

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MİYELODİSPLASTİK SENDROMDA VE LÖSEMİLERDE
MİR146A’NIN TGF- B SİNYAL REGÜLASYONUNDAKİ
ROLÜ VE 5q DELESYONU İLE İLİŞKİSİNİN
İNCELENMESİ**

SEDA SÜSGÜN

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. YELDA TARKAN ARGÜDEN**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MİYELODİSPLASTİK SENDROMDA VE LÖSEMİLERDE
MİR146A’NIN TGF- B SİNYAL REGÜLASYONUNDAKİ
ROLÜ VE 5q DELESYONU İLE İLİŞKİSİNİN
İNCELENMESİ**

SEDA SÜSGÜN

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. YELDA TARKAN ARGÜDEN**

**İKİNCİ DANIŞMAN
DOÇ. DR. ONUR BAYKARA**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı, Genetik Programında Yüksek Lisans öğrencisi Seda SÜSGÜN tarafından Doç. Dr. Yelda TARKAN ARGÜDEN'in danışmanlığında hazırlanan “Miyelodisplastik Sendromda ve Lösemilerde miR-146a'nın TGF- B Sinyal Regülasyonundaki Rolü ve 5q Delesyonu ile İlişkisinin İncelenmesi” başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 21.06.2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ayhan DEVİREN

İ.Ü. Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı



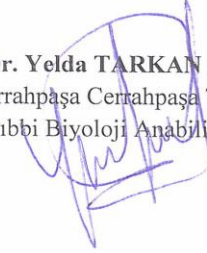
Doç. Dr. Sema SIRMA EKMEKÇİ

İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Genetik Anabilim Dalı



Doç. Dr. Yelda TARKAN ARGÜDEN

İ.Ü. Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

SEDA SÜSGÜN

İTHAF

Hayattaki en büyük şansım değerli aileme ve yaşamın her alanında emeğiyle var olan kadınlara ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans süresi boyunca tüm bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan, eğitim hayatıma değerli katkıları olan danışman hocam Doç. Dr. Yelda Tarkan Argüden'e,

Her konuda ilgisi, yardımı ve sabrıyla bir arkadaş gibi olan sevgili danışman hocam Doç. Dr. Onur Baykara'ya,

Desteğini ve sevgisini hep hissettiğim Prof. Dr. Ayhan Deviren'e,

İş hayatına başladığım yeni üniversitemde anlayışlı yaklaşımından dolayı Doç. Dr. Fahri Akbaş'a,

Tez çalışmamın gerçekleşmesi için gerekli yardımları sağlayan hematolog Prof. Dr. Şeniz Öngören Aydın'a ve Uzm. Dr. Tuğrul Elverdi'ye,

Mesleki gelişimime katkıda bulunan, bir laboratuvardan çok aile gibi olan Sitogenetik Ekibi'nden başta Dr. Dilhan Kuru olmak üzere, Doç. Dr. Ayşe Çırakoğlu, Dr. Şükriye Yılmaz ve İlknur Yaldir'a

Akademik hayatıma dokunuşu çok anlamlı olan, bir danışman özverisiyle öğreten Dr. Emrah Yücesan'a,

Karanlık FISH odasında beni hiç yalnız bırakmayan, teknik desteği ve arkadaşlığı için MSc. Başak Aslaneli Çakmak'a,

Sorgusuz sualsiz ihtiyaç duyduğum her an, en kötü günlerimde hep yanımda olan, fedakarlığın ne demek olduğunu öğrendiğim, canım dostum MSc. Handenur Göktan'a,

Neşesi ve güler yüzüyle beni hep motive etmeye çalışan canım arkadaşım Dr. Hilal Şahin'e,

Manevi desteği ve yardımlarıyla hayatımda çok önemli yere sahip sevgili arkadaşlarım MSc. Aslı Karacan, MSc. İrem Yağmur Diker, MSc. Şeyma Ceylan, MSc. Sezen Atasoy, MSc. Narmin Bakhshaliyeva, Mak. Müh. Aylin Dikmen ve Dyt. Merve Sert'e

Eğitime desteği amaç edinmiş çok değerli büyüğüm Av. Serhat Ünal'dı'ya,

Benim ben olmamda, azmimde, hayat görüşümde çok büyük etkileri olan ablalarım Uzm. Dt. Zehra Süsgün Yıldırım ve Av. Esra Süsgün'e, biricik kardeşim Elçin Süsgün'e, yanında olamasam da enerji kaynağım yeğenim Duru Lena'ma ve tabii ki her koşulda en büyük destekçim, beni bugünlere getiren canım Annem ve Babam'a,

Sonsuz teşekkürler...

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 24641

İÇİNDEKİLER

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI.....	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	XİV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. HEMATOPOEZ	3
2.2. MİYELODİSPLASTİK SENDROMLAR.....	4
2.2.1. Epidemiyoloji.....	4
2.2.2. Tanı	4
2.2.3. Etiyoloji.....	5
2.2.4. Klinik Seyir	5
2.2.5. Sınıflandırma.....	9
2.2.5.1. FAB Sınıflandırması	9
2.2.5.2. DSÖ Sınıflandırması	10
2.2.6. MDS'nin Patogenezi ve Genetiği	11
2.2.6.1. MDS'nin Sitogenetiği	12
2.2.6.2. MDS'nin Moleküler Genetiği ve Epigenetiği	15
2.3. MikroRNA'LAR.....	17
2.3.1. MDS'de mikroRNA'lar	18
2.3.2. MikroRNA-146a	19
2.3.3. MikroRNA-145.....	20
2.4. TGF-β SİNYAL YOLAĞI.....	21
2.4.1. MDS'de TGF-β Sinyalizasyonu	23

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1. GEREÇ	25
3.1.1. Materyal	25
3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Gereçler.....	25
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	26
3.1.4. Kullanılan Tamponlar ve Çözeltiler (Solüsyonlar).....	27
3.1.4.1. Sitogenetik Yönteminde Kullanılan Tamponlar ve Çözeltiler.....	27
3.1.4.2. FISH Yönteminde Kullanılan Tamponlar ve Çözeltiler	27
3.1.4.3. Gerçek Zamanlı PZT Yönteminde Kullanılan Tamponlar Ve Çözeltiler	29
3.2. YÖNTEM	30
3.2.1. Konvansiyonel Sitogenetik Metodu.....	30
3.2.2. FISH Metodu.....	32
3.2.2.1. Tekrarlayan Dizi Problemleri.....	32
3.2.2.2. Lokusa Spesifik Problemler	32
3.2.2.3. Tüm Kromozom Boyama Probu	32
3.2.3. Total RNA İzolasyonu ve cDNA Dönüşümleri	34
3.2.3.1. Kandan Lökosit İzolasyonu.....	34
3.2.3.2. RNA İzolasyonu.....	34
3.2.3.3. MikroRNA'dan Komplementer DNA Eldesi.....	35
3.2.3.4. Total RNA'dan Komplementer DNA Eldesi	36
3.2.4. Gerçek Zamanlı PZT.....	36
3.2.4.1. miRNA'larda Görece (Rölatif) Gen İfadesi.....	37
3.2.4.2. Hedef Genin Görece İfadesi.....	38
3.2.5. İstatistiksel Analiz.....	39
3.2.5.1. $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu	39
3.2.5.2. FISH yönteminde <i>Cut-Off</i> belirlemede <i>BetaInv</i> (<i>Inverse Beta Distribution</i> , Ters Beta Dağılımı) metodu.....	39
4. BULGULAR.....	41
5. TARTIŞMA	57
KAYNAKLAR	64
HAM VERİLER	72
FORMLAR	73
ETİK KURUL KARARI	75

PATENT HAKKI İZNİ	78
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	79
ÖZGEÇMİŞ	80



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: MDS’de kromozomal anomali bulgularının prognoza etkisi (30)	6
Tablo 2-2: Uluslararası Prognostik Skorlama Sistemi (IPSS) (7, 31)	7
Tablo 2-3: IPSS’ye göre skor değerlendirmesi (7, 31)	7
Tablo 2-4: ‘Gözden Geçirilmiş Uluslararası Prognostik Skorlama Sistemi’ne göre kriterler (33).....	8
Tablo 2-5: IPSS-R risk kategorilerine göre sağkalım ve AML transformasyon süreleri (33).....	9
Tablo 2-6: FAB sınıflandırmasına göre MDS alt tipleri (34)	9
Tablo 2-7: DSÖ 2016 MDS Sınıflandırması (35).....	10
Tablo 3-1: Kullanılan primerlerin dizileri	29
Tablo 3-2: miRNA’dan cDNA dönüşümü yapılırken kullanılan kimyasallar ve miktarları.....	35
Tablo 3-3: Total RNA’dan cDNA dönüşümü yapılırken kullanılan reaktifler ve miktarları.....	36
Tablo 3-4: qPZT reaksiyonu hazırlanırken kullanılan reaktifler ve miktarları.....	37
Tablo 3-5: GZ-PZT’da kullanılan döngü parametreleri	38
Tablo 3-6: GZ-PZT reaksiyon içeriği	38
Tablo 3-7: GZ-PZT için uygulanan koşullar	39
Tablo 4-1: MDS Ön Tanısıyla Gelen Hastaların Sitogenetik Değerlendirme Sonuçları	41
Tablo 4-2: Kontrol Grubuna Ait Konvansiyonel Sitogenetik Analiz Sonuçları.....	43
Tablo 4-3: Gözlenen sinyal durumları için Cut-Off değerleri	51
Tablo 4-4: Kontrol grubuna uygulanan 5p15.2/5q33-34 probu için elde edilen veriler.	52
Tablo 4-5: Olgu grubuna uygulanan 5p15.2/5q33-34 probu için elde edilen veriler	53
Tablo 4-6: Olgularda miR-146a, miR-145 ve SMAD2 için hesaplanan $2^{-\Delta\Delta ct}$ değerleri ve görece ifade değişim durumları	56

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Hematopoetik kök hücrelerden farklılaşarak oluşan miyeloid ve lenfoid seri hücrelerinin gelişimi (24).....	3
Şekil 2-2: 2072 MDS'li olguda yapılan sitogenetik çalışmada tespit edilen anomaliler (40).....	12
Şekil 2-3: miRNA biyogenezi ve fonksiyonu (14)	17
Şekil 2-4: miRNA'ların gen düzenleme mekanizması (14).....	18
Şekil 2-5: hsa-mir-146a'nın <i>stem-loop</i> yapısı (75, 76)	19
Şekil 2-6: Olgun hsa-miR-146a-5p dizisi (75, 76)	19
Şekil 2-7: miR-146a ile <i>SMAD2</i> mRNA'sı arası etkileşim (20).....	20
Şekil 2-8: pre-miR-145'in <i>stem-loop</i> yapısı (75, 76).....	20
Şekil 2-9: Olgun hsa-miR-145-5p dizisi (75, 76)	20
Şekil 2-10: miR-145 ve <i>SMAD2</i> arası etkileşim (21)	20
Şekil 2-11: TGF- β / <i>SMAD</i> sinyal yolağı (81)	22
Şekil 2-12: <i>SMAD2</i> proteinin amino asit dizisi ve üç boyutlu yapısı (Uniprot ID: Q15796)	23
Şekil 2-13: Sitokinlerin hematopoezi düzenleyici etkisi (82).....	24
Şekil 3-1: 5q33-34 delesyon probu (83)	27
Şekil 3-2: İnterfaz FISH yönteminde 5q33-34 probunun olası sinyallerinin gösterimi .	28
Şekil 3-3: FISH prob çeşitleri (91)	33
Şekil 3-4: SYBR Green çalışma prensibi (93).....	37
Şekil 4-1: Çalışmada kullanılan hasta grubunun cinsiyete göre dağılımı.....	41
Şekil 4-2: Sitogenetik analizle gözlenen klonal sayısal anomaliler ve görülen hasta sayısı	46
Şekil 4-3: Olgu 6'ya ait 92,XXXX kromozom yapısına sahip bir karyogram örneği	47
Şekil 4-4: Olgu 7'ye ait 42,XX,-3,-8,-15,-22 kromozom yapısına sahip bir karyogram örneği	47
Şekil 4-5: Olgu 8'e ait 42,XY,-5,-10,-20,-22 kromozom yapısına sahip bir karyogram örneği	48
Şekil 4-6: Olgu 13'e ait 46,XY,chtb(3)(p21),chtb(7)(q22),chtb(10)(q22) kromozom yapısına sahip bir karyogram örneği.....	48

Şekil 4-7: Olgu 19'a ait 46,XX,-7,+mar1 kromozom yapısına sahip bir karyogram örneği	49
Şekil 4-8: Olgu 21'e ait 46,XX,ins(X;?)(p11.2;??) kromozom yapısına sahip bir karyogram örneği.....	49
Şekil 4-9: Farklı kromozom yapılarına sahip FISH örnekleri	50
Şekil 4-10: <i>SMAD2</i> görece gen ifade çalışmasında Ct ve erime noktası değerleri.....	54
Şekil 4-11: Hasta ve kontrol gruplarının görece miR-146a ifade değerlerinin karşılaştırılması.....	55
Şekil 4-12: Hasta ve kontrol gruplarının görece miR-145 ifade değerlerinin karşılaştırılması.....	55
Şekil 4-13: Hasta ve kontrol gruplarının görece <i>SMAD2</i> ifade değerlerinin karşılaştırılması.....	55

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ALL:	Akut Lenfoblastik Lösemi
AML:	Akut Miyeloid Lösemi
BAC:	Bakteri Yapay Kromozomu
cDNA:	Komplementer DNA
CDR:	Yaygın Delesyon Bölgesi
Ct:	Döngü Eşik Değeri
DAPI:	4',6'-diamino-2-fenilindol
DNA:	Deoksiribonükleik Asit
DSÖ:	Dünya Sağlık Örgütü
FAB:	Fransız, Amerikan, İngiliz
FISH:	Floresan İn Situ Hibridizasyon
FITC:	Floresin İzotiyosiyanat
GTL:	Giemsa-Tripsin-Leishman
HKH:	Hematopoetik Kök Hücre
IPSS:	Uluslararası Prognostik Skarlama Sistemi
IPSS-R:	Gözden Geçirilmiş Uluslararası Prognostik Skarlama Sistemi
ISCN:	Uluslararası İnsan Sitogenetik Nomenklatür Sistemi
KMML:	Kronik Miyelomonositik Lösemi
LTBP:	TGF- β Bağlayıcı Protein
MDS:	Miyelodisplastik Sendrom
MDS-EB:	Artmış Blastlı MDS
MDS-MLD:	Birden Çok Seride Displazili MDS
MDS-RS:	Halka Sideroblastlı MDS
MDS-SLD:	Tek Seride Displazili MDS
MDS-U:	Sınıflandırılmamış MDS
miRNA:	MikroRNA
mRNA:	Mesajcı RNA
PBS:	Fosfat Tampon Tuzu
qGZ-PZT:	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Tepkimesi

RA: Refrakter Anemi

RAEB: Artmış Blastlı Refrakter Anemi

RAEB-T: Transformasyondaki Artmış Blastlı Refrakter Anemi

RARS: Ring Sideroblastlı Refrakter Anemi

RISC: RNA ile İndüklenen Susturma Kompleksi

RNA: Ribonükleik Asit

SSC: Sodyum Sitrat Tuzu

TBRI: TGF-B Reseptör I Kinaz

TGF- β : Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta

TNF- α : Tümör Nekroz Faktörü Alfa

TxRED: Teksas Kırmızı Floresan Boyası

YAC: Maya Yapay Kromozomu

ÖZET

SÜSGÜN, S. (2019). Miyelodisplastik sendromda ve lösemilerde miR-146a'nın TGF- β sinyal regülasyonundaki rolü ve 5q delesyonu ile ilişkisinin incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik AD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Miyelodisplastik sendrom, verimsiz hematopoez nedeniyle displastik hücreler ve periferik kanda sitopeni ile karakterize, heterojen bir klonal hematopoetik kök hücre malinitesidir. Hastaların %30-50'sinde klonal kromozomal anomaliler gözlenmektedir. Bununla birlikte MDS ile ilişkilendirilen çok sayıda gen mutasyonu ve ifade düzeyi değişen miRNA tanımlanmıştır. Çalışmamıza dahil edilen hastalarda, sitogenetik ve moleküler bulgular arasında ilişki kurmak amacıyla MDS'de sık gözlenen 5q delesyonuna ve bu bölgeden kodlanan miR-146a/miR-145 ifadesine odaklanıldı. Hematopoezde baskılayıcı bir sitokin olan TGF- β sinyalizasyonunun alt yolağında görevli SMAD2 ile bahsedilen miRNA'lar arasındaki ilişki incelendi. MDS ön tanısı almış 24 hastanın kemik iliği aspirasyon materyaline ve 20 sağlıklı kontrol örneğine sitogenetik, FISH ve GZ-PZT yöntemleri uygulandı. Olguların %43,4'ünde klonal sitogenetik anomali saptandı, del(5q) anomalisi hem sitogenetik hem de FISH yöntemiyle birlikte değerlendirildi ancak olgularda istatistiksel olarak anlamlı delesyon bulgusuna rastlanmadı. Yapılan miRNA ifade analizi çalışması sonrasında tüm olgularda miR-146a ifadesinin azaldığı ($p=0,0003$), bununla birlikte olguların %41,6'sında SMAD2 ifadesinin arttığı belirlendi. miR-145 ve SMAD2 ifadelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış veya azalış gözlenmezken aralarındaki ilişkinin anlamlı olduğu tespit edildi ($p=0,04$). Olgu sayısının artırılması MDS'de hastalığın moleküler etiyopatogenezinin aydınlatılmasına yardımcı olabilir.

Anahtar Kelimeler: MDS, Sitogenetik, FISH, miR-146a, TGF- β

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 24641

ABSTRACT

SÜSGÜN, S. (2019). Investigating the role of miR-146a in TGF- β signal regulation in myelodysplastic syndrome and leukemias and its relationship with 5q deletion. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Genetics. Master's Thesis. İstanbul.

Myelodysplastic syndrome (MDS) is a clonal heterogeneous hematopoietic stem cell malignancy characterized by dysplastic cells and cytopenia in peripheral blood due to inefficient hematopoiesis. Clonal chromosomal abnormalities are seen in 30-50% of patients. However, a large number of gene mutations and miRNAs with altered gene expression have been associated with MDS. In order to establish an association between the cytogenetic and molecular findings in patients included in our study, we focused on the deletion of 5q, which is one of the most frequently deleted regions in MDS, and the expression levels of miR-146a / miR-145 encoded from this region. The association between the MDS, miRNAs and SMAD2, a target of the above mentioned miRNAs and a functional gene in the signaling pathway of TGF- β , a suppressive cytokine, was investigated. A total of 24 bone marrow aspiration materials obtained from patients pre-diagnosed with MDS and the blood of 20 healthy control subjects were investigated using cytogenetic, FISH and RT-PCR methods. Clonal cytogenetic abnormality was detected in 43.4% of the cases and del (5q) abnormality was evaluated using cytogenetic and FISH methods but no statistically significant deletion finding was found in cases. miRNA expression analysis showed that the expression of miR-146a was decreased in all patients ($p = 0.0003$) while SMAD2 expression was increased in 41.6%. While there was no statistically significant change in miR-145 and SMAD2 expression levels, a significant relationship between these two was found ($p = 0.04$). Increasing the number of patients may help to enlighten the molecular pathogenesis of MDS.

Key Words: MDS, Cytogenetics, FISH, miR-146a, TGF- β

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 24641

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hematopoez (Lat. Haema: kan, poesis: yapım, üretim), hematopoetik kök hücrelerden (HKH) olgun kan hücrelerinin üretildiği bir süreç olup, yetişkin bireylerde büyük oranda kemik iliğinde gerçekleşir (1, 2). Miyelodisplastik sendrom (MDS) verimsiz hematopoeze bağlı olarak kemik iliği hücrelerinde morfolojik displazi ve periferik kanda olgun kan hücresi sayısında azalma (sitopeni) ile karakterize olan heterojen hematolojik bir malignitedir ve akut miyeloid lösemiye (AML) dönüşüm riskinin yüksek olduğu bildirilmiştir (3, 4).

Hastalık *de novo* veya tedavi sonrasında (sekonder olarak) ortaya çıkabilmektedir. İyonlaştırıcı radyasyon, toksinler veya kemoterapötik ilaçlara maruz kalmanın hastalığın oluşmasını kolaylaştırıcı etkenler olduğu düşünülmektedir. MDS çocukluk çağında nadir görülse de bazı kalıtsal hastalıklarla birlikte ortaya çıktığı görülmüştür. Yetişkinlerde ise yaş ilerledikçe görülme sıklığının artmasının kemik iliği hücrelerindeki içsel ve çevresel etkiler nedeniyle olduğu düşünülmektedir (4-6).

MDS'nin Avrupa'da görülme sıklığı 3-20/100.000 civarındadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl 10.000'den fazla yeni tanı konmaktadır (7).

Hastalarda tekrarlayan ve başka nedenlerle dışlanamayan sitopeniler vardır (8). Vakaların %40-50'sinde sitogenetik anomali bulunur ve yaygın olarak del(5q), del(7q), +8, del(20q), del(17p) gözlenir (3). Moleküler çalışmalar sonucunda *ASXL1*, *TP53*, *EZH2*, *ETV6* ve *RUNX1* genlerinde mutasyonlar görülmüş ve kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (9).

MDS tanısının konulabilmesi için en az bir miyeloid seri hücre tipinde altı aydan uzun süren ve başka nedenlerle dışlanamayan sitopeniye ek olarak; en az bir hücre serisinde hücrelerin %10'undan fazlasında displazi veya en az %15 halka sideroblast bulunması, tipik sitogenetik bulguların gözlenmesi, kemik iliğinde %5-19 oranında blast hücrelerinin bulunması gibi kriterlerden bir veya birkaçının bir arada bulunması gerekmektedir (10).

Hastalık heterojen yapıda olduğu için prognozda etkili birçok etken belirlenmiştir. Sağkalımı ve AML transformasyon ihtimalini belirlemek için uluslararası risk değerlendirme standardı olarak *International Prognostic Scoring System* (IPSS) kabul edilmiştir. Bu sistemde kemik iliğindeki blast hücresi sayısı, sitopeni durumu, kemik iliği sitogenetik sonuçları skora yöntemi kullanılmıştır (11, 12).

Olgun mikroRNA'lar (miRNA) tek zincirli, 19-23 nükleotid uzunluğunda, evrimsel olarak korunmuş, protein kodlamayan RNA'lardır (13). miRNA'ların erken gelişim, hücresel farklılaşma, çoğalma, apoptoz, gelişimsel zamanlama ve hematopoez gibi birçok farklı biyolojik süreçte kritik düzenleyici roller oynadığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu nedenle miRNA'ların ifadesindeki değişiklikler birçok hastalık ile ilişkilendirilmiştir (14).

MDS’de sık görülen del(5q) vakalarında bu bölgede bulunan miR-146a ve miR-145’in ifadesinin düşük seviyelerde olduğu tespit edilmiştir (15). Yapılan hayvan deneylerinde miR-146a ifadesi olmayan farelerde ekstramedüller eritropoez, anemi, trombositopeni, lenfopeni ve yaşla birlikte miyeloproliferasyon geliştiği gösterilmiştir (16). Başka bir çalışmada ise del(5q) olgularında miR-146a ve miR-145 ifadesinin azalması sonucunda HKH’de doğal immün sinyalizasyonun beklenmeyen artışı nedeniyle megakaryositik anomaliler, kemik iliği yetmezliği ve AML’ye dönüşüm eğilimi gözlenmiştir (17).

Transforme edici büyüme etmeni-beta (Transforming Growth Factor-beta, TGF- β) sinyal yolağı, hücre gelişiminin düzenlenmesinde ve hücre farklılaşmasında görevlidir. Bu nedenle TGF- β ile ilişkili sitokinlerin hücre çoğalması, farklılaşması, morfogenezi, doku homeostazisi ve yenilenmesi (rejenerasyonu) gibi önemli işlevlerde rolü büyüktür ve bu yolakta meydana gelebilecek bozukluklar birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir (18).

TGF- β ’nın kök/öncül hücrelerin üzerindeki baskılayıcı etkisi bilinmektedir. TGF- β , almaçlarına (reseptörlerine) bağlandığında hücre içi SMAD2/3 proteinleri etkinleşir. Bu proteinler çeşitli kofaktörlerle etkileşerek çekirdeğe göç eder ve birçok biyolojik etkiye yol açar. TGF- β reseptör I kinaz (TBRI) etkinleşmesinin aşağı yolağındaki aracı olan SMAD2’nin MDS’de kemik iliği öncül hücrelerinde yapısal olarak etkinleştiği gösterilmiştir (19).

İnsan fetal femur kökenli iskelet kök hücrelerinde yapılan bir çalışmada miR-146a’nın *SMAD2* ve *SMAD3*’ü hedeflediği bildirilmiştir (20). Bir fare modeli çalışmasında ise umbilikal korddan türetilmiş mezenkimal kök hücrelerde miR-145’in *SMAD2*’yi hedeflediği tespit edilmiştir (21).

Tez çalışması kapsamında, MDS hastalarında sık gözlenen kromozom 5q33-34 bölgesi delesyonları ve bu bölgeden kodlanan miR-146a’nın gen ifade değişiklikleri değerlendirilmiştir. İncelenen miR-146a/miR-145’in nın önemi ise bu miRNA’ların baskılayıcı bir sitokin olan TGF- β sinyal yolağında görevli *SMAD2*’yi hedeflediği düşünülmektedir. Bu nedenle miR-146a/miR-145’in ifadesinin azalması *SMAD2* ifadesinin artmasına neden olacaktır. *SMAD2* etkinleşmesinin artması ise TGF- β sinyal yolağı üzerinden hematopoetik kök hücrelerde miyelo baskılamaya neden olabilecektir. Bu kapsamda, MDS’nin etyopatogenezinde bahsedilen parametrelerin etkisi araştırılmıştır.

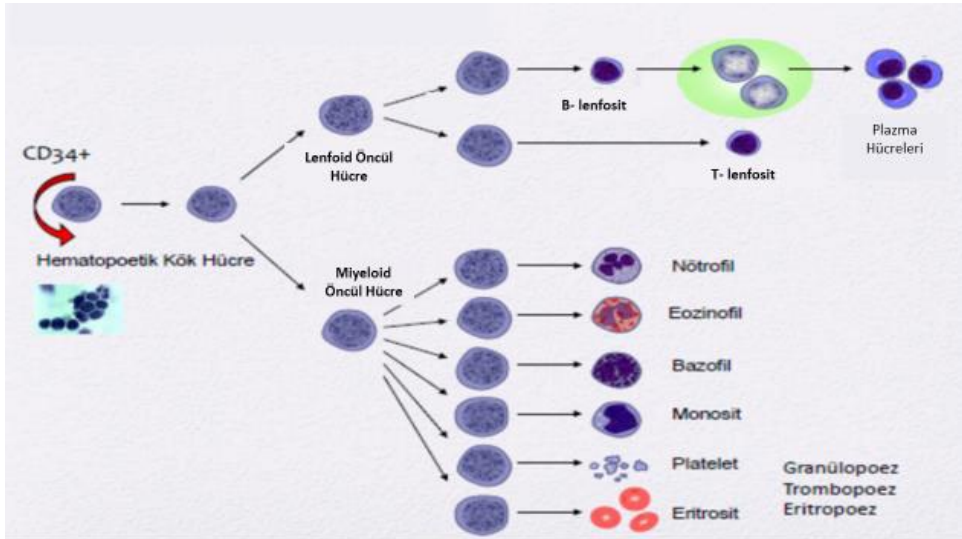
2. GENEL BİLGİLER

2.1. HEMATOPOEZ

Hematopoez, hematopoetik kök hücrelerden (HKH) olgun kan hücrelerinin üretildiği bir süreçtir (2). Kan dokusunda çok çeşitli işlevlere sahip 10'dan fazla kan hücre tipi bulunmaktadır; lökositler doğuştan ve edinilmiş bağışıklıkta görevli birçok özel hücre tipini barındırır, eritrositler oksijen ve karbondioksit taşınmasından sorumludur, megakaryositler kan pıhtılaşması ve yara iyileşmesi için gerekli olan trombositleri üretirler. Tüm bu kan hücre tipleri yetişkin bireylerde büyük oranda kemik iliğinde bulunan hematopoetik kök hücrelerden köken alarak üretilir (1).

Hematopoetik kök hücreler pluripotent özelliktedir yani kendini yenileyebilme ve farklılaşma yeteneğine sahiptirler. Erken farklılaşma safhasında kendini yenileyebilme özelliğini kaybederek multipotent öncül hücrelere dönüşürler. Bu multipotent öncül hücrelerin kendilerini yenileyebilme özelliği kısıtlı olup, sadece lenfoid ve miyeloid hücre serilerine dönüşebilirler (22).

Hematopoetik kök hücrelerden ilk farklılaşma lenfoid seri ve miyeloid serinin gelişimi ile olur. Lenfoid seriden B ve T lenfositler, doğal öldürücü hücreler (Natural Killer-NK) köken alırken miyeloid seriden makrofajlar, dendritik hücreler, mast hücreleri, osteoklastlar gibi tüm lenfoid olmayan hücre tipleri gelişir (23). Şekil 2-1'de hematopoezde öncül hücrelerden kanın şekilli elemanlarına dönüşüm süreci gösterilmiştir (24).



