

**T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI**

**AKUT LÖSEMİLERDE GRAVİN EKSPRESYONUNUN
PROGNOSTİK ÖNEMİ**

Dr. Mustafa YILDIRIM

UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Semra PAYDAŞ**

ADANA-2006

TEŞEKKÜR

Hekimliği ve örnek kişiliği ile yolumu aydınlatan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Semra PAYDAŞ'a, yetişmemde emeği olan tüm hocalarıma, desteklerini benden esirgemeyen başta eşim Evrim YILDIRIM olmak üzere aileme, çalışmamda emeği yadsınamayacak olan Laborant Sabahattin ASLAN'a katkılarından dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR.....	i
TABLO LİSTESİ.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
ÖZET	v
ABSTRACT.....	vi
KISALTMALAR LİSTESİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Akut Lösemiler	2
2.1.1. Etyoloji.....	2
2.1.2. Patogenez	4
2.1.3. İnsidens ve Sınıflama.....	5
2.1.4. Klinik	6
2.2. cAMP Sinyal İleti Sistemi ve A-Kinaz Sabitleyici Sinyal Kompleksi.....	9
2.3. Gravin	11
2.3.1. Gravinin Yapısı.....	11
2.3.2. Gravinin Fonksiyonları	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	16
3.1. Örnek Toplama	16
3.2. mRNA İzolasyonu	16
3.3. cDNA Sentezi	17
3.4. Gravin ve β Actin Primer Dizini.....	18
3.5. Real-Time PCR.....	18
3.6. Değerlendirme	20
3.7. İstatistik Analizler.....	20
4. BULGULAR.....	21
5. TARTIŞMA	28
6. SONUÇLAR.....	36
KAYNAKLAR	37
ÖZGEÇMİŞ	41

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Tablo 1: Akut Lösemilerde Görülen Kromozomal Translokasyonlar.	5
Tablo 2: Akut Lösemilerde WHO Sınıflaması.	6
Tablo 3: AML’de Prognostik Faktörler.	8
Tablo 4: ALL’ de Prognostik Faktörler.	8
Tablo 5: cDNA Reaksiyonu Protokolü.	17
Tablo 6: Sıcaklık Döngüsü Programı.	17
Tablo 7: Real-Time PCR Reaksiyon Protokolü.	18
Tablo 8: Denatürasyon Programı.	19
Tablo 9: Amplifikasyon Programı.	19
Tablo 10: Soğutma Programı.	19
Tablo 11: Lösemi Alt Gruplarına Göre Yaş ve Cinsiyet Özellikleri.	21
Tablo 12: Hastaların Organomegali Özellikleri.	21
Tablo 13: Periferik Kan Bulguları ve Tümör Yüğü Göstergeleri.	22
Tablo 14: Akut Lösemili Hastaların Yüzey Antijen Sonuçları.	23
Tablo 15: Hastalara Uygulanan Remisyon İndüksiyon Kemoterapileri.	24
Tablo 16: Hasta Alt Gruplarına Göre Sağkalım.	25
Tablo 17: Hasta ve Kontrol Grubunda β Actin-Gravin Δ Ct Değerleri.	25
Tablo 18: Gravin Ekspresyonuna Göre Sağkalım.	26
Tablo 19: Gravin Ekspresyonundaki Değişimdeki Alt Gruplara Göre Sağkalım.	26
Tablo 20: Δ Ct Değerlerine Göre Sağkalım.	26
Tablo 21: Sağkalımı Etkileyen Bağımsız Faktörler.	27
Tablo 22: Malignansilerde Gravin ile İlgili Yapılan Çalışmalar.	33

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No:

Sayfa No:

Şekil 1. SScCS/Gravinin izoformları.....	12
Şekil 2: ΔC_t ile sağkalım arasındaki ilişki.....	27

ÖZET

Akut Lösemilerde Gravin Ekspresyonunun Prognostik Önemi

Lökomogenez çok basamaklı bir süreçtir ve çok sayıda faktör bu süreçte yer alır. Tedavinin planlanmasında, tedavi hedeflerinin ve prognozu etkileyen faktörlerin belirlenmesi önemlidir. Prognostik faktörler, hastaya uygulanacak tedavinin yoğunluğunun belirlenmesinde önemlidir.

Gravin, A kinaz sabitleyici protein ailesinin üyesi bir tümör süpresör genidir. Sınırlı sayıda tümörde çalışılmış ve ekspresyon düzeyinin azaldığı gösterilmiştir. Akut Lösemilerde Gravin ekspresyonunun incelendiği bir çalışma vardır ve bu çalışmada gravin ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Ancak literatürde Gravin ekspresyonunun prognozla ilişkisini detaylı şekilde inceleyen çalışma yoktur. Çalışmamızın amacı akut lösemilerde Gravin ekspresyonu ve varsa prognozla ilişkisini ortaya koymaktır. Gravin ekspresyonu RT-PCR yöntemiyle araştırılmıştır. Kontrol gen ekspresyonu olarak β Actin kullanıldı. Sonuçlar Comperative Ct yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Çalışmaya akut lösemili 137 olgu ve 25 sağlıklı gönüllü dahil edildi. Hastaların 100'ü (%73) AML, 37'si (%27) ALL idi. Hastaların 70 (%51.1)'i erkek, 67 (%48.9)' si kadın hastalardı. Kontrol grubunda β Actin Ct değeri 21.64, Gravin Ct değeri 38.17 ± 2.5 (41-28.6), Gravin- β Actin Δ Ct değeri 16.2 ± 2.5 (19.3-5.2) bulundu. Hasta grubunda β Actin Ct değeri 22.5 ± 2.8 (17.8-35.1), Gravin Ct değeri 42.2 ± 4.9 (31.2-50), Gravin- β Actin Δ Ct değeri 19.6 ± 4.5 bulundu. Hasta ve kontrol grupları arasında Gravin- β Actin Δ Ct değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (p değeri <0.001). Genel değerlendirmede, hasta grubunda kontrol grubuna göre Gravin ekspresyonunun 11 kat azaldığı bulundu.

Hasta sağkalımları Δ Ct değerine göre değerlendirildiğinde; Δ Ct değeri 0-16 olan hasta grubunda ortalama sağkalım 17 hafta, 16-20 arasında olan hasta grubunda 24 hafta, 20'nin üzerinde olan hastalarda 48 hafta olarak bulundu.

Sonuç olarak Gravin ekspresyonunun sağkalımı olumsuz yönde etkilediği saptandı. Ancak halen bir tümör supressor gen olarak bilinen bu genin alt gruplarının ayrı ayrı değerlendirilmediği bu çalışmaya göre bu genin kötü prognostik parametre olarak ileri sürülmesi şu anda mümkün değildir. Diğer yandan tümör supressor genlerden bazılarının kaybının paradoksal olarak iyi yönde klinik gidişle birlikte olması da diğer bir kritik nokta olabilir.

Anahtar Sözcükler: Akut Lösemi, Gravin, Tümör Süpresör Gen, Prognoz

ABSTRACT

Prognostic Significance Of Gravin Expression In Acute Leukemias

Leukomogenesis is a multistep process and many factors are included in this process. It is important to determine the treatment targets and factors affecting the prognosis in the planning of the therapy. Prognostic factors are valuable for the therapeutic choices.

Gravin is a tumor suppressor gene belonging to the A kinase anchoring protein family. Gravin has been studied in a limited number of the tumors and its expression has been found to be decreased. There is one study exploring gravin expression in acute leukemias and it has been shown to be decreased. However there is no study exploring the prognostic significance of gravin in a detailed manner in literature. The aim of this study is to detect the Gravin expression in acute leukemias and, if there is, to show the association with prognosis. RT-PCR was used for this aim. β Actin was used for control gene expression. Results were evaluated with Comparative Ct method.

One hundred thirty seven cases with acute leukemia and 25 healthy controls were included in this study. A hundred of the cases (73%) had AML, 37 cases (27 %) had ALL. Male/female ratio was 70/67. β Actin Ct was 21.64, Gravin Ct was 38.17 ± 2.5 (41-28.6), Gravin- β Actin Δ Ct was 16.2 ± 2.5 (19.3-5.2) in control group. β Actin Ct was 22.5 ± 2.8 (17.8-35.1), Gravin Ct was 42.2 ± 4.9 (31.2-50), Gravin- β Actin Δ Ct was 19.6 ± 4.5 in study group. Gravin- β Actin Δ Ct was statistically different between patients and controls (p value <0.001). Gravin expression was found to be decreased 11 fold as compared with controls.

According to the Δ Ct values, overall survival was found to be 17, 24 and 48 weeks in cases with 0-16, 16-20 and more than 20, respectively.

In conclusion gravin expression has been found to be a negative factor for overall survival. However it is impossible to suggest this gene, which is known as a tumor suppressor gene, as a bad prognostic factor due to the lack of gravin isoforms. On the other hand, the loss of some tumor suppressor genes may be a good prognostic indicator and this may be another critical point.

Key words: Acute Leukemia, Gravin, Tumor Suppressor Gene, Prognosis.

KISALTMALAR LİSTESİ

AML	: Akut Myeloid Lösemi
ALL	: Akut Lenfoid Lösemi
HTLV-1	: İnsan T Hücreli Lösemi/Lenfoma Virüsü 1
t-AML	: tedavi ilişkili AML
MLL	: Mixed-Lineage Leukemia
MDS	: Myelodisplastik Sendrom
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
GPCR	: G Proteinine Bağlı Reseptörler
AKAPs	: A kinaz demirleyici proteinler
PKA	: Protein Kinaz-A
ATP	: Adenozin Tri Fosfat
SSeCKS	: Src Suppressed C kinase Substrat
RT-PCR	: Real-Time Polimerase Chain Reaction
BK	: Beyaz küre
ΔCt	: Delta Ct
LDH	: Laktik Dehidrogenaz
Hb	: Hemoglobin
Htc	: Hematokrit
Üa	: Ürik Asit
AD	: Alt Değer
ÜD	: Üst Değer
Ort	: Ortalama
SD	: Standart Sapma
ETRB	: Endothelin reseptör B
LPL	: Lipoprotein Lipaz
Ct	: Comperative Ct
FISH	: Fluorescent in-situ hybridization
İH	: İmmünohistokimyasal
WB	: Western Blot

NB	: Northern Blot
cDNA	: Complementary DNA
ATRA	: All-trans retinoic acid
B-KLL	: B cell chronic lymphocytic leukemia
LPL	: Lipoprotein Lipase
cAMP	: Cyclic Adenosine Monophosphate
PKC	: Protein Kinase-C

1. GİRİŞ

Gravin A Kinaz sabitleyici protein ailesinin üyesi bir tümör süpresör gendir. Sperm gelişimi, testis gelişimi ve nöron gelişimi fizyolojisinde rol oynar. Hücre içi sinyallerin iletiminde ve bu sinyallerin lokalizasyonunda rol oynamaktadır. Onkogenezdaki rolü birçok deneysel çalışmada gösterilmiştir. Tümör süpresör fonksiyonlarının kaybında, onkogenik özellik kazanmasında Gravin gen bölgesinin metilasyonunun rolü olduğu düşünülmektedir. Gastrik adenokarsinom, prostat karsinomu, akciğer adenokarsinomu, meme kanserinde ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında demetilasyon yapan ajanlar uygulandığında onkogenik özelliklerin gerilediği gösterilmiştir.

Akut lösemiler tedavi edilmediklerinde fatal seyirli hastalıklardır. Tanı sırasında saptanan belirli klinik ve laboratuvar parametreleri ile hastalığın prognozu tahmin edilebilir. Böylece yüksek riskli hastalara daha yoğun tedaviler verilebilir. Hastalarda lökomogenezde rol oynayan mekanizmaların belirlenmesi hedefe yönelik tedavileri gündeme getirebilir. Örneğin Akut Promyelositer Lösemide PML/RAR α füzyon proteininin tespit edilmesi, bu proteinin etkilerini engelleyen al trans retinoik asit (ATRA)'in tedavide kullanılması bu hastaların sağkalımını etkilemiştir.

Çalışmamızın amacı, Gravin gen ekspresyonunun akut lösemilerde durumunun saptanması ve varsa prognoz ile ilişkisinin araştırılmasıdır. Bu amaçla RT-PCR yöntemi ile Gravin ekspresyonu araştırılmış; başvuru anındaki periferik kan bulguları ile tümör yükü belirleyicileri ve tedaviye yanıt ile toplam sağkalım gibi parametrelerle ilişkisi incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akut Lösemiler

Lösemiler hemopoetik hücrelerin malign transformasyonu sonucu oluşan heterojen neoplastik hastalıklar grubudur. Köken aldıkları hücre tipine göre lenfoid, miyeloid; sağkalım ve olgunlaşma özelliklerine göre de akut ve kronik olarak sınıflandırılırlar.

Akut lösemiler immatür miyeloid ya da lenfoid seri hücrelerinin kan, kemik iliği ve diğer dokuların infiltrasyonu ile karakterize bir grup hastalıktır. Akut lösemiler Akut Myeloid Lösemi (AML) ve Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) olmak üzere iki ana kategoriye ayrılır. Akut lösemili hastaların başlangıç değerlendirmelerinde uzun dönemli prognoza ve tedavi planına etkisi olabilecek faktörlerin belirlenmesi önemlidir. Akut lösemilerin prognozunun ve patogenezinin anlaşılmasında moleküler, sitogenetik ve immünolojik çalışmalar katkıda bulunur.

2.1.1. Etiyoloji

Akut lösemili hastalarda birçok somatik mutasyonlar oluşur ve bu somatik mutasyonlar hücrelere proliferasyon ve yaşam avantajı kazandırır. Genetik defekt veya bilinen çevresel ajanlara maruz kalma öyküsü olmayan hastalarda genelde neden bulunamaz. Genetik predispozisyon, ilaçlar, çevresel ajanlara maruz kalma ve mesleki faktörler olası lökomojenik ajanlar olarak suçlanmıştır. Lökomogenezin hassas hemopoetik öncü hücreleri indükleyen ajanlarca oluşturulan çok basamaklı bir süreç olduğu düşünülmektedir. Etkilediği herkeste lösemi gelişimine neden olan bir faktör saptanmamıştır.

AML patogenezinde çeşitli çevresel ajanlar suçlanmıştır. İyonize radyasyon ve alkileyici ajanlar çift sarmallı DNA'da kırılmalara yol açarlar ki bu da genomik delesyonlar, nokta mutasyonları ve kromozom translokasyonlarına yol açar. Benzen gibi organik solventlere ve petrol ürünlerine mesleki maruz kalma da AML riskinde artışa neden olur. Kimyasal ajanlara maruz kalmış olan AML hastalarında RAS mutasyonu

saptanmıştır. Bu kimyasalların genetik hasara yol açarak lösemi gelişmesine neden olduğu düşünülmektedir¹.

