

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AKUT MYELOİD LÖSEMİ HASTALARINDA FLT3 VE NPM1 GEN
MUTASYONLARININ SIKLIĞININ BELİRLENMESİ VE KLİNİK
ÖNEMİNİN ARAŞTIRILMASI**

Gizem ALTAY

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü

BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

KOCAELİ

2021

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AKUT MYELOİD LÖSEMİ HASTALARINDA FLT3 VE NPM1 GEN
MUTASYONLARININ SIKLIĞININ BELİRLENMESİ VE KLİNİK
ÖNEMİNİN ARAŞTIRILMASI**

Gizem ALTAY

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü

BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Seda EREN KESKİN

Etik Kurul Onay No: KÜ GOKAEK 2020/225

KOCAELİ

2021



SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: Akut Myeloid Lösemi Hastalarında FLT3 ve NPM1 Gen Mutasyonlarının Sıklığının Saptanması ve Klinik Öneminin Araştırılması

Tez Yazarı: Gizem ALTAY

Tez Savunma Tarihi: 29.09.2021

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Seda EREN KESKİN

Bu çalışma, sınav kurulumuz tarafından Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında BİLİM UZMANLIĞI tezi olarak kabul edilmiştir.

Onay

Bu tez Kocaeli Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla onaylanmıştır.

.... /.... /2021

Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ
KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Akut Myeloid Lösemi Hastalarında FLT3 ve NPM1 Gen Mutasyonlarının Sıklığının Belirlenmesi ve Klinik Öneminin Araştırılması

Amaç: Akut Myeloid Lösemi(AML) hematopoetik sistemden kaynaklanan ve ilerleyen yaşla birlikte kendini gösteren malin bir hastalıktır. FLT3 ve NPM1 gen mutasyonları AML'nin prognozu açısından oldukça önemli yere sahiptir. Bu iki mutasyon moleküler genetik tekniklerle saptanabilmektedir. Bu retrospektif çalışmada, hedef gen mutasyonlarının sıklığı saptanarak, AML'nin klinik açıdan değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmada, 2013-2015 yılları arasında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Polikliniği'nden Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji AD laboratuvarına yönlendirilen 71 AML ön tanıılı hasta yer aldı. FLT3 ve NPM1 gen mutasyonları için çalışılan, iki ayrı Gerçek Zamanlı PZR(Real Time PCR) tekniği sonuçları geriye dönük biçimde incelendi. Bunun yanında arşiv ve hastane sisteminden elde edilen hasta bilgileri kullanılarak istatistiksel değerlendirmeler yapıldı.

Bulgular: Yapılan retrospektif incelemede 38 (%53,5) hastada FLT3, 7 (%9,8) hastada NPM1, 26 (%36,7) hastada ise hem FLT3 hem de NPM1 geni incelendi. Gerçek Zamanlı PCR tekniği kullanılarak yapılan mutasyon taraması sonucundan; toplam 8 (%11,2) hastada NPM1 mutasyonu, 4 (%5,6) hastada FLT3/ITD, 2 (%2,8) hastada ise FLT3/D835 mutasyonu saptanmıştır. Mutasyon saptanan 14 (%19,7) kişilik hasta grubu 13 (%92,8) erkek, 1 (%7,2) kadın hasta olarak gözlemlendi. Hastalara ait biyokimya ve hemogram değerleri istatistiksel olarak analiz edildi.

Sonuç: Çalışmamızda saptanan toplam %14'lük mutasyon pozitifliği, son zamanlarda yapılan çalışmalardaki oranlara göre daha az görülmüştür. Diğer yandan hastaların biyokimya ve hemogram parametreleri ile hastalığın patogenezi ve mutasyon sıklığı arasında anlamlı bir değer bulunamamıştır($p>0,5$). FLT3 mutasyonu kötü prognoz ile sonuçlanırken, NPM1 mutasyonunun daha iyi prognozla ilişkili olduğu farklı çalışmalarda bildirilmiştir. Hastalığın tanı ve tedavi planlamasında, iki mutasyonun taranması klinik seyrine önemli ölçüde katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: AML, FLT3, FLT3/ITD, FLT/D835, NPM1

ABSTRACT

Objective: Acute Myeloid Leukemia (AML) is a malin disease caused by the hematopoietic system and manifests itself with advancing age. FLT3 and NPM1 gene mutations are very important for the prognosis of AML. These two mutations can be detected by molecular genetic techniques. In this retrospective study, the frequency of target gene mutations was determined and evaluated clinically

Method: In the study, 71 patients with a diagnosis of AML were included in the 2013-2015 community who were referred to the Department of Medical Genetics and Molecular Biology, Department of Hematology, Department of Internal Medicine, Kocaeli University. Images from two different Real Time PCR techniques studied for FLT3 and NPM1 gene mutations were analyzed. In addition, detailed hardware evaluations taken from the archive and hospital are made.

Results: The total mutation positivity of 14% found in our study was less than in recent studies. On the other hand, no significant value was found between the biochemistry and hemogram parameters of the patients and the pathogenesis and mutation frequency of the disease($p>0.5$). FLT3 mutation results in poor prognosis, while NPM1 mutation has been reported in different studies to be associated with better prognosis. In the diagnosis and treatment planning of the disease, screening of the two mutations is thought to contribute significantly to the clinical course.

Conclusions: A total of 14% mutation positivity detected in our study was less than the rates in recent studies. On the other hand, no significant value was found between the biochemistry and hemogram parameters of the patients and the pathogenesis and mutation frequency of the disease ($p>0.5$). While FLT3 mutation results in poor prognosis, it has been reported in different studies that NPM1 mutation is associated with better prognosis. It is thought that screening for two mutations will contribute significantly to the clinical course of the disease in diagnosis and treatment planning.

Key Words: AML, FLT3, FLT3/ITD, FLT/D835, NPM1

TEŞEKKÜR

Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Hakan SAVLI'ya

Genetik alanında yüksek lisans eğitim şansı tanıyan, eğitim boyunca yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle her zaman destek olan Doç. Dr. Naci ÇİNE'ye

Tez çalışmam süresi boyunca danışmanlığımı üstlenen, destek ve ilgisini esirgemeyen, her aşamada öneri ve eleştirileri ile beni yönlendiren, anlayışı, güleryüzü ve her türlü paylaştığı bilgilerle yanımda olan değerli danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Seda EREN KESKİN'e

Başta Dr. Nilüfer SERTDEMİR olmak üzere, bu alanda gelişmeye katkı sağlayan tüm Tıbbi Genetik ailesine,

Her türlü sorunumu paylaştığım, yardımlarını ve desteğini hep hissettiğim Nurhan KÜLCÜ ve Cansu UĞURTAŞ'a

Bütün eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen canım AİLEM'e teşekkür ederim.

Gizem ALTAY

ORJİNALLİK BİLDİRİMİ

Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne, Bilim Uzmanlığı tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Akut Myeloid Lösemi Hastalarında FLT3 VE NPM1 Gen Mutasyonlarının Sıklığının Belirlenmesi ve Klinik Öneminin Araştırılması" başlıklı tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, şekil, tablo ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimde yer alan deneysel çalışmalar/araştırmalar bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yapılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususlar bir intihal programı (Turnitin vb.) kullanılarak test edilmiş olup, doğruluğunu beyan ederim

09 / 06 / 2021

Adı Soyadı

İmza

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ORJİNALLİK BİLDİRİMİ.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
ŞEKİLLER.....	xi
TABLolar.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Hematopoez.....	1
1.2 Kanser.....	3
1.3 Lösemiler.....	4
1.3.1. Lösemi Etiyolojisi ve Patogenezi.....	4
1.3.2. Akut Lösemiler.....	5
1.4. Akut Myeloid Lösemi.....	8
1.4.1. Klinik Bulgular.....	8
1.4.2. Laboratuvar Bulguları.....	9
1.4.3. Prognostik Faktörler.....	9
1.5. FMS Benzeri Tirozin Kinaz 3 (FLT3) Geni.....	10
1.5.1 FLT3 Ligandı.....	11
1.5.2 FLT3 ve Mutasyonlar.....	12
1.6. Nukleofosmin (NPM1) Geni.....	13
1.6.1 NPM1 Proteini.....	15

1.7 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	16
2. AMAÇ.....	18
3. YÖNTEM.....	19.
3.1. DNA İzolasyonu.....	19
3.2 RNA İzolasyonu.....	19
3.3. cDNA Aşaması.....	20
3.4. Gerçek Zamanlı PCR (Real Time PCR) Metodu.....	21
3.4.1 FL3 Mutasyonu Saptanması Real Time PCR ile Saptanması.....	21
3.4.1 Deney Öncesi Hazırlık Aşaması.....	22
3.4.2 PCR Kurulumu.....	23
3.4.3. Enzim Kesimi.....	23
3.4.2. NPM1 Mutasyonunun Real Time PCR ile Saptanması.....	24
3.5. Kullanılan Cihazlar.....	25
3.6. Sarf Malzemeler.....	26
3.7. Kullanılan Kitler ve Kimyasallar.....	26
3.8. Analiz.....	26
4. BULGULAR.....	27
5. TARTIŞMA.....	32
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	35
7.KAYNAKLAR.....	36
8.EKLER.....	39

SİMGELER ve KISALTMALAR

% : Yüzde

μ L : Mikro Litre

ALL : Akut Lenfositler Lösemi

AML : Akut Myeloid Lösemi

bp : Baz çifti

BT : Bilgisayarlı Tomografi

CD34 : Kök hücre

D835 : Aspartik Asit 835

DH : Dentrik Hücre

DNA : Deoksiribonükleik Asit

dnDNA : Tek zincirli DNA

dNTP : DNA nükleotid bazları

dsDNA: Çift zincirli DNA

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

FLK-2 : Fetal Karaciğer Kinaz-2)

FLT3 : FMS Benzeri Tirozin Kinaz 3

inv16 : İnversiyon 16

ITD : Internal Tandem Duplikasyonu

kDA : Kilo Dalton

KLL : Kronik Lenfositler Lösemi

KML : Kronik Myeloid Lösemi

LDH : Laktat Dehidrogenaz

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ DEVAMI

MDS : Myelodisplastik Sendrom

MR : Manyetik Rezonans

NPM : Nukleofosmin

°C: Santigrad

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)

RNA : Ribonikleik Asit

RTKIII : Reseptör Tirozin Kinaz 3

TM: Transmembran

WBC : White Blood Cell

WHO : Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Pluripotent kök hücre ve kök hücre kaynaklı hücre serileri.....	1
Şekil 1.2. Hematopoetik kök hücre farklılaşması.....	2
Şekil 1.3. FLT3'ün yapısı.....	11
Şekil 1.4. NPM1 varyantları.....	15
Şekil 1.6. NPM1 Geni üzerindeki işlevsel bölgeler.....	15
Şekil 1.7. PCR tekniği basamakları.....	17
Şekil 4.1 Yıllara Göre Mutasyon Sıklığı.....	28
Şekil 4.2 Yıllara Göre AML Alt Tiplerinin Sınıflandırılması.....	28

TABLULAR

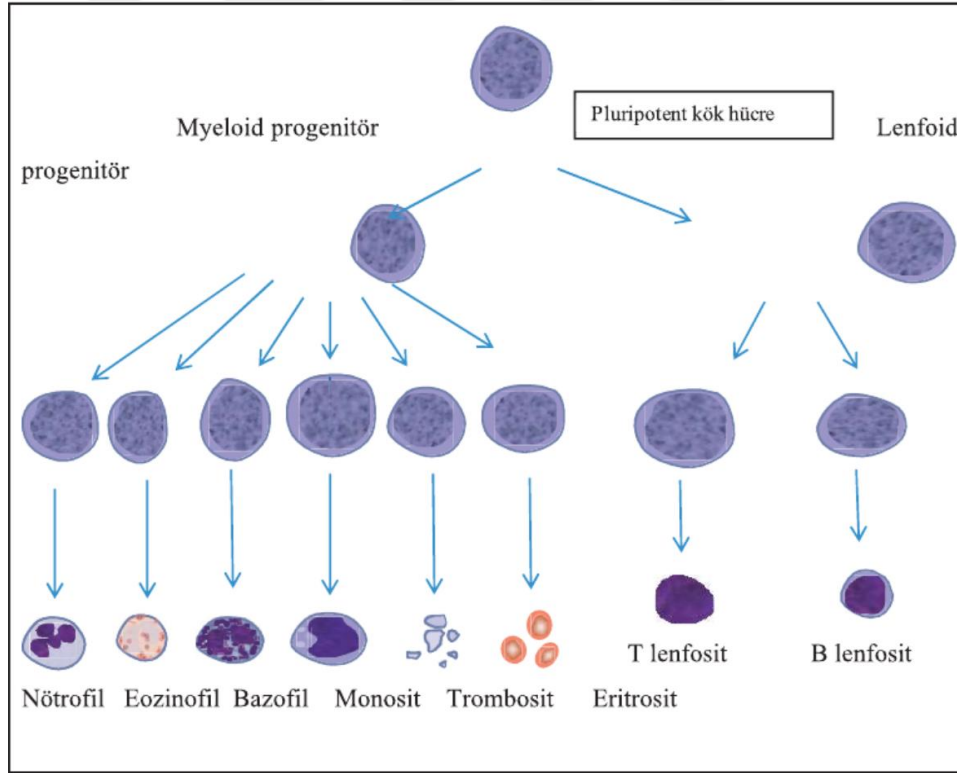
Tablo 1.1. Akut Lösemi FAB sınıflandırması.....	5
Tablo 1.2. Akut Lösemi WHO sınıflandırması.....	6
Tablo 1.3. AML sıklığının arttığı durumlar.....	8
Tablo 1.4. Genetik açıdan iyi ve kötü prognoz durumu.....	10
Tablo 3.1. Tampon miktarı.....	20
Tablo 3.2. cDNA çalışması bileşenleri.....	21
Tablo 3.3. Thermal Cycler cihaz protokolü.....	21
Tablo 3.4. Light Cycler için gerekli bileşenler.....	22
Tablo 3.5. PCR sonrası beklenen uzunluklar.....	23
Tablo 3.6. EcorV enzim bileşenleri.....	23
Tablo 3.7. Enzim ürünlerinin değerlendirilmesi.....	24
Tablo 3.8. PCR için gerekli olan bileşenler.....	25
Tablo 3.9. PCR termal döngü protokolü.....	25
Tablo 4.1. Hasta grubunun özellikleri.....	27
Tablo 4.2. Mutasyon Görülen Hastaların Hemogram Sonuç Tablosu.....	28
Tablo 4.3. Mutasyon Saptanmayan Hastaların Hemogram Sonuç Değerleri.....	29
Tablo 4.4. Mutasyon Görülen Hastaların Biyokimya Sonuç Değerleri.....	30
Tablo 4.5. Mutasyon Saptanmayan Hastaların Biyokimya Sonuç Değerleri.....	31
Tablo 4.6. AML hasta grubunun klinik verileri ile saptanan mutasyonlar.....	32
Tablo 4.7. Mutasyon Görülen Hastaların Flow Sitometri Sonuç Değerleri.....	36
Tablo 4.8. Hasta Grubunun Genetik Anomali Sonuç Tablosu.....	37



1. GİRİŞ

1.1 Hematopoez

İnsan vücudundaki kan hücrelerinin bütünü hematopoetik kök hücreler denilen, genç ve olgunlaşmamış hücrelerden oluşur. Bu oluşum süreci kemiklerin merkezinde bulunan süngerimsi bir doku olan kemik iliğinde gerçekleşir. Hematopoez insan yaşamı boyunca süren etkin bir süreçtir. Bu süreç tek bir tür kök hücreden bütün farklı kan hücrelerinin gelişim sürecini kapsayan ve kendisini yenileyerek değişik türlerde hücre dizilerine dönüşebilen pluripotent hücrelerden başlar (Şekil 1.1). Hematopoez iki basit işlem basamağından meydana gelir; bunlardan ilki kendini yenileyebilme diğeri ise yönelme ve farklılaşmadır. (Demir, & Köker, 2020, s. 1181).

