

**Sebnem YANIK**  
**PEHLIVANOĞLU**

**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İSTANBUL-2021**



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

**( YÜKSEK LİSANS TEZİ )**

**PEDİATRİK AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMI  
OLGULARINDA MINIMAL REZİDÜEL HASTALIĞIN  
MOLEKÜLER DÜZEYDE DEĞERLENDİRİLMESİ**

**ŞEBNEM YANIK PEHLİVANOĞLU**

**DANIŞMAN  
PROF.DR.NESLİHAN ABACI**

**GENETİK ANABİLİM DALI  
GENETİK PROGRAMI**

**İSTANBUL-2021**

**TEZ ONAYI**

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)



## BEYAN



## İTHAF

Benim tüm dünyam olan Anneme, Babama ve eşim Suray'a ithaf ediyorum..

## TEŞEKKÜR

Beni yüksek lisans öğrencisi olarak kabul eden ve bana bu şansı tanıyan, tez projemin planlanmasında, araştırılmasında ve yürütülmesinde ilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, bilimsel ve ahlaki değerlerini örnek aldığım ve yanında çalışmaktan onur duyduğum, desteğini ve sevgisini her zaman hissettiğim değerli hocam sayın Prof.Dr.Neslihan ABACI'ya, engin bilgisine her zaman sonsuz saygı duyduğum ve her zaman takıldığım her noktada benden desteğini esirgemeyen sevgili hocam Prof.Dr.Sema Sırma EKMEKÇİ'ye sonsuz teşekkür ederim. Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD. Öğretim üyesi Prof.Dr.Sibel BERKER KARAÜZÜM'e ve Pediatri AD. Öğretim üyeleri Prof.Dr. Osman Alphan KÜPESİZ ve Dr. Öğr. Üyesi Funda TAYFUN KÜPESİZ'e hasta örneklerinin temin edilmesindeki katkılarından dolayı teşekkür ederim.

İstanbul' a ilk geldiğimde bana hiç yabancılik çektirmeyen, ailem gibi olan, her zaman takıldığım noktalarda danıştığım bana yol gösteren, desteğini esirgemeyen Genetik LAB 2 ailem; Doç.Dr.Ferda PAÇAL, Dr.Zeliha EMRENCE, Dr.Aris Çakiris, M.Sc Burcu SALMAN YAYLAZ, M.Sc Büşra KARAÇAM, M.Sc Elifnur ÖZKAYA, M.Sc Atilla Mehmet GÜLER' e ve özel olarak bu süreçte birbirimize destek olduğumuz, bana çok büyük yardımları dokunan sevgili arkadaşım İrem COŞKUNTAN'a teşekkür ediyorum.Yüksek lisans eğitimim boyunca oluşturmuş olduğum akademik alt yapı ve bilgi birikimi için Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik ABD'da görevli olan bütün hocalarıma saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Tercih etmiş olduğum bu akademik yolda bana her zaman inanan, desteğini ve sonsuz sevgisini , bana olan sonsuz inancını her zaman yanımda ve kalbimde hissettiğim canımın içi babam Mustafa YANIK ve birtanecik annem Şerife YANIK'a ne kadar teşekkür etsem azdır..Bu sürecin tüm sıkıntılarına maruz kalan, tüm sıkıntıları benimle birlikte göğüsleyen, eğitimim boyunca desteğini, sevgisini, bilgisini ve sabrını her zaman kalbimde hissettiğim, bilimsel temellerimi oluşturan, akademik ilerlememde rol model olan, tüm ilklerimi öğrendiğim sevgili meslektaşım, eşim Dr.Suray PEHLİVANOĞLU'na çok teşekkür ediyorum.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 36170

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                |       |
|--------------------------------------------------------------------------------|-------|
| TEZ ONAYI .....                                                                | İİ    |
| BEYAN .....                                                                    | İİİ   |
| İTHAF .....                                                                    | İV    |
| TEŞEKKÜR .....                                                                 | V     |
| İÇİNDEKİLER .....                                                              | VI    |
| TABLolar LİSTESİ .....                                                         | Vİİİ  |
| ŞEKİLLER LİSTESİ .....                                                         | İXX   |
| SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....                                          | X     |
| ÖZET .....                                                                     | Xİİİ  |
| ABSTRACT .....                                                                 | Xİİİİ |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ .....                                                         | 1     |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                                        | 5     |
| 2.1. AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ .....                                            | 5     |
| 2.1.1 Hematopoez .....                                                         | 5     |
| 2.1.2 Löseminin Tanımlanması .....                                             | 6     |
| 2.1.3 Löseminin Tarihçesi .....                                                | 6     |
| 2.1.4 Akut Lenfoblastik Lösemi .....                                           | 7     |
| 2.1.4.1 ALL Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi .....                               | 7     |
| 2.1.4.2 Sınıflandırma .....                                                    | 9     |
| 2.1.4.2.1 Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)'de Dünya Sağlık Örgütü (WHO)          |       |
| Sınıflandırması .....                                                          | 9     |
| 2.1.4.2.2 Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)'de FAB Sınıflandırması .....          | 10    |
| 2.1.4.3 ALL Patogenezinde Rol Oynayan Genetik Faktörler .....                  | 10    |
| 2.1.4.4 ALL'de Prognostik Önemi Olan Moleküler-Sitogenetik Anormallikler ..... | 10    |
| 2.1.4.5 Hastalığın Kliniği ve Tedavisi .....                                   | 11    |
| 2.2 MİNİMAL REZİDÜEL HASTALIK (MRH/ MRD) .....                                 | 14    |
| 2.3 KEMİK İLİĞİ MİKROÇEVRESİ (NİŞ) .....                                       | 15    |
| 2.4 ALL'Lİ HASTALARDA ANJİOGENEZ .....                                         | 16    |
| 2.5 TWIST1, VEGF2, RANTES(CCL5), CXCR4 ve PDGFRb GENLERİ .....                 | 17    |
| 2.5.1 TWIST1 .....                                                             | 17    |
| 2.5.2 VEGFR2 .....                                                             | 19    |

|                                                                                                                  |                                         |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 2.5.3 RANTES (CCL5).....                                                                                         | 21                                      |
| 2.5.4 CXCR4 .....                                                                                                | 22                                      |
| 2.5.4.1 CXCR4 Geninin B-ALL Patogenezindeki Rolü.....                                                            | 23                                      |
| 2.5.4.2 CXCR4 Geninin T-ALL Patogenezindeki Rolü.....                                                            | 23                                      |
| 2.5.5 PDGFR-beta.....                                                                                            | 24                                      |
| 2.6 MİNİMAL REZİDÜEL HASTALIK (MRH) TAKİBİNDE KANTİTATİF REAL<br>TİME PZR (QRT-PZR) YÖNTEMİNİN KULLANILMASI..... | 25                                      |
| 3.GEREÇ VE YÖNTEM.....                                                                                           | 27                                      |
| 3.1 GEREÇ.....                                                                                                   | 27                                      |
| 3.1.1. Kullanılan Kimyasallar ve Kitler.....                                                                     | 27                                      |
| 3.1.2. Kullanılan Demirbaş Malzemeler.....                                                                       | 27                                      |
| 3.2 YÖNTEM.....                                                                                                  | 28                                      |
| 3.2.1. Kullanılan Hasta Örnekleri.....                                                                           | 28                                      |
| 3.2.2. RNA İzolasyonu.....                                                                                       | 29                                      |
| 3.2.3. cDNA Sentezi.....                                                                                         | 30                                      |
| 3.2.4. Primerlerin Tasarlanması.....                                                                             | 31                                      |
| 3.2.5. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR (qRT-PZR).....                                                              | 32                                      |
| 3.2.5.1 Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR (qRT-PZR) Protokolü.....                                                   | 32                                      |
| 3.2.6 İstatistiksel Analiz.....                                                                                  | 34                                      |
| 4.BULGULAR.....                                                                                                  | 35                                      |
| 5.TARTIŞMA .....                                                                                                 | 50                                      |
| KAYNAKLAR .....                                                                                                  | 59                                      |
| HAM VERİLER .....                                                                                                | <b>HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.</b> |
| FORMLAR.....                                                                                                     | <b>HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.</b> |
| ETİK KURUL KARARI.....                                                                                           | 69                                      |
| PATENT HAKKI İZNİ.....                                                                                           | <b>HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.</b> |
| İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....                                                                                  | 71                                      |
| ÖZGEÇMİŞ.....                                                                                                    | 72                                      |

## TABLOLAR LİSTESİ

|                                                                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 2-1: ALL’de insidans artışına neden olan genetik bozukluklar.....                                                                                                                   | 9  |
| Tablo 2-2: ALL’de WHO sınıflandırılması.....                                                                                                                                              | 9  |
| Tablo 2-3: ALL’de FAB sınıflandırması.....                                                                                                                                                | 10 |
| Tablo 2-4: ALL’de kromozomal anomalilerin prognostik önemi.....                                                                                                                           | 11 |
| Tablo 2-5: ALL’de meydana gelen belirtiler.....                                                                                                                                           | 12 |
| Tablo 2-6: ALL ayırıcı tanısında yer alan hastalıklar.....                                                                                                                                | 12 |
| Tablo 3-1: TWIST1, PDGFRB, VEGFR2, RANTES, CXCR4, ACTB Genlerine spesifik olarak tasarlanan primer dizileri.....                                                                          | 32 |
| Tablo 4-1: Pediatrik ALL olgularının cinsiyet dağılımı.....                                                                                                                               | 35 |
| Tablo 4-2: Pediatrik ALL olgularının immünofenotip (WHO) sınıflaması.....                                                                                                                 | 36 |
| Tablo 4-3: Pediatrik ALL olgularının FAB sınıflaması.....                                                                                                                                 | 36 |
| Tablo 4-4: Nüks zamanı kriterleri.....                                                                                                                                                    | 36 |
| Tablo 4-5: Pediatrik ALL olgularının sağkalım oranları.....                                                                                                                               | 37 |
| Tablo 4-6: Vakaların (immünofenotip açısından) sağlıklı kontrol grubu ile gen ekspresyonlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması.....                                               | 37 |
| Tablo 4-7: Sağ takipli, sağ tedavisi devam eden, sağ tedavisi biten ve ex olan olguların MRD Blast yüzdesi açısından istatistiksel olarak karşılaştırılması.....                          | 38 |
| Tablo 4-8: Sağ takipli, sağ tedavisi devam eden, sağ tedavisi biten ve ex olan olguların gen ekspresyonlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması.....                                | 39 |
| Tablo 4-9: Olguların FAB sınıflamasına göre gen ekspresyonlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması.....                                                                             | 40 |
| Tablo 4-10: t(9;22), t(12;21), t(6;11) ve t(1;19) translokasyonu bulunan olgular ve translokasyonu bulunmayan olguların gen ekspresyonlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması..... | 41 |
| Tablo 4-11: Trizomi tespit edilen ve trizomi tespit edilmeyen olguların gen ekspresyonlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması.....                                                 | 42 |
| Tablo 4-12: Delesyonu olan ve delesyonu olmayan olguların gen ekspresyonlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması.....                                                               | 42 |
| Tablo 4-13: Pediatrik ALL olgularının nüks zamanlarına göre gen ekspresyonlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması.....                                                             | 43 |
| Tablo 4-14: Pediatrik ALL olgularının risk gruplarına göre gen ekspresyonlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması.....                                                              | 44 |
| Tablo 4-15: Pediatrik ALL olgularının remisyona girme sürelerine göre gen ekspresyonlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması.....                                                   | 45 |
| Tablo 4-16: Pediatrik ALL olgularının CNS tutulum durumlarına göre gen ekspresyonlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması.....                                                      | 46 |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2-1: Kan Hücrelerinin Farklılaşma Süreci.....                                                                 | 5  |
| Şekil 2-2: Gelişim Sürecinde Hematopoez.....                                                                        | 6  |
| Şekil 2-3: 1968-2009 yılları arasında ALL’li çocukların sağ kalım oranları.....                                     | 8  |
| Şekil 2-4: Yaşa bağlı ALL-AML insidans oranları.....                                                                | 8  |
| Şekil 2-5: Hematopoetik Kök Hücrelerin Kemik İliği Nişinde Farklılaşma Süreci..                                     | 15 |
| Şekil 2-6: İnsan TWIST1 geninin şematik gösterimi, genomdaki lokalizasyonu ve transkriptleri.....                   | 18 |
| Şekil 2-7: TWIST1’in homodimer ve heterodimer yapısı.....                                                           | 18 |
| Şekil 2-8: TWIST1’in E-Kutusu’na bağlanmasının şematik gösterimi.....                                               | 19 |
| Şekil 2-9: VEGF2 (KDR) geninin genomdaki lokalizasyonu, şematik gösterimi , transkriptleri ve protein yapısı.....   | 20 |
| Şekil 2-10: CCL-5 (RANTES) geninin genomdaki lokalizasyonu, şematik gösterimi ve transkriptleri.....                | 21 |
| Şekil 2-11: CXCR-4 geninin genomdaki lokalizasyonu, şematik gösterimi ve transkriptleri.....                        | 22 |
| Şekil 2-12: PDGFR-b geninin genomdaki lokalizasyonu, şematik gösterimi ve transkriptleri.....                       | 24 |
| Şekil 3-1: cDNA örneklerine ait standart eğri grafiği.....                                                          | 33 |
| Şekil 4-1: Olguların blast tipine göre sağ kalım zaman aralığı.....                                                 | 46 |
| Şekil 4-2: Olguların remisyon zamanına göre sağ kalım zaman aralığı.....                                            | 47 |
| Şekil 4-3: Translokasyon tipine göre olguların yaşam süresi (ay).....                                               | 48 |
| Şekil 4-4: Pediatrik ALL olgularının immünofenotip gruplarına göre sağ kalımlarını gösteren sütun grafikleri.....   | 48 |
| Şekil 4-5: Pediatrik ALL olgularının immünofenotip gruplarına göre sağ kalımlarını gösteren çizgi-kutu grafiği..... | 49 |

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

ABL Abelson Murine Leukemia viral oncogene homolog.  
ALL: Acute lymphoblastic leukemia.  
AML: Acute myeloid leukemia.  
BCR: Breakpoint Cluster Region.  
Bç: Baz çifti.  
CD: Cluster of differentiation.  
CNS: Santral sinir sistemi.  
dH<sub>2</sub>O: Distile su.  
dNTP: Deoxynucleotide.  
DNA: Deoksiribonükleik asit.  
EGF: Endotelyal büyüme faktörü  
EMT: Epitelyal mezenkimal geçiş.  
EtBr: Etidiyum Bromür.  
FAB: French-American-British.  
FGF: Fibroblast growth factor.  
FLT1: fms ilişkili tirozin kinaz.  
HGH: Hepatosit growth factor.  
HR: High risk.  
HSCT: Hematopoetik kök hücre nakli  
Ig: Immünglobulin.  
IR: Intermediated risk.  
IFN: Interferon.  
Kİ: Kemik iliği.  
MRD / MRH: Minimal residual disease/ minimal rezidüel hastalık.  
MLL: Mixed lineage leukemia  
PCR: Polimerase chain reaction.  
Ph: Philadelphia kromozomu  
PDGF: Platelet derived growth factor.  
PDGFR: Platelet büyüme faktör reseptörü  
Q-RT PZR: Kantitatif Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu.  
RUNX1: Runt-related transcription factor 1.  
RNA: Ribonükleik asit.  
SR: Standard risk.

THR: T hücre reseptörü.

TNF: Tümör nekroz faktör.

TKI: Tirozin kinaz inhibitörü.

WHO: World Health Organization.

VEGF: Vasküler endotelyal growth factor.

.



## ÖZET

Yanık Pehlivanoglu, Ş. (2021). Pediatrik Akut Lenfoblastik Lösemi Olgularında Minimal Rezidüel Hastalığın Moleküler Düzeyde Değerlendirilmesi. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL), lenfoid progenitör hücrelerin kemik iliği ve ekstramedüller bölgelerde klonal proliferasyonu ile karakterize bir hematolojik malignitedir. ALL pediatrik (ortalama 5 yaş) ve erişkin (ortalama 50 yaş) olmak üzere yaşa bağlı iki farklı dağılım gösterir. ALL ağırlıklı olarak çocukları etkilerken yetişkinlerdeki oranı yaklaşık %20'dir. Lösemide tedaviden kaçan ve nükslere yol açan hücreler minimal rezidüel hastalık (MRD) olarak tanımlanır. Nüks, akut lösemilerde oldukça ciddi bir sorundur. Günümüzde lösemi tedavisi sonrası nükslere neden olan en önemli faktörün MRD olduğu düşünülmektedir. Bundan dolayı MRD'nin takibi hastaliksız yaşam açısından önem taşımaktadır. Tez çalışmasının amacı nüks olan/olmayan Pediatrik Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) olgularından alınan kan ve kemik iliği örneklerinde CXC Kemokin Reseptörü tip 4 (CXCR4), Platelet Türevi Büyüme Faktörü Beta (PDGFRB), Kemokin Ligandı-5 (CCL5/RANTES), Sarmal-İlmek-Sarmal Proteini 38 (TWIST1) ve Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör Reseptörü 2 (KDR/VEGFR2) gen ifade düzeylerinin pediatrik ALL'de ve MRD'de klinik tablolara bağlı olarak biyobelirteç olarak kullanılabilirliği olup olmadığını araştırmaktır. Tez çalışması için gerekli olan hasta örnekleri, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Pediatrik Hematoloji Bilim Dalı servisinde tanı konmuş 46 pediatrik ALL hastalarından ve 10 sağlıklı kontrol grubundan sağlandı. Toplanan kan ve kemik iliği örneklerinden öncelikle RNA izolasyonu işlemi yapıldı. Ardından RNA örneklerinden Real Time PZR yöntemi ile söz konusu genlerin ifade düzeylerine bakıldı. Sonuçta, pediatrik ALL'de RANTES ifade düzeyinin değiştiğini saptadık. Bulgularımız ışığında RANTES geninin ALL patogenezinde önemli rolü olduğu ve biyobelirteç olarak değerlendirilebileceği düşüncesindeyiz. RANTES'in ALL ve MRD'de biyobelirteç olarak kabul edilmesi için daha geniş kohortlarda yapılan destekleyici çalışmalara ihtiyaç olduğu kanaatindeyiz.

**Anahtar Kelimeler :** Pediatrik Akut Lenfoblastik Lösemi, MRD, RANTES ekspresyonu, RANTES, TWIST1

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 36170

## ABSTRACT

Yanık Pehlivanoglu, Ş. (2021). Molecular Evaluation of Minimal Residual Disease in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Cases. İstanbul University, Institute of Health Science, Genetics. Master Thesis. 2021. İstanbul

Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) is a hematological malignancy with bone marrow and extramedullary clonal proliferation of lymphoid progenitor cells. ALL shows two different age-related distributions: pediatric (mean age 5 years) and adult (mean age 50 years). ALL is a malignancy that usually affects children. Cells that escape treatment and cause relapses in leukemia are defined as minimal residual disease (MRD). Relapse is a serious problem in acute leukemias. The most important factor causing relapses after treatment is MRD. Therefore, follow-up of MRD is important in terms of disease-free life. The purpose of the thesis study was to determine expression level of CXCR4, PDGFRB, RANTES, TWIST1 and VEGFR2 in bone marrow or blood samples for follow-up of MRD in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients. Patient samples were obtained from 46 pediatric ALL patients diagnosed in Akdeniz University Faculty of Medicine, Department of Pediatric Hematology and 10 healthy control groups. First of all, RNA isolation was performed from the collected blood and bone marrow samples. Then, expression levels of genes were measured from RNA samples by Real Time PCR method. As a result, we found that the RANTES expression level changes in pediatric ALL. In the light of our findings, we think that the RANTES gene has an important role in ALL pathogenesis and can be considered as a biomarker. We believe that supportive studies in larger cohorts are needed for RANTES to be accepted as a biomarker in ALL and MRD.

**Key Words:** Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia, MRD, RANTES expression, RANTES, TWIST1

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 36170

**ZUSAMMENFASSUNG / RESUME**

**Dikkat bu satırı ve aşağıdaki paragrafı daha sonra siliniz!**

Bu sayfayı koyacaksınız ”ÖZET” ve “ABSTRACT” sayfalarındaki ilkeler uygun olarak hazırlayın. Bu sayfayı koymayacaksınız başlığı tamamen bloklayarak siliniz.



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL), lenfoid progenitör hücrelerin kemik iliği ve ekstramedüller bölgelerde klonal proliferasyonu ile karakterize bir hematolojik malignitedir. ALL pediatrik (ortalama 5 yaş) ve erişkin (ortalama 50 yaş) olmak üzere yaşa bağlı iki farklı dağılım gösterir. ALL ağırlıklı olarak çocukları etkilerken yetişkinlerdeki oranı yaklaşık %20'dir.

ALL, T hücreli ve B hücreli olmak üzere iki tipte gelişebilmektedir. Erişkin olgulardaki ALL tipi %75 oranında B hücre kaynaklıdır. Pediatrik olgulardaki ALL tipi, neredeyse %90'a varan iyileşme oranına sahiptir. Bu oran, son 40 yılda geliştirilen dozların ve kemoterapi programlarının optimizasyonu ile risk odaklı tedaviye bağlıdır. Buna karşılık, aynı tedavi stratejileri erişkin ALL olgularında yalnızca %35-45 oranında uzun vadeli sağ kalımı sağlayabilmiştir.