Şekil 2-1: Hematopoetik kök hücrelerden farklılaşarak oluşan miyeloid ve lenfoid seri hücrelerinin gelişimi (24)

Hematopoetik süreç, fetal dönemin erken evrelerinde (4-6. hafta) vitellus kesesinde, 6. haftadan itibaren karaciğerde, 8. haftadan itibaren dalakta, 4-5. aydan sonra kemik iliğinde meydana gelir ve bu dönemden itibaren büyük oranda kemik iliğinde gerçekleşir (25).

Yetişkinlerde kemik iliğinde hematopoetik süreç dokudaki mikroçevreden etkilenir. Mikroçevrede hücre-hücre teması, hormon salgılanması, adipositler gibi hücreler ve mezenkimal stromal hücreler ile olan ilişkiler hematopoetik süreci etkiler (26).

2.2. MİYELODİSPLASTİK SENDROMLAR

Miyelodisplastik sendrom periferik kanda çeşitli seviyelerde sitopeni ve kemik iliği hücrelerindeki yapısal bozukluklar (morfolojik displazi) ile karakterize olan, verimsiz kan hücresi üretimine neden olan hematopoetik kök hücre malinitelerinin heterojen bir grubudur (3).

Hastalık birincil olarak *de novo* veya ikincil olarak iyonlaştırıcı radyasyon, toksinler veya kemoterapötik ilaçlara olan maruziyet nedeniyle ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca olgulara AML'ye dönüşüm riskinin arttığı gösterilmiştir (4).

2.2.1. Epidemiyoloji

MDS'nin Avrupa'da görülme sıklığı (insidansı) 3-20/100.000 civarındadır. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde her yıl 10.000'den fazla yeni tanı konmaktadır ve tüm hastaların ortalama yaşı 70'in üzerindedir. ABD'de tüm popülasyonda insidansı 3-4/100.000 civarında iken 70 yaş üstü hastalarda rastlanma sıklığı 30/100.000 kadardır (27). Erkeklerde kadınlara göre daha sık görülmekle birlikte yaşa bağlı olarak arttığı ve çocuklarda nadir görüldüğü bilinmektedir (7).

2.2.2. Tanı

MDS, ileri yaştaki hastalarda sitopeni varlığıyla akla gelen hastalıklardandır ancak öncelikle sitopeniye neden olabilecek vitamin eksikliği, otoimmün hastalıklar, ilaç kullanımı, viral enfeksiyonlar, karaciğer hastalıkları, çevresel toksinlere maruziyet, aplastik anemi gibi durumlar dikkatlice incelenmeli ve sonra dışlanmalıdır. Ardından anamnez, fiziki muayene ve periferik yayma bulguları, kemik iliği aspirasyonundan sitogenetik ve moleküler genetik incelemelerle elde edilen sonuçlar hastalıkla uyumlu ise kesin tanı konulmalıdır (28).

Hastalarda tipik olarak tekrarlayan ve nedeni belirlenemeyen sitopeniler gözlenir. Olguların %30'unda trombosit sayısında azalma (trombositopeni), %40'ında nötrofil sayısında azalma (nötropeni), %80'inden fazlasında ise kansızlık (anemi) gözlenir (8).

Kemik iliği analizinde miyeloid serinin displastik kabul edilmesi için miyeloid seriden (eritroid, granülositik, megakaryositik) en az birinin hücrelerinin %10'dan fazlasının displazi göstermesi gerekir. Periferik kanda az sayıda, %5'i nadiren geçen, blast denilen olgunlaşmamış hücreler gözlenebilir. Blast sayısının doğru tespiti için kanda en az 200 hücre, kemik iliğinde en az 500 çekirdekli hücre sayılmalıdır (29).

Konvansiyonel sitogenetik analizlerde hastaların %40-50'sinde anomali gözlenir. Hastalığa özgü olarak yaygın gözlenen del(5q), del(7q), +8, del(20q), del(17p)

gibi anomaliler konvansiyonel sitogenetik yöntemlerle veya spesifik problemler kullanılarak floresan in situ hibridizasyon (fluorescent in situ hybridization-FISH) metodu ile incelenir ve tanıda önemli bulgu oluşturur (3).

Tüm bulgular bir araya geldiğinde en az bir miyeloid seri hücre tipinde altı aydan uzun süren ve başka nedenlerle dışlanamayan sitopeniye ek olarak; en az bir hücre serisinde hücrelerin %10'undan fazlasında displazi veya en az %15 halka sideroblast bulunması, tipik sitogenetik bulguların gözlenmesi, kemik iliğinde %5-19 blast sayılması kriterlerinden en az birisi bulunuyorsa minimum tanısal kriterler sağlanmış olur (10).

2.2.3. Etiyoloji

De novo MDS olguları direkt bir etiyolojiyle ilişkilendirilemese de MDS'de radyasyon ve benzeri gibi çevresel etkenlerin kolaylaştırıcı neden olduğu düşünülmektedir. Yetişkinlerde kalıtsal bir bozukluğa sonrası gelişen MDS nadir olsa da çocukluk çağında gözlenen MDS'lerde genellikle kalıtsal bir bozukluk (Down sendromu, Fanconi anemisi, Nörofibromatoz vb.) hastalığa eşlik etmektedir. Sekonder MDS'lerde kemoterapi tedavisi, radyoterapi maruziyeti, sigara kullanımı gibi çevresel faktörler hastalıkla ilişkili olabilmektedir. Tarım ve sanayi sektöründe çalışanlarda vaka sayısının arttığı tespit edilmiştir. Hastalığın yaş ilerledikçe görülmesinin artması kemik iliği hücrelerinde içsel ve çevresel nedenlerin bir arada kümülatif hasar oluşturabileceğini düşündürmektedir (5, 6).

2.2.4. Klinik Seyir

MDS'lerin yaklaşık %70'inde ilerleyen tipte (progresif) sitopeniler etkindir ve sitopeninin ilerleme hızı mortaliteyi değiştirir. Hastaların yaklaşık %50'sinde ölüm nedeni kemik iliğinin yetersiz işlevine bağlı komplikasyonlar iken, diğerlerinde ölüm nedeni MDS harici hastalıklardır. Hastaların %30'unda ise akut miyeloid lösemiye dönüşüm gözlenir. MDS'ye sekonder olarak gelişen AML klasik kemoterapi yöntemlerine cevap vermemektedir (28).

Kromozomal anomaliler de klinik seyrin belirlenmesinde önemli belirteçlerdir. MDS'de sık gözlenen sitogenetik anomalilerin prognoza etkisi Tablo 2-1'de gösterilmiştir (30).

Tablo 2-1: MDS’de kromozomal anomali bulgularının prognoza etkisi (30)

Prognoz	Çok iyi	İyi	Orta	Kötü	Çok kötü
Tek sitogenetik anomali	del(11q) -Y	Normal karyotip der(1;7) del(5q) del(12p) del(20q)	-7/7q- +8 i(17q) +19 +21	der(3)(q21) der(3)(q26)	
İki sitogenetik anomali		del(5q) içeren anomaliler	diğer herhangi iki anomali	-7/7q- içeren ikili anomaliler	
Kompleks karyotip				3 anomali	>3 anomali
Medyan sağkalım süresi (ay)	60,8	48,5	25	15	5,7

MDS heterojen bir hastalık olduğu için prognozda etkili birçok faktör tanımlanmıştır. Sağkalımı ve AML’ye dönüşüm ihtimalini belirlemek için uluslararası risk değerlendirme standardı olarak ‘Uluslararası Prognostik Skorlama Sistemi’ (International Prognostic Scoring System-IPSS) kabul edilmektedir. Bu sistemde kemik iliğindeki blast sayısı, sitopeni durumu, kemik iliği sitogenetik sonuçları skorlama yöntemi kullanılmaktadır (11, 12).

Bu sisteme göre Tablo 2-2’de verilen kemik iliğindeki blast yüzdesi, karyotip analizi, sitopeni durumu değerlendirilerek puanlandırılır. Ardından bu üç kriterdeki puanlar toplanıp prognoz skoru hesaplanır. Skor sonuçlarına göre düşük, orta-1, orta-2 ve yüksek risk olmak üzere 4 risk grubu belirlenmiştir. Tablo 2-3’de bu risk gruplarında skor değerlendirmesi verilmiştir (7, 31).

Çalışmalar hastalıkta 60 yaş üstündeki hastalarda düşük ve orta-1 risk grubunda genel sağkalımın olumsuz etkilendiğini, kadınlarda ise düşük risk grubunda sağkalım süresini uzattığını göstermiştir (11).

Tablo 2-2: Uluslararası Prognostik Skorlama Sistemi (IPSS) (7, 31)

Kemik İliğindeki Blast Yüzdesi		Karyotip		Sitopeni Durumu*		Prognoz Skoru Değerlendirmesi	
Yüzde	Puan	Sonuç	Puan	Sitopeni	Puan	Risk	Puan
<5	0	Normal	0	Sitopeni yok	0	Düşük risk	0
5-10	0,5	7. kromozom anomalisi	1	Bir hücre tipinde	0	Orta-1 risk	0,5-1
11-20	1,5	3 veya daha fazla anomali	1	İki hücre tipinde	0,5	Orta-2 risk	1,5-2
21-30	2	Diğer anomaliler	0,5	Üç hücre tipinde	0,5	Yüksek risk	2,5-3

*Hgb<10 g/dL, mutlak nötrofil sayısı<1800/μL, PLT<100,000/μL

Tablo 2-3: IPSS'ye göre skor değerlendirme (7, 31)

	Skor	Medyan Sağkalım (yıl)	AML'ye Dönüşüm Süresi (yıl)	Hasta Oranı
Düşük	0	5,7	9,4	%33
Orta-1	0,5-1	3,5	3,3	%38
Orta-2	1,5-2	1,2	1,1	%22
Yüksek	2,5-3	0,4	0,2	%7

IPSS'de zamanla revize edilerek daha kapsamlı sistemler oluşturulmuştur. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ, World Health Organization-WHO), MDS'yi kategorilere ayırarak IPSS'ye ek olarak daha ayrıntılı sitogenetik özellikler, eritrosit transfüzyonu bağımlılığı gibi etkenleri de ekleyerek WPSS'yi (WHO Classification Based Prognostic Scoring System) oluşturmuştur. Bu sisteme göre risk grupları 'çok düşük, düşük, orta, yüksek, çok yüksek' şeklinde beşe ayrılmıştır (32).

Ardından 'Gözden Geçirilmiş Uluslararası Prognostik Skorlama Sistemi (Revised International Prognostic Scoring System-IPSS-R) oluşturulmuştur. IPSS-R'de sitopenilerin derinliği, kemik iliği blast oranları, 16 özgün sitogenetik anomali durumu değerlendirilerek skorlama sistemi geliştirilmiştir (Tablo 2-4 ve Tablo 2-5) (33).

Tablo 2-4: ‘Gözden Geçirilmiş Uluslararası Prognostik Skorlama Sistemi’ne göre kriterler (33)

Kemik İliği Blast Yüzdesi
0 puan- <%2
1 puan- %2,1-%4,9
2 puan- %5-%10
3 puan- >%10
Hemoglobin (g/dL)
0 puan- >10
1 puan- 8,9-9
1,5 puan- <8
Trombosit Sayısı (*10⁹/L)
0 puan- >100
0,5 puan- 50-100
1 puan- <50
Nötrofil Sayısı(*10⁹/L)
0 puan- ≥0,8
0,5 puan- <0,8
Sitogenetik İnceleme
0 puan- Çok iyi [-Y, del(11q)]
1 puan- İyi [normal, del(5q), del(12p), del(20q), del (5q)’nun dahil olduğu iki anomali]
2 puan- Orta [del(7q),+8,+19,i(17q), diğer herhangi bir tek veya çift bağımsız klon]
3 puan- Kötü [-7, inv(3q)/t(3q)/del(3q), -7/del(7q) dahil olmak üzere iki anomali, üç anomalili kompleks karyotip]
4 puan- Çok kötü [>3 anomali içeren kompleks karyotip]
Skorlama*
≤ 1,5 puan Çok Düşük Risk
2-3 puan Düşük Risk
3,5-4,5 puan Orta Risk
5-6 puan Yüksek Risk
>6 puan Çok Yüksek Risk

*Tüm kategorilerden alınan puanlar toplanır.

Tablo 2-5: IPSS-R risk kategorilerine göre sağkalım ve AML transformasyon süreleri (33)

	Skor	Medyan Sağkalım (yıl)	Hastaların %25'inde AML'nin Geliştiği Medyan Süre (yıl)
Çok Düşük Risk	≤ 1,5	8,8	-
Düşük Risk	2,0-3,0	5,3	10,8
Orta Risk	3,5-4,5	3	3,2
Yüksek Risk	5,0-6,0	1,6	1,4
Çok Yüksek Risk	>6,0	0,8	0,73

Skorlama sistemlerinde genel kriterler değerlendirilirken MDS'de akım sitometrisi bulguları, mutasyonlar, sub-mikroskopik anomaliler, gen ifade düzeylerinde meydana gelen değişiklikler, miRNA ifade düzeyleri, epigenetik değişiklikler, telomeraz etkinliği gibi etmenlerin de prognoza etkisinin olduğu düşünülmektedir (11).

2.2.5. Sınıflandırma

MDS'nin sınıflandırılmasında DSÖ ve Fransız, Amerikan, İngiliz (French, American, British-FAB) sistemleri kullanılmaktadır. FAB 1982 sınıflandırmasına göre morfolojik bulgular göz önüne alınırken, DSÖ 2016 sınıflandırmasında displazi derecesi ve blast yüzdesi ön planda tutulmaktadır (34, 35).

2.2.5.1. FAB Sınıflandırması

Bu sistemde kemik iliği biyopsisinden elde edilen morfolojik özellikler temel alınmıştır (Tablo 2-6) (34).

Tablo 2-6: FAB sınıflandırmasına göre MDS alt tipleri (34)

MDS Tipi	Periferik Kan Bulguları	Kemik İliği Bulguları	AML'ye Dönüşüm yüzdesi	Ortalama Sağkalım (ay)
Refrakter Anemi (RA)	Blast <%1	Blast <%5	10-20	30-65
Halka Sideroblastlı Refrakter Anemi (RARS)	Blast <%1	Blast <%5 ve halka sideroblast >%15	10-35	34-83
Artmış Blastlı Refrakter Anemi (RAEB)	Blast <%5	Blast %5-%20	>50	8-18
Transformasyondaki Artmış Blastlı Refrakter Anemi (RAEB-T)	Blast >%5	Blast %20-%30 veya Auer çubuğu görülmesi	60-100	4-11
Kronik Miyelomonositik Lösemi (KMML)	Monositler >1*10 ⁹ /L	Blast >%20	>40	15-32

2.2.5.2. DSÖ Sınıflandırması

DSÖ, 2001 yılında MDS için yeni bir sınıflandırma yapmıştır. Bu sınıflandırmada FAB'dan farklı olarak AML'ye dönüşüm için blast sayısı yüzdesi %20'ye indirilmiştir, RAEB-T kategorisi sistemden çıkarılmıştır. "Fazla blastlı refrakter anemi" (Refractory Anaemia with Excess Blasts-RAEB) sınıfı tip-1 (RAEB-1) ve tip-2 (RAEB-2) olarak yeniden düzenlenmiştir. 'Birden çok dizide displazili refrakter anemi' (refractory cytopenia with multilineage dysplasia-RCMD) ve yaygın gözlenen 5q delesyonu için 'İzole del(5q) ile ilişkili MDS' gibi yeni kategoriler eklenmiştir. Kronik Miyelomonositik Lösemi (KMML) kategorisi ise Miyelodisplastik Sendrom/ Miyeloproliferatif Hastalık (MDS/MPH) adı altında yeniden sınıflandırılmıştır. Tedaviye sekonder gelişen MDS'ler ise AML sınıflandırmasına alınmıştır (36).

Ardından 2008 yılında revize edilen yeni bir sınıflama sunulmuştur. Bu sınıflamada 'Tek dizide displazili refrakter sitopeni (Refractory Cytopenia with Unilineage Dysplasia-RCUD)' ve 'Çocukluk çağı refrakter sitopeni' kategorileri eklenmiştir. Sekonder MDS'ler, tedaviye sekonder AML ile birlikte 'AML ile ilişkili neoplaziler' adı altında 'tedaviyle ilişkili miyeloid neoplaziler' olarak yeni bir başlık olarak sınıflandırılmıştır (29).

Güncel olarak 2016 yılında DSÖ tarafından yeni bir sınıflandırma yayınlanmıştır. Bu sınıflandırmadaki temel farklılık displazi derecesine ve blast yüzdesine ağırlık verilmesi ve sitopenilerin vurgulanmamasıdır. Çünkü anlamlı derecede displazisi olan hücrelerde sitopenilerin her zaman pozitif örtüşmediği görülmüştür. Bu nedenle 'refrakter sitopeni' gibi isimlendirmeler kaldırılmıştır. Her kategori 'MDS-' ön adıyla başlatılmıştır. *SF3B1* mutasyonunun halka sideroblastlarla bağlantısı belirlenmiştir. *SF3B1* mutasyonu bulunan olgularda halka sideroblastlar çekirdekli eritroid hücrelerin %5 ve üzerinde görüldüğü takdirde MDS-RS olarak sınıflandırılmıştır. Mutasyon bulunmayanlarda ise halka sideroblastların %15' den fazla olması bu sınıfa dahil edilme koşulu olmuştur. Tablo 2-7'de 2016 DSÖ MDS sınıflandırması ayrıntılı olarak gösterilmiştir (35).

Tablo 2-7: DSÖ 2016 MDS Sınıflandırması (35)

MDS Alt Tipi	Displazi gösteren hücre serisi sayısı	Sitopeniler*	Halka sideroblast yüzdesi**	Blast yüzdesi***	Karyotip durumu
Tek seride displazili MDS (MDS-SLD)	1	1 veya 2	<%15/<%5****	Kİ <%5, PK <%1, Auer çubuğu yok	del(5q)'lu MDS'yi dışlayan sitogenetik anomali
Birden çok seride displazili MDS (MDS-MLD)	2 veya 3	1-3	<%15/<%5****	Kİ <%5, PK <%1, Auer çubuğu yok	del(5q)'lu MDS'yi dışlayan sitogenetik anomali
Halka sideroblastlı MDS (MDS-RS)					

Tek seride displazili MDS-RS (MDS-RS-SLD)	1	1 veya 2	$\geq 15\%$ $\geq 5\%$ ****	Kİ $< 5\%$, PK $< 1\%$, Auer çubuğu yok	del(5q)'lu MDS'yi dışlayan sitogenetik anomali
Birden çok seride displazili MDS-RS (MDS-RS-MLD)	2 veya 3	1-3	$\geq 15\%$ $\geq 5\%$ ****	Kİ $< 5\%$, PK $< 1\%$, Auer çubuğu yok	del(5q)'lu MDS'yi dışlayan sitogenetik anomali
İzole del(5q) MDS	1-3	1-2	Herhangi bir değer	Kİ $< 5\%$, PK $< 1\%$, Auer çubuğu yok	Tek başına del(5q) veya -7 ya da del(7q) dışında ek bir anomaliyle birlikte
Artmış blastlı MDS (MDS-EB)					
MDS-EB-1	0-3	1-3	Herhangi bir değer	Kİ $5\%-9\%$ veya PK $2\%-4\%$, Auer çubuğu yok	Herhangi biri
MDS-EB-2	0-3	1-3	Herhangi bir değer	Kİ $10\%-19\%$ veya PK $5\%-19\%$ veya Auer çubuğu	Herhangi biri
Sınıflandırılmamış MDS (MDS-U)					
Kanda blastları %1 olan	1-3	1-3	Herhangi bir değer	Kİ $< 5\%$, PK $= 1\%$ ****, Auer çubuğu yok	Herhangi biri
Tek dizide displazisi ve pansitopenisi olan	1	3	Herhangi bir değer	Kİ $< 5\%$, PK $< 1\%$, Auer çubuğu yok	Herhangi biri
Tanımlayıcı sitogenetik anomaliye bağlı olan	0	1-3	$< 15\%$ *****	Kİ $< 5\%$, PK $< 1\%$, Auer çubuğu yok	MDS tanımlayıcı anomaliler
Çocukluk çağı refrakter sitopeni	1-3	1-3	yok	Kİ $< 5\%$, PK $< 2\%$	Herhangi biri

*hemoglobin, < 10 g/dL; trombosit sayısı, $< 100 \times 10^9/L$; ve mutlak nötrofil sayısı, $< 1,8 \times 10^9/L$

**Kemik iliğindeki eritroid hücrelerde

*** Kemik iliğinde ve periferik kanda

****SF3B1 mutasyonu varsa

*****Periferik kanda %1 oranındaki blastlar ikiden fazla ayrı durumda kaydedilmelidir

***** $\geq 15\%$ halkalı sideroblast oranı olan hastalar MDS-RS-SLD olarak sınıflandırılırlar.

2.2.6. MDS'nin Patogenezi ve Genetiği

MDS, hematopoetik kök hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasındaki bozukluklarla karakterize bir hastalıktır. Miyeloid seri kök hücrelerindeki neoplastik dönüşüm miyelodisplaziye neden olur. Bu dönüşümde pek çok genetik etmenin etkili olabileceği düşünülmektedir (6).

MDS olgularında kemik iliği hiperselüler veya normoselüler olsa da periferik kanda sitopeniler gözlenir. Bu durum da apoptozun artışına bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Yapılan çalışmalarda olguların kemik iliğinde CD34⁺ hücrelerinde pro-apoptotik sitokinlerin miktarı anti-apoptotik sitokinlerin miktarından yüksek düzeyde çıkmıştır (6, 28).

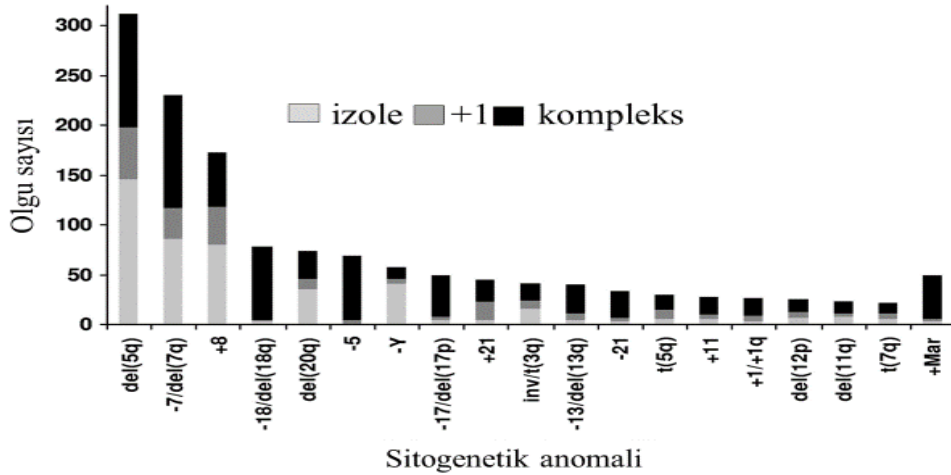
MDS’de sitogenetik anomaliler, mutasyonlar, gen ifade oranlarında değişim sık gözlenen genetik bozukluklardır (37).

2.2.6.1. MDS’nin Sitogenetiği

MDS olgularının %40-50’sinde sitogenetik anomali gözlenmektedir ve sitogenetik bulgular hastalığın prognozu hakkında önemli bilgiler vermektedir. IPSS’ de hastalığın prognozunu belirlenmesinde sitogenetik skorlamayı kullanmaktadır. MDS’de yaygın ve nadir sitogenetik anomaliler bilinse de bu anomalilerin etkilediği olası belli genler henüz aydınlatılamamıştır ve bu konuda çalışmalar devam etmektedir (38).

De novo veya sekonder MDS’li olgularda en sık rastlanan anomali kromozomal delesyonlardır. Bu delesyonlar genellikle 5q, 7q, 20q, 11q, 13q, 12p ve 17p bölgelerinde gözlenmektedir. Kromozomal delesyonlardan sonra monozomi, trizomi ve dengesiz translokasyonlar sıktır. 5. ve 7. kromozomlar ile Y kromozomunda monozomi sık gözlenirken 8. kromozomun trizomisi yaygındır. Üç ya da daha fazla anomalinin gözleendiği kompleks karyotipler kötü prognozla ilişkilendirilmektedir (3, 28, 39).

2072 MDS hastasıyla yapılan bir çalışmadaki sitogenetik anomalilerin frekansları Şekil 2-2’de verilmektedir (40).



Şekil 2-2: 2072 MDS’li olguda yapılan sitogenetik çalışmada tespit edilen anomaliler (40)

a. del(5q) Anomalisi

5. kromozomun uzun kolunda meydana gelen delesyonlar, MDS'de en sık rastlanılan kromozomal anomali olup, tanı alan hastaların %15'inden fazlasında gözlenmiştir. del(5q) içeren MDS'ler heterojen klinik özellik gösterirler ve tedavi ile prognoz açısından iki büyük sınıfa ayrılırlar. Bir grup sitotoksik kemoterapi ve/veya radyasyona maruziyet sonrasında ortaya çıkar ve sıklıkla ek kromozomal anomalilerle birlikte TP53 mutasyonu içerirler. Bu alt grupta lösemik dönüşüm olasılığı artmıştır ve genel sağkalım süresi daha kısadır. İzole 5q delesyonu taşıyan grup ise diğer grubun aksine daha iyi prognoz gösterir ve lösemik dönüşüm olasılığı düşüktür. 5q kromozomuna özgü delesyonlar prognozu belirlemede önemli bir ölçüttür. Çalışmalar bu bölgede bulunan özgün genlerin kaybının hastalığa etkisini aydınlatma yönünde ilerlemektedir (38).

b. Monozomi 7 ve del(7q) Anomalileri

7. kromozom anomalileri primer MDS'de vakaların yaklaşık %10'unda, sekonder MDS'lerde ise %50'den fazlasında gözlenmiştir (40, 41). 7. kromozom anomalileri MDS'de ve AML gibi diğer miyeloid malinitelerde, daha kötü prognoz ve azalmış genel sağkalım süresiyle pozitif olarak örtüşmektedir (12). 7. kromozom delesyonlarında kaybolan bölge genellikle çok büyüktür ve bu bölgede bulunan genlerin haplo-yetersizliği MDS patogenezinde rol oynar (42).

c. Trizomi 8 Anomalisi

Trizomi 8 de MDS'de sık saptanan anomalilerden biridir, izole +8 hastaların yaklaşık %5'inde gözlenir ve orta derece prognoz riski taşır (38). Yapılan çalışmalarda trizomi 8 CD34+ hücrelerde gözlenmezken miyeloid öncül hücrelerde gözlenmiştir. Bu da anomalinin hastalığın patogenezinin geç evrelerinde ortaya çıktığını göstermektedir. Trizomi 8 içeren hücrelerde anti-apoptotik protein ifade seviyeleri artmaktadır ve bu nedenle de apoptotik sinyallere yüksek direnç gösterdiği ortaya konmaktadır (43, 44).

d. Cinsiyet Kromozomu Anomalileri (-Y, -X)

Cinsiyet kromozomu kaybı yaşa bağlı olarak ortaya çıksa da hematolojik malinitelerle de ilişkilidir (45).

MDS'de izole Y kromozomu kaybı çok iyi prognoz sınıfındadır. Ancak Y kromozomu kaybı yaşlanmayla birlikte ortaya çıktığından ve MDS görülme sıklığı da yaşla birlikte arttığından MDS ve Y kromozomu kaybı arasındaki ilişki tam olarak aydınlatılamamıştır. Bununla birlikte Y kromozomu kaybının miyeloid bozukluklarda tedavi öncesinde gözlenmesi, bu durumun patogeneze etkisinin olduğunu ve akut lösemiye dönüşüm sırasında normal karyotipin tekrar ortaya çıktığını düşündürmektedir (38). 2072 MDS hastasıyla yapılan sitogenetik çalışmada izole Y kromozomu kaybı hastaların %4'ünde gözlenmiştir (Şekil 2-2) (40).

Kadın hastalarda X kromozomu kaybıysa görece çok daha nadir gözlenmektedir ve orta derece prognozla ilişkilendirilmiştir (38). Turner sendromlu hastalarda ise MDS'ye veya diğer hematolojik malignitelere karşı artmış bir risk gözlenmemiştir (46).

e. 3q Anomalileri

Delesyon, translokasyon ve inversiyon gibi 3q anomalileri MDS'de çok nadir gözlenirse de kısa sağkalım süresi nedeniyle kötü risk özelliği olarak sınıflandırılır. inv(3q) ve t(3;3)(q21;q26) genellikle 3q26 lokusundaki *MECOM* genini etkiler. Bunun sonucunda EVI1 proteini aşırı ifade edilir ve hematopoetik progenitörlerde kontrolsüz çoğalmaya ve farklılaşmada bozulmaya neden olur (38).

f. Trizomi 13, del(13q) Anomalileri

Trizomi 13 MDS'de yaygın olmayan ancak AML'de sıklıkla gözlenen tekrarlayan bir anomalidir (olguların %1-2'sinde). +13, genellikle aşırı blastları ve orta şiddetli pansitopenisi (tüm kan hücrelerinin sayısının aynı anda azalması) olan ilerlemiş MDS'de gözlenir ve zayıf riskli sitogenetik özellik olarak sınıflandırılır. Trizomi 13, ileri yaştaki erkeklerde gözlenir (38).

del(13q), sadece özellikle lenfoid hücrelerin bulunduğu hematolojik malinitelerde (kronik lenfositik lösemi (KML), multiple miyeloma (MM) gibi) değil, miyeloid hastalıklarda da gözlenir (45). Trizomi 13'ün aksine del(13q) MDS vakalarının %2'sinde gözlenir. Hücre döngüsü kontrolü ve hücrel farklılaşmadan sorumlu *RB1* tümör baskılayıcı geni de del(13q) bölgesinde yerleşiktir. Bu da tedaviye sekonder MDS ve sekonder AML ile 13q delesyonu arasındaki ilişki için güçlü bir kanıt olabilir (38).

g. Trizomi 21, Monozomi 21 Anomalileri

Trizomi 21 Down Sendromu olarak adlandırılan özellikleri iyi bilinen kalıtsal bir bozukluk olup, AML ile akut lenfoblastik lösemi (ALL) için artmış risk taşımaktadır. Bu kalıtsal hastalığın dışında +21 hematolojik malinitelerde klonal sitogenetik anomali olarak da gözlenmektedir (45, 47). Trizomi 21 MDS olgularında %0,3-0,8 oranında görülen nadir sitogenetik anomalilerdendir. Trizomi 21'li MDS hastalarında klasik olarak hafif anemi, trombositopeniyle birlikte düşük mutlak nötrofil sayımı rapor edilmiştir (12).