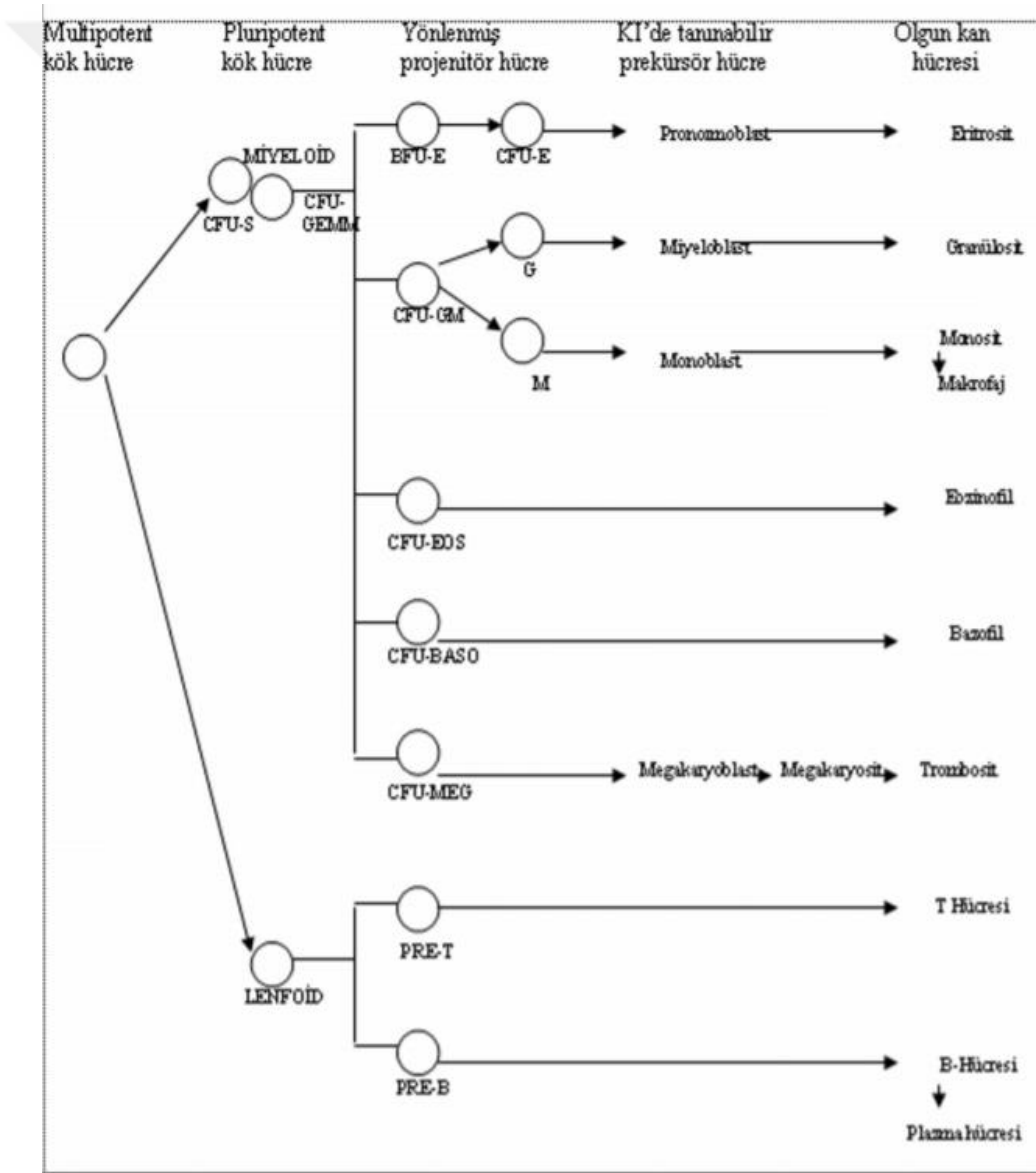


Şekil 1.1.. Pluripoten kök hücre ve kök hücre kaynaklı hücre serileri

Bölünme, farklılaşma ve olgunlaşma evrelerinden geçen; kök hücre ve progenitör hücre adı verilen kan hücreleri morfolojik olarak kolayca tanınabilen üç temel grupta incelenir.

Bunlar; eritrositler, trombositler ve çok farklı işlev ve yapıya sahip olan lökositler olarak bilinmektedir (Williams, 2000).

Kemik iliğindeki kan hücrelerinin geçirdiği bu süreçler, pluripotent kök hücrelerin progenitörler aracılığı sayesinde oluşarak; Bu kök hücreler myeloid ve lenfoid seri hücrelerine dönüştürülmek üzere yönlendirilirler. (Şekil 1.2.). Myeloid kök hücreler bütün myeloid dizi hücreleri olan eritrosit, granülosit(nötrofil, eozinofil, bazofil), monosit ve platetleri oluştururken; lenfoid kök hücreler, lenfoid dizi hücreleri B ve T lenfositlerine dönüşürler. Myeloid diziler kemik iliğinde gelişim gösterirken, lenfoid kök hücreler işlevsel aktif B hücreleri, kemik iliği ve lenfoid organlarda, T lenfositlerinin gelişimini ise timusta tamamlar. (Eminli ve ark., 2009).



Şekil 1.2. Hematopoetik kök hücre farklılaşması K, Kemik iliği; CFU, colony-forming unit; S, splen; GEMM, granülosit, eritrosit, monosit (veya makrofaj)-megakaryosit; BFU, burst-forming-unit, GM, granülosit, monosit; EOS, eozinofil, BASO, bazofil; MEG, Megakaryosit

Kök hücrelerin sahip olduğu temel özellikler sayesinde değişik birçok fonksiyona sahip bu kan hücreleri, insan yaşamı süresince yenilenerek sabit bir sayıda kalmaktadır. Bu yolla, örneğin; bir insan ömrü boyunca bir saat içinde $1-5 \times 10^9$ eritrosit ve $1-5 \times 10^9$ lökosit ürettiği belirlenmiştir. Kan kaybı ve enfeksiyon gibi ihtiyacın yükseldiği durumlarda bazı düzenleyici mekanizmalar ile hücre dağılımı ve yapım hızında fazlaca değişiklikler olabilir; diğer yandan bu yönelimlerin dışında bazı patolojik durumlarda ise direk kök hücre ilgili, aplostik anemi, lösemi, myeloproliferatif hastalıklar ve myelodisplastik gibi sorunlar meydana gelebilmektedir. (Williams ve ark., 2000)

1.2 Kanser

Kanserler oldukça fazla basamağa sahip bir patogeneze kaynak alırlar. Yakın zamanda yapılan genetik tabanlı çalışmalar, yüz binlerce bireyden alınan kan DNA'larına ilişkin, hematolojik maligniteler ve insan yaşı ile bağlantılı yaygın somatik mutasyonların varlığını ortaya çıkarmışlardır. Bu mutasyonlar öncül bir hücreden belirlenebilir hematopoetik çoğalmaya doğru genişleme oluşturur. Aslında bu klonal hematopoez durumunun yalnızca yüksek hematolojik malignite riski ile değil, bununla birlikte kardiyovasküler rahatsızlıklar ve genel ölüm oranı ile de bağlantıları vardır(Jan, Ebert, & Jaiswal, 2016).

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

- Hücrelerde sınırsız poliferasyon özelliği
- Büyümesini baskılayan faktörlere duyarlı olmaması
- Hücrelerde apoptozis görülmemesi
- Damar oluşumlarını(angioenezis) tetikleme
- Hücrelerin doku dışında başka bölgelere sıçraması(metastaz)
- Hücrelerin doku içine tam bir şekilde girmesi(invazyon) (Kumar ve ark., 2015;

Tahsinoğlu ve ark., 1981)

Tüm kanser tiplerinde rastlanan genomik değişimler, nokta mutasyonları, sayısal ve yapısal kromozomların bozuklukları olmaktadır. Genomdaki bu sayı ve yapı

anormalliklerinin yanında, birçok epigenetik mekanizmalarında kanser yapıcı etkilerinin olduğunu göstermiştir. Genetik açıdan kanser yapısına bakıldığında, kanserde mevcut olan genler, onkogenler ve tümör süpressör gen olarak iki ayrı farklı grupta incelenmektedir(Sakızlı & Atabey, 2006). Onkogenler; kanser başlangıcında rol oynayan, kontrolsüz proteinleri eksprese eden genlerdir. Tümör baskılayıcı genler ise; hücrenin başlıca fonksiyonlarında görev alan ve hücre poliferasyonunun eksi yönde kontrolünü yapan genlerdir.

1.3 Lösemiler

Kemik iliğinin insan yaşamını tehdit edici malign bozukluklardan meydana gelen, kan hücrelerinin kontrol dışı ve sınırsız biçimde bölünerek çoğalmasının sonucu oluşan hastalık grubudur(Wujcik, 2003).

Lösemiler; buldukları hücrenin tipine göre myeloid ve lenfoid, hücrelerin farklılaşma seviyelerine göre ise; akut veya kronik olarak sınıflandırılmaktadır(Ruddon, 2007)

1.3.2. Lösemi Etiyolojisi ve Patogenezi

Pluripotent hücrelerden kaynak alan kan hücreleri kemik iliğinde gelişip olgunlaşmış hücrelere dönüşürler. Bu süreçte hematopoez gerçekleşir. Lösemiler söz konusu olduğunda bu kan hücreleri olgunlaşmamış blast halde kalır. Bunun nedeni ise çekirdeğindeki genlerden veya Deoksiribonükleik asit(DNA) segmentlerinden birinin mutasyona uğramış olmasıdır. Bir gen mutasyona uğradığı zaman hücre olgunlaşma yeteneğini kaybeder. Bunun sonucu olarak da bölünme kontrolünü ve yeteneğini kaybeden birçok blast hücre ve olgunlaşmış çok az hücreler meydana gelir (Austin, & Delzell, & Cole 1998)

Lösemilerin ortaya çıkma sebepleri tam olarak bilinmemekle birlikte bazı durumlarda olası birçok neden belirlenebilmektedir. Bazı karsinojenlerin etkisiyle birlikte mutasyon, delesyon, kromozomal translokasyonlar ve genetik anomaliler meydana gelebilmektedir. Kimyasal bir karsinojen olan benzenin hematopoetik ve diğer kanser türlerine neden olduğu bildirilmiştir. Diğer yandan rasyasyonun da kromozomlarda farklılığa yol açtığı ve lösemi insidansını artırdığı bilinmektedir. (Moloney, 1987)

Kalıtsal etkenlerinde lösemi de önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Örneğin; Down sendromlu hastaların normal sağlıklı hastalara göre lösemi insidansı 16-30 kat daha fazla olduğu görülmüştür(Brothman et al. 2003; Ross et al, 2005). Ayrıca sayısal kromozomal anomalilerinin sebep olduğu hormonal ve genetik durumlardan dolayı Kliniferter ve Turner

sendromlu hastalarda sağlıklı bireylere göre lösemiye yakalanma riskinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir. (Gravholta ve ark., 1998; Halse ve ark., 1995).

1.3.3. Akut Lösemiler

Akut lösemiler, öncül ve kök hücrelerin tümörsel transformasyonu sonucu ilerleyen ve lösemik hücrelerin dönüşebilme ve olgunlaşma bozukluğu ile, normal kan hücrelerinin yapılamaması, aşırı poliferasyon gösteren lösemik hücrelerin doku, periferik kan gibi yapıları istila etmesi ile karakterize edilir(Lichtman, 1995)

1976 yılında Fransız, Amerikan ve İngiliz hematologlardan oluşan bir grup tarafından orijinal şekil kabul edilen akut lösemi Fransız,Amerikan,İngiliz sınıflandırması (FAB) sınıflaması oluşturulmuştur. FAB sınıflamasında akut lösemilerin morfolojik ve sitokimyasal özellikleri göz önüne alınmıştır. Fakat immünofenotipleme, elektron mikroskopu, sitogenetik, moleküler biyolojik açıdan tespit yöntemlerini ve nadir lösemi tiplerini içermeyen bir sınıflamadır(Tablo 1.)(Head ve ark., 2004; Schumacher, 2004)

Tablo 1.1 Akut Lösemi FAB sınıflandırması

Akut Miyeloid Lösemi (AML)	
(Alt Tip Tanımlama)	
M0	Minimal farklılaşma gösteren akut miyeloblastik lösemi
M1	Olgunlaşma göstermeyen akut miyeloblastik lösemi
M2	Granülositik olgunlaşma gösteren akut miyeloblastik lösemi
M3	Akut promiyelositer lösemi
M3V	Akut varyant promiyelositer lösemi (mikrogranuler)
M4	Akut miyelomonositer lösemi
M4Eo	Akut eozinofilik miyelomonositer lösemi
M5a	Akut monoblastik lösemi
M5b	Akut monositer lösemi
M6	Akut eritrolösemi

M7	Akut megakaryoblastik lösemi
Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)	
L1	Çocukluk tipi ALL
L2	Erişkin tipi ALL
L3	Burkitt tipi ALL

Akut lösemilerde genetik bozuklukların ciddi biçimde tespit edilir hale gelmesi ve bunların prognoz açısından önem arz etmesi ile 2001 yılında Dünya Sağlık Örgütü(World Health Organization, WHO) yeni bir sınıflandırma yapmıştır. Bu sınıflandırmada imminolojik, morfolojik, sitogenetik, genetik ve moleküler düzeyde kriterler göz önünde bulundurulmuştur. Bu yeni sınıflandırmada akut lösemi tanısı için blastik hücre sayımı %20'ye indirilmiş(%30'dan) olup, nadir lösemi tipleri de dahil edilmiştir(Tablo 2.)(Valk, & Delwel, & Lowenberg, 2005)

Tablo 2: Akut Lösemi WHO Sınıflaması

Akut Miyeloid Lösemi
1.Tekrarlayan Genetik Anomalilerle Seyreden AML
•t(8;21)(q22;q22), (AML 1/ETO) ile AML
•inv(16)(p13q229 veya t(16;16)(p13;q22), (CBFβ/MYH1-1)ile AML
•Akut promiyelositer lösemi (t(15;17)(q22;q22), (PML/RARα) ile AML)
•11q23 (MLL) anomalisi ile AML
2.Çoğul Seri Displazisi ile Seyreden AML
•Önceden miyelodisplastik sendromlu
•Önceden miyelodisplastik sendrom olmadan
3. Tedaviye İkincil AML ve MDS
•Alkilleiyici ajanlarla ilişkili

•Topoisomerez II inhibitör ile ilişkili
4. Tanımlanan Gruplara Girmeyen AML
•Minimal farklılaşma gösteren AML
•Olgunlaşma göstermeyen akut miyeloblastik
•Akut miyelofibrozis ile panmiyelozlösemi
•Granülositik olgunlaşma gösteren akut miyeloblastik lösemi
•RAR α rearrajmanı göstermeyen akut promiyelositer lösemi
•Akut miyelomonositik lösemi
•Akut monoblastik ve monositer lösemi
•Akut eritrolösemi
•Akut megakaryoblastik lösemi
•Akut bazofilik lösemi
•Myeloid sarkom
Akut Lenfoblastik Lösemi
1.Prekürsör B-lenfoblastik lösemi/lenfoma
2.Prekürsör T-lenfoblastik lösemi/lenfoma
3. Burkitt lenfoma/lösemi
Serisi Belirsiz Akut Lösemi
1.Bifenotipik akut lösemi
2.Farklılaşmamış akut lösemi

Moleküler analiz tekniklerinin ilerleyişi ile lösemiye dönüşüm mekanizmalarının birazda olsa daha iyi anlaşılmasını sağlamış ve akut lösemide yeni ve fonksiyonel diagnostik marker özelliğini almaya başlamışlardır(Matutes ve ark., 1997)

1.4 Akut Myeloid Lösemi

Normal hücrelere oranla poliferasyon hızı artmış, hücrelerin kontro dışı ve klonal proliferasyonu ile ortaya çıkan ve yüksek hızda ilerleyen malign hastalıklar grubudur. Akut Myeloid (AML) her yıl tanı konan lösemi hasta grubunun %20'sini oluşturur. Çocukluk döneminde Akut Lenfoblastik Lösemi(ALL) AML'ye oranla 4 kat fazla olmasına karşın, yenidoğan döneminde AML daha sık görülmeye başlar ve adolesan çağında oranı artmaya devam eder. Bu yükseliş erişkin hasta grubunda da görülür. AML sıklık oranının daha fazla olduğu kanıtlanan durumlar Tablo 3'de görülmektedir(Sonak & Uysalol, 2012)

Tablo 1.2. AML sıklığının arttığı durumlar

Genetik hastalıklar <ul style="list-style-type: none">• Down sendromu (x15), Fankoni anemisi, Bloom sendromu, Kostmann sendromu, Diamond Blackfan anemisi, Nörofibromatozis, Ataksi-Telenjektiazi, Shwachman-Diamond sendromu, Klinefelter sendromu, Trombositopeni-radius eksikliği (TAR) sendromu, Ailevi trombositopeni
Çevresel faktörler <ul style="list-style-type: none">• Maternal ilaç / sigara / alkol kullanımı, Maternal topoisomeraz II içeren yiyecek alımı, radyasyon, iyonizan ışınlar*, sitotoksik kemoterapi (alkilleyiciler ve epipodofilotoksinler)*, petrol ürünleri, pestisidler, benzen*, ağır metaller (*İspatlanmış faktörler)
Sekonder AML nedenleri <ul style="list-style-type: none">• Miyelodisplastik sendromlar ve miyeloproliferatif sendromlar, İyonizan radyasyon tedavisi ve bazı kemoterapötik ajanlar: Nitrogen mustard, Cyclophosphamide, Ifosfamide, Chlorambucil, Melphalan, Etoposide

1.4.1. Klinik Bulgular

AML'nin kesin kriterleri konulmamakla birlikte; belirli genetik veya sonradan oluşan bağışıklık sistemi sorunları, radyoaktif ve röntgen ışınları, belirli kimyasal ajanlar ve virüslerin bu hastalığın meydana gelmesinde önemli rolleri olduğu düşünülmektedir.