ALL, farklı genetik temellere bağlı olarak ortaya çıkan hematolojik bir hastalıktır. Farklı mutasyonlar ve epigenetik değişimler prognostik düzeyi etkilemektedir. ALL patogenezinde rol oynayan çeşitli genetik değişiklikler arasında, lenfoid gelişim genleri (PAX5, IKZF1, EBF1, LEF1), tümör baskılayıcı genler (CDKN2A, CDKN2B, RB1 ve TP53), lenfoid sinyal genleri (BTLA, CD200, TOX), transkripsiyon regülatör ve koaktivatörleri (TBL1XL1 ve ERG) ve ayrıca kromatin yapı regülatörleri ve epigenetik regülatörlerin (CTCF, CREBBP) yer alır. T hücre kaynaklı ALL, aktive edici NOTCH1 mutasyonlarının ve TLX1 (HOX11), TLX3 (HOX11L2), YLY1, TAL1 ve MLL transkripsiyon faktörlerinin yeniden düzenlenmesi ile karakterizedir.

ALL'de prognostik önemi olan moleküler-sitogenetik anormallikler; Philedelphia kromozomu (Ph)-pozitif ALL, Ph-benzeri ALL, hiperdiploidi (>50 kromozom), hipoploidi (<44 kromozom) ve translokasyon tipi t(12;21), t(9;22), t(1;9), t(4;11)'dir. BCR-ABL1 benzeri ALL hastalarının çoğu IKZF1, PAX5 ve VPREB1 gibi B hücresi gelişiminde rol oynayan genlerde değişikliklere sahiptir. BCR-ABL1 benzeri ALL, pediatrik B-ALL'nin yaklaşık %15'ini oluşturur ve kötü prognoz ile ilişkilidir.

Lösemide tedaviden kaçan ve nükslere yol açan hücreler minimal rezidüel hastalık (MRD) olarak tanımlanır. MRD, morfolojik olarak tespit edilemeyecek kadar az sayıda blastik hücre varlığı anlamına gelir. Günümüzde lösemi tedavisi sonrası nükslere neden olan en önemli faktörün MRD olduğu düşünülmektedir.

Gelişmiş ülkelerde pediatrik ve erişkin ALL hastaları MRD temelli risk gruplarının belirlenmesi için, MRD tanı protokolleri uygulanmaktadır. ALL’de ilk MRD tanısı 1980 yıllarında immünfloresan mikroskopi yöntemi ile ortaya konmaya başlanmıştır. MRD’nin doğru, güvenilir ve hassas bir şekilde tanımlanabilmesi için %0.01 veya 1/10.000’e eşit veya daha düşük oranda ALL hücrelerinin belirlenebilmesi gerekir. Bunun için kanda ve kemik iliğinde aberrant immünfenotiplerin ve spesifik gen aberasyonlarının (Ig/THR) saptanabilmesi için akım sitometri veya PZR yöntemleri uygulanmaktadır. Günümüzde uygulanan klasik MRD teknikleri; Ig/THR hedefli qPZR, Klasik *multicolor* akım sitometri-MRD ve füzyon gen hedefli RQ-RT PZR yöntemleridir. Bu yöntemler ile T ya da B hücreli ALL’de MRD’ye yönelik tespit için 2 tip lösemi-spesifik belirteçle analiz yapılır. Birincisi kromozomal rekombinasyonla gelişen anormal füzyon bölgelerinin belirlenmesi, ikincisi ise hastalığa spesifik olarak ortaya çıkan immünglobulin (Ig) ya da T-hücre reseptör (THR) genlerinin yeniden düzenlenmelerinin belirlenmesidir. Klinik çalışmalarda genellikle hastalarda Ig veya T-hücre reseptörünün ekspresyon düzeyleri belirlenmektedir. Bu ekspresyon düzeylerini belirlemek için PCR yöntemi kullanılır.

Kemik iliği mikroçevresi (niş), hematopoetik malignitelerde önemli bir faktördür. Lösemilerde, kemik iliği mikroçevresinin hastalığın başlangıcı ve progresyonu açısından destekleyici bir rolü vardır. Ayrıca lösemi hücrelerinin hematopoezinin desteklenmesi için kritik sinyallerin olduğu en yaygın nüks bölgesidir. Hematopoetik hücrelerdeki kuisens, metabolizma ve sağ kalım yollarının tümü kemik iliği mikroçevresinden etkilenir. Bu yollar, kemik iliği nişindeki lösemik hücreler tarafından tedavi direncini artırmak için ortak olarak seçtiği bilinen yollarlardır. Birçok çalışma lösemik hücreler ile kemik iliği arasındaki etkileşimi daha iyi anlamamıza yardımcı olmuştur Ancak; hastalığın nüksü, klinik bir sorun olarak devam etmektedir. Yapılan çalışmalar; kemik iliği nişinin ALL proliferasyonunu ve kemoresistansını desteklediğini kanıtlamıştır. Kemik iliğinin endosteal ve perivasküler nişlerinin ALL gen ekspresyonunu

düzenleyebildiği bilinmektedir. Bu niş bölgeleri hücre farklılaşması, proliferasyonu, sağ kalımı ve perifere çıkışı gibi kritik roller düzenlemektedir.

TWIST1; heliks-loop-heliks ailesinden bir transkripsiyon faktörüdür. Embriyogenezde mezenkimal hücre soylarının gelişiminde transkripsiyonel düzenlemede rol alır. Son yapılan çalışmalarda, TWIST1 geninin hem hematopoietik hücrelerin işlevinde ve gelişiminde, hem de hematolojik malignitenin gelişiminde anahtar rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca TWIST1 ekspresyonunun farklı TH1 efektör bellek hücrelerinde baskın olduğunu tespit edilmiştir. Vasküler endotelyal büyüme faktörü 2 (VEGF2), anjiyogenez ve hematopoez oluşumunda ve bunda rol oynayan hücrelerin korunmasında kritik önemi olan büyüme faktörüdür. VEGF reseptörleri hematopoietik hücrelerin alt gruplarında eksprese edilir. Son yapılan çalışmalarda VEGF'in sitokinlerle uyarıldıktan sonra hematopoietik kök hücrelerden salgılandığı da belirlenmiştir. Transplante kemik iliğinde VEGFR-2'nin aşırı ekspresyonu ve aktivasyonu, T hücresi alt soylarında azalmaya yol açar. Yapılan bu çalışmalar VEGFR-2'nin kanserde, anormal hematopoezde ve immün yetmezlikte rol oynadığını göstermiştir. RANTES (CCL5); yaşlanan kök hücrelerde yüksek düzeyde bulunan inflamatuvar bir sitokindir. RANTES'in hematopoietik rolünü anlamak için yapılan çalışmalarda; kemik iliği progenitörlerinde retroviral ekspresyonla RANTES'in aşırı üretilmesi, T hücresi miktarında ve T hücre soylarında azalmaya yol açtığı görülmüştür. CXCR4 geni, CXC kemokin SDF-1'in reseptörüdür. CXCR4, pluripotent progenitörleri içeren CD34 + hücrelerinde eksprese edilir ve hematopoietik kök hücrelerin yerleşiminde görevlidir. CXCR4 ekspresyonu, SDF-1'in biyolojik etkileri için çok önemli bir yere sahiptir. SDF'nin rolü henüz kesin olarak bilinmemekle birlikte hücre büyümesi, göçü ve transkripsiyonel aktivasyonu sağlayacak ve lösemik kemik iliğine katkıda bulunabilecek farklı sinyal yollarını aktive ettiği öne sürülmektedir. PDGFRb; hücre yüzeyi reseptörü olarak görev yapar ve embriyonik gelişim, anjiyogenez, hücre çoğalması ve farklılaşması, hayatta kalma dahil olmak üzere birçok biyolojik işlemin düzenlenmesinde rol oynarlar.

Bu bilgiler ışığında tez çalışmamızın amacı; standart Ig/THR tanı yaklaşımından farklı olarak ALL'de nüks, kemik iliği mikroçevresinde homing ve hücre farklılaşması açısından önemli olabileceğini düşündüğümüz TWIST1, VEGFR2, RANTES, CXCR4 ve PDGFRb genlerinin ekspresyon düzeyleri araştırmak ve çalışmamızda, MRD tanısı alan pediatrik olgularda söz konusu hedef genlerin ekspresyon düzeyleri ile nüks

arasındaki ilişkiyi açığa kavuşturmayı, MRD açısından bilgi verici olabilecek ve tedaviye yön verebilecek yeni belirteçler saptanmayı amaçlamaktayız.

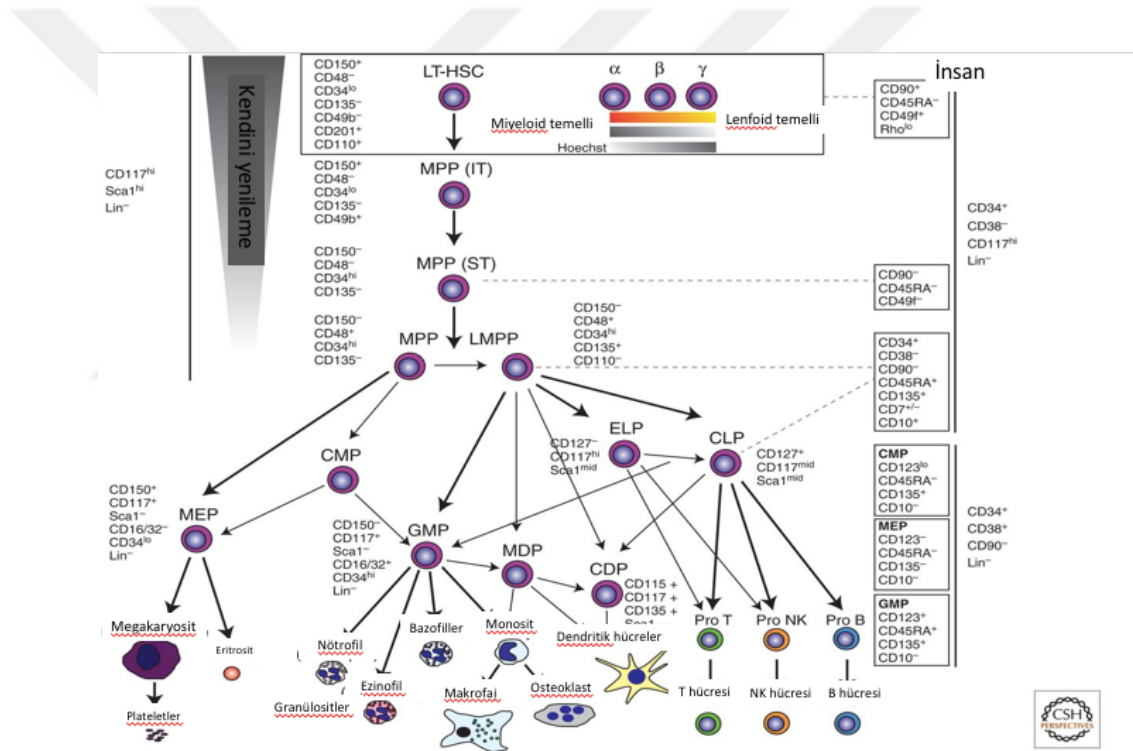


## 2. GENEL BİLGİLER

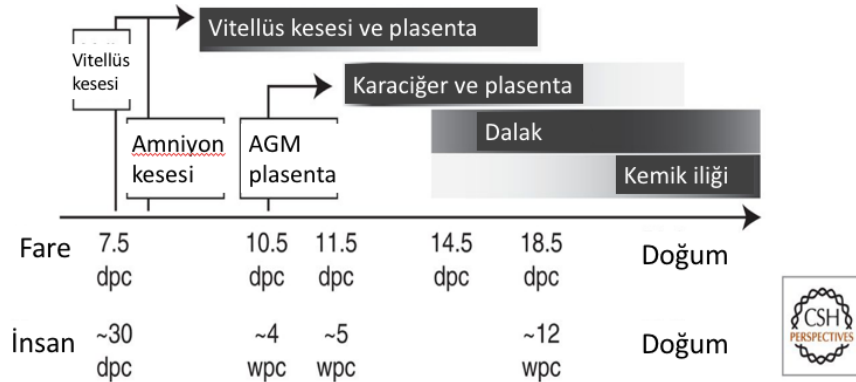
### 2.1. AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ

#### 2.1.1 Hematopoez

Hematopoez, pluripotent öncül hücrelerinin matür kan hücresi soylarına farklılaşması süreci olarak tanımlanır (Şekil 2.1). Hematopoetik hücreler sürekli yenilenirler ve yenilenme hızları vücut gereksinimlerine göre farklılık gösterir (1). Gelişim sürecinde hematopoez, embriyonik hayatta bir çok organ tarafından gerçekleştirirken, erişkin dönemde genellikle kemik iliğinde gerçekleşir (Şekil 2-2) (2).



Şekil 2-1: Kan Hücrelerinin Farklılaşma Süreci (2)



**Şekil 2-2: Gelişim Sürecinde Hematopoez (2)**

### 2.1.2 Löseminin Tanımlanması

Lösemiler, belirli bir hematopoetik farklılaşma aşamasına gelmiş olan hücrelerin malign hale dönüşmesi ile oluşan neoplastik hastalıklardır (3). Daha açık anlatılacak olursa; beyaz kan hücrelerinin (lökositlerin) anormal bir şekilde artması ile karakterize olan, öncül hücrelerine göre kan veya kemik iliği kanseri olarak; hastalığın başlama süresine göre ise akut lösemi veya kronik lösemi olarak sınıflandırılırlar (3).

### 2.1.3 Löseminin Tarihçesi

Kan hücrelerinin tanımlanması 17-18.yüzyıllarda gerçekleşmiştir. Eritrositler Anton von Leeuwenhoek tarafından 1674'te, lökositler Joseph Lieutaud tarafından 1749'da, lenfositler ise William Hewson tarafından 1774'te tanımlanmıştır. 1743 yılında hematoloji terimini ilk defa Thomas Schwenke kullanmıştır. 19.yüzyılda ise halk arasında "kan kanseri" olarak nitelendirilen lösemi tanımlanmıştır. İlk kez lösemili bir hastanın kan hücresi resmini Bennett 1852 yılında yayınlamıştır. Hemen ardından ikinci bir lösemi olgusunu ise Virchow yayınlamıştır. Yaşayan bir hastada löseminin ilk mikroskopik tanısı Henry Fuller tarafından 1846'da gerçekleştirilmiştir. Daha sonrasında ise Virchow, benzer bir olgu yayınlamış ve yeni bulunan bu hastalık için Yunanca lökos (beyaz) ve aima (kan) kelimelerini birleştirerek "lösemi (beyaz kan)" terimini kullanmıştır (4,5).

Virchow tarafından 1849'da üçüncü bir olgu yayınlanmıştır ve bu olguda, kronik löseminin splenik ve lenfatik formlarının varlığını tespit etmiştir. 1877'de Paul Ehrlich

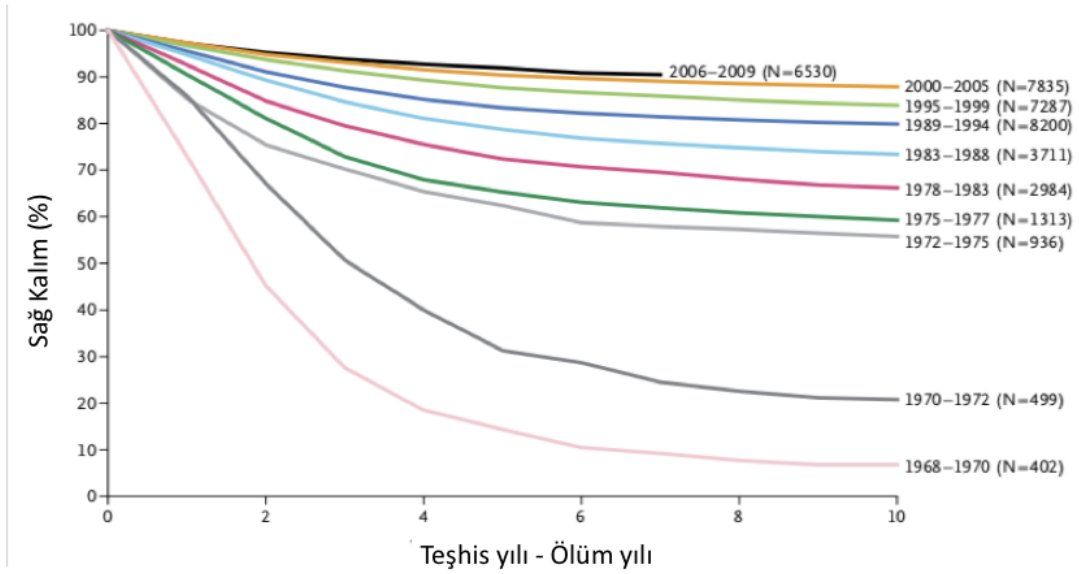
kan hücreleri arasındaki farklılaşmayı gösteren bir boyama tekniği buldu ve bu buluş tıpta çığır açtı. Bu sayede, 1880 yılında beyaz kan hücrelerinin üç farklı granülosit tipi (eozinofil, bazofil, nötrofil) olduğunu göstermiştir. Yeni ortaya koyulan bu bulgu, kronik lösemilerde hematopoetik farklılaşma sürecindeki hastalığa tutulan hücre serisinin tipine göre, lenfoid ve miyeloid olarak sınıflandırılmasını sağlamıştır (5).

#### **2.1.4 Akut Lenfoblastik Lösemi**

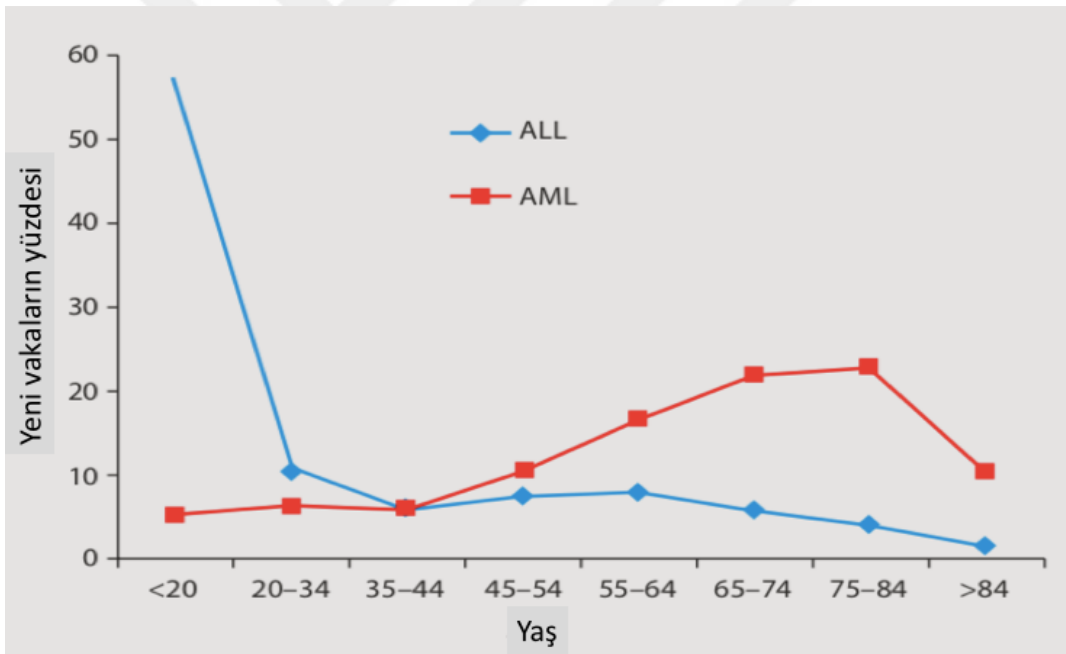
Akut lenfoblastik lösemi (ALL) lenfoid projenitör hücrelerin kemik iliği ve ekstramedullar bölgelerde klonal proliferasyonu ile karakterize olan, en yaygın çocukluk çağında görülen bir hematolojik malignitedir (6). ALL pediatrik (ortalama 5 yaş) ve erişkin (ortalama 50 yaş) olmak üzere yaşa bağlı iki farklı dağılım gösterir. ALL ağırlıklı olarak çocukları etkilerken yetişkinlerdeki oranı yaklaşık %20'dir. ALL T hücreli ve B hücreli olmak üzere iki tipte gelişebilmektedir. Erişkin olgulardaki ALL vakalarının %75'i ve pediatrik ALL vakalarının %85'i B hücre kaynaklıdır. Pediatrik olgulardaki ALL tipi, %90'a varan iyileşme oranına sahiptir (7).

##### **2.1.4.1 ALL Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi**

Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL), ağırlıklı olarak çocukları etkileyen bir hastalıktır. Çocukluk çağında görülen kanserlerin %25'ini oluşturur (6). ALL'nin yetişkinlerdeki oranı yaklaşık %20'dir (7). Amerikan Kanser Derneği'nin 2019'da ABD'deki akut lenfoblastik lösemi (ALL) verilerine göre (çocuklar ve yetişkinler dahil), yaklaşık 5.930 yeni ALL vakası (erkeklerde 3.280 ve kadınlarda 2.650), ALL'ye bağlı yaklaşık 1.500 ölüm gerçekleştiği (erkeklerde 850 ve kadınlarda 650) saptanmıştır. Bu çalışmaya göre ALL gelişme riski en fazla, 5 yaşından küçük çocuklarda olduğu bildirilmiştir. ALL gelişme riski 20'li yaşların ortasına doğru azalır fakat 50 yaşından sonra tekrar artmaya başlar. Genel olarak, tanı almış her 10 ALL vakasının 6'sı pediatriktir (8). *National Cancer Institute* verilerine göre; akut lenfoblastik lösemi vakalarında ölüm oranlarının 64-75 yaşları arasındaki bireylerde daha yüksek bulunmuştur (9).