Monozomi 21'de MDS'de nadir gözlenen sitogenetik anomalilerdendir. İzole -21 vakaların %0,3'ünde gözlenirken, diğer anomalilere eşlik etme oranı %0,5'dir. Monozomi 21'in prognoza etkisi çalışmaların yetersizliği nedeniyle tam bilinmemekle birlikte orta risk grubunda sınıflandırılmıştır (38).

h. İzokromozom 17q Anomalisi

i(17q) anomalisi orta risk grubunda sınıflandırılmaktadır ve izole i(17q) MDS vakalarının %1'inde gözlenir. *TP53* geni 17p13.1'de yerleşik olup, izokromozom 17q varlığında p kolu kaybolmaktadır. Bir tümör baskılayıcı olan *TP53* geninin kaybı nedeniyle i(17q)'nın MDS patogenezinde rol alabileceği düşünülmektedir (48).

i. del(20q), del(12p), del(11q) Anomalileri

İzole del(12p) ve del(20q) taşıyan MDS hastaları sitogenetik açıdan iyi risk kategorisinde, del(11q) ise iyi prognoz kategorisinde sınıflandırılmaktadır (38).

j. Kompleks Karyotip Durumu

Üç ya da daha fazla kromozom anomalisi içeren durumlara kompleks karyotip adı verilir. Kompleks karyotiplerde genetik materyal kaybı/kazanımı olur. *De novo* MDS'lerde %20, tedaviye sekonder MDS'lerde ise %90 oranında gözlenmektedir. Kompleks karyotip kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (3).

k. Normal Karyotip Durumu

MDS olgularının %30-60'ında normal karyotip gözlenir. Normal karyotip iyi risk grubunda sınıflandırılmıştır. Sağkalım süreleri 3,8 yıldır ve AML'ye dönüşüm ortalama 5,6 yılda gerçekleşir (33).

2.2.6.2. MDS'nin Moleküler Genetiği ve Epigenetiği

Bejar ve ark.'ın MDS'li hastalarla yaptığı çalışmada *ASXL1*, *TP53*, *EZH2*, *ETV6* ve *RUNX1* mutasyonlarının, bilinen genel risk etmenlerinden bağımsız olarak genel sağkalım üzerinde olumsuz etki yaptığını ileri sürmüşlerdir ve bu bulgular daha sonra yapılan çalışmalarla doğrulanmıştır (9).

MDS'de çeşitli genlerde tekrarlayan somatik mutasyonlar rapor edilmiştir ve bu mutasyonların hastalığın gelişimi ve/veya prognozu üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (42).

a. Kırpılma Faktörü Mutasyonları

Papaemmanuil ve ark.'ın yapmış olduğu tüm ekzom dizileme analizinde, bir kırpılma faktör geni olan *SF3B1*'in mutasyonunun MDS'de sık gözlemlendiği bildirilmiş ve düşük risk grubunda sınıflanmıştır. *SF3B1* mutasyonu halka sideroblastla karakterize MDS hastalarının %70'inden fazlasında tespit edilmiştir. *SF3B1* mutasyonu MDS ile güçlü bir şekilde ilişkilendirilmiş ilk gendir (49, 50).

Yoshida ve ark., bilinen *SF3B1* mutasyonuna ek olarak yine kırpılmada görevli *U2AF35* (*U2AF1*), *SRSF2* ve *ZRSR2* genlerinde tüm ekzom dizileme analizi ile mutasyonlar rapor etmiştir (51).

Spliceosome mutasyonları MDS'de %57 gibi bir oranda gözlenmektedir ve hastalığa özgünlüğünün yüksek olduğu gösterilmiştir (42).

b. Epigenetik Düzenleyici Mutasyonlar

Genlerin promotörlerinde bulunan CpG adalarındaki metillenme, majör epigenetik transkripsiyonel kontrol mekanizmasıdır ve insan tümörleriyle lösemilerde sıklıkla düzenlenmesinin bozulduğu görülmüştür. DNA metillenme modellerindeki değişiklikler MDS'de sadece promotördeki CpG adalarında değil aynı zamanda genomun intragenik ve intergenik bölgelerinde ve *enhancer*larda da olabilmektedir. Hücrenin çoğalmasında,

tutunma (adezyon) ve diğer karakteristik özelliklerini kontrol eden genlerdeki hipermetillenme de dahil olmak üzere epigenetik düzenlemelerin MDS'de sık gözlemlendiği belirtilmiştir (52).

DNMT3A, *IDH1/IDH2* ve *TET2* gibi DNA metillenmesini düzenleyen proteinleri kodlayan genler ile, *EZH2*, *ASXL1* ve *UTX* gibi histon işlevinden sorumlu ürünleri olan genlerin MDS'de sıklıkla mutasyona uğradığı gösterilmiştir (42).

TET2 genindeki etkisizleştirici mutasyonlar MDS'de ve miyeloproliferatif neoplazilerde tekrarlayan delesyon ve 4q24 bölgesindeki heterozigotluk kaybı bölgeleri analizlerinde tanımlanmıştır. MDS vakalarının %20'sinde *TET2* geninin mutasyona uğradığı görülmüştür. KMML ve AML başta olmak üzere bütün miyeloid malinitelerde de *TET2* mutasyonu bildirilmiştir (42).

TET2 ifadesi *IDH1* ve *IDH2* tarafından üretilen bir metabolit olan α -ketoglutarat ile düzenlenir. *IDH1* ve *IDH2* mutasyonları MDS vakalarının %5-10'unda rapor edilmiştir ve kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. AML'de *IDH1/2* mutasyonu *TET2* mutasyonu ile birlikte gözlenmiştir. Mutant IDH proteinleri *TET2* proteini ile katalize edilen 5-metilsitozin hidroksillenmesini baskılamaktadır. Mutant *IDH2* geninin veya *TET2* geninin ifadesinin azalması kültürde hematopoetik farklılaşmayı ve artmış öncül hücre belirteç ifadesini bozarak ortak bir pro-lökomojenik etkiyi düşündürmektedir (53, 54).

DNMT3A metil gruplarını DNA'daki CpG adalarına transfer eden bir metil transferaz enzimidir. *DNMT3A*, etkin kromozom bölgelerinin metillenmesinin verimli bir şekilde düzenlenmesi için gereklidir. *DNMT3A* geninin mutasyonları MDS vakalarının yaklaşık %10'unda gözlenmiştir ve sağkalım süresinin azalması ile AML'ye dönüşümün hızlanmasıyla ilişkilendirilmiştir (55).

ASXL1, hematopoetik hücrelerde epigenetik düzenlemede rol oynayan kromatin-bağlayıcı proteini kodlar. MDS'de *ASXL1* mutasyonu vakaların %11-15'inde gözlenir ve kötü prognozla ilişkili olup, AML'ye dönüşümde sık gözlenir (42).

EZH2 bir histon lizin metiltransferaz genidir, miyeloid malinitelerde bir tümör baskılayıcı olduğu düşünülmektedir ve MDS olgularının %5'inde mutasyona uğramış olarak gözlenir. Bu genin mutasyonu azalmış sağkalım süresiyle ilişkilendirilmiştir (9, 56).

c. Sinyal İletimi ve Transkripsiyon Etmen Mutasyonları

RAS sinyal yolağında yer alan genlerden özellikle *NRAS* mutasyonları MDS hastalarında %5-10 oranında görülür. *RAS* mutasyonları kötü prognozla ilişkilendirilse de bu durum yeterli çalışmayla doğrulanmamıştır (57).

Tirozin kinaz kodlayan genlerin mutasyonları MDS'de çok nadir olmakla birlikte MDS/MPN'si, refrakter anemisi, halka sideroblastları ve trombositozu olan hastaların yaklaşık %50'sinde sitoplazmik tirozin kinaz kodlayan *JAK2* geninde V617F mutasyonu bulunmuştur (58).

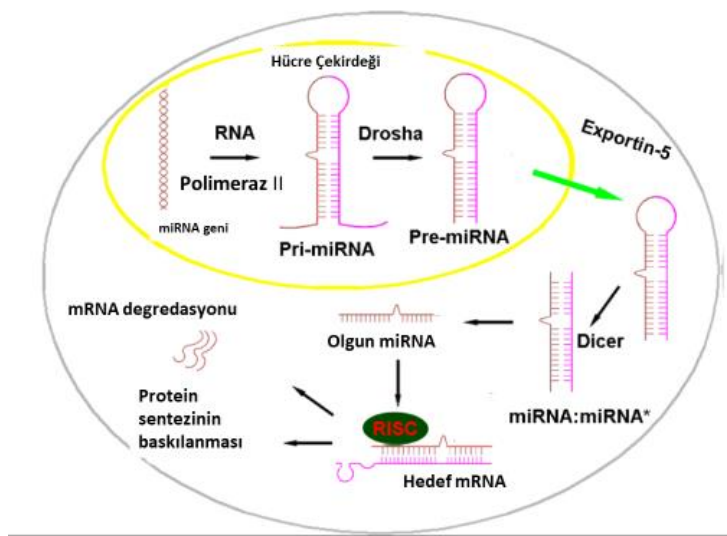
Hematopoezde düzenleyici rolü olan bir transkripsiyon faktörü kodlayan *RUNX1* geninin mutasyonları MDS'de vakaların %10'unda gözlenmiştir. Bir diğer transkripsiyon faktörü geni olan *ETV6*'nın mutasyonu da MDS'de %2-5 oranında gözlenir. Bu iki mutasyon da kötü prognoz göstermektedir (9).

Bir tümör baskılayıcı gen olan *TP53*'ün mutasyonları MDS vakalarında %5-10 oranında gözlenir. *TP53* mutasyonunun genomik instabiliteyi arttırdığı düşünülmektedir ve genellikle 5. kromozom anomalileriyle birlikte gözlenirken kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (59).

2.3. MikroRNA'LAR

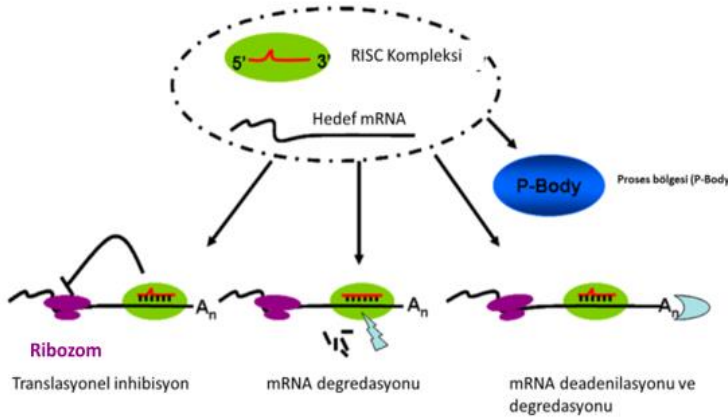
Olgun MikroRNA'lar (miRNA) evrimsel olarak korunmuş, tek zincirli, yaklaşık 19-23 nükleotid uzunluğunda, endojen olarak ifade edilen, protein kodlamayan RNA'lardır ve hayvanlarda, bitkilerde ve bazı virüslerde gen ifadesini post-transkripsiyonel olarak düzenlerler (13, 60).

miRNA'ların biyogenezi Şekil 2-3'de gösterildiği gibi çok basamaklıdır. miRNA'lar, hücre çekirdeğinde intragenik veya intergenik bölgelerden RNA polimeraz II tarafından 1-3 kb'lık primer miRNA (pri-miRNA) olarak transkribe olurlar (61). Pri-miRNA'lar çekirdekte RNaz III enzimi Drosha ve çift zincire bağlanan RNA bağlayıcı proteinler yardımıyla kesime uğrarlar ve yaklaşık 70-100 nükleotidlik *stem-loop* yapısında pre-miRNA'lar oluşur (62, 63). Ardından pre-miRNA'lar çekirdekten sitoplazmaya daha ileri kesimlerin gerçekleşeceği bölgeye Exportin-5 proteini ile taşınır ve RNaz III enzimi Dicer, 18-24 bazlık çift zincirli olgun miRNA:miRNA yapılarını oluşturur (64, 65). Çift zincir ayrıldıktan sonra ipliklerden birisi *RNA ile İndüklenen Susturma Kompleksi (RNA Induced Silencing Company-RISC)*'ne dahil olur. Diğer iplik ise yolcu miRNA adını alır ve sıklıkla yapısı bozulan bu miRNA, miRNA hemostazında düzenleyici rolü oynar (66, 67).



Şekil 2-3: miRNA biyogenezi ve fonksiyonu (14)

RISC'e dahil olan miRNA Şekil 2-4'de görüldüğü gibi hedefi olan mRNA'yla eşleşerek bu mRNA'nın bozunmasını tetikler ya da mRNA'nın translasyon mekanizmasından ayrılmasını sağlayarak translasyonunun baskılanmasına neden olur (68). Hayvanlardaki çoğu miRNA hedefiyle tam eşleşmez bu nedenle translasyonel durdurmada birden çok miRNA görev alabilir (14).



Şekil 2-4: miRNA'ların gen düzenleme mekanizması (14)

Yapılan çalışmalar miRNA'ların erken gelişim, hücresel farklılaşma, proliferasyon, apoptoz, gelişimsel zamanlama ve hematopoez gibi çok çeşitli biyolojik süreçlerde kritik düzenleyici roller oynadığını göstermiştir. Bu nedenle miRNA'ların ifadesindeki değişiklikler birçok hastalık ile ilişkilendirilmiştir (14).

2003 yılında Michael ve ark., kolon adenokarsinomunda bazı miRNA'ların ifade seviyelerinin değiştiğini görmüş ve ardından birçok kanserde ifadesi değişen miRNA'lar tanımlanmıştır (14, 69).

Protein kodlayan genlerdeki gibi miRNA'larda da ifadesi artan onkogenik miRNA'lar onkomiR, tümör baskılayıcı miRNA'lar TS-miR (Tumor Suppressor-miR) olarak adlandırılır. OnkomiR'ler hücre farklılaşmasını, apoptozu kontrol eden genleri veya tümör baskılayıcı genleri baskılayarak tümör gelişimine neden olurken TS-miR'ler ise onkogenik genleri baskılayarak tümör gelişimine engel olurlar (70).

miRNA kodlayan genlerdeki mutasyonlar, epigenetik modelin bozulması, ifadelerinin artışı veya azalışı ve biyogenezinde görevli enzim veya kofaktörlerin miktarındaki değişiklikler kanserde miRNA etkinliğinin bozulmasına neden olan mekanizmalardır (71, 72).

2.3.1. MDS'de mikroRNA'lar

miRNA'lar hücre farklılaşması ve hematopoezde görevli düzenleyicilerin mRNA'larının translasyonunda görevlidir. Dolayısıyla miRNA'larda meydana gelen değişikliklerin MDS'yi tetikleyici mekanizmalardan olduğu yapılan çalışmalarla desteklenmiştir.

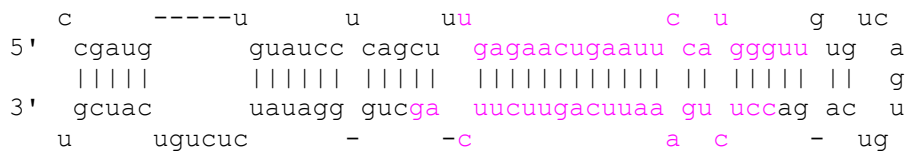
2011 yılında Sokol ve ark.'ın 44 MDS tanılı ve 17 sağlıklı bireye mikroarray yöntemi kullanarak yaptığı çalışmada kontrol grubuyla hastalar arasında 13 miRNA'nın ifadesinin önemli derecede değiştiğini göstermişlerdir ($p<0,01$). 10 miRNA IPSS risk kategorileriyle yakından ilişkili bulunmuştur ($p<0,01$). mir188 ailesi üyelerinin yüksek ifadesi ise kötü prognoz ve AML'ye dönüşümle örtüşmüştür. Çalışmanın sonucunda MDS'de miRNA'ların tanıda ve prognozda önemli yer tuttuğu kabul edilmiştir (73).

MDS'de anomalileri sık gözlenen 5q31-34 bölgesinde, 13 miRNA haritalanmıştır ve mir143, miR-145 ve miR-146a'yı da içeren miRNA'ların del(5q) vakalarında düşük seviyelerde ifade edildiği gösterilmiştir (15). Dahası, izole del(5q) haplo-yetersizliği olan MDS'lerde bu üç miRNA'nın hastalığın karakteristik klinik özelliklerinin ve malin klon baskınlığının gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir (74). Ayrıca yapılan bazı çalışmalarda miR-146a'ya sahip olmayan farelerde ekstramedüller eritropoez, anemi, trombositopeni, lenfopeni ve yaşlandıkça miyeloproliferasyon geliştiği gösterilmiştir (16).

Starczynowski ve ark., hematopoetik kök/progenitor hücrelerde 5q delesyonu sonucu miR-146a ve miR-145 kaybının anlamlı sonuçlar doğurduğunu göstermiş ve çalışmalarını hayvan deneyleriyle desteklemişlerdir. Bu miRNA'ların hedefleri olarak Toll-interlökin-1 reseptör domaini içeren adaptör protein (Toll-interleukin 1 receptor domain adapter protein-TIRAP) ve tümör nekroz faktörü reseptör-ilişkili faktör-6'yı (tumor necrosis associated factor 6-TRAF6) düşünmüşlerdir (17).

2.3.2. MikroRNA-146a

Homo sapiens mikroRNA-146a (hsa-mir-146a) 5q33.1 bölgesinde bulunmaktadır ve pre-miR-146a *stem-loop* yapısındadır (Şekil 2-5)(75, 76).



Şekil 2-5: hsa-mir-146a'nın *stem-loop* yapısı (75, 76)

Stem-loop yapısındaki bu miRNA biyogenez sonucu olgun 22 nükleotidlik yapıya dönüşür (Şekil 2-6)(75, 76).

21-UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU-42

Şekil 2-6: Olgun hsa-miR-146a-5p dizisi (75, 76)

Cheung ve ark.'ın insan fetal femur kökenli iskelet kök hücrelerinde (Skeletal Stem Cells-SSCs) yaptığı çalışmada miR-146a'nın *SMAD2* ve *SMAD3*'ü hedeflediği gösterilmiştir. Artan miR-146a ifadesi *SMAD2* ve *SMAD3*'ün ifadesini engellemiş ve bu genlerin ürünlerinin azalması dolayısıyla TGF- β sinyal yolağı etkinliği azalmıştır.

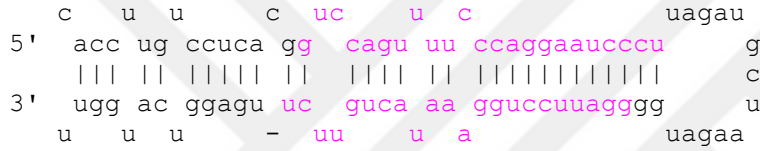
Çalışma bu yolağın iskelet oluşumunda önemli bir rol oynadığını ve kemik onarımı için insan iskelet kök hücre farklılaşma modülasyonundaki etkilerinin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. Şekil 2-7’de miR-146a’nın *SMAD2* mRNA’sını hedeflediği bölge gösterilmiştir (20).

miRNA	3' uuggguaccuuaaguCAAGAGu 5'	Pozisyon 1 – 22
Hedef	5' cgaauagacgguaguGUUCUCa 3'	

Şekil 2-7: miR-146a ile *SMAD2* mRNA’sı arası etkileşim (20)

2.3.3. MikroRNA-145

Homo sapiens mikroRNA-145 (hsa-mir-145) 5q32 bölgesinde bulunmaktadır ve pre-miR-145’in *stem-loop* yapısı Şekil 2-8’de gösterilmektedir (75, 76).



Şekil 2-8: pre-miR-145’in *stem-loop* yapısı (75, 76)

Sitoplazmada olgunlaşan hsa-miR-145-5p, biyogenezi sonucu 23 nükleotidlik Şekil 2-9’da gösterilen diziye dönüşür (75, 76).

16 - GUCCAGUUUUGCCAGGAAUCCCU - 38

Şekil 2-9: Olgun hsa-miR-145-5p dizisi (75, 76)

Fung ve ark., cilt bozukluğu bulunan bir fare modelinde umbilikal korddan türetilmiş mezenkimal kök hücrelerin (umbilical cord-derived Mesenchymal Stem Cells-uMSCs), yara oluşumu ve miyofibroblast birikiminin azaltılmasında işlevsel olduğunu göstermişlerdir. Bu işlevselliğin temelde uMSC’den türetilmiş eksozomlara ve esas olarak eksozomal miRNA’lara (miR-21, -23a, -125b ve -145) bağlı olduğunu bulmuşlardır. Yapılan çalışmada miR-145’in TGF- β 2/SMAD2 yolağı aracılığıyla miyofibroblast oluşumunu baskılamakta görev aldığı gösterilmiştir. Şekil 2-10’da çalışmada elde edilen verilere göre miR-145’in hedef geni *SMAD2* ile eşleşmesi gösterilmiştir (21).

miRNA	3' ucccuaaggacccUUUUGACCUg 5'	Pozisyon 1- 23
Hedef	5' agaaaagacauacAAAACUGGAu 3'	

Şekil 2-10: miR-145 ve *SMAD2* arası etkileşim (21)

2.4. TGF- β SİNYAL YOLAĞI

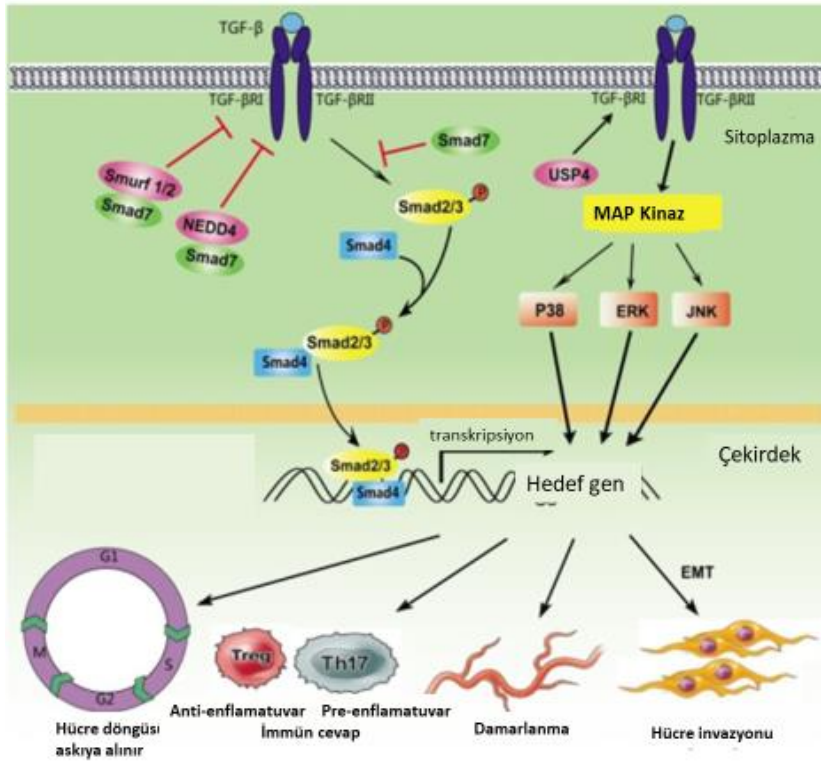
Transforme edici büyüme faktörü-beta (Transforming Growth Factor-beta- TGF- β) sinyal yolağı, hücre gelişiminin düzenlenmesinde ve hücre farklılaşmasında görevlidir. Bu nedenle TGF- β ile ilişkili sitokinlerin hücre çoğalması, farklılaşması, morfogenezi, doku homeostazisi ve yenilenmesi gibi önemli işlevlerde rolü büyüktür ve bu yolla meydana gelebilecek bozukluklar birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir (18).

Belirli bir TGF- β ailesi üyesi için hedef gen sayısı pluripotent embriyonik hücrelerde birkaç tane olabildiği gibi farklılaşmış hücrelerde yüzlerce olabilir. TGF- β 'nın transkripsiyon üzerindeki etkisi hedeflenen gene ve hücre içi içeriğe bağlı olarak etkinleştirici veya baskılayıcı şekilde olabilir. TGF- β 'da SMAD sinyal yolağı, tüm bu gen cevapları için merkezi bir kanaldır (77).

Farklı TGF- β ligandlarının almaçlarının ve düzenleyicilerinin fazlalığı ve etkinliği çekirdekteki sinyalleme üzerinden SMAD işlevini düzenler. Transkripsiyonu düzenlemek için SMAD proteinleri ile iş birliği yapan etkenler vardır. Hücre tipine özgü transkripsiyon etkenleri, TGF- β ve kemik morfogenetik proteini (bone morphogenetic factor-BMP) ile etkileştirilmiş SMAD proteinlerini miyeloblastlar, miyeloid öncül hücreleri ve eritroid öncül hücreleri içinde özgün gen lokuslarına yönlendirir. Farklılaşmış hücrelerde çeşitli transkripsiyon faktörleri SMAD proteinlerini hedeflenen genlerin farklı alt birimlerine gönderebilir. Oluşan SMAD kompleksleri daha sonra transkripsiyonu düzenlemek için kromatin okuyucular, modifiye ediciler ve yeniden biçimlendiricileri çağırır. Tüm bu SMAD ilişkili proteinlerin ortak işlevi hangi genlerin hedefleneceğini ve hangisinin etkinleştirilip hangisinin baskılanacağını belirler (78, 79).

SMAD ailesinin üyeleri işlevlerine göre üç gruba ayrılabilirler; birincisi SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 ve SMAD8'i içeren almaçla düzenlenen SMAD'lar (R-SMAD), ikincisi tek üyesi SMAD4 olan ortak SMAD (Co-SMAD), üçüncüsü SMAD6 ve SMAD7'yi içeren engelleyici SMAD'lar (I-SMAD). R-SMAD'lar membrana bağlı serin/treonin almaçlarına bağlanır ve kinazlarla etkinleştirilir. Co-SMAD (SMAD4) etkin R-SMAD'lara bağlanır ve bu karmaşım (kompleks) nükleusa gidip I-SMAD'lar R-SMAD'ları baskılayarak TGF- β ailesinin sinyalleşmesini negatif yönde düzenler (80).

Gizli öncül olarak adlandırılan latent TGF- β 1, latent TGF- β -bağlayıcı proteine (LTBP) bağlanır. Etkinleşen olgun TGF- β 1, tip I ve tip II hücre yüzeyi almaç komplekslerine bağlanır. Her almaç kompleksi küçük bir sistein açısından zengin hücre dışı bölgeden ve temelde kinaz alanlarından oluşan hücre içi bölgeden oluşur. TGF- β / SMAD yolağında, TGF- β 1, TGF- β almaç II'ye bağlanarak sinyalleşmeyi başlatır. Ardından TGF- β 1, TGF- β almaç tip I kinazını etkinleştirerek SMAD2 ve SMAD3'ü fosforile eder. Etkinleşen SMAD2 ve SMAD3, SMAD4 ile etkileşerek bir kompleks oluşturur. Bu kompleks çekirdeğe göç eder ve SMAD7'yi de dahil ederek hedef genlerin transkripsiyonunu düzenler (Şekil 2-11) (80, 81).



Şekil 2-11: TGF-β / SMAD sinyal yolağı (81)

SMAD2 (ENSG00000175387), 18q21.1'de yerleşik, 122,189 baz çifti uzunlukta, 10 tanesi kodlayan olmak üzere toplam 11 ekzondan oluşan bir gendir (GRCh38.p12).

52,3 kDa moleküler ağırlığı olan 467 amino asit uzunlukta MAD homolog 2 proteinini kodlar (Uniprot ID: Q15796) (Şekil 2-12).

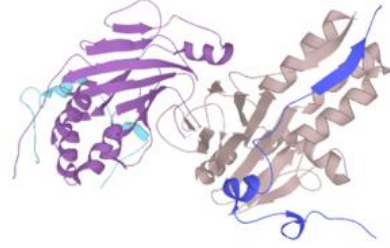
SMAD proteinleri birçok sinyal yolağında transkripsiyonel aracı ve sinyal iletici olarak bulunur. Bu proteinler, hücre çoğalması, apoptoz, farklılaşma gibi çok sayıda hücrel faaliyetlerde bulunan TGF-β sinyal yolağında görevlidir (RefSeq).

