinik ve genetik özellikleri	44
Tablo 4.2.	Kontrol grubu PK örneklerinde WT1, VEGF, VEGFR2, NRP1 ve survivin gen ekspresyonları.....	51
Tablo 4.3.	AML hastaları tanı anı Kİ Örneklerinde WT1, BIRC5, VEGFA, KDR, NRP Gen Ekspresyonları	52
Tablo 4.4.	ALL hastaları tanı anı Kİ Örneklerinde WT1, BIRC5, VEGFA, KDR, NRP Gen Ekspresyonları	53
Tablo 4.5.	AML hastaları tanı anı PK Örneklerinde WT1, BIRC5, VEGFA, KDR, NRP Gen Ekspresyonları	53
Tablo 4.6.	ALL hastaları tanı anı PK Örneklerinde WT1, BIRC5, VEGFA, KDR, NRP Gen Ekspresyonları	54
Tablo 4.7.	AML hastalarının Kemik İliği Örneklerinde WT1, NRP1, BIRC5, VEGFA ve KDR Gen Ekspresyonları.....	55
Tablo 4.8.	ALL hastaları Kemik İliği Örneklerinde WT1, NRP1, BIRC5, VEGFA ve KDR Gen Ekspresyon Bulguları.....	77
Tablo 4.9.	AML hastaları PK Örneklerinde WT1, NRP1, 2.BIRC5, VEGFA ve KDR Gen Ekspresyonları.....	58
Tablo 4.10.	ALL hastaları PK Örneklerinde WT1, NRP1, BIRC5, VEGFA ve KDR Gen Ekspresyonları.....	60
Tablo 4.11.	Nüks eden hastaların WT1, BIRC5, VEGFA, KDR, NRP Gen Ekspresyonları.....	62
Tablo 4.12.	Çalışmaya alınan hastaların bilgileri.....	65

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1.	VEGF geni exon ve intronları	24
Şekil 2.2.	VEGF ve tirozin kinaz reseptörleri ile ilişkisi	27
Şekil 3.1.	WT1 geni standartlarının Real Time PCR görüntüsü.....	40
Şekil 3.2.	WT1 geni standartlarının ekspresyon verimliliği.....	40
Şekil 4.1.	ABL geni ekspresyonu Real Time PCR görüntüsü.....	45
Şekil 4.2.	ABL geni ekspresyon verimliliği.....	46
Şekil 4.3.	WT1 geni ekspresyonu Real-Time PZR görüntüsü	46
Şekil 4.4.	WT1 geni ekspresyon verimliliği	47
Şekil 4.5.	BIRC5 geni ekspresyonu Real-Time PZR görüntüsü	47
Şekil 4.6.	BIRC5 geni ekspresyon verimliliği.....	48
Şekil 4.7.	VEGFA geni ekspresyonu Real-Time PZR görüntüsü.....	48
Şekil 4.8.	VEGFA geni ekspresyon verimliliği.....	49
Şekil 4.9.	KDR geni ekspresyonu Real-Time PZR görüntüsü	49
Şekil 4.10.	KDR geni ekspresyon verimliliği	50
Şekil 4.11.	NRP1 geni ekspresyonu Real-Time PZR görüntüsü.....	63
Şekil 4.12.	NRP1 geni ekspresyon verimliliği.....	50
Şekil 4.13.	AML hastaları kemik iliği örneklerinde WT1 ve BIRC5ekspresyonu ROC eğrisi	63
Şekil 4.14.	AML hastaları periferik kan örneklerindeWT1 ekspresyonu ROC eğrisi.	63
Şekil 4.15.	ALL hastaları periferik kan örneklerinde WT1, BIRC5, KDR ve NRP1 ekspresyonu ROC eğrisi.....	64

KISALTMALAR

AL	: Akut Lösemi
AML	: Akut Myeloblastik Lösemi
ALL	: Akut Lenfoblastik Lösemi
WT1	: Wilm's Tumor 1
VEGF	: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
VEGFR2	: Vasküler Endotelial Büyüme Faktör Reseptörü
KDR	: Kinaz domain reseptör
BIRC5	: Baculovirus IAP repeat- containing 5
NP1	: Nöropilin1
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-PZR	:Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
QRT-PZR	:Kantitatif Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PK	: Periferik Kan
Kİ	: Kemik İliği
DNA	:Deoksiribonükleik asit
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
cDNA	: Komplementer DNA
MRH	: Minimal Rezidüel Hastalık

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Akut lösemiler tüm kanserlerin yaklaşık olarak %3'ünü oluşturur. Amerika'da kanserden ölümlerin %1.2'si akut lösemi kaynaklıdır. Hematolojik malignitelerin tedavisindeki ilerlemeler hastalardaki tedaviye yanıt oranlarını artırmakta ve pek çok hastada hastalıksız sağ kalımı uzatmaktadır. Lösemi tedavisinde son yıllardaki gelişmelere karşın, nüksün varlığı hala ciddi bir sorun olarak sürmektedir.

Hastaya uygulanan tedaviden (radyoterapi, kemoterapi, kemik iliği nakli) kurtulan ve nüks gelişmesine sebep olan hücrelerin varlığı "**minimal rezidüel hastalık-MRH**" olarak tanımlanmıştır. Düzenli MRH'nın tesbiti ile nüksün erken tanınabileceği kabul gören bir yaklaşımdır. AML'de hastalıksız yaşam süresi rezidüel hastalığın kontrol altında tutulmasına bağlıdır. Bu nedenle MRH takibi önem kazanmaktadır.

Akut lösemilerde MRH'nin klinik relaps öncesi belirlenebilmesi, lösemi hastalarının tedavisinde ve yaşam süresinin uzatılmasında son derece önemlidir. Özellikle spesifik sitogenetik ya da moleküler markırı olmayan hastaların MRH takibinde yeni markırların bulunmasına ihtiyaç duyulmaktadır. AML vakalarının çoğu morfolojik remisyon sonrasında MRH için hassas bir markıra sahip değildir. Eğer hastalığın tekrarı MRH takibiyle morfolojik relaps öncesi gösterilebilirse donör lökosit infüzyon (DLI) kullanımı veya immunsupresif tedavi gibi yaklaşımlar tam vaktinde uygulanabilir.

Son 10 yılda Wilm's tumor geninin birçok kanser türünde olduğu gibi lösemide de aşırı eksprese edildiğini gösteren çalışmalar yapılmıştır. Bunu takiben özellikle AML hastalarının kemik iliği (Kİ) örneklerinde WT1 ekspresyonunun MRH takibi için kullanılabilirliğini ileri süren çalışmalar yayınlanmıştır. Normal periferik kan (PK) örneklerinde ve uzun süredir tam remisyonda olan lösemi hastalarının periferik kanında WT1 ekspresyonun çok düşük olması ya da bulunmaması relapsı tespit etme açısından periferik kanın, kemik iliğinden daha hassas olabileceğini düşündürmektedir. Bunu gösteren çalışmalar az da olsa tıbbi literatürde mevcuttur. Bu durumun başka örneklerle de gösterilmesi gerekir, şöyle ki Kİ yerine PK'dan çalışılması hastaların uyumunu arttıracak, aynı zamanda moleküler çalışmaların daha sık yapılarak nüksün erken tanısını kolaylaştırabilecektir.

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF); VEGFR-1 ve VEGFR-2 olmak üzere 2 adet transmembran tirozin kinaz reseptörlerine bağlanarak temel biyolojik etkisini gösterir. Gerek kan damarlarının (anjyogenez), gerekse kan hücrelerinin (hematopoez) oluşumu için, VEGF ve reseptörlerinin etkileşimi gerekmektedir. Normal kan yapım sürecinin yanı sıra hematopoietik neoplazilerde de VEGF ve VEGF reseptörlerinin eş zamanlı ekspresyonunu gösterilmiştir. Son yıllarda solid tümörlerin özelliği olduğu bilinen anjiogenezisin hematolojik malignitelerde de rolü olduğu konusunda çalışmalar yapılmıştır. Literatürde özellikle VEGFA ve VEGFR2 (KDR, Flk1)'in akut lösemilerde kontrol grubuna göre daha yüksek eksprese edildiğini gösteren yayınlar mevcuttur. Ancak anjiogenezisin hematolojik malignitelerdeki rolü hala tam olarak aydınlatılamamıştır. VEGF ekspresyonu, bir taraftan lökomogenezde anjiyogenezin rolü, diğer taraftan antianjiyojenik tedavi yaklaşımlarının klinikte uygulanabilirliğinin belirlenmesi açısından çok önemlidir.

Nöropilinler (NRP1 ve NRP2), VEGF'ün reseptörü olarak tanımlanmıştır ve non-tirozin kinaz transmembran reseptör ailesindendir. NRP'ler endotelyal hücreler kadar tümör hücrelerinde de eksprese edilmektedir. Löseminin ilerlemesinde NRP'nin rolü bilinmemektedir. Ancak literatürde AML hastasında NRP1 mRNA ekspresyonunu varlığını gösteren yayınlar mevcuttur. Artmış NRP-1 ekspresyonu AML hastalarının kemik iliğinde ve periferik kanındaki blast yüzdesi ile direk ilişkili bulunmuştur. Bu bilgiler NRP-1 in AML hastalarında daha yüksek seviyede eksprese edildiği ve NPP-1'in VEGF'e cevapta lösemi hücrelerinin kemotaksisini ve proliferasyonunu arttırdığını

göstermiştir. NRP-1 fonksiyonlarının inhibisyonunun, AML'nin tedavisinde yeni terapötik strateji sağlayacağını ileri sürülmektedir.

AML'de tedavi başarısızlığının primer sebebi erken relaps ve tedaviye dirençtir. Zamanı geldiğinde ölmesi gerektiği halde apoptotik kontrol mekanizmalarındaki bozukluklar nedeniyle ölemeyen hücreler genomlarında biriktirdikleri mutasyonlarla malign transformasyona aday hücrelerdir. Apoptozisin azalması malign hastalıkların gelişiminde olduğu kadar tedavi direncinde de önemlidir. Genellikle tümör dokusunda proliferasyonun artmasına bağlı olarak apoptoziste de artış izlenir.

Survivin, 'baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5' olarakta adlandırılan BIRC5 geni tarafından sentezlenir. Survivin bifonksiyonel bir proteindir. Yani, anti-apoptotik etkilerine ek olarak hem normal hücrelerde hem de malign hücrelerde mitozu düzenler. Survivin mitozun sadece G/2 fazında eksprese edilir. Survivin proteini mitoz boyunca tübülün ile etkileşimde bulunarak mitotik iğde lokalize olur ve böylece mitozun düzenlenmesine katkıda bulunur. Pek çok kanser türünde survivin aşırı eksprese edilmektedir. Literatürde lösemi hastalarında tanı anında survivin overekspresyonunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Uzun süre tam remisyonda olan hastalarda ise survivin ekspresyonu sabit kalmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, AML ve ALL hastalarında nüksün erken tespitini sağlayan, MRH takibinde kullanılabilecek potansiyel yeni markırları belirlemektir. WT1 tümör süpressör geninin özellikle AML hastalarının çoğunda tanı anında aşırı eksprese edildiği, Kantitatif Real Time Polimeraz Zincir Reasyonu (RT-PZR) ile MRH takibinde bu gen ekspresyonunun kullanılabildiği çeşitli yayınlarla gösterilmiştir.

Çalışmamızda hematolojik malignitelerdeki rolü tam açıklığa kavuşmamış anjiogenesis geni VEGF ve onun 2 reseptörü ve bir antiapoptotik gen olan BIRC5 gen ekspresyonlarının WT1 geni gibi MRH takibinde kullanılabilir birer markır olup olamayacağı araştırıldı. Elde edilecek verilerin AML ve ALL hastalarında esas görevi anjiogenesis olan VEGF ve reseptörlerinin lösemilerdeki rolünün belirlenmesine ve lösemide antianjiogenik tedavi yaklaşımlarının değerlendirilmesine katkı sağlayacağı kanısındayız.

Çalışmamızda bu amaçla Akut Myeloblastik Lösemi (AML) ve Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) hastalarının Kİ/PK örneklerinde Wilm's Tümör 1 (WT1), Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) , Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör Reseptörü 2

(KDR/VEGFR2), Survivin (BIRC5) ve Nöropilin1 (NP1) genlerinin ekspresyonları belirlendi. Hastalardan ortalama 6-12 ay süre ile alınan Kİ/PK örneklerinden WT1, VEGF, VEGFR2, NRP1 ve Survivin (BIRC5) gen ekspresyonları çalışılarak bu gen ekspresyonların MRH takibi için kullanışlı bir markır olup olmayacağı araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.AKUT LÖSEMİLER

Akut lösemiler, hematopoetik sistemin immatür hücrelerin olgunlaşma aşamasındaki duraklama sonucu malign özellikteki klonların çoğalması ile karakterize olan heterojen bir hastalıktır (1).

Bu immatür ve kontrolsüz çoğalan lösemik hücreler başta kemik iliği ve periferik dolaşım olmak üzere retiküloendotelyal sistem, merkezi sinir sistemi ve diğer vücut bölgelerinde birikir. Kemik iliğinin kontrolsüz olarak çoğalan lösemik hücrelerle infiltrasyonu sonucu anemi, trombositopeni ve nötropeni gelişir. Sonuçta hastalığın belirtileri olan solukluk, halsizlik, kanamalar, kemik ağrıları ve hayatı tehdit eden enfeksiyonlar ortaya çıkar (2).

Akut lösemiler temel olarak akut lenfoblastik lösemi (ALL) ve akut myeloid lösemi (AML) olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Tedavi ve prognozun birbirinden çok farklı olması nedeniyle akut lösemilerin değerlendirilmesinde en önemli adım tanı anında lenfoid, myeloid ayrımının yapılmasıdır. Akut lösemiler oldukça hızlı klinik seyir gösterirler ve kısa zamanda tedaviye başlanmazsa ölüm kaçınılmazdır.

Akut lösemiler ‘French-American-British cooperative grup’ (FAB) kriterlerine göre hücrelerin sitogenetik boyanma ve morfolojik boyanma özelliklerine göre Akut Myeloid Lösemi (AML) ve Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) olarak sınıflandırılmış ve çeşitli alt grupları tanılanmıştır.

FAB klasifikasyonuna göre AML kendi arasında 8 farklı gruba ayrılır. (M0, M1, M2 , M3 , M4 ,M5, M6, M7). ALL ise, immünolojik ve morfolojik olarak iki farklı şekilde sınıflandırılabilir. İmmünolojik olarak köken aldığı hücreye göre T ve B olmak üzere ikiye ayrılırken morfolojik olarak L1, L2, L3 olarak sınıflandırılır (3,4).

Akut lösemiler tüm kanserlerin yaklaşık olarak %3’ünü oluşturur (5). AML insidansı çocuk ve erişkinlerde 1/150000 , ALL insidansı ise 100000’de 1.3’dür (6). Gelişmiş ülkelerde akut lösemilerin % 83’ünü ALL, % 17’sini AML oluşturmakta olup, insidanda bölgesel farklılıklar görülebilir. Ülkemizde kesin olmamakla birlikte, ALL sıklık açısından yine birinci sırada yer almakta ve çeşitli merkezlerde tedavi gören çocuk hastaların en az % 27’sini oluşturmaktadır (7-9).

2.2.ETİYOLOJİ

Lösemilerin nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte multifaktöriyel olduğu düşünülmektedir. Etkilediği herkeste lösemiye neden olan bir faktör henüz belirlenmemiştir. İyonize edici ışınlar, kimyasal karsinojenler ve infeksiyöz ajanlar, lösemi etiolojisinden sorumlu tutulan çevresel faktörlerdir (10-12). Radyasyonun etiolojideki rolü, tanı ve tedavi amacıyla ışın alan ya da atom bombasının etkisinde kalan bireylerin incelenmesiyle ortaya konmuştur. İyonize radyasyon ve alkilleyici ajanlar çift sarmallı DNA’da kırılmalara yol açarlar ki bu da genomik delesyonlar, nokta mutasyonları ve kromozom translokasyonlarına neden olur.

Kimyasal karsinojenlerden benzen gibi organik solvent veya petrol ürünlerine maruz kalmanın erişkin lösemilerinin etiolojisinde rolü olduğu gösterilmiştir. Deri, lastik ve petrol endüstrilerinde çalışanlar, kamyon şoförleri ve benzin istasyonu görevlileri gibi uzun süre benzen ve/veya türevlerine maruz kalanlarda AML gelişme olasılığı artmıştır. Alkilleyici ajanlar topoizomeras II inhibitörü gibi kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar da AML’ye yol açabilir.(13-16)

Günümüzde en çok viral etiyoloji üzerinde durulmaktadır. Kanseri etiyolojisinde rol oynadığı düşünülen virüsler: Retrovirüsler, EBV (endemik Burkitt, nasofarengeal Ca), HTLV-I (Adult T hücreli lösemi), HTLV-II (Hairy cell lösemi)'dir (20). Aynı zamanda bazı genetik bozukluklar da lösemi insidansı artmaktadır. Bunlar; ataksi-telenjiyektazi, Bloom sendromu, Fanconi anemisi, Down sendromu Konjenital agamaglobulinemi, Poland sendromu, Shwachman-Diamond sendromu, Li-Fraumeni sendromu (p53 mutasyonu), Nörofibromatozis, Diamond-Blackfan anemisi, Kostmann hastalığıdır (10,17,18).

2.3.PATOGENEZ

Bütün hematopoetik hücreler ortak multipotent ana hücrelerden kaynaklanır. Eritrositler, polimorfonükleer granülositler, monositler ve trombositler gibi periferik kandaki olgun hücreler kemik iliğindeki progenitor hücrelerden tek bir hat üzerinde olgunlaşarak gelişir. Lösemi myeloid veya lenfoid progenitör hücrelerin malign transformasyona uğraması ve bu transforme hücrenin çoğalarak gittikçe büyüyen bir klon oluşturması sonucu gelişir. Akut lösemi hücrelerinin temel karakteristik özelliği farklılaşma yeteneğini kaybetmiş olmalarıdır. Lösemiye yol açan malign transformasyonun mekanizması net olarak bilinmemekle birlikte temelde genlerdeki defektler sonucu geliştiği düşünülmektedir.

Sitogenetik çalışmalar, lösemilerin yaklaşık yarısında sık tekrarlayan kromozom anomalilerinin bulunduğunu göstermiştir. Bu yapısal kromozom anomalilerinin translokasyonlar, inversiyonlar ve delesyonlar şeklinde olduğu ve etkilenen bölgelerde bulunan genlerin de lökomogeneze rol oynadıkları gösterilmiştir. Bu genler incelendiğinde aynı zamanda hematopoetik sistemin gelişimi ve normal fonksiyonu esnasında da rol oynadıkları ortaya çıkmaktadır. Lösemilerde diğer tümörlerde olduğu gibi tümör süpresör gen inaktivasyonu ve/veya onkogen aktivasyonu gözlenir. Wilms tümör süpresör gen, p53, p16INK4 baskılandığı gösterilmiş tümör süpresör genlerdir. RAS proto onkogenlerinin aktivasyonlarında artış gösterilmiştir (19,20).

Kromozomal translokasyonlar lökomogeneze kritik öneme sahiptir. Bu translokasyonlar hücrede başlıca iki yolla lökomogenezi aktive eder. Birincisi gen füzyonudur. Gen füzyonu, genellikle bir transkripsiyon faktörü ya da reseptör tirozin kinaz proteinini kodlayan gen bölgesi ile bunlarla ilgisi olmayan bir proteini kodlayan gen bölgesinin füzyona uğrayarak kimerik bir protein oluşturmasıdır. Bu kimerik

protein hücrenin malign transformasyonuna neden olur. Bir diğer mekanizma ise gen aktivasyonudur. Translokasyonlar sonucunda hücrede normalde transkripsiyonu kontrol eden bir gen, uygun olmayan bir biçimde başka bir genin aktif promotor ya da enhansörünün kontrolü altına girer ve gen ekspresyon kontrolü bozulur (21)

Hematopoietik hücrelerin proliferasyonu, farklılaşması ve fonksiyonel hale gelmesi, sitokin ve hormon olarak sınıflanabilen bir dizi ekstraselüler molekül tarafından kontrol edilmektedir. Sinyal ileti sisteminin majör üç üyesi bulunmaktadır; kinazlar, adaptör ya da “docking” proteinler ve transkripsiyon faktörleri. Sinyal ileti yollarında oluşan bozukluklar proliferasyon ve farklılaşmada defektlere yol açar. Örneğin lösemik blastlarda sitokin sentezi ve otokrin/parakrin yolla JAK/STAT yolunun uyarılması, akut myeloid lösemide devamlı STAT aktivasyonu nedeni olabilecek mekanizmalar arasında sayılmaktadır. STAT3 aktivitesi Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) düzeyinin artışına yol açarak, tümör anjiyogenezisinde de rol oynamaktadır (10,22,23).

2.4.AKUT MYELOİD LÖSEMİ

Akut myeloid lösemi (diğer adlarıyla akut myeloblastik lösemi veya akut nonlenfoblastik lösemi) ALL’ye nazaran oldukça heterojen bir hastalıktır. Akut myeloid lösemi, granülositik, eritroid, megakaryositer veya monositer serilerin herhangi birinden kaynaklanabileceği gibi karma farklılaşma da (hem granulositik, hem megakaryositik) gösterebilir.

ABD’de AML’nin yıllık insidansı yaklaşık 2.4/100000’dür. Akut myeloid lösemi her yaşta görülebilmekle beraber temelde ileri yaş erişkin hastalığıdır. İnsidans yaşla birlikte artar ve 65 yaş üzerinde 100000’de 12.6’ya ulaşır. Erişkinlerde akut lösemilerin %85’i, çocuklarda %15’i AML’dir (16).

AML moleküler mutasyonlar ve sitogenetik aberasyonların kompleks bir ağı sonucu ortaya çıkar. Bu genetik mutasyonlar bir markır olarak kullanılır ve hastalığın alt gruplara ayrılmasında, teşhis ve tedaviye karar verilmesinde son derece önemlidir.

AML de prognostik öngörü ve alt sınıflandırma hastaların %55’inde tanımlanan sitogenetik bozukluklarla yapılır. Bu kromozomal anomaliler heterojendir ve dengeli translokasyonlar gibi yapısal anomaliler kadar bütün kromozomların kazanımı veya kaybolması gibi sayısal anomalileri içerebilir. En sık yinelenen kromozomal değişiklikler klinik profil ile yakından ilişkilidir (7, 24)

AML’li hastaların %15’inde t(8;21)(q22;q22) görülür ve FAB M2 sınıfına girer (Tablo 2.1). AML1-ETO füzyon geni olarak adlandırılır. AML’li hastaların %15 inde inv(16) ve t(16;16) görülür. AML M4’de CBFB-MYH11 kimerik proteini görülür. t(15;17) ise daha çok M3 tip AML de görülür ve retinoik asit reseptör α geni (17q21 de RAR α geni) ve PML geni (15q21) dengeli translokasyon ile oluşur. Bu moleküler anormalliklerin klinik önemi vardır ve translokasyona sahip bireyler, trans-retinoik asit ile RAR α reseptörü bağlanarak tedavi edilebilir. AML1-ETO veya CBFB-MYH11 saptanması durumunda yüksek doz sitozin arabinozid tedavisi sonrası yüksek oranda uzun dönem remisyon görülür (7, 25).

Tablo 2.1. AML’de sık görülen genetik değişiklikler

Hastalık	Kromozomal değişiklik	Genetik yeniden düzenlenme	Sıklık (%)	Prognoz	Lösemi alt tipi
AML	t(15;17)	PML-RARA	13	İyi	M3
	t(8;21)	AML1-ETO	7-15	İyi	M2
	İnv16 veya t(16;16)	CBFB-MYH11	5-15	İyi	M4
	t (8;16)	MOZ-CBP	<1	Kötü	
	t (9;22)	BCR-ABL	<1	Kötü	
	t (6;9)	DEK-CAN	1	Kötü	

Ayrıca son yıllarda normal karyotip gözlenen AML hastalarının %45 inde prognostik öngörü ve alt sınıflandırmalara izin veren yeni moleküler markırlar da tanımlanmıştır. Bu yinelenen markırlardan biri FLT3 geninin uzunluk mutasyonları/internal tandem duplikasyonlarıdır (FLT3/LM). Bundan başka CEPBA gibi transkripsiyon faktör şifreleyen genlerdeki değişiklikler veya nükleofosmin (NPM1) mutasyonları gibi tümör süpressör yolak ile ilişkili mutasyonlar ortaya çıkmaktadır (7).

Bugünkü çalışmalar, lökomogeneziste rolü olduğu düşünülen ek moleküler markırlara yönelmiştir. Zinc finger DNA binding protein şifreleyen Wilms’ Tümör geni (WT1) bunlardan biridir. Bu tümör süpressör gen çeşitli lösemi tiplerinde, özellikle AML’de, aşırı eksprese edilmektedir. Ayrıca normal karyotipli hastaların %10 ‘u WT1 mutasyonu taşımaktadır. Bu mutasyonu taşıyan hastaların tam remisyona girmelerinde sıkıntı

vardır ve bu yüzden WT1 mutasyonu normal karyotipli hastalarda risk katlanmasına neden olabilir (26,27)

BAALC geni, *ERG* (ETS-related) and *EVI* (ecotropic virus integration-1) genlerinin aşırı ekspresyonu normal karyotipli AML hastalarında kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (28-31).

VEGF geninin tümör anjiogenezisle ilişkili olduğu ve solid tümörlerde ekspresyonunda artış meydana geldiği bilinmektedir. Bununla birlikte yeni veriler VEGF ve reseptörlerinin hematolojik malignitelerde artmış ekspresyonunu göstermiştir (32).

2.5.AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ

Akut lenfoblastik lösemi, akut lösemilerin % 75'ini oluşturur. 3-4/100000 sıklıkla görülmektedir. Akut lenfoblastik lösemi, çocukluk çağında en sık görülen malignite olup Amerika Birleşik Devletleri'nde 15 yaş altında tanı alan kanserlerin %23'ünü oluşturduğu bildirilmektedir (20,22,33)

ALL lerde tanı sırasında saptanan belli klinik ve laboratuvar bulguları prognostik öneme sahiptir. Bu faktörlerin saptanması modern tedavi stratejilerinin planlanması açısından önem taşımaktadır. Prognostik faktörler temel alınarak hastalar farklı risk gruplarına ayrılmakta ve tedavileri planlanmaktadır. Çocukluk çağı ALL'sinde prognostik faktörler lökosit sayısı, yaş, cinsiyet, ırk, mediastinal kitle, tanı sırasındaki hemoglobin seviyesi ve trombosit sayısı, FAB morfolojisi, sitogenetik, immünofenotipik alt grup şeklinde sıralanmaktadır (33)

Kromozomal bantlama ve kültür yöntemlerindeki gelişmelere paralel olarak ALL olgularının %90'dan fazlasında sayısal veya yapısal kromozomal anomaliler saptanmıştır. ALL'de yapılan sitogenetik incelemelerde 50'den fazla kromozoma sahip hücrelerin bulunduğu (hiperdiploidi) ALL vakalarında prognozun daha iyi olduğu bazı merkezlerce kabul edilmektedir. Hipodiploidi yani 46'dan az kromozoma sahip ALL vakalarında ise prognoz kötüdür. Kromozom 4, 10, 17 ve 18 in trizomileri ALL vakalarında iyi prognozdur. Yapısal kromozom anomalileri ALL'de sık olarak bulunmakta ve vakaların yaklaşık %40'ında translokasyon tespit edilmektedir. Bu translokasyonların lösemi patogenezinde rol oynadığı ve bazılarının kötü prognozla birlikte olduğu bilinmektedir (tablo 2.2)(34).