Şekil 2-3: 1968-2009 yılları arasında ALL'li çocukların sağ kalım oranları (25)



Şekil 2-4: Yaşa bağlı ALL-AML insidans oranları(11)

Akut lösemilerin etiyojisi halen net olarak aydınlatılamamıştır. Akut lösemi gelişiminde bir çok çevresel ve genetik risk faktörü olduğu bilinmektedir. Bunlar; iyonize radyasyon, çeşitli kimyasallar (örn.benzen), kullanılan bazı ilaçlar, kromozom anomalileri ve bazı genetik bozukluklar sonucu artan insidans (örn. Ataksi Talenjiektazi, Li-Fraumeni Sendromu, Bloom Sendromu, Nörofibromatozis, Trizomi 21, Fankoni Anemisi vb.) olarak belirtilebilir. Lösemi vakalarının çoğuna sadece genetik yatkınlığın

değil, aynı zamanda somatik değişikliklerinde neden olduğu düşünülmektedir. Lösemilerde insidans artışına neden olan genetik bozukluklar tablo 2-1’de gösterilmiştir(10,11).

**Tablo 2-1: ALL’de insidans artışına neden olan genetik bozukluklar (10,11)**

| Grup                       | Risk | Yaş aralığı |
|----------------------------|------|-------------|
| Trizomi 21 (Down Sendromu) | 1/95 | < 10 yaş    |
| Bloom Sendromu             | 1/8  | < 30 yaş    |
| Fanconi Anemisi            | 1/12 | < 16 yaş    |

#### 2.1.4.2 Sınıflandırma

##### 2.1.4.2.1 Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)’de Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Sınıflandırması

Dünya Sağlık Örgütü (*World Health Organization, WHO*) sınıflandırmasına göre, Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) tanısı “immünfenotipleme” yöntemi ile koyulur.ALL’de WHO sınıflaması Tablo 2-2’de gösterilmiştir.(12)

**Tablo 2-2: ALL’de WHO sınıflandırılması (12)**

| ALL'de Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Sınıflandırması                       |
|------------------------------------------------------------------------|
| <b>Prekürsör B Hücreli ALL (Sitogenetik Alt Gruplar ve Onkogenler)</b> |
| t(9;22) - BCR-ABL                                                      |
| t(11q23) - MLL                                                         |
| t(1;19) - E2A/BPX1                                                     |
| t(12;21) - TEL/AML1                                                    |
| <b>Burkitt Hücreli Lösemi</b>                                          |
| <b>Prekürsör T Hücreli ALL</b>                                         |

#### 2.1.4.2.2 Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)'de FAB Sınıflandırması

FAB terimini French-American-British sözcüklerinin baş harfleri oluşturmaktadır. FAB sınıflandırması, akut lenfoblastik lösemi (ALL)'de neoplastik hücrelerin morfolojik özelliklerine göre yapılan bir sınıflandırma sistemidir. ALL'de FAB sınıflandırması Tablo 2-3'te gösterilmiştir (10,13).

**Tablo 2-3:ALL'de FAB sınıflandırması.**

| Alt Tip       | Özellik                                                                                |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| L1 (%85- %89) | Küçük, Uniform, Nükleusu düzenli, Sitoplazma dar, Yoğun nükleer kromatin               |
| L2 (%14)      | Büyük, Uniform değil, Nükleusu düzensiz, Orta büyüklükte sitoplazma, Dağınık Kromatin. |
| L3 (%1)       | Büyük, Uniform, Koyu bazofilik ve vakuollü sitoplazma, Nükleus düzenli.                |

#### 2.1.4.3 ALL Patogenezinde Rol Oynayan Genetik Faktörler

ALL, farklı genetik temellere bağlı olarak ortaya çıkabilmektedir. Farklı mutasyonlar ve epigenetik değişimler, hastalığın prognostik düzeyini etkilemektedir. ALL patogenezinde rol oynayan çeşitli genetik değişimler arasında; lenfoid gelişim genleri (PAX5,IKZF1,EBF1 ve LEF1), tümör baskılayıcı genler (CDKN2A, CDKN2B, RB1, TP53), lenfoid sinyal genleri (BTLA, CD200,TOX), transkripsiyon regülatör ve koaktivatörleri (TBL1XR1 ve ERG) ve ayrıca kromatin yapı regülatörleri ve epigenetik regülatörlerin (CTCF ve CREBBP) yer aldığı belirlenmiştir.(7).

#### 2.1.4.4 ALL'de Prognostik Önemi Olan Moleküler-Sitogenetik Anormallikler

Pediyatrik ALL'de lökosit miktarı, cinsiyet, yaş, hemoglobin seviyesi, trombosit miktarı ve FAB sınıflaması gibi prognostik faktörler mevcuttur (14).

ALL'de prognostik önemi olan moleküler-sitogenetik anormallikler; Philedelphia kromozomu (Ph) pozitif ALL, Philedelphia benzeri ALL, hiperdiploidi (>50 kromozom), hipoploidi (<44kromozom) ve translokasyon tipi t(12;21), t(1;19),t(9;22), t(4;11)'dir. BCR-ABL1 hastalarının çoğu IKZF1, PAX5 ve VPRED1 gibi B hücresi gelişiminde rol

oyunayan genlerde değişikliklere sahiptir. BCR-ABL1 benzeri ALL, pediatrik B-ALL'nin yaklaşık % 15'ini oluşturmaktadır ve kötü prognoz ile ilişkilidir (7,15). Yapılan bazı çalışmalarda, ALL'nin sitogenetik incelemeleri sonucunda >50 kromozoma sahip olan yani hiperdiploidi bulunan ALL vakalarının daha iyi prognoza sahip olduğu gösterilmiştir. Buna bağlı olarak, < 46 kromozoma sahip olan yani hipodiploidi bulunan ALL vakalarının ise kötü bir prognoz ile seyrettiği belirlenmiştir. Ayrıca 4., 10., 17., ve 18. Kromozomların trizomilerinin de hiperdiploidideki gibi ALL'de iyi prognoza sahip olduğu düşünülmektedir.(16). ALL'de kromozom anomalileri sağ kalımı ciddi oranda etkiler.(tablo 2-4)(17).

**Tablo 2-4: ALL'de kromozomal anomalilerin prognostik önemi(17)**

| Kromozomal Anomaliler               | Beş Yıllık Sağkalım (Güven Seviyesi)    |
|-------------------------------------|-----------------------------------------|
| <b>Hiperploidi</b>                  |                                         |
| > 50 Kromozom                       | %80 (%65-90)                            |
| 47-50 Kromozom                      | %90 (%50-98)                            |
| Triploidiye yakın, 66-73 kromozom   | Tam olarak bilinmiyor, muhtemelen iyi.  |
| Tetraploidiye yakın, 82-94 kromozom | Tam olarak bilinmiyor, muhtemelen < %60 |
| Normal diploid, 46 kromozom         | %80 ( %65-90)                           |
| Hipoploidi < 46 kromozom            | %71 (%55-85)                            |
| Pseudolipoid                        | %73 (%55-85)                            |
| t(1;19)                             | %53                                     |
| t(4;11)                             | %45                                     |
| t(9;22)                             | %14                                     |

#### 2.1.4.5 Hastalığın Kliniği ve Tedavisi

ALL'nin klinik patogenezi, kemik iliği yetersizliğinin düzeyi ile ortaya konulmaktadır (17). Çocuklarda gözlemlenen ilk semptomlar genelde letarji, kemik ağrıları, halsizlik ya da belirgin iştah kaybıdır. Bu semptomlar non-spesifiktir. Gözlemlenen spesifik semptomlara ise kemik iliği infiltrasyonu neden olur. Bu semptomlara örnek olarak kanama, anemi ve enfeksiyonlar verilebilir. Ayrıca bu durum normal hematopoezinde engellenmesine yol açmaktadır (18). Pediatrik ALL'de meydana gelen bulgular Tablo 2-5'te gösterilmiştir. Hasta öyküsünde lösemiden şüphe edildiğinde,

kan sayımı ve periferik yayma çalışmalarının yapılması, şüphelenilen vakalara daha hızlı bir şekilde tanı koymayı sağlar. Ayrıca ALL şüphesi var ise, periferik yayma ve kan sayımının yanı sıra kemik iliği aspirasyonu yapılması daha kesin bir sonuca ulaştırır (10,17,18).

**Tablo 2-5: ALL’de meydana gelen belirtiler(17)**

|                                          |                                                                                                                                                  |
|------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Anemi Belirtileri</b>                 | Letarji, yorgunluk, bitkinlik, çabuk yorulma, iştah kaybı                                                                                        |
| <b>Enfeksiyonlara Eğilim Belirtileri</b> | Ateşli hastalıklar                                                                                                                               |
| <b>Kanamaya Eğilim Belirtileri</b>       | Purpura, Mukozal kanama, Hematom ve Morarma                                                                                                      |
| <b>Organ İnfiltrasyonu Belirtileri</b>   | Kemik-Eklemler ağrısı, Hepatomegali, Splenomegali, generalize lenf nodu büyümesi, mediastinal kitle ve bunu takiben süperior vena kava sendromu. |
| <b>Sistemik Hastalık Belirtileri</b>     | Nedeni bilinmeyen ateş, kilo kaybı, gece terlemeleri.                                                                                            |

**Tablo 2-6: ALL ayırıcı tanısında yer alan hastalıklar**

| <b>ALL Ayırıcı Tanısında Yer Alan Hastalıklar</b>                                       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Aplastik Anemi ve diğer kemik iliği yetmezliği sendromları.</b> Örn: Fanconi Anemisi |
| <b>Romatolojik hastalıklar.</b> Örn: Still Hastalığı, ARA vb.                           |
| <b>Osteomyelit</b>                                                                      |
| <b>Farklı malignitelerin kemik iliğine yayılması.</b> Örn: Nöroblastom, Rabdomyosarkom  |
| <b>Myeloproliferatif, Myelodisplastik sendromlar</b>                                    |
| <b>Viral ve diğer enfeksiyonlar</b> Örn: İnfeksiyöz mononükleoz, CMV, <i>leishmania</i> |
| <b>Lökomoid Reaksiyon.</b> Örn: Difteri ve sepsis                                       |
| <b>Idiopatik trombositopenik purpura</b>                                                |

ALL klinik ve genetik açıdan heterojen bir hastalıktır. Dolayısıyla, ALL’nin farklı alt tiplerine sahip olan hastaların şikayetleri, göstermiş oldukları klinik belirtiler farklıdır. Bu durum, hastalara uygulanan tedavilere farklı bir şekilde yanıt vermelerine sebep olur. ALL hastalarına genellikle uygulanan standart tedavi şekillerine örnek olarak ışın tedavisi, kemoterapi, radyoterapi ve hematopoetik kök hücre nakilleri (HSCT) verilir (19). ALL’li çocuklar için, çeşitli tedavilerde kullanılan temel bileşenler benzerdir ve

uygulanan bu tedaviler farklı fazlardan oluşur. Uygulanan tedavi fazlarından birincisi, indüksiyon tedavisidir. İndüksiyon tedavisi genellikle 4-6 hafta sürer ve glukokortikoid (prednizon ya da deksametazon), vinkristin, asparaginaz preparatı ve kemoterapi içerir. Bu aşamada hastaların çok büyük bir kısmının remisyona girdiği görülür. Yinede tek başına bu tedavi yeterli değildir. Çünkü; ek bir tedavi uygulanmazsa, hastalarda nüks tekrar gerçekleşebilir. Uygulanan tedavi fazlarından ikincisi yani remisyon sonrası tedavi; remisyonu güçlendirmek ve tekrar lösemi gelişmesini önlemek için 6-8 ay boyunca yoğun kombinasyon içeren bir kemoterapi tedavisidir. Bunu takiben hastalar, 18-30 ay boyunca düşük yoğunluklu “anti metabolit” temelli bir bakım tedavisi alırlar. Bu terapinin içeriği, günlük ağız yoluyla alınan merkaptopurin ya da tiyoguanin ve haftalık ağızdan alınan metotreksattan oluşur. Ancak tedavideki tüm bu gelişmelere rağmen halen günümüzde kemoterapinin hastalar için en etkili bileşimi ve süresi bilinmemektedir. Uygulanan bir diğer tedavi çeşidi, tekrarlayan ALL’de hematopoetik hücre transplantasyonudur (20). ALL’li çocukların çoğunlukla %15-%20’sinde nüks görülmektedir ve sonrası tedavi oranları oldukça düşüktür. Nükse neden olan bazı prognostik faktörler mevcuttur. Bunlardan birisi, nüksün tekrarlama zamanıdır. Daha kısa bir süre içerisinde meydana gelen tekrarlar, genellikle daha kötü prognoz ile ilişkilidir. Diğer bir faktör ise immünofenotiptir. T hücreli immünofenotipte daha kötü prognoz ile ilişkilidir. Prognozda çok önem arz eden bir diğer faktör ise nüks bölgesidir (20,21). ALL’de primer tedaviden sonra nüks gelişme ihtimali söz konusudur. Bu durumda hastaların ikinci bir remisyona girip iyileşme ihtimali %50’dir. Ancak tedavi sırasında meydana gelen nükslerde hastaların ikinci bir remisyona girme şansı %50-%70’tir ve remisyona giren hastaların yaklaşık %20-%30’u tedavi edilebilir. Nüksten sonra allojenik hematopoetik hücre transplantasyon tedavisi, primer tedaviye göre daha fazla tercih edilir. Hematopoetik kök hücre transplantasyonu gerektiren durumların belirlenmesinde minimal rezidüel hastalığın (MRD) değerlendirilmesi yol gösterici olabilir (22,23,24,25).

Uygulanan tüm bu tedavilerin başarılarına değinecek olursak, çocuklarda sağ kalım oranları yetişkin hastalardan çok daha yüksektir. Bu farklılığa neden olan bazı durumlar; erişkinlerde genetik alt yapının bozulmuş olması ve uygulanan yoğun tedaviye karşı geliştirilen yan etkinin çocuklara göre daha ağır olmasıdır (26,27,28).

## 2.2 Minimal Rezidüel Hastalık (MRD)

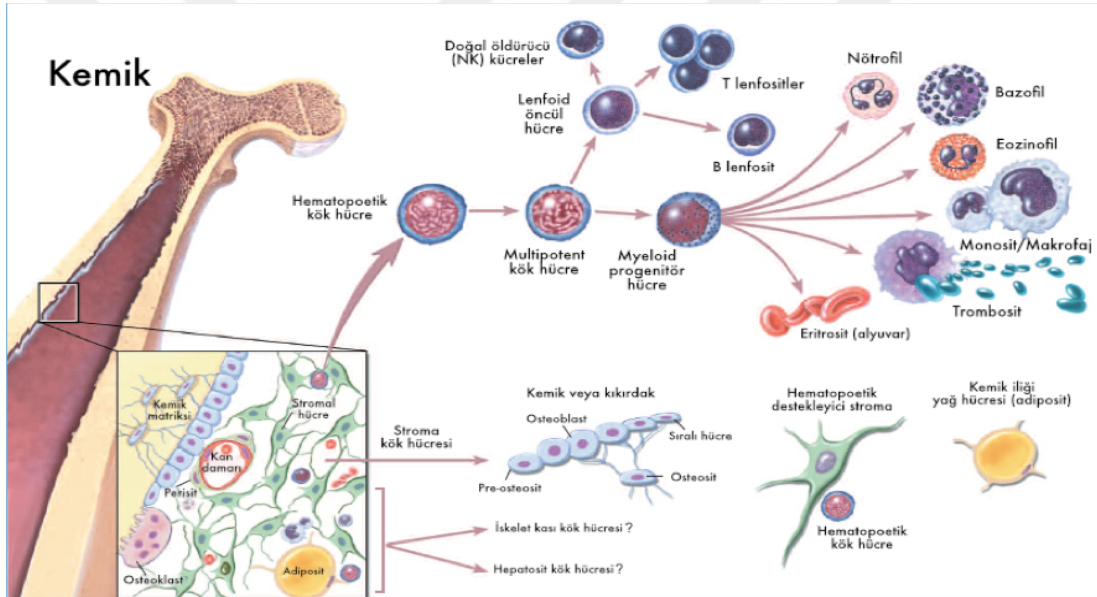
Lösemilerde tedaviden kaçan ve nükslere yol açan hücreler “Minimal Residual Disease/Minimal Rezidüel Hastalık (MRD/MRH) olarak tanımlanmıştır (29). MRD, morfolojik açıdan tespit edilemeyecek kadar düşük sayıda blastik hücre varlığı anlamını taşır. Günümüzde MRD’nin lösemi tedavisi sonrası nükslere yol açtığı düşünülmektedir (30). Yapılan son çalışmalarda, MRD takibinin hastaya uygulanan mevcut tedaviden en yüksek verimi almak ve bu tedaviden kaynaklanan toksisiteleri en aza indirmek suretiyle tedaviyi iyileştirmede önemli bir katkısı olduğu gözlenmiştir. Böylece, son yıllarda MRD düzeyi ile tedaviye cevap arasındaki ilişkinin önemi ortaya çıkmıştır. Bu çalışmalar ışığında, hastaların risk gruplarının belirlenmesi ve risk gruplarına uygun tedavini yöntemlerinin planlanabilmesi için MRD’nin tespiti önem arz etmektedir (29,31). ALL hastalarında remisyonunda (hastalıksız) kalma süresi MRD’nin kontrol altında tutulmasına bağlıdır. Bazı gelişmiş ülkelerde pediatrik ve erişkin ALL hastalarının MRD’ye bağlı risk gruplarının analizi için, MRD tanı protokolleri uygulanmaktadır (32,33). ALL’de ilk MRD tanısı 1980 yıllarında immünfloresan mikroskopi yöntemi ile ortaya konmaya başlanmıştır. MRD’yi doğru, güvenilir ve hassas bir şekilde belirleyebilmek, %0.01 veya 1/10.000’e eşit veya daha düşük oranda ALL hücrelerinin bulunmasına bağlıdır. Bunun için kanda ve kemik iliğinde anormal immünfenotiplerin ve spesifik gen anomalilerinin (Ig/THR) saptanması için akım sitometri veya PZR yöntemleri uygulanmaktadır. Günümüzde uygulanan klasik MRD teknikleri ise; Ig/THR hedefli qPZR, Klasik multicolor akım sitometri-MRD ve füzyon gen hedefli RQ-RT PZR olarak sıralanabilir (34). Bu yöntemler ile T ya da B hücreli ALL’de MRD’yi tespit etmek amacı ile kromozomal rekombinasyonla meydana gelen anormal füzyon bölgelerin belirlenmesi ve lösemi spesifik olarak meydana gelen T hücre reseptör genlerinin (THR) yeniden düzenlenmeleri olmak üzere iki farklı belirteçle analiz yapılır (30). Klinik olarak yapılan çalışmalarda genellikle hastalarda Ig veya T-hücre reseptörü genleri PZR’da MRD için hedef bölge olarak seçilerek ekspresyon düzeyleri belirlenmektedir (35).

Cave ve arkadaşları tarafından yapılmış olan 246 çocuk hasta ile çalışılan bir araştırmada, indüksiyon tedavisi sırasında  $>1/100$  oranında MRD (+) olan hastalarda nüks artışı gözlemlenmiştir. Bu çalışma ışığında MRD(+)’lik, artmış nüks riski ile ilişkili bulunmuş, fakat hastalık ile ilişkili olduğu bilinen yaş, lökosit sayısı, immünfenotip gibi diğer risk

faktörleri ile herhangi bir ilişkisi bulunmamıştır(30,36). MRD'nin negatif çıktığı sonuçlar bize hastalarda nüks olma riskinin de düşük olduğunu gösterebilir.

### 2.3 Kemik İliği Mikroçevresi (NİŞ)

Kemik iliği mikroçevresi yani kısa adı ile niş, hematopoetik malignitelerde önemli bir faktördür. Lösemilerde, kemik iliği mikroçevresinin hastalığın başlangıcı ve progresyonu açısından destekleyici rolü vardır. Ayrıca, lösemi hücrelerinin hematopoezinin desteklenmesi için kritik sinyallerin olduğu en yaygın nüks bölgesidir (37,38,39). Şekil 2-5 'te hematopoetik kök hücrelerin kemik iliği nişindeki farklılaşma süreci gösterilmiştir.



**Şekil 2-5: Hematopoetik Kök Hücrelerin Kemik İliği Nişinde Farklılaşma Süreci (40)**

Hematopoetik kök hücreler, endosteal niş alanından vasküler niş alanına göç ederek farklılaşmaya başlar. Kök hücre nişinde stromal, osteoblast, osteoklast hücreler bulunur. Bunlar; migrasyon (göç), homing (köklülük) ve farklılaşmayı düzenlerler. Bu süreçte pluripotent kök hücre farklılaşmaya başlayarak multipotent hale gelir ve hematopoetik kök hücre olarak lenfoid ya da miyeloid farklılaşmaya gider (41,42). Hematopoetik hücrelerdeki kuisens, metabolizma ve sağkalım yollarının tümü kemik iliği mikroçevresinden etkilenir. Bu yollar kemik iliği mikroçevresindeki lösemik hücreler tarafından tedavi direncini artırmak için ortak olarak seçtiği bilinen yollardır

(43). Yapılan bir çok çalışma kemik iliği nişinin ALL proliferasyonunu ve kemoresistansını desteklediğini kanıtlamıştır. Kemik iliğinin endosteal ve vasküler nişlerinin ALL gen ekspresyonunu düzenleyebildiği bilinmektedir (41). Bu niş bölgeleri hücre farklılaşması, proliferasyonu, sağkalımı ve perifere çıkışı gibi kritik işlevleri düzenlemektedir (39,44).