SMAD2 kolorektal kanser, meme kanseri, pankreatik kanser gibi birçok kanser türü ile enflamatuvar barsak hastalığı, renal fibroz, obstrüktif nefropati gibi birçok hastalık ve sendromla ilişkilendirilmiştir (MalaCards).

```

10      20      30      40      50
MSSILPFTPP VVKRLLGWKK SAGGSGGAGG GEQNGQEEKW CEKAVKSLVK
60      70      80      90     100
KLKKTGRIDE LEKAITTNQC NTKCVTIPST CSEIWGLSTP NTIDQWDTTG
110     120     130     140     150
LYSFSEQTRS LDGRLQVSHR KGLPHVIYCR LWRWPDLSH HELKAIENCE
160     170     180     190     200
YAFNLKKDEV CVNPYHYQRV ETPVLPPVLV PRHTEILTEL PPLDDYTHSI
210     220     230     240     250
PENTNFPAGI EPQSNYIPET PPPGVISEDG ETSQQQLNQS MDTGSPAELS
260     270     280     290     300
PTTLSPVNHS LDLPVITYSE PAFWCIAIY ELNQRVGETF HASQPSLTVD
310     320     330     340     350
GFTDPSNSER FCLGLLSNVN RNATVENTRR HIGRGVRLYY IGGEVFAECL
360     370     380     390     400
SDSAIFVQSP NCNQRYGWHP ATVCKIPPGC NLKIFNNQEF AALLAQSVNQ
410     420     430     440     450
GFEAVYQLTR MCTIRMSFVK GWGAEYRRQT VTSTPCWIEL HLNGLQWLWD
460
KVLTMGSPS VRCSMS

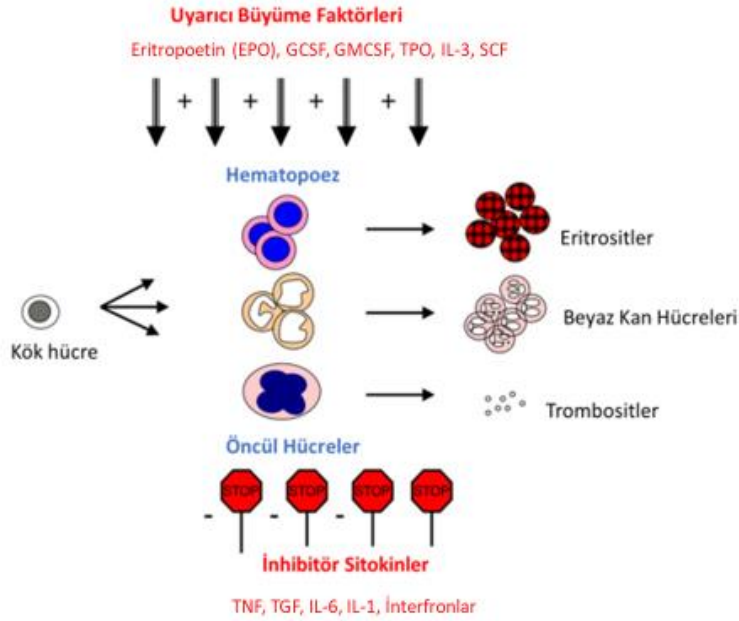
```



Şekil 2-12: SMAD2 proteinin amino asit dizisi ve üç boyutlu yapısı (Uniprot ID: Q15796)

2.4.1. MDS'de TGF- β Sinyalizasyonu

Hematopoezin çeşitli sitokinlerin karmaşık etkileşimleri ile düzenlendiği düşünülmektedir. Eritropoetin (EPO), granülosit koloni uyarıcı faktör (granulocyte colony stimulating factor-G-CSF), granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (granulocyte macrophage-colony stimulating factor-GM-CSF) ile interlökin-3 (IL-3) gibi büyüme etkenleri, miyeloid ve eritroid öncül hücrelerinin farklılaşmasını destekler. Diğer taraftan interferonlar, interlökinler, tümör nekroz faktörü alfa (tumor necrosis factor-alpha-TNF- α) ve TGF- β 'nın hematopoetik kök hücreler üzerinde baskılayıcı etkileri vardır. Bu nedenle baskılayıcı ve uyarıcı sitokinlerin arasındaki dengesizlik miyelosupresyon ve kemik iliği yetmezliğine neden olabilmektedir. MDS'de baskılayıcı sitokinlerin aşırı sinyalleme yaptığı görülmektedir dolayısıyla tedavi için bu yollar potansiyel hedef olmalıdır (Şekil 2-13) (82).



Şekil 2-13: Sitokinlerin hematopoezi düzenleyici etkisi (82)

TGF- β 'nın kök/öncül hücrelerin baskılanması üzerindeki etkisi bilinmektedir. TGF- β almaçlarına bağlanınca hücre içi SMAD2/3 proteinleri etkinleşir. Bu proteinler çeşitli kofaktörlerle etkileşerek çekirdeğe göç eder ve birçok biyolojik etkiye yol açar. TGF- β almaç I kinaz (TBRI) etkinleşmesinin aşağı yolağındaki aracı olan SMAD2'nin MDS'de kemik iliği öncül hücrelerinde yapısal olarak etkinleştiği gösterilmiştir (19).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Materyal

Bu çalışmada 16.11.16 tarihli 414947 sayılı İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi (İÜ CTF) Dekanlığı Klinik Araştırmalar Etik Kurulu kararı ile izin alınmış, 2017-2018 yılları arasında CTF İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı'nda MDS ön tanısı almış 24 hastadan rutin tetkikler için alınan kemik iliği aspirasyon materyalleri çalışılmış ve kontrol grubu olarak sağlıklı 20 kişinin periferik kan örneği incelenmiştir. Çalışma İÜ CTF Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Hastalardan ve kontrol grubundaki sağlıklı bireylerden alınan örnekler, konvansiyonel sitogenetik, gerçek zamanlı polimeraz zincir tepkimesi (GZ-PZT) ve floresan in situ hibridizasyon (FISH) metotları ile incelenmiştir. Konvansiyonel sitogenetik ile hastalarda genel kromozom analizi yapılmış, GZ-PZT metodu ile hsa-miR-146a, hsa-miR-145 ve *SMAD2* ifadeleri kontrol edilmiş ve FISH metodu ile hücrelerde 5q delesyonu varlığı araştırılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Gereçler

- Etüv (Memmert, Almanya)
- Santrifüj (Hettich Rotafix 32A masaüstü santrifüj, Almanya)
- Soğutmalı Mikrosantrifüj (Hettich, Almanya)
- Nanodrop Spektrofotometre (Thermo Scientific, Massachusetts, ABD)
- Otoklav (Hirayama, Japonya)
- Distile Su Cihazı (Nüve, Türkiye)
- PZT cihazı (Bio-Rad CFX96, Kaliforniya, ABD)
- Isı Döngü Cihazı (Applied Biosystems 9700, Kaliforniya, ABD)
- Multiwell Plate (Roche, Basel, İsviçre)
- Vorteks (Dragon Lab MX-S, Pekin, Çin)
- Buzdolabı +4°C (Arçelik 4042 T Plus, Türkiye)
- Derin Dondurucu -80°C (Sanyo, Osaka, Japonya)
- Derin Dondurucu -20°C (Arçelik, Türkiye)
- Hotplate (Selecta, Cham, İsviçre)
- Otomatik Pipet Seti (Capp, Odense, Danimarka)
- Hassas Terazî (Precisa xB 220 A, Dietikon, İsviçre)
- pH çubuğu (Isolab, Wertheim Almanya)
- Manyetik Karıştırıcı (Are Velp Scientifica, Usmate, İtalya)
- Su banyosu (Kottermann Labortechnik, Uetze, Almanya / Memmert, Almanya)
- Işık Mikroskobu (Nikon Eclipse E600, Tokyo, Japonya/ Leica DM 2500, Wetzlar, Almanya)
- Floresan mikroskobu (Olympus Bx51, Tokyo, Japonya)
- Floresan mikroskobu filtreleri: Teksas Kırmızısı, FITC, DAPI

- Görüntüleme Sistemi: Isis FISH programı (Metasystem, Heidelberg, Almanya), Karyotipleme programı Applied Images (Nicon, Tokyo, Japonya) ve Ankagen Karyotyping programı (Leica, Wetzlar, Almanya)
- Hibridizasyon cihazı: ThermoBrite (Abbott, Illinois, ABD)
- Lam: Menzel-Glaser Superfrost ground edges 90 (İngiltere)
- Lamel: Menzel-Glaser 100 Deckglaser (İngiltere)
- Beher
- Erlenmayer
- Mezür
- Balon joje
- PCR toplama tüpleri
- PCR filtreli tüpler
- Eppendorf tüpler (0,5-1,5-2.0 ml, Corning, NY, ABD)
- Pastör pipeti
- Pipet uçları
- Laboratuvar saati
- Enjektör
- Termometre

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- HCl (Merck, Almanya)
- RPMI 1640: Medyum A ve B (Biochrome, Almanya)
- Kolsemid: PBS'te çözülmüş 10µg/ml colsemide solüsyonu (KaryoMAX, Almanya)
- Pepsin (Sigma, Almanya)
- NaCl (Merck, Almanya)
- KCl (Merck, Almanya)
- Na₂HPO₄.2H₂O (Merck, Almanya)
- KH₂PO₄ (Merck, Almanya)
- triNaCitrat.2H₂O (Appli Chem, Almanya)
- Metanol (Merck, Almanya)
- Asetik Asit (Merck, Almanya)
- %96 Ethanol (Merck, Almanya)
- DAPI Antifade II (Cytocell, İngiltere)
- İmmersiyon yağı (Merck, Almanya)
- Ksilol (Merck, Almanya)
- Parafilm (Bemis NA, İngiltere)
- Rubber Cement (Marabu Fixogum, Almanya)

3.1.4. Kullanılan Tamponlar ve Çözeltiler (Solüsyonlar)

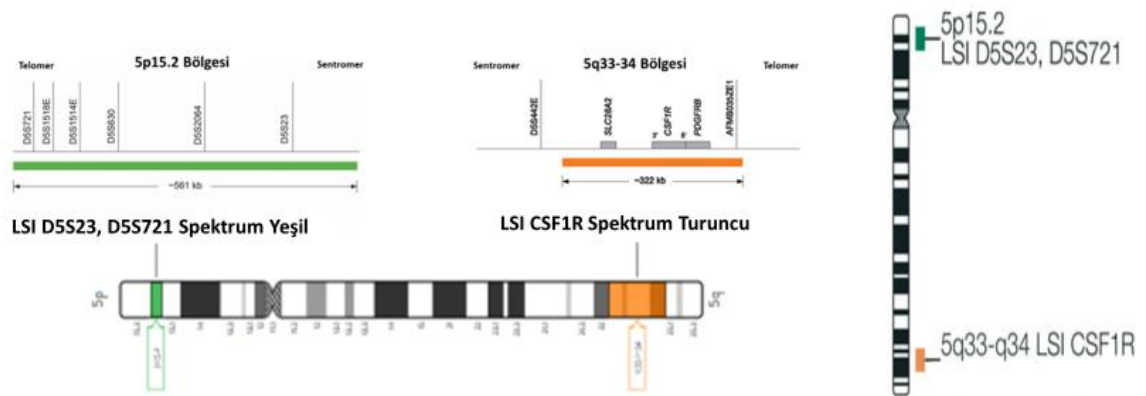
3.1.4.1. Sitogenetik Yönteminde Kullanılan Tamponlar ve Çözeltiler

- **Kültür vasatı:** %20 fetal bovin serum, L-glutamin, penisilin, streptomisin ve phytohemagglutinin içeren RPMI 1640 hazır kromozom medyum (Biochrome F-5023)
- **Kolsemid:** 10 µg/ml kolsemid içeren çözelti (Biochrome L-6221)
- **Hipotonik Şok çözeltisi:** 0,075M KCL çözeltisi
- **Carnoy fiksatif:** Metanol:Asetik Asit (3:1)
- **Tripsin:** %9'luk NaCl çözeltisi içinde 0,15 mg Tripsin çözülerek hazırlanır
- **Salin:** %9'luk NaCl çözeltisi
- **Tampon Çözelti:** 0,025 M KH₂PO₄ çözeltisi (pH:6.8)
- **Leishman Stok Boyası:** 0,3 gr Leishman boyası 200 ml metanol içerisinde çözülerek hazırlanır.
- **Leishman kullanım çözeltisi:** Boya çözeltisi:Tampon çözelti (1:5)

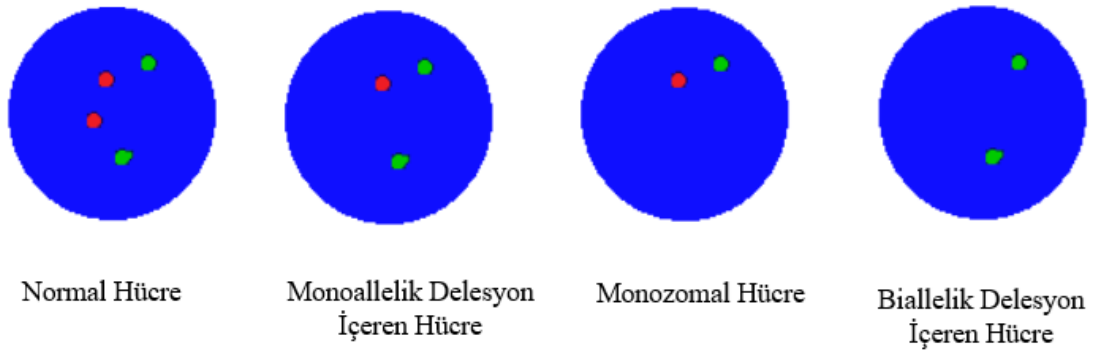
3.1.4.2. FISH Yönteminde Kullanılan Tamponlar ve Çözeltiler

- **Kullanılan FISH Probu:**

Miyeloid malignitelerde 5. kromozomun q kolunda yaygın olarak delesyona uğrayan bölgeler (Commonly Deleted Regions-CDR) tanımlanmıştır. MDS'de ve yaygın alt sınıfı 5q- sendromunda, *CSF1R* genini içeren 1.5 Mb'lık bir CDR bölgesi tespit edilmiştir. Vysis Abbott (Chicago, Illinois, ABD) LSI *CSF1R/D5S23, D5S721* çift renkli probu, yaklaşık 322 kb'lık spektrum turuncu etiketli *CSF1R* probu ile yaklaşık 561 kb'lık spektrum yeşil etiketli *D5S23, D5S721* probunun bir karışımıdır (Şekil 3-1). Normal hücrelerde iki yeşil kontrol bölgesi ve 2 turuncu (TxRed filtrede kırmızı) gen bölgesi gözlenmelidir. Delesyon varlığında sinyallerin durumu Şekil 3-2'de gösterilmektedir (83).



Şekil 3-1: 5q33-34 delesyon probu (83)



Şekil 3-2: İnterfaz FISH yönteminde 5q33-34 probunun olası sinyallerinin gösterimi

- **PBS (Fosfat Tampon Tuzu):**
 - ✓ 0,8 gr NaCl
 - ✓ 0,2 gr KCl
 - ✓ 1,4 gr Na₂HPO₄·2H₂O
 - ✓ 0,2 gr KH₂PO₄

1000 ml distile su (dH₂O)'da çözülür. pH: 6,8'e ayarlanır.
- **20xSSC (Sodyum Sitrat Tuzu):**
 - ✓ 43,8 gr NaCl
 - ✓ 22,05 gr TriSodyum Sitrat Dihidrat (C₆H₅Na₃O₇·2H₂O)

1000 ml dH₂O'da çözülür. pH:6,8'e ayarlanır.
- **2xSSC:**
 - ✓ 50 ml 20xSSC, dH₂O ile 500 ml'ye tamamlanır. pH: 6,8'e ayarlanır.
- **0,4xSSC:**
 - ✓ 10 ml 20xSSC, dH₂O ile 250 ml'ye tamamlanır. PH: 6,8'e ayarlanır.
- **10 nM HCL:**
 - ✓ 0,83 mL konsantre HCL, 1000 ml dH₂O'da çözülerek hazırlanır.
- **Pepsin Çözeltisi:**
 - ✓ 1 gr Pepsin, 50 ml dH₂O'da çözülür.
- **Postfiksasyon Solüsyonu (sabitleme sonrası çözeltisi):**
 - ✓ 1 ml, %1'lik Formamid,
 - ✓ 1,0165 gr MgCl₂·6H₂O, PBS çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlanır.
- **DAPI Tamponu (Buffer):**
 - ✓ 0,178 gr Na₂HPO₄·2H₂O, 100 ml dH₂O'da çözündürülür. (5mg/100ml).
- **DAPI Stok Çözelti**
 - ✓ 1:100 ml DAPI tamponu

- **%70'lik Etanol:**
 - ✓ 70 ml Etanol dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.
- **%85'lik Etanol:**
 - ✓ 85 ml Etanol dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.
- **%100'lük Etanol:**
 - ✓ 100 ml Etanol.

3.1.4.3. Gerçek Zamanlı PZT Yönteminde Kullanılan Tamponlar Ve Çözeltiler

- **RBC Lizis Çözeltisi (10X)**

- ✓ 8,02 gr NH₄Cl
- ✓ 0,84 gr NaHCO₃
- ✓ 0,37 gr EDTA

100 ml'e dH₂O ile tamamlanır. 10 ml 10X RBC alınıp üzerine 90 ml dH₂O eklenerek 1X RBC Lizis çalışma çözeltisi elde edilir.

- **Primerler:**

hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-145-5p ve U6 snRNA primerleri Bioline (Londra, İngiltere) firmasından temin edilmiştir.

SMAD2 ve ACTB primerleri Sentegen Biotech (Ankara, Türkiye) firmasından sipariş edilmiştir. Primerlerin dizisi Tablo 3-1'de verilmiştir.

Tablo 3-1: Kullanılan primerlerin dizileri

Amplikon	Forward Primer	Reverse Primer
SMAD2	5'-ACCGAAATGCCACggTAgAA-3	5'-TggggCTCTgCACAAAgAT-3'
ACTB	5'-CATTgCTgACAggATgCAGAAggAg-3'	5'-CCTgCTTgCTgATCCACATCTgCTg-3'

- **Total Ribonükleik Asit (RNA) Eldesinde Kullanılan Kimyasallar** (Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research, Kaliforniya, ABD))
 - ✓ Trizol çözeltisi
 - ✓ RNA ön yıkama tamponu
 - ✓ RNA yıkama tamponu
 - ✓ DNaz I
 - ✓ DNA parçalama tamponu
 - ✓ DNaz-RNaz içermeyen su

- **MikroRNA (miRNA) Eldesinde Kullanılan Kimyasallar**
(EPIK™ miRNA Select Kit (Bioline, Londra, İngiltere))
 - ✓ 5X RT tampon
 - ✓ Ters Transkriptaz enzimi (Reverse Transcriptase (RT))
 - ✓ SYBR Master Mix
 - ✓ Nükleaz içermeyen Su
- **Komplementer DNA (cDNA) Dönüşümünde Kullanılan Kimyasallar**
(SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit (Bioline, Londra, İngiltere))
 - ✓ 5X TransAmp Tampon
 - ✓ Ters Transkriptaz enzimi
- **Gerçek Zamanlı PZT’de Kullanılan Kimyasallar**
(SensiFAST™ SYBR No-ROX Kit (Bioline, Londra, İngiltere))
 - ✓ SYBR Green mix

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Konvansiyonel Sitogenetik Metodu

Hematolojik malinitelerde spesifik kromozom anomalilerinin incelenmesi, birincil ve ikincil değişikliklerin belirlenmesi, kırık noktalarının tespiti, anomali olan bölgelerde ifadesi değişen ya da delesyona uğrayan genlerin tanımlanması sitogenetik tetkiklerin temel amaçlarındandır. Sitogenetik sonuçları hastalığın tanısında, prognozunda, tedavinin düzenlenmesinde ve takibinde önemli parametrelerdir (84).

Çekirdeği olan ve bölünebilen tüm hücreler sitogenetik incelemede kullanılabilir. Rutinde sıklıkla kemik iliği, perifer kanı, amniyon sıvısı, koryon villus hücreleri kullanılır. Mitotik etkinliği yüksek olan kemik iliği gibi dokulara doğrudan yöntem kullanılabilir. Perifer kanı, amniyositler gibi dokularda kültür işlemi yapılır. Periferik kan için 72 saatlik kültür uygulanırken, kemik iliği için genellikle 24 ve 48 saatlik kültür işlemi yapılır. Kültür saatinin dolmasına yakın hücreleri metafaz evresinde durdurmak amacıyla kolşisin kullanılır. Kolşisin iğ ipliklerini bloke ederek etki gösterir. Ardından hipotonik şok ile hücre şişirilir, fiksasyon ve yıkama işlemleri uygulanır, uygun nem ve sıcaklıkta yayma preparatlar hazırlanır. Kromozomları bantlamak için sıklıkla Giemsa-Tripsin-Giemsa (GTG) ya da Giemsa-Tripsin-Leishman (GTL) yöntemleri kullanılır. İdeal bant seviyesi 400 üzerinde olmalıdır. Elde edilen bulgular ‘*International System of Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN 2016)’e göre değerlendirilir (85).

Çalışmamızda konvansiyonel sitogenetik metodu, hastalarda bulunan tüm kromozom anomalilerini tespit etmek amacıyla şu şekilde uygulanmıştır;

- I. MDS ön tanısı almış hastalardan rutin tetkikler amacıyla heparinle yıkanmış enjektöre alınan kemik iliği aspirasyon materyaline 24 saatlik ve 48 saatlik kültür, kontrol grubu oluşturmak amacıyla sağlıklı bireylerden alınan kan örneğine 72 saatlik kültür yöntemi uygulanmıştır. Steril ortamda vidalı kapaklı tüplere 5'er ml bölünen RPMI-1640 Medyum A içerisine 8 damla kemik iliği, kontroller için 5 ml Fitohemaglutinin bulunan RPMI-1640 Medyum B içerisine 12 damla perifer kanı ekilmiştir. Tüpler 37°C etüve kaldırılmıştır.
- II. Kemik iliği içeren tüplere kültürün 22. ve 46. saatlerinde, perifer kanı içeren tüplere kültürün 70. saatinde, bölünmeyi metafaz safhasında durdurmak amacıyla iğ ipliklerini bloke eden Kolsemid (Kolşisin) maddesinden 50 µl eklenmiştir, tüpler ters yüz edilerek tekrar etüve kaldırılmıştır.
- III. Tüpler kültür süresinin bitimine yarım saat kala etüvden alınmış ve kromozom eldesi için çıkış adı verilen işlem başlatılmıştır. Kültürden alınan tüpler 246 g'de 7 dakika santrifüj edilmiş, süpernatantlar dökülmüştür.
- IV. Tüplerdeki pelet üzerine pastör pipeti yardımıyla 6 ml 37°C 0,075 M KCl vorteks eşliğinde eklenmiş ve ardından hipotonik şok amacıyla kemik iliği tüpleri 27 dakika, kan tüpleri 8 dakika 37°C etüvde inkübe edilmiştir.
- V. İnkübasyon süresi tamamlandığında tüpler etüvden alınıp pre-fiksasyon amacıyla tüplere 1-2 damla 1:3 oranında Carnoy fiksatif damlatılmış, tüpler 246 g'de 7 dakika santrifüj edilmiş, süpernatantlar dökülmüştür.
- VI. Peletler üzerine fiksasyon amacıyla vorteks eşliğinde damla damla 6 ml Carnoy fiksatif eklenmiştir. İşlemi takiben tüpler bir gece +4°C'de bekletilmiştir.
- VII. Ertesi gün yıkama işlemine geçilmiştir. Tüpler öncelikle 246 g'de 7 dakika santrifüj edilmiş, üst sıvı atılmış, pelet üzerine vorteks eşliğinde 6 ml Carnoy fiksatif eklenmiş ve bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Bu sayede örnekler yayma işlemine hazır hale getirilmiştir.
- VIII. Tüplerdeki pelet üzerine taze hazırlanmış Carnoy sabitleyici birkaç damla eklenmiş, pastör pipeti ile pipetaj yapılmıştır.
- IX. Oda sıcaklığında %50-52 nem ortamında temiz lamalar üzerine birkaç damla örnek yayılmıştır.
- X. Lamlar aynı ortam koşullarında kurutulduktan sonra üzerlerine birkaç damla Carnoy sabitleyici eklenmiş ve lamlar kurumaya bırakılmıştır.
- XI. Kuruyan preparatlar ortam şartlarına göre uygun süre ve sıcaklıkta hotplate üzerinde yaşlanmaya bırakılmıştır.
- XII. Bu işlemi takiben bantlama safhası başlatılmıştır. GTL bantlama metodu kullanılmıştır. Preparatlar, içerisinde tripsin çözölmüş PBS çözeltisinde 1-5 saniye bekletildikten sonra tampon çözeltiden geçirilmiştir. Ardından 30-60 saniye süresince 1:5 oranında hazırlanmış Leishman boya:tampon çözelti ile boyanmışlardır. Su ile fazla boyası giderilen preparatlar havada kurumaya bırakılmıştır.
- XIII. İncelemeye hazır hale gelen preparatlar ışık mikroskopunda 10X büyütmede taranmış, kaliteli metafazlar 100X immersiyon objektifinde kamera yardımıyla karyotipleme programına aktarılmış ve kromozom analizi yapılmıştır.

3.2.2. FISH Metodu

FISH, kromozom sayı ve yapı anomalilerini floresan işaretleme yöntemiyle saptamak için kullanılan moleküler sitogenetik bir yöntemdir. Floresan molekül prob adını alır. Problar, hedef DNA/RNA dizisine tamamlayıcı (komplementer), radyoaktif ya da kimyasal olarak işaretlenmiş nükleik asit dizileridir ve hedeflenen bölgeyle hibrid oluştururlar. Hibridizasyonla oluşan sinyaller uygun filtreler kullanılarak floresan mikroskopta incelenir (86, 87).

FISH'in sitogenetik yöntemlere göre çözünürlüğü (rezolüsyonu) daha yüksektir, submikroskobik anomaliler ayırt edilebilir, uygulaması kolaydır. Mozaizm tanısı konmasında, mikrolelesyonların ve yeniden düzenlenmelerin belirlenmesinde tercih edilir. Tekniğin bir avantajı da interfaz hücrelerine uygulanabilmesi, metafaz gerektirmemesidir (88).

Rutin tetkiklerde kullanılan problar genellikle doğrudan (direkt) işaretlenmiştir. Bununla birlikte biotin veya digoksijenin gibi haptenlerle doğrudan olmayan (indirect) olarak da işaretlenebilirler. Proba bağlı haptenler floresan işaretli antikorla ikincil tepkimeye girer. Floresan boyalar kendine özgü dalga boyunda incelenir (89, 90).

Problar hedef bölgelerine göre 3'e ayrılırlar (Şekil 3-3) (91).

3.2.2.1. Tekrarlayan Dizi Probları

Kromozomların sentromerik ve perisentromerik bölgelerinde bulunan α -satellit, β -satellit ve diğer satellit bölgelere spesifik problardır. En sık kullanılanı, insan kromozom sentromerlerinde tekrarlayan α -satellitlere özgü problardır. α -satellit kromozom bölgelerinde yüzlerce hatta binlerce tekrar bulunabilir ve bu nedenle sinyal oldukça kuvvetlidir. Tekrarlayan dizi probları kopya sayısı anomalilerinde ve anöploidilerin belirlenmesinde, telomere yakın yeniden düzenlenmelerde kullanılabilir (89).

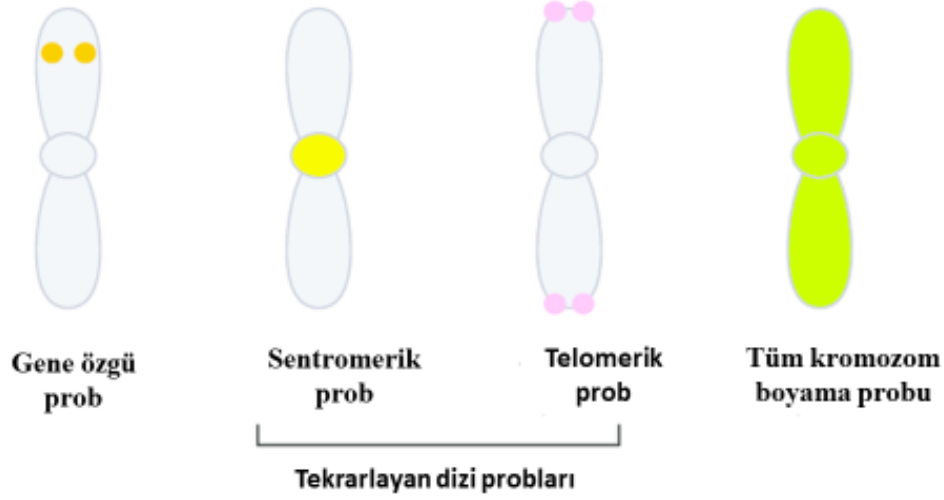
3.2.2.2. Lokusa Spesifik Problar

Lokusa ya da gene özgü problar, belirli bir genin varlığını ya da lokalizasyonunu belirlemek için interfaz veya metafaz kromozomlarında kullanılabilen problardır. Diziye özgü bu problar, maya yapay kromozomu (Yeast Artificial Chromosome-YAC), bakteri yapay kromozomu (Bacterial Artificial Chromosome-BAC), kozmitler gibi vektörlerle genomun istenilen bölgesinin klonlanarak üretilmesiyle elde edilir. Yapısal anomalilerin belirlenmesinde ve kromozom kırık noktalarının tespitinde bu problar kullanılabilir (89).

3.2.2.3. Tüm Kromozom Boyama Probu

Bir kromozomun tümü veya bir parçasına spesifik, tekrarlayan dizilerden oluşan bu problarla kromozomun tümü boyanabilir. Genellikle yapısal anomalilerin tespitinde kullanılırlar. Bilinmeyen derivatif kromozomların hangi kromozomdan köken aldığını

belirlemede, halka kromozomların ve markerların incelenmesinde, translokasyonların doğrulanmasında kullanılırlar (89).