Hayvan lösemi modellerinde birçok retrovirüsün lösemi oluşturabileceği gösterilmiştir. Bununla birlikte insan lösemilerinde İnsan T Hücreli Lösemi/Lenfoma Virüsü (HTLV-1) dışında etken saptanamamıştır. HTLV-1 T Hücreli Lösemi ve lenfoma ile ilişkili bulunmuştur².

Malign ve malign olmayan hastalıklarda kemoterapotik kullanımı da akut lösemi insidensini artırır. Sekonder ya da tedavi ilişkili AML (t-AML) alkilleyici ajanlar ve Topoizomerez 2 inhibitörleri kullanımını takiben gelişebilmektedir. Alkilleyici ajan kullanımından ortalama 3 -5 yıl sonra AML görülmektedir, bu olgularda AML öncesinde miyelodisplastik bozukluklar görülmektedir. Tedavi ilişkili AML klonal sitogenetik anomaliler ile ilişkilidir. Bu anomalilerin çoğunluğu kromozom 5 ve/veya 7'nin uzun kolunda tam kayıp veya kısmi delesyonlardır. İkinci grup t-AML vakalarında ise 11q23'de bulunan Mixed-Lineage Leukemia (MLL) geninde değişiklikler tespit edilmiştir. Bu grup vakalar genelde DNA topoizomerez 2'yi hedefleyen tedaviler (örneğin epipodofilotoksinler, antrasiklinler) sonucu gelişir. Tipik olarak bu vakalarda lösemi gelişimi öncesi Myelodisplastik değişiklikler gözlenmez. Primer malignensiden 12 -18 ay gibi kısa bir süre sonra sekonder malignensi gelişir. Hodgkin, Non-Hodgkin lenfoma ve meme kanserli hastalarda otolog kök hücre nakli ile birlikte yüksek doz kemoterapi ve hemopoetik büyüme faktörü desteği, Myelodisplastik Sendrom (MDS) ve AML gelişme riskini arttırmaktadır^{3,4,5,6,7}.

Bazı hematolojik hastalıklar da AML'ye öncülük etmektedir. Örneğin MDS'li hastaların hastalıkları süresince %30'unda AML gelişir. Aynı şekilde Polisitemia Vera, Esansiyel Trombositopeni, Myeloid Metaplazi gibi myeloproliferatif hastalıklarda AML gelişme riski artmıştır.

Epidemiyolojik ve aile çalışmalarında lösemi gelişiminde genetik predispozisyonu destekleyen kanıtlar bulunmuştur. Monozigot ikizlerde risk artmıştır. Birçok konjenital hastalıkta lösemi insidensinde artış vardır. Down Sendromu, Bloom's Sendromu, Ataksi Telenjektazi, Fanconi Anemisinde artmış AML insidensi vardır^{8,9}.

2.1.2. Patogenez

Lösemi miyeloid veya lenfoid progenitör hücrelerin malign transformasyona uğraması ve bu transforme hücrenin çoğalarak gittikçe büyüyen bir klon oluşturmaları sonucu gelişir. Akut lösemi hücrelerinin temel karakteristik niteliği diferansiyasyon 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 lökomogenezde 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^{10,11}.

Kromozomal translokasyonlar lökomogenezde 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 oluşturmalarıdır. 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 promotör ya da enhanserının kontrolü altına girer ve gen ekspresyon kontrolü bozulur. Akut lösemilerde görülen kromozomal translokasyonlar tablo 1’de gösterilmektedir.

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 miyeloid 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. LT3R'lerin kontrolsüz ve daimi aktivasyonunun akut miyeloid lösemiye yol açtığı bildirilmiştir^{12,13,14}.

Tablo 1: Akut Lösemilerde Görülen Kromozomal Translokasyonlar⁵⁶.

Hastalık	Genetik Rearrangement	Kromozomal Değişiklik	Sıklık (%)	Fenotipi	Prognoz
B-ALL	<i>E2A-PBX1</i>	t(1;19)	3	CD10+, CD19+, cIg+, pre-B-ALL	iyi
	<i>TEL-AML1</i>	t(12;21)	2	CD10+, pre-B-ALL	iyi
	<i>BCR-ABL</i>	t(9;22)	25		kötü
T-ALL	<i>SIL-SCL</i>	1p32 delesyonu	25		kötü
	<i>TCRD-SCL</i>	t(1;14)	3		
	<i>TCR-HOX11</i>	t(10;14) t(7;10)	5		HOX11 over-ekspresyonunda iyi
	<i>TCRD-HOX11L2</i>	t(5;14)	20	CD3+ CD10+	İyi
AML	<i>PML-RARA</i>	t(15;17)	13	APML	İyi
	<i>AML1-ETO</i>	t(8;21)	7	Myeloid diferansiasyon	iyi
	<i>CBFB-MYH11</i>	inv(16) veya t(16;16)	5	Eozinofili ile birlikte Myeloid ve myelomonositik	iyi
	<i>MOZ-CBP</i>	t(8;16)	<1	Eritrofagositoz ile birlikte monositik	Kötü
	<i>BCR-ABL</i>	t(9;22)	<1	Değişken Myeloid diferansiasyon	Kötü
	<i>DEK-CAN</i>	t(6;9)	1	Myeloid diferansiasyon	Kötü

2.1.3. İnsidens ve Sınıflama

AML insidensi yaklaşık yılda 100.000'de 3,6 iken ALL'nin tüm yaş gruplarındaki toplam insidensi 100.000'de 1,3'dür. AML erişkinlerde ALL ise çocukluk çağında daha sık gözlenir¹⁵.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nın 2000 yılında yayınladığı lenfoid ve myeloid kökenli malignansilerin sınıflandırılmasına ilişkin rapordan önce Akut lösemi

sınıflandırmasında Fransız, Amerikan, İngiliz (FAB) çalışma grubunun sınıflandırılması kullanılmaktaydı. FAB sınıflandırmasında AML tanısı için periferik kan ve/veya kemik iliğinde blast oranının $>30\%$ olması gerekli idi. Yeni WHO sınıflandırmasında ise bu oran $>20\%$ olarak belirlenmiştir¹⁶. Tablo 1’de yeni WHO sınıflaması görülmektedir.

Tablo 2: Akut Lösemilerde WHO Sınıflaması.

Akut myeloid lösemiler	Yenileyici sitogenetik anomalili AML’ler t(8;21) (q22;q22) bulunan AML’ler inv(16) (p13q22) veya t(16;16) (p13;q22) olan AML’ler Akut promyelositik lösemi t(15;17) (q22;q12) (PML/RAR α) gösteren AML 11q23 anomalili AML
Çok dize displazili AML	Başlangıçta miyelodisplastik sendromlu olanlar Başlangıçta miyelodisplastik sendromlu olmayanlar
Tedavi ile ilişkili AML ve Miyelodisplastik sendrom	Minimal diferansiyonlu AML Olgunlaşma göstermeyen AML Olgunlaşma gösteren AML RAR α re-aranjmanı olmayan akut promiyelositer lösemi Akut miyelomonositik lösemi Akut monoblastik ve monositik lösemi Akut eritroid lösemi Akut megakaryoblastik lösemi Akut bazofilik lösemi Miyelofibrozis ile akut panmiyeloz Miyeloid sarkom
Başka şekilde sınıflandırılmayan AML	Minimal diferansiyonlu AML Olgunlaşma göstermeyen AML Olgunlaşma gösteren AML RAR α re-aranjmanı olmayan akut promiyelositer lösemi Akut miyelomonositik lösemi Akut monoblastik ve monositik lösemi Akut eritroid lösemi Akut megakaryoblastik lösemi Akut bazofilik lösemi Miyelofibrozis ile akut panmiyeloz Miyeloid sarkom
Akut lenfoblastik lösemiler	Prekürsör B lenfoblastik lösemi/lenfoma Prekürsör T lenfoblastik lösemi/lenfoma Burkit lösemi/lenfoma
Karmaşık dizeli akut lösemiler	Bifenotipik akut lösemi Diferansiye olmamış akut lösemi

2.1.4. Klinik

Akut lösemiye bağlı semptom ve bulgular nonspesifiktir. Normal hemopoetik hücre üretiminin durması veya azalmasına bağlı olarak görülen sitopeniler ve organ invazyonuna bağlı semptomlar gözlenir. Hastalar genellikle yorgunluk ve kırgınlıkla

karakterize viral enfeksiyon benzeri bir tablo ile başvururlar. Anoreksi ve kilo kaybı sıklıkla görülür. Sternum, kostaların ve uzun kemiklerin tutulumuna bağlı olarak diffüz kemik ağrısı hastaların %25'inde görülür. .

Fizik muayenede sitopenilere ait veya lösemik infiltrasyona ait bulgular saptanır. Anemi, solukluğa ve kardiyovasküler semptomlara yol açar. Trombositopeni peteşi, ekimoz ve epistaksise neden olan hemostatik defekte neden olur. Splenomegali hastaların %50'sinde saptanır. Çoğunlukla dalakta hafifçe bir büyüme vardır. Çok büyük bir dalak lösemiye öncülük eden myeloproliferatif bir hastalığı düşündürür. AML'de ALL'ye göre lenfadenopati daha az görülür.

Cilt tutulumu Lökemia Kutis olarak adlandırılır. Hastaların %10'unda gözlenir. Sweet Sendromu olarak adlandırılan Akut Nötrofilik Dermatitis akut lösemiler ve diğer hematolojik hastalıklar ile ilişkili kutanöz paraneoplastik sendromdur. Hassas kırmızı plak ve nodüller ile karakterizedir¹⁷. Kloroma olarak ta adlandırılan Granülositik Sarkom blastların ekstramedüller birikimiyle oluşmakta ve daha çok M1 ve M2 subtipinde görülür. Kötü prognozla ilişkilidir. Santral sinir sistemi tutulumu ALL'de daha sık görülür AML hastalarının ise %5-7 sinde asemptomatik tutulum vardır. Dolaşımdaki lösemik hücre sayısı 50.000/mm³ olunca kan viskozitesinde artışa ve lökoblantik embolilere bağlı olarak lökostaz tablosu oluşabilir. Hastalarda semptomlar yorgunluk, diffüz baş ağrısı ile başlayıp konfüzyon koma ile sonlanabilir¹⁹. AML hastalarında gözün her üç tabakası da tutulabilir. Hastalarda çeşitli pulmoner komplikasyonlar gelişebilir. En sık rastlanan pulmoner problem pnömonidir. Bakteriyel, viral, fungal nedenlere bağlı olarak gelişebilir. Pulmoner hasar ve buna bağlı diffüz alveoler hasar gelişebilir. Akut lösemilerde kalbin direkt invazyonu klinik olarak nadiren tanı konmasına karşı otopsilerde daha sık görülür. Daha çok kemoterapi ilişkili toksite görülür. Gastrointestinal problemler akut lösemili hastalarda sıkça rastlanır. Oral-özofajial kandidiazis ve herpetik özofajit en sık disfaji sebebidir. Gingival hipertrofiye Monositer AML'de sıklıkla rastlanır^{17,18}.

Akut lösemi hastalarında sitotoksik kemoterapiye, organ invazyonuna bağlı olarak metabolik ve elektrolit bozuklukları sık görülür. Yüksek hücresel döngü sonucu oluşan pürin katabolizma artışı hiperürisemiye neden olur. Hipokalemi AML'de özellikle monositer subtiplerde sık gözlenir. Bu subtiplerde lösemik hücrelerden lizozim salgılanır. Lizozim proksimal renal tübüllerde disfonksiyona yol açarak potasyum

kaybına neden olur. Akut lösemi hastalarında hipokalsemi görülebileceği gibi hiperkalsemi de görülür. Lösemik hücrelerin hızlı lizisine bağlı olarak tümör lizis sendromu görülür. Bu sendrom hiperürisemi, hiperkalemi, hiperfosfatemi hipokalsemi ile karakterizedir. Lösemik hücrelerde aneorobik glikolize bağlı olarak laktik asidoz gelişebilir¹⁹.

Akut lösemili hastaların çoğunluğunda pansitopeni ve periferik yaymada blastlar görülür. Beyaz küre sayısı genellikle 1000/mm³ ile 100.000-200.000/mm³ arasındadır. Hastaların %10' unda periferde blast olmadan sadece sitopeniler olabilir. Bütün hastalara kemik iliği biyopsi ve aspirasyonu yapılmalıdır. İmmünohistokimyasal boyamada myeloperoksidaz, esteraz ve sudan-black myeloid orijini, PAS ve TdT lenfoid orijini gösterir. Daha ileri inceleme için immünofenotiplendirme yapılır.

Akut lösemi tanısı konduğunda uzun dönemli prognozu ve tedavi planını belirlemek için prognostik faktörler belirlenmelidir. Akut lösemi alt gruplarına ait prognostik faktörler tablo 3 ve 4'de yer almaktadır.

Tablo 3: AML'de Prognostik Faktörler.

	İYİ PROGNOZ	KÖTÜ PROGNOZ
YAŞ	<45	45>
LÖKOSİT	<25.000	>100.000
LDH	NORMAL	ARTMIŞ
PERFORMANS SKORU	0-1	>1
İMMÜNFENOTİP	CD34(-),MDR1(-),CD2(+) TdT(-),HLA-DR(-)	CD34(+),MDR1(+),TdT(+) HLA-DR(+)
SİTOGENETİK	t(15;17), t(8;21), inv(16)	Del 7q, del5q, 3q21, 3q26 Kompleks karyotip
	DE NOVO	SEKONDER

Tablo 4: ALL'de Prognostik Faktörler.

	İYİ PROGNOZ	KÖTÜ PROGNOZ
YAŞ	<30	>30
LÖKOSİT	<30.000	> 30.000 (T hücreli lösemide>100.000)
İMMÜNFENOTİP	T hücreli ALL	Matür B hücreli ALL Erken B hücreli ALL
SİTOGENETİK	12 p anormalliği t(10;14)(q24;q11)	t(9;22) t(1;19) t(4;14) hipodiploidi

2.2. cAMP Sinyal İleti Sistemi ve A-Kinaz Sabitleyici Sinyal Kompleksi

Proteinlerin üç boyutlu uzaysal konfigürasyonları sabit değildir. Birçok mekanizma ile uzaysal konfigürasyonları değişir. Bunların en önemlisi yapılarına fosfor eklenmesidir. Proteinlere fosfor eklenmesiyle üç boyutlu uzaysal konfigürasyonları değişir. Böylelikle diğer proteinler ile etkileşimleri aktive ya da inhibe edilmiş olur.