## 2.4 ALL'Lİ HASTALARDA ANJIOGENEZ

Çok hücreli organizmaların sağlıklı bir şekilde yaşamlarına devam edebilmeleri için; oksijen ve besin maddelerinin organ ve dokulara taşınabilmesi ve aynı zamanda dokulardaki atık maddelerinde o bölgeden uzaklaştırılması gerekir. Bu olay bir damar ağı sayesinde gerçekleştirilir.

Anjiyogenez terimi , damar oluşumundan önce meydana gelen endotel hücrelerinin birikerek oluşturduğu kapillerlerin daha fazla dallanması, genişlemesi ve beraberinde küçük damarların oluşmasıdır yani, yeni damar gelişimini belirtir. Embriyonik gelişme ve yara iyileşmesi gibi temel bazı fizyolojik durumlarda anjiyogenez çok büyük bir rol üstlenir. Ayrıca anjiyogenezin progresif tümör gelişimi, metastazı ve invazyonunda da çok büyük önem arz ettiği gösterilmiştir (45,46). Boyutları 2mm'den küçük olan tümörler çevrelerindeki dokulardan beslenebilme özelliğine sahiptir ancak, büyük boyutlardaki tümörler çevre dokudan beslenemedikleri için yeni damar ağı oluşturma ihtiyacı hissederler (47).

Anjiyogenezin sağlık bir şekilde gerçekleşebilmesi proanjiyogenik (damar oluşumunu destekleyen) ve antianjiyogenik (damar oluşumunu engelleyen) faktörler arasındaki denge önemlidir. Bu bilgiler ışında insanlarda anjiyogenezin oluşması proanjiyogenik faktörler olan vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), tümör nekroz faktör (TNF), anjiopoetin-I, fibroblast büyüme faktörleri (aFGF, bFGF) ve hepatosit büyüme faktörleri (HGF) ve antianjiyogenik faktörler olan FVIII, trombospondin, kolajenin ve  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  interferon (IFN) arasındaki denge ile ilişkilidir (46,48). Tümörlerden salgılanarak anjiyogenezi tetikleyen faktörler ise epidermal büyüme faktörü (EGF), platelet büyüme faktörü (PDGF), transforme edici büyüme faktörü (TGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)'dür.

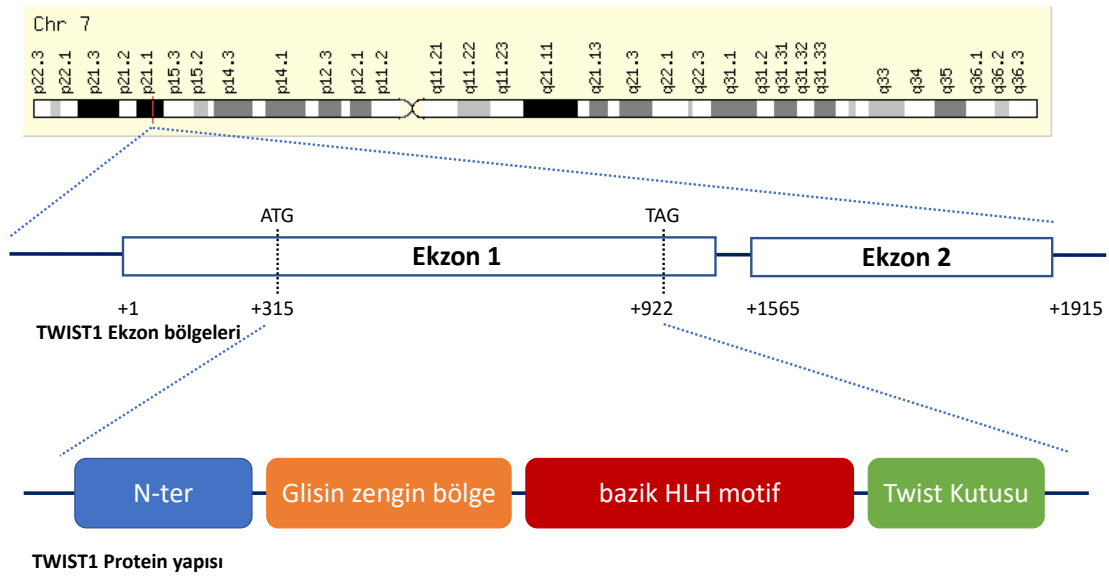
Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), endotel hücrelerin çoğalmasını, damarlanmayı tetikleyen ve anjiyogenezi düzenleyen heparin bağlayıcı bir glikoprotein molekülüdür. VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3 olmak üzere üç transmembran tirozin kinaz reseptörlerine bağlanarak işlev gösterir. Bunlardan damar şekillenmesi ile ilişkili olanlar VEGFR-1 (fms ilişkili tirozin kinaz-FLT1) ve VEGFR-2 (kinaz insert domain reseptör-KDR), lenfatik çoğalma ile ilişkili olan ise VEGFR-3'tür. Hem anjiogenez (kan damarı oluşumu) hem de hematopoez (kan hücrelerinin oluşumu) için VEGF ve transmembran tirozin kinaz reseptörlerinin etkileşimi çok büyük önem arz etmektedir (49,59).

Son zamanlarda hematolojik malignitelerde anjiyogenezin önemini ortaya koymak amacı ile akut ve kronik lösemilerde, ayrıca lenfomalarda bir çok çalışma yapılmıştır. Akut lösemiler kemik iliği infiltrasyonu ile ilişkili oldukları için, solid tümörlerde gözlenen kitle oluşumu gözlenmez. Bu sebeple anjiyogenezin solid tümörlere sağladığı oksijen ve besin maddelerinin taşınımı ve buradaki atıkların uzaklaştırılması desteği, akut lösemilerdeki durumu tartışmalıdır. Günümüzde çeşitli çalışmalar, akut lösemilerde anjiyogenik faktörlerin ifade düzeylerinin ve anjiyogenezin arttığını göstermektedir. Fakat bu bulgular, anjiyogenezin lösemi patogenezindeki rolünün netleşmesi için henüz yeterli düzeyde değildir (47,48). Bu bilgiler ışığında anjiyogenezin akut lösemilerdeki önemini açığa çıkartmak adına yeni araştırmalara ihtiyaç vardır.

## **2.5 TWIST1, VEGF2, RANTES(CCL5), CXCR4 ve PDGFRb Genleri**

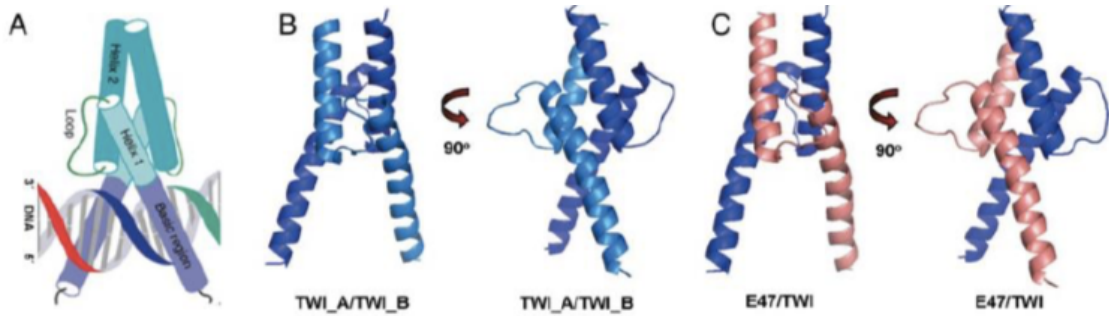
### **2.5.1 TWIST1**

TWIST1 geni, embriyogenezde mezenkimal hücre soylarının gelişiminde transkripsiyonel düzenlemede ve kanserde epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) sürecini regüle etmede kilit öneme sahiptir (51,52). İnsan TWIST1 geni, *heliks-loop-heliks* ailesinin üyesidir. 7.kromozomun p21.1 bölgesinde lokalizedir, 2 ekzon ve 1 introndan oluşur. Ekzon 1 bölgesinden kodlanan protein 202 aminoasitten oluşur ve 21 kDa ağırlığındadır. Kodlanan bölge 609 baz çifti, intron bölgesi 536 baz çifti ve 3'UTR'de yer alan ekzon 2 bölgesi 350 baz çiftinden oluşur. TWIST1 geninin promotor dizisinde -32 ve -110 bölgelerinde iki ayrı TATA motifi yer alır. (GenBank Accession No. NM\_000474)(53). Şekil 2-6'da insan TWIST1 geninin şematik gösterimi verilmiştir (54).



**Şekil 2-6: İnsan TWIST1 geninin şematik gösterimi, genomdaki lokalizasyonu ve transkriptleri (54,55)**

TWIST1, hem homodimer hem de heterodimer şeklinde dimerize olarak işlev görür. Yapılan bazı çalışmalar sonucunda oluşan heterodimer yapıların, homodimer yapılara göre daha kararlı olmasından dolayı daha fonksiyonel olduğu ortaya koyulmuştur (56,57).

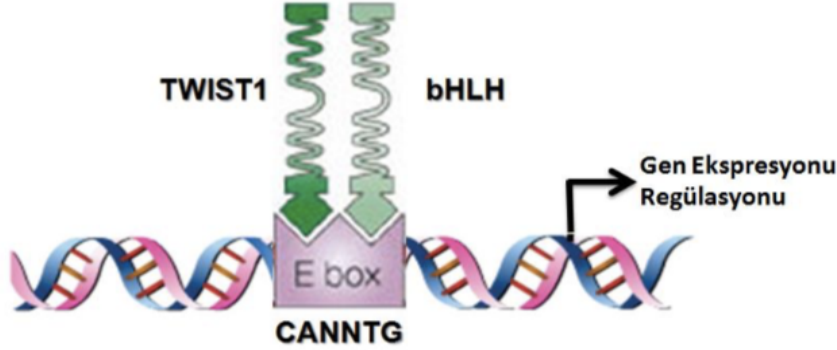


**Şekil 2-7: TWIST1'in homodimer ve heterodimer yapısı (56).**

TWIST1, promotorlarında E kutusu (CANNTG) bulunan genlerin transkripsiyonunu düzenler (56,58). TWIST1'in tanıma dizisi olan CANNTG (E-box)'e bağlanması şematik olarak Şekil 2-8'de gösterilmiştir.

İnsan TWIST1 geni hücre farklılaşmasında, morfogenezde, hematopoezde, kardiyogenezde ve tümör oluşumunda rol alan çeşitli genlerin ifadenmesini kontrol eder

(59,60). Bazı proto-onkogenlerin ifade düzeyini artırırken, bazı tümör supressör genlerin ifadesini engeller (61,62).



**Şekil 2-8: TWIST1'in E-Kutusu'na bağlanması şematik gösterimi (56,58).**

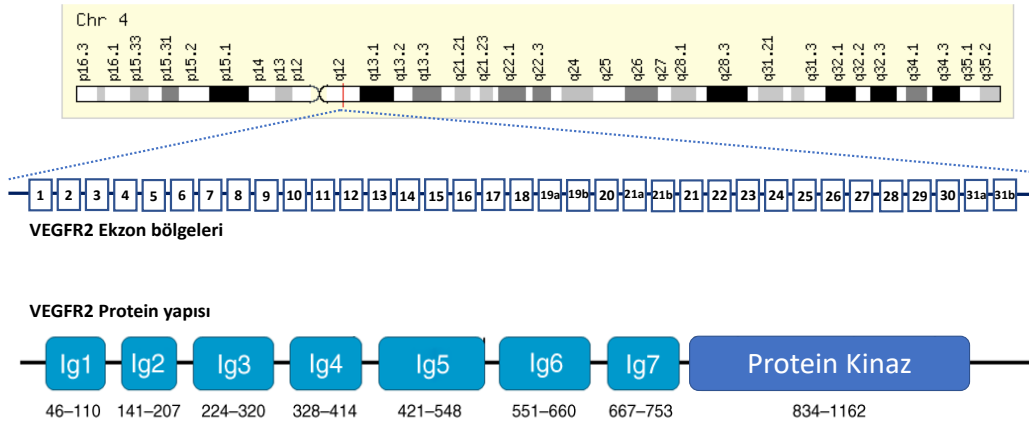
Kanserde TWIST1'in yüksek düzeyde ifadelenmesi sağkalım oranlarını düşürmektedir. Bunun sebebi, TWIST1'in hücre proliferasyonunu ve epitelyal mezenkimal geçişi tetiklemesidir (63). Yapılan çalışmalar sonucunda bir çok kanser türünde TWIST1'in yüksek düzeyde ifadeleniği gözlenmiştir.

### 2.5.2 VEGFR2

KDR (Kinase insert domain receptor) olarak bilinen vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü 2 (VEGFR2), 200-230 kDa ağırlığında, endotelial hücre sinyallerini ileten bir VEGF reseptörüdür. VEGFR2 geni, 4.kromozomun q12 bölgesinde lokalize ve 34 ekzona sahip bir genidir. VEGFR2 (KDR); VEGF ailesinden VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD ve VEGFF ligandları tarafından güçlü bir şekilde aktive edilebilir. Bu sayede, VEGFR2 ifade eden hücrelerin aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini teşvik ederek hücre migrasyonunu ve anjiyogenezi düzenler. *In vivo* hayvan modellerinde yapılan deneylerde VEGFR2 gen ifadesi baskılandığında damar oluşumunun (vaskülogenez) ve kan hücrelerinin (hematopoez) gelişiminde defektlere yol açtığı görülmüştür (64).

Normalde VEGFR2 geninin, endotel hücrelerinde, hematopoetik kök hücrelerde ve umbilikal kord hücrelerinde ifade edildiği bilinmektedir. Postnatal dönemde özellikle endotel hücreleri hematopoetik kök hücreler ve megakaryositlerde ifade edildiği belirlenmiştir. Kemik iliği (Kİ), periferik kan ve kord kanı örnekleri ile yapılan

analizlerde CD34+ hücrelerde VEGFR2 pozitifliğinin %0.1-0.5 oranında olduğu saptanmıştır. VEGF ile muamele edilen hematopoetik kök hücrelerin %90-95’inde multipotensi farklılaşma kabiliyetlerinin zayıf bir şekilde tetiklendiği görülmüştür. Periferik kan örneklerindeki hematopoetik öncü hücrelerinde ise VEGFR2 geni saptanmamıştır. VEGFR2 ifade eden ve etmeyen CD34+ hematopoetik kök hücre fraksiyonlarında yapılan çalışmalarda, VEGFR2’nin hücrelerin köklülük düzeyini gösteren ve öncü hücrelerden ayıran fonksiyonel bir belirteç olduğu saptanmıştır (65). Ayrıca akut lösemi hastalarında VEGFR2 geninin ifade düzeyi, normal (kontrol) grubuna göre daha yüksektir. Ancak bu çalışmalara rağmen hematolojik hastalıklarda, solid tümörler gibi kitle oluşumu gözlenmediği için, anjiyogenezin mekanizması tam anlaşılabilmiş değildir (47). Şekil 2-9’da VEGF2 (KDR) geninin kromozom lokalizasyonu, şematik gösterimi ve transkriptleri verilmiştir.



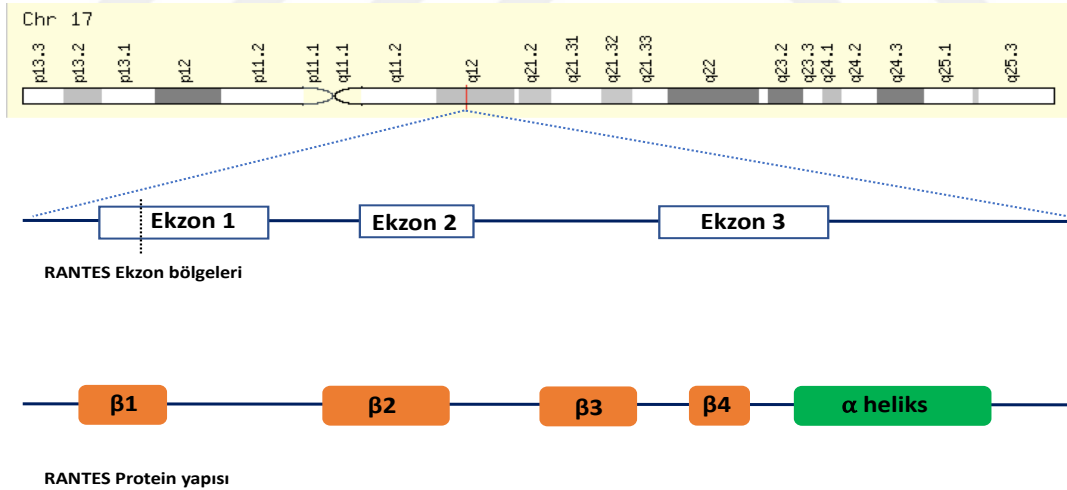
**Şekil 2-9: VEGF2 (KDR) geninin genomdaki lokalizasyonu, şematik gösterimi , transkriptleri ve protein yapısı (66,67).**

Akut miyeloid lösemi (AML) hastalarının kemik iliği blast hücreleri ile yapılan çalışmada, remisyon hastalarında VEGFR2 geninin yeni tanı alan hastalara göre daha düşük seviyede olduğu belirlenmiştir. Ayrıca VEGFR2 ifade düzeyinin nüks görülen hastalarda yeni tanı alanlara göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (68).

### 2.5.3 RANTES (CCL5)

RANTES diğer adı ile CCL-5 (C-C motif kemokin ligand-5) olarak bilinen gen, 68 aminoasitlik bir protein kodlar (69). CCL-5, 17.kromozomun q kolunda lokalize, 3 ekzon ve 2 intron bölgesinden oluşur ve bu bölgede bulunan kemokin genlerinden bir tanesidir. Kemokinler, immünregülatör ve enflamatuvar işlemlerde rol almak suretiyle salgılanırlar (70).

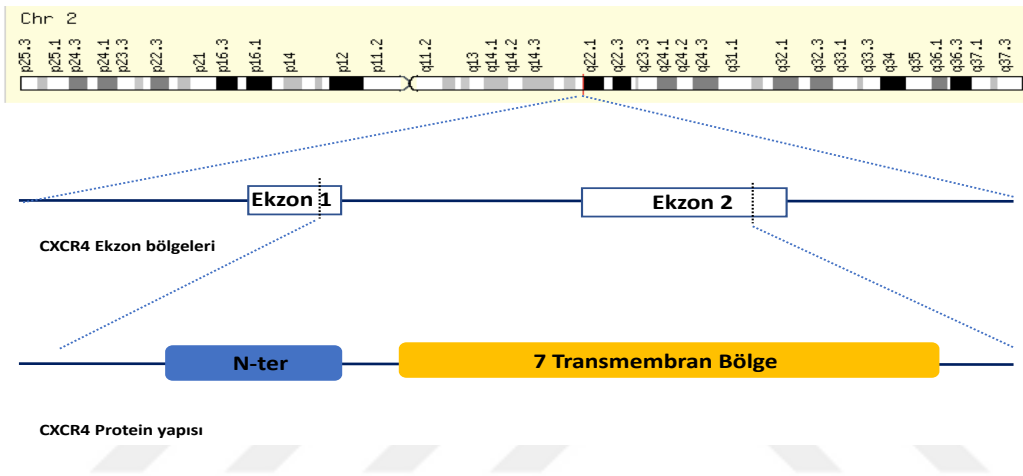
RANTES (CCL-5), monositler, eozinofiller, T lenfositler için kemoatraktan görevi görür. Bazofillerin sitoplazmasında bulunan granüllerin hücre dışına bırakılmasını ve T hücrelerinin aktive olmasını destekleyici rol oynadığı bilimektedir (71). 7 transmembran G proteini yapısında olan spesifik reseptörlere bağlanarak lökosit hücrelerinin göçünü tetikler. CCR1, CCR3, CCR4 ve CCR5 RANTES'in aktive edebildiği bu reseptörlere örnek olarak verilir (72). RANTES (CCL5), serum ve endotel bağlı bir kemokin çeşididir. Bu kemokinler, dolaşımda mevcut olan hücrelerdeki bağlanma bölgeleri için rekabete girerler. Daha sonrasında endotel hücrelerine, immün hücreler için yol gösterici olmak suretiyle bağlanarak işlev gösterirler (73).



**Şekil 2-10: CCL-5 (RANTES) geninin genomdaki lokalizasyonu, şematik gösterimi ve transkriptleri (74,75).**

### 2.5.4 CXCR4

CXCR4 geni, 2.kromozomun q22.1 bölgesinde (2q22.1) lokalize olan, 2 ekzon bölgesi bulunduran bir gendir (76). Bu gen, timusta ve kemik iliğinde stromal hücrelerden türemiş faktör-1 (SDF-1/ CXCL12)'e özgü bir CXC kemokin reseptörü kodlar (77). Bu reseptör, 352 aminoasitten oluşur ve 39.75 kDa ağırlığındadır. Reseptörün hücre yüzeyinde lokalize olmasını sağlayan 7 transmembran bölge içerir. Reseptör monomerleri, homodimerler oluşturarak aktive olabilmekte ve işlev görebilmektedir. (76).