Tablo 2.2. ALL’de sık görülen genetik değişiklikler

Hastalık	Kromozomal değişiklik	Genetik yeniden düzenlenme	Sıklık (%)	Prognoz
B-ALL	t (1;19)	E2A-PBX1	3	İyi
	t (12;21)	TEL-AML1	2	İyi
	t (9;22)	BCR-ABL	25	Kötü
T-ALL	1p32del	SIL-SCL	25	Kötü
	t (1;14)	TCRD-SCL	3	
	t (10;14) t (7;10)	TCR-HOX11	5	
	t (5;14)	TCRD-HOX11L2	20	İyi

Sitogenetik değişiklikler tanıda anormal hücrelerde bulunur, remisyonda kaybolur ve nükslerde bazen ek değişikliklerle beraber ortaya çıkar. Tablolarda görülen kromozomal anomalilerin belli biyolojik ve klinik özellikler ile ilişkisi net olarak bilinmemektedir. Buna rağmen, gelişmiş karyotipleme yöntemlerini içerse de, sitogenetik incelemeler ile yetinmemek, moleküler defektleri de incelemek gerekir (34). Bunun nedenlerinden biri, genetik yeni düzenlemelerin birçoğunun karyotipleme ile gösterilememesidir. t(9;22) yetişkin ALL hastalarını %25 inde, çocuk ALL hastalarının %5 ‘inde görülür ve kötü prognoz göstergesidir. Ancak, sitogenetik olarak tespiti güç olmasından dolayı moleküler tekniklerle bcr-abl geninin varlığı veya FISH metodu ile pozitiflik saptanabilmektedir. B prekürsör ALL de t(1;19)/E2A-PBX1 ve t(4;11)/MLL-AF4 füzyonu kötü prognoz ile ilişkilendirilmişken, t(12,21)/TEL/AML1 iyi prognoz ile ilişkilidir.

Son yıllarda gen ekspresyon profili çalışmaları T-ALL vakalarının büyük kısmında bir veya daha fazla onkogenin ekspresyonunu prognoz ile ilişkilendirmiştir. Bu onkogenlerden en sık gözlenenleri HOX11, LMO2 ile LMO1, TAL1 ile LMO2 veya LMO1, HOX11L2 ve MLL-ENL dir. Hem B-ALL hem T-ALL’de HDM2 onkogeninin aşırı ekspresyonu ve mutasyonları ile P53 anomalleri kötü prognoz ile ilişkilidir (35-37)

Yapılan çalışmalarda ALL hastalarında tanı anında yüksek WT1 ekspresyonu gösterilmiştir. WT1 ekspresyonundaki artış daha kısa yaşam ve daha yüksek relaps ile ilişkilendirilmiştir (38).

2.6. LÖSEMİLERDE MİNİMAL REZİDÜEL HASTALIK TAKİBİ

Akut lösemili hastalar tanı anında yaklaşık 10^{12} - 10^{13} lösemi hücresine sahiptir. Remisyon-indüksiyon tedavisi (leri) ile hastaların büyük çoğunluğu tam remisyonu (complete remission=TR) başarır. Kemik iliğinde blast sayısı morfolojik olarak % 5'in altında kabul edildiğinde hematolojik tam remisyon tanımlaması kullanılır. Tam remisyonunda vücuttaki lösemik hücre tamamen yok olmaz, yaklaşık 10^{10} lösemik hücre kalır. Tam remisyonundan itibaren klinik belirgin lösemik nükse kadar geçen sürede vücuttaki lösemik hücre yükü büyük oranda bilinmez. Bu nedenle de 10^{10} lösemik yükten itibaren hastalar benzer veya farklı rejimlerle lösemik yükü azaltılması, belki de tamamen yok edilmesi için dönem dönem tedavi almaktadırlar (39).

Hematolojik malignitelerinin tedavilerindeki ilerlemeler yanıt oranlarını artırmakta ve pek çok hastada hastalıksız sağkalımı uzatmaktadır. Akut lenfoblastik lösemide (ALL) yaklaşık % 80- 90'nında ve akut miyeloblastik lösemili (AML) yetişkinlerin % 70-80'inde ilk sıra tedaviler ile tam remisyon elde edilmektedir. Fakat hastaların yaklaşık % 60-70'i tedavi sonrası rezidüel hastalık nedeniyle nüks etmektedir.

Hastaya uygulanan tedaviden (kemoterapi, kemik iliği nakli) kaçan ve nükse neden olan hücrelerin varlığı “minimal rezidüel hastalık-MRH” tanımlamasını gündeme getirmektedir.

Akut lösemi hastaları için prognoz çok heterojendir. Hastaların çok azı relaps riski açısından biyolojik ve klinik ölçümlere sahip olmasına rağmen kalan büyük çoğunluğu için açık bir prognostik faktör ancak teşhiste tanımlanabilir. Hastalığa cevabın derecesi bu hastalar için sonucun bilgi verici bir prediktörü olabilir. Minimal residüel hastalık gibi, geleneksel morfolojik tekniklerle bulunamayan lösemi hücrelerini bulmada modern teknikler tedaviye cevabın değerlendirilmesi için geliştirilmektedir. AML için kurulan modern MRH teknikleri genetik anomalilerin PZR amplifikasyonu ve anormal immunofenotipleri bulan akım sitometri temeline dayanır (41).

Yüksek sensitiviteye sahip bir metod olan akım sitometri (MFC multiparameter flow cytometry) ile lösemi ilişkili aberant immünofenotiplerin (LAIPs) belirlenmesi MRH takibinde sıkça kullanılan bir metoddur. Sitogenetik bir yöntem olan karyotip analizi ile

sayısal ve büyük yapısal anomalilerin belirlenmesi, fluoresan in situ hibridizasyon (FISH) ve PZR yöntemi ile füzyon gen transkriptlerinin tespiti, PZR ile anormal genler veya anormal eksprese edilen genlerin, klona özgü Ig ve TCR gen yeniden yapılanmalarının gösterilmesi günümüzde kullanılan yöntemlerdir (Tablo 2.3) (42).

PZR yöntemi MRH saptamada en duyarlı yöntemdir. Pek çok hematolojik malignitede klinik sonuç ile PZR yöntemiyle saptanabilen çok düşük düzeyde hastalığa özgü belirleyiciler arasında önemli oranda ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Bu hedeflerin bazıları sadece lösemi hücrelerine özgüdür ve normal hücrelerde çok düşük veya hiç yoktur. Bu PZR hedeflerine başvurma ve yöntemin duyarlılığı lösemi tipine göre değişir. Kronik miyelositer lösemi ve ALL'de saptanan bir PZR hedefi tüm hastalarda normalde düşük düzeyde bulunabilir iken, AML'ye özgü PZR hedefleri yalnızca hastaların % 30-40'inde saptanır. AML ya da ALL'ye özgü moleküler markırlar MRH takibinde rutin olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda bu moleküler markırlara ilaveten aşırı eksprese edilen bazı genlerin MRH takibinde kullanılabileceği ileri sürülmektedir (43,44).

Tablo 2.3. Hematolojik malignitelerde RT-PZR ile MRH bulunması

	Ig/TCR yeniden düzenlenmeleri	Füzyon genler	WT1
Duyarlılık	10^{-4} - 10^{-5}	10^{-4}	10^{-4}
B hücre	%	%	%
Öncül B-ALL çocuk	95	40-50	Veri yok
Öncül B-ALL yetişkin	90	35-45	70-90
T hücre			
Öncül T-ALL çocuk	>95	10-25	
Öncül T-ALL çocuk	90	5-10	75
Miyeloid seri			
AML çocuk	5-10	20-40	85-100
AML erişkin	5-10	10-20	85-100

2.7. MRH ‘IN İZLENMESİNDE OVEREKSPRESE GENLER

Bugün için AML vakalarının yaklaşık %40’ında sitogenetik ve moleküler genetik anomaliler belirlenememekte ve MRH takibi için genetik hedefleri bulunmamaktadır. Böyle vakalarda AML de yüksek oranda eksprese edilen genler MRH hedefleri olarak ele alınabilir. Bununla birlikte tüm bu genlerin normal hücrelerde bile temel ekspresyon seviyesi olması, dolayısıyla füzyon gen veya gen mutasyonları gibi ‘asla tespit edilemez’ değildir. Bu nedenle tanı anında bazı vakalarda sensitivitesi 1/1000 ile 1/10000 arasında değişebilir. Çoğu çalışma bu markırların kullanılabilirliğini göstermiş olsa da füzyon gen yada mutasyon spesifik markırları olmayan birkaç vakada WT1 veya EVI1 gibi markırlar yüksek ekspresyon gösterebilir.

MRH çalışmaları için gösterilen ilk overekspresyon markırı WT1’dir. Wolfgang ve arkadaşları AML de hemen her vakada WT1’in overeksprese olduğunu ve bu sebeple WT1 overekspresyonunun malign hücrelerin spesifik özelliği olduğunu ileri sürmüştür. WT1 ekspresyonu için 1/10000 nin altında bir sensitivite yakalamışlardır. Erişkinler kadar çocuklar için de yüksek, redüktif değerler tespit etmişlerdir. Ayrıca düşük sensitivite değerleriyle birlikte, WT1’in sadece füzyon geni olmayan ve spesifik mutasyonu bulunmayan vakalarda kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir (42).

2.8. MRH TAKİBİNİN KLİNİK DEĞERİ

ALL’deki çoğu MRH çalışması çocuklarda yapılmıştır. Başlangıçta küçük hasta gruplarında yürütülen çalışmaların sonuçları MRH varlığının önemini göstermiş, ancak bulgular tam bir paralellik içinde bulunmamıştır. Bunun sitostatik tedavi ile uygulanan tekniklerdeki farklardan kaynaklandığı düşünülmüştür. Daha sonra yürütülen büyük prospektif çalışmalarda MRH takibinin klinik değeri kanıtlanmış, ve güncel tedavi protokollerinde risk sınıflamasına dahil edilebileceği sonucuna varılmıştır (34,43)

Tedaviden kaçan bu rezidüel hücrelerin saptanması ve varlığının klinik önemi konusunda giderek yeni teknolojilerin de eklenmesiyle önemli gelişmeler olmuştur. Bu nedenle MRH saptanması ve değerlendirilmesi için çeşitli laboratuvar yöntemleri kullanıma girmiştir.

AML de MRH ın takibinin klinik önemi çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (4,5,7). İnv(16), t(15;17) li hastalarda AML1-ETO ve CBFbeta/MYH11 bulunması için kantitatif PZR çalışılmış, relaps riski yüksek hastaların tespiti bu teknikle gösterilmiştir (41).

İndüksiyon tedavisi sonunda immüfenotipleme veya PZR ile düşük düzeyde saptanan veya hiç saptanamayan MRH olması, iyi prognoz göstergesidir. Foroni L ve arkadaşlarının (1999) MRH çalışmalarının meta-analizi ALL'li çocukların yaklaşık %50'sinin indüksiyon sonunda MRH pozitif olduğunu ve bu hastaların yaklaşık %45'inin nüks edeceğini göstermişlerdir. Nüks riski, saptanan MRH düzeyi ile doğru orantılı bulunmuştur. Ayrıca, immüfenotipleme ile saptanan MRH düzeyi, olumsuz prognostik özelliği bilinen kromozom anomalilerinin varlığı ile korelasyon göstermektedir (98).İndüksiyon sonunda saptanan MRH düzeyinin en güçlü prognostik faktör olduğu bulunmuştur. Üstelik, bu değerin yaş, lökosit sayısı, prednisolon yanıtı, kromozom anomalileri ve immüfenotip gibi bilinen risk faktörlerinden de bağımsız olduğu belirtilmektedir. Gerek çocuk, gerek erişkinde ki akut lösemilerde günümüzde MRH risk hesaplamasına temel oluşturacak kadar yaygınlık kazanmıştır (45).

Fusion transkriptlerinin amplifikasyonu tarafından MRH tespiti yapılırken, spesifik lösemik alt tiplerin belirlenmesinde akım sitometri (ASM) geniş bir uygulama potansiyeline sahiptir. San Miguel ve arkadaşları (46) morfolojik remisyonadaki yetişkin AML hastalarında indüksiyon kemoterapisi sonrasında alınan ilk kemik iliğinde MRH göstermiştir. Çalışmada MRH seviyeleri bakımından hastalar 4 gruba bölünmüş; %0.01 lösemik hücreden daha az 8 hastanın biri relaps olurken, %1 lösemik hücreye sahip 17 hastada relaps oranı %84 olarak tespit edilmiştir. %0.01-%0.1 lösemik hücreli hasta (n=37) ve %0.1-%1 li (n=64) lösemik hücreli hasta orta seviyede relaps oranına sahip bulunmuştur (41).

2.9. AML'DE MRH TESPİTİ

AML için güncel tedavi protokolleri FLT3, NPM1 gibi moleküler bozukluklar, spesifik kromozomal aberasyonlar, immunofenotipik profiller beyaz küre miktarı ve yaşı da içeren prognostik faktörlere dayalıdır. MRH nin izlenmesi AML hastalarında, hastanın relaps riskinin bulunmasında ve tedaviye cevabın değerlendirilmesinde önemli tanısal araç olarak kullanılmaktadır (47).

AML vakalarının çoğu morfolojik remisyon sonrasında MRH için hassas bir markıra sahip değildir. Eğer hastalığın tekrarı morfolojik relaps öncesi gösterilebilirse donör lökosit infüzyon (DLI) gibi kullanımı veya immunosupressif terapi gibi teropatik yaklaşımlar tam vaktinde uygulanabilir (48).

AML de MRH'ın moleküler saptanması, tanımlanan kromozomal anormallikler ve füzyon genleri ile sınırlıdır. Son beş yılda AML'de MRH saptamada kantitatif-revers transkriptaz PZR (QRT-PZR) en sık kullanılan PZR yöntemidir. AML'de üç tane sık önemli resiprokal rearanjman üreten füzyon genleri t(15;17), inv(16)/t(16;16) ve t(8;21) dir. Bu yeniden düzenlenmeler tüm AML hastalarının % 20'sinde saptanır ve iyi prognozu gösterir. Bu genleri taşıyan hastaların çoğu tam remisyona ulaşır, ancak % 10-30'u sonunda nüks eder (49-52).

AML'de bu füzyon transkriptleri PML-RARA, CBFB-MYH11 ve AML1-ETO(RUNX1-MTG8) olup, en çok çalışılan ise PML-RARA'dır. Kantitatif olmayan PZR ile yapılan ilk çalışmalarda akut promiyelositik lösemide (APL) PZR negatifliğinin uzun dönem remisyonu gösterirken PZR pozitifliği yüksek oranda relapsla sonuçlanır (54-59). Residüel PML-RARA pozitif hücreler hastalık nüksünü öngörür ve bu nedenle de tedavi kararlarında önemli bir parametredir (96, 103-106). Kantitatif olmayan PZR APL'de oldukça önemli olmasına rağmen, sınırlı bir parametredir, tümör yükü hakkında kesin bir bilgi vermez. Residüel CBFB-MYH11 veya AML1-ETO transkriptlerinin morfolojik tam remisyonda saptanması henüz aydınlatılamamıştır. t(8;21)(+) AML'li hastalarda konvansiyonel ve nested PZR ile tanımlanan MRH verileri, uzun dönem remisyonlarda sürekli pozitif olan pek çok olguda eşlik ettiği gösterilmiştir. Ayrıca MLL-AF9 ve diğer MLL-füzyon transkriptlerinde önemini gösteren az sayıda çalışma da vardır (60-61).

Günümüzde QRT-PZR ile AML'de tanımlanan MRH düzeylerinin prognostik etkisi üzerine toplanan veriler takiplerde lösemik transkriptlerin doğru değerlendirmesine izin verir.

Herhangi bir tedaviye başlamadan önce ilk tanıda bu füzyon genlerinin miktarını ölçmek önemlidir. Bu moleküler düzeyde değiştiği gibi, füzyon genin alttipini değerlendirme esasen önemlidir. Ayrıca, tanıdaki ilk değer MRH değerlendirme noktalarında bazal değer oluşturmak için zorunludur. Referans genlere göre tanıda bu ilk oranların herhangi bir prognostik etkisi gösterilememiştir. Ancak, CBFB-MYH11-

pozitif AML'li 14 hasta ile yapılan bir çalışmada yüksek transkript oranlarının yüksek blast sayısı ve kısa sağkalıma eşlik ettiği gösterilmiştir (62).

Krauter ve arkadaşları indüksiyon tedavisi sonrası MRH $\geq$ % 1 saptanması ile nüks kadar geçen sürenin ortalama 3 ay olduğunu, bu nedenle de bu vakalarda tedaviye yüksek riskli hastalar gibi devam edilmesini önermektedirler (63). Başka bir çalışmada nüks eden hastalarında morfolojik tam remisyondaki örneklerinde CBFB-MYH11 transkript düzeyi (ortanca 151-dağılım 1-1632) nüks etmeyenlere göre (ortanca 0-dağılım 0-133) yüksek olduğu ($p < 0,0001$) ve sonuçta sürekli tam remisyon için PZR negatifliğinin elde edilmesi gerektiğini göstermektedir. Ayrıca, 1.tam remisyondaki hastaları CBFB-MYH11 kopya/ 10000 ABL kopyası eşiğine göre (10-4) yüksek ve düşük riskli olarak ikiye ayırdıklarında, eşik değerin altında kalan hastaların takip periyodunda tam remisyonların devam ettiğini gözlemişlerdir. Diğer bir çalışmada inv(16)/CBFB-MYH11 pozitif AML'ye odaklandığında, sınırlı sayıda hastada remisyonun herhangi bir zamanında %0,25 kritik bir transkript oranının nüksü belirlediği gösterilmiştir (64).

2.10. ALL'DE MRH TESPİTİ

Kromozom anormallikleri ile birlikte birkaç akut lösemi tümöre-özgü füzyonlara sahiptir. Örneğin BCR-ABL füzyon gen transkriptleri t(9;22)'ye sahip yetişkin ALL vakalarında, t(1;19)'a sahip çoğu pre-B-ALL'de E2A-PBX1, t(4;11)'li infant pro-B-ALL'de yüksek sıklıkta MLL-AF4 füzyon gen transkriptleri ve t(12;21)'li çocukluk prekürsor-B-ALL'de TEL-AML1 füzyon gen transkriptleri gibi. Böylece RT-PZR ile lösemiye-özgü gen transkriptleri prekürsor-BALL'de MRH saptamada kullanılabilir.

T-ALL'li hastaların % 10'u kadarında SIL-TAL1 füzyon gen transkriptleri RT-PZR analizi ile saptanabilir; hatta yine T-ALL'lilerin %10'unda CALM-AF10 füzyon gen transkriptleride saptanabilir (65-67).

MRH takibinin standart olarak her hastaya uygulanabildiği merkezlerde takriben ALL hastaların %90 da MRH değerlendirmesi için bir hedef bulma şansı vardır. MRH negatif hastaların prognozunu daha iyi olduğu bilinmektedir. Buna rağmen %10-20 hastada MRH negatif iken nüksler görülebilmektedir. Erişkinlerde MRH negatifleşmeye daha yavaş başlamakta ve pek az hasta MRH negatif olabilmektedir. ALL çalışmaları indüksiyon tedavisinden sonra MRH düzeyinin 10^{-2} olması durumunda nüks oranının

%60 çıktığını göstermiştir. Bir yıl içinde mümkün olduğunca sık MRH takibinin hasta takibinde daha güvenilir olduğu gösterilmiştir (68).

Sonuç olarak; yeni tanı almış her lösemi hastasında mutlak suretle klasik konvansiyonel yöntemlerle sitogenetik analiz, yapılabiliyorsa FISH ve PZR ile de moleküler düzeyde genetik analiz yapılmalıdır. Remisyon elde edildikten sonra da relaps durumunu erken saptama ve sonraki tedavinin planlanması için MRH takibi hastalığa uygun belirteçlerle ve her hastalık için uygun aralıklarla yapılmalıdır.

2.11.MRH'İN SAPTANMASINDA PZR İÇİN YENİ HEDEFLER

Normal karyotipli veya füzyon transkripti saptanmayan AML hastalarında PZR kullanımı olası değildir. Normal karyotipli AML'de veya diğer prognostik orta derece anormallikler, trizomi 8 veya 11 ve del(9q), FLT-3 geninde uzunlamasına mutasyonlar (FLT3-LM) ve MLL geninin parsiyel tandem duplikasyonu (MLL-PTD) sıklıkla saptanır ve MRH tanımlanmasında ümit vaat eden belirleyicilerdir. Ayrıca, WT1 geni veya EVI1 geninin anormal ekspresyonu gibi önemli belirleyiciler sınırlı sayıda çalışmada kullanılmıştır. Böylece, sensitif PZR esaslı değerlendirilebilen hasta sayısı günümüzde artmaktadır (Tablo 2.4) (69).

Tablo 2.4. AML'de MRH Değerlendirmede Farklı PZR Hedefleri

PZR hedefi	Yeni tanı AML'de pozitiflik %	Normal yada orta riskli AML'de pozitiflik %	Kompleks anormal karyotipli AML'de pozitiflik %
PML-RARA	7-8	-	-
AML1-ETO	7-8	-	-
CBFB-MYH11	7-8	-	-
MLL-AF10	5	-	-
MLL-PTD	6	10	2
FLT3-LM	23	40	2
WT1	100	100	100
EVI1	20	10	10

2.12.WILMS' TÜMÖR 1 GENİ

Wilms' tümör 1 geni yeni doğanlarda Wilms tümörüne neden olan gen olarak keşfedilmiştir. WT1 geni kromozom 11p13'de lokalize bir tümör supressör gendir. İnsan WT1 geni 10 exondur ve yaklaşık 50 kb'lık bir gendir. Bu gen birçok büyüme faktörü için transkripsiyonel repressör yada aktivatör olarak fonksiyon gören bir çinko parmak transkripsiyon faktör şifreler. Aynı zamanda insülin benzeri büyüme faktörünün (insulin-like growth factor-II (IGF-11) güçlü bir transkripsiyon baskılayıcısı, platelet türevli büyüme faktör A (platelet-derived growth factor-A (PDGF-A)) zinciri, 5 koloni stimüle edici faktör-1 (5 colony-stimulating factor-I (CSF-and IGF-reseptör (IGF-R)) geni olarak fonksiyon görür (70-71).

WT1 in en önemli özelliklerinden biri alternatif splicing, alternatif translasyon başlama siteleri ve RNA editingin kombinasyonu tarafından üretilen isoformların çokluğudur. En az 24 farklı varyant bu lokustan üretilir. RNA editing insan, fare ve rat mRNA sında gözlenmiştir. Gözlenen edited RNA'nın oranı farklı çalışmalarda çeşitlilik göstermiştir. Alternatif translasyona başlama bölgelerinden üretilen izoformlar hakkında çok az şey bilinmektedir (70).

RB1 ve p53 gibi diğer tümör supressör genlerin ekspresyonundan farklı olarak WT1 ekspresyonu çok az doku ile sınırlıdır. Fare deneyleri ve insanlardaki mutasyon analizleri WT geninin vücut fonksiyonunun sürdürülmesi ve gelişim esnasında önemli görevleri olduğunu göstermiştir. WT1 memeli embriyonik gelişimi esnasında ürogenital sistem, karaciğer, beynin belli alanları, spinal kord, mezotelyal organlar gibi pek çok dokuda eksprese edilir. Ayrıca WT1 ince barsak, kalp, akciğer gibi organlarda da eksprese edilir. Bunlar dışındaki organlarda ise eksprese edilmez (72).

Wilms tümörü genindeki mutasyonlar çeşitli hastalıklarla neden olur. WT1 ve WT2 genlerindeki delesyonlar Wilms Tümörü (çocukluk çağında en sık görülen renal tümör) ile ilişkilidir. Ayrıca WT1 mutasyonları ve overekspresyonunun meme kanseri, akciğer kanseri, retinoblastoma gibi malignansiler ve Denys- Drash, Frasier, WAGR sendromu gibi çeşitli hastalıklarla ilişkisi gösterilmiştir (70,73).

AML ve ALL gibi çeşitli hematolojik malignansilerde WT1 mRNA'sının overekspresyonu gösterilmiştir. WT1'in böbrek bozukluklarının gelişimindeki rolü bilinmesine rağmen insan hematopoiezindeki fonksiyonu hala tam olarak açıklanamamıştır. Ancak WT1'in kan hücre gelişimine katkı sağladığı ve lösemi kökenli hücre serileri ve primer kan hücrelerinin farklılaşmasına neden olduğu ileri sürülmektedir (72).

Lökomogenesis prosesinde WT1'in rolü tartışmalıdır. AML ve ALL'de WT1 aşırı eksprese edilmesi, bu tumor supressör genin hematopoietik hücrelerde onkogenik aktivitesi olabileceğini ileri sürmektedir. Yapılan çalışmalarda WT1'in hematopoietik prekürsör alt gruplarına olan etkisinin daha çok evreye spesifik olduğu görülmektedir, buda öncül hücrelerde hücrel aktiviteyi arttırırken hücrel farklılaşmayı da tetiklediğini göstermiştir (72).

Son yıllarda yapılan bir çalışmada WT1 antisens oligoprimierlerin taze insan lösemik hücrelerinde büyümeyi inhibe ettiğini fakat normal koloni şekillendiren granülosit makrofj ünitesini (CFU-GM) etkilemediğini göstermiştir. Tüm bu sonuçlar lökomogenesise WT1 geninin katılımını güçlendirmektedir (71).

WT1 ekspresyonunun lösemide panlösemik markır olarak kullanılabilirliği ilk kez Inoue ve arkadaşları tarafından ileri sürülmüş ve olgunlaşmamış hücrelerin karakteristik bir markırı olarak gösterilmiştir (72)

Akut lösemilerin büyük çoğunluğunda (%70-90) WT1 overeksprese edilmektedir. Bu yüzden akut lösemide potansiyel teropatik hedef ve uygun MRH markırı olarak tanımlanmıştır. Aynı zamanda WT1 over ekspresyonu kötü prognostik faktördür.

Kemik iliğinde WT1 mRNA seviyesinin AML de MRH ın varlığını yansıttığı, ancak morfolojik bulguların tam remisyonda durduğu rapor edilmiştir. Periferik kanda da WT1 mRNA'sının MRH bulunmasında, lösemi tipine aldırmadan allojenik kök hücre nakli (AKİT) sonrası relapsın tahmininde kullanılabileceği gösterilmiştir. WT1 geninin overekspresyonu KML nin ileri safhası, ALL, AML, myeloblastik sendrom gibi pek çok lösemi tipinde gösterilen bir panlösemik moleküler markırdır (48).

QRT-PZR'ın geliştirilmesi ile WT1 mRNA'sı AML hastalarında MRH'ın bir markırı olarak kullanılmaya başlanmıştır. WT1 gen ekspresyon seviyeleri AML de sağkalım için de prognostik bir faktördür. Inoue ve arkadaşları düşük WT1 ekspresyonu, daha yüksek tam remisyon oranı ve daha uzun sağkalım süresi arasında ilişki olduğunu göstermiştir (71,73).

Inoue ve arkadaşları (1996) yaptıkları çalışmada WT1 ekspresyon seviyesinin kantitasyonu tarafından MRH teşhisinde en önemli avantajının, WT1'in lösemi alt tipine bakmaksızın hemen her vakada veya bcr/abl, PML/RARA ve AML1/ET0 gibi DNA markırlarının varlığı ve yokluğunda da uygulanabilirliği olduğunu göstermiştir (71).

Ancak daha sonra WT1 ekspresyonunun özellikle spesifik bir moleküler markırı olmayan AML ve ALL hastalarında MRH takibinde kullanılabileceğini ileri süren yayınlar da çıkmıştır.

Lösemi hastalarında MRH'nin doğru değerlendirilmesi tedavi rejiminin etkinliği, olası yakın nüksün erken tanısı ve bireysel tedavi protokolünü belirlemede son derece önemlidir. Lösemik hücrelerde yaklaşık olarak WT1 ekspresyon seviyeleri, normal Kİ'ndekinden 10^3 daha fazla ve PK den 10^5 kez daha fazladır. Normal ve lösemik hücreler arasında WT1 ekspresyon seviyelerinde ki bu çarpıcı fark PK' da $1/10^5$ ve Kİ de $1/10^3$ kadar düşük frekansta MRH bulunmasını mümkün kılar (71).

Lösemik ve normal hücrelerde WT1 transkriptleri arasındaki ayrımı açıkça yapan QRT-PZR, MRH değerlendirilmesinde WT1'in çok kullanışlı bir markır olarak kullanılabileceğini gösterilmiştir. Özellikle sitogenetik bir markırı olmayan hastalarda takip boyunca lösemik klonun davranışını izleme ve tedaviye cevabın belirlenmesinde yardımcı olabilmektedir.