Proteinlerin fosforilasyonunda anahtar rolü oynayan enzimler protein kinazlardır. Protein kinazların birçok çeşidi vardır. Siklik Adenozin Monofosfat (cAMP)'a bağımlı Protein Kinazlar (PKA) bunlardan birisidir. PKA'lar cAMP düzeyinin artışı ile etkinleşirler. Hücre büyümesi, farklılaşması ve iyon kanal modülasyonunda rol oynarlar.

Yaklaşık 50 yıldan beri bilinen cAMP, ilk olarak hormonların intraselüler etkilerine aracılık eden haberci proteinler olarak tanımlanmıştır. Ancak daha sonra etkilerinin endokrin sistemle sınırlı olmadığı aksine bilinen en yaygın intraselüler ikincil haberci proteinlerden birisi olarak homeostazisin idamesinde kritik öneme sahip olduğu bulunmuştur²⁰.

cAMP'nin sitoplazma içine salınışında G Proteinine Bağlı Reseptörler (GPCR) rol oynarlar. GPCR ismi Guanozindifosfat ve Guanozintrifosfat ile çalıştıkları için verilmiştir. Bütün GPCR'lar hücre zarını 7 kez geçen tek bir proteinden oluşurlar. GPCR'lar hücre zarının bir parçası değildir ve Alfa, Beta, Gama adı verilen birbirine bağlı üç protein alt birimden oluşurlar. GPCR'lar işlevleri ve yapıları farklı alfa alt birimlerine göre sınıflandırılırlar. Beta ve Gama alt birimleri ortaktır.

cAMP birçok kritik öneme sahip proteini aktifleştirebilir. Bununla birlikte cAMP'nin temel intraselüler hedefi Protein Kinaz-A (PKA)'dır. PKA ilk olarak 1968'de Krebs ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. cAMP'nin hücre içinde artışı PKA'yı aktifleştirir. Aktif hale gelen PKA hedef proteinlerin spesifik serin threonin residülerine Adenozin Tri Fosfat (ATP)'tan fosfor transferini gerçekleştirir. Uzaysal konumu değişen proteinlerin aktiviteleri değişir. İntraselüler substratların PKA bağımlı fosforilasyonu hücre motilitesi, metabolizması, farklılaşması, sinaptik ileti, iyon kanal aktiviteleri, büyüme ve gen transkripsiyonu gibi bir çok hücre fonksiyonunu kontrol eder²¹.

PKA serin-treonin kinaz aktivitesine sahip bir holoenzimdir. Dört alt birimi vardır. İki alt birimi düzenleyicidir. R sembolü ile gösterilir. Diğer iki alt birimi ise katalitiktir. C sembolü ile gösterilir. Katalitik alt birimler C alfa, C beta, C gama olmak üzere üç farklı gen tarafından eksprese edilirler. Düzenleyici alt birimler ise R1 alfa, R1 beta, R2 alfa, R2 beta olmak üzere dört farklı gen tarafından eksprese edilirler²².

Protein kinazlar hücre içinde serbest halde bulunmazlar. Sabitleyici proteinlere bağlı olarak bulunurlar. Sabitleyici proteinler sadece protein kinazların hücre içinde gereksinim duyulan yerlerde olmasını sağlamazlar aynı zamanda protein kinazların fonksiyonlarında düzenlerler. PKA'yı sabitleyen proteinlere A kinaz sabitleyici proteinler denir.

A-Kinaz Sabitleyici Protein (AKAP) terimi ilk olarak Rubin ve arkadaşları tarafından PKA' ya bağlanan inek beyin P75 ve sıçan beyin P150 proteinleri için kullanılmıştır²³. Carr ve arkadaşları PKA ve alt birimi R2'ye bağlanan proteinlerin ilişkisinin moleküler temellerini ortaya çıkarmışlardır²⁴.

AKAP'ların çoğunluğu cDNA ekspresyon kütüphanelerinin rekombinant R 2 probu ile taranması ile bulunmuştur. AKAP'ların iki farklı fonksiyonel bölgeleri vardır. Birinci bölgeleri R 2 ile kompleks oluşturan amfipatik helikal bölgeleridir. İkinci bölgeleri hücre içi yapılara bağlanmalarını sağlayan bölgedir.

İlk bulunan AKAP beyin ekstrelerinden elde edilen tip2 PKA ile ilişkili olan Mikrotübül İlişkili Protein 2 (MAP 2)' dir. AKAP ailesi bunu takiben büyümüş 50'den fazla yapı olarak farklı fonksiyon olarak benzer proteinler tespit edilmiştir. Nematod, fare, sıçan gibi pek çok canlı türünde de AKAP orthologları tespit edilmiştir.

AKAP isimlendirilmesi genel olarak her bir sabitleyici proteinin moleküler ağırlığına göre yapılmaktadır. Bununla birlikte bu sınıflama metodu farklı molekül ağırlığındaki benzer AKAP proteinleri için kullanışsızdır. Ayrıca Gravin, Pericentrin bazı sabitleyici proteinler PKA ile ilişkilerinin tespitinden önce isimlendirilmiştir.

AKAP'lar hücre içi sinyalleri lokalize ederler. Farklı AKAP'lar aynı intraselüler komponente bağlanabilir. AKAP79/150 plazma membranındaki fosfolipitlere bağlanır²⁵. Fosfolipitlere bağlanması için fosfolipid bağlayıcı olarak N-terminal myristoyl gruba ihtiyaç duyarlar²⁶. Aynı AKAP' ın farklı izoformları hücrenin farklı komponentlerini hedefleyebilir. Örneğin AKAP18' in α ve β izoformları plazma membranının farklı komponentlerine bağlanır. AKAP'lar hücrelerin içinde plazma

membranı, nükleus, mitokondri, aktin sitoskeleton ve sarkoplazmik retikulum gibi çeşitli yapılara bağlanırlar. D-AKAP 1 mitokondriye bağlanır. Pericentrin, AKAP 350/450 ise sentrozoma bağlanır²⁷.

2.3. Gravin

Gravin ilk defa 1992’de miyastenia gravisli hastaların serumlarında tespit edilmiştir. Gordon ve arkadaşları insan umbilikal ven hücre dizisi cDNA kütüphanesi kullanılarak miyastenia gravisli hastaların serum örneklerini incelemişlerdir. Gravin, intrastoplazmik bir antijen olarak önerilmiş ve ilk defa miyastenia gravisli hastalarda tespit edildiğinden Gravin olarak adlandırılmıştır²⁸.

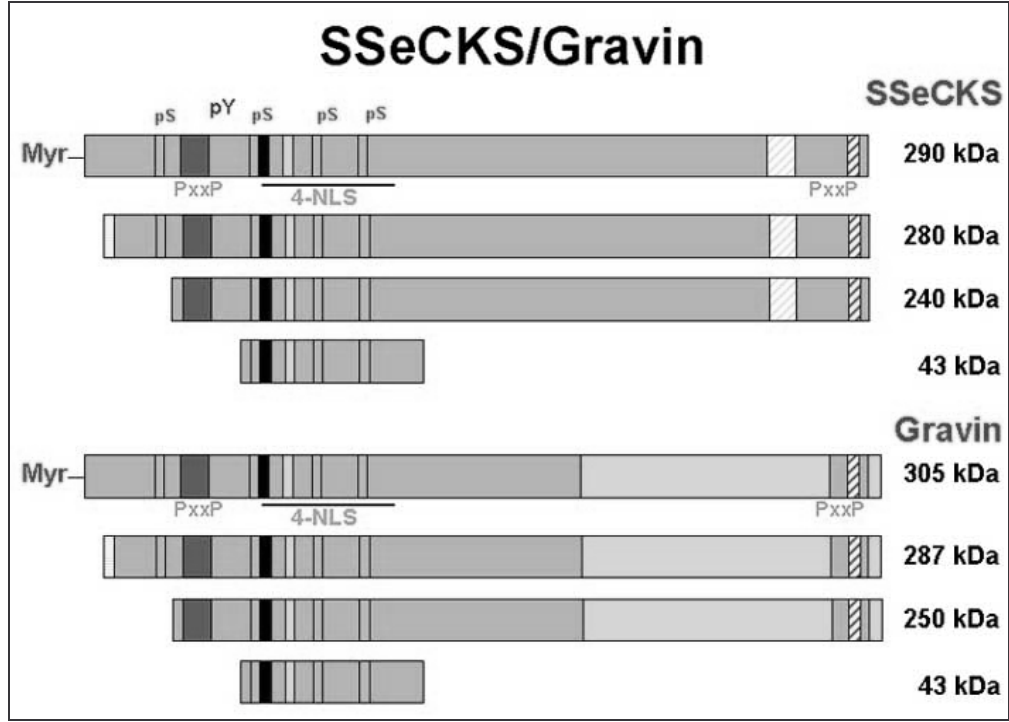
Miyastenia gravisli hastalarda tanımlanmasına rağmen bu hastalıkta patogeneze ve klinik önemi ile ilgili yapılan çalışma sayısı azdır. Gravinin miyastenia gravisli hastalarda klinik önemi ile ilgili literatürde 2001 yılında Sasaki ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma vardır. 11 miyastenia gravisli hasta ve 43 sağlıklı gönüllüden elde edilen serumlar incelenmiştir. Miyastenia gravisli hastaların ortalama gravin düzeyi ile sağlıklı gönüllülerin ortalama gravin düzeyi arasında fark bulunmamıştır. İki miyastenia gravisli hastanın değerlerini ortalamadan yüksek bulmuşlardır. Bu hastalar 40 yaşından daha genç ve nontimomatöz hastalardır. Genç hastalar ve timoma ile ilişkisiz miyastenia gravisli hastaların prognozu diğer hastalara göre daha iyi olduğu için miyastenia gravisli hastalarda anti-gravin antikor pozitifliğinin iyi yönde bir prognostik faktör olabileceğini ileri sürülmüştür²⁹.

2.3.1. Gravinin Yapısı

Gravin/AKAP12 AKAP ailesinin bir üyesi olan sabitleyici bir proteini kodlayan gendir. Gravin gen bölgesi Xia ve arkadaşları tarafından 6q24 - 25.2 olarak tespit edilmiştir. Gravin proteinin 305, 287 ve 250kDa olmak üzere üç farklı izoformu tespit edilmiş ve AKAP 12/A, AKAP 12/B, AKAP 12/C olarak adlandırılmıştır. Ayrıca 43 kDa küçük bir izoformunda vardır³⁰.

Gravin ile yapılan çalışmalar 1997’de Nauert ve arkadaşlarının daha önce kemirgenlerde tümör süpresör gen olarak tespit edilen Src Suppressed C kinase Substrat

(SSeCKS) ile homoloji gösterdiği tespit edildikten sonra artmıştır. Gravin ve SSeCKs'nin genomik yapısı %68 oranında benzerdir. Benzeri fonksiyonları tespit edilmiştir²⁸. Şekil 1'de Gravin ve SSeCKs'nin isoformları gösterilmektedir.



Şekil 1. SSeCKS/Gravinin izoformları.

Gravinin dokulardaki dağılımı incelendiğinde fibroblastlarda, periferik ve santral sinir sistemi komponentlerinde, adrenal medullada, Bowman kapsülünün somatik tabakasında, bazı organların düz kas hücrelerinde tespit edilmiştir. Gravin antijenleri endotel hücrelerinde tespit edilmiş, trombositlerde, lökositlerde, insan eritrolösemi hücrelerinde tespit edilmemiştir. İnsan eritrolösemi hücreleri phorbol myristate acetate ile indüklendiğinde bunlarda da gravin antijenini tespit edilmiştir. Gravin hücre içinde hücrenin daha çok apikalinde yerleştiği tespit edilmiştir. Hücrenin plazma membranında, endoplazmik retikulumda yer aldığı gösterilmiştir. Gravin PKA, PKC R2 α , PKA, β_2 adrenerjik reseptör, β arrestin, clatrin, kolmodulin, siklinler ile kompleksler oluşturmaktadır^{31,32,33}.

2.3.2. Gravinin Fonksiyonları

AKAP ailesinin bir üyesi olan gravin PKA ve PKC ile ilişkilidir. Hücre içi sinyallerin lokalizasyonunda görev alır. Gravin endotel hücrelerinin çoğalmasında, hasara karşı verdikleri yanıtta rol oynar. Grove ve arkadaşları vasküler endotelial hücrelerde gravinin intraselüler dağılımını ve rolünü incelemişler. Hücre iskeleti elementleri Sitokalsin D ve Kolşisin ile hasara uğratıldığında Gravinin hücre içi dağılımının değişmediği gözlenmiştir. Oysa lisatlar ile endotel hücre hasarı gerçekleştirildiğinde Gravin miktarında artış gözlenmiştir. Hücre bütünlüğünün korunmasında Gravinin rol oynadığını öne sürmüşlerdir³³.

Gravin β_2 adrenerjik reseptörlerin fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Fan ve arkadaşları Gravinin bu fonksiyonunu insan epidermoid karsinoma (A431) hücre kültüründe yaptıkları çalışma ile göstermişlerdir. β_2 adrenerjik reseptörlerin uyarılmamış durumlarında reseptör, gravin, PKA ve PKC'nin bir kompleks halinde birlikte bulunduklarını ve β_2 adrenerjik reseptörler agonist ile uyarıldıklarında ise gravin, PKC ve PKA bu kompleksten ayrıldığını ve reseptörün β_2 arrestin ile kompleks oluşturarak aktivitesinin sonlandığını göstermişlerdir³⁴.

Gravin nöron gelişiminde de rol oynamaktadır. Gravin düzeyi santral sinir sistemi nöral progenitör hücre özelliğini gösteren NT-2 hücre dizilerinde postmitotik polar hücreler olan NT-N hücrelerine göre daha fazla bulunmuştur. Bu bulguya dayanılarak nöron gelişiminde rol oynadığı öne sürülmüştür³⁵.

Gravinin hücre biyolojisindeki fonksiyonları ile ilgili yapılan çalışmaların çoğu kemirgenlerdeki ortholoğu olan SSeCKS ile yapılmıştır. SSeCKS ilk olarak v-scr transformasyonu ile indüklenen onkogeneze downregüle olan genlerin taranmasıyla tanımlanmıştır ve kemirgenlerde mitojenik regülatuar bir proteindir. Her iki proteinde hücre periferi boyunca lokalize olurlar. Hücre adezyon ve göçünde rol oynarlar. PKA R 2 ve PKC' ye bağlanırlar^{36,37}.