**Şekil 2-11: CXCR-4 geninin genomdaki lokalizasyonu, şematik gösterimi ve transkriptleri.(78,79)**

CXCR4 geni, hücre migrasyonunun ve hematopoezin düzenlenmesinde kritik rol oynar. Bilimsel çalışmalar sonucunda CXCR4, endotelial hücrelerde vasküler dallanma gelişiminde önemli rolü olduğu belirlenmiştir (78). Bunun yanısıra kanser metastazında organa özgü olan infiltrasyon düzenlenmesinde görev aldığı bildirilmiştir. Normal fizyolojik koşullarda, SDF-1/ CXCR4 sinyali hem hematopoetik hücrelerin kemik iliğinde tutunmasında hem de T hücreleri ve mevcut olan diğer olgun hematopoetik hücrelerin lokalizasyonunda oldukça kritik bir rol oynamaktadır (80). CXCR4 sinyalizasyonu solid ve hematolojik tümörlerin yüzeyinde aşırı ifadenmesi ile hastalığın ilerlemesi arasında korelasyon olduğu bildirilmiştir. İlave olarak, T-ALL hücre membranlarında CXCR4 yüksek seviyede ifade edilmesi onkojenik NOTCH aktivasyonunu tetiklediği saptanmıştır (81,82).

#### 2.5.4.1 CXCR4 Geninin B-ALL Patogenezindeki Rolü

SDF-1 / CXCR4 geni, normal B hücrelerinin lenfopoezinde, hücrelerin göçü ve hematopoetik kök hücrelerin kemik iliği nişlerine girmesi aşamasında kritik bir rol oynar (83,84). SDF1/ CXCR4 geninin, hematolojik malignitelerde rolü olduğu gibi aynı zamanda birçok kanser türünde de karşımıza çıkar (80). Lösemik hücreler kemik iliği , karaciğer, timus , lenf düğümleri ve beyin olmak üzere SDF-1 ifade eden organlarla aktif olarak etkileşime girerler. Bu bilgiden yola çıkarak hastalar ile yapılan bazı çalışmalar sonucunda lösemik blastlarda ve kemik iliği infiltrasyonunda hücre yüzeyindeki CXCR4 ifadenmesinin artmış olduğu gözlenmiştir (85,86). Bu deneysel bulgular sonucunda, CXCR4 gen ifade seviyesinin yüksek olmasının, nüks insidansının da artması ile korele olduğu sonucuna varılmıştır (87,88).

Mowafi ve arkadaşları yaptıkları çalışmalar neticesinde, ALL hastası çocuklardan alınan serumlardaki SDF-1 düzeylerini değerlendirmişler ve SDF-1'in çocukluk çağı öncesi B-ALL'de lösemik hücrelerin proliferasyonunda ve bu hücrelerin hayatta kalabilmesinde rol oynayabileceği sonucuna varmışlardır (89). Aynı zamanda, Khandany ve arkadaşları erişkin ALL hastalarında kemik iliği nakli öncesi ve sonrası SDF-1 serum düzeylerini değerlendirmişler, bunun sonucunda ise kemik iliği transplantasyonundan sonra SDF-1 düzeylerinin düştüğünü ve SDF-1'in hem ALL patogenezini için hem de lösemi tanısında önemli bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermişlerdir (90).

#### 2.5.4.2 CXCR4 Geninin T-ALL Patogenezindeki Rolü

SDF1/CXCR4 aktivasyonu, lösemik hücrelerin kemik iliği mikroçevresine tutunma ve göçü için oldukça kritik bir öneme sahiptir (91). Yapılan çalışmalar sonucunda, tüm T-ALL alt tiplerinde yüksek CXCR4 aktivasyonu olduğu gözlemlenmiştir. Lösemik mikroçevrede, kemik iliği stroması tarafından salgılanan SDF-1' in tümör hücrelerinin yapışma özelliğini arttırdığı ve T-ALL hücrelerinin devamlılığı için oldukça ideal bir vasküler endotelial niş oluşturduğu belirlenmiştir. Bu bilgilere ek olarak, CXCR4'ün T-ALL hücrelerinin sağkalımını ve çoğalmalarını tetiklediği in vivo çalışmalar sonucunda açığa kavuşturulmuştur (81,92). Ayrıca, CXCR4 hedefli gen baskılama çalışmaları, NOTCH kaynaklı T-ALL tipinde, tümör gelişimi ve kemik iliği infiltrasyonunun CXCR4 ifadesinin baskılanmasına bağlı olarak azaldığını saptamıştır (81,92,93). Tüm bu bilgiler ışığında, bir CXCR4 antagonistinin, dolaşımda mevcut olan

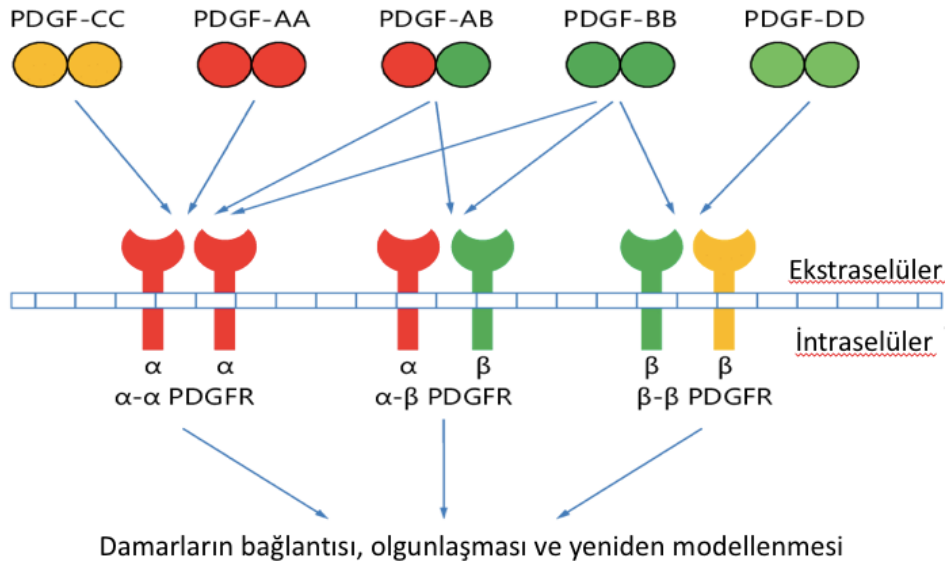
lösemi hücrelerine karşı T-ALL tedavisinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (80,94).

### 2.5.5 PDGFR-beta

PDGFR (Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptörü), beş adet ligand izoformu ile aktive olabilen, hücre zarında lokalize olan glikoproteinlerdir. Bu reseptörün PDGFR-a ve PDGFR-b olmak üzere iki farklı izoformu mevcuttur. (Yarden ve ark.,1986) İnsan PDGFR-b (Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptörü-beta) geni, 110 aminoasitten oluşan ve 180 kDa ağırlığında bir proteini kodlar. Söz konusu gen, 5. Kromozom q33 bölgesinde lokalizedir (95,96).



\*<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PDGFRB&keywords=PDGFRb> (96)



**Şekil 2-12: PDGFR-b geninin genomdaki lokalizasyonu, şematik gösterimi ve transkriptleri.(97)**

Lösemi olguları ile yapılan çalışmalar, PDGFRb geninin translokasyon neticesinde füzyon gen yapısına katıldığını belirlemiştir. Bu olgularda saptanan EBF1-PDGFRB gen füzyonu, B hücresi öncüsü akut lenfoblastik lösemi (ALL) vakalarının <%

l'inden sorumlu olduğu ve Philadelphia benzeri ALL alt tipinde de ortaya çıktığı gözlemlenmiştir(98). Bu füzyon genin, kromozom 5q33'ün interstisyel delesyonundan ya da dengeli kromozomal yeniden düzenlenmelerinden kaynaklandığı belirtilmiştir. Bir diğer araştırmada, tam remisyon gösteren 12 hasta çalışılmış (ALL 97/99 ve UKALL 2003) ve bu hastaların 10'unda indüksiyon tedavisi sonrasında minimal rezidüel hastalığın (MRD'nin) pozitif olduğu belirlenmiştir. Bu hastalardan 7 tanesi tanı aldıktan 18-59 ay sonra hastalığın nüksettiği belirlenmiştir. Hastaların 9'u tanı aldıktan sonra 6-9 yıl hayatta kaldıkları bildirilmiştir. Ayrıca, konvansiyonel kemoterapötik tedaviye cevap vermeyen bu EBF1-PDGFRB pozitif hastaları, tirozin kinaz inhibitörü olan imatinib tedavisine tam cevap verdiği saptanmıştır. Bu bulgular, indüksiyon tedavisi başarısız olan, 29.güne kadar remisyona girmeyen ya da 14. haftada MRD pozitif ( $>0.5\%$ ) olan hastalarda EBF1-PDGFRB taraması yapılması gerektiğini ve EBF1-PDGFRB pozitif olan vakalarda imatinib tedavisinin uygulanabileceğini göstermiştir(99).

Philadelphia kromozomu (Ph) benzeri akut lenfoblastik lösemi (ALL), çocukluk çağı ALL vakalarının % 10-15'ini oluşturur. PDGFRB ile yeniden düzenlenmiş ALL - olgularının çoğu tirozin kinaz inhibitörlerine (TKI), örneğin imatinib'e istenen tedavi yanıtını verir. Bununla birlikte, bazı vakalarda TKI'lere karşı direnç gelişmektedir, ancak bu mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. Bir çalışmada, yeni bir PDGFRb füzyon geni olan AGGF1-PDGFRB geni tanımlanmıştır. Ayrıca imatinib, dasatinib, nilotinib ve ponatinib tedavilerine direk olarak direnç gelişmesi ve nüks ile ilişkilendirilmiş C843G mutasyonu saptanmıştır. İlaça direnç neden olan bu mutasyon, çok hedefli kinaz inhibitörü olan CHZ868 molekülüne oldukça duyarlıdır. Bu durum ABL TKI'lere direnç geliştiren hastalar için potansiyel terapötik seçenek olarak değerlendirilebilir niteliktedir (100).

## **2.6 MİNİMAL REZİDÜEL HASTALIK (MRH) TAKİBİNDE KANTİTATİF REAL TIME PZR (QRT-PZR) YÖNTEMİNİN KULLANILMASI**

Isıya dayanıklı polimeraz (taq polimeraz), 1980'li yıllarda "thermus aquaticus" isimli bakteriden saflaştırılmıştır. Taq polimerazın polimeraz zincir reaksiyonlarında (PZR) kullanılmasıyla, otomatik termal siklus cihazlarının gelişimi başlamıştır(101). Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) yöntemi, 1990'lı yılların başında

florokromların ışıma özelliklerinin kullanılması ile birlikte Higuchi ve arkadaşları tarafından geliştirilmeye başlanmıştır. RT-qPZR, geleneksel PZR ve gen analizi yöntemlerini birleştirerek PZR reaksiyonları boyunca meydana gelen ürün miktarı ve oluşan bu ürün miktarının sayısal olarak ölçülmesini sağlamıştır (102). Bu yöntemde genetik materyalin reaksiyon boyunca çoğaltımını monitörize eden florokrom molekülleri ile işaretlenmiş probler veya boyalar kullanılır. Floresan işaretli prob/boya sayesinde, genetik materyalin çoğalması ile korele olarak floresan ışımda artış gözlemlenir(103).

Günümüzde RT-qPCR, hematolojik malignitelerde yaygın olarak kullanılan PZR bazlı kantifikasyon yöntemidir. Bu yöntem, malignitelere spesifik olan füzyon genlerin ya da anormal ifadelenen malignitelere yol açan genlerin periferik kanda/kemik iliğinde sabit düzeyde ifadelenen bir genin (kontrol gen) mRNA seviyelerini ölçerek kıyaslamak sureti ile değerlendirir. Ayrıca yapılan hematolojik çalışmalar sonucunda, PZR’da meydana gelen kontaminasyon riskini ve yanlış pozitif/negatif sonuç ihtimalini azalttığı için MRH’ı değerlendirmek için güvenilir yöntemler arasında olduğu gösterilmiştir (104). MRH’ın takibi, lösemiler için oldukça büyük bir önem arz etmektedir. RT-qPZR’ın MRH takibinde tanıda gen ifadesinin tespiti, lösemik hücrelerin klonal -ekspansiyonundaki azalmanın tespiti ve nükse neden olan lösemik klonların erken tespitini yapmak üzere üç ana hedefi mevcuttur. RT-qPZR tüm bu tespitleri yapabilmek için hastalığa spesifik füzyon genler, gen defektleri ve mutasyonları kullanır. Füzyon genlerde hassasiyet 1/10 000 000 iken aşırı ifadelenen genlerde 1/10 000 000’in altındadır (105).

### 3.GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 GEREÇ

##### 3.1.1. Kullanılan Kimyasallar ve Kitleler

RNA İzolasyon Kiti (QIAGEN- RNeasy mini kit)

Taq DNA Polimeraz (Thermo Scientific)

Taq DNA Polimeraz PCR Buffer (Thermo Scientific)

dNTP

MgCl<sub>2</sub> (Thermo Scientific)

Primerler (sentebiolab)

DNA Marker (Thermo Scientific)

Agaroz (Sigma)

Jel Loading Dye

Etidyum Bromür

cDNA Sentez Kiti (ThermoFisher Scientific)

Sybr Green (Bioline Sensifast NO-ROX kit)

##### 3.1.2. Kullanılan Demirbaş Malzemeler

Buz Makinası (Scotsman AF-80)

Derin Dondurucu -80°C (marka)

Derin Dondurucu -20°C (Beko)

Buz Dolabı 4 °C (Beko)

Distile Su Cihazı (Direct-Q 3V)

Spektrofotometre (MultiscanGO-ThermoFisher Scientific)

Mikrodalga Fırın (Vestel)

Mikrosantrifüj (Biosan combi spin)

Otomatik Mikropipetler (Eppendorf)

PCR Cihazı (Biorad)

PCR Kabini (ESCO)

Real Time PCR Cihazı (Applied Biosystems- Quant Studio 3)

Vorteks (Biosan)

Jel Görüntüleme Cihazı (marka)

Thermocycler (Biorad)

Çeker Ocak (Nükleon Fume Hood Cabinet)

Gel Elektroforezi (Biorad)

Güç Kaynağı (Biorad)

Hassas Terazı

Eppendorf Tüpler

## 3.2 YÖNTEM

### 3.2.1. Kullanılan Hasta Örnekleri

Tez projemizde çalışmak için gerekli olan hasta örnekleri , Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Pediatrik Hematoloji Bilim Dalı servisinde tanı konmuş 46 pediatrik ALL hastalarından ve 6 kontrol grubundan sağlanmıştır. Tez projesi için gerekli olan etik kurul onayı İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan (Dosya No: 2019/808, tarih:12.09.2019) alınmıştır. 18 yaşından küçük olan hastaların veli/vasi'lerine ve 18

yaşından büyük olan hastaların kendilerine bilgilendirilmiş onam formu imzalatılarak, Genetik Hastalıklar ve Tanı Merkezinde mevcut olan kan/kemik iliği / RNA örnekleri kullanılmıştır.

### 3.2.2. RNA İzolasyonu

Çalışma kapsamına alınan kemik iliği örnekleri alındığı gün içerisinde PAXgene Kemik İliği RNA izolasyon kiti kullanılarak RNA'ları elde edilmiştir. RNA eldesi için;

Öncelikle, ön hazırlık için, PAXgene Kemik İliği RNA Tüpleri, oda sıcaklığında kemik iliği biyopsisi öncesinde en az 2 saat inkübe edildi. Kemik iliği örneği PAXgene Kemik İliği RNA Tüpleri içerisinde transfer edildi. Kit içeriğinde mevcut olan BMR2 solüsyonunda çökeltiler mevcut ise 37°C'de çözümleri sağlandı. Kit talimatı doğrultusunda BMR4 solüsyonuna %96-100 etanol eklenerek kullanıma hazır hale getirildi. Kullanılacak olan çalkalayıcı inkübatör önceden 55°C'ye getirildi ve RNA izolasyon kiti protokolü aşağıda verildiği gibi uygulandı.

1. Elde edilen yaklaşık 1 mL kemik iliği örneği, kit içeriğinde mevcut olan PAXgen kemik iliği RNA tüplerine ilave edilerek 3000xg'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi.
2. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet üzerine 7 mL BMR yıkama tamponu ilave edildi.
3. Pellet çözülene kadar vortekslendi ve 10 dakika 3000xg'de santrifüj edildi. Sonrasında süpernatant atıldı.
4. Pellet üzerine 350 µl BMR1 tamponu eklendi ve pellet homojenize edilene kadar vortekslendi.
5. Üzerine BMR2 tamponu ilave edildi, 10 saniye boyunca vortekslendi ve oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edildi.
6. Örneğin vizkozitesi pipetlenebilir olup olmadığı kontrol edildikten sonra pipetle tüm örnek 1,5 mL'lik santrifüj tüpüne alındı.
7. Örnek üzerine 40 µl Proteinaz K eklendi ve önceden ayarlanan 55°C'deki çalkalayıcı inkübatörde 400 rpm'de 10 dakika boyunca çalkalandı. (Çalkalayıcı inkübatör sonraki deney adımlarında gerekli olacak olan 65°C'ye ayarlandı)

8. Süre sonunda lizat, PAXgene Shredder spin column tüpüne pipetle aktarıldı. Maksimum hızda 3 dakika santrifüj edildi.
9. Tüpteki pelleti bozmadan, süpernatant kısmı yeni bir 1,5 mL'lik santrifüj tüpüne pipetlendi. Üzerine 350 µl etanol eklendi, vortekslendi ve ardından 500 rpm'de 1-2 saniye santrifüj edildi.
10. Daha sonra 700 µl örnek PAXgene spin kolonu tüpüne pipetlendi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Spin kolonu yeni 2 mL'lik tüp içerisine yerleştirildi.
11. PAXgene RNA spin kolonuna 350 µl BMR3 tamponu eklendi ve ardından 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
12. 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpünde, 70 µl RDD tamponu üzerine 10 µl DNase I stok solüsyonu eklendi. Daha sonra tüpe hafifçe vurarak karıştırıldı ve 1-2 saniye santrifüj edildi.
13. Oluşturduğumuz bu 80 µl inkübasyon karışımı, PAXgene RNA spin kolonu membranına pipetlendi ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
14. Tekrar PAXgene RNA spin kolonuna 350 µl BMR3 tamponu eklendi ve 8000 rpm'de santrifüj edildi. Daha sonra spin kolonu yeni bir 2 mL'lik tüpe aktarıldı.
15. PAXgene RNA spin kolonuna 500 µl BMR4 tamponu eklenerek 8000 rpm'de tekrar santrifüj edildi ve kolon yeni bir 2 mL'lik tüpe aktarıldı.
16. Başka bir PAXgene RNA spin kolonuna 500 µl BMR4 tamponu eklendi ve bu da 8000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
17. Kullanılan tüp atılarak PAXgene RNA spin kolonu yeni bir 2 mL'lik tüpe aktarıldı ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
18. Sonrasında PAXgene RNA spin kolonu 1,5 mL'lik yeni bir tüpe aktarıldı. PAXgene RNA spin kolon membranına 40 µl BMR5 tamponu eklenerek, RNA'yı ayrıştırabilmek için 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
19. Elde edilen elüsyon ürünü 65°C'de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan hemen sonra buz üzerine aktarıldı.
20. Elde edilen RNA örnekleri -80 °C'de saklandı.

### 3.2.3. cDNA Sentezi

Çalışmamızda elde ettiğimiz RNA örneklerinden cDNA eldesi ticari olarak temin ettiğimiz *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific)* yardımı ile gerçekleştirildi. cDNA eldesi gerçekleştirdiğimiz RNA örneklerindeki RNA

miktarları spektrofotometre (*MultiscanGO-ThermoFisher Scientific*) ile belirlendi. Her bir örnekten en fazla 2µg RNA alınarak kit protokolü uygulandı.

1. Bunun için öncelikle cDNA reaksiyonu için gerekli olan master mix aşağıda verildiği gibi hazırlandı.

| 2X Master Mix İçeriği             | Reaksiyon Hacmi (µl) |
|-----------------------------------|----------------------|
| 10× RT Tamponu                    | 2.0                  |
| 25× dNTP Mix (100 mM)             | 0.8                  |
| 10× RT Random Primerler           | 2.0                  |
| MultiScribe™ Reverse Transkriptaz | 1.0                  |
| RNase Inhibitörü                  | 1.0                  |
| Steril H <sub>2</sub> O           | 3.2                  |
| Final Hacim                       | 10.0                 |

2. Hazırlanmış olduğumuz 2X master mix buzda bekletildi.
3. Her bir örnek için 0,2 mL'lik santrifüj tüpüne 2X master mix'ten 10 µl pipetlendi.
4. Üzerine RNA örneklerinden 10 µl ilave edildi ve karışması için pipetajlandı.
5. Hava kabarcıklarından kurtulmak için tüpler kısa santrifüjle çöktürüldü.
6. Tüpler thermal cycler cihazına (*BioRad*) yerleştirildi ve aşağıdaki program uygulandı.

| Thermal Cycler Programı | 1.Basamak | 2.Basamak | 3.Basamak | 4.Basamak |
|-------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Sıcaklık (°C)           | 25        | 37        | 85        | 4         |
| Zaman (Dakika)          | 10        | 120       | 5         | ∞         |

7. Thermal Cycler programı uygulanarak elde edilen cDNA örnekleri deney çalışmasına kadar -20°C'de saklandı.

### 3.2.4. Primerlerin Tasarlanması

Proje kapsamında ele aldığımız TWIST1, PDGFRB, VEGFR2, RANTES ve CXCR4 genlerinin ekspresyonlarını belirlemeye yönelik (her bir genin tüm bölgeleri primer dizisi tasarlamaya dahil edildi) *Forward* ve *Reverse* yönlü primerleri, *Integrated*

*DNA Technologies (IDT) ve NCBI primer designing tool(REFERANS ADRESİ)* programları kullanılarak tasarlanmıştır.