MRH markırı olarak WT1'in rolünün değerlendirilmesi için yapılan bir çalışmada QRT-PZR'da bir füzyon transkripti olan hastanın bu markırı ile birlikte eş zamanlı olarak WT1 ekspresyonu çalışılarak takip edilmiştir. WT1 seviyesi MRH monitorizasyonu için kullanılan diğer moleküler markır ile sıkı bir paralellik göstermiştir. AML hastalarının takibinde, normal PK veya normal Kİ'de de bulunan WT1 ekspresyonunun hasta örneğindeki artışın hematolojik relapsın habercisi olabileceği bulunmuştur. WT1'deki artıştan kısa süre sonra relaps görülür, relapsın kinetiği çok farklılık gösterir. Bu durumun aksine normal WT1 değeri uzun süreli remisyonla ilişkilidir. WT

ekspresyonunun değerlendirilmesi bütün AML hastalarında oldukça sensitiftir ve çoğu vakada bu sensitivite 10^{-3} ve 10^{-4} 'e ulaşır (72)

2.13.AKUT LÖSEMİLİ HASTALARDA ANJİOGENEZİS

Çok hücreli organizmaların yaşamlarını sürdürebilmeleri; besin ve oksijenin organ ve dokulara taşınmasını bunun yanında dokulardan artık maddelerin uzaklaştırılmasını sağlayan kompleks yapıdaki damar ağına bağlıdır. Damarsal yapının oluştuğu ilk evreye vaskulogenez denmektedir. Anjiogenez ise damarların oluşmasından önceki evrede endotel hücrelerinin kümelenmesi ile oluşan kapillerlerin dallanması ve genişlemesi ve küçük damarların büyüüp filizlenmesidir. Kısaca anjiogenez, yeni damar gelişimi olarak tanımlanmaktadır. Kan damarlarının gelişmesi proanjiogenik ve antianjiogenik faktörler arasındaki dengeye bağlıdır. Bu süreç için birçok fizyolojik ve patolojik şartların olması gerekmektedir. Yara iyileşmesi, embriyonik gelişme, üreme gibi fizyolojik durumlarda anjiogenez son derece önemlidir. Tümörlerin progresyonu, metastazı ve invazyonunda da anjiogenezin rolünün olduğu gösterilmiştir (74).

İnsanlarda anjiogenezis, anjiogenezisi stimüle eden vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), asidik ve bazik fibroblast büyüme faktörleri (aFGF, bFGF), anjiopoetin-1, tümör nekrozis faktör (TNF), hepatosit büyüme faktörü (HGF) gibi proteinler ile anjiogenezisi inhibe eden, FVIII, kolajenin, trombospondin, fibronektin, α , β , γ interferon (IFN) gibi faktörler arasındaki ince bir denge ile düzenlenmektedir. Bugün için progresif tümör büyümesi ve metastazının anjiogenezise bağlı olduğu bilinmektedir. Anjiogenezisin tümör büyüme ve metastazındaki öneminin anlaşılması, anjiogenezisin belirlenme yöntemleri ve anjiogenezis tedavi modalitelerinin oluşmasını stimüle etmiştir (74,75).

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF); VEGFR-1 ve VEGFR-2 olmak üzere 2 adet transmembran tirozin kinaz reseptörlerine bağlanarak temel biyolojik etkisini gösterir. Gerek kan damarlarının (anjiyogenez) gerekse kan hücrelerinin (hematopoez) oluşumu için, VEGF ve reseptörlerinin iletişimi gerekmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar normal hematopoezin yanı sıra hemopoetik neoplazilerde de VEGF ve VEGF reseptörlerinin koekspresyonu gösterilmiştir. VEGF ekspresyonu, bir taraftan lökomogenezde anjiyogenezin rolünü diğer taraftan antianjiogenik tedavi yaklaşımlarının klinikte uygulanabilirliğinin belirlenmesi açısından çok önemlidir.

Yapılan çalışmalarda hematolojik maligniteli hastaların kemik iliklerinde mikrodamar yoğunluğunun arttığı tespit edilmiştir (74-76).

Son 10 yılda anjiogenezisin hematolojik hastalıklarda da önemli olabileceği düşünülmüş, erişkin ve çocukluk akut lösemilerinde, kronik lösemilerde, miyelodisplastik sendromlarda, lenfomalarda, multipl miyelomada neovaskülarizasyonun rolünü değerlendirmeye yönelik çalışmalar yapılmıştır. Hematolojik malignitelerden lenfoma gibi solid tümörlerde anjiogeneziste artış, diğer solid tümörlerdeki patogeneze nedeniyle akla yatkın gelmekte ise de, sıvı hematolojik tümörlerden biri olan akut lösemilerde anjiogenezisin neden artmış olabileceği sorusunu cevaplandırabilmek oldukça zordur. Çünkü kemik iliğini infiltre eden akut lösemi hücreleri solid tümörler gibi “kitle” oluşturmamaktadırlar. Bu yüzden de lösemik hücrelere besin ve oksijenin taşınması veya metabolitlerin bu hücrelerden uzaklaştırılması amacı çok tatmin edici değildir. Fakat akut lösemilerde de anjiogenezisin ve anjiogenik mediyatörlerin artmış olduğu çeşitli çalışmalarla desteklenmiştir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar patogenezin netleşmesi açısından yeterli değildir (74-76) .

Kemik iliği kan akımı artışı kemik iliğindeki anjiogenesis artışı ile birliktedir. Solid tümörlerdeki gibi lösemi patogenezinde de anjiogenezisin önemli olduğu vurgulanmaktadır. Lökosit sayısı yüksek AML hastalarda VEGF artışının prognostik gösterge olduğu, lökosit sayısı yüksek hastalarda remisyon hızı ile negatif korelasyon olduğu gösterilmiştir (77,78).

Lenfemopoetik tümörlerde artmış anjiogenezisin, hematolojik hücrelerden VEGF, bFGF salınımına ve üretimine bağlı olduğu yorumu yapılmaktadır. Bu hücreler; CD34 hücre, monosit, T-cell, polimorfonükleer lökosit, trombosit ve megakaryositlerdir. Yüksek trombosit sayısı ile serum VEGF ve bFGF düzeyi 58 kanser hastasında kıyaslandığında yüksek trombosit veya lökositle bFGF arasında ilişki kurulmamasına rağmen VEGF ile PLT yüksekliği arasında ilişki görülmüştür (79).

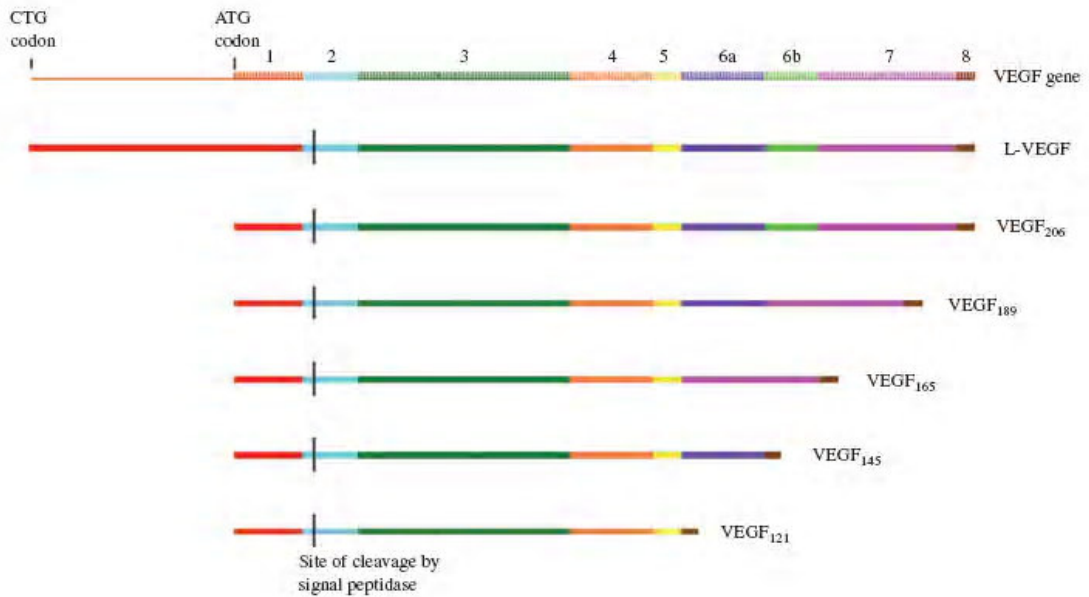
Erişkin 20 AML hastası ve 20 kontrol hastasında endotelial hücre göstergeleri (ULEX-E ve VWF) ile yapılan çalışmalarda anjiogenezisin AML patogenezinde rol oynadığı, anjiogenezis inhibisyonunun AML tedavisinde yeni strateji olması gerektiği vurgulanmıştır. Farklı bir çalışmada ise 62 AML hastası normal kontrol hastaları ile karşılaştırıldığında; ‘mikrodamar dansitesi’ ("microvascular density" (MVD))yüksek

bulunmuştur. İndüksiyon tedavisinin 16. gününde MVD'nin %60 azalmış olduğu, tam remisyonda ise MVD'nin kontrole benzer oranda olduğu görülmüştür. Ayrıca hastaların %75'inde MVD'nin kontrol hastalarının iki üç katı yüksek olduğu görülmüş, MVD'nin AML hastalarının klinik izlemlerinde kullanılabileceği belirtilmiştir (79).

2.14.VASKÜLER ENDOTEL BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF), AİLENİN ÜYELERİ, YAPISI VE SENTEZİ

Trombosit kaynaklı büyüme faktörleri süper ailesinin üyesi olan Vasküler Endotel Büyüme Faktörü ailesi, endotel hücreleri için özgüdür ve önemli etkileri vardır. Vücutta hem fizyolojik olaylarda, hem de tümör büyümesi ve yayılmasını da içeren patolojik bir çok hastalığın etiyolojisinde yer alır. Bu yüzden 1980'lerde keşfedildiğinden günümüze kadar gittikçe artan bir ilgiyle araştırılmaktadır (80).

VEGF ailesinin yedi üyesi vardır: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F, VEGF-G ve Plasenta büyüme faktörü. Hepside VEGF homolog durumda 8 adet sistein rezidülerinin ortak yapısını taşır. VEGF-A Human-VEGF olarak da isimlendirilir. Hatta bazı makalelerde VEGF olarak da adlandırılmaktadır. VEGF-A geni kromozom 6p21.3'te lokalize olmaktadır. Kodlayıcı bölge ~14 kb'lık bir alan kaplamaktadır ve 8 exon'dan oluşmaktadır. Tek bir pre-mRNA'nın alternatif splicing'i (birleştirilmesi) çok sayıda farklı VEGF türünü oluşturur (81-83).



Şekil 2.1. VEGF geni exon ve intronları

VEGF-B, 167 amino asitli bir proteindir ve vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü-1'e bağlanarak monositlerin aktivasyonu ve farklılaşmasında rol alır. Ayrıca VEGF-B vaskülogenesiste ve endotel hücrelerdeki invaziv enzimlerin aktivasyonlarını sağlayabilir. VEGF-C, 388 amino asitten oluşur ve lenfanjiogenezde rol oynar. VEGF-D, 334 amino asitten oluşur ve VEGF-C gibi lenfanjiogenezde rol alır ve bu proteinin VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanabildiği ve in vivo angiogenezisi uyarabildiği gösterilmiştir. VEGF-E'nin amino asit dizilimi ise VEGF-A ile %25 oranında aynıdır. Endotel hücrelerinin proliferasyonunu sağlar ve kan damarlarının geçirgenliğini artırır (78,80).

VEGF vücutta birçok farklı hücrede sentezlenir: ovaryum follikülleri, korpus luteum, akciğer alveolar hücreleri, renal glomerül visseral epitel hücreleri, böbrek proksimal tübül hücreleri, adrenal korteksin tüm hücreleri, Leydig hücreleri, aktive makrofajlar, arterioller çevreleyen fibroblastlar, bronşiyal ve koroid pleksus epitel hücreleri, hepatositler gibi (80).

VEGF mRNA sentezi trombosit kaynaklı büyüme faktörü-BB, keratinosit büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü, tümör nekrozis faktör- α , transforming büyüme faktörü- β 1 ve interlökin- β 1 gibi çeşitli faktörler tarafından başlatılır. Ama bunların arasında hipoksi belki de, VEGF ve reseptörlerinin yapımını indükleyen en etkili uyaranlardan biridir (80).

VEGF ve iki transmembran tirozin kinaz reseptörü VEGFR1 ve VEGFR2 omurgalılarda iki temel prosesin düzenlenmesini sağlar: bunlar yeni damar oluşumunun sağlanması (anjioenez) ve kan hücrelerinin yapımı (hematopoez). Hematopoietik kök hücreler bütün kan hücrelerini oluşturma yeteneğindedir ve genellikle kan damarlarının formasyonunda içeren anahtar hücreler olan endotel hücrelerde kümeler halinde bulunur. VEGF-duyarlı hücrelerin yakınlığına rağmen hematopoez yetişkin Kİ'de neoanjioenezden bağımsız meydana gelir, bu durum VEGF'ün iki sürecin farklı mekanizmalar tarafından düzenlendiğini düşündürmektedir (84).

2.15.VEGF EKSPRESYONU

Pek çok sitokin ve büyüme faktörü, VEGF mRNA'sını upregüle etmekte ya da VEGF salgısını indüklemektedir. Bunlar arasında PDGF, TNF-alfa, TGF-beta, FGF-4, Keratinosit büyüme faktörü (KGF/FGF-7), Epidermal büyüme faktörü (EGF), IL-1alfa, IL-1beta, IL-6 ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1) bulunmaktadır. Bunların çoğu direkt bir

angiogenik etkiden yoksundur ancak VEGF ve bFGF üzerinde angiogenik aktivite sergilerler. Koagülasyon faktörlerinden factor VII/VIIa'nın bir reseptörü olan doku faktörünün sitoplazmik kuyruğu da VEGF üretimini regüle eder ve yara iyileşme yerlerinde önem taşıyabilir.

Hipoksi, VEGF mRNA düzeylerinde hızlı ve güçlü bir artışı indüklemektedir. Bu durum özellikle, tümörlerin nekrotik alanları etrafında daha belirgin bir şekilde görülmektedir. Ancak VEGF ailesinin diğer üyeleri ve bFGF hipoksi tarafından indüklenmemektedir. Bu nedenle VEGF, hipoksi ile indüklenmiş neovaskularizasyonun en önemli mediatörüdür. Hipoksik hücrelerden salgılanan adenosin, adenosin A2 reseptörlerine bağlanır ve c-AMP bağımlı protein kinaz (PKA) yolağı üzerinde VEGF'yi upregüle eder (85) .

2.16.VEGFA

VEGFA fizyolojik ve patofizyolojik anjiogenezisin temel mediatörüdür. VEGFA ve VEGFR1'e bağlanarak monositlerin aktivasyonu ve farklılaşmasında rol alır. Aynı zamanda vasküler geçirgenlik (permeability) faktör olarak da bilinir ve kültüre edilmiş düz kas hücrelerinde üretilir. Yapısal olarak VEGFA dimerin her kutbunda reseptör bağlayan bölgesi olan bir antiparalel dimerdir. İnsan VEGF'sinin bugüne dek 6 isoformu tanımlanmıştır. Bu isoformların uzunluğu 121 ile 206 amino asidik rezidüler arasında değişmektedir. Bu izoformlar 121, 145, 165, 189 ve 206 nolu aminoasitlerin değişken şekilde bağlanması sonucu oluşur. VEGFA izoformlarının ayrı biyolojik aktiviteleri vardır ve aynı heparan sülfat proteoglikanları (HSPGS) ve nöropilinler gibi (NRP) 1-5 eksonlar tafafından kodlanan aminoasitler tüm izoformlarda vardır ancak alternatif ayrılmalar 6 ve 7. eksonlarda ortaya çıkabilir (81).

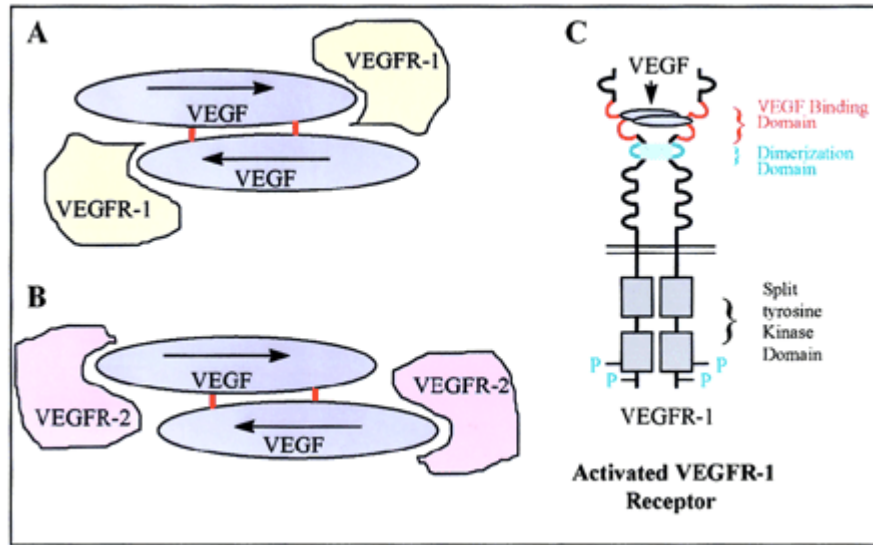
VEGF üreten hücrelerin çoğu tercihen VEGF121, VEGF165 ve VEGF189'u eksprese ediyor gibi görünmektedir. VEGF183'ün de geniş bir doku dağılımı vardır. Bu isoform, daha önceleri VEGF183 ile karıştırıldığı için keşfedilmesi gecikmiştir. Aksine, VEGF145 ve VEGF206 nisbeten daha seyrek bulunurlar ve görünürde sadece plasental kökenli hücrelere sınırlı bir şekilde bulunurlar.

2.17.VEGF RESEPTÖRLERİ

VEGF sinyal iletimindeki ana reseptörler reseptör kinaz (RTKs) ailesinin PDGF reseptör alt ailesindendir ve VEGFR1, VEGF2, VEGFR3 olarak adlandırılır, bundan başka NRP1, NRP2 ve HSPGs gibi VEGF koreseptörleri bulunur. VEGF reseptörlerinin

1 den fazla oluşu VEGF'e cevapta katkı sağlar ve böylece dengeli bir sinyal iletimi sağlanır (81).

VEGF reseptörleri neredeyse sadece endotelial hücrelerde ekspresse olurlar. Üç tip VEGF reseptörü tayin edilmiştir. Fms-benzeri tirozin kinaz (Flt-1=VEGFR-1) ve fetal karaciğer kinaz 1 (flk-1/KDR=VEGFR-2) reseptörlerin VEGF' ne afiniteleri yüksektir. Bu reseptörlerin vaskülogenezis ve fizyolojik angienez için önemli düzenleyici sistemler oldukları gösterilmiştir. Flk-1/KDR' nin tümör anjiogenezinde daha önemli olduğuna inanılmaktadır. Son zamanlarda VEGFR-3 (Flt-4) VEGF-C için bir reseptör olduğu ve lenfanjiogenez ile daha yakın ilişkide olduğu bildirilmiştir. Onkogenlerin de anjiogenez oluşumunda önemli rolleri olduğu gösterilmiştir. Örneğin P53 ve Bcl-2 anjiogenez stimülatörleri ve inhibitörleri arasındaki dengeyi düzenleyerek anjiogenez etkilerler (76-78).



Şekil 2.2. VEGF ve tirozin kinaz reseptörleri ile ilişkisi

2.17.1. VEGFR2 (KDR, Flk1)

VEGFR-2 (kinaz-insert-domaini-içeren reseptör; KDR olarak da bilinmektedir) 200 – 230 kDa'luk yüksek affiniteli bir VEGF reseptörüdür. Tüm endotelial hücre cevaplarının hemen hepsini ileten bir glikoproteindir. VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve VEGF-F nin tüm izoformlarına bağlanır. İnsanlarda, tirozin kinaz reseptörleri için yapılan endotelial cDNA taramaları sırasında tanımlanan bu reseptör, daha önceden keşfedilmiş olan fare fetal karaciğer kinazı-I (flk-1) ile %85 oranında ortak bir sekans kimliğine

sahiptir. VEGFR-2 oluşturmamayan fareler, endotelial ve hematopoietik prekursorlerin gelişiminde çeşitli defektler göstererek embriyoda 9,5.nci günde ölmektedir. Bu tür prekursor hücrelerde olduğu kadar endotel hücrelerinde, başlangıç aşamalarında bulunan hematopoietik kök hücrelerde ve umbilikal kordun stromasında normalde VEGFR-2 reseptörleri eksprese edilmektedir. Ancak inaktif durumda bulunan erişkin damar yapısında VEGFR-2 mRNA'sı down-regüle edilmiş gibi görünmektedir. VEGFR-1 her ne kadar VEGF için daha yüksek bir affiniteye sahip olsa da, VEGFR-2 ligandla bağlandıktan sonra tirozinle çok daha etkin bir şekilde fosforile edilir. Sonrasında intraselüler pek çok yola aktive olur ve endotel hücrelerinde mitogeneze, kemotaksise ve morfolojik değişikliklere yol açar (86).

VEGFR2 esas olarak endotelial hücre yüzeylerinde lokalizedir ve intraselüler sinyal iletimini başlattığı düşünülmektedir ki bu da endotelial hücrelerin integrin bağımlı göçü ile ilişkilidir. Çünkü integrin $\alpha V\beta 3$ ile kompleks oluşturabilir ve endotelial hücre proliferasyonu, migrasyonu ve in vivo anjiogenezi indükleyebilir. Bu durum NRP1 reseptörünün varlığında daha da güçlü olmaktadır. VEGFR2 knockout farelerde aşırı bozulmuş vaskülogenezis ve hematopoez embriyo döneminde gösterilmiş ve buda embriyonun ölümüyle sonuçlanmıştır. Dahası VEGFR2 ekspresyonu diferensiasyon bağlantılı durumda görünür ve doğum sonrası azalır (81)

VEGFR-2 (kinaz-insert-domaini-içeren reseptör; KDR olarak da bilinmektedir) 200 – 230 kDa'luk yüksek affiniteli bir VEGF reseptörüdür. Ayrıca VEGF-C ve VEGF-D için de reseptör görevi yapabilmektedir.

Pluripotent hematopoietik kök hücre (HSCs) üzerine yapılan çalışmalar hematopoietik progenitor hücrelerin (HPCs) CD34 markırı ile karşılaştırılabilir pozitif bir markırın eksikliği çalışmalarda sıkıntı yaratmaktadır. İnsan postnatal hematopoietik dokularında CD34 (+) hücrelerin %0.5 ila 0.1'inde KDR eksprese edilmektedir. Bu yüzden KDR, kök hücrelerin bulunmasında pozitif fonksiyonel bir markırdır (87).

2.17.2.Nöropilinler

NRP'ler VEGF'ün reseptörü olarak tanımlanmıştır ve küçük sitoplazmik domain ve multiple ekstraselüler domain içeren non-tirozin kinaz transmembran reseptör ailesindendir. İki homolog nöropilin NRP1 ve NRP2 benzer protein yapısına sahiptir ancak ekspresyon paternleri ve regülasyonunda ve ligand bağlanma özelliklerinde farklılık görülür. Örneğin; endotelial hücreler hem NRP1 ve hem NRP2 eksprese

ederken lenfatik endotelyal hücreler ağırlıklı olarak NRP2, epidermal hücreler NRP1 eksprese eder. NRP1 intraselüler tirozin kinaz domain içermez ve böylece VEGF sinyalizasyonu için diğer reseptörlerle birlikte hareket etmesi gerekir. VEGFR1 ve VEGFR2 ile birleşir ve bunu da VEGFA₁₆₅, PLGF, VEGFB ve VEGFE'yi bağlayarak yapar fakat VEGFA₁₂₁ i bağlayamaz. NRP2'ler immün yanıtta, nöral gelişimde ve anjiogeneziste aktif mediatörler olarak görev yaparlar. NRP2 gen delesyonu küçük lenfatik damarların oluşumunu bozar, buda NRP2 nin VEGFR3 için koreseptör olarak hareket ettiğini düşündürmektedir (81,88).

NRP-1, collapsin/semaphorin ailesinin belirli üyeleri için nöronal bir reseptör olarak daha önceden karakterize edilmiş olan 120 – 130 kDa ağırlığında bir glikoproteindir. NRP1'in tümör kökenli hücreler ve endotel hücreleri de dahil olmak üzere çok geniş bir doku dağılımı mevcuttur.

NRP1, VEGF165 için bir koreseptör şeklinde etki ederek bu isoformun VEGFR-2'ye bağlanmasını ve bioaktivitesini arttırmaktadır. Kemik iliği stroma hücrelerinde VEGF165 bağlanmasının eritropoetin düzeylerini ve Flt-3 ligandı ekspresyonunu arttırdığı göz önüne alındığında NRP1 sinyalleme hematopoeze de katkıda bulunuyor olabilir (89).

Nöropilinler endotelyal hücreler kadar tümör hücrelerinde de eksprese edilmektedir. Löseminin ilerlemesi ve büyümesinde NRP'nin rolü bilinmemektedir. Lin Lu ve ark. NRP1'in lösemik hücrelerde ekspresyonunu ve etkisini çalışmışlar ve 7 lösemik hücre hattının 6'sında ve 24 AML hastasında NRP1 mRNA ekspresyonunu varlığını göstermiştir. RNA interferans tarafından azaltılmış NRP1 ekspresyonu, AML cell line HEL'de VEGF aracılı migrasyon azalmasına neden olmuştur. Artmış NRP-1 ekspresyonu AML hastalarının kemik iliğinde ve periferik kanındaki blast yüzdesi ile direkt ilişkili bulunmuştur. Bu bilgiler NRP-1 in AML hastalarında daha yüksek seviyede eksprese edildiği ve NRP-1'in VEGF'e cevapta lösemi hücrelerinin kemotaksisini ve proliferasyonunu arttırdığını göstermiştir. NRP-1 fonksiyonlarının inhibisyonunun AML'nin tedavisinde yeni teröpatik strateji sağlayacağı ileri sürülmektedir (90).

2.18.ALL VE AML HASTALARINDA ANJİOGENEZ GENLERİNİN EKSPRESYONU

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ilginç bir büyüme faktörü olup VEGFA ve VEGFR2'in akut lösemilerde kontrol grubuna göre yüksek eksprese edildiğini

gösteren yayınlar mevcuttur. Ancak anjiogenezisin hematolojik malignitelerdeki rolü hala tam olarak aydınlatılamamıştır. VEGF ekspresyon çalışmaları bir taraftan lökomogenezde anjiyogenezin rolünü diğer taraftan antianjiyojenik tedavi yaklaşımlarının klinikte uygulanabilirliğinin belirlenmesi açısından çok önemlidir.

Wang C. ve arkadaşları VEGF/VEGFR'lerinin ekspresyonunu, kemoterapi öncesi ve sonrası akut lösemili 122 hastanın kemik iliği anjiogenezisi ile ekspresyon arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Remisyon hastalarında KDR ve VEGF ün ekspresyonu tedavi edilmemiş yeni tanı ve hastalara göre oldukça düşük bulunmuştur. Ancak remisyon olmayan hastalarda önemsiz bir azalma gösterilmiştir. KDR ve VEGF ekspresyonu relaps hastalarda yeni tanı hastalarla karşılaştırıldığında oldukça artmış olduğu görülmüştür. VEGF ve KDR'nın ekspresyonu yüksek dereceli kemik iliği mikrodamar sayıları, düşük dereceli olanlara göre anlamlı yüksekti ve mikrodamar sayıları ile orantılı bulunmuştur. AML hastalarında VEGF ve KDR ekspresyonu ile kemik iliği blastlarının yüzdesi arasında pozitif bir korelasyon tespit edilmiştir. VEGF ve onun iki spesifik selüler reseptörü hem hematolojik hücrelerde hem de endotelial hücrelerde eksprese edilmektedir. VEGF parakrin faktör olarak kemik iliğinde anjiogenik reaksiyonların düzenlenir. VEGF ve onun reseptörü KDR antianjiogenik ve antilösemik tedavi stratejilerinin ilerlemesine katkı sağlayabilir (91).

VEGF çeşitli myeloid neoplasilerde neoplastik hücrelerde üretilir ve otokrin büyüme regülasyonunda rol oynar. Vales A. ve arkadaşları 28 AML, 14 KML, 3 kronik eozinofilik lösemi, 9 kronik myelomonositik lösemi, 3 mast cell lösemi hastasında VEGFR1/Flt-1, VEGFR2/KDR, Flt-4, NRP-1, NRP-2 ekspresyonunu araştırmışlardır. RT-PCR ile VEGFR mRNA'sının ekspresyonu ve immünokimyasal yöntemle VEGFR proteininin ekspresyonu analiz edildiği çalışmada çoğu hastada lösemik hücrelerin hastalığın tipinden bağımsız NRP-1 mRNA ve NRP-2 mRNA 'sı eksprese ettiği gösterilmiştir. Aksine Flt-1, KDR ve Flt-4 lösemi tipiyle açık bir ilişki olmaksızın değişken şekilde eksprese edilmektedir. Sonuçta myeloid lösemilerde neoplastik hücreler genellikle NRP1 ve NRP2'yi içeren VEGFR eksprese etmektedir (92) .