Lin ve arkadaşları scr ve ras onkogenleri transforme edilmiş hücrelerde süprese olan genleri taramışlar. Scr ve ras transformasyonu ile onkogeneze oluşturulmuştur. SSeCKS re-ekspresyonu ile oluşan onkogenezin baskılandığı görülmüş. SSeCKS 'yi yeni bir mitojenik regülatuar gen olarak tanımlamışlardır³⁸.

Cohen ve arkadaşları bir onkogenik transkripsiyon faktörü olan v-Jun transforme edilen hücrelerde SSeCKS düzeylerini incelemişlerdir. Transforme hücrelerde SSeCKS'nin downregüle olduğu gözlenmiştir. SSeCKS re-ekspresyonu sağlandığında transforme fenotipin geriye döndüğü gözlenmiştir. Bu değişimle beraber diğer tümör supresör gen ürünü düzeylerinin de tekrar arttığı görülmüştür³⁹.

Gelman ve arkadaşları sitoiskeleal yapının kontrolünde SSeCKS'nin rolünü araştırmışlardır. NIH3T3 fibroblasts kültürlerinde çalışılmış, tavşanlardan elde edilen anti-SSeCKS antikoları, actin, venikulin, fokal adezyon kinaz ve fosfotirozin monoklonal antikoları kullanılmıştır. İmmün blot, immünfloresan, immün elektron mikroskop yöntemleri kullanılmıştır. Tetrasiklin kullanılarak SSeCKS ekspresyonu sağlanmış. SSeCKS indüksiyonu transforme olmayan normal hücrelerde şişmeye ve hücrelerde girintilere neden olmuştur. SSeCKS over-ekspresyonu actin, vinculin veya FAK düzeylerini değiştirmemiştir. Fakat integrin bağımsız FAK tirozin fosforilasyonunu arttırmıştır. Bir mitojenik sinyal yolu olarak SSeCKS'nin actin temelli sitoiskeletal yapıyı kontrolünde fonksiyonu olduğunu öne sürülmüştür⁴⁰.

Gelman ve arkadaşları ayrıca SSeCKS ekspresyon paternini de araştırmışlardır. Bu amaç için WI-38 fibroblast ve epitelyal hücre kültürleri, primer sıçan hipokampal nöronları, S24 hücreleri (tetrasiklinle regüle edilmiş), fare sperm hücreleri, yetişkin ve fetal fare dokuları kullanılmıştır. Bu çalışmalarda immünhistokimyasal, immünfloresan ve real time PCR teknikleri kullanılmıştır. Erken fetal dokularda SSeCKS protein ekspresyonu mezenkimal dokularda, nöral tüpün luminal yüzeyinde, notokordda, kalp ve perikartda, ürogenital dokularda odaklanmış bulunmuştur. Yetişkin farelerde fetal dönemde olanlara göre daha fazla dokuda SSeCKS protein ekspresyonu tespit edilmiştir. Gonadlarda, düz kas ve kalp kaslarında, akciğer, beyin ve kalpte tespit edilmiştir. Sıçan testislerinde puberte ile birlikte SSeCKS düzeylerinin arttığı ve sperm hücrelerinde ekspresyonunun olduğunu tespit edilmiştir. Çalışmacılar bu deneylerle SSeCKS'nin embriyogenezis sırasında hücre göçünde, doku mimarisi ve sitoiskeletal yapının devamında ve kontrolünde rolü olduğunu ileri sürmüşlerdir⁴¹.

Gravinin hücredeki bu fonksiyonlarının saptanmasından sonra çeşitli kanserlerde gravin ekspresyonu çalışılmıştır. Bu çalışmalardan ilki 1995 yılında prostat kanserinde comparative genomik hibridizasyon yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Gravin ekspresyonun prostat kanserinin progresyonunda rolü olabileceği öne sürülmüştür. Daha

sonra 2001 yılında prostat kanseri metastazında rolü araştırılmıştır. Malign hücrelerin metastatik özellik kazanmasıyla Gravin ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda Gravin ekspresyonunun over, tiroid papiller karsinom, gastrik adenokarsinom ve meme kanserinde azaldığı gösterilmiştir. Gravin ekspresyonu miyeloid malignansilerde de araştırılmıştır. AML, KML ve MDS’de Gravin ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir⁴².

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahiliye Anabilim Dalı Onkoloji Bilim Dalı'nda, öykü, fizik muayene, sitomorfolojik, immunohistokimyasal ve immün-fenotipik çalışmalar ve biyokimyasal parameterlerle ile 2000–2004 yılları arasında ALL ve AML tanısı alan hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. Histokimyasal olarak akut lösemilerde Sudan Black, PAS, miyeloperoxidaz ve esteraz değerlendirildi.

İmmün-fenotipik analiz için hastalardan 2 ml. periferik kan örneği, EDTA içeren tüplere alındı. Örnekler inkübe edilip eritrositler lizise uğratıldıktan sonra akım-sitometri cihazına uygun hale getirildi. Akım-sitometri (Epics XL Coulter) cihazıyla değerlendirilen örneklerde CD yüzey belirleyicilerin lenfosit ve blast hücre popülasyonu içerisindeki yüzde oranları tespit edildi. CD2, 3, 4, 5, 7, 8, 13, 14, 33, 34 incelendi. %25 üzerinde ekspresyon (+) kabul edildi.

Periferik kan örneklerinde blastik hücrenin Gravin ekspresyonu Real-Time Polimerase Chain Reaction (RT-PCR) yöntemi kullanılarak ölçüldü.

Gravin mRNA ekspresyonu aşağıda verilen sıra ile Real-Time RT-PCR yöntemi kullanılarak yapıldı. Çalışma LightCycler (Roche Applied Science) ile gerçekleştirildi.

3.1. Örnek Toplama

Hastalardan tanı anında, tedavi öncesinde 3 ml periferik kan K3EDTA'lı tüpe alındı.

3.2. mRNA İzolasyonu

Hasta ve kontrollerden alınan kan örneklerinin Beyaz küre (BK) değerleri Beckman Coulter Gen S System II cihazında belirlendi.

Toplam 3×10^6 BK ependorf tüpüne alındı. Üzerine 1 ml Red Blood Cell Lysis Buffer (Roche Applied Science) eklendi. Örnek 10 dakika oda ısıda hafifçe çalkalanarak bekletildi. 13.000 rpm 15 sn. santrifüj edilerek lökositler çöktürüldü. Parçalanmış eritrosit artıkları uzaklaştırıldı. MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit I'in

(Roche Applied Science) Lysis solusyonundan lökositler üzerine 300 µl eklenerek hücreler parçalandı, vorteksle karıştırıldı ve izolasyon yapılana kadar -20 C⁰de saklandı.

İzolasyon MagNA Pure LC (Roche Applied Science) cihazında, MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit I kullanılarak otomatik olarak gerçekleştirildi. Sistem oligo dT bağlı manyetik partiküllerle mRNA' nın saflaştırılması prensibine dayanmaktaydı. İzole edilen m-RNA örnekleri 4 ayrı ependorf tüpüne bölünerek -86C⁰'de saklandı.

3.3. cDNA Sentezi

Saklanan mRNA örnekleri First Strand cDNA synthesis kit (Roche Applied Science) ile cDNA haline getirildi.

Tablo 5: cDNA Reaksiyonu Protokolü.

1 Örnek İçin:	MİKTAR	10 Örnek İçin:	MİKTAR
Reaction Buffer	2.0 µl	10x Reaction Buffer	22 µl
25 mM MgCl ₂	4.0 µl	25 mM MgCl ₂	44 µl
Deoxynucleotide Mix	2.0 µl	Deoxynucleotide Mix	22 µl
Random Primer p(dN) ₆	2.0 µl	Random Primer p(dN) ₆	22 µl
RNase Inhibitor	1.0 µl	RNase Inhibitor	11 µl
AMV Reverse Transcriptase	0.8 µl	AMV Reverse Transcriptase	8.8 µl
Sterile Water	0.2 µl	Sterile Water	2.2 µl
Toplam	12 µl	Toplam	132 µl

cDNA eldesi için gereken materyaller miktarlara göre hazırlandı. Vortekste hafifçe çalkalandı ve spin santrifüj edildi. cDNA reaksiyon karışımı dan her 0.2 ml PCR tüpüne 12 µl pipetlendi. Daha sonra üzerine her RNA örneğinden 8 µl pipetlendi ve pipet ucu atılmadan 3-4 kez pipet ile bu cDNA karışımı ve RNA karıştırıldı. Oda sıcaklığında (+25°C' de) 10 dakika bekletildi. Aşağıda belirtilen programda thermal cyclerda cDNA reaksiyonu gerçekleştirildi.

Tablo 6: Sıcaklık Döngüsü Programı.

Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
25°C	10 dakika	1
42°C	60 dakika	1
99°C	5 dakika	1
4°C	5 dakika	1

3.4. Gravin ve β Actin Primer Dizini

Gravin primeri olarak Gravin Probe set (Assay ID: Hs00374507_m1, Applied Biosystems) kullanıldı. β Actin primeri olarak Beta Actin Probe Set (Assay ID: Hs99999903_m1, Applied Biosystems) kullanıldı.

3.5. Real-Time PCR

Gravin ve β Actin mRNA dizisine spesifik primerler ile 10 μ l reaksiyon hacminde kapiller PCR tüplerinin içinde amplifiye edildi. Amplifikasyon için LightCycler FastStart DNA MasterPLUS HybProbe (Roche Applied Science) kiti kullanıldı. Amplifikasyonlar Real-Time RT-PCR cihazı olan LightCycler cihazında gerçekleştirildi. PCR reaksiyonu sırasında amplifikasyon işlemi gerçekleştiğinde TaqMan probdan salınarak serbest kalan FAM boyası Real-Time PCR cihazı tarafından kaydedilerek her örneğin başlangıç konsantrasyonuna göre vermiş olduğu Ct değerleri yine cihaz tarafından otomatik olarak hesaplandı. Amplifikasyon LightCycler cihazının bilgisayarından on-line olarak da izlendi.

Tablo 7: Real-Time PCR Reaksiyon Protokolü.

15 Örnek (+ 1) İçin (10 μ l):	MİKTAR
PCR Grade Water	104.0 μ l
Probe Set	8.0 μ l
Master Mix	32.0 μ l
Toplam	144.0 μl / 16 = Her tüpe 9 μl

Çalışması yapılacak tam olarak 15 adet cDNA örneği belirlenir. Tablo 4'deki karışım formülüne uyularak iki adet karışım hazırlandı. I. karışım Gravin test karışımıdır. II. karışım ise Beta Actin referans karışımıdır. I. karışımı hazırlarken probe seti olarak Gravin probe setinden, II. karışımı hazırlarken de probe seti olarak Beta Actin probe setinden konuldu. Her iki karışım hazır olduğunda. I. Karışım (Gravin) 1-16 numaralı kapiller tüplerine 9 ar μ l pipetlenir. II. Karışım (Beta Actin) 17-32 numaralı kapiller tüplerine 9 ar μ l pipetlendi. 1-15 nolu kapillerlere örnek 1den 15 e kadar olacak şekilde 1 μ l cDNA sırayla pipetlendi. 17-31 nolu kapillerlere örnek 1den 15 e kadar

olacak şekilde 1 µl cDNA sırayla pipetlendi. cDNA’larda pipetlendikten sonra kapillerler kapatıldı. 3000 rpm de 30 saniye santrifuj edildi ve Ligtcycler carauseline yerlestirildi. Aşağıdaki programa göre Real-Time PCR işlemi gerçekleştirildi. (Tablo 8, 9, 10)

Tablo 8: Denatürasyon Programı.

Döngü Programı Verileri	Değer
Döngü Sayısı	1
Analiz Modu	YOK
Sıcaklık Hedefi	Segment 1
Hedef Sıcaklık (°C)	95
İnkübasyon Zamanı	10:00
Sıcaklık Değişim Hızı (°C/saniye)	20.0
Basamak Ölçüsü	0
Basamak Gecikmesi (Döngülerde)	0
Kazanım Modu	YOK

Tablo 9: Amplifikasyon Programı.

Döngü Programı Verileri	Değer	
Döngü Sayısı	45	
Analiz Modu	ÖLÇME	
Sıcaklık Hedefleri	Segment 1	Segment 2
Hedef Sıcaklık(°C)	95	60
İnkübasyon Zamanı	0	20
Sıcaklık Değişim Hızı (°C /saniye)	20.0	10.0
İkinci Hedef Sıcaklık(°C)	0	0
Basamak Ölçüsü	0	0
Basamak Gecikmesi (Döngülerde)	0	0

Tablo 10: Soğutma Programı.

Döngü Programı Verileri	Değer
Döngü Sayısı	1
Analiz Modu	YOK
Sıcaklık Hedefleri	Segment 1
Hedef Sıcaklık(°C)	40
İnkübasyon Zamanı	30
Sıcaklık Değişim Hızı (°C/saniye)	20.0
İkinci Hedef Sıcaklık(°C)	0
Basamak Ölçüsü	0.0
Basamak Gecikmesi (Döngülerde)	0

Floresans kanal ayarları, F1/1 olarak kullanıldı. Sonuçlar Ligtcycler Software ile analiz edilerek değerlendirildi.

3.6. Değerlendirme

Sonuçlar Comperative Ct yöntemi ile hesaplandı. Bu yöntemde önce hasta ve kontrol grubu örneklerinin ortalama Ct değerleri hem Beta Actin hem de Gravin için ayrı ayrı hesaplandı. Daha sonra Gravin ortalama değerinden Beta Actin ortalama değeri çıkarılarak ayrı ayrı hasta ve kontrol gruplarının ΔCt (Delta Ct) degerleri ve bunlara ait standart sapma değerleri hesaplandı. Daha sonra kontrol grubu ΔCt değeri hasta grubu ΔCt değerinden çıkarılarak $\Delta\Delta Ct$ degeri bulundu. Bu değer $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne uygulanarak hasta grubunun gravin ekspresyonun kontrol grubuna göre kaç kez artmış yada azalmış olduğu Beta Actin gen ekspresyonu internal kontrol olarak kullanılarak relatif olarak belirlendi⁴³.