AML’de görülme sıklığı farklı olmakla birlikte birçok bulgular ortaya çıkabilir. Bu bulgular kısaca şöyle özetlenebilir (Yiallouros, 2010) ;

1. Sıklıkla görülen bulgular(hastaların %60’ının üstünde):

- Sürekli halsiz, isteksiz hissetme
- Trombosit düşüklüğüne bağlı anemi veya diğer cilt sorunları
- Nötrepeniye bağlı enfeksiyon yatkınlığı

2. Kısmen görülen bulgular (hastaların %20-30’u arasında)

- Normal dışı diş eti ve/veya burun kanamaları
- Ciltte peteşi de denilen ufak kanamalar
- Lenf bezlerinde şişlikler

3. Çok az rastlanan bulgular(>%20)

- Nefes almada güçlük
- Merkezi sinir sisteminin etkilenmesi sonucu baş ağrıları ve görme sorunları
- Fiziksel aktivite yaparken zorlanma

1.4.2 Laboratuvar Bulguları

AML hastalığının laboratuvar bulgularının tanısında artan veya yükselen lökosit sayısı, anemi ile sonuçlanan hematopoetik progenitör hücrelerin kaybı ve sayıca azalması, trombositopeni gibi durumlar mevcuttur. Artan poliferasyon sebebiyle biyokimyasal açıdan laktat dehidrogenaz(LDH) ve ürik asit değerlerinin yüksek çıkması da laboratuvar bulguları arasında sayılabilir. Bunlara ek olarak çeşitli bulguların tespiti durumunda; Akciğer grafisi, batin görüntülemesi, MR, BT ve ekokaryografi gibi tetkiklerde gerekli olabilir. AML’de blast sayısının %20-30 oranının üstünde seyretmesi kesin kriter olarak değerlendirilir ve bu durumda kemik iliği aspirasyonu / biyopsisi kesinlikle yapılmalıdır(Anak, & Sarıbeyoğlu, 2011)

1.4.3 Prognostik Faktörler

Akut lösemilerde en elverişli tedavi seçeneklerinin belirlenmesinde, bütün risk gruplarının değerlendirilmesi prognostik faktörlerin saptanmasında oldukça önemlidir. Çünkü hastalığın seyrine göre en uygun yoğunlukta tedavi sürecine geçiş yapmak ve yüksek riskli hastalarda bu riskleri almak oldukça önemlidir. Tanı esnasında genel olarak kabul

edilen prognostik faktörlerin bazıları şöyle sıralanabilir(Ağaoğlu, 2010; Carroll, Bhatla, Redner, & Kessel, 2016) ;

- Cinsiyet
- Yaş
- Lökosit sayısı
- Sitogenetik ve moleküler genetik test sonuçları
- WBC değeri
- Patoloji sonuçları

Genetik açıdan iyi ve kötü prognoz gösteren bazı durumlar Tablo 4’te gösterilmiştir.

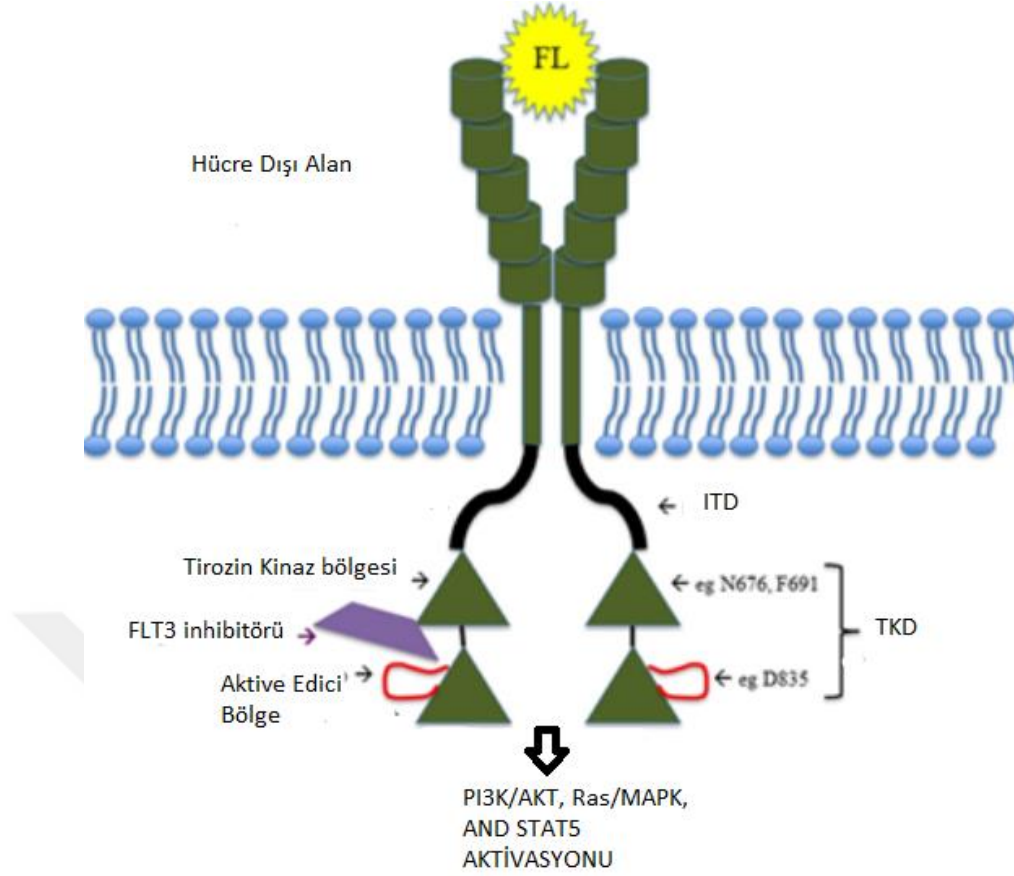
Tablo 1.3. Genetik açıdan iyi ve kötü prognoz durumları

İyi prognoz gösteren durumlar	Kötü prognoz gösteren durumlar
-Normal karyotip sonuçları -Negatif mutasyon sonuçları -inv(16) - t(15;17), t(8;21)	-5, 7, 8. kromozom anomalileri -Klonal kompleks karyotipik anomaliler -t(9;22), t(6;9) anomalileri -Lökositoz

1.5 FMS Benzeri Tirozin Kinaz 3(FLT3) Geni

Hematopoetik hücreler tarafından ifade edilen bir tirozin kinaz reseptörü olan FMS benzeri tirozin kinaz 3(FLT3); kök hücrelerin gelişmesi ile farklılaşmasında ve hematopoezin düzenlenmesinde kritik görevlerde yer alır. FLK-2 (fetal karaciğer kinaz-2) ve STK-1 (insan kök hücre kinaz-1) olarak da bilinen FLT3, 1991 yılında 2 ayrı bağımsız grup tarafından klonlanmıştır. FLT3 , sınıf III reseptör tirozin kinaz (RTKIII) reseptör ailesinin diğer üyeleri ile birlikte oldukça yüksek benzerliklere sahiptir. (Gilliland, & Griffin, 2002).

FLT3 geni kromozom üzerinde 13q12 bölgesinde yer alır ve 24 eksonluk kısmı içerir. Bu gen farelerde 1000 aminoasitlik bir proteini kodlarken insanlarda 993 aminoasitlik bir kısmı kodlar. FLT3 genel yapı olarak hücre dışı bir alan, zar geçiş bölgesi ve hücre içinde tirozin kinaz bölgesini içeren bir C terminal kuyruğundan oluşan, geçirgen zara sahip bir proteindir(Şekil 3.). FLT3 reseptörü, kemik iliğinde CD34+, olgunlaşmamış hematopoeitik hücreler, timus, plasenta, beyin, gonad ve dendritik hücreler gibi yapılarda ifade edilirler(Rosnet, & Birnbaum, 1992; Agnes ve ark., 1994)



Şekil 1.3. FLT3'ÜN yapısını ve işlevi

1.5.1 FLT3 Ligandı

FLT3 ligandı (FL) 1993'te klonlanan, çözünebilen bir homodimerik protein olan, bir tip I transmembran (TM) proteindir. Kemik iliği mikroçevresindeki fibroblastlar, miyeloid hematopoietik hücre dizileri, B ve T hücreleri gibi yapılardan ekspresedilir. (Duhier ve ark., 2001).

Dentrik hücreler (DH), T hücrelerine antijen sağlayan hücrelerdir. Kanser hastalarında hücrel immunoteropötik ajan olarak çalışmaları yapılmıştır. FL'nin, katil hücrelerin (NK) gelişimi üzerinde de önemli rolleri saptanmıştır. DH ve NK hücrelerinin poliferasyonuna yol açtığından dolayı, FL'nin geniş çerçevede bir anti tümör ajanı olma potansiyeli yapılan çalışmalarda göz önüne alınmıştır. Aynı zamanda FLT3'ün inhibisyonunun, AML için iyi bir tedavi yaklaşımı gibi görülse de anti lösemik immünitinin engellenebilme olasılığının da bulunduğu bildirilmektedir (Gale, 2003).

Ayrıca in vitro ortamlarda yapılan çalışmalarda FL, IL-7 ve IL-11 ile ifade edildiğinde B hücre öncüllerinde klonal genişleme ve farklılaşma saptanmıştır. Bunun yanında B hücre lenfopoezini stimüle etmek için IL-7, c-kit ligand, IL-3 ve IL11 ile beraber hareket ettiği bilinmektedir.

FL, FLT3 taşıyıcı AML ve ALL olgularında incelendiğinde; lösemik hücrelerde anti-apoptotik özelliğin yanı sıra, insan yaşamını uzatıcı etkilere sahip olduğu görülmüştür.(Rombouts, & Blokland, & Löwenberg, & Ploemacher , 2000). Bunun yanısıra Anconi anemisi veya kazanılmış aplastik anemi gibi hastalıklarda da çözünebilir FL oldukça yüksek seviyelerde bulunmuştur.(McKenna ve ark., 2000).

FLT3 sinyal iletim yolları henüz tam olarak bilinmemektedir ancak primitif hematopoetik hücrelerin proliferasyonu ve apoptozisindeki kritik rolü anlaşılmıştır.

Hematopoetik hastalığı olan bireylerde yapılan çalışmalar FL'nin hematopoezde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Sağlıklı kişilerde dolaşımdaki (plazmada) FL ifadesi, bazı hastalarda saptanan seviyeden daha düşüktür. Ayrıca, kök hücresi kompartmanına etki eden hematopoetik bozukluklarda özellikle Fanconi anemisi ve kazanılmış aplastik anemi gibi hastalıkların tanısında FL düzeylerinin oldukça yüksek olduğu saptanmıştır. Bu tip anemilerde kök hücrelerin noksanlığını düzeltmek amacıyla FL'nin üretebileceği ileri sürülmektedir.(McKenna ve ark., 2000).

1.5.2. FLT3 ve Mutasyonlar

FLT3 reseptörünün genelde birçok B hücresinde, myeloid ve monositik lösemi hücre hatlarında ifadesi olurken, FL ekspresyonunun büyük bir kısmı insan lösemi ve lenfoma hücre hatlarında olduğu belirlenmiştir. FL'nin aynı zamanda birincil AML blastlarında yüksek derecede eksprese edildiği gözlemlenmiştir.(Zheng ve ark., 2003). B lenfosit kaynaklı Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)'nin neredeyse tüm örnekleri ve AML olgularının %90'dan çoğundada hem RNA hem de fonksiyonel açıdan FLT3 ekspresyonu gösterilmiştir. Aynı şekilde, Kronik myelositer lösemi (KML)'de düşük seviyelerde, kronik lenfositik lösemi (KLL) ve hatta T hücre ALL hücrelerinin de FLT3'ü ifade ettiği gösterilmiştir. SEMK2-M1 lösemi hücre hattının yabancı tip FLT3 geninin amplifikasyon saptanmıştır. Normal kemik iliği ile kıyaslandığında insan lösemi (primer) hücrelerinde daha fazla miktarlarda ve CD34 ifadesi ile yakın bağlantılı olmayacak biçimde, kontrolsüz olarak eksprese edilir (Carow ve ark., 1993; Nakao ve ark., 1996). Bunun sonucunda FLT3

reseptör-ligand birleşiminin lökomogenez önemli olduğu yapılan birçok fonksiyonel hücre çalışmalarında gösterilmiştir.

İnternal Tandem Duplikasyonu(ITD)'ları 1996'da Nakao ve arkadaşları tarafından yetişkin AML ve çocuk ALL hastalarında mesajcı ribonükleik asit (m RNA) sıklığı ve dağılımı araştırmalarını yürütürken, polimeraz zincir reaksiyonlarında (PCR) JM bölgesinde beklenilenin dışında uzun fragmanlar olarak rastlanmış ve tanımlanmışlardır. (Nakao ve ark.1996). Bu fragmanların detaylı tarama yapıldığında, farklı uzunluklarda sekanslar , adım adım tekrarlar halinde araya girmiş halde bulunmuşlardır. Bu duplike olmuş fragmanların tümünün tirozinden zengin olduğu , tümünün exon 14-15 tarafından kodlanan JM bölgesi içinde olduğu, uzunluklarının 12-240-bp arasında değişebildiği gözlenmiştir (Frohling ve ark., 2002; Gale, 2003).

Lösemilerde FLT3-ITD mutasyonu sıklığının yetişkinlerde % 13,2 - % 32 arasında olduğu, miyelodisplastik sendromların (MDS) %3' ünde , akut lenfoblastik lösemilerde (ALL) ise çok az sıklıkta rastlandığı bildirilmektedir. Ayrıca FLT3-ITD mutasyonuna; KML, Hodhgin dışı lenfoma, multiple miyelom (MM) hastalıklarında ve sağlıklı kişilerde hiç rastlanmamıştır (Levis & Small, 2003).

ITD mutasyonu, AML alt tipleri içinde en sık olarak sırasıyla; M6, M7, M3 ve M5'görülmüştür. Kısmi ve tam wild tip allel kaybı sonuçlarının mutant band analizlerinde her hastada aynı olmadığı ve bu durumun genetik instabiliteye bağımlı olarak geliştiği bildirilmiştir(Gale, 2003).

FLT3'ün aktive edici bölgesindeki tirozin kinazlarda da mutasyon gözlenmektedir; bu mutasyon ikincil tirozin kinaz bölgesinin 20. Exonuna karşılık gelen aspartik asit 835(D835) ve isoleüsin 836(I836) noktalarında amino asit duplikasyonu olarak tanımlanmıştır(Yamamoto ve ark., 2001). Tirozin kinaz aktivesine yol açan bu nokta mutasyonunun AML vakalarında görülme insidansı yaklaşık olarak %5-10 civarındadır.