2.19.ANTİANJİOGENİK TEDAVİLER

Moleküler biyolojideki ilerleme ile onkolojik tedavi yaklaşımlarında devrim gerçekleştirilmiştir. Anjiogenezis inhibitörleri endotel hücrelerine etki ederek tümör progresyonunu engellemektedir. Akut miyeloid lösemide tedavi başarısının

artırılabilmesine yönelik (remisyon indüksiyonu, konsolidasyon, idame) yeni yaklaşımlar getirme çabaları vardır. Bu amaçla yürütülen çalışmaların kapsamında antianjiogenik ajanlarda bildirilmiştir.

AML’de blastik hücrelerde hastaların hemen hemen yarısında VEGF salgınır. Bu faktör endotel hücrelerinin proliferasyonu ve aktivasyonunu uyarır, aktif endotel hücrelerinden lösemik hücre büyümesi ve sağ kalımı için gerekli olan hematopoetik büyüme faktörleri kök hücre faktörü (SCF) ya da granülosit koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) salgınır (93).

Mesters RM ve arkadaşları AML hastalarının kemik iliğinde artmış anjiogenezis ve indüksiyon kemoterapi sonrası tam remisyonu başaran hastalarda kemik iliği mikrodamar dansitesinin normalizasyonunu rapor etmişlerdir (94). Tumor anjiogenezis yeni mikrodamarların oluşumuna liderlik eden bir olaylar zincirini başlatan spesifik aracılardan ekspresyonuna bağlıdır. Bunlar içinde VEGF ve FGF (fibroblast büyüme faktörü) ve anjiopietin solid tümörlerde yani damar oluşumunda önemli rol oynar. Bu sitokinler endotel hücrelerin göçü ve proliferasyonunda görev alır. Son yıllarda bu aracılardan hematolojik malignitelerde rol oynadığı ileri sürülmüştür. İzole edilmiş AML blastlarında VEGF ve VEGFR2 reseptörleri aşırı eksprese edilmektedir. Bu yüzden VEGF/VEGFR2 pathway otokrin ve parakrin yolda lösemik blastların büyümesini ilerletebilir. Böylece yeni damar oluşumu ve anjiogenik araçlar/reseptörler antilösemik ve antianjiogenik tedavi stratejileri için hedef olabilir. İmmunomodülatör bir ilaç olan thalidomide hayvan deneylerinde anjiogenezi baskılamaktadır ve refraktör multipl myelomda önemli aktiviteye sahiptir. Ayrıca thalidomide tedavisi alan 20 AML hastasının 5 inde remisyona girmiş ve mikrodamar dansitesinde azalma görülmüştür. Thalidomidin AML de anti lösemik aktivite kadar anti anjiogenik etki de yaptığı gösterilmiştir. AML ve diğer hematolojik malignansilerde antianjiogenik tedavi stratejilerinin rolünün anlaşılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (94).

2.20.APOPTOZİS

Programlanmış hücre ölümü olarak da adlandırılan apoptozis eski Yunanca’da “yaprak dökümü” anlamına gelir ve ilk olarak 1972 yılında İskoçyalı araştırmacılar Kerr, Wyllie ve Currie tarafından “canlılarda hücre azalmasının özgün bir tipi” olarak tanımlanmıştır.

Apoptozis, biyolojik ömrünü tamamlamış veya genetik yapısı bozulmuş hücrelerin komşu hücrelere zarar vermeden yok edilmesi sağlayan bir mekanizmadır. Apoptosis

genetik ve biyokimyasal olarak kontrol edilen programlanmış hücre ölümüdür. Apoptozis özellikle embriyonik dönemde bazı dokuların farklılaşmasında, bazı dokuların ise involüsyona gitmesinde önemli rol oynar. İnsanda embriyonik dönemde santral sinir sisteminin maturasyonu sırasında uygun sinaptik ağı oluşturamayan nöronlar apoptozisle ortadan kaldırılır. Apoptozise embriyonik dönemde parmaklar arasındaki perdenin kaldırılması ve damak füzyonu sonrası kalıntı hücrelerin ortadan kaldırılması da örnek teşkil etmektedir (95)

Yetişkin dönemde bazı dokularda yaşam boyu apoptozis yoğun bir şekilde gerçekleşir. Örneğin uterusda menstruasyon sırasında endometriyum hücrelerinde apoptozis gerçekleşir ve bu hücreler menstrüel kanama ile uzaklaştırılır. İnce bağırsaklarda kriptaların tabanlarındaki hücreler uç kısımlara göçerler ve sonunda apoptozisle ölümler bağırsak lümenine dökülürler. Aynı şekilde derinin stratum korneum tabakası apoptozisle ölen hücrelerin oluşturduğu bir tabakadır.

Apoptozis immün sistem için hayati öneme sahiptir. Lenfositlerin maturasyonu sırasında defektif veya oto-reaktif lenfositler apoptozisle ölümler. Aynı şekilde timik involüsyonda da apoptozis rol oynar. Ayrıca apoptozis dokulardaki hücre sayısını sabit tutmakta kritik öneme sahiptir Apoptotik sinyali alan hücrede genetik olarak kodlanmış olan apoptotik program çalışmaya başlar ve bir seri kontrollü biyokimyasal reaksiyonlarla hücre ölümü gerçekleşir (96-98).

2.21.APOPTOZİS İNHİBE EDİCİ PROTEİN AİLESİ (İAP)

Bcl-2 ve İAP apoptozisin düzenlenmesinden sorumlu başlıca iki gen ailesidir. İAP'ler ilk olarak Baculovirüs genomunda gösterilmiştir. Virüsle enfekte hücrenin konakçı immün sistemi tarafından indüklenen apoptozisini inhibe ederek virüsü korur. Bu genlerin ileri organizmalara hatta insanlara da evrimsel olarak aktarılması apoptozisin hücresel kontrolünde kritik öneme sahip olduklarının kanıtıdır.

Bugüne kadar 8 farklı IAP üyesi tanımlanmıştır. NAIP (NLR ailesi, apoptozis inhibitör protein), XIAP (X-linked apoptozis inhibitörü), c-IAP1, c-IAP2, livin, ILP2, BRUCE ve survivin. Bu proteinlerin ortak moleküler yapıları vardır. Amino-terminallerinde 70-80 aminoasitten oluşan Baculovirus IAP repeat (BIR) adı verilen dizilerden 1 ile 3 adet bulunur. BIR domainleri anti-apoptotik etki için gereklidir. Bazılarının karboksi terminallerinde çinko bağlayabilen RING domainleri vardır. Anti-apoptotik etki mekanizmaları değişkendir (97,98,99).

2.21.1.Survivin

Survivin IAP ailesinin en küçük üyesidir ve ‘baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5’ olarakta adlandırılan geni BIRC5 geni tarafından sentezlenen bir proteindir 142 amino asitten oluşur. Amino terminalinde yalnızca bir BIR domaini vardır ve farklı olarak karboksi terminalinde çinko bağlayabilen RING domaini yoktur. Onkogenez ile ilişkisi gösterilmiş olan tek IAP’dır. BIRC5 gen lokusu 17q25’te lokalizedir 4 eksondan ve 3 introndan oluşur. Son dönemde alternatif splicing ile oluşan, birbirinden farklı fonksiyonları olan 4 farklı izoformu tanımlanmıştır: Survivin, survivin 2B, survivin 3B ve survivin-delta-ex-3. Survivin-2B’nin anti-apoptotik etkisi yoktur.

Survivin bifonksiyonel bir proteindir. Anti-apoptotik etkilerine ek olarak hem normal hücrelerde hem de malign hücrelerde mitozu düzenler. Mitozun sadece G/2 fazında eksprese olurlar. Survivin proteini mitoz boyunca tübülün ile etkileşimde bulunarak mitotik iğde lokalize olur ve böylece mitozun düzenlenmesine katkıda bulunur (97).

Örneğin Survivin knock-out fare embriyolarında mikrotübül ağında ciddi defektler, multinükleer hücre formasyonları ve %100 embriyonik ölüm bildirilmiştir. Survivin asıl etkin olduğu dönem metafazdır. Bu dönemde temel olarak mitotik mikrotübüllerde ve sentrozomlarda lokalizedir. Ancak, anafazda ağ iplikçiklerinde, mitozun geç evrelerinde mitotik midbody’lerde de bulunur. Anti-Survivin antikorlarının mikroyeksiyonu ağ iplikçiği formasyonunda kritik defektlere, kardeş kromatinlerin erken ayrışmasına yani anormal metafaz progresyonuna yol açar. Sentrozomlar ve mitotik midbody’lerdeki survivine yönelik antikor mikroyeksiyonları metafaz durması ve sıklıkla apoptozisle sonlanır (98).

Survivin proteini kaspaz aktivasyonuna engel olur, böylece programlanmış hücre ölümü ve apoptozisin negatif düzenlenmesinde rol oynar. Survivin indüksiyonun bozulması tumor büyümesinde azalma ve apoptoziste artışa neden olur. Survivin onko-fetal proteinlerdendir. Embriyonik yaşamda ve birçok tümörde yüksek düzeyde eksprese olmasına rağmen maturasyonunu tamamlamış dokularda eksprese olmaz. Bu yüzden survivin kanser tedavilerinde ideal bir hedeftir. Son zamanlarda timus, CD34 (+) hemopoetik kök hücrelerde, endotelial hücrelerde, kolonik mukozada, uterin serviksin epitelial hücrelerinde Survivin ekspresyonu olduğu gösterilmiştir. Survivin

regülasyonunun moleküler mekanizması bu gün hala anlaşılmış değildir, ancak p53 proteinine bağlı olduğu düşünülmektedir. (98).

2.22.KANTİTATİF REAL TIME PZR YÖNTEMİ (QRT-PZR) VE MRH TAKİBİNDE KULLANIMI

1988 yılında “thermus aquaticus” bakterisinden saflaştırılan, ısıya dayanıklı polimerazın (taq polimeraz) kullanımı ile birlikte polimeraz zincir reaksiyonları için (PZR) otomatize termal siklus cihazları geliştirilmeye başlanmıştır. Higuchi ve arkadaşlarının 1992 yılında floresan ışımaya tekniğini kullanarak Real-time PZR’ı geliştirmişlerdir. Bu gelişim sayesinde artık PZR reaksiyonunu boyunca oluşan ürün miktarını ekranda izlemek ve gen kopya ürünlerinin düzeylerini sayısal değerlere dönüştürerek ölçmek mümkün olmuştur (100,101).

QRT-PZR konvansiyonel PZR ve prob hibridizasyon yöntemlerinin birlikte kullanıldığı nükleik asit kantitasyon tekniğidir. Spesifik bir floresan işaretli prob DNA/cDNA hedef ile bağlanarak PZR reaksiyon sisteminin içine eklenir. PZR amplifikasyonunun ekstensiyon fazı boyunca spesifik floresan işaretli prob taq polimerazın 5’-3’ ekzonükleaz aktivitesi ile kesilir. Buda tespit edilebilen bir floresan miktarı üretir. Bu reaksiyonda salınan floresan miktarı hedef sekans sayısı ile doğru orantılıdır. Bu sebeple başlangıç hedef DNA/cDNA kopya sayısının doğru ve mutlak sayısal değerlendirilmesi kapalı bir tüp tekniği sistemi ile yapılabilir. Bu teknik konvansiyonel PZR da gerekli olan PZR sonrası işlemlere gerek duymaz ve geleneksel PZR da kaçınılmaz olan kontaminasyon ihtimalini azaltır, dahası bu yöntem amplifikasyon primerlerine yönelik sekanslarda prob hibridizasyonunun kullanımı sayesinde yanlış pozitif veya negatif sonuç ihtimalini azaltmaktadır. QRT-PZR yöntemi yakın çalışmalarda gösterildiği üzere hematolojik malignitelerde MRH’ın ortaya konmasında hassas, spesifik, güvenilir ve uygun bir yöntemdir (102,103).

QRT-PZR günümüzde AML hastalarında PZR temelli ölçmede sıkça kullanılan bir metoddur. RT-PZR nested PZR’a göre daha az sensitiv olmasına rağmen alınan örnekte residüel hastalığı bulmada internal kontrol genlerini içermesiyle yeterince hassastır ve residüel hastalığın miktarına tam olarak karar vermeyi sağlar. QRT-PZR yöntemi AML spesifik genlerin (füzyon gen, anormal eksprese edilen gen) mRNA seviyelerini ölçer. Aranılan genin ekspresyon seviyesi QRT-PZR ile periferik kan ve kemik iliğinde maturasyonun herhangi bir safhasında sabit ve stabil ekspresyon seviyesine sahip bir

genin kontrol gen olarak miktarının ölçülmesi tarafından bulunabilir. ABL, GUS ve $\beta 2$ mikroglobulin gibi genlerin kontrol olarak kullanılabilirliği çalışmalarla gösterilmiştir (42) . MRH takibi lösemiler için çok değerlidir. MRH izlenmesinde QRT-PZR'ın 3 ana hedefi vardır.

1. Tanıda transkripsiyon oranını
2. Lösemik klonların redüksiyon oranını
3. Recurrent (tekrarlayan) klonların erken tespitini yapmak

QRT-PZR'da bunların tespitini yapmak için füzyon gen transkripleri, spesifik gen defektleri, spesifik mutasyonlar ve aberant eksprese edilen genleri kullanır. Aberant eksprese edilen genler dışında çoğu hedef yüksek oranda spesifiktir. Füzyon gen ve mutasyon spesifik yöntemlerle 1/10 000 000 oranında sensitivitelere ulaşılmışken overeksprese genlerde hassasiyet 1/10 000 000'nin altındadır (42,47).

Buna rağmen RT-PZR'ın bazı dezavantajları da vardır. Örneğin; majör tehlikelerinden biri RNA degradasyonu yüzünden yanlış negatif sonuçların elde edilebilmesidir. QRT-PZR ın eksik kaldığı bir diğer unsur değişik laboratuarlarda değerlendirilen füzyon gen veya housekeeping gen oranlarının karşılaştırılamamasıdır. Bu durum PZR değişkenlerindeki (örnek tipi, RNA hazırlama metodu, PZR cihazı, primer prob seçimi) farklılıktan kaynaklanmaktadır. Bu yüzden QRT-PZR yorumu standardizasyon gerektirir ve MRH verilerinin raporlanması uluslararası benzerlik göstermesi çok istenilen bir durumdur (103).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1 Demirbaş Malzemeler

Aletler	Markası
Buzdolabı	Arçelik
Derin Dondurucu (-20°C)	Beko
Derin Dondurucu (-80°C)	Sanyo
Distile Su cihazı	Millipore
Mikrodalga fırın	Arçelik
Mikrosantrifüj	Heraus
Otomatik Mikropipetler	Eppendorf/Gilson
Nanodrop	Thermo
Real Time PCR cihazı	Corbett
Soğutmalı Santrifüj	Sigma
Thermocycler	Corbett
Vorteks	MS1
Minishaker	IKA®
Heat plate	HLC

3.1.2 Sarf Malzemeler ve Kimyasal Maddeler

Trizol

Etanol

Kloroform

Buzluk

Eppendorf Tüpler (0.2,0.5,1.5,2 µl'lik)

Distile su

cDNA sentez kiti

Pastor pipeti

Amonyum klorid

Potasyum bikarbonat

EDTA

3.2.KAN VE KEMİK İLİĞİ ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı'na öykü, fizik muayene, sitomorfolojik, immunohistokimyasal ve immün-fenotipik çalışmalar ve biyokimyasal parameterler (BUN, Kreatinin, LDH, ürik asit) ile ALL ve AML tanısı alan hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. Erciyes Üniversitesi'nde 15 AML, 10 ALL hastasından toplam 92 PK örneği, Gaziantep Üniversitesi'nde 13 AML ve 4 ALL hastasından toplam 42 kemik iliği örneği toplandı. Kontrol grubu olarak 25 sağlıklı bireyden P.K. örneği toplandı. Hastalardan tanı anında, ilk remisyonda ve sonrasında ortalama 2-3 ay ara ile 10 ml periferik kan örneği veya 3 ml kemik iliği örneği K₃EDTA'lı tüpe alındı.

3.3.GEN EKSPRESYONU ÇALIŞMA YÖNTEMİ

Toplanan Kİ ve PK örneklerinden ilk olarak RNA izole edildi.

3.3.1.RNA İzolasyonu

1. Hastadan alınan 3 cc EDTA'lı kemik iliği veya 10 cc EDTA'lı periferik kan örnekleri falkon tüp içerisine alındıktan sonra üzerine kemik iliği veya kan miktarının 3 katı kadar Red Cell Lysis (155mM Amonyum Klorid, 10mM potasyum Bikarbonat, 1mM EDTA) solüsyonu eklendi.
2. +4°C de 20 dk bekledikten sonra 2000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.

3. Süpernatant atıldı. Pellet (lökositler) üzerine 3 cc red cell lizis solüsyonu eklenerek 10 dk +4°C’de bekletildi.
4. 2000 rpm’de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant atıldı.
5. Pellet üzerine 1ml trizol eklenerek 2ml’lik enjektörle 8-10 kez resüspanse edilir ve 2ml’lik ependorf tüpe alındı.
6. Tüpler 37°C’de 10 dk bekletildi.
7. Üzerine 200µl kloroform eklenerek vortekslendi.
8. +8C sıcaklıkta 10600 rpm’de 10dk santrifüj edildi.
9. Aköz faz başka tüpe alınıp üzerine 500 µl soğuk absolüt etanol eklendi.
10. 30 dk -20°C de bekletildikten sonra 10600 rpm’de 10dk santrifüj edildi.
11. Süpernatant atıldıktan sonra pellet üzerine 10000 µl %75’lik etanol eklendi.
12. 9200 rpm’de 5dk santrifüj edildi. Süpernatant atılıp pellet 2-5 dk 37°C’de kurutuldu. 40 µl distile su ile çözüldü.
13. RNA’lar nanodropta ölçüldü.
14. RNA’ların konsantrasyonu yaklaşık 1000ng olacak şekilde dilüe edildi, çalışılncaya kadar -80°C derin dondurucuya kaldırıldı.

3.3.2.cDNA Sentezi

Her bir RNA örneğinden aşağıdaki basamaklar izlenerek cDNA izolasyonu yapıldı.

A: Anneling (yapışma) basamağı:

1. Her bir RNA örneği için 0,2’lik PCR tüplerine aşağıdaki şekilde reaksiyon miksi hazırlandı.

Miks içeriği	1 reaksiyon için
RNA örneği (1µg)	Xµl
RT primer	1µl
RNase/DNase free water	Yµl
Final volüm	10µl

2. Hazırlanan reaksiyon miksi 65°C de 5 dk inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonrası tüpler hemen buz üzerine alınıp hızlı şekilde soğuması sağlandı.

B: Extension (uzama) basamağı:

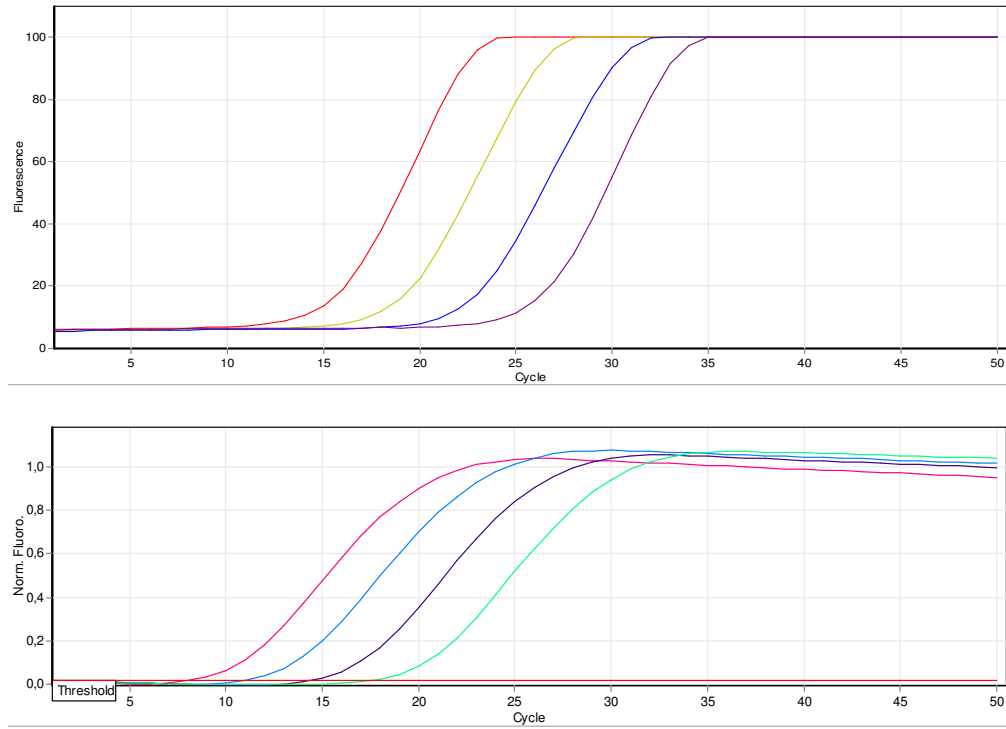
1. Her bir RT reaksiyonu için 10µl aşağıdaki protokole uygun bir miks hazırlandı.

Miks içeriği	1 reaksiyon için
qScript 10x buffer	2 µl
dNTP miks (10mM)	1 µl
DTT 100mM	2 µl
RNase/DNase free water	4 µl
qScript enzim	1 µl
Final volüm	10 µl

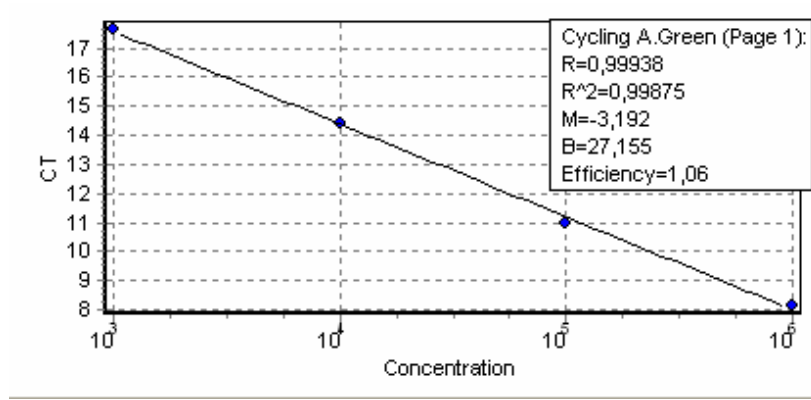
2. Buz üzerindeki örneklerin her birine 10 µl bu miksten eklendi.
3. Tüpler hafifce vortekslendikten sonra 55°C’de 20 dk inkübe edildi. Elde edilen cDNA’lar 1/10 oranında dilüe edildi (20 µl cDNA+ 180 µl distile su). Daha sonra cDNA’lar -20°C derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.3.3.Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Elde edilen hasta ve kontrol cDNA’ları, WT1, VEGFA, KDR, NRP, Survivin ve housekeeping gen Abl mRNA dizisine spesifik FAM ile işaretli primer/problar (Tablo 3.1) ile 20 µl reaksiyon hacminde 0,2ml PCR tüplerinin içinde amplifiye edildi. Amplifikasyon için Primerdesign marka primer/prob kiti kullanıldı. Genlerin mRNA kopya sayılarının belirlenmesinde her bir gen için 100000, 10000 ve 1000 kopya içeren pozitif kontroller (standartlar) kullanıldı (Şekil 3.1). Amplifikasyonlar Real-Time RT-PCR cihazı olan Corbett cihazında gerçekleştirildi. Çalışmaya alınan bütün örnekler standartlar ile birlikte ve en az 2 kez çalışıldı.



Şekil 3.1. WT1 geni standartlarının Real Time PCR görüntüsü



Sekil 3.2. WT1 geni standartlarının ekspresyon verimliliği

3.3.3.1.Real-Time PZR Reaksiyon Protokolü

Aşağıdaki tabloya göre her bir gen için ayrı ayrı primer/prob kullanılmak üzere qPZR miski hazırlandı.

Malzeme	1 reaksiyon
Primer prob miks	1 µl
2X qPZR mastermiks	10 µl
Distile su	4 µl
Son volüm	15 µl

Hazırlanan miks soğuk blok üzerinde PZR tüplerine dağıtıldıktan sonra her bir tüpe 5 µl cDNA örneği ilave edildi ve aşağıdaki programa göre Corbett Real-Time PCR cihazında Real Time PZR gerçekleştirildi.

1 siklus	Süre	Sıcaklık
Enzim aktivasyonu	10 dk	95°C
50 siklus		
Denatürasyon	15sn	95°C
Veri toplama	30sn	50°C
Extension (uzama)	15sn	72°C

Sonuçlar Corbett Software ile kantitasyon analiz yapılarak değerlendirildi.

3.4. İSTATİSTİK ANALİZLER

İstatistiksel analiz, SPSS 16.0 (Statistical Package for the Social Sciences) istatistik programı kullanılarak yapıldı. 0.05'in altındaki p değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Hasta ve kontrollerden toplanan kemik iliği ve periferik kan örneklerinde WT1, BIRC5, VEGFA, KDR ve NRP1 gen ekspresyonunun istatistiksel değerlendirilmesinde Kruskal-Wallis tek yönlü varyans analizi kullanıldı. Hastaların 1. ve 2. Kİ veya PK örnekleri arasındaki farklılığın tespitinde Wilcoxon signed rank testi , 1, 2, 3, ve 1, 2, 3, 4. Kİ veya PK örnekleri arasındaki farklılığın tespitinde ise Friedman testi kullanıldı. Her bir gen ekspresyonu için cut off değerleri ROC (receiver-operating characteristic) curve analiz ile belirlendi. Cut-off" nokta değerleri, spesifisite ve sensitivite yüzdeleri, pozitif ve negatif likelihood oranları (LR), %95 güven aralıkları (confidence interval = CI) ve pozitif ve negatif prediktif değerleri hesaplandı.

BIRC5, VEGFA, KDR ve NRP1 gen ekspresyonu ile WT1 ekspresyonu arasındaki ilişkin tespiti için korelasyon analizi yapıldı.

Tablo 3.1. Ekspresyon çalışılan genlerin primer dizileri

Gen adı	GenBank no	Dizi
ABL	(NM_005157)	F:5' GCCGAGTTGGTTCATCATCAT 3' R:5' CATCTCCCACTTGTCGTAGTTG 3' Prob Sekansı 5' aCGGGCTCATCACCACGCTCCATTATCCcgt 3'
WT1	(NM_024426)	F: 5' ATAACCACACAACGCCCATC 3' R:5' CACATCCTGAATGCCTCTGAA 3' Prob Sekansı 5' aCGGAGCCCAATACAGAATACACACGCACGactccgt 3'
BIRC5	(NM_001168)	F: 5' AAACCTAAGCACAAAGCCATTCTAAG 3' R: 5' CACTCTATTCTGTCTCCTCATCCA 3' Prob Sekansı 5' CTGAAGTTCACCCCGTTTCCCAATGtataacttcag 3'
VEGFA	(NM_001025366)	F: 5' CCAGGAAAGACTGATACAGAACG 3' R : 5' GGTTTCTGGATTAAGGACTGTTC 3' Prob Sekansı 5' CCACGCTGCCGCCACCACACCA 3'
KDR	(NM_002253)	F : 5' AGGGAGTCTGTGGCATCTG 3' R : 5' GTGTCTGTGTCATCGGAGTG 3' Prob Sekansı 5' TGGACTGGTAGCCGCTTGTCTGGTTTGAGgtcca 3'
NRP	(NM_003873)	F : 5' GAGGAAGTTCAAGATCGGGTAC 3' R : 5' CTCAGGTGTATCATAGTTGTTGTTG 3' Prob Sekansı 5' cATCATCTTCCAGTCCGAGCCGTTGTTGCagatgatg 3'

4. BULGULAR

Bu çalışmaya, akut lösemi tanısı konmuş 42 hasta ve kontrol grubu olarak 24 sağlıklı birey dahil edildi. Akut lösemili hastalar öncelikle hücre türüne göre myeloid ve lenfoid olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Sonrasında alınan örneklerinin kemik iliği ve periferik kan kaynaklı olup olmamasına göre tekrar alt gruplar oluşturuldu. Toplam 14 ALL hastasından 4'nden Kİ, 10'undan PK rneėi toplandı. 28 AML hastasından ise 13'nden Kİ, 15'inden PK rneėi toplandı. Toplanan 92 PK, 42 Kİ rneėinden WT1, VEGF, KDR, NRP1 ve BIRC5 gen ekspresyonlarının MRH tespitinde kullanılabilirliği araştırıldı. Kontrol grubundan alınan 24 PK rneėinde yine bu 5 genin ekspresyon paterni belirlendi.