Şekil 3-3: FISH prob çeşitleri (91)

Çalışmamızda gene özgü prob kullanılarak 5q33-34 bölgesindeki delesyonlar FISH yöntemi şu şekilde incelenmiştir;

- I. FISH metodu için kullanılacak materyallere direk kültür işlemi uygulanmıştır. Kültür çıkışı ve yıkama işlemleri yapıldıktan sonra tüpler +4°C’de bir gece bekletilmiştir.
- II. Örnekler taze yayılarak aynı gün kullanılmıştır, yayma sonrasında preparatlar incelenerek uygun pepsin muamele süreleri belirlenmiştir.
- III. Sıcak su banyosu 37°C’ye ayarlanmış, 1 ml 1N HCl+99 ml dH₂O çözeltisi su banyosuna konularak ısıtılmıştır. Sıcaklık 37°C olduğunda içerisine 500 µl pepsin eklenmiş, preparatlar uygun bulunan süreye göre 1-3 dakika bu çözelti içerisinde bekletilmiştir.
- IV. Ardından oda sıcaklığında preparatlar sırasıyla 5 dakika PBS, 10 dakika post-fiksasyon ve tekrar 5 dakika PBS çözeltisi içerisinde inkübe edilmiştir.
- V. Sonrasında preparatlara 2 dakika 2xSSC çözeltisi ile muamele edilmiştir.
- VI. Dehidratasyon amacıyla preparatlar sırasıyla %70, %85 ve %100’lük alkol ile 3’er dakika muamele edilmiştir. Bu işlemten sonra preparatlar oda sıcaklığında kurutulmuştur.
- VII. Prob kiti, deney öncesinde -20°C’den çıkarılmış ışık almayacak şekilde oda sıcaklığında çözünmeye bırakılmıştır. Sonrasında bir eppendorf tüp içerisinde her bir preparat için 0,5 µl prob, 3,5 µl hibritleme çözeltisi ve 1 µl saf dH₂O total hacim 5 µl olacak şekilde karıştırılmıştır.
- VIII. Prob içeren tüp, lam ve lamel 37°C’de yarım saat bekletilmiştir.

- IX. Ardından karanlık ortamda 5 µl prob çözeltisi preparat üzerinde çalışılacak bölgeye dikkatlice damlatılmış, üzeri lamel ile kapatılmış ve etrafı yapıştırma solüsyonu ile yapıştırılmıştır.
- X. Preparat 74°C'ye ayarlanmış hotplate üzerinde 2 dakika denatürasyon amacıyla bekletilmiştir.
- XI. Sonrasında preparat hibritleme işlemi için ThermoBrite cihazında 37°C'de nemli ortamda 20 saat bekletilmiştir.
- XII. Sürenin bitimini takiben hibritleme sonrası yıkamalar yapılmıştır. Öncelikle lamel etrafındaki yapışkan çıkarılarak lamel kaldırılmıştır.
- XIII. Önceden su banyosunda 72°C'ye getirilmiş 0,4xSSC çözeltisinde preparat 2 dakika bekletilmiştir.
- XIV. Sonrasında oda sıcaklığında 2xSSC çözeltisinde 30 saniye bekletilerek yıkama işlemi tamamlanmıştır.
- XV. Preparat üzerine 15 µl DAPI antifade II çözeltisi mikropipet yardımıyla damlatılmış ve lama yayılan çözelti üzerine lamel kapatılarak preparat incelemeye hazır hale getirilmiştir. Preparatlar incelenene kadar ışık almayan bir kutu içerisinde +4°C'de saklanmıştır.
- XVI. Preparatlar 'Olympus BX51' floresan mikroskobunda 100x immersiyon objektifinde TxRed, FITC, DAPI filtreleri ile incelenmiştir. Program olarak Isis FISH Imaging System arayüzü kullanılmıştır.

3.2.3. Total RNA İzolasyonu ve cDNA Dönüşümleri

3.2.3.1. Kandan Lökosit İzolasyonu

- I. EDTA'lı tüpe alınan 6 ml periferik kan 50 ml'lik falcon tüpe alınmış ve üzerine 18 ml 1X RBC Lizis çözeltisi eklenmiştir.
- II. Tüpler +4°C'de 15 dakika bekletilmiştir.
- III. Ardından 1950 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
- IV. Süpernatant dökülmüş ve pelet 1 ml RBC Lizis çözeltisinde çözünmüş, 1,5 ml'lik temiz bir tüpe alınmıştır.
- V. 825 g'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır.
- VI. Süpernatant atılmış ve elde edilen lökositler 250 µl PBS'de çözünmüştür.

3.2.3.2. RNA İzolasyonu

- I. Hasta grubu için EDTA'lı tüpe alınan kemik iliği aspirasyon materyalinden kontrol grubu için ise periferik kandan elde edilen PBS'de çözünmüş lökosit örneğinden 100 µl bir tüpe alınmış ve üzerine 300µl TRI reagent (1:3 oranında) eklenmiştir, 5 dakika boyunca karıştırılmıştır. Ardından 16.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant, RNaz içermeyen başka bir tüpe aktarılmıştır.
- II. Alınan süpernatanta eşit hacimde mutlak etanol eklenip karıştırılmıştır.
- III. Karışım, toplama tüpü içindeki filtreli tüpe transfer edilmiş, 16.000g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Filtreli tüp yeni bir toplama tüpüne aktarılmıştır.

- IV. Filtreli tüp üzerine 400 µl RNA yıkama tamponu eklenip 16.000g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir.
- V. RNaz içermeyen steril bir tüpte 5 µl DNaz I ve 75 µl DNA parçalama tamponu karıştırılmış ve karışım filtreli tüp üzerine eklenmiştir. Oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir.
- VI. Üzerine 400 µl RNA ön yıkama tamponu eklenip 16.000g'de 30 saniye santrifüj edilmiş, altta kalan sıvı dökülmüş ve işlem tekrarlanmıştır.
- VII. Sonrasında 700 µl RNA yıkama tamponu eklenip 16.000g'de 2 dakika santrifüj edilmiş ve filtreli tüp steril 1,5 ml'lik eppendorf tüp içine aktarılmıştır.
- VIII. Bu aşamada RNA eldesi için 50 µl DNaz RNaz içermeyen su filtreli tüp matriksine eklenmiş ve 16.000g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Total RNA alttaki tüpte toplanmıştır.
- IX. RNA'ların saflığı ve konsantrasyonu nanodrop ile ölçüldükten sonra cDNA dönüşümü yapılana kadar -80°C'de saklanmıştır.

3.2.3.3. MikroRNA'dan Komplementer DNA Eldesi

- I. Kit içeriğinde bulunan kimyasallar buz üzerinde çözündürülmüş ve tepkimeler buz üzerinde devam ettirilmiştir.
- II. 20 µl tepkime için en fazla 200 ng RNA kalıbı olacak şekilde konsantrasyon ayarlanmıştır.
- III. Tepkime Tablo 3-2'de belirtildiği haliyle hazırlanmıştır.

Tablo 3-2: miRNA'dan cDNA dönüşümü yapılırken kullanılan kimyasallar ve miktarları

Materyal	Miktar
Kalıp RNA	200 ng
5X RT tampon	4 µl
RT primer	0,4 µl
Ters transkriptaz enzimi	1 µl
Nükleaz içermeyen su	Toplam hacim 20 µl olacak şekilde eklenmiştir.

- IV. Kimyasallar yavaşça pipetaj yapılarak tüp içerisinde karıştırılmıştır.
- V. Tepkime tüpü, ısı döngü cihazında 42°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Ardından tepkimeyi durdurmak için 90°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Elde edilen cDNA, gerçek zamanlı PZT yapılana kadar -80°C'de saklanmıştır.

3.2.3.4. Total RNA'dan Komplementer DNA Eldesi

- I. Kit içeriğinde bulunan kimyasallar buz üzerinde çözündürülmüş ve tepkimeler buz üzerinde devam ettirilmiştir.
- II. Tepkime Tablo 3-3'e göre hazırlanmıştır.

Tablo 3-3: Total RNA'dan cDNA dönüşümü yapılırken kullanılan reaktifler ve miktarları

Materyal	Miktar
Total RNA	200 ng
5X TransAmp tampon	4 µl
Ters transkriptaz enzimi	1 µl
Nükleaz içermeyen su	Total hacim 20 µl olacak şekilde eklenmiştir.

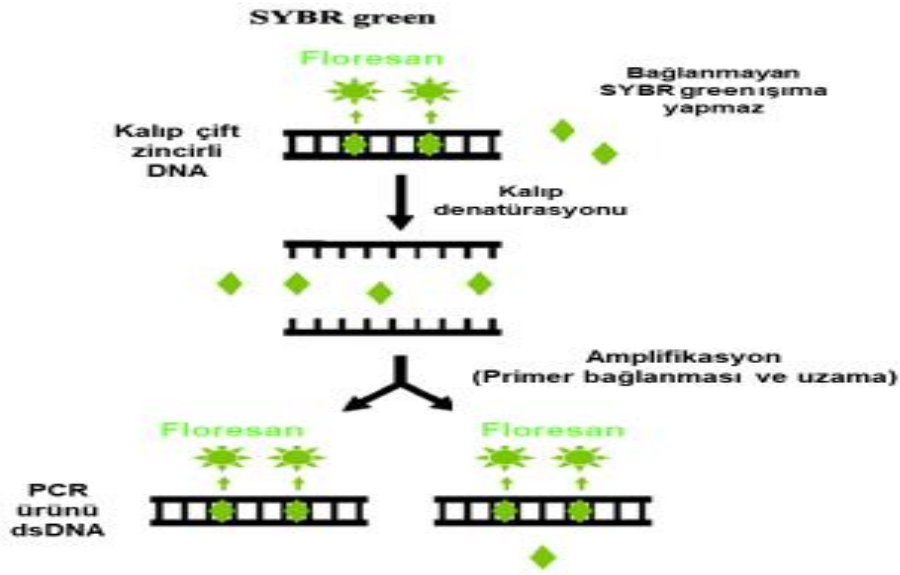
- III. Dikkatlice pipetaj yapılarak kimyasallar karıştırılmıştır.
- IV. Isı döngü cihazında sırasıyla 25°C'de 10 dakika, 42°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Ardından tepkimenin sonlanması için 85°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir.
- V. Elde edilen cDNA, gerçek zamanlı PZT yapılarına kadar -80°C'de saklanmıştır.

3.2.4. Gerçek Zamanlı PZT

GZ-PZT, DNA veya RNA örneklerinin çoğaltılması ve ortamdaki ürün miktarının gerçek zamanlı olarak floresan işaretli boyalarla izlenmesine olanak veren moleküler bir metottur. Kullanılan floresan işaretli boyalar genel olarak iki çeşittir. Taq-Man ve hidroliz problemleri diziye özgüdür. SYBR-Green ise çift zincirli DNA'ya büyük oluk bölgesinden bağlanarak ışıma yapar ve diziye özgü değildir (92).

SYBR Green'in PZT sırasında çalışma prensibi Şekil 3-4'de gösterilmiştir (93).

GZ-PZT yöntemi; gen ifade seviyesinin ölçülmesi, nokta mutasyonlarının tespiti, DNA hasarını inceleme, metilasyon ve tek nükleotid polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism-SNP) analizi, kromozom anomalilerinin belirlenmesi gibi birçok amaçla kullanılabilir (94).



Şekil 3-4: SYBR Green çalışma prensibi (93)

Çalışmamızda miR-146a, miR-145 ve *SMAD2*’nin görece gen ifade seviyelerini belirlemek amacıyla GZ-PZT yöntemi şu şekilde uygulanmıştır;

3.2.4.1. miRNA’larda Görece (Rölatif) Gen İfadesi

miRNA’dan elde edilen cDNA’lardan SensiSmart SYBR Master Mix (Bioline, Londra, İngiltere) kullanılarak GZ- PZT çoğaltma çalışması yapılmıştır.

- I. 2x SensiSmart™ Master Mix ve cDNA’lar buz üzerinde çözündürülmüştür.
- II. cDNA tepkime tüpleri (20 µl), kitin içinde bulunan DEPC’li su ile son hacim 100 µl olacak şekilde sulandırılmıştır.
- III. PCR reaksiyon mixi Tablo 3-4’e göre hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu plağa dağıtılmış ve her cDNA örneği için çift kuyucuk çalışılmıştır.

Tablo 3-4: qPZT reaksiyonu hazırlanırken kullanılan reaktifler ve miktarları

Kimyasal	Tek Tepkime Miktarı
2x SensiSmart™ Master Mix	10 µl
Sulandırılmış cDNA	5 µl
PCR primerleri	2 µl
DEPC’li su	3 µl
Toplam Hacim	20 µl

- IV. Hazırlanan plak 200g’de 30 saniye santrifüj edilmiştir.
- V. GZ-PZT cihazı Tablo 3-5’de belirtilen döngü parametrelerine ayarlanmış ve polimeraz zincir tepkimesi gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3-5: GZ-PZT’da kullanılan döngü parametreleri

Döngü Sayısı	Sıcaklık	Zaman
1	95°C	10 dakika
	40°C	5 dakika
40	95°C	10 saniye
	60°C	30 saniye

3.2.4.2. Hedef Genin Görece İfadesi

mRNA’dan elde edilen cDNA’lardan SensiFast™ SYBR No-ROX kit (Bioline, Londra, İngiltere) kullanılarak GZ-PZT çoğalma çalışması yapılmıştır.

- I. PCR ana karışımı Tablo 3-6’da verilen miktarlara göre hazırlanmıştır.
- II. cDNA’lar (20 µl), 0,1 mM EDTA ile son hacim 100 µl olacak şekilde sulandırılmıştır.
- III. Hazırlanan reaksiyonlar Tablo 3-7’de verilen koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3-6: GZ-PZT reaksiyon içeriği

Kimyasal	Hacim
2x SensiFAST SYBR No-ROX mix	10 µl
10 µM forward primer	0,8 µl
10 µM reverse primer	0,8 µl
cDNA	5 µl
dH ₂ O	3,4 µl
Toplam hacim	20 µl

Tablo 3-7: GZ-PZT için uygulanan koşullar

Döngü Sayısı	Sıcaklık	Zaman
1	95°C	2 dakika
40	95°C	5 saniye
	60°C	10 saniye
	72°C	15 saniye

3.2.5. İstatistiksel Analiz

3.2.5.1. $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu

GZ-PZT yöntemi Bio-Rad CFX96 cihazında gerçekleştirilmiş ve hedef gen ile referans genlere ait döngü eşik değerleri (cycle threshold, C_t) belirlenmiştir. Gen ifadelerindeki değişiklikler $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi ile tespit edilmiştir (95). Verilerin istatistiksel anlamlılıkları $2^{\Delta C_t}$ değerleri kullanılarak *Unpaired Student's T-Test* ve *Paired Student's T-Test* analizi ile GraphPad Prism 7.0 programı (GraphPad Software, Inc., CA, ABD) kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.5.2. FISH yönteminde *Cut-Off* belirlemede *BetaInv* (Inverse Beta Distribution, Ters Beta Dağılımı) metodu

FISH probunun validasyonu için *Cut-Off* değerinin belirlenmesi önemlidir. FISH çalışması sonucunda bir örneğin normal/negatif veya anormal/pozitif olarak değerlendirilebilmesi için normal *Cut-Off* değerinin bilinmesi gerekir. Bunun için ise normal bir popülasyonda gözlenen anormal sinyal düzeyi bilinmelidir. Sağlıklı bir bireyde bulunan anormal sinyal miktarı “yanlış pozitif” değer olarak tanımlanır. Yanlış pozitif miktarının bilinmesi ile hastalarda anormal olarak kabul edilebilecek sinyal sayısının alt sınırı belirlenir. Yanlış pozitif hücreler genellikle rastgele çıkışma, fazla ayırık sinyaller, floresan kalıntıları, tavsiye edilmeyen hücre seçimi gibi çeşitli teknik nedenlerle olabilmektedir.

BetaInv metodu normal *cut-off* değerini belirlemek için binom dağılımının %95’inin üst güven sınırını hesaplayan bir yöntemdir. Ortalama ve standart sapma yöntemi *Gauss* (çan-biçimli) eğrisi kullanır oysa FISH sonuçları bu duruma uygun değildir ve bu nedenle alternatif olarak *Binomial* (eğimli çan-biçimli) eğri kullanılmalıdır. Binom dağılımını kullanan istatistiksel fonksiyonlara Beta Dağılımı denir. Beta dağılımında yüzdelik kısım bilinmediği için hedeflenen %95’lik yüzdeyi kullanan Ters Beta Dağılımı metodunu kullanılır. Ters Beta Dağılımında güven aralığı %95 seçilir yani $p < 0,05$ durumu anlamlı kabul edilir. *BetaInv* fonksiyonu ile *cut off* değeri belirlendikten sonra hastada bulunan anormal sinyal değeri, eğer bu değer

üzerinde ise anlamlı kabul edilir, bu değere eşit veya altında ise gözlenen anormal sinyaller normal aralıkta kabul edilir.

BetaInv fonksiyonu;

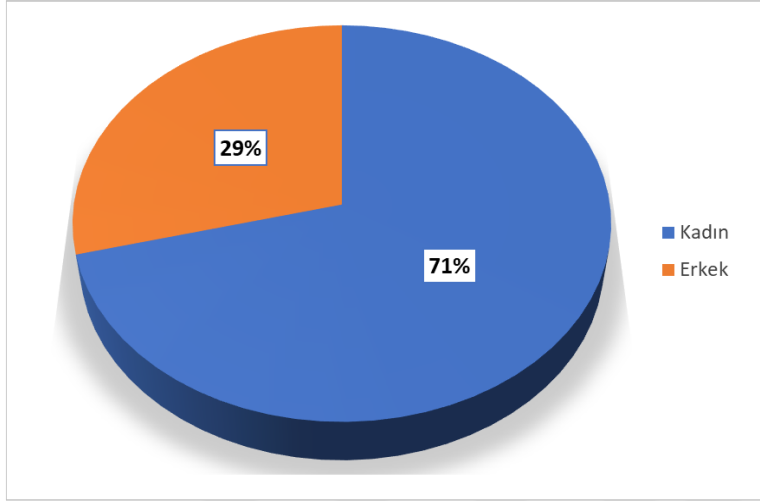
BetaInv("Güven Aralığı"; "Yanlış Pozitif Hücre Sayısı +1" ; "İncelenen Hücre Sayısı") şeklinde hesaplanır (96).

Örneğin 200 hücre incelenen bir FISH çalışmasında yanlış pozitif hücre sayısı 5 ise %95 güven aralığında; $BetaInv(0,95;6;200)= 0,0505$ yani %5 (10 hücre) olarak hesaplanır. Bu değer çalışmanın *Cut-Off*'u olarak belirlenir. Hastada 11 ve üzeri hücrede anormal sinyal gözleniyorsa bu durum istatistiksel olarak anlamlıdır ve anormal olarak kabul edilir. Anormal sinyal sayısı 10 ve altında ise normal aralıktadır.



4. BULGULAR

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı'na başvurmuş ve MDS ön tanısı almış 17'si kadın yedisi erkek toplam 24 hasta çalışmaya alınmıştır. Olgu grubunun cinsiyete göre dağılımı Şekil 4-1'de gösterilmektedir. Hastaların yaş ortalaması $65,56 \pm 9,7$ olarak belirlenmiştir.



Şekil 4-1: Çalışmada kullanılan hasta grubunun cinsiyete göre dağılımı

23 hastanın kemik iliği aspirasyon materyaline yapılan G-bantlama sonucunda dört olguda değerlendirilebilecek kalitede metafaz elde edilememiş, 19 olguda konvansiyonel sitogenetik değerlendirme yapılabilmektedir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4-1'de verilmiştir. Kontrol grubunu oluşturan 20 sağlıklı bireye konvansiyonel sitogenetik değerlendirme yapılmış ve tamamında yeterli kalitede ve sayıda metafaz elde edilmiştir. Kontrol grubuna ait sitogenetik sonuçları Tablo 4-2'de verilmiştir.

Tablo 4-1: MDS Ön Tanısıyla Gelen Hastaların Sitogenetik Değerlendirme Sonuçları

Olgu Numarası	Yaş	Cinsiyet	Sitogenetik Analiz Sonucu
1	61	E	37~45,XY,-Y[9],-18[3][cp11]/46,XY[6]
2	63	K	46,XX[1], nka*[2]
3	72	E	46,XY[1], nka[3]
4	69	E	46,XY[2], nka[3]
5	52	E	39~45,X,-Y[4],-6[3],-15[3],-22[4][cp7]/46,XY[11]

6	64	K	46, XX[12], nka[8]
7	47	K	40~51,XX,-8[3],-14[3],-15[5],-17[4],-20[3][cp8]/46,XX[16]
8	78	E	36~45,X,-Y[5],-5[3],-9[3],-10[3],-11[3],-18[3],-20[3],-22[3][cp11]/46,XY[10]
9	82	K	35~45,XX,-5[3],-19[3],-20[4],-21[3][cp6]/46,XX[6]
10	61	K	27~33,X,+X[2],+1[2],+3[3],+4[2],+7[2],+9[2],+10[3],+13[3],+14[2],+15[2],+16[4],+19[2],+21[2][cp4]/42~45,XX,-9[3],-12[3],-18[3],-21[4][cp8]/46,XX[8]
11	66	K	nka[3]
12	55	K	DMB**
13	84	E	27~34,X,+2[2],+6[2],+13[2],+18[2],+21[2],+22[2][cp2]/39~45,XY,-16[4],-21[3][cp7]/46,XY[16]
14	55	E	28~34,X,+Y[2],+3[2],+5[2],+8[2],+12[2][cp2]/36~45,XY,-17[3],-21[3][cp8]/46,XY[11]
15	50	K	DMB
16	79	K	46,XX[2]
17	64	K	DMB
18	65	K	Sitogenetik analiz gerçekleştirilmedi.
19	60	K	37~46,XX,-7[8],del(21)(q22)[3],+mar1[6][cp10]
20	75	K	46,XX[1]
21	69	K	46,XX,ins(X;?)(p11.2;??)[3]/35~45,XX,-17[4],-19[3],-22[3][cp7]/46,XX[10]
22	69	K	46,XX[20], nka[7]

23	66	K	46,XX[10], nka[8]
24	63	K	DMB

*Non-klonal anomali

** Değerlendirilecek kalitede metafaz bulunamamıştır.

Tablo 4-2: Kontrol Grubuna Ait Konvansiyonel Sitogenetik Analiz Sonuçları

Kontrol Numarası	Yaş	Cinsiyet	Sitogenetik Analiz	Kontrol Numarası	Yaş	Cinsiyet	Sitogenetik Analiz
1	33	K	46,XX[20]	11	46	E	46,XY[20]
2	32	K	46,XX[20]	12	40	K	46,XX[20]
3	49	K	46,XX[20]	13	41	E	46,XY[20]
4	50	E	46,XY[20]	14	51	K	46,XX[20]
5	36	K	46,XX[20]	15	37	E	46,XY[20]
6	53	K	46,XX[20]	16	38	E	46,XY[20]
7	46	E	46,XY[20]	17	44	K	46,XX[20]
8	50	K	46,XX[20]	18	37	K	46,XX[20]
9	61	K	46,XX[20]	19	36	E	46,XY[20]
10	41	E	46,XY[20]	20	47	K	46,XX[20]

Konvansiyonel sitogenetik uygulanan MDS ön tanısı almış 24 hastada her kromozom için gözlenen sayısal anomaliler ve görülme sıklıkları Şekil 4-2’de yer almaktadır.

Çalışmaya katılan 24 olgu için elde edilen bulgular sırasıyla şu şekildedir;

1. Olgu: 61 yaşındaki erkek hastanın kemik iliği aspirasyon materyalinden sitogenetik analiz yapılmış ve 20 metafaz karyotiplenmiştir. İncelenen 20 metafazın altısında 46,XY kromozom yapısı saptanırken 14 metafazda klonal olan ve klonal olmayan kromozom sayı düzensizlikleri gözlenmiştir. Klonal anomalilerden derlenen kompozit karyotipe göre dokuz sahada -Y anomalisi, üç sahada -18 anomalisi bulunmaktadır.

2. Olgu: 63 yaşındaki kadın hastanın kemik iliği aspirasyon materyalinden yapılan sitogenetik analizde değerlendirilebilecek üç saha bulunmuştur. Karyotiplenen metafazların birinde 46,XX kromozom yapısı saptanırken iki metafazda klonal olmayan kromozom sayı düzensizlikleri gözlenmiştir.

3. Olgu: 72 yaşındaki erkek hastanın kemik iliği aspirasyon materyalinden sitogenetik analiz yapılmış ve değerlendirilebilecek dört saha bulunabilmiştir.

Karyotiplenen bir metafazda 46,XY kromozom yapısı saptanırken üç metafazda klonal olmayan sayı düzensizlikleri gözlenmiştir.

4. Olgu: 69 yaşındaki erkek hastanın kemik iliği aspirasyon materyalinden yapılan sitogenetik analizde değerlendirilebilecek beş metafaz bulunmuştur. Karyotiplenen beş metafazın ikisinde 46,XY kromozom yapısı saptanırken üç metafazda hipodiploid (38-45) seviyede klonal olmayan kromozom sayı düzensizlikleri gözlenmiştir.

5. Olgu: 52 yaşındaki erkek hastanın kemik iliği aspirasyon materyalinden sitogenetik analiz yapılmış ve 21 metafaz incelenmiştir. Karyotiplenen 21 metafazın dokuzunda 46,XY kromozom yapısı saptanırken 10 metafazda klonal olan ve klonal olmayan kromozom sayı düzensizlikleri gözlenmiştir. Hipodiploid seviyedeki yedi metafazın dördünde -Y, üçünde -6, üçünde -15, dördünde -22 anomalisi gözlenmiştir.

6. Olgu: 64 yaşında kadın hastanın kemik iliği aspirasyon materyalinden sitogenetik analiz yapılmış ve 20 metafaz karyotiplenmiştir. 12 metafazda 46,XX kromozom yapısı saptanırken incelenen yedi metafazda klonal olmayan kromozom sayı ve yapı düzensizlikleri bir sahada tetraploid seviyede kromozom yapısı gözlenmiştir (Şekil 4-3).

7. Olgu: 47 yaşında kadın hastanın kemik iliği aspirasyon materyalinden yapılan sitogenetik incelemede 31 metafaz karyotiplenmiştir. 16 metafazda 46,XX kromozom yapısı saptanırken 15 metafazda klonal olan ve klonal olmayan kromozom sayı ve yapı düzensizlikleri gözlenmiştir. Kompozit karyotipe sahip olan sekiz metafazın üçünde -8, üçünde -14, beşinde -15, dördünde -17, üçünde -20 anomalisi bulunmuştur (Şekil 4-4).

8. Olgu: 78 yaşındaki erkek hastanın kemik iliği aspirasyon materyalinden sitogenetik analiz yapılmış ve 21 metafaz karyotiplenmiştir. 21 metafazın 10'unda 46,XY kromozom yapısı saptanırken 11 metafazda klonal olan ve klonal olmayan kromozom sayı düzensizlikleri gözlenmiştir. Kompozit karyotipe sahip 11 metafazın beşinde -Y, üçünde -5, üçünde -9, üçünde -10, üçünde -11, üçünde -18, üçünde -20, üçünde -22 anomalisi gözlenmiştir (Şekil 4-5).

9. Olgu: 82 yaşında kadın hastanın kemik iliği aspirasyon materyalinden yapılan sitogenetik incelemede 12 metafaz karyotiplenmiştir. İncelenen 12 metafazın altısında 46,XX kromozom yapısı saptanırken kompozit karyotipe sahip 6 metafazın üçünde -5, üçünde -19, dördünde -20, üçünde -21 anomalisi bulunmuştur.

10. Olgu: 61 yaşında kadın hastanın kemik iliği aspirasyon materyalinden sitogenetik inceleme yapılmış ve 22 metafaz karyotiplenmiştir. İncelenen sekiz metafazda 46,XX kromozom yapısı saptanırken 14 metafazda klonal olan ve klonal olmayan kromozom sayı düzensizlikleri tespit edilmiştir. Ayrıca hipertriploid ve hiperoktaploid seviyede birer metafaz gözlenmiştir. Klonal anomalilerden derlenen kompozit karyotip formülü Tablo 4-1'de verilmiştir.

11. Olgu: 66 yaşında kadın hastanın kemik iliği aspirasyon materyalinden yapılan sitogenetik incelemede değerlendirilecek kalitede metafaz bulunamamıştır. Bir haploid, bir diploid ve bir poliploid seviyede üç metafaz gözlenmiştir.

12. Olgu: 55 yaşında kadın hastanın kemik iliği aspirasyon materyalinden sitogenetik inceleme yapılmış ve değerlendirilecek kalitede metafaz bulunamamıştır.

13. Olgu: 84 yaşında erkek hastanın kemik iliği aspirasyon materyalinden yapılan sitogenetik incelemede 28 metafaz karyotiplenmiştir. Karyotiplenen 28 metafazın 16'sında 46,XY kromozom yapısı saptanırken diploid seviyede kromozom sayısına sahip yedi metafazda ve haploid seviyede kromozom sayısına sahip iki metafazda klonal olan ve klonal olmayan kromozom sayı ve yapı düzensizlikleri gözlenmiştir. Klonal anomalilerden derlenen kompozit karyotip formülü Tablo 4-1'de yer almaktadır. İncelenen 12 metafazda bir ya da birden fazla kromatid kırıkları ve kromozom gapler gözlenmiştir. Bunlardan chsg(2)(p10), chsg(3)(q27), chtb(10)(q22) noktalarındaki kırık ve gapler birden fazla metafazda tespit edilmiştir (Şekil 4-6).