1.6 Nukleofosmin Geni

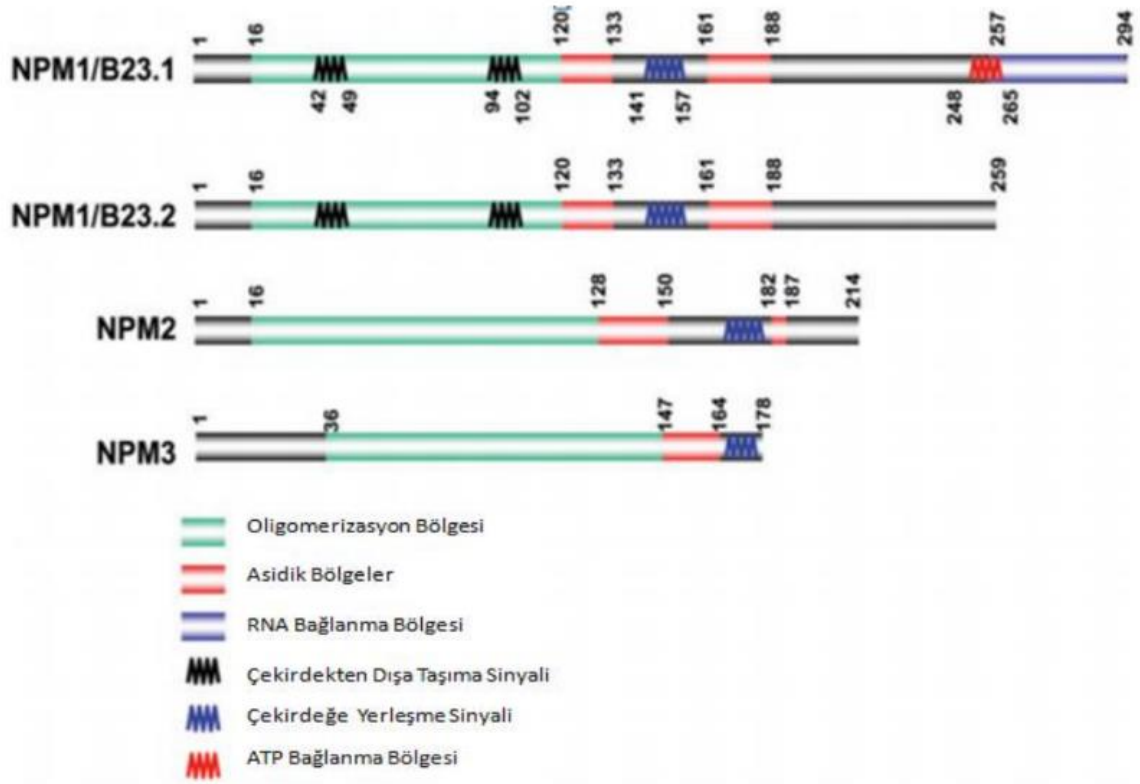
Nükleolar fosfoprotein B23 veya numatrin olarakta isimlendirilen Nukleofosmin(NPM) geni bir fosfoproteindir. Ribozomların biyogenezinde bulunmakla birlikte, bazı proteinlerin nükleolusa taşınmasına olanak sağlamasının yanında birçok önemli görevleri vardır. Bunlar şöyle sıralanabilir;

- Histon modifikasyonu
- Ribozom biyogenezi ve taşınımı
- Genomik stabilite ve DNA onarımı
- Endoribonükleaz aktivasyonu
- Hücre döngüsü sırasında sentrozom duplikasyonu
- ARF-p53 tümör baskılayıcı yolağının regülasyonu
- RNA sarmal yapısının kararsızlaştırıcı aktivitesi
- Kaspazla aktive edici DNaz'ın baskılanması
- Çekirdekçikte bulunduğu anda apoptozu inhibasyonu

NPM1 geni, çeşitli tümör tiplerinde regülasyona yoluyla mutasyona uğratılır ve kromozom yapısında yer değişimlerine sebep olur(Falini ve ark., 2007)

Katı tümörlerde NPM1 genellikle yüksek seviyelerde eksprese olarak gözlemlenir ve NPM1'in tümör baskılayıcı p53/ARF yolağının inaktivasyonu yoluyla tümör ilerlemesini destekleyebileceği düşünülmektedir; bunun tam tersine düşük seviyelerde eksprese edildiğinde, NPM1, sentrozom duplikasyonunun engellenmesi yoluyla tümör büyümesini baskılayabilir(Meani N, & Alcalay M., 2009; Okuwaki M., 2008)

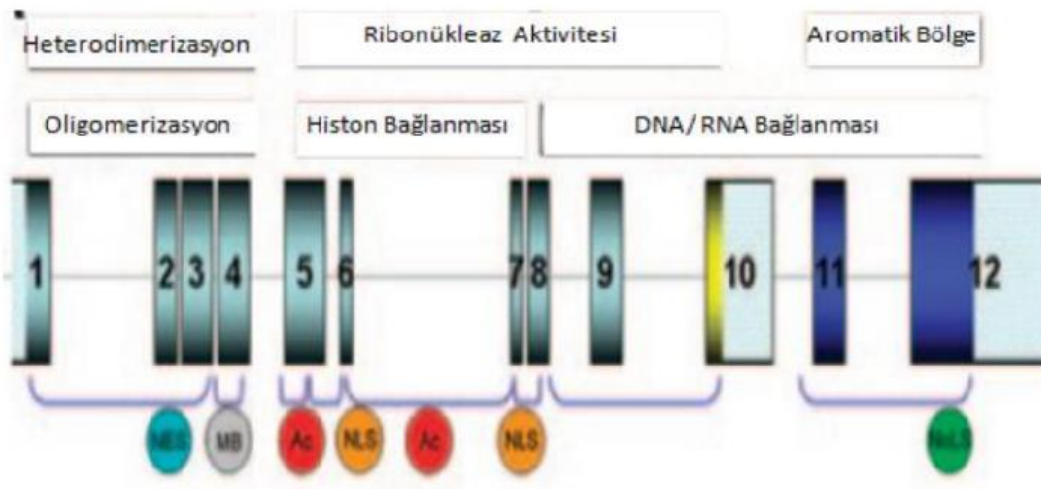
NPM proteinleri; NPM1, NPM2, NPM3 VE omurgalılarda bulunmayan NPM olarak dört grupta incelenen 294 aminoasitlik bir proteindir. Bunlar arasında en baskın ve uzunluğu en fazla olan NPM1'dir. NPM2'nin, NPM1'den farklı 3' bölgesinde 24 aminoasitİN eksik olmasıdır. (Şekil 6. NPM1 varyantarı)(NPM3 ise çerçeve domainindeki ekson 8 kaybıyla, just membran bölgede eksik olan daha da kısa bir protein oluşturmuştur. Lim M.J., & Wang X.W., 2006)



Şekil 1.4. NPM1 varyantları

1.6.1.NPM1 Proteini

NPM1 proteini birden fazla spesifik bölge içeren 37 kD'luk işlevsel bir bölgeye sahiptir.(Şekil 7).



Şekil 1.5. NPM1 geni üzerindeki işlevsel bölgeler(UÇUNOĞLU, 2011)

Şaperon aktive edici özelliklerinin yanında, çeşitli pentamerik sinyaller oluşumunda da görev alır. Bunun yanı sıra proteinin çekirdek merkezli transformasyonunu sağlayarak aktivesini regüle sinyaller bulunur(Falini ve ark., 2006)

Yetişkin AML olgularının üçte birinde, NPM1'de oluşan nokta mutasyonu sonucu sitoplazmadaki protein ekspresyon seviyeleri değişir(Ridge ve ark., 1990).

Bu zamana kadar AML olgularında 40 farklı NPM1 mutasyonu saptanmıştır; bunların arasında en sık rastlanan değişiklik mutasyon A olarak tanımlanan, gen sekansının 956-959 konumundaki , TCTG dördü nükleotidinin tekrar etmesi şeklindedir. Bu değişikliğin AML hastalarında görülme insidansı yaklaşık %75-80 civarındadır(Naoue. T, & Kiyoi, H, 2004)

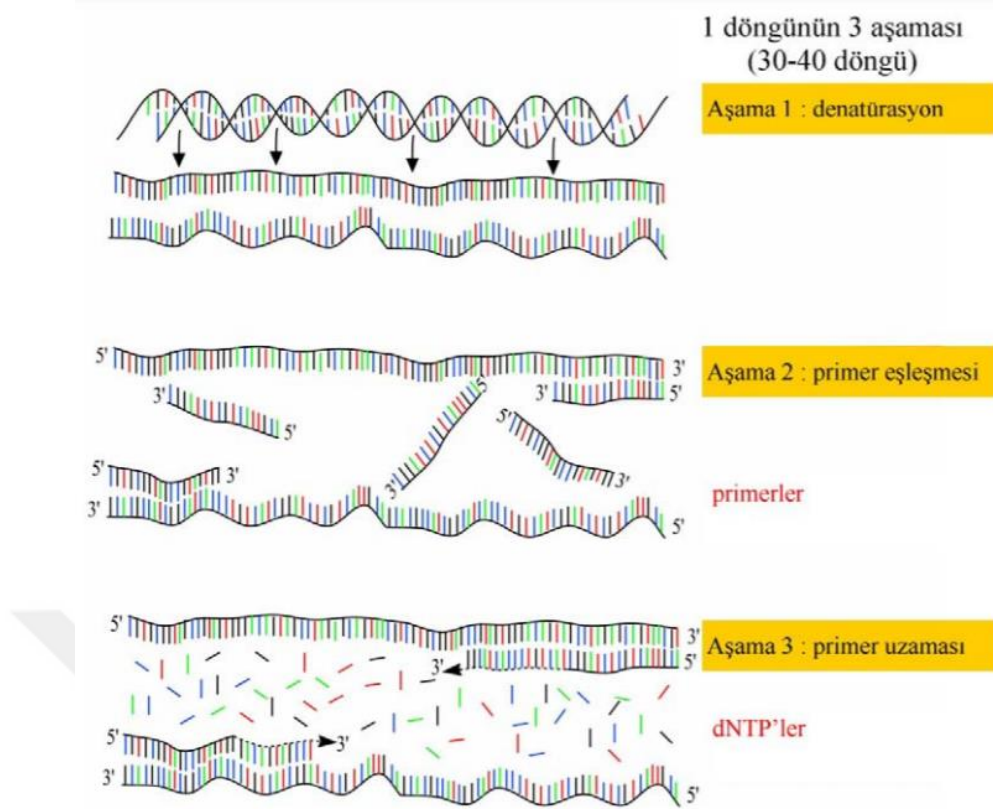
1.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

1983 yılında Amerikalı biyokimyacı Kary Mullis ve arkadaşları tarafından icat edilen Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PCR) moleküler biyoloji,genetik ve moleküler tıpta hızlıca yerini almıştır(Jaiki ve ark., 1985).

PCR, çift sarmallı DNA molekülünün uzunluğu bilinen iki kısmı arasında, istenilene miktarda DNA'nın enzimatik olarak çoğaltılmasını esasına dayanır. Başlangıçta yalnızca istenilen gen parçasının küçük bir kopyası elde edilirken, uzun yıllar boyunca yapılan çalışmalar sonucu, günümüzde PCR tekniği ile birkaç saat içinde küçük bir gen parçasından milyarlarca kopa elde edebilmek mümkün hale gelmiştir(Sekiya T 199

PCR hücre içerisinde, DNA'nın kendini kopyalaması esasına dayanır. Çift sarmallı DNA(dnDNA), tek sarmallı DNA(dsDNA) haline çözülerek kopyalanır ve çoğaltılarak tekrar bağlanması işlemi gerçekleşir. Teknik kısaca şu basamaklarda işlenir(Şekil 1.);

- Yüksek sıcaklıkta çift sarmallı DNA'nın denatürasyon işlemi ile tek sarmallı hale gelmesi,
- Sıcaklık düşürülerek oligonükleotidlerin DNA'nın tamamlayıcı dizilerine bağlanması
- Son olarak DNA polimeraz ile primerlere nükleotid eklenme işlemleri gerçekleştirilerek DNA sarmalı enzimatik olarak birleştirilir.



Şekil 1.7. PCR tekniği basamakları (Vierstraate A., 1999)

2. AMAÇ

Bu retrospektif tez çalışmasının amacı, Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji A.D laboratuvarına 2013-2015 yılları arasında başvuran 71 Akut Myeloid Lösemi(AML) hastasında taranan FLT3/ITD, FLT3/D835 ve NPM1 mutasyonlarını hasta klinik verileri ile değerlendirerek; genetik değişikliklerin sıklığı, kliniğe etkisi ve prognostik öneminin saptanmasıdır.



3. YÖNTEM

Bu retrospektif tez çalışması, Kocaeli Üniversitesi Hastanesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda yürütüldü. Geriye dönük yapılan bu çalışmada hasta arşiv dosyaları ile birlikte Nucleus programından alınan bilgiler incelendi. Çalışmaya, 2013-2015 yılları arasında Kocaeli Üniversitesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Polikliniği'nden rutin tanı amaçlı FLT3 VE NMP1 gen mutasyonu taraması için Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji AD. laboratuvarına yönlendirilen AML ön tanı ve sonuçlarının bilimsel çalışmalarda kullanıldığına dair onam almış 70 hasta alındı.

Çalışmaya alınan bu hastaların seçimi yapılırken herhangi bir kriter olmaksızın randomize bir seçim yapıldı. Araştırma için gerekli olan klinik parametreler; yaş, cinsiyet, hematolojik ve biyokimya test sonuçları ile histopatolojik bulgular hastane sistemi(Nucleus) ve arşiv dosyalarından elde edildi.

Bu retrospektif çalışma, Kocaeli Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylandı (KÜ GOKAEK 2020/225).

3.1 DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu, FLT3 gen paneli çalışması için yapıldı. Hastalardan EDTA'lı tüplerle alınan periferik kan veya kemik iliği örneklerinin izolasyonu Qiagen robotik sistemi ile yapıldı. İzolasyon kitinin proteinaz K, yıkama solüsyonu, manyetik boncuklar ve pipetaj içeren kartuş sistemi cihaza yerleştiriliktikten sonra hastanın 220 µL örneği 1,5 ml'lik ependorf tüpüne alındı. Son olarak DNA'nın izolasyonun olacağı elüsyon tüpleri yerleştirilerek DNA izolasyon basamakları otomatik olarak gerçekleştirildi. Yeterli miktarda DNA konsantrasyonuna sahip örnekler bir sonraki aşamaya aktarıldı.

3.2 RNA İzolasyonu

NPM1 geni çalışması için ilk basamak olarak RNA izolasyonu yapıldı.

- Hastalardan alınan periferik kan veya kemik iliği örnekleri 1,5 ml'lik falkon tüpe aktarıldı.
- 10-15 dakika buz üzerinde bekletilerek yavaşça alt-üst edilerek karıştırıldı.
- 10 dakika 4C'de santrifüj edilerek süpernatant atıldı.

- 2 damla Eritrosit lizis tamponu (EL Buffer) eklenerek yavaşça karıştırıldı.
- Tekrardan 10 dakika 4C’de santrifüj edilerek süpernatant atıldı.
- Alınan kan miktarı baz alınarak 350 µL veya 600 µL RNeasy Lizis Tampon (Buffer RLT) eklendi.

Tablo 3.1. Tampon miktarı

Buffer RLT (µL)	Kan miktarı (ml)	Lökosit sayısı
350	≤ 0,5	≤ 2×10 ⁶
600	0.5-1.5	2×10 ⁶ - 1×10 ⁷

- Pipetaj yapılarak hücrelerin tamamen parçalanması sağlandı.
- Lizat Qlashedder kolonuna aktarıldı. En yüksek devirde 2 dakika santrifüj edildi.
- 15 saniye 10,000 rpm’de santrifüj edildi.
- Filtre temiz collection tüpüne aktarılarak üzerine 700 µL RW1 Buffer eklendi.
- 15 saniye 10,000 rpm’de santrifüj edildi.
- Üzerine 500 µL RPE Buffer eklenerek 15 saniye 10,000 rpm’de santrifüj edildi.
- Son üç işlem tekrarlanıp RPE Buffer eklendikten sonra 14,000 rpm’de 3 dakika santrifüj edildi.
- Filtre temiz collection tüpüne alınarak 14,000 rpm’de 1 dakika döndürüldü ve 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
- Üzerine 30-50 µL Rnase water eklenerek 40 saniye kadar bekletildi
- 10.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilerek ölçümü yapıldı.

3.3 cDNA Aşaması

Elde edilen RNA örneklerinden cDNA eldesi etmek için RT-RGQ Kit (Qiagen) kullanıldı.

RNA örnekleri 65°C de 5 dakika inkübasyondan sonra hemen buz üzerine alınarak 5 dakika bekletildi (200 nanogram RNA ile başlandı).

Tablo 3.2. Cdna çalışması bileşenleri

Materyal	Reaksiyon başına
Karışım(Kit içinden çıkan)	7,5 µL
Reverse Transcriptase	2,5 µL
Toplam	10 µL

- 10 µl hazırlanan karışım RNA örnekleri üzerine dağıtıldı.
- Su ile toplam hacim 25 µl'ye tamamlandı.
- Thermal Cycler cihazında aşağıda verilen PCR protokolü uygulandı.

Tablo 3.3. Thermal Cycler cihazı protokolü

25°C	10 dakika
46 °C	45 dakika
85 °C	5 dakika
4 °C	5 dakika

3.4. Real Time PCR (Gerçek Zamanlı PCR) Metodu

3.4.1 FLT3 Mutasyonunun Real Time PCR Yöntemi ile Saptanması

FLT3 mutasyonu taraması FLT3/ITD VE FLT3/D835 olarak iki ayrı çalışmada yapıldı. Deneyin ilk aşaması LightCycler 480 Real Time PCR cihazında her iki mutasyonda aynı şekilde yapıldı. Daha sonraki aşamalarda ise; PCR sonrası oluşan ITD ürünleri metafor agarozda yürütülüp değerlendirilmesi yapılırken D835 PCR ürünleri ise enzim kesimi işlemine alındı. Mutasyon kiti olarak LeukoStrat FLT3 Mutasyon Kiti (Invivoscribe) kullanıldı.

3.4.1.1. Deney Öncesi Hazırlık Aşaması

- Kit içerisinde bulunan FLT3 ITD Master Mix, FLT3 D835 Master Mix, IVS-0050 Clonal Control DNA, IVS-P004 Clonal Control DNA, IVS-0000 Polyclonal Control DNA ve Specimen Control Size Ladder tüpleri oda sıcaklığına getirilerek eritildi.
- IVS-0050 Clonal Control DNA, ITD miksi için pozitif kontrol olarak kullanıldı.
- IVS-P004 Clonal Control DNA, D835 miksi için pozitif kontrol olarak kullanıldı.
- IVS-0000 Polyclonal Control DNA, hem ITD hem de D835 miksi için negatif kontrol olarak kullanıldı.
- Hasta isimleri ile birlikte örnekler listesi yapılarak hazırlık aşaması tamamlandı.