Tablo 4.1. Çalışmaya alınan hastaların klinik ve genetik özellikleri

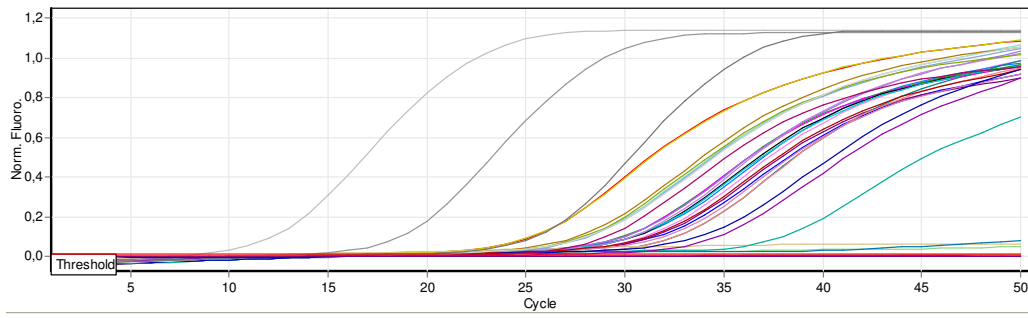
Toplam hasta sayısı	42
AML vaka sayısı	28
PK	15
Kİ	13
ALL vaka sayısı	14
PK	10
Kİ	4
AKİT sayısı	23
Ortalama takip süresi	6-18 ay
Relaps olan hasta sayısı	9
Hastanın son durumu	
Sağ	28
Ölü	14

Anormal Karyotip	46 XY der (6) del (6) (p21) 45, XY, -7 (monozomi 7) 47, XY, +4 (Trizomi 4)
Normal	11
Spesifik Moleküler markır	
t(9;22)	5
t(8;21)	1
t(15;17)	1
İnv16	1

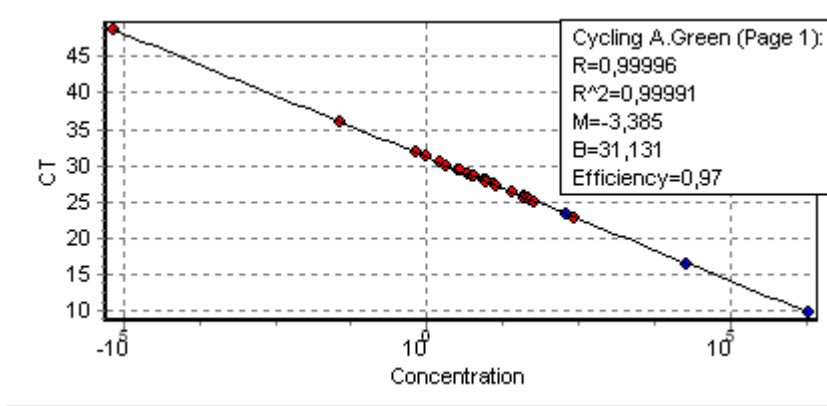
4.1. WT1 GEN EKSPRESYON BULGULARI

Real-time PZR sisteminde kantitasyon metodu ile ekspresyon çalışmalarının pek çoğunda standart eğri kullanımı kabul edilmiş bir ölçüm parametresidir. Corbett Real-Time PZR sisteminde standart eğri, örneklerden alınan floresan ışımların ölçülmeye başladığı sıklusa (y-ekseni) karşı örneğin logaritmik konsantrasyonu (x-ekseni) olarak çizilir. Oluşturulan eğrinin eğimi software tarafından hesaplanır ve bilinmeyen örnek konsantrasyonları bu eğri üzerinden otomatik olarak hesaplanır.

Çalışmamızda ilk olarak tüm örneklerim ABL gen ekspresyonu çalışıldı. Bunun için ABL geni pozitif kontrol örneği belli oranlarda dilüe edilerek standart oluşturuldu ve her bir örnekteki ABL kopya sayısı belirlendi (Şekil 5)



Şekil 4.1. ABL geni ekspresyonu Real Time PCR görüntüsü



Şekil 4.2. ABL geni ekspresyon verimliliği

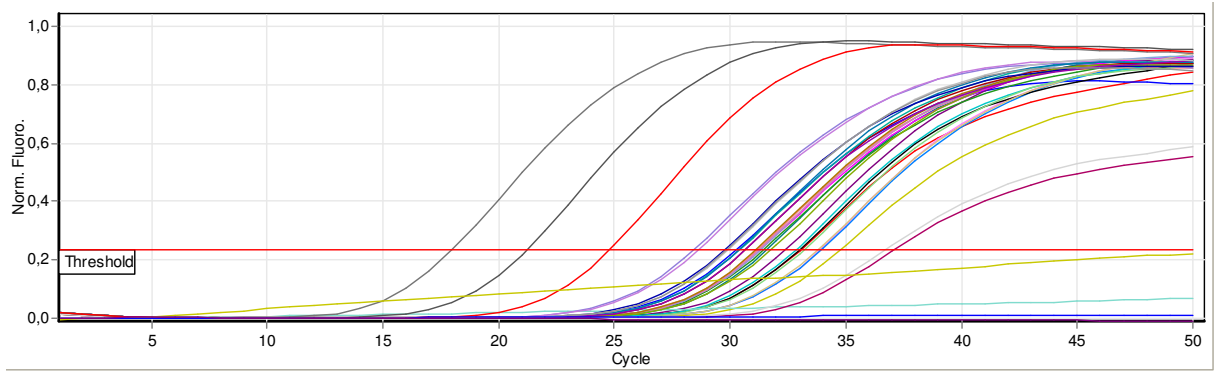
Daha sonra WT1 geni için standartlar oluşturuldu ve her örneğin WT1 mRNA kopya sayısı tespit edildi. WT1 gen ekspresyonu, WT1 kopya sayısının aynı örneğin ABL kopya sayısına bölünmesiyle hesaplandı.

Toplam 42 AML ve ALL hastasının tanı anında alınan kemik iliği/periferik kan örneklerinde WT1 geni mRNA ekspresyon oranlarının istatistiksel değerlendirilmesinde *nonparametrik Kruskal-Wallis tek yönlü varyans analizi* kullanıldı.

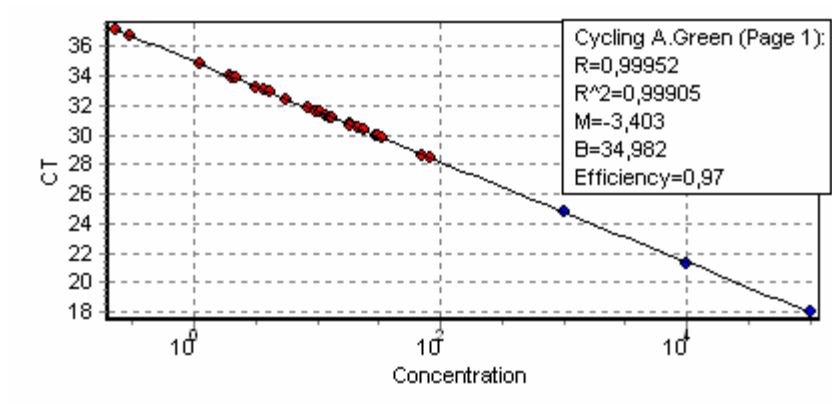
AML hastalarının Kİ örneklerinde WT1 ekspresyonu, ALL hastalarının Kİ örneklerindeki WT1 ekspresyonuna göre anlamlı şekilde yüksek bulundu ($P < 0,05$). Ayrıca istatistiksel olarak AML hastalarının Kİ örneklerinde WT1 ekspresyonu, AML ve ALL hastalarının PK ve kontrol grubu örneklerindeki WT1 ekspresyonuna göre de yüksek bulundu ($P < 0,05$). AML hastalarının tedavi sonrası alınan Kİ örneklerinde tanı anı örneklerine göre WT1 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi.

AML hastalarının PK örneklerinde WT1 ekspresyonu, kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek iken ($P<0,05$), ALL hastalarının PK örneklerine göre anlamlı bir fark göstermedi.

ALL hastaları PK örneklerinde WT1 ekspresyonu ile kontrol grubu WT1 ekspresyonu arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. Ayrıca ALL hastaları PK örneklerinde, AML ve ALL hastalarınıninkine göre de anlamlı bir fark yoktu.



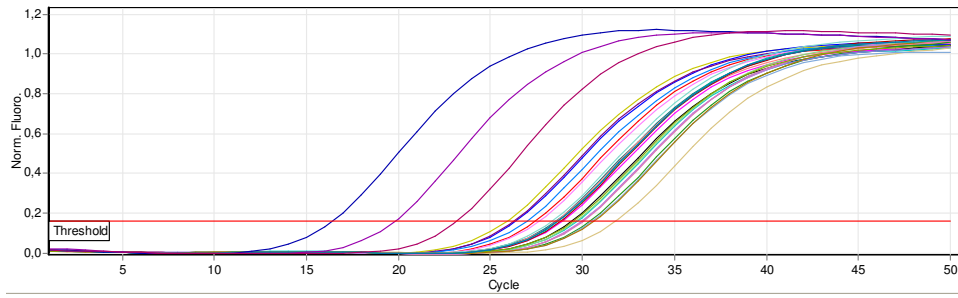
Şekil 4.3. WT1 geni ekspresyonu Real-Time PZR görüntüsü



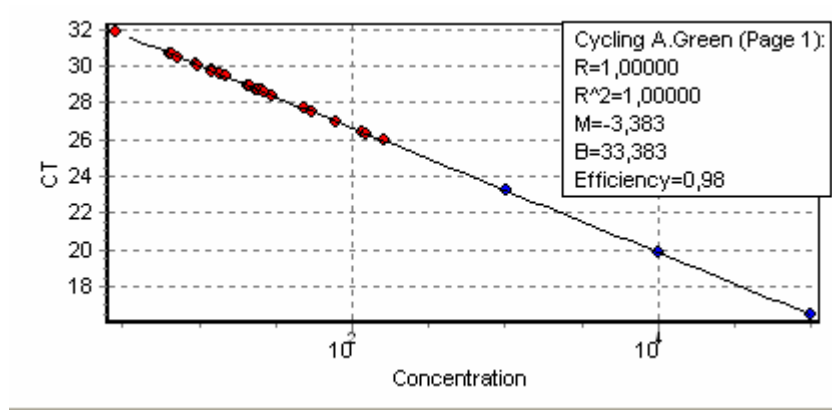
Şekil 4.4. WT1 geni ekspresyon verimliliği

4.2. BIRC5 GEN EKSPRESYON BULGULARI

BIRC5 geni için pozitif kontrol örnekleri belli oranlarda dilüe edilerek standart oluşturuldu. Bu standartlara göre örneklerin BIRC5 geni kopya sayıları belirlendi. Her bir örneğin BIRC5 gen ekspresyonu, BIRC5 kopya sayısının aynı örneğin ABL kopya sayısına bölünmesiyle hesaplandı.



Şekil 4.5. BIRC5 geni ekspresyonu Real-Time PZR görüntüsü



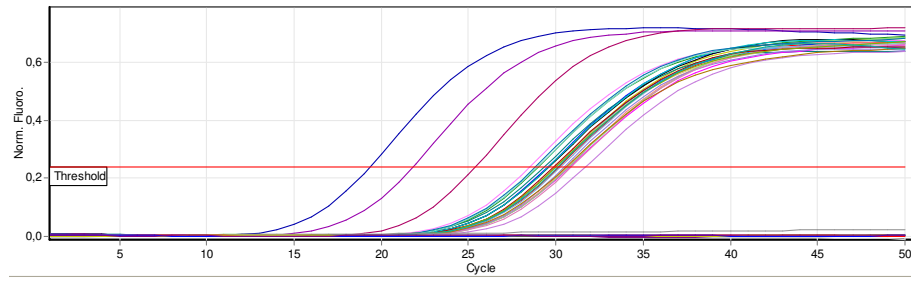
Şekil 4.6. BIRC5 geni ekspresyon verimliliği

BIRC5 geni mRNA ekspresyon oranlarının istatistiksel değerlendirilmesinde *nonparametrik Kruskal-Wallis tek yönlü varyans analizi* kullanıldı.

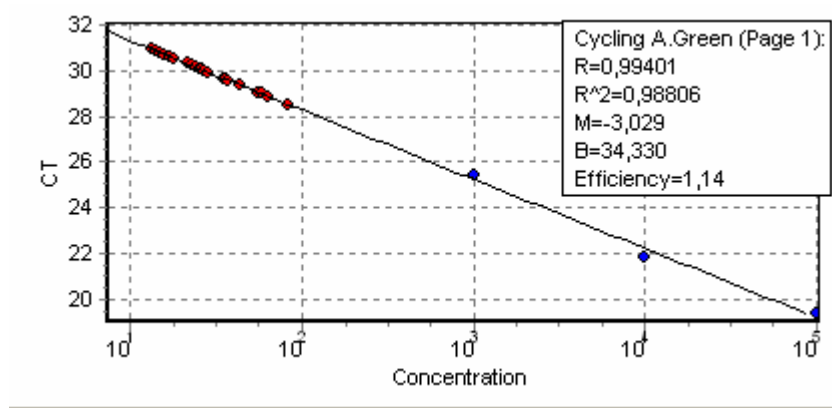
BIRC5 gen ekspresyonu açısından AML hastaları Kİ örnekleri, AML ve ALL hastalarının PK örnekleri ve kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı şekilde yükseldi ($P<0,05$). Ancak AML ve ALL hastalarının Kİ örnekleri ve AML ve ALL hastaları P.K örnekleri arasında BIRC5 gen ekspresyonu açısından anlamlı bir fark gözlenmedi.

4.3. VEGFA GEN EKSPRESYON BULGULARI

VEGFA geni için pozitif kontrol örnekleri belli oranlarda dilüe edilerek standart oluşturuldu. Bu standartlara göre örneklerin VEGFA geni kopya sayıları belirlendi. Her bir örneğin VEGFA gen ekspresyonu, VEGFA kopya sayısının aynı örneğin ABL kopya sayısına bölünmesiyle hesaplandı.



Şekil 4.7. VEGFA geni ekspresyonu Real-Time PZR görüntüsü

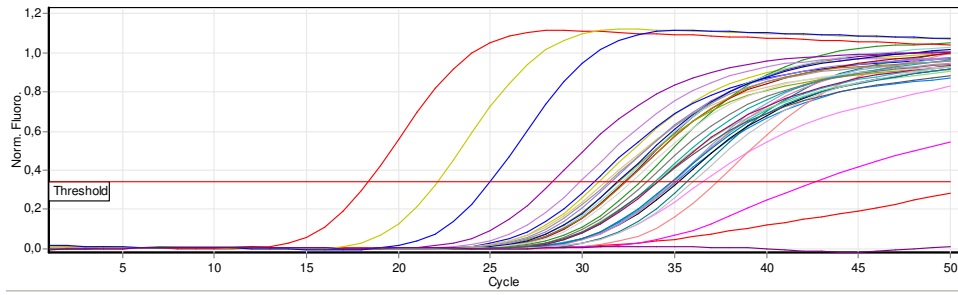


Şekil 4.8. VEGFA geni ekspresyon verimliliği

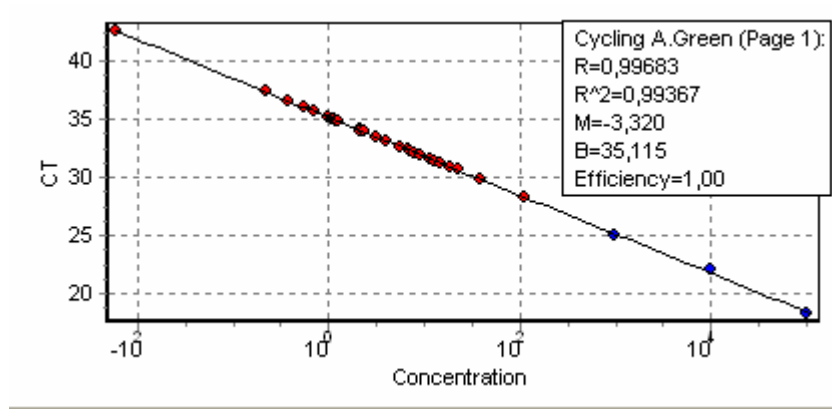
VEGFA geni mRNA ekspresyon oranlarının istatistiksel değerlendirilmesinde *nonparametrik Kruskal-Wallis tek yönlü varyans analizi* kullanıldı. VEGFA gen ekspresyonunda gruplar arasında anlamlı bir fark izlenmedi.

4.4. KDR GEN EKSPRESYON BULGULARI

KDR geni için pozitif kontrol örnekleri belli oranlarda dilüe edilerek standart oluşturuldu. Bu standartlara göre örneklerin KDR geni kopya sayıları belirlendi. Her bir örneğin KDR gen ekspresyonu, KDR kopya sayısının aynı örneğin ABL kopya sayısına bölünmesiyle hesaplandı.



Şekil 4.9. KDR geni ekspresyonu Real-Time PZR görüntüsü

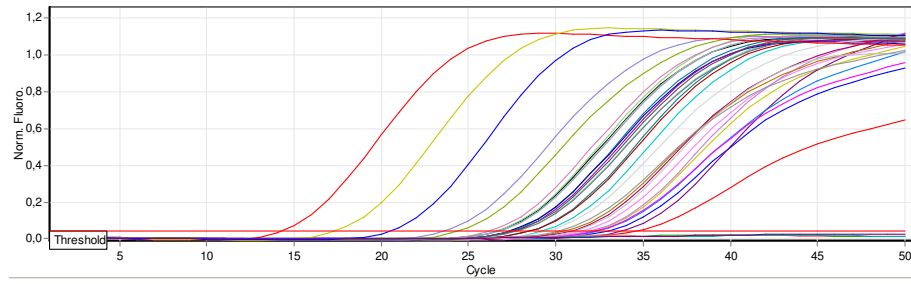


Şekil 4.10. KDR geni ekspresyon verimliliği

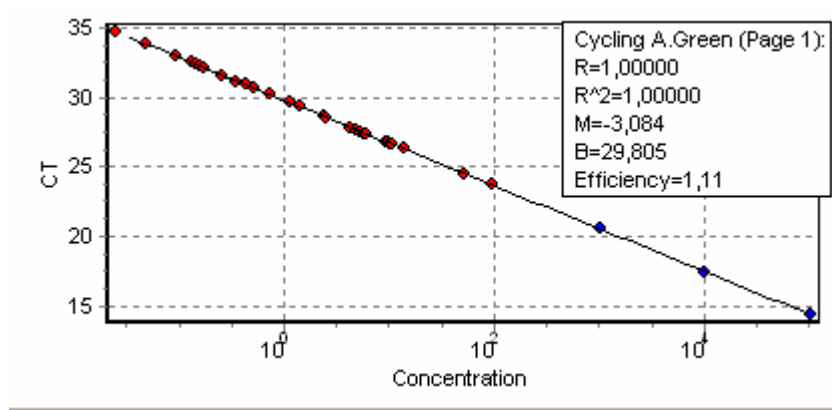
KDR geni mRNA ekspresyon oranlarının istatistiksel değerlendirilmesinde *nonparametrik Kruskal-Wallis tek yönlü varyans analizi* kullanıldı. KDR gen ekspresyonunda gruplar arasında anlamlı bir fark izlenmedi.

4.5. NRP1 GEN EKSPRESYON BULGULARI

NRP1 geni için pozitif kontrol örnekleri belli oranlarda dilüe edilerek standart oluşturuldu. Bu standartlara göre örneklerin NRP1 geni kopya sayıları belirlendi. Her bir örneğin NRP1 gen ekspresyonu, NRP1 kopya sayısının aynı örneğin ABL kopya sayısına bölünmesiyle hesaplandı.



Şekil 4.11. NRP1 geni ekspresyonu Real-Time PZR görüntüsü



Şekil 4.12. NRP1 geni ekspresyon verimliliği

NRP1 geni mRNA ekspresyon oranlarının istatistiksel değerlendirilmesinde *nonparametrik Kruskal-Wallis tek yönlü varyans analizi* kullanıldı. ALL hastalarının PK örnekleriyle kontrol grubu arasında NRP1 ekspresyonundaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu. ($P < 0,05$).

4.6. KONTROL GRUBU ÖRNEKLERİNDE WT1, NRP1, BIRC5, VEGFA VE KDR GEN EKSPRESYON SONUÇLARI

Tablo 4.2. Kontrol grubu PK örneklerinde WT1, VEGF, VEGFR2, NRP1 ve survivin gen ekspresyonları

Kontrol	WT1/ABL	BIRC5/ABL	VEGFA/ABL	KDR/ABL	NRP1/ABL
1	0,134	0,567	0,237	0,340	0,010
2	0,082	0,621	0,105	0,176	0,012
3	0,112	0,669	0,219	0,243	0,006
4	0,080	0,442	0,000	0,348	0,014
5	0,089	0,475	0,822	0,129	0,010
6	0,087	0,448	0,151	0,227	0,000
7	0,024	0,313	0,530	0,048	0,012
8	0,044	0,556	0,356	0,289	0,022
9	0,000	0,149	1,191	0,000	0,021
10	0,000	0,308	0,215	0,000	0,015
11	0,000	0,237	0,593	0,000	0,051
12	0,000	0,333	1,000	0,000	0,028
13	0,000	0,083	0,750	0,000	0,000
14	0,000	0,387	0,484	0,000	0,032
15	0,000	0,518	1,036	0,018	0,036
16	0,000	0,368	1,105	0,000	0,053
17	0,000	0,476	0,857	0,048	0,048
18	0,000	2,000	1,400	0,000	0,000
19	0,000	0,188	0,271	0,000	0,021
20	0,023	0,488	0,674	0,047	0,047
21	0,000	0,500	1,417	0,083	0,083
22	0,059	0,765	1,529	0,118	0,059
23	0,032	0,742	0,774	0,097	0,000
24	0,014	0,343	0,914	0,029	0,014
	median (Min-max)	median (Min-max)	median (Min-max)	median (Min-max)	median (Min-max)
	0,07 (0-0,134)	0,462 (0,83-2)	0,712 (0-1,53)	0,48 (0-035)	0,18 (0-0,83)

4.7.AML VE ALL HASTALARI TANI ANI ÖRNEKLERİNDE WT1, BIRC5, VEGFA, KDR, NRP GEN EKSPRESYON BULGULARI

Tablo 4.3. AML hastaları tanı anı Kİ Örneklerinde WT1, BIRC5, VEGFA, KDR, NRP Gen Ekspresyonları

Hasta Protokol No	Wt1/ ABL	BIRC5/ ABL	VEGFA/ ABL	KDR/ ABL	NRP1/ ABL
1	0.258	0.04	0.095	0.0070	0.0
2	0.667	3.556	0.667	0.111	0.0
3	0.143	14.0	0.429	0.0	0.0
4	1.2	3.8	1.0	0.0	0.0
5	1.0	2.308	1.385	0.154	0.423
6	1.6	3.25	4.45	0.2	0.05
7	2.323	5.258	1.29	0.0	0.129
8	0.75	12.286	2.071	0.5	3.393
10	1.0	11.889	0.667	0.0	0.111
14	0.4	1.4	0.0	0.0	0.0
15	1.0	1.8	0.7	1.1	0.0
16	0.9	1.27	4.43	0.13	0.0
18	0.83	3.83	0.811	0.019	0.019
	n=13 Median (Min-max)	n=13 Median (Min-max)	n=13 Median (Min-max)	n=13 Median (Min-max)	n=13 Median (Min-Max)
	0,9 (0,143-2.32)	3,556 (0,4-14)	0,811 (0-4,45)	0,19 (0-1,1)	0,0 (0-3,93)

AML hastalarının tanı anı Kİ örneklerinde ortalama VEGF gen ekspresyonu (1,38) da AML hastalarının PK (0,83), ALL hastalarının hem PK (0,63) hem Kİ (0,70) ve kontrol grubuna (0,69) göre yüksekti (tablo 4.3).

KDR ortalama gen ekspresyonu AML hastalarının Kİ örneklerinde (0,17), AML hastalarının PK (0,85), ALL hastalarının hem PK (0,03) hem Kİ (0,031) örnekleri ve kontrol grubuna (0,09) göre yüksek bulundu (tablo 4.3).

Tablo 4.4. ALL hastaları tanı anı Kİ Örneklerinde WT1, BIRC5, VEGFA, KDR, NRP Gen Ekspresyonları

Hasta protokol no	Wt1/ ABL	BIRC5/ ABL	VEGFA/ ABL	KDR/ ABL	NRP1/ ABL
9	0.0060	0.723	0.025	0.0	0.088
12	0.1	0.1	0.0	0.1	0.0
13	0.014	16.536	1.449	0.014	0.072
17	0.01	1.444	1.364	0.01	1.162
	n=4 median (Min-max)	n=4Median (Min-max)	n=4 Median (Min-max)	n=4Median (Min-max)	n=4 Median (Min-max)
	0.012 (0,006-0,1)	1,0835 (0,1-16,536)	0,6945 (0-1,449)	0,012 (0-0,1)	0,8 (-1,162)

Tablo 4.5. AML hastaları tanı anı PK Örneklerinde WT1, BIRC5, VEGFA, KDR, NRP Gen Ekspresyonları

Hasta protokol no	Wt1/ ABL	BIRC5/ ABL	VEGFA/ ABL	KDR/ ABL	NRP1/ ABL
30	0.367	1.472	0.222	0.0060	0.939
31	0.741	1.556	3.852	0.556	0.0
32	0.717	1.167	3.317	0.35	0.0
33	3.292	1.525	0.608	0.1	0.0
36	0.488	5.244	0.616	0.07	0.023
40	0.0030	0.589	0.969	0.0080	0.0030
41	0.112	1.851	0.116	0.014	0.0
45	0.143	1.143	0.076	0.0	0.0
46	0.052	7.414	0.276	0.0	0.086
48	0.026	0.714	0.091	0.052	0.0

Tablo 4.5. AML hastaları tanı anı PK Örneklerinde WT1, BIRC5, VEGFA, KDR, NRP Gen Ekspresyonları (Devamı)

50	0.016	0.107	1.609	0.038	0.15
56	0.025	0.033	0.042	0.0070	0.017
58	0.051	4.324	0.257	0.051	0.029
60	0.058	5.004	0.4	0.0090	0.036
61	0.0030	0.042	0.10	0.014	0.0
	n=15 Median (Min-max)	n=15 Median (Min-max)	n=15 Median (Min-max)	n=15 Median (Min-max)	n=15 Median (Min-max)
	0,58 (0,003-3,292)	1,472 (0,033-7,414)	0,276 (0,042-3,852)	0,014 (0-556)	0,003 (0-0,939)

Tablo 4.6. ALL hastaları tanı anı PK Örneklerinde WT1, BIRC5, VEGFA, KDR, NRP Gen Ekspresyonları

Hasta protokol no	Wt1/ Abl	BIRC5/ Abl	VEGFA/ Abl	KDR/ Abl	NRP1/ Abl
34	0.091	2.091	1.091	0.091	0.0
38	0.231 0	4.0	0.308	0.077	0.0
39	0.091	0.667	0.0	0.0	0.0
42	0.077	1.615	2.846	0.0	0.0
43	0.032 6	2.013	0.857	0.045	0.0060
44	0.071	1.286	0.643	0.0	0.0
52	0.0	1.0	0.333	0.0	0.0
55	0.0090	3.514	0.05	0.0050	0.0
57	0.078	1.656	0.078	0.078	0.0
59	0.00	3.664	0.114	0.0030	0.0
	n=10 Median (Min-max)	n=10 Median (Min-max)	n=10 Median (Min-max)	n=10 Median (Min-max)	n=10 Median (Min-max)
	0,74 (0,-0.231)	31,835 (0,667-4)	0,3205 (0-2,846)	0,04 (0-0,091)	0,0 (0-0,06)

4.8.AML HASTALARININ KEMİK İLİĞİ ÖRNEKLERİNDE WT1, NRP1, BIRC5, VEGFA VE KDR GEN EKSPRESYON BULGULARI

AML hastalarının 1. ve 2. Kİ örnekleri arasındaki farklılığın tespitinde *Wilcoxon signed rans test*i kullanıldı.