14. Olgu: 55 yaşında erkek hastanın kemik iliği aspirasyon materyalinden sitogenetik inceleme yapılmış ve 22 metafaz karyotiplenmiştir. İncelenen metafazların 11'inde 46,XY kromozom yapısı saptanırken diploid seviyede kromozom sayısına sahip sekiz metafazın üçünde -17, üçünde -21, haploid seviyede kromozom sayısına sahip iki metafazda +Y, +3, +5, +8, +12 tespit edilmiş ve bir poliploid seviyede kromozom sayısına sahip metafaz gözlenmiştir.

15. Olgu: 50 yaşında kadın hastanın kemik iliği aspirasyon materyalinden yapılan sitogenetik incelemede bir adet 46,XX kromozom yapısına sahip metafaz gözlenmiştir.

16. Olgu: 79 yaşında kadın hastanın kemik iliği aspirasyon materyalinden sitogenetik inceleme yapılmış ve sadece iki adet 46,XX kromozom yapısına sahip metafaz gözlenmiştir.

17. Olgu: 64 yaşında kadın hastanın kemik iliği aspirasyon materyalinden yapılan sitogenetik incelemede değerlendirilecek kalitede metafaz bulunamamıştır.

18. Olgu'ya sitogenetik inceleme yapılamamıştır.

19. Olgu: 60 yaşında kadın hastanın kemik iliği aspirasyon materyalinden sitogenetik inceleme yapılmış ve 13 metafaz karyotiplenmiştir. 13 metafazda klonal olan ve klonal olmayan kromozom sayı ve yapı düzensizlikleri gözlenmiştir. Kompozit karyotip formülü yazılabilen 10 metafazın sekizinde -7, üçünde del(21)(q22) ve altısında +mar1 tespit edilmiştir (Şekil 4-7).

20. Olgu: 75 yaşında kadın hastanın kemik iliği aspirasyon materyalinden yapılan sitogenetik incelemede sadece bir adet 46,XX kromozom yapısına sahip metafaz gözlenmiştir.

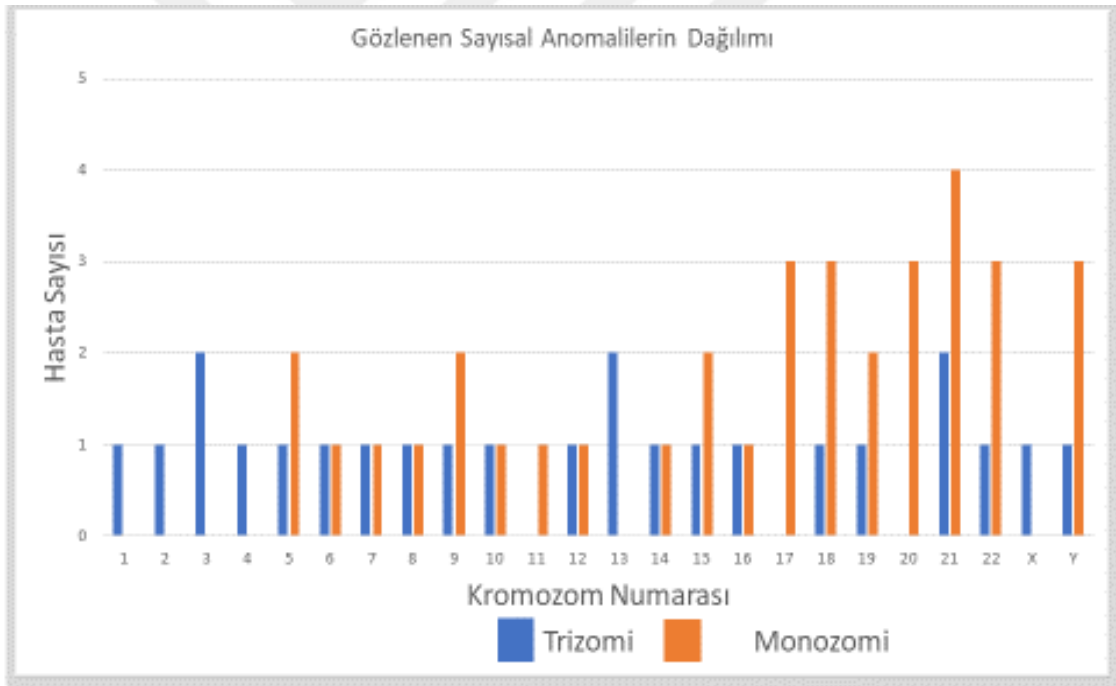
21. Olgu: 69 yaşında kadın hastanın kemik iliği aspirasyon materyalinden sitogenetik inceleme yapılmış ve 22 metafaz karyotiplenmiştir. 22 metafazın 10'unda

46,XX kromozom yapısı saptanırken kompozit karyotipe sahip yedi sahanın dördünde -17, üçünde -19, üçünde -22 gözlenmiş ve üç sahada X kromozomunun p11.2 bölgesinde kökeni tanımlanamayan insersiyon tespit edilmiştir (Şekil 4-8).

22. Olgu: 69 yaşında kadın hastanın kemik iliği aspirasyon materyalinden yapılan sitogenetik incelemede 27 metafaz karyotiplenmiştir. 20 metafazda 46,XX kromozom yapısı saptanırken altısı hipoploidi (41-45) biri hiperploidi (30) seviyede kromozom sayısına sahip yedi metafazda klonal olmayan kromozom sayı düzensizlikleri gözlenmiştir.

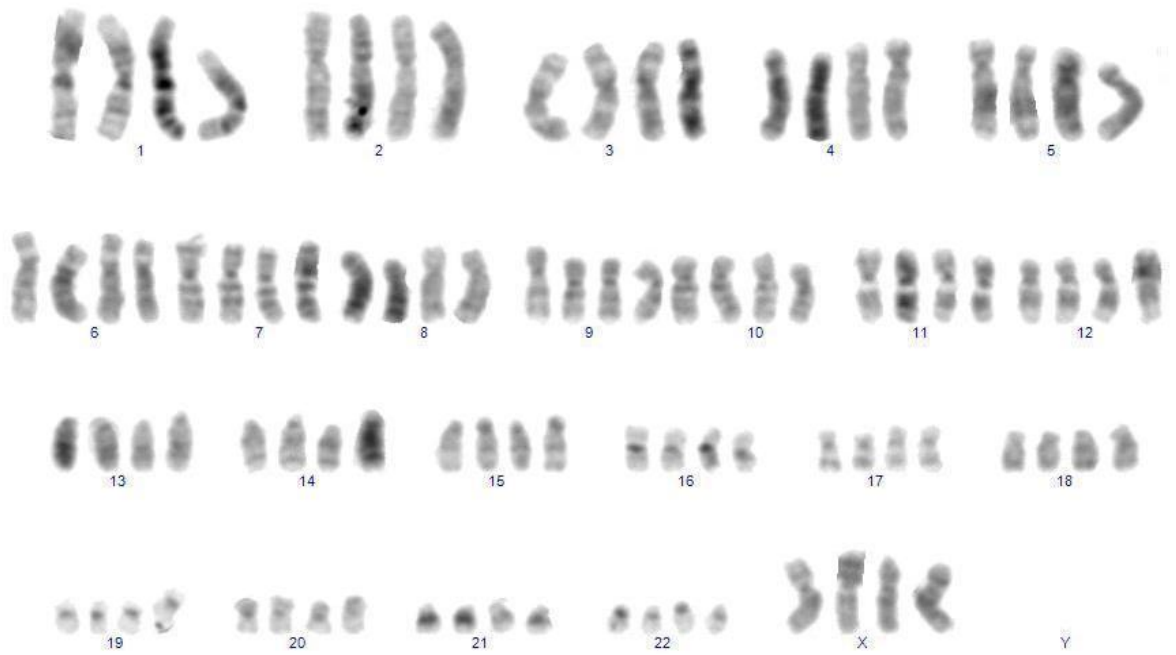
23. Olgu: 66 yaşında kadın hastanın kemik iliği aspirasyon materyalinden sitogenetik analiz yapılmış ve 20 metafaz karyotiplenmiştir. 10 metafazda 46,XX kromozom yapısı saptanırken incelenen sekiz metafazda klonal olmayan kromozom sayı ve yapı düzensizlikleri gözlenmiştir.

24. Olgu: 63 yaşında kadın hastanın kemik iliği aspirasyon materyalinden sitogenetik inceleme yapılmış ve değerlendirilecek kalitede metafaz elde edilememiştir.



Şekil 4-2: Sitogenetik analizle gözlenen klonal sayısal anomaliler ve görülen hasta sayısı

Birer hastada ise del(21)(q22), ins(X;?)(p11.2;??) ve +mar1 yapısal anomalileri klonal olarak gözlenmiştir.



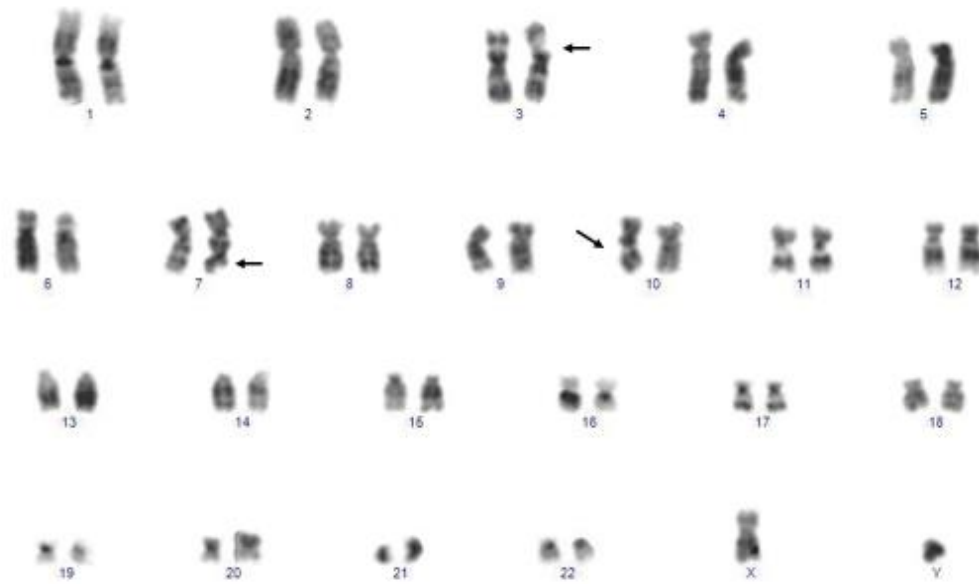
Şekil 4-3: Olgu 6'ya ait 92,XXXX kromozom yapısına sahip bir karyogram örneği



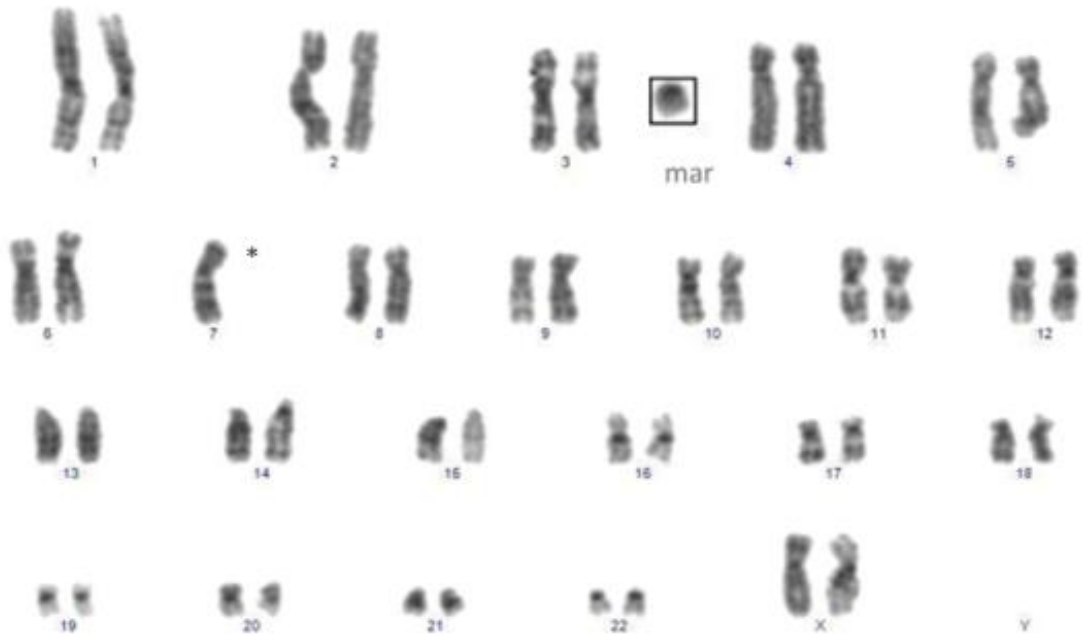
Şekil 4-4: Olgu 7'ye ait 42,XX,-3,-8,-15,-22 kromozom yapısına sahip bir karyogram örneği



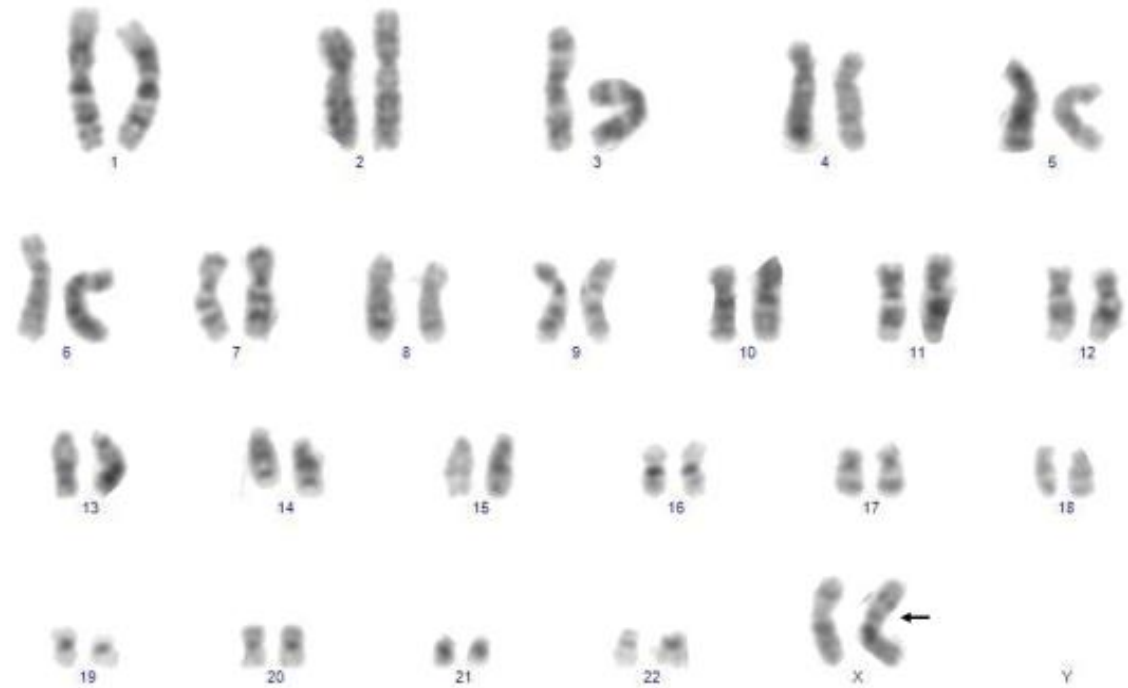
Şekil 4-5: Olgu 8'e ait 42,XY,-5,-10,-20,-22 kromozom yapısına sahip bir karyogram örneği



Şekil 4-6: Olgu 13'e ait 46,XY,chtb(3)(p21),chtb(7)(q22),chtb(10)(q22) kromozom yapısına sahip bir karyogram örneği

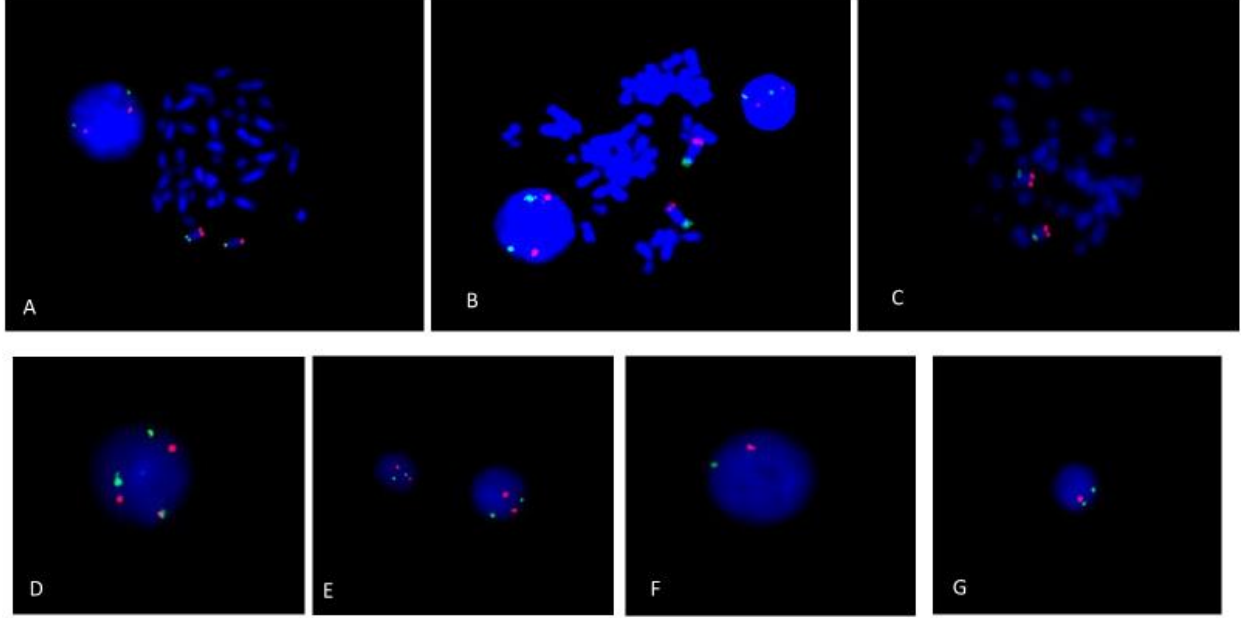


Şekil 4-7: Olgu 19'a ait 46,XX,-7,+mar1 kromozom yapısına sahip bir karyogram örneği



Şekil 4-8: Olgu 21'e ait 46,XX,ins(X;?)(p11.2;??) kromozom yapısına sahip bir karyogram örneği

Olgulara, 5q33-34 bölgesine özgü DNA probu kullanılarak FISH metodu uygulanmış ve her olguda en az 200 hücre sayılmıştır. Şekil 4-9'da bazı olgu ve kontrollere ait FISH görüntüleri verilmektedir.



Şekil 4-9: Farklı kromozom yapılarına sahip FISH örnekleri

(Yeşil sinyal (Y): 5p15.2 kontrol bölgesi, Kırmızı sinyal (K): 5q33-34 delesyon bölgesi; mFISH: metafaz FISH, iFISH: interfaz FISH)

A: Kontrol 7'ye ait normal mFISH ve normal iFISH görüntüsü (2Y2K), B: Kontrol 16'ya ait normal mFISH ve normal iki iFISH görüntüsü (2Y2K), C: Olgu 1'e ait normal mFISH görüntüsü (2Y2K), D: Olgu 6'ya ait trizomi içeren iFISH görüntüsü (3Y3K), E: Olgu 6'ya ait iki normal iFISH görüntüsü (2Y2K), F: Olgu 13'e ait monozomi içeren iFISH görüntüsü (1Y1K), G: Olgu 13'e ait monoallelik delesyon içeren iFISH görüntüsü (2Y1K).

Olgularda elde edilen bulgularının anlamlılığını değerlendirmek amacıyla sağlıklı kontrollere uygulanan FISH metodundan elde edilen verilerden en yüksek yanlış pozitif hücre sayısı ve incelenen toplam hücre sayısı değerleri kullanılarak *BetaInv* fonksiyonu ile *BetaInv* ("Güven Aralığı"; "Yanlış Pozitif Hücre Sayısı +1" ; "İncelenen Hücre Sayısı") formülü kullanılarak *Cut-Off* değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4-3).

Örneğin; monoalelik *del(5q)* durumu için kontrollerde gözlenen en yüksek yanlış pozitif sinyal değeri 11'dir. Uygulanan fonksiyon ile;

$$\text{BetaInv}(0,95; 12 ; 200) = 0,08$$

değeri bulunmuştur. Bu değer yüzde *Cut-Off* değerini vermektedir. 200 hücrede *Cut-Off* olarak belirlenen hücre sayısı;

$$200 \times 0,08 = 16$$

şeklinde hesaplanmıştır. Bu durumda sayılan 200 hücrede 16'dan fazla monoallelik del(5q) sinyali görmek anlamlı, 16 ve altında gözlenen her sinyal normal aralıkta olmaktadır.

Aynı hesaplama tüm sinyal durumları için uygulanmıştır. *Cut-Off* değeri Monozomi 5 için 10 hücre, -5/5q durumu için 22 hücre, kontrol bölgesi del(5p15.2) için 16 hücre olarak belirlenmiştir.

Tablo 4-3: Gözlenen sinyal durumları için Cut-Off değerleri

Sinyal	Max. “yanlış pozitif” hücre sayısı	Toplam incelenen hücre sayısı	<i>BetaInv</i> değeri	<i>Cut-Off hücre sayısı</i>
Monoalelik Delesyon	11	200	0,08	16
Monozomi	6	200	0,05	10
Monoalelik Delesyon ve Monozomi	17	200	0,11	22

Tablo 4-4’de sağlıklı kontrollerden, Tablo 4-5’de hastalardan elde edilen FISH sonuçları verilmiştir.

Hesaplanan değerlere göre del(5q) anomalisi için bir hastada, monozomi 5 için üç hastada *Cut-Off* değerinin üzerinde sinyal gözlenmiştir, diğer hastalar için delesyon bulguları normal aralıktadır.

Tablo 4-4: Kontrol grubuna uygulanan 5p15.2/5q33-34 probu için elde edilen veriler

* En yüksek yanlış pozitif sinyal değeri

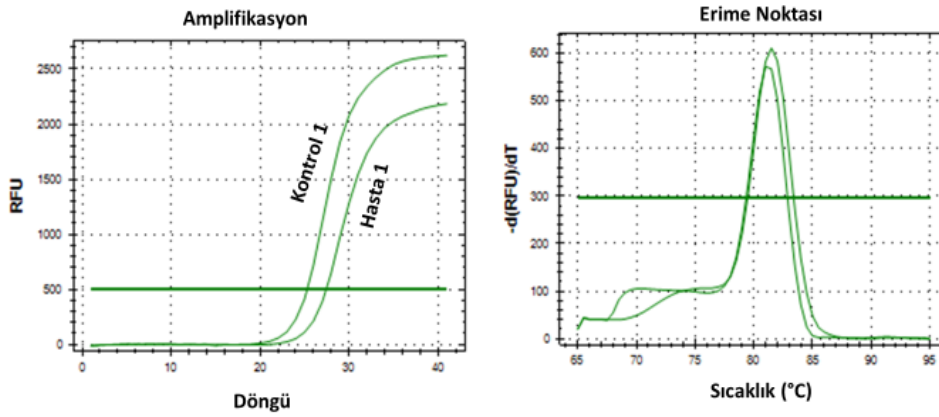
	Normal Hücre	Monoalelik Delesyon	Monozomi	Toplam hücre
K1	220	1	1	226
K2	175	7	5	200
K3	171	6	3	202
K4	173	5	5	202
K5	185	3	4	200
K6	176	7	6*	200
K7	174	6	3	200
K8	192	4	1	201
K9	193	3	3	204
K10	205	1	2	211
K11	187	6	3	204
K12	193	5	0	203
K13	177	11*	6*	200
K14	185	4	2	202
K15	195	5	1	203
K16	180	5	2	200
K17	185	5	2	200
K18	194	1	3	204
K19	189	5	3	201
K20	200	4	3	212

Tablo 4-5: Olgu grubuna uygulanan 5p15.2/5q33-34 probu için elde edilen veriler

* Cut-Off üzerinde bulunan değerler

	Normal Hücre	Monoalelik Delesyon	Monozomi	Toplam hücre
H1	191	6	3	206
H2	FISH analizi gerçekleştirilemedi.			
H3	169	18*	2	197
H4	190	8	4	215
H5	156	8	7	204
H6	170	11	9	205
H7	202	6	5	217
H8	187	4	6	202
H9	194	4	2	210
H10	200	7	2	228
H11	FISH analizi gerçekleştirilemedi.			
H12	FISH analizi gerçekleştirilemedi.			
H13	188	7	8	208
H14	177	12	16*	213
H15	146	6	14*	209
H16	173	3	12*	207
H17	164	4	5	200
H18				
H19	187	16	1	212
H20	182	10	3	220
H21	179	2	9	205
H22	183	7	4	208
H23	FISH analizi gerçekleştirilemedi.			
H24	FISH analizi gerçekleştirilemedi.			

MDS ön tanısı almış 24 hastadan alınan kemik iliği biyopsi materyallerinden ve kontrol amacıyla sağlıklı 20 kişiden alınan kan dokularından total RNA izolasyonları ve cDNA dönüşümleri yapılmıştır. Ardından GZ-PZT yöntemi ile Ct ve erime noktası değerleri belirlenmiştir (Şekil 4-10). Her geni normalize etmek amacıyla aynı zamanda uygun referans genlerin de Ct değerleri belirlenmiştir. Her örnek için elde edilen hedef genin Ct değerinden referans genin Ct değeri çıkarılarak ΔCt (delta Ct) değerleri bulunmuştur. Genlerin ifade değerlerindeki görece değişim durumları $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile belirlenmiştir. Bu yöntemle göre elde edilen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri; 0,9-1,1 aralığında ise ifade değişmemiş, 0,9'un altında ise azalmış, 1,1'in üstünde ise artmış kabul edilmiştir (Tablo 4-4) (95). Verilerin anlamlılığı $2^{\Delta Ct}$ değerleri kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.



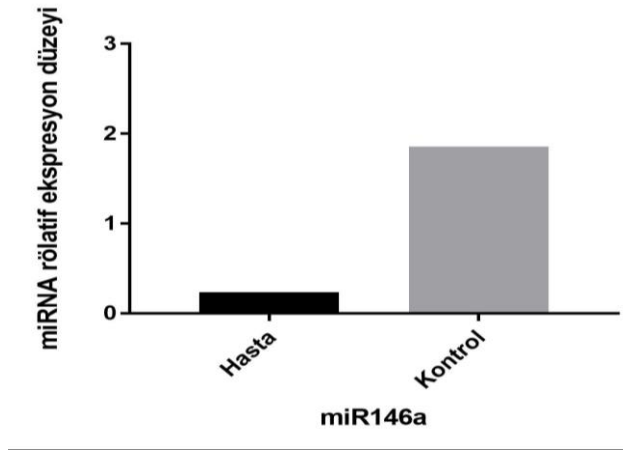
Şekil 4-10: SMAD2 görece gen ifade çalışmasında Ct ve erime noktası değerleri

Her gen için gen ifade analizleri iki defa çalışılmış ve ortalama Ct değerleri belirlenmiştir. Elde edilen Ct sonuçları parametrik bir test olan ve değerlerin medyanlarının karşılaştırılmasını baz alan *Unpaired T-Test* ile değerlendirilmiştir. Buna göre miR-146a için $p=0,0003$, miR-145 için $p=0,24$, SMAD2 için $p=0,47$ olarak hesaplanmıştır.

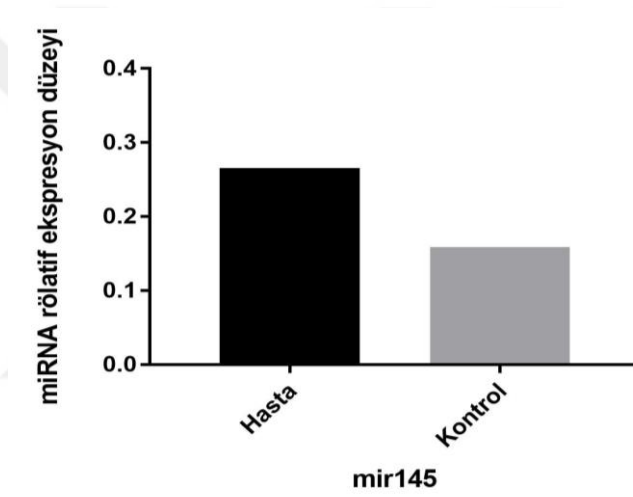
miR-146a için yüksek düzeyde istatistiksel anlamlılık bulunurken miR-145 ve SMAD2 için p değerleri açısından bir anlamlılık saptanmamıştır. miR-146a'nın ifadesi hastalarda kontrollere oranla yüksek düzeyde anlamlı olarak azalmıştır. Şekil 4-11, 4-12 ve 4-13'de her gen için $2^{\Delta Ct}$ değerleri kullanılarak elde edilen istatistiksel verilerin grafik üzerinde gösterimi bulunmaktadır.

miR-146a ifadesi tüm hastalarda anlamlı bir şekilde azalırken, miR-145 ifadesi 15 hastada artmış, altı hastada azalmış ve üç hastada değişmemiştir. SMAD2 ifadesi ise kontrollere nazaran 10 hastada artmış, dokuz hastada değişime uğramamış ve beş hastada azalmıştır. Tablo 4-6'da tüm olguların görece gen ifade düzeylerinde meydana gelen değişimler verilmiştir.