3.4.1.2. PCR Kurulumu

Deney grubu ile birlikte kontrol grubu karışım örnekleri aşağıda ** çizelgede ki gibi hazırlandı.

Tablo 3.4. LightCycler için gerekli bileşenler

Karışım Bileşeni	Miktar (µL)
ITD Master Miks/ D835 Master Miks/ Specimen Control Size Ladder Miks	45
HotStartTaq DNA Polymerase	0,25
Toplam	45

- Örnek başına 45 µL miks tüplere dağıtılarak, üzerlerine 5 µL DNA eklendi.
- PCR sonrası ITD ürünleri %2'lik metafor agoroza 100 voltda 45 dakika yürütülüp değerlendirilmesi yapılırken D835 PCR ürünleri ise enzim kesimi işlemine alındı.

Tablo 3.5. PCR Sonrası Beklenen Uzunluklar

Master Miks	Pozitif Kontrol	Wild Type	Mutant Tip
ITD Miks	360 bp	331 bp	330 bp'den daha büyük bant
Spicemen Control Size Ladder Miks	-	84 bp, 96 bp, 200b bp, 300 bp, 600 bp,	Sırasıyla bu uzunlukta bantlar görülür.

3.4.1.3 EcoRV Enzim Kesimi

- EcoRV enzim kesimi işlemi sadece D835 PCR ürünleri için gerçekleştirildi.
- 10x Buffer oda sıcaklığına getirilerek eritildi. (Bu aşamadaki işlemler soğuk blok üzerinde gerçekleştirilmelidir.)
- Miks hazırlanması ve dağıtımını PCR öncesi odada yapıldıktan sonra PCR ürünlerinin dağıtılması ise PCR sonrası ayrı alanda gerçekleştirildi.
(EcoRV enzimi kullanılacağı zaman -20°C'den çıkarılmalı ve kullanıldıktan sonra hemen -20°C'ye kaldırılmalıdır.)

Tablo 3.6. EcoRV Enzim miksi için gerekli bileşenler

EcoRV Miks İçin Gerekli Kimyasallar	(µl)
10X Buffer	2

EcoRV (10U/μl)	4
H₂O	14
Toplam	20

- 20 μl EcoRV miks tüplere dağıtılıp üzerlerine 10 μl D835 master miks PCR ürünü yüklendi.
- EcoRV enzim kesimi ürünleri % 2'lik agaroz jelde bantlar açılana kadar (45 dakika 1saat) yürütüldü.

Tablo 3.7. EcoRV Enzim Kesim Ürünlerinin Değerlendirilmesi

Klonal (Pozitif) Kontrol (IVS-P004)	Polyklonal (Negatif) Kontrol (IVS-0000)
129 bp	81 bp

- EcoRV enzimi ile kesim yapıldığında ise 81bp'da bant veren örnekler negatif, 129bp'da bant veren örnekler pozitif olarak değerlendirildi.

3.4.2 NPM1 Mutasyonunun Real Time PCR Metodu İle Saptanması

NPM1 mutasyon taraması için, hastalardan alınan periferik kan ve kemik iliği örneklerinden total RNA izolasyonu yapıp elde edilen RNA'dan ters transkriptaz ile cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Ardından Rotor-Gene Q Real Time PCR(Qiagen) cihazında NPM1 mutasyonu amplifikasyonu gerçekleştirildi. Deneyde NPM1 mutA MutaQuant Kit kullanıldı.

- İlk olarak hastanın adı-soyadı, elde edilen nükleik asit konsantrasyonu, alınacak RNA miktarı ve eklenecek su miktarı kriterlerine uygun olarak çizelge hazırlandı.
- Kit içeriği (RNase İnhibitör ve Reverse Transcriptase dışında) buz üzerinde çözülerek kısaca santrifüj edildi.

- RNase İnhibitör ve Reverse Transcriptase,kullanılacağı zaman buz üzerine çıkartıldı.
- RNA örnekleri 65°C de 5 dakika inkübasyondan sonra hemen buz üzerine alındı.
-

Tablo 3.8. PCR için gerekli olan bileşenleri

Bileşenler	Miktar (µl)
1) 5X Buffer/ Tampon	5
2) dNTP	2
3) Random Primer	5,25
4) DTT	1,25
5) RNase İnhibitör	0,5
6) Reverse Transcriptase	1
<i>Toplam</i>	15
RNA	*1-10

- Hazırlanan karışımdan her bir hasta RNA örneğinin üzerine 15 µl miks dağıtıldı.
- Rotor-Gene Q Real Time PCR protokolü uygulandı.

Tablo 3.9. PCR termal döngü protokolü

Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)
25°C	10 dakika
50°C	60 dakika
85°C	5 dakika
4°C	5 dakika

3.5. Kullanılan Cihazlar

- LightCycler 480 Real Time PCR Cihazı (Roche, Almanya)
- Rotor Gene Q Real Time PCR Cihazı (Qiagen, Almanya)
- SimpliAmp Thermal Cyclers (ABD)
- Mikro Santrifüj (Sigma, ABD)
- Qubit 3 DNA ölçüm cihazı (İnvitrogen)
- Vorteks (Biosan)
- Mikropipetler, 10 µl, 100 µl, 1000 µl (Eppendorf, Almanya)
- Buzdolabı -4 ve -20 (Arçelik, Türkiye)

- Robotik Sistem Cihazı (Qiagen)
- Elektroforez Tankı ve Güç kaynağı

3.6. Sarf Malzemeler

- Pastör pipeti
- Falkon tüp (15 ml, 50 ml)
- Mikrosantrifüj tüpler
- LightCycler 480 multiwell plate-96
- LightCycler 480 Şeffaf Kaplama Filmi
- PCR tüpü
- Mikropipet Uçları
- Jel Tarağı
- Ependorf Tüp
- Elüsyon Tüp
- Collection Tüp

3.7. Kullanılan Kitler ve Kimyasallar

- RT-RGQ cDNA Kit (Qiagen)
- LeukoStrat FLT3 Mutasyon Kiti (Invivoscribe)
- Eritrosit lizis tamponu (EL Buffer)
- RNeasy Lizis Tampon (Buffer RLT)
- NPM1 mutA MutaQuant Kit (Qiagen)
- Rnase water
- Metafor Agaroz Jel
- EZ1[®] DNA Blood Kit (Qiagen)

3.8. Analiz

FLT3 VE NPM1 genlerinin ayrı şekilde iki farklı Real Time PCR tekniği kullanılarak yapılan mutasyon taraması raporları araştırıldı. Raporlar pozitif ve negatif olarak incelendi Hastalara ait hemogram ve biyokimya test sonuçları ise Statistical Package for the Social Sciences (SPSS (16.0)) programı ile Spearman korelasyon analizi kullanıldı ve $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu tez kapsamında, 2013-2015 yılları arasında Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji A.D laboratuvarına AML ön tanısı ile yönlendirilen 71 hasta çalışmaya alındı. Periferik kan ve kemik iliği alınan örneklerden taranması istenilen mutasyon tarama raporları ile birlikte, hastaların dosya bilgileri ve hastane sisteminden alınan farklı test sonuçları retrospektif olarak değerlendirildi.

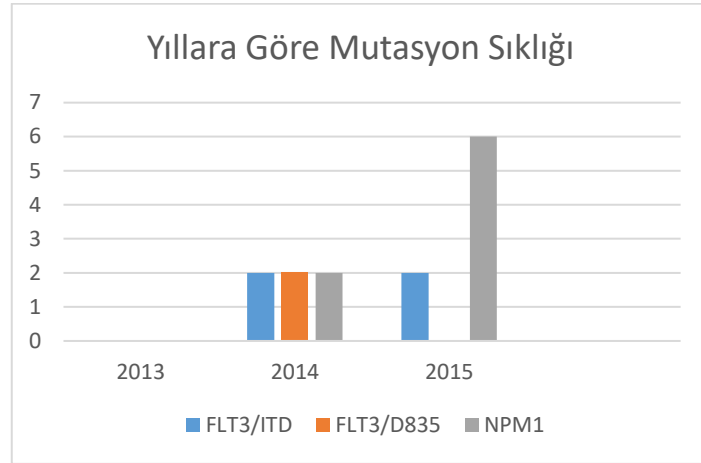
Çalışmaya alınan bu hastalardan 38 (%53,5) kişide FLT3, 7 (%9,8) kişide NPM1, 26 (%36,7) kişide ise hem FLT3 hem de NPM1 geni incelendi.

Tablo 4.1. Hasta Grubunun Özellikleri

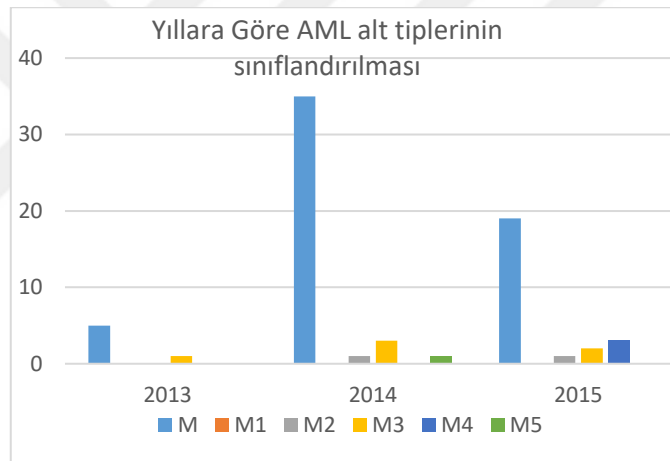
Cinsiyet	Hasta Sayısı(n)	Toplam (%)
Kadın	17	(%23,9)
Erkek	54	(%76,1)
TANI		
AML	59	(%83,2)
AML-M2	2	(%2,8)
AML-M3	6	(%8,4)
AML-M4	3	(%4,2)
AML-M5	1	(%1,4)
YAŞ		
≤30	5	(%7,5)
>30	66	(%92,5)
MATERYAL		
Kemik İliği	13	(%18,3)
Periferik Kan	58	(%81,7)

Yapılan retrospektif inceleme sonucu FLT3/ITD, FLT3/TKD ve NPM1 mutasyonu analiz sonuçları tez kapsamı dahilinde birlikte değerlendirildi.

Şekil 4.1 Yıllara Göre Mutasyon Sıklığı



Şekil 4.2 Yıllara Göre AML Alt Tiplerinin Sınıflandırılması



Toplamda 71 hastada üzerinden yapılan mutasyon taraması sonucu toplam 8 (%11,2) hastada NPM1 mutasyonu, 4 (%5,6) hastada FLT3/ITD, 2 (%2,8) hastada ise FLT3/D835 mutasyonu saptanmıştır. Mutasyon saptanan 14 (%19,7) kişilik hasta grubu 13 (%92,8) erkek, 1 (%7,2) kadın hasta olarak incelendi(p>0.05).

Saptanan mutasyonlar yıllara göre ele alındığında 2013 yılında hiç pozitiflik saptanmaz iken, 2014 yılında üç farklı mutasyonda (FLT3/ITD(n=2), FLT3/D835(n=2), NPM1(n=2)) eşit sayıda hastalarda, 2015 yılında ise yüksek oranda NPM1(n=6) pozitifliği saptanmış olarak gözlemlendi.

Tablo 4.2. Mutasyon Görülen Hastaların Hemogram Sonuç Tablosu

Olgu	Saptanan Mutasyon	WBC	NEU	LYM	MONO	EOS	BASO	PLT	HCT
1	FLT3/D835	15	4,12	2,11	7,68	0,003	106	21,9	22,9
2	NPM1	4,72	4,54	0,17	0,001	0,002	0	106	41,4
3	FLT3/ITD	126	5	5,73	111	1,49	3,18	47,5	23
4	FLT3/D835	0,06	0,007	0,051	0,001	0,001	0	15,7	24,9
5	FLT3/ITD	0,223	0,006	0,211	0,006	0	0	16,8	27,4
6	NPM1	10,4	0,015	2,31	7,79	0,014	0,317	26,7	35
7	NPM1	69,7	35,5	16,2	15,6	0,084	2,61	-	-
8	NPM1	246	34,1	169	17,4	0,546	24,6	-	-
9	NPM1	3,7	2,11	1,23	0,278	0,057	0,018	57,1	27,4
10	FLT3/ITD	1,35	0,088	1,09	0,144	0,004	0,02	48,6	21,5
11	FLT3/ITD	14,2	0,258	1,03	11,1	0,002	1,88	125	22,5
12	NPM1	0,119	0,045	0,054	0,015	0	-	22,5	22,1
13	NPM1	0,784	0,016	0,754	0,006	0,005	-	67,4	25,7
14	NPM1	0,646	0,252	0,347	0,004	0,039	0,005	25,9	27,2

Tablo 4.3. Mutasyon Saptanmayan Hastaların Hemogram Sonuç Değerleri

Olgu	WBC	NEU	LYM	MONO	EOS	BASO	PLT	HCT	MPW	RDW
1	89	13,2	6,59	53,3	0,233	15,6	39,4	21,9	-	27,5
2	15,7	14,5	1,2	0,074	0,017	-	-	23,9	5,95	-
3	0,074	0,01	0,059	0,003	0,001	0	10,5	24,5	-	16
4	5,62	0,856	1,97	2,67	0,01	0,113	104	27,8	8,52	25,8
5	2,69	2,33	0,218	0,123	0,003	0,012	101	25,9	9,72	21
6	0,595	0,138	0,276	0,129	0,002	0,05	35,6	28,9	7,31	20,5
7	10,5	0,356	2,99	6,85	0,054	0,258	127	15,2	5,72	16,8
8	78,3	4,6	10,6	22,5	1,58	2,09	54,9	19,5	-	21,7
9	14,5	4,53	2,7	6,86	0,012	0,377	14,3	22,5	-	15,1
10	9,2	1,77	7,18	0,066	0,068	0,117	15,3	22,5	-	15,2
11	6,77	2,08	3,04	1,54	0,02	0,089	155	22,6	-	17,7
12	9,54	6,43	67,4	0,405	0,051	-	240	34	-	16,1
13	2,04	0,833	1,15	0,052	0	0	17,4	25,5	-	14,5
14	41,7	31,8	6,35	3	0	0,538	63,8	25,5	-	18,5
15	0,406	0,056	0,327	0,016	0,008	0	70,6	26,9	6,38	17
16	0,06	0	0,045	0,014	0,001	0	14,3	24,8	-	17,7
17	0,472	0,003	0,456	0,01	0	0,003	65,2	24,8	6,69	13,8
18	126	5	5,73	111	1,49	3,18	47,5	23	6,75	16,1
19	1,09	0,022	0,469	0,598	0,001	0,002	38,5	27,8	8,02	17,3
20	0,269	0,008	0,259	0,001	0	0	25,3	30	7,05	16,9
21	2,04	0,152	1,71	0,132	0,026	0,018	263	26,4	5,39	17,6
22	1,41	0,592	0,767	0,007	0,003	0,036	55	26,7	-	19,3

23	2,28	1,23	0,93	0,09	0,006	0,023	265	29,5	6,82	15,6
24	16,3	15,6	0,505	0,157	0,011	0,031	75,2	22,5	7,23	15,7
25	0,223	0,006	0,211	0,006	0	0	16,8	27,4	-	14,8
26	10,4	0,015	2,31	7,79	0,014	0,317	26,7	35	9,74,	21,1
27	0,475	0,129	0,339	0	0,002	0,005	58	29,9	5,94	15,2
28	0,426	0,029	0,377	0,019	0,002	0	56,5	30,6	7,35	17,2
29	15,1	1,29	2,64	9,71	0,015	1,44	32,6	16,1	6,99	18,7
30	2,55	1,02	0,998	0,207	0,284	0,043	197	41,7	6,93	17,7
31	3,47	2,26	0,693	0,465	0,001	0,03	255	23,7	6,18	14,4
32	2,99	0,156	1,91	0,713	0,004	0,207	43,5	28,9	7,5	17,7
33	49,2	0,023	15,2	33,6	0	0,386	214	41,5	6,44	16,5
34	4,9	0,741	1,5	2,15	0,002	0,496	11	27,9	-	18,9
35	0,889	0,352	0,503	0,018	0,001	0,015	21,5	23	-	17,2
36	1,99	0,048	0,936	0,842	0,005	0,155	160	27,5	5,84	21,5
37	4,47	0,22	1,27	2,5	0,023	0,462	24,5	27	-	16,8
38	21,3	4,32	5,35	10,6	0,312	0,722	43,8	30,1	6,59	14,9
39	22,9	5,14	5,98	11	0,334	0,504	62,8	34,8	6,2	15,7
40	1,49	0,371	0,818	0,274	0,002	0,027	8,1	33	-	18,5
41	183	12,5	25,8	114	1,4	28,9	66,7	31,4	-	16,8
42	0,142	0,063	0,056	0,019	0,002	-	28,1	22	6,96	17,8
43	87,2	49,5	18,6	14,7	0,009	4,47	23,8	22,9	6,47	15,6
44	2,07	1,93	0,137	0	0,005	-	38,8	25,4	-	31,8
45	7,17	4,24	1,62	1,06	0,217	-	96,3	35,2	35,2	19,8
46	0,812	0,263	0,519	0,018	0,001	0,011	42,3	25,6	8,03	18,1