AML hastalarından tanı esnasında alınan kemik iliği örneklerinde WT1 ekspresyon oranı ile 2. örneği (remisyon) arasında anlamlı bir azalma tespit edildi (P=0,009) ancak BIRC5, VEGFA, KDR ve NRP1 gen ekspresyonları arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi (tablo 4.7).

Tabo 4.7. AML hastalarının Kemik İliği Örneklerinde WT1, NRP1, BIRC5, VEGFA ve KDR Gen Ekspresyonları

Hasta protokol no	Örnek alınma zamanı	Wt1/ Abl	BIRC5/ Abl	VEGFA/ Abl	KDR/Abl	NRP1/Abl
1	TANI	0,258	0,040	0,095	0,007	0,000
	2	0,333	7,000	3,000	0,000	0,000
	3	0,333	3,833	0,333	0,000	0,000
	4	0,500	2,000	0,500	1,000	0,000
	5	0,077	13,154	2,308	0,000	0,000
2	TANI	0,667	3,556	0,667	0,111	0,000
3	TANI	0,143	14,000	0,429	0,000	0,000
	2	0,095	0,643	0,310	0,071	0,071
	3	0,429	0,714	0,357	0,214	0,000
4	TANI	1,200	3,800	1,000	0,000	0,000
	2	0,473	1,364	0,745	0,000	0,000
5	TANI	1,000	2,308	1,385	0,154	0,423
6	TANI	1,600	3,250	4,450	0,200	0,050
	2	0,071	13,810	7,119	0,119	0,238
	3	0,064	1,236	2,027	0,045	0,100
7	TANI	2,323	5,258	1,290	0,000	0,129
	2	0,167	0,667	3,333	0,125	0,417

Tabo 4.7. AML hastalarının Kemik İliği Örneklerinde WT1, NRP1, BIRC5, VEGFA ve KDR Gen Ekspresyonları (Devamı)

Hasta protokol no	Örnek alınma zamanı	Wt1/ Abl	BIRC5/ Abl	VEGFA/ Abl	KDR/Abl	NRP1/Abl
8	TANI	0,750	12,286	2,071	0,500	3,393
	2	0,667	0,667	0,667	0,000	0,000
10	TANI	1,000	11,889	0,667	0,000	0,111
11	TANI	5,000	13,846	1,231	0,077	4,000
14	TANI	0,400	1,400	0,000	0,000	0,000
	2	0,211	36,632	1,684	0,000	0,053
	3	0,800	10,200	1,840	0,120	0,200
15	TANI	1,000	1,800	0,700	1,100	0,000
	2	0,200	13,300	13,300	0,000	0,500
	3	1,000	2,667	6,333	1,000	0,000
16	TANI	0,900	1,270	4,430	0,130	0,000
	2	0,618	4,941	2,882	0,118	0,382
	3	0,321	0,877	2,469	0,037	0,296
	4	0,027	3,233	1,014	0,795	0,164
18	TANI	0,830	3,830	0,811	0,019	0,019
	2	0,080	10,400	17,920	0,320	0,400
	3	0,000	0,760	0,000	0,040	0,480
	4	0,050	2,250	0,500	0,100	0,150

4.9.ALL HASTALARI KEMİK İLİĞİ ÖRNEKLERİNDE WT1, NRP1, BIRC5, VEGFA VE KDR GEN EKSPRESYON BULGULARI

ALL hastalarının Kİ 1. ve 2. örnekleri arasındaki farklılığın tespitinde *Wilcoxon signed ransk testi* kullanıldı. Örnekler arasında anlamlı bir fark gözlenmedi.

Tablo 4.8. ALL hastaları Kemik İliği Örneklerinde WT1, NRP1, BIRC5, VEGFA ve KDR Gen Ekspresyon Bulguları

Hasta protokol no	Örnek alınma zamanı	Wt1/ Abl	BIRC5/ Abl	VEGFA/ Abl	KDR/ Abl	NRP1/ Abl
9	TANI	0,006	0,723	0,025	0,000	0,088
	2	0,500	72,500	9,000	0,000	1,000
12	TANI	0,100	0,100	0,000	0,100	0,000
	2	0,188	29,375	4,813	0,063	0,375
	3	0,118	39,176	5,294	0,059	0,353
13	TANI	0,014	16,536	1,449	0,014	0,072
	2	0,967	0,483	0,183	0,000	0,000
	3	0,053	19,684	2,316	0,000	0,053
17	TANI	0,010	1,444	1,364	0,010	1,162

4.10.AML HASTALARI PERİFERİK KAN ÖRNEKLERİNDE WT1, NRP1, BIRC5, VEGFA VE KDR GEN EKSPRESYON BULGULARI

AML hastaları 1. ve 2. PK örnekleri arasındaki farklılığın tespitinde *Wilcoxon signed rank testi* kullanıldı. AML hastaları PK örnekleri için WT1, BIRC5, VEGFA, KDR ve NRP1 ekspresyonu açısından örnekler arasında anlamlı bir fark bulunamadı (tablo 14).

Tablo 4.9. AML hastaları PK Örneklerinde WT1, NRP1, 2.BIRC5, VEGFA ve KDR Gen Ekspresyonları

Hasta protokol no	Örnek alınma zamanı	Wt1/ Abl	BIRC5/ Abl	VEGFA/ Abl	KDR/ Abl	NRP1/ Abl
30	TANI	0,367	1,472	0,222	0,006	0,939
	2	0,465	1,181	0,590	0,417	0,007
	3	0,038	0,577	1,231	0,038	0,046
	4	0,008	0,096	0,040	0,016	0,000
	5	0,133	1,778	2,222	0,133	0,044
31	TANI	0,741	1,556	3,852	0,556	0,000
	2	0,171	0,771	1,600	0,086	0,029
	3	0,125	0,825	0,450	0,038	0,038
32	TANI	0,717	1,167	3,317	0,350	0,000
	2	0,330	1,149	0,305	0,313	0,023
	3	0,640	1,400	2,720	0,240	0,040
	4	0,180	0,539	3,551	0,067	0,124
33	TANI	3,292	1,525	0,608	0,100	0,000
	2	0,320	2,280	3,640	0,260	0,080
	3	0,114	0,857	1,714	0,114	0,200
	4	1,031	1,297	0,313	0,641	0,031
36	TANI	0,488	5,244	0,616	0,070	0,023
	2	0,259	1,296	4,185	0,185	0,148
	3	2,296	12,185	1,000	0,111	0,111
	4	1,000	6,300	0,900	0,800	0,100
40	TANI	0,003	0,589	0,969	0,008	0,003
	2	0,018	0,894	0,724	0,059	0,029
	3	0,011	1,148	0,738	0,055	0,011
41	TANI	0,112	1,851	0,116	0,014	0,000
	2	0,009	9,249	0,214	0,017	0,014
	3	0,033	3,500	0,250	0,083	0,000
	4	0,024	1,353	0,275	0,051	0,000

Tablo 4.9. AML hastaları PK Örneklerinde WT1, NRP1, 2.BIRC5, VEGFA ve KDR Gen Ekspresyonları (devamı)

Hasta protokol no	Örnek alınma zamanı	Wt1/ Abl	BIRC5/ Abl	VEGFA/ Abl	KDR/ Abl	NRP1/ Abl
45	TANI	0,143	1,143	0,076	0,000	0,000
	2	0,060	9,838	0,251	0,108	0,000
	3	0,025	3,004	1,227	0,079	0,000
	4	0,043	4,503	0,683	0,043	0,006
46	TANI	0,052	7,414	0,276	0,000	0,086
	2	0,014	5,957	0,357	0,014	0,043
	3	0,050	2,482	0,305	0,007	0,078
	4	0,000	22,000	0,000	0,000	0,000
48	TANI	0,026	0,714	0,091	0,052	0,000
	2	0,014	0,029	2,286	0,000	0,000
	3	0,014	18,243	2,338	0,014	0,000
	4	0,036	4,286	0,357	0,036	0,000
50	TANI	0,016	0,107	1,609	0,038	0,150
	2	0,100	7,667	0,667	0,067	0,033
	3	0,131	1,339	0,437	0,044	0,000
	4	0,013	6,053	1,132	0,007	0,007
56	TANI	0,025	0,033	0,042	0,007	0,017
	2	0,113	0,509	0,245	0,113	0,245
	3	0,000	0,000	1,000	0,000	0,333
58	TANI	0,051	4,324	0,257	0,051	0,029
	2	0,044	4,803	0,943	0,039	0,004
	3	0,008	1,481	1,570	0,005	0,076
60	TANI	0,058	5,004	0,400	0,009	0,036
	2	0,009	1,580	0,131	0,009	0,000
	3	0,029	4,139	0,324	0,002	0,004
61	TANI	0,003	0,042	0,104	0,014	0,000
	2	0,042	0,042	0,167	0,042	0,000
	3	0,024	0,108	0,568	0,097	0,000

4.11.ALL HASTALARI PERİFERİK KAN ÖRNEKLERİNDE WT1, NRP1, BIRC5, VEGFA VE KDR GEN EKSPRESYON BULGULARI

ALL hastalarının 1. ve 2. PK örnekleri arasındaki farklılığın tespitinde *Wilcoxon signed rans test*i kullanıldı.

ALL hastalarından tanı esnasında alınan PK örneklerinde NRP1 ekspresyon oranı ile 2. örneği (remisyon) arasındaki artış istatistiksel olarak anlamlı idi ($P=0,041$) ancak BIRC5, VEGFA, KDR ve WT1 gen ekspresyonları arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi (tablo 4.10).

Tablo 4.10. ALL hastaları PK Örneklerinde WT1, NRP1, BIRC5, VEGFA ve KDR Gen Ekspresyonları

Hasta protokol no	Örnek alınma zamanı	Wt1/ Abl	BIRC5/ Abl	VEGFA/ Abl	KDR/ Abl	NRP1/ Abl
34	TANI	0,091	2,091	1,091	0,091	0,000
	3	0,071	1,786	0,429	0,000	0,071
	4	0,000	4,067	2,667	0,000	0,000
38	TANI	0,231	4,000	0,308	0,077	0,000
	2	0,167	8,542	1,500	0,042	0,000
	3	0,100	5,000	2,600	0,000	0,000
	4	0,091	2,682	2,773	0,000	0,045
39	TANI	0,091	0,667	0,000	0,000	0,000
	2	0,005	5,476	0,762	0,014	0,010
	3	0,000	1,957	3,174	0,087	0,087
	4	0,006	1,361	1,207	0,065	0,000
	5	0,018	1,274	0,139	0,000	0,000
42	TANI	0,077	1,615	2,846	0,000	0,000
	2	0,000	0,750	0,109	0,102	0,008
	3	0,031	0,281	1,875	0,047	0,016
	4	0,000	2,149	0,970	0,030	0,000

Tablo 4.10. ALL hastaları PK Örneklerinde WT1, NRP1, BIRC5, VEGFA ve KDR Gen Ekspresyonları (devamı)

Hasta protokol no	Örnek alınma zamanı	Wt1/ Abl	BIRC5/ Abl	VEGFA/ Abl	KDR/ Abl	NRP1/ Abl
43	TANI	0,040	1,415	0,037	0,132	0,000
	2	0,032	2,013	0,857	0,045	0,006
	3	0,063	1,125	0,078	0,297	0,016
	4	0,024	0,438	0,025	0,109	0,000
44	2	0,071	1,286	0,643	0,000	0,000
	3	0,091	0,740	1,143	0,039	0,000
	4	0,053	1,737	16,947	0,000	0,000
	5	0,143	0,964	1,750	0,000	0,000
52	TANI	0,000	1,000	0,333	0,000	0,000
	2	0,071	2,857	1,143	0,000	0,000
	3	0,227	0,000	1,455	0,045	0,000
	4	0,094	1,188	0,188	0,031	0,000
55	TANI	0,009	3,514	0,050	0,005	0,000
	2	0,045	13,764	2,607	0,107	0,008
	3	0,041	1,757	0,595	0,014	0,014
	4	0,026	3,281	0,772	0,061	0,009
57	TANI	0,078	1,656	0,078	0,078	0,000
	2	0,000	1,560	0,028	0,009	0,000
59	TANI	0,006	3,664	0,114	0,003	0,000
	2	0,015	2,269	0,121	0,020	0,000
	3	0,016	1,752	0,076	0,043	0,000

4.12.NÜKS EDEN HASTALARIN WT1, BIRC5, VEGFA, KDR, NRP GEN EKSPRESYON BULGULARI

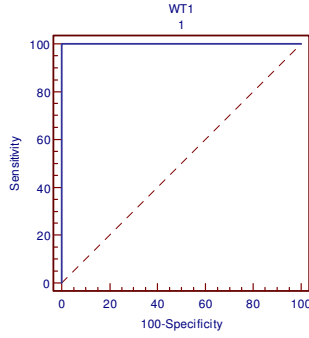
Çalışmamıza alınan 6 AML ve 3 ALL hastası nüks etti, 1 ALL hastası remisyona giremedi.

4.13.AML VE ALL HASTALARINDA WT1, BIRC5, VEGFA, KDR, NRP GEN EKSPRESYONU CUT OFF DEĞERLERİ VE ROC EĞRİLERİ

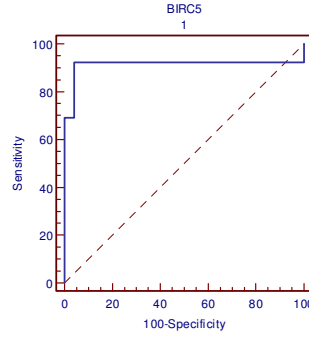
Tablo 4.11. Nüks eden hastaların WT1, BIRC5, VEGFA, KDR, NRP Gen Ekspresyonları

Hasta no	Tanı	Nüks tarihi	Örnek zamanı	Wt1/ Abl	BIRC5/ Abl	VEGFA/ Abl	KDR/ Abl	NRP1/ Abl
3	AML	1.10.09	TANI	0,143	14,000	0,429	0,000	0,000
			2	0,095	0,643	0,310	0,071	0,071
			3 (21.05.09)	0,429	0,714	0,357	0,214	0,000
9	ALL T(9;22)+	4.09.09	TANI	0,006	0,723	0,025	0,000	0,088
			2 (4.08.09)	0,500	72,500	9,00	0,000	1,00
30	AML İNV 16+	24.09.09	TANI	0,367	1,472	0,222	0,006	0,939
			2 (4.08.09)	0,465	1,181	0,590	0,417	0,007
			3	0,038	0,577	1,231	0,038	0,046
			4	0,008	0,096	0,040	0,016	0,000
			5	0,133	1,778	2,222	0,133	0,044
36	AML	6.01.10	TANI	0,488	5,244	0,616	0,070	0,023
			2(8.01.10)	0,259	1,296	4,185	0,185	0,148
			3 (20.01.10)	2,296	12,185	1,000	0,111	0,111
			4	1,000	6,300	0,900	0,800	0,100
46	AML	21.10.09	TANI	0,052	7,414	0,276	0,000	0,086
			2	0,014	5,957	0,357	0,014	0,043
			3 (21.05.10)	0,050	2,482	0,305	0,007	0,078
			4 (27.10.09)	0,000	22,000	0,000	0,000	0,000
58	AML	5.08.09	TANI	0,051	4,324	0,257	0,051	0,029
			2 (20.07.09)	0,044	4,803	0,943	0,039	0,004
			3	0,008	1,481	1,570	0,005	0,076
61	AML	28.10.08	TANI	0,003	0,042	0,104	0,014	0,000
			2 (18.10.08)	0,042	0,042	0,167	0,042	0,000
			3	0,024	0,108	0,568	0,097	0,000
39	ALL	28.07.09	TANI	0,091	0,667	0,000	0,000	0,000
			2	0,005	5,476	0,762	0,014	0,010
			3 (10.06.09)	0,000	1,957	3,174	0,087	0,087
			4	0,006	1,361	1,207	0,065	0,000
			5	0,018	1,274	0,139	0,000	0,000
42	ALL T(9;22)+	18.02.09	TANI	0,077	1,615	2,846	0,000	0,000
			2	0,000	0,750	0,109	0,102	0,008
			3 (07.01.09)	0,031	0,281	1,875	0,047	0,016
			4	0,000	2,149	0,970	0,030	0,000
59	ALL T(9;22)+	Hiç rem. girmede	TANI	0,006	3,664	0,114	0,003	0,000
			2	0,015	2,269	0,121	0,020	0,000
			3	0,016	1,752	0,076	0,043	0,000

Her bir gen ekspresyonu için cut off değerleri *receiver-operating characteristic curve analiz (ROC eğrisi)* ile belirlendi. Cut-off' nokta değerleri, spesifisite ve sensitivite yüzdeleri, pozitif ve negatif likelihood oranları (LR), %95 güven aralıkları (confidence interval = CI) ve pozitif ve negatif prediktif değerleri hesaplandı.

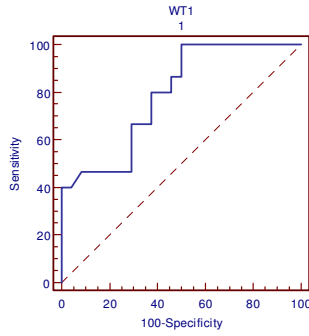


Cut off:0,134
sensitivite:% 100



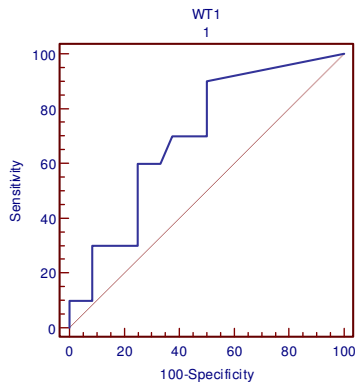
Cut off:0,765
sensitivite:%92

Şekil 4.13. AML hastaları kemik iliği örneklerinde WT1 ve BIRC5 ekspresyonu ROC eğrisi.

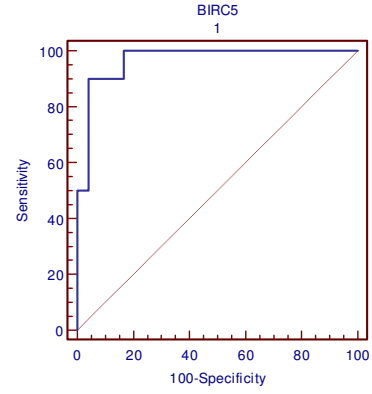


Cut off: > 0
Sensitivite: % 100

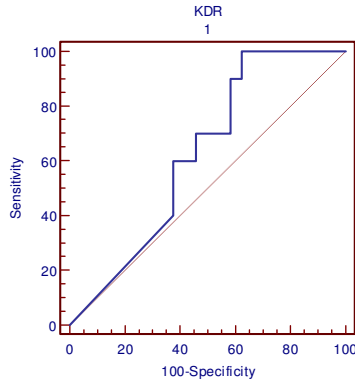
Şekil 4.14. AML hastaları periferik kan örneklerinde WT1 ekspresyonu ROC eğrisi.



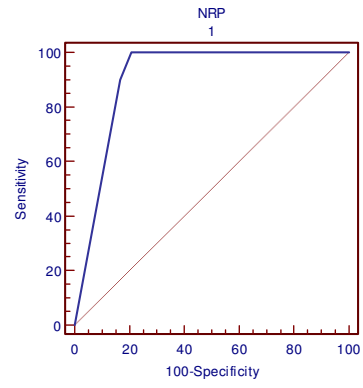
Cut off: > 0
Sensitivite: % 90



Cut off: > 0,765
Sensitivite: % 90



Cut off: > 0,091
Sensitivite: % 100



Cut off: > 0,006
Sensitivite: % 100

Şekil 4.15. ALL hastaları periferik kan örneklerinde WT1 ,BIRC5, KDR ve NRP1 ekspresyonu ROC eğrisi.

Tablo 4.12. Çalışmaya alınan hastaların bilgileri

HASTA NO	Tam	ÖRNEK TÜRÜ	Sitogenetik/ FISH/RT PCR	Nüks	Relaps Blast %	Son durum	Tedavi
1	AML	Kİ	46 XY			Sağ	Kemoterapi (KT)
2	AML	Kİ	46 XX			Ölü	
3	AML	Kİ	46 XX	+	70	Ölü	
4	AML	Kİ	46 XX			Sağ	AKİT
5	AML	Kİ	46 XY			Ölü	
6	AML	Kİ	46 XX			Sağ	KT
7	AML	Kİ	46 XY	+	90	Ölü	AKİT
8	AML	Kİ				Ölü	relaps refrakter
10	AML	Kİ	46 XX			Ölü	
11	AML	Kİ	t(15;17)			Sağ	KT
14	AML	Kİ	46 XY der (6) del (6) (p21)			Sağ	AKİT
15	AML	Kİ	46 XY			Sağ	AKİT
16	AML	Kİ	45, XY, -7 (monozomi 7)	+	90	Ölü	AKİT
18	AML	Kİ	47, XY, +4 (Trizomi 4)			Sağ	AKİT
9	ALL	Kİ	t(9;22)	+	45	Ölü	relaps refrakter
12	ALL	Kİ	46 XY			Sağ	AKİT
13	ALL	Kİ	46 XX			Ölü	
17	ALL	Kİ				Sağ	AKİT
30	AML	PK	inv16	+	%3 MRH+	Sağ	AKİT
31	AML	PK				Sağ	AKİT
32	AML	PK	t(8;21)			Sağ	AKİT
33	AML	PK				Sağ	AKİT

Tablo 4.12. Çalışmaya alınan hastaların bilgileri (devamı)

HASTA NO	Tam	ÖRNEK TÜRÜ	Sitogenetik/ FISH/RT PCR	Nüks	Relaps Blast %	Son durum	Tedavi
36	AML	PK		+	8	Sağ	AKİT
40	AML	PK				Sağ	AKİT
41	AML	PK				Sağ	KT
45	AML	PK				Ölü	
46	AML	PK		+	34	Sağ	KT
48	AML	PK				Sağ	KT
50	AML	PK				Sağ	AKİT
56	AML	PK				Sağ	KT
58	AML	PK		+	?	Ölü	
60	AML	PK				Sağ	KT
61	AML	PK		+	70	Ölü	
34	ALL	PK	t(9;22)			Sağ	AKİT
38	ALL	PK				Sağ	AKİT
39	ALL	PK				Ölü	AKİT
42	ALL	PK	t(9;22)	+	50	Sağ	AKİT
43	ALL	PK	t(9;22)			Sağ	AKİT
44	ALL	PK				Sağ	AKİT
52	ALL	PK				Sağ	AKİT
55	ALL	PK				Sağ	KT
57	ALL	PK				Ölü	AKİT
59	B-ALL	PK	t(9;22)	TR girmedi	30	Sağ	KT

5. TARTIşMA VE SONUÇ

Akut lösemiler tüm kanserlerin yaklaşık %3'ünü oluşturur. ABD'de kanserden ölümlerin %1.2'si akut lösemi sebebiyle olmaktadır. AML erişkinlerde, ALL ise daha çok çocuklarda görülmektedir. Akut lösemi çok hızlı ilerler ve tedavi edilmezse kısa sürede ölümlle sonuçlanır (33).

AML ve ALL hastalarında bir seri tedavi sonrası tam remisyon görülse de hastalığın nüks etme riski vardır. Nüks riski hastaların az bir kısmında klinik ya da biyolojik özellikleri göstermeleriyle tahmin edilebilirken büyük çoğunluğunda risk belirtisi için bir markır yoktur (41).

Hematolojik malignitelerde RT-PCR füzyon gen transcriptleri, mutasyon spesifik primerlerle gen mutasyonlarının tespiti için kullanılan hassas bir yöntemdir. Füzyon gen ya da mutasyonlar hastalığın tanı ve tedavisi kadar residüel löseminin tespiti için de kullanır. Ancak AML ve ALL hastalarının çoğunda bu tür bir moleküler markır mevcut değildir. Bu nedenle son yıllarda anormal eksprese edilen genlerin tespiti ile MRH takibi önem kazanmıştır. Özellikle spesifik bir markırı olmayan vakalarda AML'de yüksek oranda eksprese edilen genler MRH hedefleri olarak ele alınabilir.

Bu çalışmamızda AML ve ALL hastalarında WT1, VEGF, VEGFR2, NRP ve survivin gen ekspresyonlarının MRH takibinde kullanılabilir bir markır olup olamayacağı araştırıldı.

Akut lösemilerde MRH çalışmaları için gösterilen ilk overekspresyon markır WT1'dir. İnoue K ve arkadaşları K.T. ile tedavi edilen 27 AML, 2 ALL, 2 AMLL (acute mixed lineage leukemia), AKİT yapılan 13 AML, 5 ALL, 5 KML hastasında revers transkriptaz PZR ile Kİ ve PK örneklerinde WT1 ekspresyonunu takip etmişlerdir ve PK'nın MRH bulmada daha üstün olduğunu ileri sürmüşlerdir. Kİ ve PK'da WT1 ekspresyon seviyesi monitorizasyonunun bireysel tedavinin etkinliğinin hızlı değerlendirilmesi ve tümör spesifik DNA markırlarının varlığı ya da yokluğunda tüm lösemi hastaları için erken dönemde klinik relapsın tanısı için kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir (71).

Qstergaart M ve ark (104) ve Wolfgang ve arkadaşları (105) yeni tanı AML hastalarının PK ve Kİ örneklerinde WT1 ekspresyonu çalışmışlar ve WT1 aşırı ekspresyonuu göstermişlerdir. Kemoterapi sonrası hastalarda WT1 ekspresyonunda azalma tespit edilmiştir. Artmış WT1 ekspresyonu ve nüks arasında yakın bir ilişki gözlenmiştir. WT1 ekspresyon seviyelerinin özellikle füzyon transkripti negatif hastalarda MRH bulmada bir araç olabileceğini ileri sürmüşlerdir (104,105)

Weisser M ve ark AML hastalarından tanı anında alınan örneklerde WT1 ekspresyonu çalışmış ve prognozla ilişkilendirmişlerdir. Kantitatif WT1 seviyeleri vakaların %83-96 sında ikinci bir markır veya hasta kliniği ile ilişkili bulunmuştur. Yüksek WT1 ekspresyonunu daha kısa sağkalım ve hastalıksız yaşam ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir (26).

Nowakowska-Kopera ve arkadaşları WT1 ekspresyonunu MRD markırı olarak değerlendirmişlerdir. WT1 ekspresyonundaki artışın hematolojik relapsı 4 ay öncesinden haber verdiğini (ortalama süre 129 gün; range 6-298) ileri sürmüşlerdir (106).

Çalışmamızdaki AML hastalarının tanı anında alınan PK örneklerinde WT1 ekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksekti. Aynı zamanda AML hastalarının Kİ örneklerinde de WT1 ekspresyonunun hem AML hastalarının PK örneklerine hem de kontrol grubuna göre yüksek olduğu tespit edildi. AML hastalarının

tedavi sonrası alınan Kİ örneklerinde tanı anı örneklerine göre WT1 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi.

Çalışmamıza alınan 28 AML hastasından 6'sı nüks etti (tablo 4.11). Nüks olan (flow sitometri sonucuna göre) 6 AML hastasının 1'inden Kİ, 5'inden PK örneği toplanmış olup hem Kİ, hem PK'da nüks öncesi WT1 ekspresyon oranında artış tespit edildi. Nüks öncesi hastaların PK örneklerinde WT1 ekspresyonunda ortalama 37,4 gün öncesi WT1 ekspresyonunda artış olduğu tespit edildi (2-150 gün arası). Bulgularımız bu yönüyle Qstergaart M ve ark (104), Nowakowska-Kopera (106) ve Weisser M ve ark (26)'nın çalışmaları ile uyumlu olup AML hastalarının Kİ örneklerinden WT1 gen ekspresyonunun MRH takibi için kullanılabilecek iyi bir markır olduğunu desteklemektedir.

MRH takibinde güncel bilgiler Kİ kullanımının PK'a göre daha iyi olduğu yönündedir. Ancak Kİ'nin periferik kandan biraz daha hassas olduğunu gösteren çalışmalar olsa da son dönemde karşılaştırılabilir çalışmalar PK'nın PML-RARA'da en az Kİ kadar hassas olduğunu gösteren umut verici çalışmalar da vardır.