3.7. İstatistik Analizler

Kesikli değişkenlerin karşılaştırılmasında Ki-kare testi, Sürekli değişkenlerin kullanılmasında Mann-Whitney-U testi kullanılmıştır. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir. Survival analizi Kaplan-Meier yöntemi ile analiz edilmiştir. Verilerin analizinde SPSS PC version 12.0 (Statistical Package for Social Sciences) paket programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Lösemili olgulara ait kan örnekleri tanı anında alınarak gerekli işlemler sonrasında uygun koşullarda saklandı. Demografik ve laboratuvar verileri hasta dosyalarından elde edildi. Toplam hasta sayısı 137 olup bunların 100'ü (%73) AML, 37'si (%27) ALL idi. 67 kadın ve 70 erkekten oluşan çalışma grubunda yaş dağılımları AML için 42.1 ± 14.3 (16–77), ALL için 30.5 ± 14.8 (15–73) idi. Çalışmaya dahil edilen hastalara ait demografik veriler Tablo 11'de özetlenmiştir.

Tablo 11: Lösemi Alt Gruplarına Göre Yaş ve Cinsiyet Özellikleri.

		TANI		Toplam
		AML (n=100)	ALL (n=37)	(n=137)
Yaş (Ortalama $\pm$ SS) Ortanca (AD-UD)		42.1 ± 14.3 42.5 (16-77)	30.5 ± 14.8 25.0 (15-73)	39.0 ± 15.3 39.0 (15-77)
Cinsiyet (n, %)	Erkek	49 (%49)	21 (%56.8)	70 (%51.1)
	Kadın	51 (%51)	16 (%43.2)	67 (%48.9)

Hastaların 133'ünde (%97) de novo lösemisi, 4'ünde (%3) sekonder lösemi vardı. Ekstra medüller tutulum 12 hastada (%8.8) tespit edildi. En sık ekstra medüller tutulum %1.9 ile karaciğer tutulumu olarak bulundu. Hastaların 39'unda (%28.5) lenfadenopati tespit edilirken 98 hastada (%71.5) tespit edilmedi. 11 hastada (%8) yalnızca hepatomegali, 27 hastada (%19.7) yalnızca splenomegali, 29 hastada (%21.2) hepatosplenomegali tespit edildi. Hastaların 70'inde (%51.1) organomegali tespit edilmedi. Hastaların organomegali özellikleri tablo 12'de özetlenmiştir.

Tablo 12: Hastaların Organomegali Özellikleri.

	AML	ALL	TOPLAM
HEPATOMEGALİ	9 (%9)	2 (%5.4)	11 (%8)
SPLENOMEGALİ	20 (%20)	7 (%18.9)	27 (%19.7)
HEPATOSPLENOMEGALİ	16 (%16)	13 (%35.1)	29 (%21.2)
LENFADENOPATİ	21 (%21)	18 (%48.6)	39 (%28.5)

Her iki grupta tanı anındaki lökosit, hemoglobin, hematokrit, trombosit, ürik asit ve Laktik Dehidrogenaz (LDH) düzeyleri değerlendirildi. AML grubunda beyaz küre (Bk) $43057.5 \pm 56213.2 /\text{mm}^3$, hemoglobin (Hb) $7.9 \pm 2.2 \text{ g/dl}$, hematokrit (Htc) $\% 22.9 \pm 6.5$, trombosit $56459.1 \pm 88646.1 /\text{mm}^3$, LDH $2036.3 \pm 3301.2 \text{ IU/dl}$, Ürik Asit (Üa) $6.2 \pm 2.9 \text{ mg/dl}$ bulundu. ALL grubunda lökosit $33161.6 \pm 50485.3 /\text{mm}^3$, hemoglobin $8.5 \pm 2.9 \text{ gr/dl}$, hematokrit $\% 25 \pm 9.0$, trombosit $80140.5 \pm 15128.8 /\text{mm}^3$, LDH $2144.5 \pm 3066.1 \text{ IU/dl}$, Ürik Asit $6.2 \pm 3.2 \text{ mg/dl}$ bulundu. AML ve ALL olguları arasında periferik kan bulguları ve tümör yükü göstergeleri yönünden anlamlı fark bulunmadı. P değerleri sırasıyla 0.349, 0.196, 0.127, 0.199, 0.863, 0.961 olarak bulundu. Tablo13'de periferik kan bulguları ve tümör yükü göstergeleri görülmektedir.

Tablo 13: Periferik Kan Bulguları ve Tümör Yükü Göstergeleri.

	AML	ALL	P değeri
	Ort±S D Ortanca AD-ÜD	Ort±S D Ortanca AD-ÜD	
Lökosit /mm ³	$43057.5 \pm 56213.2 /\text{mm}^3$ (18700) 36-337000.0	$33161.6 \pm 50485.3 /\text{mm}^3$ (17900) 1600-250000	.349
Hemoglobin gr/dl	$7.9 \pm 2.2 \text{ g/dl}$ (7.7) 2.2 -15	$8.5 \pm 2.9 \text{ gr/dl}$ (9) 2.8-15	.196
Hematokrit %	$\% 22.9 \pm 6.5$ (22.2) 7.4 -45	$\% 25 \pm 9.0$ (26.2) 8.9-42	.127
Trombosit /mm ³	$56459.1 \pm 88646.1 /\text{mm}^3$ (31750) 190-747000	$80140.5 \pm 15128.8 /\text{mm}^3$ (33000) 8000-434000	.199
Laktik Dehidrogenaz IU/dl	$2036.3 \pm 3301.2 \text{ IU/dl}$ (1234.5) 203-20870	$2144.5 \pm 3066.1 \text{ IU/dl}$ (1520) 178-18756	.863
Ürik Asit mg/dl	$6.2 \pm 2.9 \text{ mg/dl}$ (5.6) 1.4-15.5	$6.2 \pm 3.2 \text{ mg/dl}$ (6.2) 2.0 -15.8	.961

Hasta grupları değerlendirildiğinde ΔCt değeri ile lökosit, hemoglobin, hemotokrit, trombosit, laktik dehidrogenaz, ürik asit değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı. P değerleri sırasıyla 0.672, 0.963, 0.943, 0.841, 0.825, 0.740 olarak bulundu. Lökosit sayısı ile hemoglobin, LDH, ürik asit değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı. P değerleri sırasıyla 0.043, 0.000,

0.035 olarak saptandı. LDH ile lökosit, ürik asit, AST, ALT değerleri arasında anlamlı fark saptandı. P değerleri sırasıyla 0.000, 0.000, 0.000 olarak bulundu. Ürik asit düzeyleri ile lökosit, LDH, AST, creatin değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı. P değerleri sırasıyla 0.035, 0.000, 0.005, 0.001 olarak bulundu.

Tablo 14’de AML ve ALL hastalarının yüzey antijeni sonuçları özetlenmektedir.

Tablo 14: Akut Lösemili Hastaların Yüzey Antijen Sonuçları.

	AML	ALL
CD2 Ort±S D (Ortanca) AD-UD	17.8±25.6 (4.7) 0.5- 96	30.4 ± 297 (21) 0.3 -96
CD3 Ort±S D (Ortanca) AD-UD	20.3±25.7 (5.1) 0-84	19.1± 23.4 (9.8) 0.3- 89
CD7 Ort±S D (Ortanca) AD-UD	24.1±27.3 (7.7) 0- 91.3	37.5± 36 (20) 0.5- 95
CD13 Ort±S D (Ortanca)AD-UD	42.1 ±28.3 (42.1) 0.6-93.5	24 ± 21.7 (20.1) 0.1- 74
CD19 Ort±S D (Ortanca) AD-UD	24.5 ±29.2 (10) 0 - 95	31.6 ± 32.2 (15.1) 1.1 -95
CD20 Ort±S D (Ortanca) AD-UD	5.3 ± 14.6 (0.4) 0 – 95	15.9 ± 24.8 (4.5) 0.2 – 95
CD10 Ort±S D (Ortanca) AD-UD	7.9± 16.8 (3.3) 0 -98	38.9 ± 36.6 (24.5) 0.4- 93.3
CD33 Ort±S D (Ortanca) AD-UD	29,7 ± 29.2 (17.2) 0.1 -98	7.5 ± 14.1 (2.1) 0 – 60.0

AML grubunda 8, ALL grubunda 2 hasta remisyon indüksiyon kemoterapisi alamadan kaybedildi. 126 hastaya remisyon indüksiyon kemoterapisi uygulandı. AML olgularından 80 hastaya (%80) 7+3 protokolü (Cytosine Arabinozid 200 mg/m² 7gün ve antrasiklin (Daunorubicin 45 mg/m² veya İdarubicin 12mg/m²) 3 gün), 11 hastaya (%11) AİDA protokolü (ATRA 45 mg/m² ve İdarubicin 12 mg/m²), 1 hastaya (%1) 5+2 protokolü (Cytosine Arabinozid 100 mg/m² 5 gün, İdarubicin 12mg/m² 2 gün) uygulandı. ALL grubunda 29 hastaya TLG-ALL (Siklofosamid 1000mg/m² 1. gün, Daunorubisin 45mg/m² 1,2,3.günler, Vincristin 2mg/gün 1,8,15,22. günler, Prednizolon 60mg/m² 1.günden 28.güne kadar, L-asparaginaz 6000U/m2/gün 5.günde başlayarak haftada 2 kez toplam 6 doz), 3 hastaya CODOX-M (Siklofosamid 800 mg/m² 1. gün,

200 mg/m² 2 ve 5. günler, Vincristin 1.5 mg/m² 1. gün, Doxorubicin 40 mg/m² 1,8,15. günler, Methotrexate 1200 mg/m² yüklemeden sonra 240 mg/m² 23 saat infüzyon 10. günde, folinik asit 192 mg/m² 11. günde yüklemeden sonra 6 saatte bir 12 mg/m² Methotrexate düzeyine göre devam edilir) protokolü, 2 hastaya genel durumları ve yaşları nedeniyle steroid ve vincristin içeren kemoterapi, 2 hastaya Hyper-CVAD protokolü (1,3,5,7. kürlerde Siklofosamid 300 mg/m² 1-3 günler, Vincristin 2 mg 4 ve 14. gün, Doxorubicin 50 mg/m² 4. gün, 40 mg 1-4.gün ve 11-14. gün, 2,4,6,8. kürlerde methotrexate 1000 mg/m² 1. gün, Cytosine Arabinozid 3000 mg/m² 2ve 3. günler) uygulandı. Hastalara uygulanan remisyon indüksiyon kemoterapileri tablo 15’de özetlenmiştir.

Tablo 15: Hastalara Uygulanan Remisyon İndüksiyon Kemoterapileri.

Kemotrapi Protokolü	AML	ALL
7+3	80 (%80)	YOK
YAŞLI	1 (%1)	YOK
CODOX-M	YOK	3 (%8.1)
TLG/ALL	YOK	29 (%78.3)
HyperCVAD	YOK	2 (%5.4)
VID	YOK	1 (%2.8)
AİDA	11 (%11)	YOK
KT ALMADAN ÖLÜM	8 (%8)	2 (%5.4)

Yirmi altı hasta remisyon indüksiyon kemoterapisi sırası/sonrası kaybedildi. Remisyon indüksiyon tedavisini tam dozda alan 101 hastada yanıt değerlendirildi. Tüm hasta grublarında 79 hastada (%78.2) tam remisyon elde edilirken 22 hasta (21.8) yanıtsızdı. AML grubunda 55 hastada (%77.5), ALL grubunda 24 hastada (%80) tam remisyon elde edildi.

Takip edilen hastalarda 3 hastaya otolog 4 hastaya allogeneik kemik iliği transplantasyonu yapıldı. Hastaların 104’ü (%77) ortalama 71.7 hafta takip süresinde kaybedildi, 2 hasta ise takipten çıktı. 32 hasta halen yaşamaktadır. Hasta alt gruplarına göre sağkalımlar tablo 16’da gösterilmektedir.

Tablo 16: Hasta Alt Gruplarına Göre Sağkalım.

YANIT DURUMU	AML		ALL	
	HASTA SAYISI	MEDİAN SAĞKALIM	HASTA SAYISI	MEDİAN SAĞKALIM
TAM REMİSYON	55 (%77.5)	60 HAFTA	24 (%80)	56 HAFTA
PARSİYEL YANIT	1	40 HAFTA	YOK	YOK
REFRAKTER	15	12 HAFTA	6	6 HAFTA
Toplam	71	68 HAFTA	30	80 HAFTA

Bu çalışmanın konusu olan Gravin gen ekspresyonu RT-PCR Yöntemi ile saptandı. 137 olgudan oluşan hasta grubunda β Actin Ct değeri 22.5 ± 2.8 (17.8-35.1), Gravin Ct değeri 42.2 ± 4.9 (31.2-50), Gravin- β Actin Δ Ct değeri 19.6 ± 4.5 bulundu. 25 sağlıklı kontrolden alınan kan örneklerinde ise β Actin Ct değeri 21.64, Gravin Ct değeri 38.17 ± 2.5 (41-28.6), Gravin- β Actin Δ Ct değeri 16.2 ± 2.5 (19.3-5.2) bulundu. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (p değeri <0.001). Hasta alt grupları olan AML ve ALL' de β - Actin, Gravin Δ Ct değerleri sırasıyla 20 ± 4.4 , 18.7 ± 4.7 olarak bulundu. Alt gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı (p 0.096) . Hasta ve kontrol grubuna ait β Actin - Gravin Δ Ct değerleri tablo 17'de gösterilmiştir.

Tablo 17: Hasta ve Kontrol Grubunda β Actin-Gravin Δ Ct Değerleri.

	β Actin CT Ort $\pm$ S D (Ortanca) AD-UD	Gravin Δ Ct Ort $\pm$ S D (Ortanca) AD-UD	β Actin-Gravin Δ Ct Ort $\pm$ S D (Ortanca) AD-UD
KONTROL GRUBU	22.5 ± 2.8 (21.7) 17.8-35.1	38.17 ± 2.5 (38.26) 41-28.6	16.2 ± 2.5 (16.5) 5.2- 19.3
HASTA GRUBU	22.5 ± 2.8 (22) (17.8-35.1)	42.2 ± 4.9 (41) 31.2-50	19.6 ± 4.5 (19) 9.3-32
AML	22.4 ± 2.7 (21.9) 17.9-33	42.4 ± 4.9 (41) 31.2-50	20 ± 4.4 (19.2) 9.3-32
ALL	23 ± 3.1 (22.1) 17.8-35.1	41.6 ± 5.0 (41) 32.4-50	18.5 ± 4.7 (18) 11.7-28.9

Hasta grubunun ortalama Gravin gen ekspresyon “*fold change*” değeri 11 olarak bulundu. Başka bir ifadeyle hasta grubunda kontrol grubuna göre Gravin gen ekspresyonu 11 kat azalmış olarak bulundu. Hastaların bireysel “*fold change*” değerleri hesaplandığında kontrol grubuna Gravin gen ekspresyonu 19 hastada (%13.9) artmış, 106 hastada (%77.5) azalmış, 12 hastada(%8.8) kontrol grubuyla benzer bulundu. Olgular Gravin gen ekspresyonundaki azalmalar ve artmalara göre 100 ve 10 kat artış ve azalışlara göre gruplandırıldı. 80 olguda (%58.4) Gravin gen düzeyi 100 kattan az azalma, 26 olguda (%19) 100 kattan fazla azalma, 14 olguda (%10.2) 10 kattan az artma, 5olguda (%3.6) 10 kattan fazla artma 5 hastada (%3.6) tespit edildi. Gravin gen ekspresyonunun değişimine göre sağkalımlar tablo18’de gösterilmiştir.