Tablo 4.4. Mutasyon Görülen Hastaların Biyokimya Sonuç Değerleri

Olgu	Saptanan Mutasyon	ALP	ALT SGPT	BUN	CRP	LDH	ÜRE	Ürea	GGT	Albumin
1	FLT3/D835	122	29	68	12,21	534	5	145,52	112	2,7
2	NPM1	81	11	26	0,62	236	3,1	55,4	38	4,05
3	FLT3/ITD	128	15	10	12,54	179	1,3	21,4	56	3,91
4	FLT3/D835	-	-	18	12,56	95	3,1	38,52	-	-
5	FLT3/ITD	76	16	22	20,66	632	3,5	47,08	51	4,74
6	NPM1	55	15	11	0,53	93	3,1	23,54	49	3,82
7	NPM1	51	20	6	9,41	233	2,8	12,84	68	2,33
8	NPM1	115	26	26	2,2	465	7,7	55,64	46	2,22
9	NPM1	-	11	10	3,02	261	-	21,4	-	3,96
10	FLT3/ITD	50	11	20	0,49	113	4,6	42,8	35	3,57
11	FLT3/ITD	343	235	62	6,41	-	35,6	132,68	163	3,89
12	NPM1	343	235	62	6,41	-	35,6	132,68	163	3,89
13	NPM1	66	22	22	0,06	251	2,2	47,8	50	3,48
14	NPM1	115	23	16	2,34	765	7	34,24	31	4,33

Tablo 4.5. Mutasyon Saptanmayan Hastaların Biyokimya Sonuç Değerleri

Olgu	ALP	ALT SGPT	BUN	CRP	LDH	ÜRE	Ürea	GGT	Albumin
1	180	256	16	40,39	4162	-	34,24	473	3,67
2	-	69	41	33,07	186	3,8	87,74	-	2,8
3	87	25	15	1,03	194	5,3	32,1	139	4,46
4	122	29	68	12,21	534	5	145,52	112	2,7
5	65	21	15	0,34	277	3,3	42,8	22	3,2
6	781	71	10	4,85	344	2,9	21,4	264	3,12
7	75	24	8	6,95	111	1,1	17,12	20	3,85
8	-	11	15	1,43	755	-	32,1	-	4,02
9	-	28	12	0,16	-	5,5	25,68	-	4,15
10	-	8	13	8,85	-	-	27,82	-	3,91
11	73	18	8	1,82	179	2,2	17,12	42	3,46
12	-	14	12		170	5,3	25,68	29	4,46
13	52	35	15	0,15	426	-	32,1	13	4,21
14	-	12	7	3,54	-	-	14,98	-	-
15	164	33	11	7,66	320	3,4	23,54	178	3,41
16	106	14	-	-	617	4	-	123	3,22
17	64	9	9	9,02	209	1,1	19,26	25	3,63
18	60	13	52	49,54	432		111,28	14	2,51
19	128	15	10	12,54	179	1,3	21,4	56	3,91
20	-	-	17	22,26	168	1,4	36,38	-	-
21	-	-	61	23,25	664	9,6	130,54	-	-
22	105	14	21	28,26	249	2,8	44,94	70	3,02
23	65	16	19	3,78	223	2,9	40,66	25	3,75
24	-	-	21	2,77	-	6,5	44,94	-	3,52
25	47	31	19	0,46	220	4,4	40,66	117	5,02
26	54	15	27	1,68	162	3,3	57,78	32	3,39
27	128	14	5	-	675	1,7	10,7	-	4,21
28	63	51	17	0,62	771	1,6	36,38	92	3,68
29	70	31	32	15,71	937	5,5	68,48	53	3,16
30	42	9	23	2,1	446	3,7	49,22	50	3,57
31	81	10	17	0,58	185	3,9	36,38	13	4,07
32	115	21	11	2,1	136	5,3	23,54	53	3,27
33		10	25	-	-	-	53,5	-	-
34	111	24	20	7,58	270	5,7	42,8	252	3,52
35	102	16	14	2,62	546	6,6	29,96	113	4,13
36	-	12	12	8,98	242	-	25,68	20	2,61
37	73	10	28	4,33	230	-	59,92	18	3,47
38	-	11	33	5,01	627	-	70,62	-	-
39	62	14	13	9,27	255	3,7	27,82	21	2,92

40	384	206	61	5,64	4983	35,6	130,54	179	2,92
41	81	22	13	2	270	7,3	27,82	41	3,95
42	-	35	14	6,28	1120	11,2	29,96	80	3,7
43	92	17	12	8,99	159	2,8	25,68	128	3,26
44	53	9	13	17	165	2,9	27,82	88	2,96
45	-	46	41	25,6	2356	17,8	87,74	-	3,41
46	73	18	8	1,82	179	2,2	17,12	42	3,46

Çalışmaya dahil edilen 71 hastadan 4 kişiye ait WBC kan değerlerine ulaşılamamıştır. Hastaların WBC değerleri; 9 (%12,6) hastada normal değer aralığında, 32 (%45) hastada azalan ve 19 (%26,7) hastada artan seviyelerde olduğu gözlemlendi.

WBC değeri normal değerinin altında olan 32 hasta tespit edildi; Bu grupta incelenen 28 hastada nötrofil, 27 hastada lenfosit, 29 hastada monosit, 27 hastada PLT ve 31 hastada HCT değeri normal seviyenin altında tespit edilmiştir. WBC değeri normal değerinin üzerinde tespit edilen 19 hastanın 16'sında ise CRP değeri artan seviyelerde olduğu tespit edildi.

Elde edilen hasta grubunda, mutasyon saptanan ve mutasyon saptanmayan hastaların hemogram ve biyokimya sonuçları karşılaştırılığında, pozitif hasta değerlerinin diğer gruptaki hastaların değerleriyle arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0.05$).

Arşivden elde edilmesi planlanan FLT3 mutasyon taraması sonucu elde edilen jel elektoroforezi görüntü sonuçlarına ulaşılamadı.

Elde edilen klinik verilerin ve taranan mutasyonların incelenen 71 hasta ile birlikte geniş bir tablosu oluşturuldu. Yaş, cinsiyet, AML alt gruplandırması ve saptanan mutasyon bilgileri ile birlikte, incelenen WBC değerleri kaydedildi. SPSS(SPSS 16.0) programı ile istatistiği yapılan WBC değeri 3,6-10,2 referans değeri aralığında değerlendirilerek; normal değerinin üstü lökositoz, bu referans değerinin altı ise lökopeni olarak yorumlandı.(Tablo .2.)

Tablo 4.5. AML hasta grubunun klinik verileri ile saptanan mutasyonlar

OLGU NO	HASTA YAŞI	CİNSİYET	ALT GRUP	SAPTANAN MUTASYON	WBC
1	35	E	-	-	Lökositoz
2	41	E	-	-	Lökositoz
3	66	E	M3	-	Lökopeni

4	34	E	-	-	Lökopeni
5	71	E	-	FLT3/D835	Normal
6	67	E	M5	-	Lökopeni
7	22	K	-	-	Normal
8	62	E	-	-	Lökopeni
9	42	E	-	NPM1	Lökopeni
10	58	K	M2	-	Normal
11	40	E	-	-	Lökosiztoz
12	56	E	-	-	Lökosiztoz
13	21	K	-	--	Lökosiztoz
14	44	E	-	-	Lökopeni
15	71	K	-	--	Normal
16	66	E	-	-	Normal
17	30	E	-	-	Normal
18	46	E	-	-	Lökopeni
19	55	E	-	-	Lökosiztoz
20	53	K	-	-	Lökopeni
21	41	K	-	-	Lökopeni
22	37	E	-	FLT/ITD	Lökopeni
23	26	E	-	-	Lökosiztoz
24	56	E	-	FLT3/D835	Lökopeni
25	29	E	-	-	Lökopeni
26	51	E	-	-	Lökopeni
27	81	E	M3	-	Lökopeni

28	68	EE	-	-	Lökopeni
29	75	E	-	-	Lökopeni
30	34	E	-	-	Lökopeni
31	89	E	-	-	Lökopeni
32	23	K	-	-	Lökopeni
33	74	K	-	-	Lökopeni
34	34	E	-	-	Lökopeni
35	89	K	-	-	Lökopeni
36	23	E	M3	-	Normal
37	74	E	-	-	Lökopeni
38	25	E	-	-	Lökopeni
39	42	E	-	-	Lökosiztoz
40	-	E	M3	-	Lökopeni
41	36	E	-	-	Lökosiztoz
42	66	K	-	-	Lökopeni
43	72	E	-	-	Lökopeni
44	69	E	-	-	Lökosiztoz
45	92	E	M3	-	Lökosiztoz
46	68	K	M3	-	Normal
47	25	K	-	-	Lökopeni
48	57	E	-	-	Lökopeni
49	72	K	M4	NPM1	Lökopeni
50	65	E	M4	-	Normal
51	28	E	-	-	Lökosiztoz

52	56	E	-	-	Lökopeni
53	38	E	-	-	Lökopeni
54	74	E	-	FLT/ITD	Lökopeni
55	79	E	-	-	Lökopeni
56	71	K	-	-	Normal
57	64	E	-	-	Lökopeni
58	36	E	-	-	Lökositoz
59	82	E	-	FLT/ITD	Lökositoz
60	74	E	-	-	Lökopeni
61	41	E	M2	NPM1	Lökositoz
62	56	E	-	-	Lökositoz
63	38	E	-	-	Lökopeni
64	43	E	-	-	Lökopeni
65	32	K	-	-	Lökositoz
66	45	E	-	NPM1	Lökopeni
67	-	E	M4	NPM1	Normal
68	-	E	-	-	-
69	-	E	-	-	-
70	-	E	-	-	-
71	77	E	-	-	-

Tablo 4.6. Mutasyon Görülen Hastaların Flow Sitometri Sonuç Değerleri

Olgu	BLAST	CD34	CD45	CD33	HLA-DR	CD117	MPO	CD99	CD22
1	4,64%	21,72%	57,18 %	51,61 %	23,58%	37,36%	88,91%	17,58 %	28,14 %
2	46,89%	6%	34,67 %	65,88 %	30,08%	78%	53,09%	15,43 %	54,12 %
3	7,65%	11,27%	72,87 %	19,57 %	32,04%	23,60%	32,63%	1,17%	13,47 %
4	51,13%	4,31%	90,45 %	88,18 %	25,22%	79,35%	28,28%	61,83 %	-
5	23,37%	23,92%	81,35 %	77,98 %	13,91%	29,25%	50,70%	76,70 %	98,94 %
6	78,65%	31,73%	99,00 %	93,19 %	21,78%	95,59%	74,15%	86,23 %	0,62%
7	74,60%	7,29%	22,29 %	97,68 %	15,86%	7,63%	0,31%	92,77 %	12,07 %
8	50,89%	5%	99%	25,88 %	92%	78,90%	36,77%	89,77 %	14,64 %
9	79,34%	13,34%	94,32 %	87,33 %	60,36%	90,70%	35,32%	-	1,03%
10	26,65%	1,67%	9,04%	1,85%	1,20%	0,90%	80,68%	8,09%	6,44%

Tablo 4.7. Hasta Grubunun Genetik Anomali Sonuç Tablosu

Olgu	Mutasyon	t(15;17)	inv(16)	9;22	11q23	del5	del20q	tri8	del7q
1	-	neg	-	neg	-	-	-	-	-
2	-	poz	-	neg	-	-	-	-	-
3	-	neg	-	neg	neg	-	-	-	-
4	-	neg	-	neg	-	-	-	-	-
5	FLT3/D835	poz	-	neg	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	neg	-	-	-	-	-	-
8	-	neg	-	-	neg	-	-	-	-
9	NPM1	-	-	neg	-	-	-	-	-
10	-	neg	neg	neg	neg	-	-	-	-
11	-	neg	neg	neg	neg	-	-	-	-
12	-	neg	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	neg	neg	neg	-
14	-	neg	neg	-	-	-	-	-	-
15	-	neg	-	-	-	-	-	-	-
16	-	neg	-	poz	-	-	-	-	-
17	-	neg	neg	-	neg	-	-	-	-

18	-	neg	-	-	neg	-	-	-	-
19	-	neg	-	-	-	-	-	-	-
20	-	neg	-	-	-	-	-	-	-
21	-	neg	neg	neg	-	-	-	-	-
22	FLT3/ITD	neg	-	neg	-	-	-	-	-
23	-	neg	-	neg	-	-	-	-	-
24	FLT3/D835	poz	-	neg	-	-	-	-	-
25	-	neg	neg	neg	-	-	-	-	-
26	-	poz	neg	neg	-	-	-	-	-
27	-	neg	-	neg	-	neg	neg	-	-
28	-	poz	-	neg	-	-	-	-	-
29	-	neg	-	neg	neg	-	-	-	-
30	-	neg	neg	neg	-	-	-	-	-
31	-	neg	neg	neg	neg	-	-	-	-
32	-	neg	-	neg	yet	-	-	-	-
33	-	neg	-	neg	-	-	-	-	-
34	-	neg	-	neg	neg	neg	neg	neg	-
35	-	poz	-	neg	neg	-	-	-	-
36	-	-	-	neg	neg	-	-	-	-
37	-	-	-	-	neg	-	-	-	-
38	-	neg	-	-	-	-	-	-	-
39	FLT3/ITD	neg	poz	-	-	-	-	-	-
40	-	neg	-	-	-	-	-	-	-
41	-	neg	-	-	-	-	-	-	-
42	-	neg	-	neg	-	-	-	-	-
43	NPM1	neg	-	neg	-	-	-	-	-
44	NPM1	neg	-	-	-	-	-	-	-
45	-	neg	-	neg	neg	neg	neg	neg	-
46	-	neg	-	neg	yet	-	-	-	-
47	-	neg	-	neg	yet	-	-	-	-
48	-	neg	-	neg	neg	-	-	-	-
49	NPM1	neg	-	neg	-	-	-	-	-
50	-	neg	-	neg	-	neg	-	-	-
51	-	neg	-	-	yet	-	-	-	-
52	-	neg	-	-	-	-	-	-	-
53	-	neg	-	-	-	-	-	-	-
54	-	poz	-	-	-	-	-	-	-
55	-	neg	-	-	-	neg	-	-	-
56	-	poz	-	-	neg	-	-	-	-
57	-	poz	-	-	neg	-	-	-	-
58	-	neg	-	neg	neg	-	-	-	-
59	-	neg	-	-	-	-	-	-	-
60	-	neg	-	neg	-	-	-	-	-
61	NPM1	neg	-	poz	-	-	-	-	-
62	-	neg	-	poz	-	-	-	-	-

63	-	neg	-	neg	-	-	-	-	-
64	-	neg	-	neg	-	-	-	-	-
65	-	neg	-	neg	-	-	-	-	-
66	NPM1	poz	-		-	-	-	-	-
67	NPM1	neg	-	neg	neg	-	-	-	-
68	-	-	-	poz	neg	-	-	-	-
69	-	neg	-	neg	-	-	-	-	-
70	-	neg	-	neg	-	-	-	-	-
71	-	neg	-	neg	-	-	-	-	-

Elde edilen tabloda 9 hastada t(15;17), 1 hastada inv(16), 3 hastada ise 9;22 genetik anomalisi saptanmıştır. Bu incelemede; inv(16) görülen 1 hasta FLT3/ITD pozitif, t(15;17) görülen 2 hasta FLT3/D835, 1 hasta NPM1 pozitif; t(9;22) görülen 1 hasta ise NPM1 pozitif mutasyonlu hastalar olarak gözlemlendi.

5. TARTIŞMA

Kan kanseri olarakta bilinen lösemiler, kemik iliğinde olgunlaşmamış hücrelerin aşırı poliferasyonu ile karakterize edilen hastalık grubudur. Kanser hastalıklarının görülme sıklığı sıralamasında 15. Sırada yer alırken, kansere bağlı ölümlerde 11. sıradadır. Kadınlara göre erkeklerde 1,5 kat daha sık görülmekte ve erkek hastalarda ölümcül seyirli olma eğilimindedir. Bu durum çalışma grubumuzdaki hastalarının %23,9'unun kadın, %76,1'inin erkek olması ile yaklaşık bir değer gösterebilmektedir.(Lo-Coco, & Fuad, & Ramazan, 2010).

Akut Myeloid Lösemi (AML), fonksiyonel gen mutasyonlarının ve kromozomal yeniden düzenlemelerin işlevsellik kazanması aracılığıyla hematopoietik öncüllerin klonal transformasyonundan kaynaklanan heterojen bir lösemi grubudur. Tüm AML vakalarının yaklaşık olarak %30'unu oluşturan FLT3 en yaygın görülen mutasyondur ve kötü prognostik faktör olarak kabul edilmiştir. Bu mutasyonlar, çoğunlukla reseptörün bitişiğinde duran zar alanı içinde amino asitlerin ardışık kopyalarını içerir ve tirozin kinaz aktivitesi ile meydana gelir.