Çalışmamızda AML ve ALL hastalarının bir grubundan Kİ, başka bir gruptan ise PK örneği toplanmıştır. Amacımız WT1 ekspresyonunun MRH takibinde PK'dan çalışılıp çalışılamayacağı sorusuna yanıt aramak ve PK kullanımını destekleyici veriler elde etmektir.

PK dan MRH takibinde WT1 ekspresyonu kullanımı ile ilgili literatürde çok az çalışma mevcuttur. İnoue K ve ark (71) ve Sakamoto Y ve ark. (48) nın yaptığı çalışmalarda WT1 ekspresyonunun MRH takibinde PK'dan çalışılabileceği öne sürmüşlerdir. Çalışmamız sonunda elde edilen veriler İnoue K ve Sakamoto Y ve arkadaşlarının bulgularını desteklemekte ve PK'dan MRH takibinde WT1 ekspresyonunun PK'dan çalışılabileceği yönündedir.

Diğer taraftan literatürde WT1 ekspresyonunun spesifik bir moleküler markırı olmayan hastalarda özellikle MRH takibinde kullanılabiliirliği yönünde çalışmalar da mevcuttur (105,107). Çalışmamızda nüks eden 1 hastada aynı zamanda inv16 pozitifliği mevcuttu (tablo 4.11). Bu hastada nüks öncesi WT1 ekspresyonunda artış olduğu gösterildi. Bu nedenle WT1 ekspresyonunun başka moleküler markırı olan hastalarda da kullanılabileceği kanısındayız. Bu yönüyle çalışmamız Ogawa H ve ark (108) ve İnoue K ve arkadaşlarının (71) çalışması ile uyumlu iken WT1'in sadece moleküler markırı

olmayan hastalarda kullanılabileceğini ileri süren Wolfgang K ve arkadaşları ve Qstergaart M ve arkadaşlarının çalışmaları ile paralellik göstermemektedir.

Literatürde erişkin ALL hastalarında tanı anı örneklerinde WT1 ekspresyonu ile ilgili az sayıda yayın mevcuttur.

Busse A ve arkadaşları 238 erişkin ALL hastanın 219'unda WT1 ekspresyonu bulmuşlardır. AML hastaları ile karşılaştırdıklarında ALL'nin çeşitli alt tiplerinde WT1 ekspresyonunu daha düşük olduğu göstermişlerdir. Cox regression analizi hastalıksız ya da tam sağ kalım ile WT1 ekspresyonun prognostik rolü arasında bağlantı olmadığını ileri sürmüştür (109).

Lim CK ve ark. 3 erişkin ALL, 15 AML hastasının tanı anı PK örneklerinde RT-PCR ve nested PZR ile WT1 gen ekspresyonu çalışmışlar ve kontrol grubuna göre tüm hastalarda WT1 ekspresyonunu yüksek bulmuşlardır (110).

Bizim çalışmamızda Busse A, ve Lim CK'nın çalışmaları ile uyumlu veriler elde edilmiştir. Çalışmamıza alınan 10 ALL hastasının tanı anı PK örneklerinde WT1 ekspresyonunun varlığı belirledik. Ancak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Bunun nedenin hasta sayımızın az olmasından kaynaklı olduğuna inanıyoruz.

Çalışmamızda Kİ örneği alınan, t(9;22) pozitifliği olan 1 erişkin ALL hastası (protokol no 9) nüks etmiştir. Bu hastada nüks öncesi (30 gün) alınan örnekte tanı anına göre yüksek WT1 gen ekspresyonu gösterilmiştir (tanı:0,006, nüksten 30 gün önce 0,5). Yine nüks eden, t(9;22) pozitifliği olan ve PK örneğinden takip edilen 1 erişkin ALL hastasında (protokol no 42) nüksten 41 gün önce alınan örnekte WT1 ekspresyonunda artış izlenmiştir. Bu veriler t(9;22) pozitifliği olan erişkin ALL hastalarında WT1 ekspresyonunun MRH takibinde hem PK hem Kİ örneklerinin kullanılabileceği yönünde destek vermektedir (tablo 4.11).

Spesifik moleküler markırı olmayan ve hiç remisyona girmeyen bir ALL hastasında (protokol no 59) WT1 seviyesi sabit kalmıştır. Bu nedenle biz WT1 ekspresyonunun t(9;22) pozitifliği olan erişkin ALL hastalarında MRH takibinde t(9;22) ile birlikte kullanılabileceği düşüncesindeyiz (tablo 4.11).

Çalışmamız erişkin ALL hastalarında WT1 ekspresyonunun kullanımını göstermesine rağmen literatürde bu verimizi destekleyecek çalışmaya rastlanmamıştır. Bunun nedeni WT1 ekspresyonunun daha çok çocuk ALL hastalarında yapılmış olması olabilir.

Elmağaçlı AH ve ark. PK kök hücre nakli veya allojenik kök hücre nakli (AKİT) yapılan akut lösemili hastalarda MRD markırı olarak WT1'in rolünü çalışmışlardır. WT1 transkriptlerinin bulunması PK kök hücre nakli veya allojenik kök hücre nakli yapılan hastalarda lösemik relapsın tahmin edilmesinde ve MRH takibinde güvenilir ve uygun bir markır olamayacağını ileri sürmüşlerdir (111).

Çalışmamızda spesifik bir moleküler markırı olmayan ve AKİT yapılan 1 ALL hastasında (protokol no 39) nakil sonrası hematolojik nüks görülmüş, ancak nüksten 48 gün önce alınan örnekte WT1 ekspresyonuna rastlanmamıştır (tablo 4.11). Elmağaçlı AH ve arkadaşları yaptığı çalışmada akut lösemilerde WT1 ekspresyonunun AKİT yapılan hastalarda MRH tespitinde kullanılamayacağını ileri sürmüşlerdir. Bizim bulgumuzda Elmağaçlı ve arkadaşlarının çalışması ile uyumludur. Ancak Ogawa H ve ark, Jin S ve ark, Candoni A ve ark, Gu WY ve arkadaşları AKİT sonrası WT1'in kullanılabileceğini göstermiştir. Bizim bulgularımız aksini göstermektedir. Bunun sebebi bizim AKİT sonrası nüks olan sadece 1 hastamızın olması olabilir (112,113).

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) kan damarlarının (anjiyogenez) ve kan hücrelerinin (hematopoez) oluşumunu sağlayan bir büyüme faktörüdür. Bu görevlerini VEGFR-1 ve VEGFR-2 olmak üzere 2 adet transmembran tirozin kinaz reseptörlerine bağlanarak yerine getirir. Solid tümörlerde VEGF gibi anjiogenik faktörlerin önemi açıkça ortaya konmuştur. Son yıllarda anjiogenezin AML, ALL ve KML gibi hematolojik malignitelerde de rolü olduğu konusunda çalışmalar yapılmıştır. Literatürde özellikle VEGFA ve VEGFR2 (KDR, Flk1)'in akut lösemilerde kontrol grubuna göre yüksek eksprese edildiğini ile ilgili çalışma sınırlı sayıdadır ve anjiogenezin hematolojik malignitelerdeki rolü hala tam olarak aydınlatılamamıştır (114).

Çalışmamızdaki 42 hastanın tanı anı örneklerinin 39'unda VEGF ekspre edilmekte idi (%92.85). Hem ALL hem AML hastalarının Kİ, PK örnekleri ve kontrol grubu örneklerinde VEGF ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi. Bunun nedeninin hastaların lösemi alt tiplerindeki farklılıklar ve hasta sayısındaki yetersizlikten kaynaklandığı kanısındayız. Ancak AML hastalarının Kİ örneklerinde

ortalama VEGF gen ekspresyonu (1,38) AML hastalarının PK (0,83), ALL hastalarının hem PK (0,63) hem Kİ (0,70) ve kontrol grubuna (0,69) göre yüksekti.

Padro T ve ark. AML hastalarında immünohistokimyasal boyama ile VEGF ve VEGFR2'nin yüksek ekspresyonunu göstermişlerdir. VEGFR2'nin ekspresyonunu indüksiyon KT sonrası TR'u başaran hastalarda azaldığını tespit etmişlerdir (115).

Wang Y ve ark. 31 AML hastasının Kİ mononükleer hücrelerinde 21 (65.6%), 1 (3.1%) ve 17 (53.1%) hastada VEGF, KDR ve Flt1 ekspresyonunu tespit etmişlerdir (116).

Xu D ve ark. AML hastalarının Kİ örneklerinde revers transkriptaz PCR ile VEGF ekspresyonu çalışmışlardır. AML hastalarından alınan Kİ örneklerinde (82%) , OKİT yapılan hastalar (41.67%) ve normal Kİ örneklerine (30.76%) göre VEGF mRNA ekspresyon oranının daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir (117).

Ye XJ ve Lin MF akut lösemili, tedavi almamış yeni tanı hastaların örneklerinde (0.86) ve nüks olan hastalarda (1.02) VEGF ekspresyonunu normal kontrol grubu (0.39) ve remisyon örneklerine (0.41) göre yüksek bulmuşlardır. Ayrıca yeni tanı AML (1.03) hastalarında VEGF ekspresyonunu ALL (0.61) hastalarına göre yüksek bulmuşlardır ($P < 0.05$). AML hastalarında VEGF sekresyonu ve mRNA ekspresyonu ALL hücrelerindekiinden daha yüksek bulunmuştur (118).

Bu çalışma da aynı zamanda Ye XJ ve Lin MF, Padro T, Wang C'nin yapmış olduğu çalışmalarda akut lösemi hastalarının yeni tanı konmuş, remisyona girmiş ve nüks olmuş hastalar arasında gerek immünohistokimyasal olarak mikrodamar sayısı değişiklikleri, gerekse kantitatif RT-PZR ile VEGF gen ekspresyonundaki farklılıklardan yola çıkarak VEGF geninin MRH takibinde kullanılabilir bir markır olup olamayacağı konusunu da araştırdık. Literatürde VEGF'ün MRH takibinde kullanılabilirliği ile ilgili yayın mevcut değildi. Yeni bir MRH markırı olarak VEGF ekspresyonunun residüel hastalık takibinde de yararlı olabileceğini, ayrıca elde edilecek verilerin olumlu olması halinde çalışmamızın antilösemik ve antianjiogenik tedavi yaklaşımlarına katkı sağlayacağı düşünüldü.

Çalışma grubunda nüks olan AML hastalarının takip örneklerine baktığımızda VEGF gen ekspresyonunda nüks zamanı artış yada azalma gözlenmemiştir. Aksine nüks olan 3 ALL hastasında (protokol no 9, 39, 42) yaklaşık 40 gün öncesi alınan örneklerde VEGF ekspresyonunda belirgin artış izlenmiştir (tablo 4.11). Bu hastalardan 2'si t (9,22)

pozitifliği olan, diğeri ise spesifik moleküler markırı olmayan hastalardı. Hiç remisyona girmeyen diğeri ALL hastası (protokol no 59)'nın örneklerinde değışiklik izlenmedi. Bu verilerden yola çıkarak biz erişkin ALL hastalarında başka moleküler markırların varlığı ya da yokluğunda, VEGF ekspresyonunun nüksün erken tanısında kullanılabilir bir markır olabileceğini sonucuna vardık.

Nüks eden bir ALL hastasında (protokol no 39) nüksten 48 gün öncesi alınan örnekte WT1 ekspresyonunda artış izlenmezken VEGF geni aynı örnekte tanı anı ve remisyon örneklerine göre yüksekti (tablo 4.11). Bu nedenle özellikle bu hastada VEGF geni ekspresyonunun nüks markırı olarak kullanılabileceği kanısındayız.

Çalışmamız, nüks görülen hastalarda VEGF ekspresyonun yüksek olduğunu açıkça göstermiştir ve bu açıdan Wang Y ve Ye XJ ile arkadaşlarının bulguları ile örtüşmektedir. Wang Y'nin yaptığı çalışmada AML hastalarının %56.1'inde VEGF ekspresyonu tespit etmiştir. Bizim çalışmamızda AML hastalarında VEGF ekspresyonu 27 hastanın 26'sında gösterilmiştir (%96.4). Ayrıca Ye XJ ve Lin MF'nin yapmış olduğu çalışmada AML hastalarında ALL hastalarına göre VEGF ekspresyonunun fazla olduğu ifade edilmiştir. Bizim bulgularımız AML ve ALL hastaları VEGF ekspresyonu arasında farklılık olmadığı yönündedir.

ALL hastalarının VEGF ekspresyon oranlarına baktığımızda t(9;22) pozitifliği olan hastalarda (1,227) spesifik moleküler markırı olmayan ALL hastalarına (0,23) göre yüksek olduğu görülmüştür. Hiramatsu A ve ark (2006) AML hücrelerinde VEGF ve reseptörlerinin hastalığa spesifik markırların varlığında farklı oranlarda eksprese edildiğini bulmuşlardır (119). Bizim verilerimize göre de VEGF, t(9;22) pozitifliği olan erişkin ALL hastalarında daha çok eksprese edilmektedir.

KDR gen ekspresyonun da çalışmaya alınan 42 akut lösemili hastanın tanı anı örneklerinin 30'unda KDR ekspresyonu gösterildi (%71.4). AML hastalarında ise 28 hastanın 21'inde eksprese edilmekte idi (%75). Bizim çalışmamızda KDR ekspresyon oranı Wang Y ve arkadaşlarının çalışmasına göre daha yüksek bulunmuştur(%49,5). Bu ekspresyon farklılığı hastalarda AML ve ALL alt tiplerindeki farklılıktan kaynaklı olabilir.

Hem ALL hem AML hastalarının Kİ, PK örnekleri ve kontrol grubu örneklerinde KDR ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi. Bunun nedeninin hastaların lösemi alt tiplerindeki farklılıklardan ve hasta sayısındaki yetersizlikten

kaynaklandığı kanısında. Ancak AML hastalarının Kİ örneklerinde ortalama KDR gen ekspresyonu (0,17) AML hastalarının PK (0,85), ALL hastalarının hem PK (0,03) hem Kİ (0,031) örnekleri ve kontrol grubuna (0,09) göre yüksek bulundu. Ancak nüks eden hastaların KDR ekspresyonunda nüks öncesi örneklerinde anlamlı bir artış ya da azalma tespit edilmedi.

KDR geni için ROC curve analiz ile bulunan cutt off değeri (0.091, sensitivite %100) ALL hastalarının PK örnekleri ile normal bireylerin PK örnekleri arasında KDR ekspresyonundaki farklılığı kesin bir şekilde göstermiştir (şekil 19). Bu durumda KDR gen ekspresyonunun yeni tanı ALL hastalarında 0,091 den yüksek olması, bizim çalışmamızda hastalığın varlığını ortaya koyan bir markır olarak hizmet edebileceği sonucunu ortaya çıkmaktadır. Bu verimizi destekleyecek çalışmaların ALL'nin tanı ve tedavisine katkı sağlayacağı kanısındayız.

NRP'ler VEGF'ün koreseptörü olarak tanımlanmıştır. NRP1 ve NRP2 olmak üzere 2 homoloğu vardır. VEGF reseptörü NRP1, angiogenez, vaskulogenez ve sinir sisteminin gelişiminde rol oynamaktadır. NRP1'in tümör kökenli hücreler ve endotel hücreleri de dahil olmak üzere çok geniş bir doku dağılımı mevcuttur. Lösemisi ilerlemesi ve büyümesinde NRP'nin rolü bilinmemektedir. Hematolojik malignitelerde NRP ekspresyonu ve rolü ile ilgili az sayıda çalışma mevcuttur.

Lin Lu ve arkadaşları NRP1'in lösemik hücrelerde ekspresyonunu ve etkisini çalışmışlar ve AML hastalarında NRP1 mRNA ekspresyonunu varlığını göstermişlerdir. Artmış NRP-1 ekspresyonu AML hastalarının kemik iliğinde ve periferik kanındaki blast yüzdesi ile direk ilişkili bulunmuştur. Bu bilgiler NRP1'in AML hastalarında daha yüksek seviyede ifade edildiği ve NRP1'in VEGF'e cevapta lösemi hücrelerinin kemotaksisini ve proliferasyonunu arttırdığını göstermiştir. NRP-1 fonksiyonlarının inhibisyonunun AML'nin tedavisinde yeni teröpatik strateji sağlayacağını ileri sürmüşlerdir (90).

Vales A. ve arkadaşları RT-PCR ve immünokimyasal yöntemle NRP1 ve NRP2 mRNA'sının akut ve kronik lösemilerde çoğu hastada ifade edildiğini, lösemik hücrelerin hastalığın tipinden bağımsız ifade edildiğini göstermişlerdir (92).

Refrakter ve nüks etmiş AML hastalarında NRP1 in rolü ve antianjiogenik tedavideki regülasyon görevi net değildir. Kreuter ve arkadaşları thalidomide ile tedavi edilen AML hastalarında NRP1 ekspresyonu araştırmışlardır. Refraktör ve nüks etmiş AML

hastalarında NRP1 ekspresyonunun arttığını ve ayrıca thalidomide içeren antilösemik uygulamaların NRP1 downregülasyonunda etkili olduğunu ileri sürmüşlerdir (120).

Çalışmamıza alınan 28 AML hastasının 14'ünde (%50), 14 ALL hastasının 4'ünde tanı anı örneklerinde NRP1 ekspresyonu tespit edildi (%28.57). Bizim AML hastalarına NRP1 ekspresyonu oranımız (%50) Lin Lu ve arkadaşlarının oranından (%100) daha azdı. Vales ve ark RT-PCR ve immünokimyasal yöntemle NRP-1 ve NRP-2 mRNA'sını çoğu hastada lösemik hücrelerin hastalığın tipinden bağımsız eksprese edildiğini göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda oranları farklılık gösterse de NRP1'in lenfoblastik ve myeloblastik kaynaklı lösemilerde eksprese edildiğini tespit ettik.

ALL hastalarının PK örneklerinde ortalama NRP1 gen ekspresyonu (0,0006) AML hastalarının PK (0,85) ve Kİ (0,317), ALL hastalarının Kİ (0,33) örnekleri ve kontrol grubuna (0,024) göre oldukça düşük olduğu belirlendi.

NRP1 ekspresyonunda ALL hastalarının PK örnekleri ile kontrol grubu örnekleri arasındaki ekspresyon farklılığı istatistiksel olarak anlamlı idi ($p < 0,05$). Ayrıca aynı hasta grubunun 2. örneklerinde (remisyon örnekleri) NRP1 ekspresyonundaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p = 0,0041$). Kreuter ve arkadaşları thalidomid tedavisi sonrası NRP1 ekspresyonunda azalma olduğunu göstermişlerdir. Bizim hastalarımızın tedavi sonrası (KT) örneklerinde ise artış tespit edilmiştir. Bu farklılığın tedavi rejimindeki farklılıklardan kaynaklandığı düşüncesindeyiz.

Nrp1 geni için ROC curve analiz ile bulunan cut off değeri (0.006, sensitivite %100) ALL hastalarının PK örnekleri ile normal bireylerin PK örnekleri arasında Nrp1 geni ekspresyonundaki farklılığı kesin bir şekilde göstermiştir (şekil 19). Bu durumda Nrp1 gen ekspresyonunun yeni tanı ALL hastalarında 0,006 dan yüksek olması çalışmamızda hastalığın varlığını ortaya koyan bir markır olarak hizmet edebileceği sonucunu ortaya çıkmaktadır. Bu verimizi destekleyecek çalışmaların ALL'nin tanısında ve antianjiogenik tedavisi yaklaşımlarının gelişmesine katkı sağlayacağı kanısındayız.

Nüks eden AML ve ALL hastalarının nüks öncesi örneklerinde NRP1 gen ekspresyonunda artış ya da azalma görülmedi. Bu nedenle NRP1' geninin akut lösemili hastalarda MRH takibinde kullanılabilir bir markır olamayacağı sonucuna vardık.

Son yıllardaki çalışmalar AML'nin biyolojisinde apoptozis ve anjiogenezinin önemini göstermiştir. VEGF spesifik bir endotelial hücre mitojeni olarak hizmet eden ve damar

permeabilitesinin güçlü bir indükleyicisi olarak anjiogeneziye rol alan önemli bir moleküldür. VEGF antiapoptotik protein survivinin ekspresyonunu indüklemektedir. Survivin hem hücre bölünmesinin kontrolü hem de apoptozisin inhibisyonunda görevli apoptozis inhibe edici protein ailesini (IAP) bir üyesidir. Survivin bifonksiyonel rolü yüzünden farklı tümör tiplerinde tedaviye direnç ve kanser ilerlemesinde merkezi rol oynadığı ileri sürülmüştür. Survivin, baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5 olarakta adlandırılan geni BIRC5 geni tarafından sentezlenen bir proteindir. Survivin proteini programlanmış hücre ölümü ve apoptozisin negatif düzenlenmesinde rol oynar. Son yıllarda yapılan çalışmalar survivinin aşırı ekspresyonunun kötü prognoz ile ilişkili olduğunu ve multiple kemoterapötik ilaçlar için tümör direncine neden olabileceği göstermiştir (121).

Avgitidou A ve arkadaşları 5 yıldan daha uzun dönem tam remisyonda olan 16 AML hastalarının ve aynı yaşta normal bireyin kemik iliği örneklerinde VEGF ve Survivin mRNA ekspresyonunu çalışmışlardır. Araştırmacılar anjiogenesis ve apoptoz arasında korelasyon olduğunu göstermişlerdir (122).

Paydaş S ve ark. iki antiapoptotik protein olan survivin ve bcl-2'nin akut lösemilerde klinik ve hematolojik bulguları ile tedaviye yanıt arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Her iki gen ekspresyonunu hasta grubunda kontrol grubuna göre yüksek bulmuşlardır. Ayrıca klinik ve hematolojik parametrelerle survivin ve bcl-2 ekspresyonu karşılaştırıldığında CD7 ve CD34 ekspresyonu arasında önemli ilişki olduğunu, bu yüzden kötü prognostik gösterge olduğunu savunmuşlardır (123).

Oto ÖA ve ark. 34 ALL ve 40 AML hastasında RT-PZR ile bcl-2 ve survivin ekspresyonu çalışmışlardır. Survivin ekspresyonu tüm vakalarda %83 oranında bulunmuştur. Survivin ALL'de %90, AML'de %76.5 oranında tespit etmişlerdir. Sonuç olarak survivinin akut lösemide, özellikle AML'de kötü prognostik faktör olduğunu göstermişlerdir (124).

Bizim çalışmamızda akut lösemili 42 hastada (28 AML, 14 ALL) survivin ekspresyonu RT-PZR ile çalışılmış ve hastaların tanı anı örneklerinin hepsinde ve kontrol grubundaki tüm örneklerde survivin ekspresyonunun varlığı gösterilmiştir (%100). Shinozawa I ve ark (2000) northern blott tekniği ile çalışmışlar ve survivin ekspresyonun oranını hem normal PK örneklerinde hem ALL hastalarında bizden düşük bulmuşlardır (125).

Bunun muhtemel nedeninin kullanılan metodun duyarlılığından kaynaklandığı ve RT-PCR'ın survivin ekspresyon analizinde daha iyi bir teknik olduğu kanısındayız. Zaten birçok çalışmada hematolojik malignitelerde gen ekspresyonu çalışılmasında RT-PCR yönteminin duyarlı bir yöntem olduğu gösterilmiştir. Adida C ve arkadaşları (126) da immunohistokimyasal olarak AML hastalarında survivin ekspresyonunu tespit etmişlerdir (%60). Biz Adida C ve arkadaşlarından farklı olarak survivin ekspresyon oranını AML hastalarının hem PK hem Kİ örneklerinde %100 bulduk. Bu farklılık muhtemelen kullanılan metoddan kaynaklanmaktadır. Diğer taraftan Oto ÖA ve ark (2007) da RT-PZR yöntemi ile akut lösemi hasta grubunda (ALL, AML) survivin ekspresyonunu bizden daha düşük oranda bulmuşlardır.

Çalışmamızda AML hastalarının Kİ örnekleri survivin ekspresyonu kontrol grubu PK örneklerindeki anlamli şekilde yüksek bulunmuştur ($P<0,05$). Aynı zamanda hem AML hastalarının, hem ALL hastalarının tanı anı PK örneklerinde survivin ekspresyonundaki artış, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamli bulunmuştur ($P<0,05$). Sonuçlarımız bu yönüyle Paydaş S ve arkadaşlarının bulguları ile uyumludur. Ancak ALL ve AML hastalarının gerek PK, gerekse Kİ örnekleri arasında survivin ekspresyonunda anlamli bir farklılık gözlenmedi. Ayrıca hastaların tanı anı ve remisyon örnekleri arasında da istatistiksel olarak anlamli bir fark bulunamadı. Bunun nedeninin hasta sayısının az olması olabileceği gibi hastalarda lösemi alt tipindeki çeşitlilikten kaynaklı olabileceği düşüncesindeyiz.

Nüks eden AML ve ALL hastalarının nüks öncesi örneklerinde survivin gen ekspresyonunda artış ya da azalma görülmedi. Bu sonuç bizi survivin geninin akut lösemili hastalarda MRH takibinde kullanılabilir bir markır olamayacağı düşüncense yönlendirdi. Avgitidou A ve ark. survivin geninin MRH takibinde kullanılabileceği konusunda çalışmalar yapılmasının faydalı olacağını belirtmişlerdir. Bizim yaptığımız çalışma bu konuda bir ilk olmuştur. Ancak sonuçta survivin geninin MRH takibinde kullanılabilir bir makır olamayacağı sonucu ağırlık kazanmaktadır.

Survivin geni için ROC curve analiz ile bulunan cut off değeri (0.765, sensitivite %90) ALL hastalarının PK örnekleri ile normal bireylerin PK örnekleri arasında survivin geni ekspresyonundaki farklılığı da kesin bir şekilde göstermiştir (şekil 19). Bu durumda survivin genide WT1, KDR ve Nrpl geni gibi yeni tanı ALL hastalarında hastalığın varlığını ortaya koyan bir markır olarak kullanılabileceği görülmektedir.

Araştırmamızda çeşitli yayınlarda MRH takibinde kullanılabileceği ileri sürülen WT1 gen ekspresyonunun NRP1, BIRC5, VEGFA ve KDR ekspresyonları ile uyumluluğunun tespiti için *korelasyon analizi* yapılmış ve her grupta WT1'e göre diğer gen ekspresyonlarındaki artış ve azalmalar karşılaştırılmıştır.

Kontrol grubunda WT1 gen ekspresyonunda BIRC5 ile orta, KDR ile güçlü bir korelasyon bulunurken; VEGFA ve NRP1 ile orta derecede negatif korelasyon gözlemlendi. ALL hastalarının Kİ örnekleri NRP1, BIRC5, VEGFA ve KDR ekspresyonlarının WT1 ile korelasyonuna baktığımızda BIRC5 (0,533) ve KDR (0,411) ile orta derecede bir korelasyon (doğru orantı) gözlemlendi. Yani hastalarda WT1 ekspresyonu ile birlikte BIRC5 ve KDR gen ekspresyonları da arttı. ALL hastalarının PK örneklerinin WT1 ekspresyonlarının ile NRP1 ekspresyonu arasında zayıf bir korelasyon gözlemlendi.

AML hastalarının Kİ örnekleri NRP1, BIRC5, VEGFA ve KDR ekspresyonlarının WT1 ile korelasyonuna baktığımızda VEGFA ile iyi derecede (0,65) bir korelasyon gözlemlendi. AML hastalarının PK örnekleri NRP1, BIRC5, VEGFA ve KDR ekspresyonlarının WT1 ile korelasyonuna baktığımızda BIRC5 (0,533) ile orta derecede bir korelasyon, NRP1 ile negatif yönde zayıf bir korelasyon (-0,234) gözlemlendi.

Araştırmamız sonucunda WT1, VEGFA, KDR, NRP1 ve survivin genlerinin AML ve ALL hastalarındaki ekspresyonların belirlendi. WT1 geninin akut lösemilerde MRH takibinde kullanılabılır bir markır olduğu tespit edildi. Aynı zamanda VEGFA genin de özellikle ALL hastalarında MRH takibinde kullanılabileceği gösterildi.

Bu konuda yapılacak başka çalışmaların VEGF ve reseptörleri ile Survivin'in hematolojik malignitelerin patofizyolojisindeki ve AML progresyonundaki rolünü anlamaya katkı sağlayacağına inanıyoruz. VEGF'ün minimal rezidüel hastalık (MRH) göstergesi olarak kabul edilebilmesi için çalışmamızı destekleyecek daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu kanısındayız.