Tablo 18: Gravin Ekspresyonuna Göre Sağkalım.

EKSPRESYON	ORTALAMA YAŞAM SÜRESİ
NORMAL	8 HAFTA
AZALMIŞ	32 HAFTA
ARTMIŞ	24 HAFTA

Tablo 19: Gravin Ekspresyonundaki Değişimdeki Alt Gruplara Göre Sağkalım.

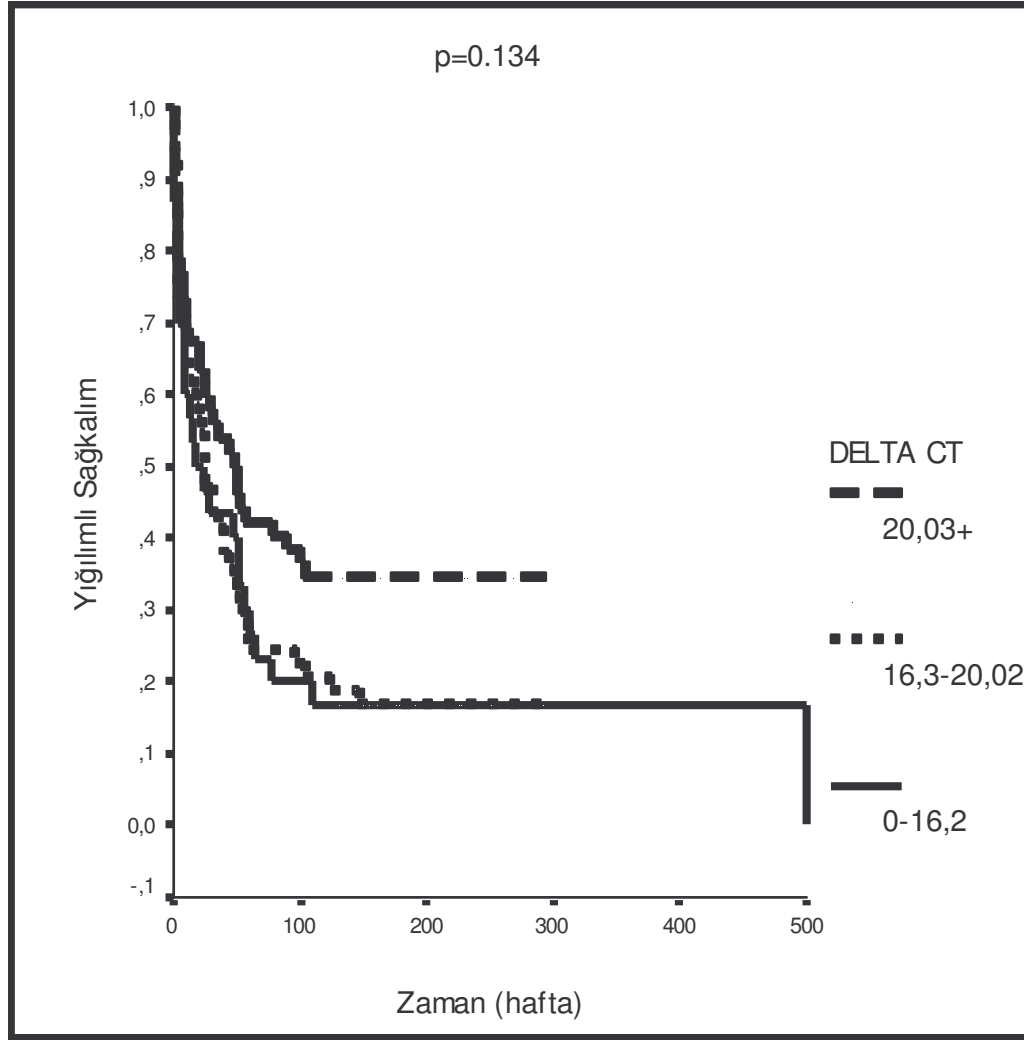
EKSPRESYON	ORTALAMA YAŞAM SÜRESİ
NORMAL	8 HAFTA
100 KATTAN AZ AZALMIŞ	28 HAFTA
100 KATTAN FAZLA AZALMIŞ	48 HAFTA
10 KATTAN AZ ARTMIŞ	24 HAFTA
10 KATTAN FAZLA ARTMIŞ	14 HAFTA

Hastalar ΔCt değerlerine göre göre kontrollerde saptanan değerlere göre kıyaslama yapmak üzere alt gruplara ayrılarak sağkalım açısından değerlendirildi. ΔCt değerlerine göre sağkalım tablo 20’de gösterilmektedir.

Tablo 20: ΔCt Değerlerine Göre Sağkalım.

DELTA CT	ORTALAMA YAŞAM SÜRESİ
0-16	17 HAFTA
16-20	24 HAFTA
20 +	48 HAFTA

Tablodan da görüldüğü gibi ΔCt değeri arttıkça sağkalım artmaktadır. Yani Gravin ekspresyonu azaldıkça sağkalım süresi uzamaktadır (Şekil 2).



Şekil 2: Δ Ct ile sağkalım arasındaki ilişki.

Sağkalımı etkileyen bağımsız faktörler değerlendirildiğinde, LDH, Bk, yaş ve tanıya göre kıyaslamada lökosit ve Δ Ct değeri bağımsız faktörler olarak tespit edildi. P değerleri sırasıyla 0,003, 0,058 olarak bulundu. Tedaviye yanıt da bu parametrelere katıldığında indüksiyon kemoterapisine yanıt tek bağımsız parametre olarak bulundu (p değeri 0,000). Sağkalımı etkileyen bağımsız faktörler tablo 21’de gösterilmektedir.

Tablo 21: Sağkalımı Etkileyen Bağımsız Faktörler.

	B	STANDART HATA	P DEĞERİ	ODD RATIO (OR)	%95 GÜVENLİK ARALIĞI	
					ALT DEĞER	ÜST DEĞER
LDH	0,000	0,000	0,170	1,000	1,000	1,000
LÖKOSİT	0,000	0,000	0,003	1,000	1,000	1,000
YAŞ	0,005	0,007	0,518	1,000	,990	1,019
TANI	-0,169	0,241	0,483	,845	527	1,354
DELTA CT	0,043	0,023	0,058	,958	,916	1,001

5. TARTIŞMA

Lösemi patobiolojisinin anlaşılması ve elde edilen bilgi birikimi fatal seyirli olan bu hastalık grubun doğal seyrini değiştirmiştir. Hücre içi sinyal yollarında oluşabilen bozukluklar hücrelerin kontrolsüz çoğalmalarına ve apoptoza dirençli olmalarına neden olabilmektedir. Sinyal ileti yollarındaki bozuklukları hedefleyen tedaviler yoğun olarak araştırılmakta ve klinik kullanıma girmektedir.

cAMP sinyal ileti yollarının önemli olanlarından. cAMP yolu hücre içi etkilerini protein kinazlar aracılığıyla gerçekleştirir. A kinaz sabitleyici protein ailesi protein kinazların hücre içi lokalizasyon ve fonksiyonlarını düzenler. Gravin AKAP ailesinin bir üyesidir. Gravin gen ekspresyonu tümör hücrelerinde azalmaktadır. Gravin gen ekspresyon düzeyinin tümör hücrelerinde azalması ile metastaz yapma yeteneği artmaktadır. Bu nedenle bir tümör süpresör gen olarak tanımlanmaktadır. Ancak tümörlerde gravin ekspresyonu görece sınırlı sayıda tümör grubunda çalışılmış olduğu için tümör davranışı ile Gravin ekspresyonu arasındaki ilişki henüz netleşmemiştir.

Gravinin onkogenezele ilişkisini öne süren ilk çalışma Frankfort ve Gelman tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada v-src onkogeni transforme edilen NIH3T3 fibroblast hücre kültürü kullanılmıştır. PCR-temelli eksiltici hibridizasyon tekniği ile v-src transformasyonu ile hücre içinde düzeyi azalan 9 cDNA tespit edilmiştir. Üç cDNA daha önce tanımlandığı ve bunların Tip I kollagen, Gravin ve parsiyel human cDNA (clone A7C09) olduğu tespit edilmiştir. Bunların düzeyinin HMG-Co-A-Redüktaza göre 3–15 kat azaldığı gösterilmiştir. Düzeyi azalan bu genlerin v-src'nin indüklediği onkogeneze rol oynayabileceği öne sürülmüştür⁴⁴. Bu çalışmalardan sonra gravinin kanserlerle ilişkisi incelenmiş, bu amaçla prostat, akciğer, mide, melanom ve meme kanserlerinde tümör hücre dizileri ve/veya tümör örnekleri ve ilaveten bazılarında transgenik fare modellerinde Gravin ekspresyonu çalışılmıştır. Ayrıca 2 çalışmada da lösemilerde gravin ekspresyonu araştırılmıştır. Bu çalışmalarda temel olarak FISH, Northern Blot, Western Blot, immün floresan analiz, immünohistokimyasal yöntemler kullanılmıştır.

Visakorpi ve arkadaşları prostat kanserinde oluşan genetik değişiklikleri araştırmışlardır. Gravinin ileri prostat kanserinde delesyon için sıcak bir nokta tespit etmişlerdir⁴⁵. Xia ve arkadaşları ise Gravin ve SSeCKS'nin prostat kanseri gelişiminde

ve metastaz yeteneğindeki rolünü araştırmışlardır. Bu çalışma için fare ve insan prostat epitelyal hücre dizileri, fare ve insan prostat kanseri hücre dizileri ve hiperplazi özelliği gösteren hücreler kullanılmıştır. Hücre dizilerinde Gravin re-ekspresyonunu indüklemek için tetrasiklin kullanılmıştır. Gravin ve SSeCKS'nin ortholog olduğu ve gravin geninin 6q24 lokalizasyonunda olduğu gösterilmiştir. İnsan ve fare prostat kanseri hücre dizilerinde Gravin ve SSeCKS ekspresyonunun normal prostat hücre dizilerine göre azalmış olduğu gösterilmiştir. İnsan prostat epiteli, prostat hiperplazili hücreler ve prostat kanseri hücrelerinde değişik miktarlarda Gravin ekspresyonu saptanmasına karşın andiferansiye prostat kanseri hücrelerinde Gravin ekspresyonu gösterilememiştir. Kontak inhibisyonun kaybolduğu hücre dizilerinde Gravin ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir. MLL hücre dizilerine tetrasiklin uygulanmıştır. Bu hücre dizilerinde onkogenik özelliklerin kaybolduğu gösterilmiştir. MLL hücre dizisinde en az bir Ha-ras alleli olduğundan Gravin/SSeCKS'nin ras ilişkili tümör gelişimini baskıladığı öne sürülmüştür. Bu bulgularla prostat kanseri gelişiminde ve metastatik yetenek kazanmasında Gravin ekspresyon düzeyinin azalmasının rolü olduğu öne sürülmüştür. Gravin gen re-ekspresyonunun prostat kanseri progresyonunu engelleyebileceği öne sürülmüştür⁴⁶. Gelman ve arkadaşları SSeCK'nin metastaz inhibisyonu yolunu araştırmışlardır. SSeCKS'nin RhoA- vec42- bağımlı yollarla podozom formasyonunu inhibe ederek metastaz supresyonu yaptığını öne sürmüşlerdir⁴⁷.

Wikman ve arkadaşları akciğer adenokarsinomlu hastalarda gen ekspresyonlarındaki değişiklikleri araştırmışlardır. Çalışma grubu 18 hasta ve 4 kontrolden oluşturulmuştur. Hasta ve kontrol grubunun tümoral ve sağlam dokuları incelenmiştir. Çalışmada semi kantitatif real time PCR ve cDNA array yöntemleri kullanılmıştır. CCNB1, PLK, tenascin, KRT8, KRT19 ve TOP2A'nın ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Caveolin 1-2, TIMP3, SOCS 2-3, DOC2 ve Gravin ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Gravin gen ekspresyonunun tüm hasta örneklerinde azaldığı gösterilmiştir. Kontrol grupta ise gravin ekspresyonu gösterilmiştir. Bu çalışmada gen ekspresyonu ile klinik göstergeler arasındaki ilişki incelenmemiştir. Çalışmada araştırılan 10 genin de akciğer adenokarsinomunda diagnostik ve prognostik marker olarak kullanılabilineceği öne sürülmüştür⁴⁸.

Wasenius ve arkadaşları papiller tiroid karsinomlu hastalarda gen ekspresyonlarındaki değişiklikleri araştırmışlardır. Çalışma grubu 18 hasta ve 3

kontrolden oluşturulmuştur. Hasta ve kontrol grubunun tümoral ve sağlam dokuları incelenmiştir. c-MET ve matrix metalloproteinase (MMP)-11 yalnızca tümör dokusunda gösterilmiştir. Makrofaj inhibitör sitokin-1, CGD, fibronektin (FN), hipoksinin indükleyebildiği faktör 1, Fc- ϵ -reseptör γ -chain, laktat dehidrogenaz A, HLA-DBP1, AH reseptör, metalloproteinaz doku inhibitörü (TIMP-1), ve glycyl-tRNA-synthetase ekspresyonlarının arttığı gösterilmiştir. GADD153, PKD-1, CYR61, DPC4, HBA1, DLG3, protein tirozin fosfataz σ , heterokromatin protein 1 homolog- α ve Gravin ekspresyonlarının azaldığı gösterilmiştir⁴⁹.