Tez kapsamı çalışmasında 64 hastada FLT3 mutasyonlarının varlığı araştırıldı. Çalışmada FLT3/ITD ve FLT3/D835 olarak iki ayrı grupta mutasyon taraması incelendi. Sonuç olarak 4 (%5,6) hastada FLT3/ITD mutasyonu, 2 (%2,8) hastada ise FLT3/D835 mutasyonu saptanmıştır. FLT3 mutasyonları, yetişkin AML hastalarının ~%30 ila %35'inde bulunmakla birlikte bu mutasyonlar çoğunlukla normal karyotipli AML hastalarında saptanmıştır. (Takahashi ve ark., 2011). FLT3'ün yüksek aktivasyonu ile sonuçlanan mutasyonlar, reseptörün iki fonksiyonel alanında tanımlanmıştır. Bunlar AML tanılı hastalarda sırasıyla, %30 ve %10'unda meydana gelen; jukstamembran alanındaki (JM) dahili tandem duplikasyonları (ITD'ler) ve ikinci tirozin kinaz alanındaki (TKD) aktive edici nokta mutasyonlarıdır (Leung ve diğerleri, 2013). Bu oranlar bizim saptadığımız %5,6(FLT3/ITD) ve %2,8(FLT3/D835) mutasyon görülme sıklığı ile anlamlılık göstermemtedir.

Dorota ve arkadaşları 2016 yılında yaptıkları klinik çalışmada, normal karyotipli AML hastalarında FLT3/ITD mutasyonları ile hastalığın nüksetme riski ve daha kısa sağkalım süresi arasında doğrudan bir ilişki olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda, FLT3'ün dahili tandem duplikasyonu olan 1 hasta, 2 yıllık takip sırasında hayatını kaybetmiştir.

Hasta grubumuzda FLT/D835 mutasyonu saptanan bir erkek hasta Graft-versus-Host Hastalığı (GVHD) tanısı almıştır. Graft-versus-Host Hastalığı (GVHD), donörden hastaya kök hücre nakli ile verilen sağlıklı T-lenfositlerin aracılık ettiği yüksek immünolojik reaksiyon ile sonuçlanan organ fonksiyon bozukluğu ile giden kompleks bir hastalıktır. Bu hastalıkta vericinin hücrelerine greft denir ve vericinin bağışıklık hücreleri hastalıklı hücrelere saldırdığında, bu duruma graft-versus-lösemi (verici hücrelerin lösemiye karşı reaksiyonu) veya graft-versus-tümör (verici hücrelerin tümöre karşı reaksiyonu) etkisi ile meydana gelir. (Akpek, 2003, s.123-125).

FLT3 mutasyon taraması yapılan 1(%1,4) hastada inv(16), 2(%2,8) hastada ise t(15;17) sitogenetik anomalisi tespit edilmiştir. Bu iki sitogenetik anomaliside iyi prognoz göstermekle birlikte remisyona giren hastalarda sadece kemoterapi ile yapılan pekiştirme tedavisi ile birlikte hastalarda önemli ölçüde yanıt aldığı bildirilmektedir. Belirtilen anomalilerden, FLT3 pozitif mutasyonu ile birlikte saptanan inv(16) hasta 3 yıllık sağkalım gösterirken, diğer t(15;17) görülen hastalar tedavilerinde iyi prognoz sergilemekle birlikte tedavilerine devam edilmiştir.

NPM1 geni, çekirdek ile sitoplazma arasında taşıyıcı görevde ve belirgin nükleolar lokalizasyonda, yüksek derecede korunmuş bir fosfoproteindir. Bu protein, nükleik asitlerin bağlanması, sentrozom duplikasyonunun düzenlenmesi ve ribozomal fonksiyonlar dahil olmak üzere çeşitli fonksiyonlarda görev alır. Ek olarak NPM1, p53'ün kendisi ve p53 ile etkileşime giren ve p53'ü düzenleyen proteinler dahil olmak üzere çeşitli proteinlere bağlanır. Bu etkileşimler yoluyla, NPM1'in sitotoksik ilaç yanıtı olarak p53 fonksiyonuna stres kaynaklı ana düzenleyici olduğu düşünülmektedir. (Thiede ve ark, 2016). NPM1 mutasyonlarının prevalansı yaşla birlikte artar, çocukluk çağı AML'sinin %2-8'inde ve yetişkin AML'sinin %27-35'inde meydana gelir. NPM1 mutasyonları AML vakalarının yaklaşık olarak üçte birinde ifade edilirken bu hastalığın kadın baskınlığı gösterdiği bildirilmektedir (Suleiman ve ark., 2018). Bizim çalışmamızdaki oran ise 8 NPM1 mutasyonlu hasta 1 kadın görülmesidir.

Çalışmada akciğer kanseri bir erkek hastada NPM1 mutasyonu saptandı. 1994 yılında anaplastik büyük hücreli lenfomanın, NPM1 ile birleştiği tespit edilmiştir. (Du ve ark, 2018) Başka bir çalışmada CD34(-) ekspresyonunun NPM1 mutasyonu ile doğru orantıda . (Thiede ve ark, 2006) Aynı çalışmada NPM1'in diğer mutasyonlara oranla daha iyi bir prognoz

gösterdiği bildirilmiştir. Çalışma grubumuzda CD34(-) durumunu gösteren hiçbir hastada NPM1 mutasyonuna rastlanmamıştır.

AML hastalarının risk sınıflandırması ile ilgili olarak, AML ile t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1, inv(16)(p13.1;q22) ve mutasyona uğramış NPM1 olumlu sonuçla indüksiyon kemoterapisine iyi bir yanıt gösterir. Mutasyona uğramış NPM1 ile birlikte FLT3-ITD'si olmayan veya FLT3-ITD'si düşük olan vahşi tip NPM1'i olan hastalarda orta risk sınıflandırması vardır. Yabani tip NPM1 ve FLT3-ITD yüksekliğinin bir arada bulunması, olumsuz bir prognoz ve kötü sonuç ile ilişkilidir (Daver ve diğerleri, 2019). NPM1 mutasyonu saptadığımız 1 hastada t(15; 17) translokasyonu ile saptanırken, geriye kalan NPM1 mutasyonu saptanan 7 hastada; inv(16) ve t(15; 17) negatif olarak saptanmıştır. İyi prognoz olarak bildirilen bu durumda ise 1 hastada 3 yıllık sağkalım, 2 hastada ise 2 yıllık sağkalım görülmüştür.

CD34 kemik iliğinde bulunan ve tüm hücrelere dönüşebilme özelliklerine sahip hücrelerdir. En önemli özelliği buldukları dokuda hızlı bir şekilde o doku hücrelerine farklılaşabilmesidir. (Orfao ve ark, 2003; Wells ve ark, 2000) CD34 başta olmak üzere; CD117, CD33, CD11, CD15 ve HLA-DR lösemi sınıflandırılmasında önemli göstergelerdir. CD117, CD13 VE CD33 myeloid serilerdeki en erken antijenlerdir ve daha immatür olan CD34(+)'liği ile gözlenebilirler. (Menendez ve ark, 2001) Çalışmamızda 66 yaşında NPM1 mutasyonu saptanan erkek hastada CD117, CD33 VE HLA-DR pozitifliği aynı anda görülmüştür. Diğer yandan 77 ve 54 yaşlarındaki iki erkek hastada da CD34, HLA-DR ve CD117 pozitifliği ile birlikte genç blast hücrelerin artışı gözlemlenmiştir. Fakat iki hastada da herhangi bir mutasyon saptanmamıştır.

Lösemilerde %20-%30 arasındaki geniş blast oranı AML'ye dönüşümde ara dönemi tanımlar. (Howe ve ark, 2004) Çalışma grubunda KML'den AML'ye lösemik dönüşüm ön tanısıyla 2 erkek hasta gözlemlendi. Bir hastada NPM1 pozitif mutasyon saptanırken, diğer hastada herhangi bir mutasyon görülmedi.

Alt grup tayini diğer hastalıklarda olduğu gibi lösemilerde de en önemli faktörlerden biridir. Kişiye en uygun tedavi seçeneğinin saptanmasında blastik hücrelerin genetik yapısı, bazı kan değerleri ve immünohistokimyasal inceleme sonuçları oldukça önemlidir. Bizim retrospektif çalışmamızda incelediğimiz 71 kişilik hasta grubunda da M2 (n=2), M3 (n=6), M4 (n=3) ve M5 (n=1) olmak üzere farklı alt tiplere ait mevcut olmaktadır.

Lösemilerde beyaz kan hücrelerinin(WBC) aşırı yükseliği veya düşüklüğü gözlenebilir. İnsan vücudunun bağışıklık sistemi hücrelerinin ölçümüdür. Lökosit sayısı artışı, enfeksiyon varlığına veya bu enfeksiyona karşı bir fonksiyonun başlatıldığını gösterir. Bunun yanında fark edici bu artış veya azalış kan hastalıklarının da bir göstergesidir. Çalışmamızda Statistical Package for the Social Sciences (IBM SPSS Statistics (24.0)) programı ile değerlendirilen hastalara ait hemogram ve biyokimya testi sonuçları incelendiğinde; 32(%45) hastada WBC değeri azalan şekilde gözlenirken, 19(%26,7) hastada arttığı gözlemlenmiştir. Nötrofil, lenfosit ve monosit değerleri azalan lökosit sayısı ile doğrudan bağlantılı olarak azalırken, trombosit(PLT) ve hematokrit(HCT) değerlerinin de normalin altında tespit edilmesi genel olarak kan hücrelerinin yeterli üretilmediğini düşündürmektedir. Hücre hasarı sonucu artan Laktat dehidrogenaz (LDH) enzimi ise WBC yükseliği görülen 19 hastanın 16'sında yüksek seviyelerde olduğu tespit edildi. Diğer tüm hemogram(WBC, NEU, NEU%, LYM, LYM%, MONO, MONO%, EOS, EOS%, BASO, BASO%, PLT, HCT, MPW, RDW) ve biyokimya(ALP, ALT SGPT, Ast, BUN, CRP, LDH, Ürik Asit, Üre, GGT, Albumin) parametreleri istatistiksel olarak değerlendirilip literatür incelendiğinde, yüksek veya düşük kan değerlerinin, mutasyon saptanan ve saptanmayan hastalar arasında arasında anlamlı bir farklılık yoktu ($p>0.05$).

AML'de uzun süreli hastalısız sağkalım veya iyileşme sürecine geçilmesinin birinci basamağı (ön koşulu) tam remisyona ulaşılmasıdır. Birçok ilacın birlikte uygulanmasıyla yapılan bu yöntem, lösemi hücrelerinin kemik iliğinde saptanamayacak düzeye indirilmesi ve normal hematopoiesin sağlanması amaçlanır. Son 40 yıldır yaygın olarak kullanımda olan remisyona indüksiyonu tedavisi hücre siklusüne özgül ajan sitozin arabinozid ile hücre siklusüne özgül olmayan ajan daunorubisin(intravenöz olarak) den oluşmaktadır. Bu tedavi ile elde edilen tam remisyona oranı (TR) genç erişkin (<55 – 60yaş) AML olgularında %60-80, yaşlı AML (>55 – 60 yaş) olgularında %40-55, genel sağkalım oranı ise sırasıyla %30 ve %10-15'dir. Son 10 yıldır Akut myeloid lösemide tedavi başarısının artırılabilmesine yönelik yeni yaklaşımlar mevcuttur. Aşağıda bu çalışmaların kapsamındaki ajanlar bildirilmiştir(Beşışık., 2016).

- ✓ İmmunoterapi (örneğin gemtuzumab ozogamicin, IL-2, histamine dihidroklorid),
- ✓ Nükleozid analogları (klofarabin, troksasitabin)
- ✓ Hücre sinyal iletilişinin yönlendirilmesi (örneğin FLT3 inhibitörleri; CEP-706, PKC412, SU5416, SU5614, SU11248, farnesil transferaz inhibitörleri; R11577-ZARNESTRA)

- ✓ İlaç direnci yönlendirilmesi (siklosporin, PSC-833),
- ✓ Apoptoza yönlendirici (G3139-Genasense)
- ✓ Metillenmeyi azaltan ajanlar
- ✓ Antianjiojenik tedavi,
- ✓ Proteozom inhibisyonu (örneğin bortezomib)

Son yıllarda tedaviye yönelik yapılan çalışmalarla ileriye dönük olarak, FLT3 inhibitörlerinin ortaya çıkışı, terapötik yöntemler ve sonuçlarda büyük değişiklikler getirebilir. Midostaurin (PKC412, Novartis) gibi FLT3 inhibitörleri, FDA tarafından yeni teşhis edilen FLT3-ITD pozitif AML vakalarında kullanılan kemoterapi ile birlikte umut verici hedefe yönelik tedavi olarak onaylanmıştır (Wei et al. al., 2017). Bir multikinaz inhibitörü olan Midostaurin, birinci nesil bir FLT3 inhibitörüdür. Uluslararası CALGB 10603/RATIFY çalışmasının sonuçlarına göre midostaurin, yoğun kemoterapi ile birlikte ABD Gıda ve İlaç Dairesi ve Avrupa İlaç Ajansı tarafından onaylanmıştır; ek olarak , Avrupa İlaç Ajansı tarafından aktive edici bir FLT3 mutasyonu sergileyen AML'li yetişkin hastalar için idame tedavisi olarak onaylanmıştır.

FLT3'ü hedefleyen bir multikinaz inhibitörü olan Midostaurin, FLT3 ile mutasyona uğramış AML'de ön hat kemoterapisi ile kombinasyon halinde sağkalım oranlarında fayda gösterebilmektedir. Bu ilerlemeye rağmen, klinik pratikte FLT3 inhibitörlerinin kullanımı, bazı önemli ilaç-ilaç etkileşimleri ve optimal zamanlama, süre ve tedavi sıralaması konusundaki belirsizlik nedenleri ile halen karışık bir süreçtir. Monoterapi olarak, FLT3 inhibitörlerinin faydası başlangıçta eksik ve geçici klinik tepkiler ve kazanılmış direncin gelişimi ile sınırlandırılmıştır. Bu, ortak direnç mekanizmalarının üstesinden gelmek için tasarlanmış daha güçlü ve seçici FLT3 inhibitörlerinin geliştirilmesine önünü açmıştır. Bu ikinci nesil FLT3 inhibitörlerinden biri olan gilteritinib, nükseden veya refrakter AML'nin tedavisi için şimdilik FDA onaylıdır. Artık birden fazla FLT3 inhibitörü ticari olarak temin edilebildiğinden dolayı, bu ajanların AML popülasyonundaki rolünü daha fazla betimlemek önemlidir (Weis ve Marini, 2019).

Ele aldığımız hasta grubunun arşiv kayıtları incelendiğinde, FLT3 mutasyonu olan 1 hastaya Arsenik Trioksit(Trisenox) tedavisi uygulanmış olup hastalığın seyrine katkı sunduğu gözlemlenmiştir. Löseminin az görülen ama öldürücü türü olan promiyelositer lösemi tedavisinde kullanılan bu ilaç, Powell ve arkadaşlarının 518 yetişkin üzerinde yaptığı klinik deneyde, arsenik ve lösemi ilaçları alan 261 kişinin yaşam süresinin 3 yılın ardından

%86 oranında, yalnızca standart tedavi görenlerin yaşam süresinin ise %77 oranında arttığı görüldüğünü bildirdi.

NPM1 saptanan bir hastaya ise FLAG ile konsolidasyon tedavisi başlanmıştır. Hastada 2 yıllık sağkalım sağlanmıştır. 2017 yılında Dağdaş ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada akut lösemili 6 hastaya uygulanan bu yöntem sonucunda FLAG tedavisinin primer refrakter ve relaps akut lösemilerde bir tedavi seçeneği olabileceğinin ancak remisyon süresinin kısa olması nedeniyle özellikle allojeneik transplantasyon şansı olan hastalarda kullanılması daha uygun görüldüğü belirtilmiştir. Bunun yanında yüksek oranda hematolojik ve enfeksiyöz toksisiteye yol açabileceğide bildirilmiştir.

Standart indüksiyon tedavisinde kullanılan ilaçlar genellikle sitozin arabinozid (ara-C) ve antrasiklin kombinasyonudur. Antrasiklin olarak daunorubisin standart ilaçtır. Diğer antrasiklin ya da antrasendion grubu ilaçlar olarak idarubisin, mitoksantron ve daha seyrek olarak amsakrin, aklarubisin de kullanılmaktadır. İlaça direnç gelişmesi idarubisin ile daha az olmaktadır. FLT3 saptanan 3 hastada idarubucin(cytrarabine) başlanmış ve hastalarda oluşan ilaç direnci bilgisine ulaşılamamakla birlikte, hastalarda olumlu sonuçların alındığı incelenmiştir. NPM1 pozitif mutasyon görülen bir hastada ilaç direncinin geliştiği kayıt altına alınmıştır. Hastaya düzenli olarak uygulanan idarubisin ilacının, literatürde böyle durumlar ile sonuçlanacağı bildirilmiştir.