6. KAYNAKLAR

1. Lansowsky P. Leukemias (ed). Manual of Peadiatric Hematol and Oncol 3rd ed. Churchill Livinstone, New York, 2000;14: 359-411
2. Pui CH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia. New Eng J Med 1998;339(9): 605-615
3. Bennett J, Catovsky D, Daniel M. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia (AML-M0). Br J Haematol 1991;78:325.
4. Catovsky, D, Matutes, E, Bucchini. A classification of acute leukaemia for the 1990s. Ann Hematol 1991;62:16-19.
5. Kosary CL, Ries LAG, Miller BA, Hankey BF, Edwards BK. SEER cancer statistics review, 1973-1992: tables and graphs. Bethesda, Md.: National Cancer Institute, 1995.
6. Cortes JE, Kantarjian HM. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review with emphasis on biology and therapy. Cancer 1995;76:2393.
7. Hamerschlak N, Leukemia: Genetics and prognostic factors. J Pediatr (Rio J).2008;84: S52-57.
8. avdar AO. Geliřmekte olan ülkelerde çocukluk ağı malign hastalıkları.TÜBİTAK, 1997

9. Sezer U, Yağız H, Eltas A, Lenfoblastik lösemide oral bulgular (olgu sunumu) Atatürk Üniv. Diak. Derg. 2006: 85-87
10. Gedikoğlu G, Koç L. Neoplastik hastalıklar. In: "O. Neyzi, L. Koç (eds). Çocuk sağlığı ve hastalıkları cilt III" Bayda yayınları, İst. 1983:311-365
11. Leventhal BG. Neoplasm and neoplasm-like structures. In: Nelson Textbook of Pediatrics. Philadelphia 1987:1077-1100
12. Robinson LL. Environmental exposures as risk factor for childhood ALL. Cancer RES. 1987; 28: 249-255
13. Gralnick HR, Galton DAG, Catovsky D, Sultan C, Bennett JM. Classification of acute leukemia. Ann Intern Med. 1997; 87: 740-753
14. Deschler B, Lübbert M. Acute Myeloid Leukemia: Epidemiology and Etiology. Cancer 2006;107:2099-107
15. Kirsh IR. Molecular biology of leukemias. Pediatrics Clin North Am. 1988;35(49):693-727
16. Kern William F, PDQ Hematoloji. BC Decker, Hamilton, London. İstanbul Medikal Yayıncılık, 2005
17. Poplack DG, Morgolin. Management of common cancers of childhood. In: Poplack DG, editors. Principles and Practice of Pediatric Oncology I. Philadelphia: Saunders, 1997:409-504.
18. Rinsky R.A.. Benzene and leukemia. N Eng J Med, 1987;316:1034-1050
19. Steinherz PG, Gaynon PS, Breneman JC, et al. Cytoreduction and prognosis in acute lymphoblastic leukemia – the importance of early marrow response: report from the Childrens Cancer Group. J Clin Oncol 1996; 14(2):389-398
20. Ries LA, Kosary CL, Hankey BF, et al., eds. SEER Cancer Statistics Review, 1973-1996
21. Levine EG, Bloomfield CD. Leukemias and myelodysplastic syndromes secondary to drug, radiation, and environmental exposure. Semin Oncol 1992; 19:47-84
22. Smith MA, Ries LA, Gurney JG, et al. Leukemia. In: Ries LA, Smith MA, Gurney JG, et al., eds. Cancer Incidence and Survival Among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995. Bethesda, Md: National Cancer Institute, SEER Program, NIH Pub. No. 99-4649, 1999:17-34
23. Pavelic ZP, Pavelic L, Gluckman JL, et al. Expression of multidrug resistance (MDR1) gene in human normal tissues and head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) (Meeting abstract). Anticancer Drugs 5 (supply 12): 1994

24. Nowell P, Hungerford D. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*. 1960;132:1497.
25. Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies in human leukemia. II. Chronic granulocytic leukemia. *J Natl Cancer Inst*. 1961;27:1013-35.
26. Weisser M, Kern W, Rauhut S, et al. Prognostic impact of RT-PCR-based quantification of WT1 gene expression during MRD monitoring of acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2005;19:1416-1423.
27. Summers K, Stevens J, Kakkas I, et al. Wilms' tumour 1 mutations are associated with FLT3-ITD and failure of standard induction chemotherapy in patients with normal karyotype AML. *Leukemia*. 2007;21:550-551.
28. Baldus CD, Tanner SM, Ruppert AS, et al. BAALC expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: a Cancer and Leukemia Group B Study. *Blood*. 2003;102:1613-1618.
29. Marcucci G, Maharry K, Whitman SP, et al. High expression levels of the ETS-related gene, ERG, predict adverse outcome and improve molecular risk-based classification of cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol*. 2007;25:3337-3343.
30. Heuser M, Beutel G, Krauter J, et al. High meninoma 1 (MN1) expression as a predictor for poor outcome in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Blood*. 2006;108:3898-3905.
31. Lugthart S, van Drunen E, van Norden Y, et al. High EVI1 levels predict adverse outcome in acute myeloid leukemia: prevalence of EVI1 overexpression and chromosome 3q26 abnormalities underestimated. *Blood*. 2008;111:4329-4337.
32. Padró T, Bieker R, Ruiz S, Steins M, Retzlaff S, Bürger H, Büchner T et al. Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its cellular receptor KDR (VEGFR-2) in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2002 Jul;16(7):1302-10.
33. Kızıldaş A. Çocukluk çağı akut lösemilerde serum fas ve fas ligand düzeyleri. Çukurova Üni. Tıp Fak. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları, uzmanlık tezi 2008.
34. Mutlu N. BFM-2000 protokolü almış akut lenfoblastik lösemili çocuklarda miyeloid işaretli pozitifliğinin prognostik değeri ve diğer prognostik faktörler ile ilişkisi. Bakırköy Doğumevi Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi. Uzmanlık Tezi

35. Pullen J, Shuster JJ, Link M, Borowitz M, Amylon M, Carroll AJ, et al. Significance of commonly used prognostic factors differs for children with T cell acute lymphocytic leukemia (ALL), as compared to those with B-precursor ALL. A Pediatric Oncology Group (POG) study. *Leukemia*. 1999;13:1696-707.
36. Ramakers-van Woerden NL, Pieters R, Loonen AH, Hubeek I, van Drunen E, Beverloo HB, et al. TEL/AML1 gene fusion is related to in vitro drug sensitivity for L-asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2000;96:1094-6.
37. Pui CH, Schrappe M, Ribeiro RC, Niemeyer CM. Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemias. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004:118-45.
38. Simultaneous detection of MDR1 and WT1 gene expression to predict the prognosis of adult acute lymphoblastic leukemia. *Hematology*, Volume 15, Number 2, April 2010 , pp. 74-80(7)
39. Campana D, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical. *Blood*. 1995;8: 813-818.
40. Faderl S, Kurzrock R, Estrov Z. Minimal Residual Disease in Hematologic Malignancies. *Arc Pathol Mol Med* 1999; 123: 1030-1034.
41. Shook D, Coustan-Smith E, Ribeiro R, Rubnitz J at all, Minimal residual disease quantitation in acute myeloid leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2009 ; 9(Suppl 3): S281–S285
42. Kern W, Haferlach C, H Torsten, Schnittger S. Monitoring of Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer* 2008;112:4–16.
43. Cave H, van der Werften Bosch J, Suciu S, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Eng J Med* 1998;339:591
44. Pongers-Willemse MJ, Seriu T, Stolz F, d'Aniello E, Gameiro P, Pisa P, Gonzalez M, Bartram CR, Panzer-Grümayer ER, Biondi A, San Miguel JF, van Dongen JJM. Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets. Report of The Biomed-1 Concerted Action: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*. 1999;13:110
45. Foroni L, Harrison CJ, Hoffbrand AV, et al. Investigation of minimal residual disease in childhood and adult acute lymphoblastic leukemia by molecular analysis. *Br J Haematol* 1999;105:7

46. San Miguel JF, Vidriales MB, Lopez-Berges C, et al. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. *Blood* 2001;98:1746–51.
47. Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, Hills RK, Daly S, Jovanovic JV at all. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study. *J Clin Oncol.* 2009 Nov 1;27(31):5195-201.
48. Sakamoto Y, Mariya Y, Sasaki S, Teshiromori R, Oshikiri T, Segawa M. WT1 mRNA Level in Peripheral Blood Is a Sensitive Biomarker for Monitoring Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* Vol. 219 (2009) , No. 2 pp.169-176
49. Grimwade D, Walker H, Harrison G, Oliver F, Chatters S, Harrison CJ, Wheatley K, Burnett AK, Goldstone AH; Medical Research Council Adult Leukemia Working Party. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood* 2001;98:1312-20.
50. Mrozek K, Heinonen K, Bloomfield CD. Clinical importance of cytogenetics in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001;14:19-47.
51. Larson RA, Williams SF, Le Beau MM, Bitter MA, Vardiman JW, Rowley JD. Acute myelomonocytic leukemia with abnormal eosinophils and inv(16) or t(16;16) has a favorable prognosis. *Blood* 1986;68:1242-9.
52. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D at all. Standardization and quality control studies of "real-time" quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) of fusion gene transcripts for minimal residual disease detection in leukemia –A Europe Against Cancer Program. *Leukemia* 2003; 17: 2318-57
53. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, Bi W, Dee R, van der Schoot E, Delabesse E at all. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia* 2003; 17: 2474-86.
54. Sanz MA, Martin G, Rayon C, Esteve J, Gonzalez M, Diaz-Mediavilla J, Bolufer P, at all. A modified AIDA protocol with anthracycline-based consolidation results in high

- antileukemic efficacy and reduced toxicity in newly diagnosed PML/RARalpha positive acute promyelocytic leukemia. PETHEMA group. *Blood* 1999;94:3015–21.
55. Avvisati G, Lo Coco F, Diverio D, Falda M, Ferrara F, Lazzarino M, Russo D, Petti MC, Mandelli F. AIDA (all-trans retinoic acid + idarubicin) in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: a Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto pilot study. *Blood* 1996;88:1390-8.
 56. Perego RA, Marengo P, Bianchi C, Cairoli R, Urbano M, Nosari AM, Muti G, Morra E, Del Monte U. PML/RAR alpha transcripts monitored by polymerase chain reaction in acute promyelocytic leukemia during complete remission, relapse and after bone marrow transplantation. *Leukemia* 1996;10:207-12.
 57. Koller E, Karlic H, Krieger O, Mistrik M, Michlmayr G, Gadner H, Lutz D, Heinz R, Pittermann E. Early detection of minimal residual disease by reverse transcriptase polymerase chain reaction predicts relapse in acute promyelocytic leukemia. *Ann Hematol* 1995;70:75-8.
 58. Korninger L, Knobl P, Laczika K, Mustafa S, Quehenberger P, Schwarzingner I, Lechner K, Jaeger U, Mannhalter C. PML-RAR alpha PCR positivity in the bone marrow of patients with APL precedes haematological relapse by 2–3 months. *Bri J Haematol* 1994;88:427–3.
 59. Laczika K, Mitterbauer G, Korninger L, Knobl P, Schwarzingner I, Kapiotis S, Haas OA, Kyrle PA, Pont J, Oehler L, et al. Rapid achievement of PML-RAR alpha polymerase chain reaction (PCR)-negativity by combined treatment with all-trans-retinoic acid and chemotherapy in acute promyelocytic leukemia: a pilot study. *Leukemia* 1994;8:1-5.
 60. Scholl C, Breitinger H, Schlenk RF, Dohner H, Frohling S, Dohner K. Development of a real-time RT-PCR assay for the quantification of the most frequent MLL/AF9 fusion types resulting from translocation t(9;11)(p22;q23) in acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;38:274–80.
 61. Weisser M, Kern W, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T, Schnittger S. Risk assessment by monitoring expression levels of partial tandem duplications in the MLL gene in acute myeloid leukaemia. *Haematologica* 2005;90:881-9.
 62. .Marcucci G, Caligiuri MA, Dohner H, Archer KJ, Schlenk RF at all. Quantification of CBFbeta/MYH11 fusion transcript by real time RT-PCR in patients with INV(16) acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2001;15:1072–80.

63. Krauter J, Gorlich K, Ottmann O, Lubbert M, Dohner H at all. Prognostic value of minimal residual disease quantification by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction in patients with core binding factor leukemias. *J Clin Oncol* 2003;21:4413-22;
64. Guerrasio A, Pilatrino C, De Micheli D, Cilloni D, Serra A at all. Assessment of minimal residual disease (MRD) in CBFbeta/MYH11-positive acute myeloid leukemias by qualitative and quantitative RT-PCR amplification of fusion transcripts. *Leukemia* 2002;16:1176-81
65. Gokbuget N, Raff R, Brugge-Mann M, Flohr T, Scheuring U, Pfeifer H at all. Risk/MRD adapted GMALL trials in adult ALL. *Ann Hematol.* 2004; 83 (Suppl 1): S129-31.
66. van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G at all. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999; 13: 1901-28
67. Asnafi V, Radford-Weiss I, Dastugue N, Bayle C, Leboeuf D, Charrin C at all. CALM-AF 10 is a common fusion transcript in T-ALL and is specific to the TCRgammadelta lineage. *Blood* 2003; 102:1000-1006.
68. Brueggemann M, Droese J, Raff TH, et al: The prognostic significance of minimal residual disease in adult standard risk patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 98;314a, 2001
69. Mattson C, Uzunel M, Tammik I, Aschan J, Ringden O. Leukemia lineage-specific chimerism analysis is a sensitive predictor of relapse in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 2001;15:1976-1985.
70. Wagner KD, Wagner N and Schedl A. The complex life of WT1. *Journal of Cell Science.* 2003; 116, 1653-1658
71. Inoue, K., Ogawa, H., Yamagami, T., Soma, T., Tani, Y., Tatekawa, T., Oji, Y., at all. (1996) Long-term follow-up of minimal residual disease in leukemia patients by monitoring WT1 (Wilms tumor gene) expression levels. *Blood*, 88, 2267-2278.
72. Cilloni D, Saglio G. WT1 as a universal marker for minimal residual disease detection and quantification in myeloid leukemias and in myelodysplastic syndrome. *Acta Haematol.*, (2004) 112, 79-84.

73. Hamalainen M, Kairisto V, Juvonen V, Johansson J, Aure'n J at all. Wilms tumour gene 1 overexpression in bone marrow as a marker for minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *European Journal of Haematology*, 2008;80 (201–207
74. Erdem F, Gündoğdu M. Anjiojenesis Ve Anti-Anjiojenik Tedavi AÜTD 2005; 37: 1-6
75. Padro T, Ruiz S, Bieker R, et al. Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2000; 95: 2637-44
76. Klagsbrun M, D'Amore P. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996; 7: 259-70
77. Özçelik Ö, Ali R, Özkalemkaş F, Özkocaman V, Ozan Ü ve arkadaşları. Akut Lösemili Hastalarda Anjiogenezinin Değerlendirilmesi Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi,29 (2): 1-6, 2003
78. Koçar B. Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri Olgularının Serum Vegf Ve Cea Değerleri Ve Mediastinal Lenfadenopati Pozitifliği (Mediastinoskopik Tetkik İle) Arasındaki Korelasyon Yedikule Göğüs Hastalıkları Ve Göğüs Cerrahisi Eğitim Ve Araştırma Hastanesi. Uzmanlık Tezi,2003
79. Olgar Ş, Yetkin S. Anjiogenezis. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*.2003;46;139-147
80. Yazır Y, Gonca S, Filiz S, Dalçık H. Endotel Hücreleri İçin Önemli Bir Protein Ailesi; Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (Vegf), Ailenin Üyeleri, Yapısı ve Sentezi . C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi 26 (4):181 – 184, 2004
81. Dai J. and Rabie A.B.M.VEGF: an Essential Mediator of Both Angiogenesis and Endochondral Ossification. *J Dent Res* 86(10):937-950, 2007
82. Vincenti V,Cassano C,Rocchi M, and Persico G.Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3 *Circulation* 1996;93:1493-95
83. Siemester G.,Marme D, and Martini Baron G.The alfahelical domain near the amino terminus essential for dimerization of vascular endothelial growth factor .*J.Biol Chem* 1998b;273:11115-120
84. Gerber HP, Ferrara N .The role of VEGF in normal and neoplastic hematopoiesis. [J Mol. Med.](#)2003 81: 1, 20-31
85. Takagi H., King G.,Robinson G.,Ferrara N., and Aillo L.P.Adenosine mediates hypoxic induction of vascular endothelial growth factor in retinal pericytes and endothelial cells.*Invest oftalmol Vsi Since* 1996;37:21676

86. Terman B.I., Dougher Vermazen M., Maglione D., Lassam N.J., Gasporadowicz D., and Bohlen P. Identification of the KDR tyrosine kinase a reseptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys. Res Commun* 1992;187:1579-86
87. B. L. Ziegler, M. Valtieri, G. Almeida Porada, R. De Maria, R. Müller at all. KDR Receptor: A Key Marker Defining Hematopoietic Stem Cells. *Science* 1999;Vol. 285. no. 5433, pp. 1553 - 1558
88. Bielenberga DR., Pettawayb AC, Takashimad S, Klagsbrun M. Neuropilins in neoplasms: Expression, regulation, and function. *Experimental Cell Research* 312 (2006) 584 – 593
89. Soker S., Takashima S., Miao H., Neufeld G., and Klagsbrun M. Neuropilin -1 is expressed by endothelial and tumor cells and an isoform-specific reseptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 1998;92:735-45
90. Lu L, Zhang L, Xiao Z, Lu S, Yang R, Han ZC. Neuropilin-1 in acute myeloid leukemia: expression and role in proliferation and migration of leukemia cells. *Leuk Lymphoma*. 2008 Feb;49(2):331-8.
91. Wang C, Chen FY, Zhu JS, Xu YP, Han JY, Ouyang RR. Dynamic observation of vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF-receptors expression in acute leukemia. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. 2004 Nov;43(11):845-8.
92. Vales A, Kondo R, Aichberger KJ, Mayerhofer M, Kainz B, Sperr WR at all. Myeloid leukemias express a broad spectrum of VEGF receptors including neuropilin-1 (NRP-1) and NRP-2. *Leuk Lymphoma*. 2007 Oct;48(10):1997-2007.
93. Fiedler W, Mesters R, Tinnefeld H, et al. A phase 2 clinical study of SU5416 in patients with refractory acute myeloid leukemia. *Blood* 2003;102:2763-2767)
94. Mesters RM, Padró T, Steins M, Bieker R, Retzlaff S, Kessler T, Kienast J, Berdel WE. Angiogenesis in patients with hematologic malignancies *Onkologie*. 2001 Sep;24 Suppl 5:75-80.
95. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis a basic biological phenomenon with wide ranging implication in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972; 26:239-257.
96. Öktem Ö, Özhan M, Özol D. Apoptozisin Önemi. *Toraks Dergisi*, 2001;2(1):91-95
97. Ryan BM, O'Donovan N, Duffy MJ. Survivin: A new target for anti-cancer therapy. *Cancer Threat. Rev* (2009).doi:10.1016

98. Oto ÖA. Akut Ve Kronik Lösemilerde Survivin Ve Epr-1 (Effektör Hücre Proteaz -1) Ekspresyonunun Prognostik Önemi Çukurova Üniversitesi Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi
99. Invernizzi R, Travaglio E, Lunghi E, Klersy C, Bernasconi P et al. Survivin Expression in Acute Leukemias and Myelodysplastic Syndromes. *Leukemia & Lymphoma*, 2004 Vol. 45 (11), pp. 2229–2237
100. Kubista M, Andrade J, et al, The Real-Time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*. 2006;27(2-3):95-125
101. Wilhelm J, Pingoud A. Real-Time polymerase chain reaction, *ChemBioChem*, 2003;4:1120-1128
102. Savlı H, Hatırnaz Ö. Sayımsal Gerçek Zamanlı-Polimer Zincir Reaksiyonu ve Hematolojik Gen Anlatım Analizleri Türkiye Klinikleri J Med Sci 2004, 24:653-660
103. VHJ van der Velden, A Hochhaus, G Cazzaniga, T Szczepanski, J Gabert and JJM van Dongen. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* (2003) 17, 1013–1034
104. Østergaard M, Olesen LH, Hasle H, Kjeldsen E, Hokland P. WT1 gene expression: an excellent tool for monitoring minimal residual disease in 70% of acute myeloid leukaemia patients - results from a single-centre study. *Br J Haematol*. 2004 Jun;125(5):590-600.
105. Kern W, Schoch C, Haferlach T, Schnittger S. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia .*Critical Reviews in Oncology/Hematology* Volume 56:2; 2005,p 283-309
106. Nowakowska-Kopera A, Sacha T, Florek I, Zawada M, Czekalska S and Skotnicki AB. Wilms' tumor gene 1 expression analysis by real-time quantitative polymerase chain reaction for monitoring of minimal residual disease in acute leukemia 2009, Vol. 50, No. 8 , Pages 1326-1332
107. Candoni A, Tiribelli M, Toffoletti E, Cilloni D, Chiarvesio A et al. Quantitative assessment of WT1 gene expression after allogeneic stem cell transplantation is a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol*. 2009 Jan;82(1):61-8. Epub 2008 Sep 17.
108. Ogawa H, Tamaki H, Ikegame K, Soma T, Kawakami M, Tsuboi A et al. The usefulness of monitoring WT1 gene transcripts for the prediction and management of relapse

- following allogeneic stem cell transplantation in acute type leukemia. *Blood*. 2003 Mar 1;101(5):1698-704. Epub 2002 Oct 24.
109. Busse A, Gökbuget N, Siehl JM, Hoelzer D, Schwartz S at all. Wilms' tumor gene 1 (WT1) expression in subtypes of acute lymphoblastic leukemia (ALL) of adults and impact on clinical outcome. *Ann Hematol*. 2009 Dec;88(12):1199-205. Epub 2009 Apr 29.
 110. Lim CK, Goh YT, William Y. K. Hwang, Ho LP, Sun L. Studies of Wilms' Tumor (WT1) Gene Expression in Adult Acute Leukemias in Singapore. *Biomark Insights*. 2007; 2: 293–298.
 111. Elmaagacli AH. Molecular methods used for detection of minimal residual disease following hematopoietic stem cell transplantation in myeloid disorders. *Methods Mol Med*. 2007;134:161-78.
 112. Gu WY, Chen ZX, Cao XS, Hu SY, Zhu J, Wang ZL at all. Detection of WT1 expression in bone marrow of acute leukemia patients with real-time quantitative RT-PCR. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 2004 Dec;25(12):728-31.
 113. Gu WY, Chen ZX, Hu SY, Zhu J, Wang ZL, Yan F at all. Significance of dynamic detection of WT1 expression on monitoring minimal residual disease in leukemia patients following allogeneic bone marrow transplantation. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2005 Feb 23;85(7):444-7.
 114. Bellamy WT. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in multiple myeloma and other hematopoietic malignancies, *Semin Oncol*. 2001 Dec;28(6):551-9.
 115. Padró T, Bieker R, Ruiz S, Steins M, Retzlaff S, Bürger H at all. Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its cellular receptor KDR (VEGFR-2) in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2002 Jul;16(7):1302-10.
 116. Wang Y, Xiao ZJ, Liu P, Yang C, Yang RC, Cai YL, Han ZC. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors KDR and Flt1 in acute myeloid leukemia. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 2003 May;24(5):249-52.
 117. Xu D, Meng FY, Zhang Y. Expression of vascular endothelial growth factor in bone marrow cells of patients with acute myeloid leukemia. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*. 2002 Apr;22(4):357-9.

118. Ye XJ, Lin MF. The relationship between expression of the vascular endothelial growth factor and acute leukemia subtype. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 2005 Jun;26(6):363-6.
119. Hiramatsu A, Miwa H, Shikami M, Ikai T, Tajima E, Yamamoto H, Imai N atall. Disease-specific expression of VEGF and its receptors in AML cells: possible autocrine pathway of VEGF/type1 receptor of VEGF in t(15;17) AML and VEGF/type2 receptor of VEGF in t(8;21) AML. *Leuk Lymphoma*. 2006 Jan;47(1):89-95.
120. Kreuter M, Steins M, Woelke K, Buechner T, Berdel WE, Mesters RM. Downregulation of neuropilin-1 in patients with acute myeloid leukemia treated with thalidomide. *Eur J Haematol*. 2007 Nov;79(5):392-7. Epub 2007 Oct 3.
121. Xiong HX, Chen BA, Ding JH. Advance of research on survivin in hematological malignancies-review. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2004 Dec;12(6):866-9
122. Avgitidou A, Tsiga A, Ioannidou-Papayannaki E, Klonizakis F, Vlachaki E, VEGF and Survivin mRNA Expression In AML Patients With Long-Term Complete Remission.
123. Paydas S, Tanriverdi K, Yavuz S, Disel U, Sahin B, Burgut R. Survivin and aven: two distinct antiapoptotic signals in acute leukemias. *Ann Oncol* (2003) 14 (7): 1045-1050.
124. Oto ÖA, Paydas S, Tanriverdi K, Seydaoglu G, Yavuz S, Disel U. Survivin and EPR-1 expression in acute leukemias: Prognostic significance and review of the literature. *Leukemia Research* 31 (2007) 1495–1501
125. Shinozawa I, Inokuchi K, Wakabayashi I, Dan K. Disturbed expression of the anti-apoptosis gene, survivin, and EPR-1 in hematological malignancies. *Leuk Res*. 2000 Nov;24(11):965-70.
126. Adida C, Recher C, Raffoux E, Daniel MT, Taksin AL, Rousselot P, Expression and prognostic significance of survivin in de novo acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2000 Oct;111(1):196-203.

EKLER

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
İLAÇ ARAŞTIRMALARI YEREL ETİK KURULU
(Talas Yolu Üzeri 38039 KAYSERİ Tel 0 352 437 49 10 -11 Faks: 0 352 437 52 85)

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU			
	PROTOKOL ADI	Wilm's Tümör, Vasküler Endotelyal Faktör, Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör Reseptörü 2, Neuropilin ve Survivin genlerinin ekspresyonunun minimal residuel hastalık takibinde kullanılabilirliğinin araştırılması.		
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Prof.Dr. Yusuf Özkul		
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı		
	BAŞVURULAN ETİK KURUL	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi		
	DESTEKLEYİCİ FİRMA			
	FAZİ			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	☒ Tek Merkez ☐ Ulusal	☐ Çok Merkez ☐ Uluslararası		

DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Değişiklik No.su	Dili	
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐
	ARAŞTIRICI BROŞÜRÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ			Türkçe ☐	İngilizce ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐

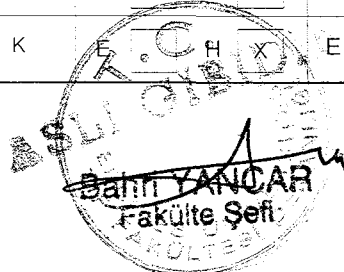
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 09/160	Karar : 07.04.2009
	Fakültemiz Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Yusuf Özkul'un sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen tek merkezli araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına ve kurulumuz kararının sorumlu araştırmacıya ve dekanlık mazamına arzına toplantıya katılan öğretim üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI İYİ KLİNİK UYGULAMALAR KLAVUZU

Ünvanı / Adı Soyadı Ek Üyeligi	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Kader KÖSE	Biyokimya	E.Ü. Tıp Fak.	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Sabahattin MUHTAROĞLU	Biyokimya	E.Ü. Tıp Fak.	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Olgun KONTAŞ	Patoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Murat AKSU	Nöroloji	E.Ü. Tıp Fak.	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	Radyodiyagnostik	E.Ü. Tıp Fak.	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Mustafa KENDİRCİ	Çocuk Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Oğuz EKMEKÇİOĞLU	Üroloji	E.Ü. Tıp Fak.	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Hasan Basri ULUSOY	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Zübeyde ÇELEBİ Avukat	Avukat	E.Ü.	K	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	

* Araştırma ile ilişkili
** Toplantıda bulunma



ÖZGEÇMİŞ

Hülya Şıvgın, 13.02.1979 yılında Kayseri’de doğdu. İlk ve Orta öğrenimini Kayseri’de tamamladı. 1996 yılında Niğde Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı, 2000 yılında mezun oldu. 2001-2004 yıllarında Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı. 2004 yılında Erciyes Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı’nda Doktora eğitime başladı. Aynı yıl Tıbbi Genetik Anabilim Dalı’nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladı. Halen Tıbbi Genetik Anabilim Dalı’nda çalışmaktadır.

E-posta: hulyasvgn@gmail.com

Tel: 0543 406 61 96