**Tablo 3-1:TWIST1, PDGFRB, VEGFR2, RANTES, CXCR4, ACTB Genlerine spesifik olarak tasarlanan primer dizileri**

| GEN ADI | FORWARD PRİMER DİZİSİ               | REVERSE PRİMER DİZİSİ               |
|---------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| CXCR4   | 5' CAT CCT CAT CCT GGC TTT CTT 3'   | 3' CAC ACC ATT GCT TGA TGA TTT C 5' |
| PDGFRB  | 5' GCT CAC CAT CAT CTC CCT TAT C 3' | 3' CTC ACA GAC TCA ATC ACC TTC C 5' |
| RANTES  | 5' CTT TGC CTA CAT TGC CCG CC 3'    | 3' TGC TGT CCC TCT CTC TTT GGC 5'   |
| TWIST1  | 5' GCA CCA TCC TCA CAC CTC T 3'     | 3' TGG CAC GAC CTC TTG AGA AT 5'    |
| VEGFR2  | 5' AGC AGG ATG GCA AAG ACT AC 3'    | 3' TAC TTC CTC CTC CTC CAT ACA G 5' |

### 3.2.5. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR (qRT-PZR)

Hastalardan elde edilen cDNA örneklerinden kantitatif gerçek zamanlı PZR (qRT-PZR) yöntemi ile ACTB, CXCR4, PDGFRB, RANTES, TWIST1 ve VEGFR2 genlerinin ifade düzeylerine bakıldı. Çalışmamızda *Applied Biosystem QuantStudio 3* cihazı ve *Bioline SensiFast SYBR No-ROX Kit* kullanıldı. Standart eğri, cDNA'ların beş farklı 1:10 dilüsyonları hazırlanarak oluşturuldu (Şekil 3.1). Çalışmaya dahil edilen tüm örnekler en az 2 kez kontrollü olarak çalışılmıştır.

#### 3.2.5.1 Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR (qRT-PZR) Protokolü

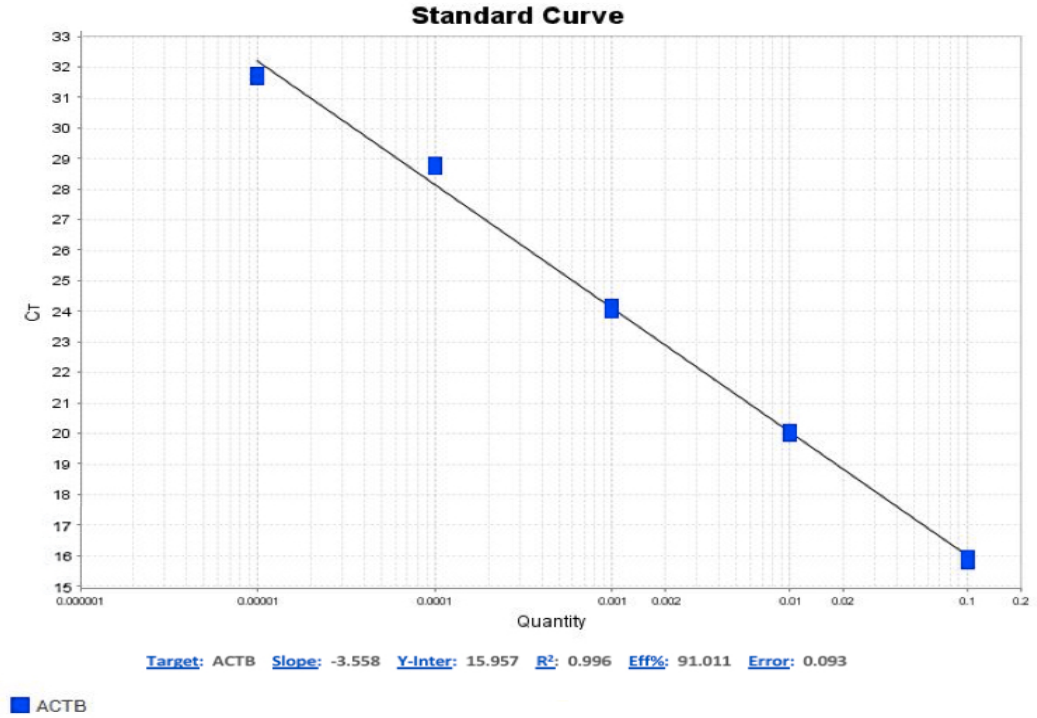
İlk olarak qRT-PZR reaksiyonu için aşağıda belirtilen kitler ile karışım hazırlandı. Karışım içeriğinde ;

- 5 µl SYBR Green
- 1 µl Forward (F) Primer
- 1 µl Reverse ( R) primer
- 1 µl cDNA örneği
- 2 µl H<sub>2</sub>O

kullanılarak, final hacim 10 µl olacak şekilde her bir gen için ayrı ayrı hazırlandı. Daha sonra, aşağıda belirtilen koşullarda qRT-PZR reaksiyonu gerçekleştirildi:

- Pre-inkübasyon: 95°C’de 2 dakika (1 döngü)
- Amplifikasyon: 95°C’de 5 saniye , 60°C’de 10 saniye (40 döngü)
- Melting Curve: 95°C’de 5 saniye, 65°C’de 1 dakika ve 97°C -
- Soğutma: 4°C’de 30 saniye

Negatif kontroller için, yapılan her bir qRT-PZR reaksiyonunda cDNA yerine su koyulmuştur. Normalizasyon işlemi, hedef genlerin ifade değerlerinin referans (housekeeping) genin ifade değerlerine bölünmesiyle gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 3-1: cDNA örneklerine ait standart eğri grafiği**

### 3.2.6 İstatistiksel Analiz

Çalışma sonucu elde edilen verilerin istatistiksel analizleri Jamovi 1.6.15, SPSS 25 (Statistical Package for the Social Sciences) ve GraphPad 8 programları kullanılarak yapıldı. P değeri 0,05'ten küçük olan değerler ( $p < 0,005$ ), istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi. Çalışmada parametrik verilerin kıyaslanması amacı ile “*Independent Sample T-testi*”, parametrik olmayan verilerin kıyaslanması amacı ile de “*Mann Whitney U Testi*” kullanıldı. Nitel verilerin korelasyonu için “*Ki-Kare Testi*” kullanıldı. Gen ekspresyonlarının dağılımının tespiti için “*Shapiro Wilk-W*” testi uygulandı.



#### 4.BULGULAR

Çalışmaya Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Pediatrik Hematoloji Bilim Dalı servisinde tanı konmuş nüks olan ve olmayan 46 pediatrik ALL hastalarından ve 6 sağlıklı kontrol grubundan sağlanan kemik iliği ve periferik kan örnekleri dahil edilmiştir. Toplanan kemik iliği ve periferik kan örneklerinden minimal rezidüel hastalık (MRH) tespiti için marker olarak kullanılabilirliğini araştırmak amacı ile TWIST1, VEGF2, RANTES(CCL5), CXCR4 ve PDGFRb genlerinin ifade düzeylerine bakıldı. 6 sağlıklı kontrolden toplanan periferik kan örneklerinde de aynı 5 genin ifade düzeyleri belirlendi.

Çalışmaya dahil edilen toplam 46 pediatrik ALL hastasının %52,2'si (n=24) kız çocuk, %47,8'i (n=22) erkek çocuktur. Ayrıca sağlıklı kontrol grubunun %50'si (n=3) kız çocuk, %50'si (n=3) erkek çocuktur.

**Tablo 4-1: Pediatrik ALL olgularının cinsiyet dağılımı**

| <b>CİNSİYET</b> | <b>SAYI (N)- ORAN (%)</b> |
|-----------------|---------------------------|
| KIZ ÇOCUK       | 24 - %52,2                |
| ERKEK ÇOCUK     | 22 - %47,8                |
| TOPLAM          | 46 - %100                 |

Olgular 2-17 yaş arasında olup, %52,2'si (n=24) 6 yaşından küçük, %47,8'i (n=22) 6 yaşından büyüktür. Olgular klinik risk değerlendirmeleri açısından Intermediate Risk (IR), Standart Risk (SR) ve Yüksek Risk (High Risk-HR) olmak üzere üç kategoriye ayrılmıştır. Olguların %30,4'ü (n=14) IR, %30,4'ü (n=14) SR ve %39,2'si (n=18) HR grubunda değerlendirilmiştir.

İmmünofenotip (WHO sınıflaması) açısından B-ALL ve T-ALL olarak gruplandırılmıştır. Olguların %80,4'ü (n=37) B-ALL; bu grupta yer alanların %75,7'si (n=28) pre B-ALL ve %24,3'ü (n=9) pro B-ALL, %19,6'sı (n=9) T-ALL grubuna dahil edilmiştir. Neoplastik hücrelerin morfolojik yapısına göre (FAB Sınıflaması) ise L1 tipi, L2 tipi ve L3 tipi olarak üç gruba ayrılmıştır. Olguların %65,2'si (n=30) L1 tipi blast, %10,9'u (n=5) L2 tipi blast, %17,4'ü (n=8) L1+L3 tipi blast ve %6,5'i (n=3) L1+L2 tipi blast olarak değerlendirilmiştir.

**Tablo 4-2: Pediatrik ALL olgularının immünofenotip (WHO) sınıflaması**

| <b>İMMÜNFENOTİP</b> | <b>SAYI (N) - ORAN (%)</b> |
|---------------------|----------------------------|
| B-ALL               | 37 - %80,4                 |
| pre B-ALL           | 28 - %75,7                 |
| pro B-ALL           | 9 - %24,3                  |
| T-ALL               | 9 - %19,6                  |
| TOPLAM              | 46 - %100                  |

**Tablo 4-3: Pediatrik ALL olgularının FAB sınıflaması**

| <b>BLAST TİPİ</b> | <b>SAYI (N)-ORAN (%)</b> |
|-------------------|--------------------------|
| L1                | 30 - %65,2               |
| L2                | 5 - %10,9                |
| L1+L2             | 3 - %6,5                 |
| L1+L3             | 8 - %17,4                |
| TOPLAM            | 46 - %100                |

Çalışmaya dahil edilen olgular nüks etme durumu açısından Tablo 4-4'te verilen kriterlere göre “geç nüks” ve “erken nüks” olmak üzere iki gruba ayrılmıştır.

**Tablo 4-4: Nüks zamanı kriterleri**

| <b>NÜKS ZAMANI</b> | <b>İLK TANI SONRASI</b> | <b>UYGULANAN TEDAVİ SONRASI</b> |
|--------------------|-------------------------|---------------------------------|
| GEÇ                |                         | > 6 ay                          |
| ERKEN              | < 18 ay                 | < 6 ay                          |

Tablo 4-4'te verilen kriterlere göre olguların %36,9'u (n=17) geç nüks, %15,2'si (n=7) erken nüks olarak gruplandırılmıştır. Geriye kalan %47,9'unda (n=22) nüks olmadığı gözlenmiştir. Ayrıca olguların %21,7'sinde (n=10) santral sinir sistemi tutulumu (CNS tutulumu) olduğu saptanmıştır. Çalışma kapsamındaki 46 pediatrik ALL olgularında hastalığa bağlı ölüm oranı %13'tür (n=6). Olguların sağkalım oranları Tablo 4-5'te verilmiştir.

**Tablo 4-5: Pediatrik ALL olgularının sağkalım oranları**

| <b>SAĞKALIM</b> | <b>SAYI (N) - ORAN (%)</b> |
|-----------------|----------------------------|
| Sağ             | 40 - %87                   |
| Ölü             | 6 - %13                    |
| TOPLAM          | 46 - %100                  |

Pre B-ALL, pro B-ALL ve T-ALL immünofenotipine sahip olguların, sağlıklı kontrollere göre gen ifadeleri (CXCR4, PDGFRB, RANTES, TWIST1, VEGFR2) karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak pre B-ALL immünofenotipine sahip olgular ile sağlıklı kontroller arasında RANTES geninde anlamlı bir değişim gözlemlendiği Tablo 4-6'da gösterilmiştir ( $p=0,015$ ).

**Tablo 4-6: Vakaların (immünofenotip açısından) sağlıklı kontrol grubu ile gen ekspresyonlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması**

|               | <b>İMMÜNOFENOTİP</b> | <b>N(SAYI)</b> | <b>ORTALAMA</b> | <b>STD.SAPMA</b> | <b>P<br/>(ANLAMLILIK)</b> |
|---------------|----------------------|----------------|-----------------|------------------|---------------------------|
| <b>CXCR4</b>  | pre B-ALL            | 28             | 1,403           | 2,305            | 0,415                     |
|               | pro B-ALL            | 9              | 0,933           | 2,649            |                           |
|               | T-ALL                | 9              | 1,808           | 2,388            |                           |
|               | Sağlıklı             | 6              | 2,028           | 0,357            |                           |
| <b>PDGFRB</b> | pre B-ALL            | 28             | 7,866           | 3,160            | 0,277                     |
|               | pro B-ALL            | 9              | 8,673           | 3,186            |                           |
|               | T-ALL                | 9              | 7,876           | 4,093            |                           |
|               | Sağlıklı             | 6              | 9,095           | 0,504            |                           |
| <b>RANTES</b> | pre B-ALL            | 28             | 7,204           | 2,288            | <b>0,015</b>              |
|               | pro B-ALL            | 9              | 8,295           | 3,228            |                           |
|               | T-ALL                | 9              | 7,680           | 3,083            |                           |
|               | Sağlıklı             | 6              | 5,803           | 0,526            |                           |
| <b>TWIST1</b> | pre B-ALL            | 28             | 7,788           | 2,866            | 0,302                     |
|               | pro B-ALL            | 9              | 9,649           | 2,253            |                           |
|               | T-ALL                | 9              | 7,944           | 3,588            |                           |
|               | Sağlıklı             | 6              | 8,426           | 0,856            |                           |
| <b>VEGFR2</b> | pre B-ALL            | 28             | 6,974           | 2,903            | 0,235                     |
|               | pro B-ALL            | 9              | 8,905           | 2,438            |                           |
|               | T-ALL                | 9              | 6,940           | 3,809            |                           |
|               | Sağlıklı             | 6              | 6,983           | 0,884            |                           |

Sağ - takipli, sağ - tedavisi devam eden, sağ-tedavisi biten ve ex olan olgular karşılaştırıldığında, sağ tedavisi devam eden ve ex olan hastalar arasında istatistiksel olarak MRD Blast yüzdeleri açısından anlamlı bir fark gözlenmiştir ( $p=0,003$ ) ve tablo 4-7’de gösterilmiştir.

**Tablo 4-7: Sağ takipli, sağ tedavisi devam eden, sağ tedavisi biten ve ex olan olguların MRD Blast yüzdesi açısından istatistiksel olarak karşılaştırılması**

|                          | SAĞKALIM       | N (SAYI) | ORTALAMA | STD.SAPMA | P<br>(ANLAMLILIK) |
|--------------------------|----------------|----------|----------|-----------|-------------------|
| <b>MRD Blast Yüzdesi</b> | Sağ Takipli    | 21       | 16,46    | 26,783    | 0,105             |
|                          | Sağ Ted. Devam | 10       | 2,13     | 2,168     |                   |
| <b>MRD Blast Yüzdesi</b> | Sağ Takipli    | 21       | 16,46    | 26,783    | 0,614             |
|                          | Sağ Ted. Biten | 9        | 10,89    | 28,950    |                   |
| <b>MRD Blast Yüzdesi</b> | Sağ Takipli    | 21       | 16,46    | 26,783    | 0,053             |
|                          | Ex             | 6        | 44       | 37,491    |                   |
| <b>MRD Blast Yüzdesi</b> | Sağ Ted. Devam | 10       | 2,13     | 2,168     | <b>0,003</b>      |
|                          | Ex             | 6        | 44       | 37,491    |                   |
| <b>MRD Blast Yüzdesi</b> | Sağ Ted. Biten | 9        | 10,89    | 28,950    | 0,075             |
|                          | Ex             | 6        | 44       | 37,491    |                   |

Sağ - takipli, sağ - tedavisi devam eden, sağ-tedavisi biten ve ex olan olguların gen ekspresyonları (CXCR4, PDGFRB, RANTES, TWIST1, VEGFR2) karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ( $p=0,318$  ;  $p=0,663$  ;  $p=0,658$  ;  $p=0,921$  ;  $p=0,865$ ).

**Tablo 4-8: Sağ takipli, sağ tedavisi devam eden, sağ tedavisi biten ve ex olan olguların gen ekspresyonlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması**

|               | SAĞKALIM       | N (SAYI) | ORTALAM<br>A | STD.SAPM<br>A | p<br>(ANLAMLIILIK<br>) |
|---------------|----------------|----------|--------------|---------------|------------------------|
| <b>CXCR4</b>  | Sağ Takipli    | 21       | 0,684        | 2,61          | 0,318                  |
|               | Sağ Ted. Devam | 10       | 1,619        | 1,44          |                        |
|               | Sağ Ted. Biten | 9        | 2,510        | 2,18          |                        |
|               | Ex             | 6        | 1,799        | 2,53          |                        |
| <b>PDGFRB</b> | Sağ Takipli    | 21       | 7,609        | 3,35          | 0,663                  |
|               | Sağ Ted. Devam | 10       | 7,790        | 3,40          |                        |
|               | Sağ Ted. Biten | 9        | 9,313        | 3,30          |                        |
|               | Ex             | 6        | 7,944        | 3,32          |                        |
| <b>RANTES</b> | Sağ Takipli    | 21       | 6,969        | 2,46          | 0,658                  |
|               | Sağ Ted. Devam | 10       | 7,529        | 2,16          |                        |
|               | Sağ Ted. Biten | 9        | 8,111        | 3,03          |                        |
|               | Ex             | 6        | 8,477        | 3,38          |                        |
| <b>TWIST1</b> | Sağ Takipli    | 21       | 7,930        | 2,93          | 0,921                  |
|               | Sağ Ted. Devam | 10       | 8,006        | 3,00          |                        |
|               | Sağ Ted. Biten | 9        | 8,765        | 3,59          |                        |
|               | Ex             | 6        | 8,486        | 2,36          |                        |
| <b>VEGFR2</b> | Sağ Takipli    | 21       | 7,283        | 2,94          | 0,865                  |
|               | Sağ Ted. Devam | 10       | 6,722        | 3,17          |                        |
|               | Sağ Ted. Biten | 9        | 7,836        | 3,77          |                        |
|               | Ex             | 6        | 7,864        | 2,58          |                        |

Tablo 4-9’da gösterildiği üzere, olguların FAB sınıflamasına göre (L1, L2, L1+L2, L1+L3) gen ekspresyonları (CXCR4, PDGFRB, RANTES, TWIST1, VEGFR2) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p=0,618$ ;  $p=0,410$ ;  $p=0,110$ ;  $p=0,460$ ;  $p=0,368$ ).

**Tablo 4-9: Olguların FAB sınıflamasına göre gen ekspresyonlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması**

|               | FAB<br>SINIFLAMASI | N(SAYI) | ORTALAM<br>A | STD.SAPM<br>A | p<br>(ANLAMLIILIK) |
|---------------|--------------------|---------|--------------|---------------|--------------------|
| <b>CXCR4</b>  | L1                 | 30      | 1,403        | 2,47          | 0,618              |
|               | L2                 | 5       | 1,533        | 2,71          |                    |
|               | L1+L3              | 8       | 1,656        | 2,24          |                    |
|               | L1+L2              | 3       | 0,307        | 1,23          |                    |
| <b>PDGFRB</b> | L1                 | 30      | 8,572        | 3,15          | 0,410              |
|               | L2                 | 5       | 7,681        | 3,41          |                    |
|               | L1+L3              | 8       | 7,177        | 3,85          |                    |
|               | L1+L2              | 3       | 5,399        | 2,81          |                    |
| <b>RANTES</b> | L1                 | 30      | 7,779        | 2,62          | 0,110              |
|               | L2                 | 5       | 7,605        | 2,92          |                    |
|               | L1+L3              | 8       | 7,268        | 2,85          |                    |
|               | L1+L2              | 3       | 5,317        | 1,14          |                    |
| <b>TWIST1</b> | L1                 | 30      | 8,733        | 2,63          | 0,460              |
|               | L2                 | 5       | 7,678        | 4,31          |                    |
|               | L1+L3              | 8       | 6,884        | 3,33          |                    |
|               | L1+L2              | 3       | 6,984        | 2,15          |                    |
| <b>VEGFR2</b> | L1                 | 30      | 7,938        | 2,79          | 0,368              |
|               | L2                 | 5       | 6,852        | 4,17          |                    |
|               | L1+L3              | 8       | 5,818        | 3,47          |                    |
|               | L1+L2              | 3       | 6,314        | 1,55          |                    |

Translokasyonlar açısından t(9;22), t(12;21), t(6;11) ve t(1;19) translokasyonlarına sahip olan olgular ve translokasyonu olmayan olguların gen ekspresyonları (CXCR4, PDGFRB, RANTES, TWIST1, VEGFR2) karşılaştırıldığında; t(9;22) translokasyonuna sahip olan hastaların, translokasyonu olmayan hastalara göre CXCR4 geninde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir ( $p=0,039$ ). Ayrıca t(9;22) translokasyonu olan hastalar ve t(1;19) translokasyonu olan hastalar arasında RANTES gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir ( $p=0,017$ ).