Birçok kanserin kemoterapiye direnç geliştirdiği temel mekanizma olan çoklu ilaç direnci (MDR), başarılı AML tedavisinin önündeki en büyük engellerden biridir (Hatakeyama ve Harashima, 2014). Erişkin AML hastalarında ise bu durum artan yaş daha kötü sonuçlarla ilişkilidir. Genel sağlık, performans durumu ve farklı komorbiditeler, bu hastaların yoğun tedavi modalitelerine gösterdikleri toleransın üzerinde önemli bir etkiye sahipken, yaşa bağlı AML ile ilişkili spesifik genetik anormallikler ilaç direncini arttırmaktadır. Bu nedenle yaş, tedavi kararlarının tek belirleyicisi olmamalıdır (Almeida ve Ramos, 2016). Diğer yandan, lestauranib g

Hazıladığımız retrospektif çalışma sonucunda elde ettiğimiz verileri, son 15 yılda yapılan ve çalışmamız ile paralellik gösteren diğer çalışmaları karşılaştırdığımızda; Bizim çalışmamızda olduğu gibi, NPM1 mutasyonunun, FLT3 mutasyonlarına göre görülme sıklığının daha yüksek saptandığı görülmüştür. Bunun yanında hasta sayısına oranla mutasyon görülme sıklığı ise diğer çalışmalarda oldukça fazladır. Bizim elde ettiğimiz düşük pozitif mutasyon saptanma oranının, benzerlik gösterdiği çalışmalar ise ülkemizde yapılan

iki yüksek lisans tez çalışmasıdır. Başka bir yüksek lisans çalışmasındaki veriler ise hasta sayısının yüksek olması ile doğru orantılı görülen sıklık mevcuttur. Ancak saptanan mutasyonlarda NPM1 mutasyonu değil, yüksek biçimde FLT3 pozitiliği görülmüştür.

Yapılan diğer çalışmalardaki kullanılan kit ve cihazlar karşılaştırıldığında ise; kullanılan cihazlar düşük derecede benzerlik göstermekle birlikte, kullanılan kitler ve çalışma teknikleri oldukça farklılık göstermektedir.

Yaptığımız çalışma grubundaki hasta sayısı, yapılan elektroforez işleminin jel görüntü arşivinin bulunamaması ve hasta bilgi sisteminde bazı bilgilere eksik ulaşılması, çalışmamızı sınırlamıştır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hazırladığımız restrospektif çalışmamız sonucu, elde ettiğimiz klinik bulgu ve taramalar ile birlikte hastalara ait parametleri inceledik. İstedığımız birçok hasta kaydı ve raporlarına ulaşabildik.

FLT3 ve NPM1 genler lösemilerde en sık rastlanan mutasyonlardır. Bu iki mutasyonunda AML başta olmak üzere lösemik dönüşüm ile seyreden diğer lösemi alt tiplerinde de saptanabileceği incelenmiştir. FLT3 yüksek nüks riski ile birlikte düşük sağ kalım oranları ile sonuçlanmaktadır. Bu mutasyonun mutans/normal gen oranlarının sağ kalım ile ilişkili bir hasta izlem kriteri olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Diğer yandan NPM1 daha iyi bir klinik seyir ile karakterize bir mutasyon olarak görülmekle birlikte, AML'nin prognozu ve alt tiplerine ayrılıp tanı alması hastaların tedavi ve tanısına yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

Yapılan diğer incelemeler ile karşılaştırıldığında, hasta grubumuzun klinik veri ve sonuçları ele alındığında önemli derecede farklılık göstermektedir. Diğer çalışmalar kendi aralarında karşılaştırıldığında ise çalışma teknikleri ve kullanılan deney kitleri farklı olmasına rağmen ulaşılan oranlar yaklaşık olarak benzerlik göstermektedir.

Mutasyon görülme oranlarının farklı olmasının, kit içerikleri ve kullanılan teknikler ile bağlantılı olabilmesinin yanı sıra ülkemizde yapılan çalışmalardaki görülme sıklığının diğer ülkelere göre düşük olması; ülke popülasyonu ile de bağlantılı olabileceği düşünülmektedir. Bunlara ek olarak; yapılan birçok çalışmada da görüldüğü gibi, mutasyonların varlığının ilaç kullanımı üzerine etkisi oldukça fazladır. Retrospektif olarak hasta arşiv dosyaları incelendiğinde, genetik mutasyon tarama raporlarının hasta tedavi ve takibi ile paralel gitmediği gözlemlenmiştir. Bundan dolayı genetik raporların hastanın tedavi seyrinde öncelik olarak göz önünde bulundurulduğunda, hastalığın ilerleyişine oldukça fazla katkı sunabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

Agnès, F., Shamon, B., Dina, C., Rosnet, O., Birnbaum, D., & Galibert, F. (1994). Genomic structure of the downstream part of the human FLT3 gene: exon/intron structure conservation among genes encoding receptor tyrosine kinases (RTK) of subclass III. *Gene*, 145(2), 283-288.

Ağaoğlu, L., Neyzi, O., Ertuğrul, T., (2010) *Lösemiler İçinde: Pediatri*. 4.Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi

Austin, H., Delzell, E., & Cole, P. (1988). Benzene and leukemia. A review of the literature and a risk assessment. *American journal of epidemiology*, 127(3), 419-439.

Bullinger, L. ve Valk, PJ (2005). Akut miyeloid lösemide gen ekspresyonu profili. *Klinik Onkoloji Dergisi*, 23 (26), 6296-6305.

Carow, C. E., Levenstein, M., Kaufmann, S. H., Chen, J., Amin, S., Rockwell, P., ... & Small, D. (1996). Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias.

Coskunpınar, E. M. (2008) *Çocukluk Çağı Akut Myeloid Lösemi Hastalarında Kromozomal Değişiklikler ve Flt3 Gen Mutasyonlarının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.*

Cotton, R. G. (2000). Methods in clinical molecular genetics. *European journal of pediatrics*, 159(3), S179-S182.

Falini, B., Nicoletti, I., Bolli, N., Martelli, M. P., Liso, A., Gorello, P., ... & Martelli, M. F. (2007). Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias

Fröhling, S., Schlenk, R. F., Breitnick, J., Benner, A., Kreitmeier, S., Tobis, K., ... & Döhner, K. (2002). Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 100(13), 4372-4380.

Goljan, E. F. (2019). Rapid review Pathology 5th edition/Goljan EF-Canada.

Gravholta, C.H., Juulb, S., Naeraac, R.W., Hansend, J. (1998) Morbidity in umer Syndrome, 51(2):147-158

Hasle, H., Mellempgaard, A., Nielsen, J., & Hansen, J. (1995). Cancer incidence in men with Klinefelter syndrome. *British journal of cancer*, 71(2), 416-420.

Head, D.R. (2004). Classification and differentiation of the acute leukemias. In: Wintrobe's Clinical Hematology, Eds: Greer JP, Foerster J, Lukenks JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins. pp:2063-76.

Kliegman, R. M., Behrman, R. E., Jenson, H. B., & Stanton, B. M. (2007). *Nelson textbook of pediatrics e-book*. Elsevier Health Sciences.

Lanzkowsky, P. (Ed.). (2005). *Pediatric hematoloji ve onkoloji el kitabı*. Elsevier. s.367-406

Levis, M., & Small, D. (2003). FLT3: ITD does matter in leukemia. *Leukemia*, 17(9), 1738-1752.

Lichtman, M. A., & Segel, G. B. (2005). Uncommon phenotypes of acute myelogenous leukemia: basophilic, mast cell, eosinophilic, and myeloid dendritic cell subtypes: a review. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 35(3), 370-383.

Matutes, E., Morilla, R., Farahat, N., Carbonell, F., Swansbury, J., Dyer, M., & Catovsky, D. (1997). Definition of acute Naoe, T., & Kiyoi, H. (2004). Normal and oncogenic FLT3. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 61(23), 2932-2938.

McKenna, H. J., Stocking, K. L., Miller, R. E., Brasel, K., De Smedt, T., Maraskovsky, E., ... & Peschon, J. J. (2000). Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 95(11), 3489-3497.

Meshinchi, S., Stirewalt, D. L., Alonzo, T. A., Boggon, T. J., Gerbing, R. B., Rocnik, J. L., ... & Radich, J. P. (2008). Structural and numerical variation of FLT3/ITD in pediatric AML. *Blood*, 111(10), 4930-4933.

- mismatches in RNA:DNA duplexes. *Science* 1985; 230:1242-1246.
- Moloney, W. C. (1987). Radiogenic leukemia revisited.
- Myers RM, Larin Z, Maniatis T. Detection of single base substitutions by ribonuclease cleavage at biphenotypic leukemia. *Haematologica*, 82(1), 64-66.
- Niederhuber, J. E., Armitage, J. O., Doroshow, J. H., Kastan, M. B., & Tepper, J. E. (2013). *Abeloff's clinical oncology e-book*. Elsevier Health Sciences.
- Rosnet, O., & Birnbaum, D. (1993). Hematopoietic receptors of class III receptor-type tyrosine kinases. *Critical reviews in oncogenesis*, 4(6), 595-613.
- Rosnet, O., Bühring, H. J., Marchetto, S., Rappold, I., Lavagna, C., Sainty, D., ... & Birnbaum, D. (1996). Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells. *Leukemia*, 10(2), 238-248.
- Ruddon, R. (2010). *Molecular biology of cancer: translation to the clinic*. Academic Press.
- Sakızlı, M., Atabey, N. ed. (2016) Hücre: Moleküler Yaklaşım. İzmir Tıp Kitabevi, İzmir, (7), s.155-158
- Schumacher, H.R. (1990) Acute Leukemia: Approach To Diagnosis. Igaku-Shoin Med Pub, Inc:Tokyo.
- Sema, A. N. A. K., & Uysalol, E. (2011). Akut Miyeloid Lösemi AML. *Çocuk Dergisi*, 12(4), 153-158.
- Small, D., Levenstein, M., Kim, E., Carow, C., Amin, S., Rockwell, P., ... & Gewirtz, A. M. (1994). STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(2), 459-463.
- Tahsinoğlu M., Çöloğlu AS., Erseven G., 1981, Dişhekimleri için Genel Patoloji, Altın Matbaacılık, İstanbul,
- Thiede, C., Steudel, C., Mohr, B., Schaich, M., Schäkel, U., Platzbecker, U., ... & Illmer, T. (2002). Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis Presented in part at the 42nd Annual Meeting of the American Society of Hematology, December 1-5, 2000, San Francisco, CA (abstract 2334). *Blood*, 99(12), 4326-4335.
- Ucunoglu, N. (2011) Akut Myeloid Hastalarında NPM1 ve FLT3 Genlerindeki Moleküler Değişikliklerin Araştırılması, İstanbul.
- Valk, PJ, Delwel, R., & Löwenberg, B. (2005). Akut miyeloid lösemide gen ekspresyonu profili. *Hematolojide güncel görüş*, 12 (1), 76-81.
- Wodnar-Filipowicz, A. (2003). Flt3 ligand: role in control of hematopoietic and immune functions of the bone marrow. *Physiology*, 18(6), 247-251.
- Yamamoto, Y., Kiyoi, H., Nakano, Y., Suzuki, R., Kodera, Y., Miyawaki, S., ... & Naoe, T. (2001). Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 97(8), 2434-2439.
- Yanada, M., Suzuki, M., Kawashima, K., Kiyoi, H., Kinoshita, T., Emi, N., ... & Naoe, T. (2005). Long-term outcomes for unselected patients with acute myeloid leukemia categorized according to the World Health Organization classification: a single-center experience. *European journal of haematology*, 74(5), 418-423.
- Yiallourous, D. B. M., Herold, F., & Creutzig, U. (2008). Akute myeloische Leukämie (AML). *Therapie*, 14(2008).
- Yiallourous, M. (2010). Acute myeloid leukaemia (AML)-brief information. *kinderjrebsinfo*.
- Yorulmaz, H., Özkalemkaş, F., Özçelik, T., Özkocaman, V., Celal, A. C. A. R., Veyselöglü, L., ... & TUNALI, A. (2010). Akut miyeloid lösemi remisyon induksiyon kemoterapisinde farklı antrasiklinlerin rolü. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 36(1), 1-6.
- Zheng, R., Levis, M., Piloto, O., Brown, P., Baldwin, B. R., Gorin, N. C., ... & Small, D. (2004). FLT3 ligand causes autocrine signaling in acute myeloid leukemia cells. *Blood*, 103(1), 267-274.

http://www.thd.org.tr/thdData/userfiles/file/08_04_2006_ugur_ozbek_10-55_11-20.pdf

https://www.journalagent.com/cocuk/pdfs/CD_12_4_153_158.pdf

<https://www.thd.org.tr/thdData/userfiles/file/2006akutlosemi.pdf>

https://tr.wikipedia.org/wiki/Polimeraz_zincir_reaksiyonu

https://www.thd.org.tr/thdData/userfiles/file/09_04_2006_sevgi_besisik_10-45_11-10.pdf



EKLER

EK-2 Olgu Rapor Formu

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ HASTANESİ TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

HASTA OLGU RAPOR FORMU

Adı-Soyadı :

Materyal : Periferik Kan EDTA

Dosya No :

Ön Tanı : AML

Tanı tarihi :

Gönderen Doktorun Adı-Soyadı :

İncelemenin Yapıldığı Laboratuvar : Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Taranan Mutasyonlar: FLT3/ITD, FLT3/D835 ve NPM1

Değerlendirmeye alınacak diğer sonuçlar;

Hemogram:

WBC:

LYM:

LYM%:

LYM:

NEU%:

MONO:

MONO%:

EOS:

EOS%:

BASO:

BASO%:

PLT:

HCT:

MPV:

RDW:

Biyokimya:

ALP:

ALT:

BUN:

CRP:

LDH:

ÜRE:

Ürea:

CCT:

Albumin:

Tıbbi Görüntüleme:

BT:

US:

Patoloji:

Periferik Yayma:

Fiziki Bulgular:

EK-3 ETİK KURUL ONAYI



T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
Tıp Fakültesi Dekanlığı



Sayı : 80418770-100/56667
Konu : Etik kurul başvurunuz hk.

14/08/2020

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Seda EREN KESKİN

İlgi : 13/08/2020 tarihli, 56554 sayılı ve "Eğitim - Öğretim İşleri (Genel)" konulu yazı

GOKAEK-2020/14.02 GOKAEK 30 Temmuz 2020 tarihli toplantısında değerlendirilen, Dr. Öğr. Üyesi Seda EREN KESKİN sorumluluğunda yürütülmesi planlanan, **2020/225** proje numaralı "Akut Myeloid Lösemi Hastalarında FLT3 ve NPM1 Gen Mutasyonlarının Sıklığının Belirlenmesi ve Klinik Öneminin Araştırılması" başlıklı proje değerlendirilmiş ve aşağıdaki değişikliklerin yapılmasını takiben yeniden değerlendirilmesine karar verilmiştir: (1) Karşılaştırılacak parametrelerin ne olacağı, özellikle hangi değişkenler arasındaki ilişkinin değerlendirileceği, primer sonlanım bölümünde belirtilmelidir. (2) İstatistiksel yöntem bölümü ayrıntılandırılmalıdır. Sorumlu araştırmacı tarafından 13.08.2020 tarih ve 61545045-100/56554 sayılı dilekçe ile gönderilen revizyon evrakında, (1) Araştırmanın primer sonlanımının taranan mutasyonlar arasında görülen laboratuvar ve klinik farklılıklar olduğu anlaşılmaktadır, (2) Araştırma tek kollu bir rapor olarak gönderildiği için hipotez testlerinin uygulanmayacağı, değişkenlerin tanımlayıcı verilerden oluşacağı anlaşılmaktadır. Projenin revize haliyle yürütülmesi uygun bulunmuştur.

KARAR: KABUL, PROJENİN YÜRÜTÜLMESİ UYGUNDUR.

Projenizin etik kurul başvurusunda geldiği haliyle yürütülmesi uygun bulunmuştur. Araştırmaya başlamak için Etik Kurul Onay Formu'nu almanız, Araştırmaya Etik Kurul onay tarihinden sonra en geç 90 gün içinde başlamanız, (i) Başlayamadığınızda veya protokolda bildirdiğiniz hususlarda herhangi bir değişiklik yaptığınızda Değişiklik Bilgi Formu ile, (ii) Araştırmanızı onay aldığınız şekilde tamamladığınızda Sonuç Raporu ile Etik Kurul'a başvurmanız gerekmektedir.

Doç.Dr. Nurettin Özgür DOĞAN
Kurul Başkanı

DAĞITIM

Gereği:
Dr. Öğr. Üyesi Seda EREN KESKİN

Bilgi:
Dr. Öğr. Üyesi Aşlıhan AKPINAR
Hasan Serhat KIROĞLU