Choi ve arkadaşları gastrik karsinom gelişiminde Gravinin rolünü araştırmışlardır. Çalışmada SNU-1, -5, -16, -484, -601, -620, -638, -668 -719, MKN28, AGS ve HepG2 hücre kültürleri kullanılmıştır. Gastrik karsinom nedeniyle opere edilen 18 hastanın tümoral dokuları ve normal dokuları analiz edilmiştir. 5-aza-20-deoxycytidine (5-Aza-dC) DNA methyltransferaz inhibitörü olarak kullanılmıştır. Kontrol gen olarak β - Actin kullanılmıştır. Dört hücre dizisinde Gravin ekspresyonu tespit edilirken diğerlerinde ekspresyon tespit edilememiştir. Gravin ekspresyonu tespit edilmeyen hücre dizileri Southern blot ve FISH yöntemleri ile incelendiğinde Gravin DNA lokusunda genetik defekt tespit edilememiştir. Gravin proteinin 305 (AKAP 12/A), 287 (AKAP 12/B) ve 250kDa (AKAP 12/C) olmak üzere üç farklı izoformu hücre dizilerinde, tümoral dokularda ve normal dokularda araştırılmıştır. Gravin ekspresyonu tespit edilen hücre dizilerinin ikisinde izoformların üçü de tespit edilmiştir. Diğer iki hücre dizisinde iki izoform tespit edilmiştir. 250kDa'luk izoform tüm hücre dizilerinde tespit edilen izoformdur. AKAP12A normal gastrik dokularda eksprese olduğu fakat gastrik karsinomlu dokularda ekspresyonunun belirgin olarak downregüle olduğu gösterilmiştir. Bilindiği gibi genomik DNA'da Sitozin-Guanin (CpG) dinükleotitlerinin metilasyonu gen susturmayla karşılıklı olarak ilişkilidir. Metilasyon, epigenetik durumlarda son derece önemlidir. Özellikle bazı genlerin promotor bölgesindeki CpG metilasyonu tümör baskılayıcının inaktivasyonu ile oluşan bazı kanserlerde erken dönemlerde gözlenmiştir. AKAP 12/A ve AKAP 12/B'nin gen bölgelerinde CpG adacıkları tespit edilmiş. Metilasyon spesifik PCR ile yapılan taramalarda gastrik kanser hücre dizilerinin bir kısmında AKAP 12/A' da metilasyon tespit edilirken metilasyon tespit edilemeyen grupta AKAP 12/B'de metilasyon tespit edilmiştir. 18 gastrik kanserli hastanın dokularında metilasyona bakılmıştır ve

AKAP12A'nın örneklerin 10'unda (56%) AKAP12B ise örneklerin 2'sinde (11%) metile bulunmuştur. Hücre dizilerine 5-Aza-dC uygulanması ile gravin ekspresyonun olduğu gözlenmiştir. Gravin ekspresyonun hiç olmadığı hücre dizilerine 5-Aza-dC ile birlikte histon deasetilaz inhibitörü trichostatin A (TSA) uygulanmıştır. AKAP 12/B ekspresyonunun olduğu gözlenmiştir. Plasmid containing wild-type AKAP12A (pAKAP12A) vektörü kullanılarak gastrik kanser hücre dizilerine gen transferi yapılmış. AKAP12A re-ekspresyonu gösterilmiştir. Transgenik hücre dizisinde TUNEL assay ve Annexin V staining kullanılarak AKAP12A re-ekspresyonun apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Çalışmacılar bu bulgularla AKAP12A restorasyonunun gastrik kanser hücrelerinde apoptozisi indükleyerek hücre çoğalmasını baskıladığını ileri sürmüşlerdir. Sonuç olarak da AKAP 12/A ve AKAP 12/B'nin kaybının gastrik karsinom gelişiminde önemli olabileceği öne sürülmüştür. Gravinin bir tedavi hedefi olabileceği, gastrik kanser ve diğer malignansiler için biyomarker olabileceği iddia edilmiştir⁵⁰.

Huang ve arkadaşları MMTV-Wnt-1 transgenik fare meme kanseri modelinde değişen gen ekspresyonlarını araştırmışlardır. Meme kanseri gelişiminin değişik evrelerinde gen ekspresyonları incelenmiştir. Gravinin de meme kanseri gelişiminde ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir⁵¹.

Lahav ve arkadaşları melanom hücre dizilerinde Endothelin reseptör B (ETRB)'nin inhibisyonunun etkilerini incelemişlerdir. ETRB inhibisyonu için BQ788 kullanmışlardır. ETRB inhibisyonu ile hücre dizilerinde apoptozun indüklendiğini göstermişlerdir. ETRB inhibisyonun hücrelerde oluşturduğu gen ekspresyonu değişiklikleri incelenmiştir. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü ve Hipoksinin İndüklediği Faktör-1 α (HIF-1 α)'nin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Gravin ekspresyonun ise VEGF'nin ekspresyonunun arttığı hücre dizilerinde azaldığı gösterilmiştir. Gravinin melanom gelişiminde rolü olabileceği öne sürülmüştür⁵². Ancak ilginç olarak bu çalışmaların çoğunda gravin ekspresyon azalması, kaybı ya da metilasyonu ile klinik arasında ciddi bağlantılar incelenmemiştir.

Bilban ve arkadaşları B hücreli Kronik Lenfositik Lösemi (B-KLL)'de Lipoprotein Lipaz (LPL) ekspresyonuyla ilişkili gen ekspresyonlarını araştırmışlardır. 42 B-KLL tanılı hastanın incelendiği bu çalışmada RT-PCR ve cDNA array yöntemleri kullanılmıştır. LPL ekspresyonu olan grupta belirgin olarak Gravin, Septin10 ve DMD

ekspresyonlarının arttığı gösterilmiştir. LPL (+) ve (-) gruplar arasında 14 farklı gen ekspresyonu tespit edilmiştir. Bu gen setlerinin tedavinin planlanmasında ve prognozun belirlenmesinde önemli önemli olabileceği teorik olarak öne sürülmüştür⁵³.

Boulwood ve arkadaşları AML, KML ve MDS'den oluşan hemopoetik neoplazili hasta örneklerinde Gravin gen ekspresyonunu araştırmışlardır. Bu çalışmada 41 AML, 10 MDS (5 refrakter anemi, 2 refrakter anemi ring sideroblast, 3 refrakter anemi excess blast), 33 KML (7 kronik faz, 2 akselere faz, 24 blastik kriz) ve 3 imitanib mesilat kullanan sitogenetik remisyonda olan hasta örnekleri kullanılmıştır. Kronik faz, akselere fazdaki KML tanılı hastalardan ve MDS tanılı hastalardan kemik iliği örnekleri alınmıştır. Kalça eklemi replasmanı yapılan 10 gönüllüden kemik iliği örnekleri de kontrol olarak kullanılmıştır. Diğer hastaların periferik kan örnekleri incelenmiştir. CD34 (+) hücreler tespit edilip RT-PCR ile Gravin gen ekspresyonunu incelenmiştir. 5 MDS tanılı, 16 AML tanılı hasta ve 50 sağlıklı gönüllüden periferik kan örneklerinde mutasyon analizi yapılmıştır. RT-PCR yöntemi ile elde edilen sonuçlar bizim çalışmamızda olduğu gibi Comperative Ct yöntemi ile değerlendirilmiştir. AML tanılı hastaların tümünde Gravin ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Bir bölümünde Gravin ekspresyonu tespit edilememiştir. MDS tanılı 10 hastanın 9'unda Gravin ekspresyonu azalmış olarak bulunmuştur. Kronik faz, akselere faz ve blastik krizdeki KML hastalarında Gravin ekspresyonu azalmakla birlikte blastik krizdeki hastalarda diğer gruplardakine göre ekspresyon daha belirgin baskılanmış bulunmuştur. Buna karşın sitogenetik remisyondaki hastalarda, sağlıklı kontrollerle kıyaslandığında daha fazla gravin ekspresyonu tespit edilmiştir. Mutasyon analizlerinde nokta mutasyonlar tespit edilmemiştir. Gravinin MDS ve KML'de prognostik bir marker olabileceği öne sürülmüştür⁴².

Çeşitli neoplazilerde gravin ekspresyonu ile ilgili olup yukarıda özetlenen çalışmalar Tablo22' de özetlenmektedir.

Tablo 22: Malingnensilerde Gravin ile İlgili Yapılan Çalışmalar.

Çalışmacı	Tümör Tipi	Materyal	Yöntem	Sonuç	Kaynak No
Frankfort	v-src onkogen transformasyonu	NIH3T3 fibroblast hücre kültürü	PCR	Ekspresyon azalmış	44
Xia	prostat kanseri	Hücre kültürü Normal ve hiperplazik prostat doku örnekleri	FISH NB WB İF	Metastaz gelişiminde rolü gösterilmiş	46
Wikman	akciğer adenokarsinomu	18 hasta ve 4 kontrolün doku örnekleri	cDNA-Array RT-PCR	Ekspresyonu azalmış	48
Wasenius	papiller tiroid karsinomu	18 hasta ve 3 kontrolün doku örnekleri	RT-PCR cDNA array İH	Ekspresyonu azalmış	49
Choi	gastrik karsinom	Hücre kültürü 18 hastanın normal ve tümöral dokuları	NB WB RT-PCR MSP-PCR	Gravin geni metilasyonu ekspresyon azalmış	50
Huang	Meme kanseri	MMTV-Wnt-1 transgenik fare meme kanseri modeli	WB İH	Ekspresyon azalmış	51
Lahav	Maling Melanom	Melanom hücre kültürü	RT-PCR cDNA array	ETRB inhibisyonu ile Gravin ekspresyonu artmış	52
Bilban	B-KLL	42 B-KLL tanılı hasta	RT-PCR cDNA array	LPL (+) Gravin ekspresyonu artmış	53
Boulwood	AML, KML ve MDS	41 AML,36 KML, 10 MDS	RT-PCR	Myeloid malingnensilerde Gravin ekspresyonu azalmış	42

Çalışmamıza akut lösemili 137 hasta dahil edildi. Bunların 100'ü AML, 37'si ALL idi. AML ve ALL hastaları arasında BK, Htc, LDH, ürik asit düzeyleri arasında fark bulunmadı. AML ve ALL' li hastalar arasında ΔC_t değerleri arasında istatistiksel anlam farkı bulunmadı.

BK, Htc, LDH, ürik asit düzeyleri ile ΔC_t değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı. Lökosit sayısı ile hemogloblin, LDH, ürik asit değerleri arasında ve LDH ile lökosit, ürik asit, AST, ALT değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı ki bu bulgular literatür ile uyumludur.

Kontrol grubu 25 sağlıklı gönüllüden oluşturuldu. Hasta ve kontrol grubu arasında ΔC_t değeri belirgin olarak farklı bulundu (p değeri <0.001). Kontrol grubunun ortalama ΔC_t değeri kullanılarak “*fold change*” değerleri hesaplandı. Tüm hasta grubu ele alındığında kontrol gruba göre hasta grubunda Gravin ekspresyonunun 11 kat azalmış olduğu bulundu. Gravin ile ilgili literatürde yapılan ve hemopoetik neoplazilerle ilişkili tek klinik çalışma Boulwood ve arkadaşlarının çalışmasıdır. Bu çalışma

sonuçları ile uyumlu olarak tüm hasta grubu ele alındığında Gravin ekspresyonunun azaldığı görülmektedir. Hastalar tek tek incelendiğinde ise hem AML hem de ALL olgularında Gravin ekspresyonunun normal ve artmış olduğu hastalar bulunmaktadır. 12 hastada (%8.8) kontrol grubuyla benzer 19 hastada (%13.9) artmış Gravin ekspresyonu saptanmıştır. Boulwood ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmanın verileri incelendiğinde de bizim çalışmamızda olduğu gibi AML grubunda kontrol grubunun değerlerine yakın Gravin ekspresyonu gösteren hastalar görülmektedir. Bu grubun yapmış olduğu çalışmada AML tanılı hasta sayısı 41 iken çalışmamızda AML sayısı 100'dür ve görece daha yüksek hasta sayısı nedeniyle sonuç daha fazla bilgi verici olabilir. Ayrıca Boulwood'un çalışmasında yalnızca gravin ekspresyonunun düzeyi saptanmış, klinik ve/veya laboratuvar verileri ile ilintisi ve prognostik değeri belirlenmemiştir.

Bilindiği gibi akut lösemilerde sağkalıma etki eden faktörler yaş, BK sayısı, LDH, performans skoru, indüksiyon kemoterapisine yanıt ve immünofenotipdir. Bunlardan en önemlileri sitogenetik anormallikler ile başlangıçtaki BK sayıları ve indüksiyon kemoterapisine yanıtıdır. Akut lösemilerde yeni prognostik belirleyiciler değerlendirilirken bu parametrelerle kıyaslama ve ilişkilendirme yapılmaktadır. Bu çalışmada da sağkalıma etki eden bağımsız faktörler olarak indüksiyon kemoterapisine yanıt, lökosit ve ΔCt değeri tespit edildi ve kemoterapiye yanıt en güçlü belirleyici olarak bulundu. ΔCt değeri ile sağkalım arasında pozitif bir korelasyon bulundu. '*fold change*' değerlerine göre hastalar Gravin ekspresyonunun azalma ve artma değerlerine göre gruplandırıldı. Ekspresyonun en fazla azaldığı grup sağkalımın en uzun olduğu grup olarak tespit edildi. Başka bir ifadeyle Gravin ekspresyonu arttıkça sağkalımın azaldığı saptandı.

Gravin ekspresyonu çeşitli tümörlerde çalışılmış olmakla birlikte ekspresyon ile sağkalım ilişkisine araştırdığımız ya da ulaşabildiğimiz literatürde rastlamadık. Aynı şekilde akut lösemi olgularında da yukarıda da işaret edildiği gibi gravin ekspresyonu ile sağkalım ilişkisi incelenmemiştir. Boulwood ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada KML alt grubundan sitogenetik remisyonunda olan hastalarda Gravin ekspresyonu kontrollerden yüksek bulunmuştur. Diğer bir ifadeyle Gravin ekspresyonu sitogenetik remisyonu dolayısıyla iyi prognozu gösteren bir marker gibi durmaktadır. Yalnızca 3 olgunun değerlendirildiği bu grup da olgu sayısının azlığı nedeniyle bir

genellemeyi olanaklı kılmamaktadır ve böyle bir ilişkiyi tanımlayabilmek veya ileri sürebilmek için daha fazla veriye ihtiyaç vardır.

B-KLL’li olguların kapsandığı bir çalışmada lipoprotein lipaz (LPL) mRNA ekspresyonu iyi prognostik bir belirleyici olarak bulunmuş ve uzun sağkalımla ilişkili gösterilmiştir. LPL pozitif hastalarda Gravin ekspresyonu da artmış olarak saptanmıştır⁵³. Dolaylı bir ilişki de olsa Gravin ekspresyonunun uzun sağkalımla ilişkisi olduğu söylenebilir ancak veriler bu yorumu yapmak için henüz yetersizdir.