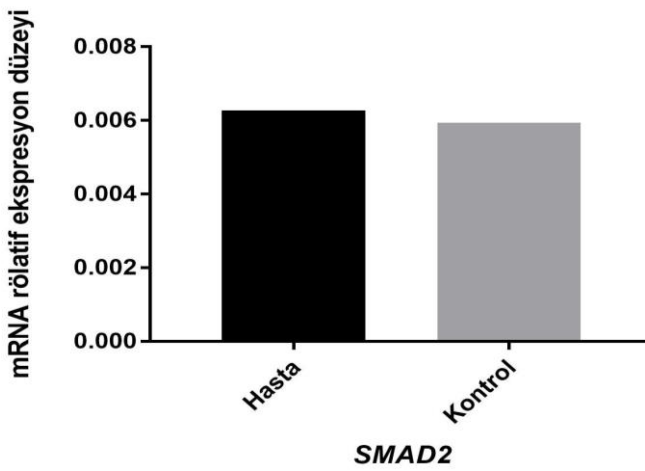
SMAD2, miR-146a ve miR-145 ifade seviyeleri *Paired T Test* ile kontrol edilmiş ve sadece SMAD2 ile miR-145 gen ifadeleri arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir ($p=0,04$).



Şekil 4-11: Hasta ve kontrol gruplarının görece miR-146a ifade değerlerinin karşılaştırılması



Şekil 4-12: Hasta ve kontrol gruplarının görece miR-145 ifade değerlerinin karşılaştırılması



Şekil 4-13: Hasta ve kontrol gruplarının görece SMAD2 ifade değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4-6: Olgularda miR-146a, miR-145 ve SMAD2 için hesaplanan $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri ve görece ifade değişim durumları

Olgu No	miR-146a		miR-145		SMAD2	
	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri	Değişim	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri	Değişim	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri	Değişim
1	0,02	↓	0,53	↓	0,93	↔
2	0,05	↓	1,12	↑	0,77	↓
3	0,01	↓	0,50	↓	0,64	↓
4	0,04	↓	1,91	↑	1,16	↑
5	0,13	↓	2,06	↑	1,10	↔
6	0,01	↓	1,03	↔	0,90	↔
7	0,08	↓	1,82	↑	1,10	↔
8	0,05	↓	0,81	↓	1,15	↑
9	0,08	↓	1,17	↑	0,99	↔
10	0,33	↓	1,66	↑	1,08	↔
11	0,05	↓	17,36	↑	0,87	↓
12	0,16	↓	0,94	↔	1,23	↑
13	1,42	↓	0,76	↓	1,30	↑
14	0,02	↓	0,36	↓	1,69	↑
15	0,17	↓	1,83	↑	0,74	↓
16	0,12	↓	11,25	↑	0,71	↓
17	0,54	↓	3,40	↑	0,97	↔
18	0,10	↓	1,23	↑	1,01	↔
19	0,16	↓	2,86	↑	1,41	↑
20	0,04	↓	0,45	↓	1,36	↑
21	0,80	↓	10,71	↑	1,49	↑
22	0,12	↓	1,04	↔	1,11	↔
23	0,08	↓	1,38	↑	1,18	↑
24	0,04	↓	7,91	↑	1,41	↑

5. TARTIŞMA

Mielodisplastik sendrom, klinik ve genetik olarak heterojen özelliklere sahip, progenitör kemik iliği hücrelerinde meydana gelen değişikliklerden kaynaklanan klonal hematolojik bir hastalıktır. Bir ya da birden fazla hematopoetik soyda meydana gelen somatik mutasyonların hücre farklılaşmasını baskılamasıyla ortaya çıkar (97). Genetik olarak dengesiz olan bu anormal kök hücre klonunun gelişimi apoptoz artışıyla birlikte etkisiz hematopoeze neden olmaktadır. Bu durum etkilenen hematopoetik soylarda sitopeniler ile kendini gösterir ve nihayetinde vakaların üçte birinde lösemik dönüşüme yol açar (16).

MDS'nin etiyopatogenezi yeterince aydınlatılamamıştır. Klinik olarak görülen çeşitlilik; sahip olunan kromozomal anomalilerin türü ve bazı moleküler belirteçlerin varlığı ile kısmen açıklanabilmektedir (98).

MDS tanılı hastaların %30-50'sinde klonal kromozomal anomaliler tespit edilmiştir. Bu anomaliler arasında en sık gözlenen delesyonlardır ve genellikle 5., 7., 8., 13., ve 20. kromozomun uzun (q) kolunda ve 12. ve 17. kromozomun kısa (p) kolunda bildirilmiştir. Bununla birlikte yeni teknolojilerin gelişmesiyle MDS ile ilişkilendirilen tekrarlayan mutasyon grupları tanımlanmıştır. Kromozomal değişimlerin yanında histon fonksiyonu ve DNA metilasyonu düzenlenmesinde görevli genlerin de MDS'de sık mutasyona uğradığının gösterilmesi, MDS'nin genetik ve epigenetik değişikliklerle ortaya çıkan bir hastalık olduğu fikrini doğurmuştur. Bu genetik değişiklikler arasında birçok miRNA'nın da işlev gördüğü bilinmektedir (16).

Çalışmamızda MDS'nin etiyopatogenezi aydınlatmak amacıyla moleküler ve sitogenetik bulgular birarada analiz edilmiş ve değerlendirilmiştir. Çalışmadaki en önemli analizlerden biri; MDS'de sık gözlenen bir sitogenetik anomali olan 5q delesyon bölgesinde kodlanan miR-146a ve miR-145 genlerinin ifade düzeylerindeki değişimin hastalıkla ilişkili olabileceğinin ve TGF- β sinyal yolağının etkinleşmesinde de olası etkisinin belirlenmesidir. Bu amaçla çalışmaya dahil edilen olgulara, konvansiyonel sitogenetik, moleküler sitogenetik ve gen ifade analizleri yardımıyla farklı ve hedefe yönelik analizler yapıldı.

MDS'de sık gözlenen delesyon ve monozomiler nedeniyle genetik materyal kaybı olmaktadır. Ancak trizomiler sık gözlenmez. Genetik materyal kaybı göz önüne alındığında MDS'de ana moleküler mekanizmanın, onkogen aktivasyonu değil tümör baskılayıcı genlerin etkisizleşmesi olduğu düşünülmektedir (99).

Deviren ve ark.'ın tedavi almamış 221 MDS tanılı hastada yaptığı sitogenetik çalışmada olguların %55,2'sinde normal karyotip, %44,8'inde klonal sitogenetik anomaliler gözlenmiştir. -Y(n=17), -18 (n=17), -21 (n=15), -7 (n=14), -22 (n=12), -5 (n=10), +8 (n=10), -19 (n= 10), del(5q) (n=3), del (20q) (n=2) sık gözlenen anomalilerdir (100).

Bernasconi ve ark.'ın 491 MDS tanılı hastayı kapsayan sitogenetik çalışmasında olguların %40'ında normal karyotip, %8,7'sinde del(5q), %4,5'inde +8 ve daha az sıklıkta +1q, 3q anomalileri, -7, del(7q), del(11q), del(12p), del (17p), del (20q), -Y tespit edilmiştir (101).

Rashid ve ark., primer MDS'li 122 olguda yaptığı çalışmada bulduğu sık anomalileri +8 (%9,9), -7/del(7q) (%4,2), -Y (%2,8), kompleks 5q (%2,8) şeklinde sıralamıştır (102).

Lai ve ark.'ın 2302 *de novo* MDS hastasında yaptığı konvansiyonel sitogenetik ve FISH bulgularını birleştiren çalışmada olguların %18,2'sinde +8, %16,2'sinde -7/del(7q), %13,1'inde -5/del(5q), %11,2'sinde del(20q) ve %6,2'sinde -Y analiz edilmiştir (103).

Çalışmamızda sitogenetik yöntemlerle analizi yapılan 23 olgunun dördünde yeterli kalitede metafaz elde edilemedi, altısında ise yeterli sayıma ulaşamadı. Olguların %43,4'ünde klonal kompleks anomaliler gözlemlendi. Sık gözlenen anomaliler %16,6 oranında -21, %12,5 oranında -17, -18, -20, -22 ve -Y, %8,4 oranında +3, -5, -9, +13, -15, -19, +21 şeklindedir. Ayrıca birer hastada +1, +2, +4, +5, +6, -6, +7, -7, +8, -8, +9, +10, -10, -11, +12, -12, +14, -14, +15, +16, -16, +18, +19, +22, +X ve +Y anomalisi klonal olarak bulunmuştur.

Elde ettiğimiz veriler MDS'de klonal sayısal anomali varlığıyla uyumludur.

Literatürde, MDS'de sık gözlenen anomaliler arasında olmayan ancak çalışmamızda yüksek oranda bulduğumuz -18, -21, -22 anomalileri, Deviren ve ark.'ın yaptığı çalışma ile örtüşmektedir.

Kawankar ve ark., farklı ülkelerde yapılan çalışmaları derlediği bir meta analiz çalışmasında kromozomal aberasyon sıklıklarının coğrafi ve etnik farklılıklara göre değiştiğini belirtmiştir (99). Bu da yukarıda bahsedildiği şekliyle, Türkiye kökenli iki çalışmanın benzer sonuçlara ulaşmasını açıklamaktadır.

Çalışmamızda MDS hastalarında en sık klonal kromozomal anomali olarak -21 ardından -17, -18, -20, -22 ve -Y anomalileri tespit edildi.

Bacher ve ark., nadir sitogenetik anomalileri derlediği bir çalışmada monozomi 21'e yer vermiştir. MDS'de izole -21'in %0,3 oranında, kompleks karyotipe sahip olgularda ise %0,5 oranında gözlemlendiğini bildirilmiştir (45). Schanz ve ark.'ın bildirdiği 8 izole -21 vakasında düşük periferik kan değerleri ve yüksek kemik iliği blast sayısı gözlenmiştir. İzole monozomi 21 orta risk grubunda sınıflandırılmıştır (12).

Marisavljević ve ark.'ın 271 MDS hastasında 17. kromozom anomalilerini derlediği çalışmada 13 olguda, bu kromozoma ait değişiklikler tespit edilmiştir. Beş olguda izole anomali bulunurken sekiz olguda kompleks kromozomal anomalilerle birlikte gözlenmiştir. Bu olgularda 17. kromozom delesyonları ve izokromozom 17q daha sık bulunmuştur. Kompleks karyotipe sahip olguların ise dördünde der(17), ikisinde monozomi 17, birer tanesinde del(17p) ve i(17q) tanımlanmıştır. Yapılan

incelemeler sonucunda 17. kromozomda meydana gelen aberasyonların MDS’de sık gözleendiği ve kötü prognozla ilişkilendirildiği bildirilmiştir (104).

DNA hasarına cevapta önemli rol oynayan tümör baskılayıcı gen *TP53*, 17p13.1 bölgesinde bulunmaktadır. 17. kromozomda meydana gelen aberasyonlar bir alelin kaybına neden olabilmekte ve ikinci alelde de baskılayıcı bir mutasyon gerçekleşmesi ile vakaların yaklaşık %70’inde *TP53* kaybedilmektedir. Bu nedenle 17. kromozom anomalileri önemli bulgu niteliği taşımaktadır (105).

Monozomi 18 ve del(18q) seyrek olmakla birlikte MDS’de kompleks kromozomal değişikliklerle birlikte bulunan ve rastgele olmayan bir anomalidir. Bu durum 18q21 bölgesinde yerleşik olan ve apoptoz düzenleyici rolü olan *BCL2* ile ilişkilendirilmektedir (106).

20. kromozomun q kolunda meydana gelen delesyonlar malin miyeloid bozukluklarda yaklaşık %5 oranında gözlenmektedir. Sık delesyonu gözlenen 20q12 bölgesinde aday bir tümör baskılayıcı gen belirlenemese de son araştırmalar Topoizomera I kodlayan genleri ve transkripsiyonel baskılayıcı proteinlerle ilişkili genleri içermesi bakımından hastalıkla ilişkili olabileceğini vurgulamıştır (105).

Araştırmalarımıza göre -22 bulgusunun MDS ile ilişkilendirildiği bir çalışmaya ulaşılamamıştır. Ancak Mori ve ark.’ın yaptığı bir çalışmada hematolojik neoplazmlarda monozomi 22 ve -22q bulgusu, *SNF5* geninin kaybı ile ilişkilendirilmiştir (107). *SNF5* (*SMARCB1*) geninin malin rabdoid tümörlerle ilişkili bir tümör baskılayıcı olduğu düşünülmektedir (108).

Y kromozomu kaybının biyolojik ve klinik önemi tam olarak bilinmemektedir. Y kromozomu kaybının malin hastalıklarda gözleendiği bildirilse de yaşlanma ile de ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu nedenle İngiltere Kanseri Sitogenetiği Grubu bu anomali üzerine kapsamlı bir araştırma yapmış ve herhangi bir hematolojik malin hastalığı olmayan hastaların %7,7’sinde, MDS hastalarının ise %10,7’sinde -Y tespit etmiştir. Bu nedenle Y kromozomu kaybının malin bir süreci bildirdiği görüşü yeterince güvenilir olmamaktadır (33).

Çalışmamızda klonal yapısal anomaliler düşük oranda gözleendi. Bir olguda del(21)(q22), bir olguda ins(X;?)(p11.2;??) ve bir olguda marker kromozom klonal olarak bulundu. Bir hastada ise tekrarlayan kromozomal boşluklar (gap’ler) ve kromatin kırıkları yaygın gözleendi.

MDS’de ailesel vakalar nadir olsa da miyelodisplazinin moleküler mekanizmasının aydınlatılması açısından önemlidir. Ailesel miyelodisplastik sendromlardan en iyi karakterize edilmiş olanı heterozigot germline *RUNX1* mutasyonunun neden olduğu miyeloid malinite eğilimli kalıtsal trombosit bozukluğudur. *RUNX1* hematopoezde düzenleyici rolü olan “Runt ilişkili transkripsiyon faktörü 1” proteinini kodlamaktadır ve 21q22 bölgesinde yerleşiktir. Bu nedenle 21q22 delesyonu bulunan kişilerde *RUNX1* kaybıyla ilişkilendirilen trombositopeni ve

MDS/AML gelişimi gözlenmiştir. Yapılan çalışmalar 21q22 lokusunda bulunan başka genlerin de MDS/AML gelişiminde etkili olabileceğini öngörmektedir (109).

Literatürdeki birçok çalışmada Xp11.2 lokusunda yer alan bazı genlerin yeniden düzenlenmesinin kanser gelişimiyle ilişkili olduğu bildirilmesine rağmen. MDS'de tanımlanmış ins(X) anomalisi bulunmamaktadır

Hodge ve ark Xp11.2'de yer alan *TFE3*(*Transcription Factor Binding to IGHM Enhancer 3*) yeniden düzenlenmesinin çocuklarda gelişen renal hücreli karsinomda belirgin bir bulgu olduğunu göstermiştir (110).

TFE3 geninin TGF- β sinyalizasyon yolağındaki bazı genlerin ekspresyonunda *enhancer* rolü üstlendiği bilinmektedir. Genin yeniden düzenlenme ile oluşan füzyon proteinlerine katılarak kanser oluşumuna neden olabileceği bildirilmiştir (111).

Zámečníkova bir olgu sunumunda pediatrik bir MDS hastasında küçük marker kromozom ve monozomi 7 bulgusunun birlikte seyrettiğini bildirmiştir. Yaptığı FISH çalışması sonucunda bu marker kromozomun 7. kromozom sentromerine sahip olduğunu göstermiştir. Monozomi 7'nin MDS ile rastgele olmayan ilişkisi, miyeloid büyüme ve farklılaşmayı düzenleyen bir veya daha fazla tümör baskılayıcı geni içermesi bakımından oldukça tutarlıdır (112).

Çalışmamızda bir olguda monozomi 7 ile marker kromozomun klonal olarak birlikteliğini görmek MDS'de kaybı anlamlı olan 7. kromozomun neden olduğu miyelodisplastik gelişime bir kanıt niteliğindedir ve bu birliktelik ileri çalışmaları gerektirmektedir.

Mitoza hazırlanan hücrelerde DNA eşlenirken çoğaltılması zor olan bazı bölgeler metafaz kromozomlarında mikroskobik boşluklara yol açar. Replikasyonda meydana gelen zorluk DNA dizisine özgü olmakla birlikte üçlü tekrar dizisi artışlarında yapılan çalışmalarda bazı transkripsiyon ve replikasyon paternleri nedeniyle kromozomal kırılğan bölgeler keşfedilmiştir. Bu bölgeler büyük genlerin kodlandığı geç replikasyona uğrayan bölgeler olarak tanımlanmıştır ve tüm bireylerde benzer özelliği göstermiştir (113). Durkin ve ark. nadir ve yaygın olarak sınıflandırılan 100 kromozomal kırılğan bölgeyi bir çalışmada derlemiştir. (114).

Çalışmamızda bazı olgularda birer sahada bazı olgularda ise ikiden fazla metafazda tekrarladığı gözlenen kırık ve gap bölgeleri, Durkin ve ark.'ın yaptığı çalışma referans olarak kontrol edildiğinde 1q25, 1q41.1, 2q21.1, 3q27, 5q21, 7q22, 9q22.1, 10q11.2, 10q22.1 lokuslarının nadir olarak sınıflandırılan kromozomal kırılğan bölgeler olduğu tespit edilmiştir.

Tüm bu bulgulardan hareketle oldukça heterojen klinik ve genetik özellik gösteren MDS hastalığında konvansiyonel sitogenetik incelemenin tüm kromozomal anomalileri göstermesi bakımından altın standart olduğu görülmektedir. Aynı zamanda elde edinilen klonal bulguların literatürde sık geçmese de aslında hastalığın altında yatan nedenlerle ilişkilendirilmesinde ileri araştırmaların önünü açabileceği gösterilmiştir.

MDS'in en yaygın alt tiplerinden biri olan, 5.kromozomun uzun kolunda meydana gelen delesyonlar ile karakterize 5q sendromu, nötropeni, refrakter anemi, atipik (hipolobulan) megakaryositlerle ilişkili normal veya yüksek trombosit sayımı ile gözlenmektedir. 5.kromozomun q33.1 bandında 1.5 megabazlık yaygın delesyon bölgesi olarak tanımlanmıştır ve bu bölge hematopoezde görevli birkaç gen içermektedir. 5q sendromunda gözlenen eritroid farklılaşma bozukluğu son zamanlarda 5q yaygın delesyon bölgesinde bulunan *RPS14* genine bağlanmıştır. Bununla birlikte Ribozomal Protein S14 proteini haplo-yetersizliği, klinikte ortaya çıkan megakaryositik displaziyi, nötropeniyi, klonal baskınlığı açıklayamamaktadır. Bu nedenle bu bölgedeki birkaç gen kaybının birlikte hastalığa neden olduğu düşünülmüştür (17).

5q31-34 bölgesinde yer alan hastalıkla ilişkili olabilecek 39 gen belirlenmiştir. Bunlardan bazıları IL-17 β (Interlökin 17 β), *PDE6A* (Siklik guanozin 3',5' Monofosfatın 6A α alt birimi), *CSF1R* (Kloni uyarıcı faktör 1 reseptörü), *IGRM* (İmmünite ilişkili GTPaz ailesi), *G3BP* (Ras GTPaz aktivite edici protein bağlayıcı protein) genleridir (115).

Bununla birlikte konvansiyonel sitogenetik analiz, kanser hücreleri gibi düşük *in vitro* mitotik aktiviteye, zayıf kromozom morfolojisine sahip hücrelerde zordur. Bu durumlarda metafaza ihtiyaç kalmadan interfaz hücrelerinde hedefe yönelik FISH analizi yapmak hızlı ve güvenilir tespit sağlamaktadır (116).

Diğer taraftan FISH yöntemi sadece belirli anomalilerin tespitine olanak verdiği için başka genetik değişikliklerin gözden kaçmasına neden olmaktadır. Bu nedenle genetik heterojenite gösteren hastalıklarda FISH ve sitogenetik analizin birlikte kullanımı düşünülmelidir. Çeşitli çalışmalar MDS'de kromozomal anomalilerin analizinin FISH ve sitogenetik kombinasyonu şeklinde yapılmasının tanıda anlamlı iyileştirme sağladığını göstermiştir (103).

Çalışmamızda, konvansiyonel sitogenetik yöntemle incelenen olgularda 5q delesyonu beklenen oranda gözlenmemiştir. Çalışmayı doğrulamak amacıyla 5q33-34 bölgesine komplementer prob kullanılarak delesyon düzeyi FISH metoduyla da incelenmiştir ve olgularda istatistiksel olarak anlamlı 5q delesyonu gözlenmemiştir.

miRNA'lar, gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan, kodlamayan bir RNA sınıfıdır. miRNA'lar genellikle hedef mRNA'larının 3'UTR bölgelerine bağlanarak mRNA degradasyonunu ya da translasyonel baskılamayı tetiklerler. Bununla birlikte miRNA'ların, mRNA'nın 5'UTR, kodlama dizisi ve gen promoter bölgeleri de dahil olmak üzere diğer bölgelerle de etkileşime girdiği bildirilmiştir. Bazı durumlarda miRNA'ların translasyonu etkin hale getirdiği veya transkripsiyonu düzenlediği de bilinmektedir. miRNA'ların hedefleriyle etkileşimi dinamik ve hücre içindeki yerleşimleri birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir. Aynı zamanda miRNA'lar, hücre-hücre iletişimine aracılık etmek amacıyla hücre dışı sıvılarla birlikte hedef hücrelere gitmek üzere eksozomlar gibi veziküller yoluyla salgılanabilir (117).

miRNA'ların hücre çoğalması, gelişmesi, farklılaşması, metabolizması, apoptoz ve hematopoez de dahil olmak birçok biyolojik etkinlikte düzenleyici kilit rol oynadığı

gösterilmiştir. miRNA'ların kan kanserlerinde önemi ilk olarak miRNA'ların çoğunun kırılğan bölgelerde ve kansere neden olan genomik bölgelerde bulunmasıyla belirlenmiş, daha sonra ise miRNA ifadesinin hematolojik malinitelerde ve solid tümörlerde dikkate değer biçimde değişmesinin tespit edilmesiyle kanıtlanmıştır. Hayvan model çalışmalarının yanı sıra fonksiyonel çalışmalarla da miRNA'ların hematolojik malinite patogeneze katkısı, kanserlerle ilişkili onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin düzenlenmesine etkisi ve miyeloid hastalıklarda epigenetik mekanizmaların düzenlenmesindeki rolü gösterilmiştir. Tüm insan miRNA'larının %70'den fazlasının MDS/AML hücre hatlarında tekrarlayan kopya sayısı değişiklik bölgesi içerisinde olduğu gözlenmiştir. Son zamanlarda yapılan mikroarray tabanlı birçok çalışmada MDS tanılı hastalarda çok sayıda miRNA'nın anormal ifadesi gösterilmiştir (118).

MDS'de sık anomali olan 5q delesyon bölgesinde (5q31-35) 13 miRNA kümesi haritalanmıştır. İzole 5q vakalarında haplo-yetersizliği olan bu miRNA'ların hastalığın spesifik klinik özelliklerinin ve malin klon baskınlığının gelişiminde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (16).

Starczynowski ve ark., -5q sendrom fenotipinin belirlenmesi için yaptığı miRNA çalışmasında hematopoetik kök hücrelerde bol miktarda bulunan miR-145 ve miR-146a kaybının önemli bulgu olduğunu göstermiş ve bu miRNA'ların hedefleri olarak *TIRAP* (Toll-İnterleukin-1 Receptor Domain-Containing Adaptor Protein) ve *TRAF6* (Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor-6) genlerini göstermiştir (17).

Çalışmamızda miR-146a ve miR-145 ifade seviyeleri incelendiğinde miR-146a'nın tüm hastalarda istatistiksel olarak azaldığı gösterilmiştir ($p=0,0003$). Ancak beklediğimiz şekilde miRNA ifadesinin azalması 5q delesyonu ile doğrudan ilişkilendirilememiştir. Bu durum MDS'de miRNA ifadesinin azalmasının delesyonlarla olabileceği gibi aynı zamanda transkripsiyonel/post-transkripsiyonel mekanizmalarla düzenlendiğini düşündürmektedir.

miRNA ifade seviyesindeki değişiklikler biyogenezi sırasında etkileştiği enzim ve kofaktörlerle ilişkilendirilebildiği gibi epigenetik yollarla, transkripsiyon faktörleriyle de düzenlenebilir. Hedef mRNA'ların miRNA ile etkileştiği bölgelerde meydana gelen mutasyonlar ya da hedef bölgelerin bazı proteinlerce kapatılması gibi durumlarla birlikte miRNA'ların endojen ceRNA'larla bağlanması da hedefi ile miRNA'ların etkileşimini engelleyebilmektedir (119).

Çalışmamızda özgün olarak miR-146a'nın literatürde MDS ile ilişkilendirilmemiş hedef geni *SMAD2* olarak belirlenmiştir. miR-146a'nın *SMAD2*'yi hedeflediği düşünülen bir yayın bulunmaktadır.

Cheung ve ark.'ın insan fetal femur kökenli iskelet kök hücrelerinde yaptığı çalışmada, miR-146a'nın hücre farklılaşmasını *SMAD2/SMAD3*'ü baskılayarak düzenlediğini gösterilmiştir. miR-146a bu düzenlemeyi *SMAD2* mRNA'sının 3'UTR bölgesine bağlanarak yapmaktadır (20).

SMAD2, TGF- β sinyal yolağında hücre içi aracı bir proteindir. Bu protein sinyalleşme sırasında diğer kofaktörlerle birleşerek kök hücreler üzerinde biyolojik etkilere yol açmak üzere nükleusa göç etmektedir. TGF- β bir miyelo-baskılayıcı sitokin olup, sitokinlerin hematopoetik hücrelerde dengesi hematopoezi düzenler. Baskılayıcı sitokinlerin artması etkisiz hematopoeze neden olur (19, 82).

Yaptığımız çalışma sonucu miR-146a ile *SMAD2* arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir korelasyon gözlenmemiştir. Ancak olguların %41,6'sında miR-146a'nın ifadesi azalırken *SMAD2*'nin ifadesi artmakta olduğu gerçeği, bu durumun hasta sayısının azlığına bağlı olduğunu düşündürmektedir. Bulgularımızın hipotezimizi destekler nitelikte olması nedeniyle, olgu sayısı artırılarak istatistiksel anlamlılığın yakalanabileceğini düşünülmektedir.

Bununla birlikte *miRTarBase* veri tabanına göre *SMAD2* mRNA'sını hedeflediği düşünülen 77 adet miRNA bulunmaktadır. Bu durum göz önüne alındığında çalışmamızda tüm olgularda miR-146a azalırken *SMAD2* ifadesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmaması yalnız başına miR-146a'nın *SMAD2* üzerinde etkili olmadığını düşündürmektedir.

SMAD2'yi hedef alan miRNA'lerden biri de miR-145'dir. Çalışmamızda miR-145 ve *SMAD2* ifadesi arasında istatistiksel anlamlılık bulunmuştur ($p=0,04$). Sekiz olguda miR-145 ve *SMAD2* arasında negatif korelasyon gözlenirken iki olguda her ikisinin de ifadesi değişmemiştir.

Ayrıca beş olguda miR-146a ifadesi azalırken miR-145 ifadesi artmış ve *SMAD2* ifadesi değişmemiştir. Dört olguda her iki miRNA ifadesi de azalırken *SMAD2* ifadesi artmıştır. Bir olguda ise miR-146a azalmış, miR-145 değişmemiş ve *SMAD2* ifadesi artmıştır. Bu durum miRNA'lar ile hedefi arasında anlamlı bir uyum olduğunu düşündürmektedir.

Olgu sayısı artırılarak, kesin tanı almış hastalarla yapılacak bir çalışmayla MDS'de miR-146a/miR-145'in *SMAD2* düzenlenmesindeki rolüyle hastalığın moleküler mekanizmasını aydınlatmada TGF- β aday bir sinyal yolağı olabilir.

İleride yapılabilecek çalışmalar ile miR-146a'nın gen ifadesindeki değişime yol açabilecek epigenetik mekanizmalar incelenebilir. miR-146a'nın hedefi olan diğer genler de değerlendirilerek hastalığın etiyopatogenezine etkisi araştırılmalıdır. Son olarak, MDS'de etkin olan genleri saptamak amacıyla yeni nesil dizileme sistemleri kullanılarak tüm ekzom ve transkriptom analizleri yapılabilir. Nadir görülen bir hastalık olan MDS'nin mekanizmasının aydınlatılması ile bu hastalığa yönelik yeni tedavi yöntemleri ve ilaçlar geliştirilerek sosyal sistem ve toplum üzerindeki yük hafifletilebilir.