**Tablo 4-10: t(9;22), t(12;21), t(6;11) ve t(1;19) translokasyonu bulunan olgular ve translokasyonu bulunmayan olguların gen ekspresyonlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması**

|               | TRANSLOKASYO<br>N | N (SAYI) | ORTALAM<br>A | STD.SAPM<br>A | p<br>(ANLAMLILIK) |
|---------------|-------------------|----------|--------------|---------------|-------------------|
| <b>CXCR4</b>  | t(9;22)           | 3        | 4,114        | 1,218         | <b>0,039</b>      |
|               | t(12;21)          | 17       | 1,215        | 3,040         |                   |
|               | t(6;11)           | 3        | 3,670        | 2,207         |                   |
|               | t(1;19)           | 7        | 0,793        | 1,440         |                   |
|               | yok               | 16       | 0,898        | 1,435         |                   |
| <b>PDGFRB</b> | t(9;22)           | 3        | 10,392       | 1,921         | 0,244             |
|               | t(12;21)          | 17       | 7,392        | 4,006         |                   |
|               | t(6;11)           | 3        | 9,727        | 2,875         |                   |
|               | t(1;19)           | 7        | 6,468        | 2,804         |                   |
|               | yok               | 16       | 8,618        | 2,667         |                   |
| <b>RANTES</b> | t(9;22)           | 3        | 9,259        | 1,136         | <b>0,017</b>      |
|               | t(12;21)          | 17       | 7,173        | 2,677         |                   |
|               | t(6;11)           | 3        | 10,043       | 1,599         |                   |
|               | t(1;19)           | 7        | 5,262        | 1,776         |                   |
|               | yok               | 16       | 8,051        | 2,549         |                   |
| <b>TWIST1</b> | t(9;22)           | 3        | 8,896        | 0,973         | 0,153             |
|               | t(12;21)          | 17       | 7,991        | 2,937         |                   |
|               | t(6;11)           | 3        | 10,453       | 2,723         |                   |
|               | t(1;19)           | 7        | 5,612        | 2,780         |                   |
|               | yok               | 16       | 8,951        | 2,770         |                   |
| <b>VEGFR2</b> | t(9;22)           | 3        | 7,969        | 0,335         | 0,162             |
|               | t(12;21)          | 17       | 7,092        | 3,291         |                   |
|               | t(6;11)           | 3        | 9,896        | 2,289         |                   |
|               | t(1;19)           | 7        | 5,146        | 2,908         |                   |
|               | yok               | 16       | 7,981        | 2,847         |                   |

Trizomileri ele aldığımızda, trizomisi olan hastalar ve trizomisi olmayan hastalar, gen ekspresyonları (CXCR4, PDGFRB, RANTES, TWIST1 ve VEGFR2) açısından kıyaslandığında PDGFRB, RANTES, TWIST1 ve VEGFR2 genlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir ( $p=0,007$ ;  $p=0,005$ ;  $p=0,009$ ;  $p=0,008$ ).

**Tablo 4-11: Trizomi tespit edilen ve trizomi tespit edilmeyen olguların gen ekspresyonlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması**

|               | GRUP | N(SAYI) | ORTALAMA | MEDYAN | STD.SAPMA | P<br>(ANLAMLIILIK) |
|---------------|------|---------|----------|--------|-----------|--------------------|
| <b>CXCR4</b>  | Var  | 8       | 2,24     | 2,92   | 2,03      | 0,263              |
|               | Yok  | 38      | 1,21     | 1,10   | 2,40      |                    |
| <b>PDGFRB</b> | Var  | 8       | 10,79    | 11,58  | 1,99      | <b>0,007</b>       |
|               | Yok  | 38      | 7,44     | 7,95   | 3,24      |                    |
| <b>RANTES</b> | Var  | 8       | 9,80     | 10,07  | 2,59      | <b>0,005</b>       |
|               | Yok  | 38      | 7,03     | 7,09   | 2,39      |                    |
| <b>TWIST1</b> | Var  | 8       | 10,59    | 10,25  | 1,66      | <b>0,009</b>       |
|               | Yok  | 38      | 7,68     | 7,81   | 2,91      |                    |
| <b>VEGFR2</b> | Var  | 8       | 9,89     | 9,65   | 1,58      | <b>0,008</b>       |
|               | Yok  | 38      | 6,81     | 7,16   | 3,02      |                    |

Tablo 4-12’de de gösterildiği üzere, çalışmada delesyona sahip olan hastalar ve delesyonu olmayan hastalar, gen ekspresyonları (CXCR4, PDGFRB, RANTES, TWIST1 ve VEGFR2) açısından kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p=0,275$ ,  $p=0,613$ ,  $p=0,599$ ,  $p=0,357$ ,  $p=0,270$ ).

**Tablo 4-12: Delesyonu olan ve delesyonu olmayan olguların gen ekspresyonlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması**

|               | DELESYON | N (SAYI) | ORTALAMA | STD.SAPMA | P<br>(ANLAMLIILIK) |
|---------------|----------|----------|----------|-----------|--------------------|
| <b>CXCR4</b>  | Var      | 7        | 2,49     | 2,76      | 0,275              |
|               | Yok      | 39       | 1,19     | 2,25      |                    |
| <b>PDGFRB</b> | Var      | 7        | 8,80     | 4,37      | 0,613              |
|               | Yok      | 39       | 7,89     | 3,12      |                    |
| <b>RANTES</b> | Var      | 7        | 8,25     | 4,08      | 0,599              |
|               | Yok      | 39       | 7,38     | 2,32      |                    |
| <b>TWIST1</b> | Var      | 7        | 9,22     | 3,06      | 0,357              |
|               | Yok      | 39       | 8,00     | 2,92      |                    |
| <b>VEGFR2</b> | Var      | 7        | 8,65     | 3,19      | 0,270              |
|               | Yok      | 39       | 7,11     | 3,01      |                    |

Olgular nüks zamanlarına göre gen ekspresyonları (CXCR4, PDGFRB, RANTES, TWIST1 ve VEGFR2) açısından kıyaslandığında aralarında istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır ( $p=0,501$ ,  $p=0,664$ ,  $p=0,066$ ,  $p=0,961$ ,  $p=0,836$ ).

**Tablo 4-13: Pediatrik ALL olgularının nüks zamanlarına göre gen ekspresyonlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması**

|               | NÜKS ZAMANI | N (SAYI) | ORTALAMA | STD.SAPMA | p<br>(ANLAMLIILIK) |
|---------------|-------------|----------|----------|-----------|--------------------|
| <b>CXCR4</b>  | Geç nüks    | 14       | 1,938    | 2,223     | 0,501              |
|               | Erken nüks  | 7        | 2,164    | 2,292     |                    |
|               | 2.kez nüks  | 2        | 0,744    | 2,620     |                    |
|               | Yok         | 23       | 1,006    | 2,384     |                    |
| <b>PDGFRB</b> | Geç nüks    | 14       | 8,818    | 3,469     | 0,664              |
|               | Erken nüks  | 7        | 8,519    | 1,580     |                    |
|               | 2.kez nüks  | 2        | 5,129    | 4,636     |                    |
|               | Yok         | 23       | 7,645    | 3,477     |                    |
| <b>RANTES</b> | Geç nüks    | 14       | 8,030    | 2,608     | 0,066              |
|               | Erken nüks  | 7        | 8,311    | 2,443     |                    |
|               | 2.kez nüks  | 2        | 4,911    | 0,952     |                    |
|               | Yok         | 23       | 7,178    | 2,694     |                    |
| <b>TWIST1</b> | Geç nüks    | 14       | 8,514    | 3,005     | 0,961              |
|               | Erken nüks  | 7        | 7,812    | 2,415     |                    |
|               | 2.kez nüks  | 2        | 8,197    | 1,692     |                    |
|               | Yok         | 23       | 8,092    | 3,244     |                    |
| <b>VEGFR2</b> | Geç nüks    | 14       | 7,768    | 2,773     | 0,836              |
|               | Erken nüks  | 7        | 6,498    | 2,786     |                    |
|               | 2.kez nüks  | 2        | 7,726    | 1,751     |                    |
|               | Yok         | 23       | 7,313    | 3,444     |                    |

Pediatrik ALL olgularının risk gruplarına (HR,IR,SR) göre gen ekspresyonları (CXCR4, PDGFRB, RANTES, TWIST1 ve VEGFR2) kıyaslandığında CXCR4 geninde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir ( $p=0,039$ ). Ancak diğer PDGFRB, RANTES, TWIST1 ve VEGFR2 genlerinde istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır ( $p=0,261$ ,  $p=0,125$ ,  $p=0,503$ ,  $p=0,506$ ).

**Tablo 4-14: Pediatrik ALL olgularının risk gruplarına göre gen ekspresyonlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması**

|               | <b>RİSK GRUBU</b> | <b>N (SAYI)</b> | <b>ORTALAMA</b> | <b>STD.SAPMA</b> | <b>p (ANLAMLILIK)</b> |
|---------------|-------------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------------|
| <b>CXCR4</b>  | HR                | 18              | 2,051           | 2,28             | <b>0,039</b>          |
|               | SR                | 14              | 0,067           | 2,13             |                       |
|               | IR                | 14              | 1,861           | 2,25             |                       |
| <b>PDGFRB</b> | HR                | 18              | 8,710           | 3,74             | 0,261                 |
|               | SR                | 14              | 6,989           | 2,32             |                       |
|               | IR                | 14              | 8,181           | 3,48             |                       |
| <b>RANTES</b> | HR                | 18              | 8,245           | 2,85             | 0,125                 |
|               | SR                | 14              | 6,575           | 1,63             |                       |
|               | IR                | 14              | 7,502           | 2,97             |                       |
| <b>TWIST1</b> | HR                | 18              | 8,531           | 3,03             | 0,503                 |
|               | SR                | 14              | 7,387           | 2,99             |                       |
|               | IR                | 14              | 8,529           | 2,83             |                       |
| <b>VEGFR2</b> | HR                | 18              | 7,612           | 3,19             | 0,506                 |
|               | SR                | 14              | 6,550           | 3,00             |                       |
|               | IR                | 14              | 7,797           | 2,97             |                       |

Olguların remisyona girme zamanına (8.gün, 15.gün, 33.gün ve 36.gün) göre gen ekspresyonları (CXCR4, PDGFRB, RANTES, TWIST1 ve VEGFR2) kıyaslandığında, Tablo 4-15'te gösterildiği üzere, geç remisyona (33.gün- 36.gün) ve 8.gün remisyona arasında PDGFRB ve RANTES genlerinin ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p=0,007$ ,  $p=0,015$ ). Ancak CXCR4, TWIST1 ve VEGFR2 genlerinin ekspresyonu açısından istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı fark bulunamamıştır ( $p=0,059$ ,  $p=0,096$ ,  $p=0,201$ ).

**Tablo 4-15: Pediatrik ALL olgularının remisyona girme sürelerine göre gen ekspresyonlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması**

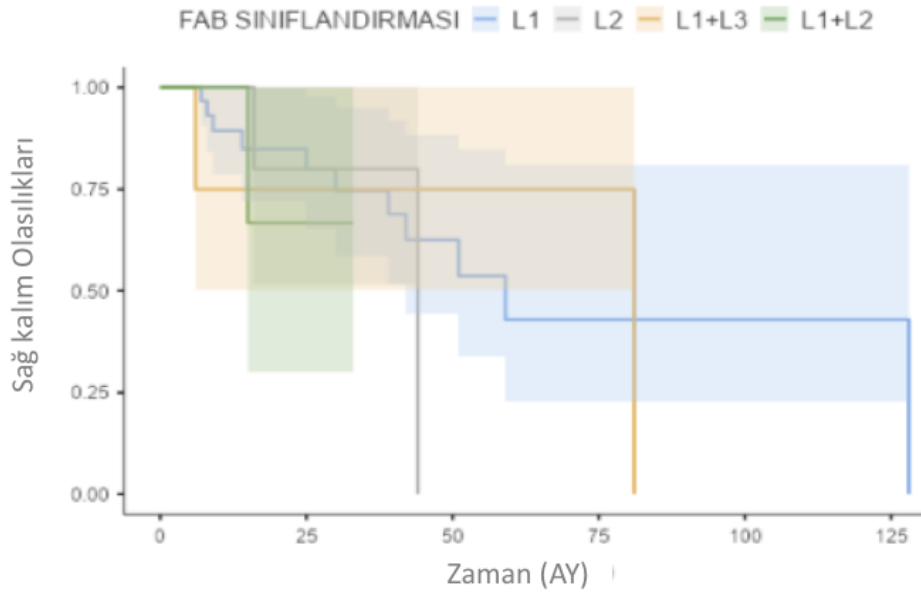
|               | REMİSYON | N (SAYI) | ORTALAMA | STD.SAPMA | p<br>(ANLAMLIILIK) |
|---------------|----------|----------|----------|-----------|--------------------|
| <b>CXCR4</b>  | 8.gün    | 5        | -0,864   | 1,607     | 0,059              |
|               | 15.gün   | 18       | 1,548    | 2,382     |                    |
|               | 33.gün   | 15       | 1,771    | 2,413     |                    |
|               | 36.gün   | 8        | 1,728    | 2,117     |                    |
| <b>PDGFRB</b> | 8.gün    | 5        | 4,674    | 1,690     | <b>0,007</b>       |
|               | 15.gün   | 18       | 8,627    | 2,631     |                    |
|               | 33.gün   | 15       | 8,041    | 3,882     |                    |
|               | 36.gün   | 8        | 8,738    | 3,436     |                    |
| <b>RANTES</b> | 8.gün    | 5        | 5,820    | 0,748     | <b>0,015</b>       |
|               | 15.gün   | 18       | 7,453    | 2,487     |                    |
|               | 33.gün   | 15       | 7,688    | 3,230     |                    |
|               | 36.gün   | 8        | 8,366    | 2,239     |                    |
| <b>TWIST1</b> | 8.gün    | 5        | 4,847    | 2,818     | 0,096              |
|               | 15.gün   | 18       | 8,738    | 2,487     |                    |
|               | 33.gün   | 15       | 8,266    | 3,149     |                    |
|               | 36.gün   | 8        | 8,861    | 2,641     |                    |
| <b>VEGFR2</b> | 8.gün    | 5        | 4,286    | 3,076     | 0,201              |
|               | 15.gün   | 18       | 7,761    | 2,735     |                    |
|               | 33.gün   | 15       | 7,578    | 3,298     |                    |
|               | 36.gün   | 8        | 7,885    | 2,619     |                    |

Santral Sinir Sistemi (CNS) tutulumları olan ve olmayan olguların gen ekspresyonları (CXCR4, PDGFRB, RANTES, TWIST1 ve VEGFR2) karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel bir farklılık bulunamamıştır ( $p=0,562$ ,  $p=0,227$ ,  $p=0,775$ ,  $p=0,171$ ,  $p=0,250$ ).

**Tablo 4-16: Pediatrik ALL olgularının CNS tutulum durumlarına göre gen ekspresyonlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması.**

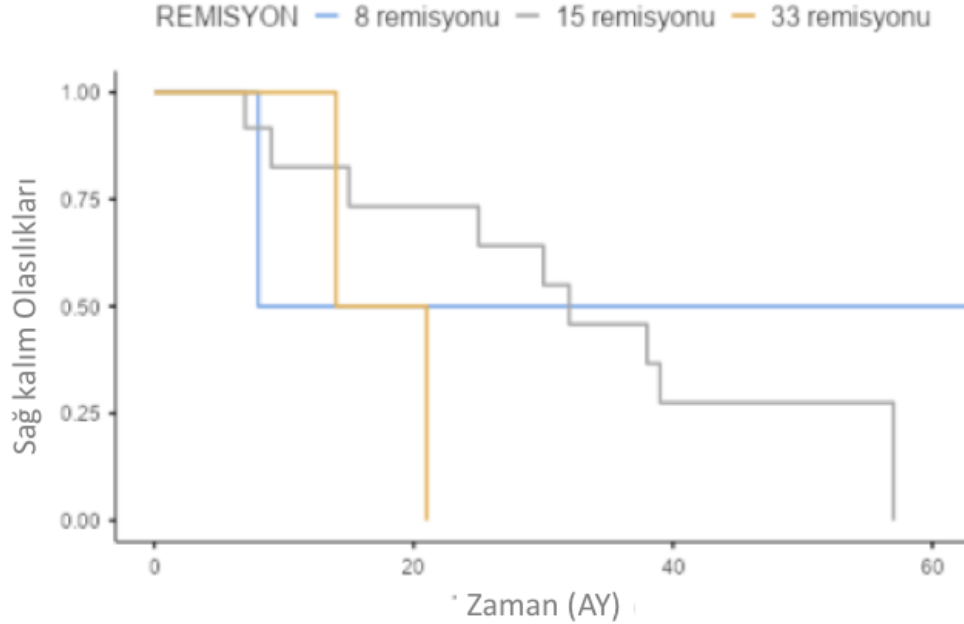
|               | CNS TUTULUMU | N (SAYI) | ORTALAMA | STD.SAPMA | p (ANLAMLIILIK) |
|---------------|--------------|----------|----------|-----------|-----------------|
| <b>CXCR4</b>  | Var          | 36       | 1,498    | 2,37      | 0,562           |
|               | Yok          | 10       | 0,999    | 2,35      |                 |
| <b>PDGFRB</b> | Var          | 36       | 8,386    | 3,11      | 0,227           |
|               | Yok          | 10       | 6,728    | 3,79      |                 |
| <b>RANTES</b> | Var          | 36       | 7,582    | 2,45      | 0,775           |
|               | Yok          | 10       | 7,254    | 3,30      |                 |
| <b>TWIST1</b> | Var          | 36       | 8,523    | 2,85      | 0,171           |
|               | Yok          | 10       | 6,956    | 3,08      |                 |
| <b>VEGFR2</b> | Var          | 36       | 7,652    | 2,93      | 0,250           |
|               | Yok          | 10       | 6,241    | 3,37      |                 |

Çalışmaya dahil edilen pediatrik ALL olgularının blast tiplerine göre sağ kalım analizlerine bakıldığında, L1+L2 tipi blasta sahip olan olguların sağ kalım oranlarının en az olduğu tespit edilmiştir. Sonra sağ kalım oranları sırasıyla (az→çok) L2 tipi blastlarda, L1+L3 tipi blastlarda ve en yüksek sağ kalım oranı ise L1 tipi blasta sahip olan olgularda tespit edilmiştir ( $L1+L2 < L2 < L1+L3 < L1$ ). Blast tiplerine göre olguların sağ kalım analizleri şekil 4-1’de gösterilmiştir.



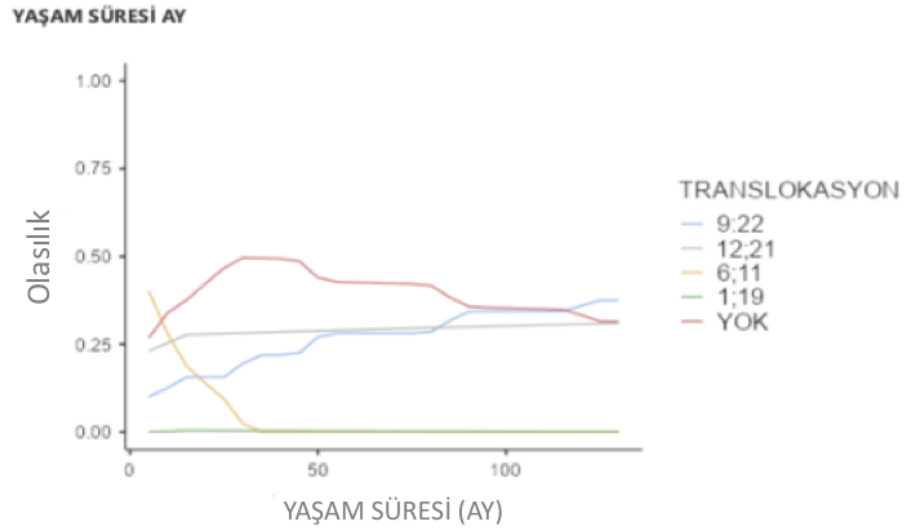
**Şekil 4-1: Olguların blast tipine göre sağ kalım zaman aralığı.**

Pediyatrik ALL olgularının remisyon zamanına bağlı olarak sağ kalım analizlerine bakıldığında, 8.gün (erken remisyon) remisyona giren olgularda sağ kalım süresinin en yüksek, 33.gün (geç remisyon) remisyona giren olguların ise genellikle sağ kalım sürelerinin daha düşük olduğu tespit edilmiştir.