BCL-2 anti-apoptotik bir proteindir ve tümör hücrelerinde ekspresyonunun arttığı bulunmuştur. Bcl-2 ekspresyonu bazı tümörlerde iyi prognozla ilişkilidir. Bunun mekanizmasının Bcl-2’nin genetik stabiliteyi sağlayarak p53 mutasyonunun neden olabildiği ek mutasyonları önlediği düşünülmektedir. Tersini düşünülürken de Gravin kötü prognostik faktörlerin etkilerini artırıyor olabilir⁵⁴.

Bir tümör süpresör gen olan Gravin düzeyinin artması ile sağkalımın azalması, paradoksal bir durum olarak gözükmektedir. Literatürde de tümör süpresör genlerin paradoksal davranışları bildirilmiştir. CDKN2A CDK/CCND1 (cyclin D1)–RB1 yolağında rol oynayan bir tümör süpresör genidir. Birçok tümörde ekspresyon düzeyi azalmaktadır. Nöroblastomlu evre 3–4 hastalarda ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Bu hastalarda aktive olan diğer faktörlerin RB1 inaktive ettiği bu inaktivasyona karşı RB1 tarafından CDKN2A’nın kompanse edilebilir overekspresyonunun olduğu speküle edilmiştir⁵⁵. Gravin de siklinlerle ilişkili bir genidir. Benzeri mekanizma Gravin ekspresyon artışının kötü prognozla ilişkisini açıklayabilir. Ancak bu iddia daha fazla sayıda olgu ve gözlem ile desteklenmediği sürece böyle iddia edilmesi doğru değildir.

Sonuç olarak bu çalışmada akut lösemi olgularında bir tümör süpresör gen olan Gravinin ekspresyonunun artışının prognozu olumsuz yönde etkilediği saptanmıştır. Bu durum genel olarak tümör süpresör genlerin fonksiyonu açısından paradoksal bir durumdur. Prognozla ve Gravin ekspresyonuyla ilişkili diğer gen ekspresyonlarının araştırılması, varsa, bu paradoksal durumun nedenini ortaya koyabilir.

6. SONUÇLAR

- 1- 137 akut lösemili hasta çalışmaya dahil edildi.
 - 2- AML ve ALL'li hastaların Gravin ekspresyonları arasında fark saptanmadı.
 - 3- Tüm hastalar genel olarak incelendiğinde Gravin ekspresyonunun kontrol grubuna göre 11 kat azaldığı bulundu.
 - 4- Gravin gen ekspresyonu 19 hastada (%13.9) artmış, 106 hastada (%77.5) azalmış, 12 hastada (%8.8) kontrol grubuyla benzer bulundu.
 - 5- Hastalar gravin gen ürünü miktarındaki artma azalmalara göre gruplandırıldı. 80 olguda (%58.4) Gravin gen düzeyi 100 kattan az azalma, 26 olguda (%19) 100 kattan fazla azalma, 14 olguda (%10.2) 10 kattan az artma, 5 olguda (%3.6) 10 kattan fazla artma tespit edildi.
 - 6- Gravin ekspresyonunun artması ile sağkalım süresinin kısaldığı bulundu.
 - 7- Sağkalıma etki eden bağımsız faktörler olarak lökosit sayısı ve ΔC_t değeri tespit edildi. Ancak indüksiyon tedavisine yanıt da değerlendirildiğinde tek bağımsız faktör tedaviye tam yanıt olarak saptandı ki bu bulgu da akut lösemilerde indüksiyon tedavisine yanıtın halen en önemli prognostik belirleyici olduğunu göstermektedir.
- Sonuç olarak Gravin ekspresyonu akut lösemilerde azalmaktadır ve gravin düzeyi artan olgularda sağkalım olumsuz yönde etkilenmektedir. Ancak bu çalışmada gravin subgrupları ayrı ayrı çalışılmadığı için bu konuda net yorum yapılmadan önce daha fazla sayıda olguda gravin izoformlarının çalışılması daha uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

1. **Levine EG, Bloomfield CD.** Leukemias and myelodysplastic syndromes secondary to drug, radiation, and environmental exposure. *Semin Oncol* **1992**; 19:47–84
2. **Poiesz et al.** Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1980**; 77:7415
3. **Le Beau et al:** Clinical and cytogenetic correlations in 63 patients with therapy-related myelodysplastic syndromes and acute nonlymphocytic leukemia: Further evidence for characteristic abnormalities of chromosomes no. 5 and 7. *J.Clin. Oncol.* **1986**;4:325–345
4. **Thirman et al.** Rearrangement of the MLL gene in acute lymphoblastic and acute myeloid leukemias with 11q23 chromosomal translocations. *N Engl J Med* **1993**; 329:909–914
5. **Super et al:** Rearrangements of the MLL gene in therapy-related acute myeloid leukemia in patients previously treated with agents targeting DNA-topoisomerase II. *Blood* **1993**; 82:3705–3711
6. **Miller et al:** Myelodysplastic syndrome after autologous bone marrow transplantation: An additional late complication of curative cancer therapy. *Blood* **1994**; 83:3780–3786
7. **Stone et al:** Myelodysplastic syndrome as a late complication following autologous bone marrow transplantation for non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* **1994**; 12:2535–2542
8. **German et al;** Wahrman Bloom's syndrome. VI. The disorder in Israel and an estimation of the gene frequency in the Ashkenazim *Am J Hum Genet* **1977**; 29(6):553-62
9. **Butturini et al** Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: an International Fanconi Anemia Registry study. *Blood* **1994**; Sep 1;84(5):1650-5
10. **Inoue et al.** WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* **1994**; 84:3071
11. **Neubauer et al.** Prognostic importance of mutations in the ras proto-oncogenes in de novo acute myeloid leukemia. *Blood* **1994**; 83:1603
12. **Benekli et al.** Signal Transducer and activator of transcription proteins in leukemias. *Blood* **2003**; 101:2940-54
13. **Niu et al.** Constitutive STAT3 activity upregulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene* **2002**; 21:2000-8
14. **Bienz et al.** Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype. *Clin Cancer Res* **2005**; 11:1416
15. **Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M:** Cancer statistics 2002. *CA Cancer J Clin* **2002**; 52:23
16. **Vardiman et al.** The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* **2002**; 100:2292
17. **Von den Driesch, P.** Sweet's syndrome (acute febrile neutrophilic dermatosis). *J Am Acad Dermatol* **1994**; 31:535.

18. **Dutcher et al.** Hyperleukocytosis in adult acute nonlymphocytic leukemia: Impact on remission rate and duration, and survival. *J Clin Oncol* **1987**; 5:1364
19. **Flombaum, CD.** Metabolic emergencies in the cancer patient. *Semin Oncol* **2000**; 27:322
20. **Meinkoth et al.** Signal transduction through the cAMP dependent protein kinase. *Mol. Cell Biochem.* **1993**; 127-128: 179-86
21. **Pierce et al.** Seven transmembrane receptors. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**; 3, 639–650
22. **Corbin, J. D, Keely, S. L.** Characterization and regulation of heart adenosine 3':5'- monophosphate-dependent protein kinase isozymes. *J. Biol. Chem.* **1977** 252, 910–918
23. **Lohmann et al.** High-affinity binding of the regulatory subunit (RII) of cAMP dependent protein kinase to microtubule-associated and other cellular proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **1984** 81, 6723–6727
24. **Carr et al.** Association of the type II cAMP-dependent protein kinase with a human thyroid RII-anchoring protein. Cloning and characterization of the RII-binding domain. *J. Biol. Chem* **1992**; 267, 13376–13382
25. **Dell'Acqua et al.** Membrane-targeting sequences on AKAP79 bind phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *EMBO J.* **1998**; 17, 2246–2260
26. **Malbon et al.** AKAPs (A-kinase anchoring proteins) and molecules that compose their G-protein-coupled receptor signalling complexes. *Biochem. J.* **2004** ; 379, 1–9
27. **Dario Diviani, John D. Scott** AKAP signaling complexes at the cytoskeleton *Journal of Cell Science* **2004**; 114, 1431-1437
28. **Nauert et al.** Gravin, an autoantigen recognized by serum from myasthenia gravis patients, is a kinase scaffold protein. *Current Biology*, **1997**; 7, 52–62
29. **Sasaki et al.** Autoantibody to Gravin is Expressed More Strongly in Younger and Nonthymomatous Patients with Myasthenia Gravis *Surg Today* **2001**; 31:1036–1037
30. **Gelman I. H.** The role of SSeCKS/gravin/AKAP12 scaffolding proteins in the spatiotemporal control of signaling pathways in oncogenesis and development . *Front. Biosci.* **2002**; 7;1782-1797
31. **Jack Erlichman et al.** Developmental expression of the protein kinase C substrate/binding protein (clone 72/SSeCKS) in rat testis *Eur. J. Biochem* . **1999**; 263, 797-805
32. **Streb et al.** Multiple Promoters Direct Expression of Three AKAP12 Isoforms with Distinct Subcellular and Tissue Distribution Profiles *Journal Of Biological Chemistry* , **2004** Vol. 279, No. 53, 56014–56023
33. **Bryon D. Grove, Aleksandra K. Bruchey** Intracellular Distribution of Gravin, a PKA and PKC Binding Protein, in Vascular Endothelial Cells *Journal of Vascular Research* **2001**; 38:163-175
34. **Fan et al.** The scaffold protein gravin (cAMP-dependent protein kinase-anchoring protein 250) binds the β_2 -adrenergic receptor via the receptor cytoplasmic Arg-329 to Leu-413 domain and provides a mobile scaffold during desensitization. *J. Biol.Chem.* **2001**; 276, 24005–24014.
35. **Jörg Piontek, Roland Brandt** Differential and Regulated Binding of cAMP-dependent Protein Kinase and Protein Kinase C Isoenzymes to Gravin in Human Model Neurons *The Journal Of Biological Chemistry* **2003**; Vol. 278, No. 40, pp. 38970–38979

36. **Chapline et al.** Identification of a major protein kinase C-binding protein and substrate in rat embryo fibroblasts decreased expression in transformed cells. *J. Biol. Chem.* **1996**; 271:6417–6422
37. **Gelman et al.** Control of cytoskeletal architecture by the src-suppressed C kinase substrate, SSeCKS. *Cell Motil. Cytoskeleton* **1998**; 41:1–17
38. **Lin, X. , Gelman, I.H.** Reexpression of the major protein kinase C substrate, SSeCKS, suppresses v-src-induced morphological transformation and tumorigenesis. *Cancer Research*, **1997**; 57, 2304–2312
39. **Cohen et al.** Expression of a down regulated target, SSeCKS, reverses v-Jun_ induced transformation of 10T1/2 murine fibroblast. *Oncogene*, **2001**; 20:141-6
40. **Gelman et all** Control of Cytoskeletal Architecture by the src-Suppressed C Kinase Substrate, SSeCKS Cell Motility and the Cytoskeleton **1998**; 41:1–17
41. **Gelman et all.** A role for SSeCKS, a major protein kinase C substrate with tumour suppressor activity, in cytoskeletal architecture, formation of migratory processes, and cell migration during embryogenesis *The Histochemical Journal* **2000**; 32: 13–26
42. **Boulwood et all.** Low expression of the putative tumour suppressor gene Gravin in chronic myeloid leukaemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia *British Journal of Haematology*, **2004**; 126, 508–51
43. **ABI PRISM 7700** User Bulletin No. 2. Sequence Detection System, Revision A, pp. 11–13, **1997** (updated 10/2001).
44. **Frankfort B. J., Gelman I. H.** Identification of Novel Cellular Genes Transcriptionally Suppressed by v-src *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**; 206(3), 916-926
45. **Visakorpi et all** Genetic changes in primary and recurrent prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* **1995**; 55:342–347
46. **Xia P et al.** The Src-suppressed C kinase substrate, SSeCKS, is a potential metastasis inhibitor in prostate cancer. *Cancer Res* **2001**; 61:5644–5651
47. **Irwin H. Gelman ve Lingqiu Gao** SSeCKS/Gravin/AKAP12 Metastasis Suppressor Inhibits Podosome Formation via RhoA- and Cdc42-Dependent Pathways *Mol Cancer Res* **2006**; 4(3), 151-158
48. **Wikman et al.** Identification of differentially expressed genes in pulmonary adenocarcinoma by using cDNA array. *Oncogene*, **2002**; 21, 5804–5813
49. **Wasenius et all.** Hepatocyte Growth Factor Receptor, Matrix Metalloproteinase-11, Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1, and Fibronectin Are Up-Regulated in Papillary Thyroid Carcinoma: A cDNA and Tissue Microarray Study *Clinical Cancer Research* **2003**; Vol. 9, 68–75
50. **Choi et al.** AKAP12/Gravin is inactivated by epigenetic mechanism in human gastric carcinoma and shows growth suppressor activity *Oncogene*, **2004**; 23: 7095–7103
51. **Huang et al.** Changes in gene expression during the development of mammary tumors in MMTV-Wnt-1 transgenic mice *Genome Biology* **2005**; 6:R84
52. **Lahav et all.** Endothelin Receptor B Inhibition Triggers Apoptosis and Enhances Angiogenesis in Melanomas *Cancer Research* **2004**; 64, 8945–8953
53. **Bilban et all.** Deregulated expression of fat and muscle genes in B-cell chronic lymphocytic leukemia with high lipoprotein lipase expression. *Leukemia* **2006**; 20, 1080–1088

- 54. Katerina V. Et al.** Paradoxical Role of Apoptosis in Tumor Progression Journal of Cellular Biochemistry **2003** 88:128–137
- 55. Gebauer et al.** Expression Profiles and Clinical Relationships of ID2, CDKN1B, and CDKN2A in Primary Neuroblastoma Genes, Chromosomes & Cancer **2004**; 41:297–308
- 56. Bench et al.** Molecular genetic analysis of haematological malignancies: I. Acute leukaemias and myeloproliferative disordersA. Clinical & Laboratory Haematology **2005** Volume 27 June Page 148

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mustafa YILDIRIM

Doğum Tarihi ve Yeri : 19/02/1977-Yavuzeli

Medeni Durumu : Evli

Adres : Yeşilyurt Mah. 136. sok No:18 Kat:3
Seyhan/ADANA

Telefon : 0 (322) 228 52 49

E-Mail : mustafayildirim7@yahoo.com

Mezun Olduğu Tıp Fakültesi : İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Yabancı Diller : İngilizce