KAYNAKLAR

1. Rieger MA, Schroeder T. Hematopoiesis. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012;4(12).
2. Wickrema A, Kee B. Molecular basis of hematopoiesis: Springer; 2009.
3. Campbell LJ. Cancer cytogenetics: methods and protocols: Humana Press; 2011.
4. Garcia-Manero G, Jahnke A. Myelodysplastic syndromes: 2015 Update on diagnosis, risk-stratification and management. 2015;90(9):831-41.
5. Charles Wiener M, Kasper DL, Fauci AS, Stephen L, Hauser M, Longo DL, et al. Harrison's Principles of Internal Medicine Self-Assessment and Board Review. 2012.
6. Hoffman R, Benz Jr EJ, Silberstein LE, Heslop H, Anastasi J, Weitz J. Hematology: basic principles and practice: Elsevier Health Sciences; 2013.
7. Ades L, Itzykson R, Fenaux P. Myelodysplastic syndromes. Lancet. 2014;383(9936):2239-52.
8. Zhou J, Orazi A, Czader MB. Myelodysplastic syndromes. Semin Diagn Pathol. 2011;28(4):258-72.
9. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. N Engl J Med. 2011;364(26):2496-506.
10. Samiev D, Bhatt VR, Armitage JD, Maness LJ, Akhtari M. A primary care approach to myelodysplastic syndromes. Korean J Fam Med. 2014;35(3):111-8.
11. Jonas BA, Greenberg PL. MDS prognostic scoring systems - past, present, and future. Best Pract Res Clin Haematol. 2015;28(1):3-13.
12. Schanz J, Tuchler H, Sole F, Mallo M, Luno E, Cervera J, et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. J Clin Oncol. 2012;30(8):820-9.
13. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 2004;116(2):281-97.
14. Dong H, Lei J, Ding L, Wen Y, Ju H, Zhang X. MicroRNA: function, detection, and bioanalysis. Chem Rev. 2013;113(8):6207-33.
15. Li J. Myelodysplastic syndrome hematopoietic stem cell. Int J Cancer. 2013;133(3):525-33.
16. Macedo LC, Silvestre AP, Rodrigues C, de Alencar JB, Zacarias JM, Ambrosio-Albuquerque EP, et al. Genetics factors associated with myelodysplastic syndromes. Blood Cells Mol Dis. 2015;55(1):76-81.
17. Starczynowski DT, Kuchenbauer F, Argiropoulos B, Sung S, Morin R, Muranyi A, et al. Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q- syndrome phenotype. Nat Med. 2010;16(1):49-58.

18. Massague J. TGFbeta signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(10):616-30.
19. Bhagat TD, Zhou L, Sokol L, Kessel R, Caceres G, Gundabolu K, et al. miR-21 mediates hematopoietic suppression in MDS by activating TGF-beta signaling. *Blood.* 2013;121(15):2875-81.
20. Cheung KS, Sposito N, Stumpf PS, Wilson DI, Sanchez-Elsner T, Oreffo RO. MicroRNA-146a regulates human foetal femur derived skeletal stem cell differentiation by down-regulating SMAD2 and SMAD3. *PLoS One.* 2014;9(6):e98063.
21. Fang S, Xu C, Zhang Y, Xue C, Yang C, Bi H, et al. Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomal MicroRNAs Suppress Myofibroblast Differentiation by Inhibiting the Transforming Growth Factor-beta/SMAD2 Pathway During Wound Healing. *Stem Cells Transl Med.* 2016;5(10):1425-39.
22. Kondo M, Scherer DC, King AG, Manz MG, Weissman IL. Lymphocyte development from hematopoietic stem cells. *Curr Opin Genet Dev.* 2001;11(5):520-6.
23. Tavian M, Peault BJJJoDB. Embryonic development of the human hematopoietic system. 2003;49(2-3):243-50.
24. Domen J, Wagers A, Weissman ILJRM. Bone marrow (hematopoietic) stem cells. 2006:13.
25. Sun T. Flow cytometry and immunohistochemistry for hematologic neoplasms: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
26. Reagan MR, Rosen CJNRR. Navigating the bone marrow niche: translational insights and cancer-driven dysfunction. 2016;12(3):154.
27. Sekeres MA. The epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2010;24(2):287-94.
28. Cecil RLF, Goldman L, Schafer AI. Goldman's Cecil Medicine, Expert Consult Premium Edition--Enhanced Online Features and Print, Single Volume, 24: Goldman's Cecil Medicine: Elsevier Health Sciences; 2012.
29. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. 2009;114(5):937-51.
30. Garcia-Manero G. Myelodysplastic syndromes: 2014 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 2014;89(1):97-108.
31. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 1997;89(6):2079-88.
32. Malcovati L, Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, Boni M, Travaglini E, et al. Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making. *J Clin Oncol.* 2005;23(30):7594-603.
33. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Sole F, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2012;120(12):2454-65.

34. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 1982;51(2):189-99.
35. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016;127(20):2391-405.
36. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood.* 2002;100(7):2292-302.
37. Visconte V, Tiu RV, Rogers HJ. Pathogenesis of myelodysplastic syndromes: an overview of molecular and non-molecular aspects of the disease. *Blood Res.* 2014;49(4):216-27.
38. Zahid MF, Malik UA, Sohail M, Hassan IN, Ali S, Shaukat MHS. Cytogenetic Abnormalities in Myelodysplastic Syndromes: An Overview. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.* 2017;11(3):231-9.
39. Naeim F, Rao PN, Grody WW. Hematopathology: morphology, immunophenotype, cytogenetics, and molecular approaches: Academic Press; 2009.
40. Haase D, Germing U, Schanz J, Pfeilstocker M, Nosslinger T, Hildebrandt B, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood.* 2007;110(13):4385-95.
41. Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Mutations of AML1 are common in therapy-related myelodysplasia following therapy with alkylating agents and are significantly associated with deletion or loss of chromosome arm 7q and with subsequent leukemic transformation. *Blood.* 2004;104(5):1474-81.
42. Pellagatti A, Boulwood J. The molecular pathogenesis of the myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol.* 2015;95(1):3-15.
43. Nilsson L, Astrand-Grundstrom I, Anderson K, Arvidsson I, Hokland P, Bryder D, et al. Involvement and functional impairment of the CD34(+)CD38(-)Thy-1(+) hematopoietic stem cell pool in myelodysplastic syndromes with trisomy 8. *Blood.* 2002;100(1):259-67.
44. Sloand EM, Pfannes L, Chen G, Shah S, Solomou EE, Barrett J, et al. CD34 cells from patients with trisomy 8 myelodysplastic syndrome (MDS) express early apoptotic markers but avoid programmed cell death by up-regulation of antiapoptotic proteins. *Blood.* 2007;109(6):2399-405.
45. Bacher U, Schanz J, Bräulke F, Haase D. Rare cytogenetic abnormalities in myelodysplastic syndromes. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2015;7(1):e2015034.
46. Manola KN, Sambani C, Karakasis D, Kalliakosta G, Harhalakis N, Papaioannou M. Leukemias associated with Turner syndrome: report of three cases and review of the literature. *Leuk Res.* 2008;32(3):481-6.
47. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood.* 2010;116(3):354-65.

48. Kanagal-Shamanna R, Luthra R, Yin CC, Patel KP, Takahashi K, Lu X, et al. Myeloid neoplasms with isolated isochromosome 17q demonstrate a high frequency of mutations in SETBP1, SRSF2, ASXL1 and NRAS. *Oncotarget*. 2016;7(12):14251-8.
49. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boulton J, Malcovati L, Vyas P, Bowen D, et al. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N Engl J Med*. 2011;365(15):1384-95.
50. Malcovati L, Papaemmanuil E, Bowen DT, Boulton J, Della Porta MG, Pascutto C, et al. Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011;118(24):6239-46.
51. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011;478(7367):64-9.
52. Issa JP. Epigenetic changes in the myelodysplastic syndrome. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2010;24(2):317-30.
53. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*. 2010;18(6):553-67.
54. Raza A, Galili N. The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(12):849-59.
55. Raddatz G, Gao Q, Bender S, Jaenisch R, Lyko F. Dnmt3a protects active chromosome domains against cancer-associated hypomethylation. *PLoS Genet*. 2012;8(12):e1003146.
56. Ernst T, Chase AJ, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, Jones AV, et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet*. 2010;42(8):722-6.
57. Shih LY, Huang CF, Wang PN, Wu JH, Lin TL, Dunn P, et al. Acquisition of FLT3 or N-ras mutations is frequently associated with progression of myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2004;18(3):466-75.
58. Ceesay MM, Lea NC, Ingram W, Westwood NB, Gaken J, Mohamedali A, et al. The JAK2 V617F mutation is rare in RARS but common in RARS-T. *Leukemia*. 2006;20(11):2060-1.
59. Kulasekararaj AG, Smith AE, Mian SA, Mohamedali AM, Krishnamurthy P, Lea NC, et al. TP53 mutations in myelodysplastic syndrome are strongly correlated with aberrations of chromosome 5, and correlate with adverse prognosis. *Br J Haematol*. 2013;160(5):660-72.
60. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. 2004;5(7):522-31.
61. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004;23(20):4051-60.
62. Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*. 2004;432(7014):235-40.

63. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425(6956):415-9.
64. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*. 2004;10(2):185-91.
65. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 2000;404(6775):293-6.
66. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136(2):215-33.
67. Yue J. miRNA and vascular cell movement. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;63(8):616-22.
68. Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol*. 2005;7(7):719-23.
69. Michael MZ, SM OC, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res*. 2003;1(12):882-91.
70. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*. 2007;302(1):1-12.
71. Jansson MD, Lund AH. MicroRNA and cancer. *Mol Oncol*. 2012;6(6):590-610.
72. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005;353(17):1793-801.
73. Sokol L, Caceres G, Volinia S, Alder H, Nuovo GJ, Liu CG, et al. Identification of a risk dependent microRNA expression signature in myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 2011;153(1):24-32.
74. Starczynowski DT, Morin R, McPherson A, Lam J, Chari R, Wegrzyn J, et al. Genome-wide identification of human microRNAs located in leukemia-associated genomic alterations. *Blood*. 2011;117(2):595-607.
75. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*. 2007;129(7):1401-14.
76. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol*. 2002;12(9):735-9.
77. Wu MY, Hill CS. Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis. *Dev Cell*. 2009;16(3):329-43.
78. Mullen AC, Orlando DA, Newman JJ, Loven J, Kumar RM, Bilodeau S, et al. Master transcription factors determine cell-type-specific responses to TGF-beta signaling. *Cell*. 2011;147(3):565-76.

79. Trompouki E, Bowman TV, Lawton LN, Fan ZP, Wu DC, DiBiase A, et al. Lineage regulators direct BMP and Wnt pathways to cell-specific programs during differentiation and regeneration. *Cell*. 2011;147(3):577-89.
80. Xu F, Liu C, Zhou D, Zhang L. TGF-beta/SMAD Pathway and Its Regulation in Hepatic Fibrosis. *J Histochem Cytochem*. 2016;64(3):157-67.
81. Li N, Xie C, Lu NH. Transforming growth factor-beta: an important mediator in *Helicobacter pylori*-associated pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2015;5:77.
82. Bachegowda L, Gligich O, Mantzaris I, Schinke C, Wyville D, Carrillo T, et al. Signal transduction inhibitors in treatment of myelodysplastic syndromes. *J Hematol Oncol*. 2013;6:50.
83. Abbott Molecular Oncology And Genetics U.S. Product Catalog. Şikago, Illinois, ABD, 2016.
84. Berker SK. Temel Sitogenetik. Moleküler Hematoloji, Klinik Hematoloji İçin Pratik Genetik Yaklaşım Kursu. 2006.
85. Nomenclature ISCoHC. ISCN: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2016): Karger; 2016.
86. Klug WS, Cummings MR, Spencer CA, Palladino MA, Ward SM. Concepts of genetics: Pearson; 2009.
87. Squire JA, Marrano P, Kolomietz EJF, practical approach. Edited by B. Beatty, S. Mai, J. Squire. Oxford University Press NY, NY. FISH in clinical cytogenetics. 2002:183-202.
88. Durak B. Hematolojide FISH. Türk Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi, Temel Moleküler Hematoloji Kursu. 2005.
89. Gersen SL. History of Clinical Cytogenetics. The Principles of Clinical Cytogenetics: Springer; 2013. p. 3-8.
90. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson Genetics in Medicine E-Book: Elsevier Health Sciences; 2015.
91. McNeil N, Ried T. Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: technology and applications in molecular medicine. *Expert Rev Mol Med*. 2000;2000:1-14.
92. Günel T. Gen Anlatımının Kantitatif Analizi 'Real Time PCR'. Türkiye Klinikleri J Med Sci. 2007.
93. Smith CJ, Osborn AM. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol*. 2009;67(1):6-20.
94. T. Günel KA. 'Real-Time PCR' ve Uygulama Alanları. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi. 2009.
95. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
96. Arsham MS, Barch MJ, Lawce HJ. The AGT cytogenetics laboratory manual: John Wiley & Sons; 2017.

97. Loken MR, van de Loosdrecht A, Ogata K, Orfao A, Wells DA. Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from a working conference. *Leuk Res.* 2008;32(1):5-17.
98. Haferlach T. Molecular genetics in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res.* 2012;36(12):1459-62.
99. Kawankar N, Vundinti BR. Cytogenetic abnormalities in myelodysplastic syndrome: an overview. *Hematology.* 2011;16(3):131-8.
100. Deviren A, Msc IMG, Msc SY, Hacıhanefioglu SJTKTBD. Cytogenetic Evaluation in 221 Untreated Patients with Myelodysplastic Syndrome/Tedavi Almamis 221 Miyelodisplastik Sendromlu Hastada Sitogenetik Degerlendirme. 2012;32(1):15.
101. Bernasconi P, Klersy C, Boni M, Cavigliano PM, Calatroni S, Giardini I, et al. World Health Organization classification in combination with cytogenetic markers improves the prognostic stratification of patients with de novo primary myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 2007;137(3):193-205.
102. Rashid A, Khurshid M, Shaikh U, Adil S. Chromosomal abnormalities in primary myelodysplastic syndrome. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2014;24(9):632-5.
103. Lai YY, Huang XJ, Li J, Zou P, Xu ZF, Sun H, et al. Standardized fluorescence in situ hybridization testing based on an appropriate panel of probes more effectively identifies common cytogenetic abnormalities in myelodysplastic syndromes than conventional cytogenetic analysis: a multicenter prospective study of 2302 patients in China. *Leuk Res.* 2015;39(5):530-5.
104. Marisavljevic D, Rolovic Z, Panitic M, Novak A, Djordjevic V, Lazarevic V, et al. [Chromosome 17 abnormalities in patients with primary myelodysplastic syndrome: incidence and biologic significance]. *Srp Arh Celok Lek.* 2004;132(1-2):10-3.
105. Heim S, Mitelman F. *Cancer cytogenetics*: Wiley Online Library; 2009.
106. Berger R, Le Coniat M, Derre J, Flexor MA, Hillion J. Abnormalities of chromosome 18 in myelodysplastic syndromes and secondary leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 1992;63(2):97-9.
107. Mori N, Inoue K, Okada M, Motoji T. Absence of mutations on the SNF5 gene in hematological neoplasms with chromosome 22 abnormalities. *Acta Haematol.* 2011;126(2):69-75.
108. Chatterjee SS, Biswas M, Boila LD, Banerjee D, Sengupta A. SMARCB1 Deficiency Integrates Epigenetic Signals to Oncogenic Gene Expression Program Maintenance in Human Acute Myeloid Leukemia. *Mol Cancer Res.* 2018;16(5):791-804.
109. Liew E, Owen C. Familial myelodysplastic syndromes: a review of the literature. *Haematologica.* 2011;96(10):1536-42.
110. Hodge JC, Pearce KE, Wang X, Wiktor AE, Oliveira AM, Greipp PT. Molecular cytogenetic analysis for TFE3 rearrangement in Xp11.2 renal cell carcinoma and alveolar soft part sarcoma: validation and clinical experience with 75 cases. *Mod Pathol.* 2014;27(1):113-27.

111. Verma SP, Das P. G-quadruplex structure at intron 2 of TFE3 and its role in Xp11.2 translocation and splicing. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2018;1862(3):630-6.
112. Zamecnikova A. Small marker chromosome and monosomy 7 in a pediatric patient with MDS. *Cancer Genet Cytogenet*. 2008;180(2):163-4.
113. Voutsinos V, Munk SHN, Oestergaard VH. Common Chromosomal Fragile Sites-Conserved Failure Stories. *Genes (Basel)*. 2018;9(12).
114. Durkin SG, Glover TW. Chromosome fragile sites. *Annu Rev Genet*. 2007;41:169-92.
115. Giagounidis AA, Germing U, Aul C. Biological and prognostic significance of chromosome 5q deletions in myeloid malignancies. *Clin Cancer Res*. 2006;12(1):5-10.
116. Kokate P, Dalvi R, Koppaka N, Mandava S. Prognostic classification of MDS is improved by the inclusion of FISH panel testing with conventional cytogenetics. *Cancer Genet*. 2017;216-217:120-7.
117. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:402.
118. Song SJ, Pandolfi PP. MicroRNAs in the pathogenesis of myelodysplastic syndromes and myeloid leukaemia. *Curr Opin Hematol*. 2014;21(4):276-82.
119. Jansson MD, Lund AHJMo. MicroRNA and cancer. 2012;6(6):590-610.

HAM VERİLER



FORMLAR

ASGARİ BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Miyelodisplastik sendrom (MDS); miyelo ve displazi kelimelerinin birleşimiyle tanımlanan bir hastalık grubudur. Miyelo kelimesi kemik iliği ve dolaşımdaki kanda bulunan granüllü beyaz kan hücrelerini, displazi kelimesi ise kan hücrelerinin anormal oluşunu ifade etmektedir. Miyelodisplastik sendrom hastalarında kemik iliğinde yapılan kan hücrelerinin olgunlaşmaması ve aynı zamanda normal hücrelerden farklı bir olgunlaşma söz konusudur.

MDS’li hastalarda kan yapımının azalması sonucu kırmızı kan hücrelerinde azalma (anemi) ve kan hücrelerinde kalite bozukluğu nedeniyle işlev görememe tablosu ortaya çıkar. Bazı hastalarda ise MDS ilerleyen safhalarda lösemiye dönüşmektedir.

MDS her yaşta görülmekle birlikte genellikle 40 yaş üzerinde sıktır. MDS’nin sebebinin tam olarak bilinmemesinin yanında küçük yaşlarda Fanconi Anemisi olan çocuklarda ortaya çıktığı yaşıyla artmasıyla beraber ise kimyasallara maruziyet, radyoterapi ve ilaç kullanımı sonrasında ortaya çıktığı gözlenmiştir.

Hastaların büyük bölümünde özellikle 5, 7, 8, 11, 12 ve 20. kromozomda bozukluklar gözlenmektedir.

Bu çalışmada MDS’nin sebeplerinin aydınlatılması amacıyla hastalardan alınan kemik iliği materyalinde mikroRNA-146a ve SMAD2 geninin ifadeleri incelenecek ve hastalıkla ilişkisi araştırılacaktır. Aynı zamanda MDS’de en sık gözlenen 5.kromozomun uzun kolunda delesyon varlığı kontrol edilecek ve miR-146a’nın ifadesinin bu bölgenin kaybıyla ilişkili olup olmadığına bakılacaktır.

Bu çalışma için, rutin tetkik amacıyla verdiğiniz kemik iliği materyaliniz araştırma amacıyla laboratuvarımızda kullanılacaktır.

Kabul etmeniz halinde katılacağınız çalışmada kemik iliği materyalinizden miR-146a ve SMAD2 geninin ifadeleri qRT-PCR metoduyla incelenecek, sitogenetik laboratuvarında karyotipleme ile kromozomal analiziniz yapılacak ve 5. kromozomun uzun kolunda delesyon kontrolü yapılacaktır.

Gönüllü olarak sizin araştırma üzerinde herhangi bir sorumluluğunuz bulunmamaktadır.

Araştırma boyunca sizden bir maddi katkı talebi olmayacaktır. Bağlı olduğunuz sağlık kurumuna (SGK) herhangi bir ücret ödetilmeyecektir. Sizin için herhangi bir rahatsızlık veya risk oluşturmayacak bu çalışma, kısa dönemde size bir fayda da sağlamayacaktır. Ancak uzun dönemde hastalığın gelişiminin daha iyi anlaşılabilmesini ve alternatif tedavi geliştirebilmek için çalışma önemlidir.

Araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlı olup çalışmada yer almayı reddedebilirsiniz. Reddetmeniz halinde yararınıza engel ya da cezai bir durum

ortaya çıkmayacaktır. İzleyiciler, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar size ait tıbbi bilgilere ulaşılabilir ancak bu bilgiler gizli tutulacaktır.

Siz veya yasal temsilciniz bilgilendirilmiş gönüllü olur formunu imzalamakla bunu kabul etmiş olacaksınız. Ayrıca kimliğinizi ortaya koyacak kayıtlar da gizli tutulacaktır. Araştırma esnasında sizi ilgilendirecek bir bilgi söz konusu olduğunda siz veya yasal temsilcinize derhal haber verilecektir.

Sizin araştırma hakkında veya araştırmayla ilgili herhangi bir olay hakkında daha fazla bilgi temin edebilmeniz için temasa geçebileceğiniz kişiler ve/veya araştırmacılara günün içinde erişebileceğiniz telefon numarası; (0212) 414 30 00 - 21801'dir. Araştırmada yer alacağınız öngörülen süre maksimum bir buçuk yıl olacaktır. Araştırmaya katılması beklenen gönüllü sayısı 30'dur.

Hasta Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum, dinledim, anladım, istediğim soruları sordum ve cevapları aldım. Bu klinik araştırmaya gönüllü olarak hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

“Miyelodisplastik sendromda ve lösemilerde miR-146a'nın TGF-β sinyal regülasyonundaki rolü ve 5q delesyonu ile ilişkisinin incelenmesi” adlı çalışma kapsamında alınan kemik iliği materyalimin;

Sadece yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum.

☐

İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum.

☐

Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.

☐

Hasta/ hasta yakını adı, soyadı

İmzası

Tarih

Açıklama yapan araştırmacı adı, soyadı

İmzası

Tarih

Olur alma işlemine tanık olan kişinin
adı, soyadı

İmzası

Tarih

ETİK KURUL KARARI

Tarih ve Sayı: 07/12/2016-441622



T.C.
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu



Sayı :83045809-604.01.02-
Konu :Yüksek Lis. Öğr. Seda
SÜSGÜN'nün etik kurul kararı A-18

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

İlgi :16.11.2016 tarihli, 414947 sayılı yazı:

Anabilim Dalınız öğretim üyesi **Doç.Dr. Yelda Tarkan ARGÜDEN**'nin danışmanlığında **Doç.Dr. Şeniz Öngören AYDIN**'nin yardımcılığında **Yüksek Lisans Öğr. Seda SÜSGÜN**'nün sorumluluğunda yürütülecek olan " Miyelodisplastik Sendromda ve Lösemilerde mir146a'nın TGF- β Sinyal Regülasyonundaki Rolü ve 5q Delesyonu ile İlişkisinin İncelenmesi" başlıklı **Yüksek Lisans Tezi** hakkında ilgi yazınız ve ekleri **06 Aralık 2016** tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup; Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği alınması koşuluyla etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-İmzalı
Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR
Başkan

EK :
1 dosya elden teslim edilecektir.

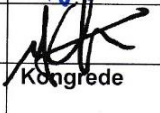
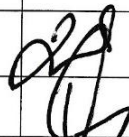
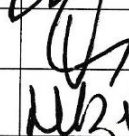
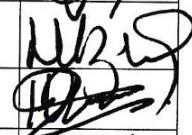
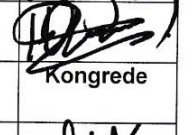
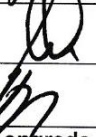
Doğrulamak İçin: <http://194.27.128.66/envision.Sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BE6EL92AT>

Ayrıntılı bilgi için irtibat : Güler SOYDANER Dahili : 22300

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa/ İSTANBUL
Tel : 0 (212) 414 30 00 21107- 21108 Fax : 0 (212) 632 00 33
e-posta : ctfpersonel@istanbul.edu.tr Elektronik Ağ : www.istanbul.edu.tr

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: A-18	Tarih: 06 Aralık 2016
	Doç.Dr. Yelda Tarkan ARGÜDEN'nin danışmanlığında Doç.Dr. Şeniz Öngören AYDIN'nın yardımcılığında Yüksek Lisans Öğr. Seda SÜSGÜN'nün sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	

ÇALIŞMA ESASI	İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI: Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR	

ETİK KURUL ÜYELERİ						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *	Katılım **	İmza
Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR (Başkan)	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Mehmet Faik ÖZÇELİK (Başkan Yard.)	Genel Cerrahi	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Muhlis Cem AR (Raportör)	İç Hastalıkları Hematoloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	Kongrede
Prof. Dr. Zeki ÖNGEN	Kardiyoloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Öner SÜZER	Farmakoloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Nurten Uzun ADATEPE	Nöroloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Hakkı Oktay SEYMEN	Fizyoloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Ayşe Pervin Sutaş BOZKURT	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	K	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	Kongrede
Prof. Dr. Gülten DİNÇ	Deontoloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Suphi VEHİD	Halk Sağlığı	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç.Dr.Zeynep Hande TURNA	İç Hastalıkları Medikal Onkoloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Mutlu NİYZOĞLU	İç Hastalıkları	İst. Eğitim ve Araştırma Hast.	E	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	Kongrede
Avukat Ayfer DİKMEN	Ticaret ve Sağlık Hukuku	Serbest Hukuk Bürosu	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Zümrüt GAMLI	Emekli Öğretmen	Sivil Üye	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

* :Araştırma ile İlişki

** :Toplantıda Bulunma

GİRİŞİMSSEL OLMAYAN İLAÇ DIŞI KLİNİK ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ETİK KURUL DEĞERLENDİRME FORMU

ETİK KURULUN ADI	İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
AÇIK ADRES	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dekanlık Binası, 34303 Kocamustafapaşa Fatih İstanbul
TELEFON	+90 (212) 414 32 52; 414 30 00/22300
FAKS	+90 (212) 632 00 40
E-POSTA	ctfetik@istanbul.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Miyelodisplastik sendromda ve lösemilerde mir146a'nın TGF- β sinyal regülasyonundaki rolü ve 5q delesyonu ile ilişkisinin incelenmesi			
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Yüksek Lisans Öğrencisi Seda SÜSGÜN			
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	GENETİK			
	KOORDİNATÖRÜN ÜNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Yelda TARKAN ARGÜDEN			
	KOORDİNATÖRÜN UZMANLIK ALANI	SİTOGENETİK			
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	TIBBİ BİYOLOJİ ABD			
	ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ	İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Binası, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Sitogenetik laboratuvarı			
	BAŞVURULAN ETİK KURULUN ADI	İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu			
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	İstanbul Üniversitesi Merkez Kampüsü 34119 Beyazıt/Fatih/İstanbul			
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ ☐ DOKTORA TEZİ ☐ YÜKSEK LİSANS TEZİ ☒	AKADEMİK AMAÇLI ☐ YANDAL UZMANLIK TEZİ ☐		
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	☐ Anket çalışması ☐ Retrospektif (geriye dönük) araştırma ☐ Girişimsel (invaziv) olmayan klinik araştırma ☒ Rutin tetkik ve tedavi işlemleri sırasında elde edilmiş materyallerle (kan, idrar, gayta, doku, görüntü gibi) yapılan çalışma ☐ Hemşirelik faaliyetlerinin sınırı içerisinde yapılan araştırma ☐ Vücut fizyolojisi çalışması ☐ Antropometrik ölçümlere dayalı çalışma ☐ Yaşam alışkanlıklarının değerlendirilmesi çalışması DIĞER ☐ Diğer ise belirtiniz:			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	DIĞER			Açıklama:

PATENT HAKKI İZİNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

MİYELODİSPLASTİK SENDROMDA VE LÖSEMİLERDE MİR146A'NIN TGF- B SİNYAL REGÜLASYONUNDAKİ ROLÜ VE 5q DELESYONU İLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

ORJİNALLIK RAPORU

%4

BENZERLİK ENDEKSİ

%1İNTERNET
KAYNAKLARI**%1**

YAYINLAR

%4

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%2
2	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	<%1
3	Submitted to Mersin Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
4	Submitted to Erciyes Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
5	www.haematologica.org İnternet Kaynağı	<%1
6	Submitted to Istanbul Medipol Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
7	www.sciencedirect.com İnternet Kaynağı	<%1
8	thd.org.tr İnternet Kaynağı	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	SEDA	Soyadı	SÜSGÜN
Doğ.Yeri	SEYHAN/ADANA	Doğ.Tar.	31.10.1992
Uyruğu	T.C	TC Kim No	13171314258
Email	sedasusgun@gmail.com	Tel	0531 946 8108

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi	2019
Lisans	Haliç Üniversitesi	2015
Lise	Fatih Terim Lisesi	2010

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

Görevi	Kurum	Süre (Yıl-Yıl)
1. Araştırma Görevlisi	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	2018-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	YÖKDİL
İngilizce	İyi	Orta	İyi	81.25

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	87.47681		

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

- I. Boğaziçi Üniversitesi Bilim Kulübü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Hafta Sonu VIII
- II. İstanbul Üniversitesi İÜGEN, Uluslararası X. İÜGEN Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kış Okulu
- III. T.C. Haliç Üniversitesi HÜGEN, I. Tüp Bebek Paneli
- IV. T.C. Haliç Üniversitesi HÜGEN, I. Onkoloji Sempozyumu
- V. T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi MOBİGEN, II. Kök Hücre Temelli Tedavilerde Güncel Yaklaşımlar Çalıştayı
- VI. Türk Hematoloji Derneği Araştırma Projelerine Destek Programı kapsamında ‘Miyelodisplastik sendromda ve lösemilerde miR-146a’nın TGF- β sinyal regülasyonundaki rolü ve 5q delesyonu ile ilişkisinin incelenmesi’ başlıklı yüksek lisans tez projesi desteklenmektedir. (2017-2019)
- VII. Kucukkaya, B., H. Basoglu, D. Erdag, F. Akbas, S. Susgun, and L. Yalcintepe. "Calcium Homeostasis in Cisplatin Resistant Epithelial Ovarian Cancer." Gen Physiol Biophys (2019).