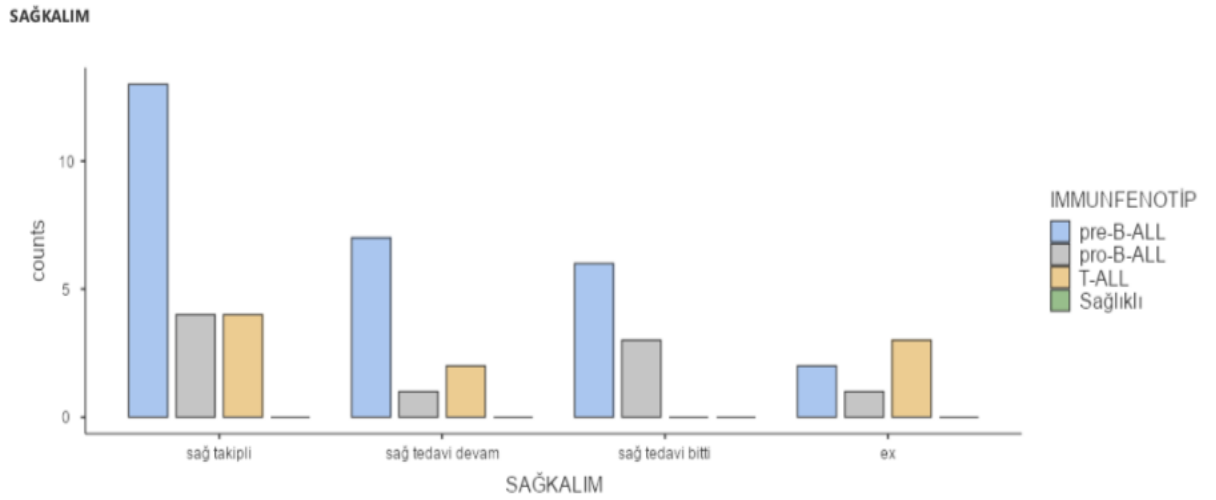
**Şekil 4-2: Olguların remisyon zamanına göre sağ kalım zaman aralığı.**

Translokasyonu olmayan pediyatrik ALL olgularının sağ kalım zaman aralıklarının daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Şekil 4-3'te de gösterildiği üzere en düşük sağ kalım zaman aralığı t(1;19) translokasyonuna sahip olgularda gözlenmiştir. Daha sonra en düşük sağ kalım t(6;11) translokasyonlu olgularda gözlemlenmiştir. Ayrıca t(9;22) translokasyonlu olguların, t(12;21) translokasyonlu olgulara göre daha uzun bir sağ kalım zamanına sahip olduğu tespit edilmiştir.

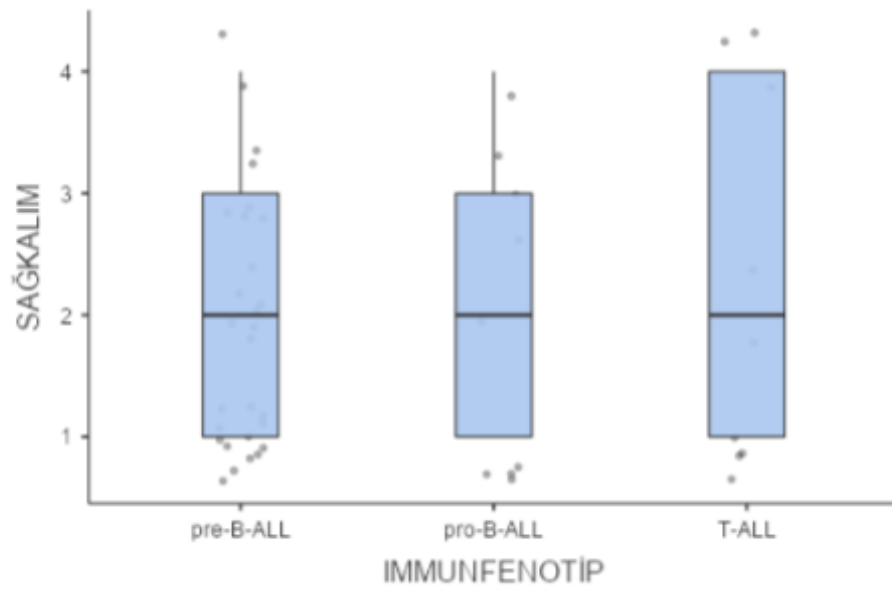


**Şekil 4-3: Translokasyon tipine göre olguların yaşam süresi (ay)**

Pediyatrik ALL olgularının immünfenotip gruplarına göre sağ kalım-güncel durumları şekil 4-4 ve şekil 4-5'teki grafiklerde gösterilmiştir.



**Şekil 4-4: Pediyatrik ALL olgularının immünfenotip gruplarına göre sağ kalımlarını gösteren sütun grafikleri**



**Şekil 4-5: Pediatrik ALL olgularının immüfenotip gruplarına göre sağ kalımlarını gösteren çizgi-kutu grafiği**

## 5.TARTIŞMA

Akut lenfoblastik lösemi (ALL) lenfoid projenitör hücrelerin kemik iliği ve ekstramedullar bölgelerde klonal proliferasyonu ile karakterize olan, en yaygın çocukluk çağında görülen bir hematolojik malignitedir(6). Akut lösemi gelişiminde bir çok çevresel ve genetik risk faktörü olduğu bilinmektedir fakat; etiyolojisi günümüzde halen net olarak aydınlatılamamıştır (10,11).

Yapılan kombine tedaviler sonrasında ALL hastalarında tam bir iyileşme (remisyon) görülse de, bu hastalığın genellikle tekrarlama (nüks etme) riski mevcuttur. Bazı olgularda kanserin tekrarlama riski bazı klinik ve biyobelirteçler ile tespit edilebilmekte, fakat olguların çoğunda bu belirteçler saptanamamaktadır (106).

Lösemilerde tedaviden kaçan ve nükslere yol açan hücreler sonucunda “Minimal Residual Disease/Minimal Rezidüel Hastalık (MRD/MRH) gelişmektedir (29). Yapılan son çalışmalar göstermektedir ki, hastaların risk gruplarının belirlenmesi ve risk gruplarına uygun tedavi yöntemlerinin planlanabilmesi için MRD’nin tespit edilmesi çok büyük önem arz etmektedir (29,31). ALL hastalarında remisyonunda (hastaliksız) kalma süresi MRD’nin kontrol altında tutulmasına bağlıdır (32,33). Hematolojik malignitelerin tespit edilebilmesi için, kanda ve kemik iliğinde anormal immünofenotiplerin ve spesifik gen anomalilerinin (Ig/THR) saptanması gerekir. Bunun için kullanılan yöntemlerden bazıları ise akım sitometri veya PZR yöntemleridir. Günümüzde MRD tespiti için kullanılan klasik ve yaygın kullanılan teknikler ise; Ig/THR hedefli qPZR, klasik akım sitometri-MRD ve füzyon gen hedefli qPZR olarak belirtilmektedir (34). Bu yöntemler aracılığı ile T ya da B hücreli ALL’de MRD’nin tespit edilmesi amacıyla, kromozomal rekombinasyonlarla meydana gelen anormal füzyon bölgelerin belirlenmesi ve lösemi spesifik olarak oluşan T hücre reseptör genlerinin (THR) yeniden düzenlenmeleri olmak üzere iki farklı belirteçle analiz yapılmaktadır (30). Klinik olarak yapılan çalışmalarda genellikle hastalarda Ig veya T-hücre reseptörü genleri PZR’da MRD için hedef bölge olarak seçilerek ekspresyon düzeyleri belirlenmektedir (35). Fakat bazı pediatrik ALL olgularında residüel hastalığın tespiti amacı ile değerlendirme kriterlerine alınan moleküler belirteçler bulunmamaktadır. Bu nedenle, ifadeleri anormal düzeyde gözlenen genlerin belirlenmesi, residüel hastalığın tespit ve takip edilmesi açısından oldukça büyük bir önem arz etmektedir. Spesifik gen

anomalileri, kromozomal rekombinasyonlar sonucu meydana gelen füzyon genler gibi biyobelirteçleri bulunmayan pediatrik ALL olgularında anormal düzeylerde ifadelenen genler, residüel hastalığın önceden öngörülebilmesi için biyobelirteç olarak değerlendirilebilir.

Bu bilgiler ışığında tez çalışmamızda; standart Ig/THR tanı yaklaşımından farklı olarak ALL olgularında nüks, kemik iliği mikroçevresinde homing ve hücre farklılaşması açısından önemli olabileceğini düşündüğümüz TWIST1, VEGFR2, RANTES, CXCR4 ve PDGFRb genlerinin ifade düzeylerini araştırdık. Pediatrik ALL olgularında söz konusu bu ele alınan hedef genlerin ifadelene düzeyleri ile nüks arasındaki ilişkiyi açığa kavuşturmak, söz konusu genlerin residüel hastalık açısından bilgi verici ve tedaviye yeniden yön verebilecek yeni belirteçler olup olmadığını araştırdık.

Çalışma kapsamına alınan 46 pediatrik ALL hastasının %52,2'si (n=24) kız çocuk, %47,8'i (n=22) erkek çocuktur. Ayrıca 6 sağlıklı kontrol grubunun %50'si (n=3) kız çocuk ve %50'si (n=3) erkek çocuktur. Hastaların yaş aralığı 2-17 yaş olup, %52,2'si (n=24) 2-6 yaş, %47,8'i (n=22) ise 6-17 yaş aralığındadır. Hastalar IR, SR, HR olmak üzere üç farklı risk kategorisinde değerlendirildi ve %30,4'ü (n=14) IR, %30,4'ü (n=14) SR ve %39,2'sinin (n=18) HR kategorisinde olduğu belirlendi. Ayrıca immünofenotip açısından hastaların %80,4'ü (n=37) B-ALL ve geri kalanı T-ALL olarak sınıflandırılmıştır. B-ALL olgularının %75,7'si (n=28) pre B-ALL ve %24,3'ü pro B-ALL'dir. Olguların blast tiplerine bakıldığında %65,2'sinin (n=30) L1 tipi, %10,9'unun (n=5) L2 tipi, %6,5'inin (n=3) L1+L2 tipi ve %17,4'ünün (n=8) L1+L3 tipi olduğu saptanmıştır. Relasp ile ilişkili olarak, olguların %36,9'unun (n=17) geç nüks, %15,2'sinin (n=7) erken nüks olduğu tespit edildi ve olguların %47,9'unda (n=22) nüks gelişmedi. Çalışmamızdaki olguların 6'sı ex olmuştur.

Projemizde araştırdığımız biyobelirteç adayı genlerden biri CXCR4 genidir. CXCR4, hücre göçü ve hematopoietik kök hücrelerin kemik iliği nişine (mikroçevresine) homingi sırasında, normal B hücrelerinin lenfopoezinde önemli rol oynar (107). *L.C.J. van den Berk ve ark.* tarafından yapılan çalışmalarda, lösemik blast hücrelerinde CXCR4 gen ifadesinin yüksek olduğu, bu durumun da B-ALL'de kemik iliği infiltrasyonuna neden olduğunu öne sürülmüştür. Bu deneysel bulgulara göre, CXCR4 genindeki ifade artışı; nüks insidansının artışı, kötü prognoz ve kısa sağ kalım zamanı ile

ilişkilendirmiştir. (108). Çalışmamızda *L.C.J. van den Berk ve ark.*'nın bulguları doğrultusunda, olguların tamamında CXCR4 gen ifadesinin istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen 1,55 kat artış gözlenmiştir. CXCR4 ifade düzeyi ve nüks durumu incelendiğinde, erken nüks durumlarında 2,16 kat arttığı saptanmıştır, ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p=0,501$ ). Ayrıca sağ kalım açısından da CXCR4 gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $p=0,318$ ).

Çalışmamızda, araştırma kapsamına aldığımız genlerin ifade düzeyleri ile t(9;22), t(12;21), t(6;11) ve t(1;19) translokasyonları arasındaki ilişkisi araştırıldı. Bu bağlamda CXCR4'ün t(9;22) saptanan olgularda, translokasyon gözlenmeyen olgulara göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ( $p=0,039$ ). *Savlı H. Ve ark.*'lerinin yaptığı çalışmada, ALL olgularında, CXCR4 gen ifadesi ve iyi prognoz ile ilişkili olduğu bilinen t(12;21) arasındaki korelasyon araştırılmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (109). Benzer şekilde çalışmamızda da CXCR4 gen ifadesi ile t(12;21) ve diğer translokasyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanamamıştır.

Hastaların kromozom analizi neticesinde trizomik olduğu belirlenen 8 hastada CXCR4 geninin, trizomik olmayanlara göre istatistiksel olarak değişmediğini belirledik ( $p=0,263$ ). Literatürde ALL hastalarında CXCR4 gen ifadesi ile trizomi arasındaki ilişkiyi araştıran herhangi bir bilimsel çalışmaya rastlamadık.

Hastalarımızın risk sınıflaması ile ilişkili olarak CXCR4 gen ifadesini incelediğimizde, yüksek risk (HR) grubundaki hastalarda standart risk (SR) grubunda olanlara göre yaklaşık 2 kat artış saptadık ( $p=0,039$ ). *Sison ve ark.*'lerinin yaptığı çalışmaya göre, pediatrik ALL'de CXCR4 gen ifadesinin baskılanması, yüksek risk grubunda olan olguların tedavisi açısından (lestaurtinib) yararlı olduğu bildirilmiştir (110). Bu bilgiye ve bulgularımıza göre CXCR4'ün yüksek risk grubu ile doğrudan ilişkili olduğu söylenebilir.

Olguların remisyon zamanlarına göre, geç remisyon durumunda, erken remisyona göre CXCR4'ün gen ifadesinde artış belirlendi ( $p=0,059$ ). İstatistiksel olarak anlamlılığın güçlenmesi için daha geniş kohortlarda çalışılmasının faydalı olabileceğini düşünmekteyiz.

Bunun yanı sıra CNS tutulumu belirlenen 10 olguda tutulumu olmayanlara göre, CXCR4 ifade düzeyinde, istatistiksel anlamlı olmayan, 1,5 kat artış saptadık ( $p=0,562$ ). CNS tutulumu nüks eden pediatrik ALL vakalarında yaygın olarak görüldüğü bilinmektedir. *Marz ve ark.* tarafından yapılan bir çalışmada, CXCR4 gen ifadesinin baskılandığı hücreler (SD-1) ile kan-serebrospinal sıvı bariyeri koroid pleksus epiteli arasındaki interaksiyonunun ve transmigrasyonunun azaldığı belirlenmiştir (111). Buna göre ve elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda CXCR4'ün CNS tutulumuna ve dolayısıyla kötü prognoza katkı sağlayabileceği söylenebilir.

Özetle; çalışma kapsamına aldığımız olgularda, CXCR4 gen ifade düzeyi artışı HR risk grubu ve t(9;22) translokasyon durumları ile istatistiksel olarak anlamlı olduğunu belirledik. Diğer bulgularımızla beraber CXCR4'ün pediatrik ALL olgularının kötü prognozu ile ilişkili olarak değerlendirilebileceğini düşünüyoruz. Bu bağlamda CXCR4'ün nüks pediatrik ALL vakaları açısından bir biyobelirteç olarak ileri araştırmalarda değerlendirilebilecek nitelikte olduğu kanaatindeyiz.

Tez çalışmamızda araştırmaya dahil ettiğimiz bir diğer gen PDGFRB'dir. Lösemi vakaları ile yapılan çeşitli çalışmalar sonucunda, PDGFRB geninin translokasyon neticesinde füzyon gen yapısı (EBF1-PDGFRB) oluşturduğu belirtilmiştir. Oluşan bu füzyon genin, B-ALL vakalarının <%1'inden sorumlu olduğu ve Philadelphia benzeri (Ph-like ALL) ALL tipinde yaygın olarak gözlemlendiği belirtilmiştir (98). Çalışmamızda olguların tamamı ve kontrol grupları PDGFRB gen ifadesi açısından kıyaslandığında, gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememesine rağmen, yaklaşık 2 kat artış gözlenmiştir. *Schwab ve ark.*'ları tarafından yapılan bir çalışmada, EBF1-PDGFRB füzyon geni saptanan 12 hasta çalışmaya dahil edilmiş ve bu hastalardan 7'sinin tam remisyondan 18-59 ay sonra geç nüks olduğu belirtilmiştir (99). Tez çalışmamızda, Schwab ve ark.'larının çalışmasının aksine, PDGFRB gen ifade düzeyinin geç ve erken nüksler ile istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon göstermediğini gözlemledik ( $p=0,664$ ).

*Schwab ve ark.*'larının yapmış olduğu bu çalışmada, PDGFRB füzyon gen ifadesinin, hastaların geç remisyona girmesine neden olduğu belirtilmiştir (99). Tez çalışmamızda remisyon zamanları (8.gün, 15.gün, 33.gün ve 36.gün) ile PDGFRB gen ifade düzeyleri arasındaki ilişkiyi incelediğimizde, bu çalışmaya paralel olarak, geç remisyona giren

olgularda, 8.gün remisyona giren olgulara kıyasla PDGFRB gen ifade düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptadık ( $p=0,007$ ).

*L den Boer ve ark.*ları tarafından, 122 pediatrik ALL (64'ü PDGFRB füzyon pozitif, 40'ı ABL1 füzyon pozitif, 10'u CSF1R füzyon pozitif ve 8'i ABL2 füzyon pozitif) vakası ile yapılan bir çalışma sonucunda, PDGFRB füzyonu ve diğer füzyon genleri taşıyan hastalar arasında sağ kalım açısından anlamlı bir fark olmadığı bildirilmiştir (112). Benzer şekilde çalışmamızda da PDGFRB gen ifade düzeyi ile sağ kalım arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptamadık ( $p=0,663$ ). Ayrıca  $t(9;22)$ ,  $t(12;21)$ ,  $t(6;11)$  ve  $t(1;19)$  translokasyonu saptadığımız olgular ile translokasyonu olmayan olgular arasında PDGFRB gen ifade düzeylerini inceledik ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptamadık. Şimdiye kadar, ele aldığımız translokasyonlar ile PDGFRB ifade düzeyi arasındaki ilişkinin incelendiği herhangi bir literatür bilgisine rastlamadık.

Bilindiği üzere PDGFRB füzyonu, pediatrik pre B-ALL vakalarının <%1'inden sorumludur (98). Çalışmamıza dahil ettiğimiz 46 pediatrik ALL olgusu ( 28'i pre B-ALL, 9'u pro B-ALL ve 9'u T-ALL) ve 6 sağlıklı kontrolü immünofenotip açısından kıyasladığımızda, pre B-ALL grubu ile PDGFRB gen ifadesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptamadık ( $p=0,277$ ). Yine bilindiği üzere PDGFRB füzyonu, pediatrik pre B-ALL vakalarında yüksek risk ile ilişkilendirilmektedir. Ancak çalışmamızda, olguların risk grupları (HR, SR, IR) ele alındığında, PDGFRB ifade düzeylerinde anlamlı bir değişime rastlamadık ( $p=0,261$ ).

Çalışmamızdaki tüm vakaları ele aldığımızda, 1,6,8,17,21,22. kromozomlarının trizomisi saptanmıştır. Trizomik vakalarda, trizomik olmayanlara göre PDGFRB ifade düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğunu belirledik ( $p=0,002$ ). Literatürde, PDGFRB ifade düzeyi ile trizomiler arasındaki ilişkiyi inceleyen herhangi bir çalışma bulunamamıştır. PDGFRB geni 5q33'de lokalizedir. Bu trizomik durumlarda trizomi 5'i saptamamıza rağmen PDGFRB gen ifadesinde artış gözlenmesinin, PDGFRB sinyal yolağında görevli diğer kromozomlarda lokalize olan genlerin fonksiyonel bir sonucu olabileceğini düşünmekteyiz.

Ayrıca literatürden farklı olarak çalışmamızda, PDGFRB gen ifade düzeyi ile CNS tutulumu ve KİT tedavisi arasındaki ilişkiyi araştırdık. PDGFRB ifade düzeyi ile

olguların CNS tutulumu arasında anlamlı bir korelasyon saptamadık ( $p=0,227$ ). Fakat KİT tedavisi olan ve olmayan hastalar açısından PDGFRB gen ifade düzeylerini incelediğimizde, istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirledik ( $p=0,007$ ).

Özetle; çalışmamızda PDGFRB geni açısından elde ettiğimiz sonuçlara göre, özellikle indüksiyon tedavisi sonrasında geç remisyona giren hastalarda PDGFRB gen ifade düzeyinin yüksek olması, genin remisyon açısından bir biyobelirteç adayı olarak değerlendirilebileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca trizomilerde PDGFRB ifade düzeyinin yüksek olması PDGFRB yolağında görevli farklı kromozomlarda lokalize olan genlerin fonksiyonel bir sonucu olduğu kanaatindeyiz.

Tez kapsamında biyobelirteç adayı olarak RANTES (CCL-5) geninin ifade düzeyini araştırdık. Bilindiği üzere RANTES monositler, eozinofiller ve T lenfositler için kemoatraktan görevi görmektedir ve T hücrelerinin aktive olmasını destekleyici bir role sahiptir (71). Çalışmamızda vaka-kontrol grupları arasında RANTES gen ekspresyonu kıyaslandığında genel kat-değişimi oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilememiştir. Literatürde şimdiye kadar, RANTES geni ile pediatrik ALL arasındaki ilişkiyi açıklayan bir çalışma mevcut değildir. Çalışmamızda RANTES gen ifade düzeyi ile olguların immünofenotipleri açısından (pre B-ALL, pro B-ALL ve T-ALL) ve hasta-sağlıklı grup açısından bir korelasyon olup olmadığını araştırdık. Yaptığımız istatistiksel analizler sonucunda, RANTES gen ifade düzeyinde pre B-ALL alt grubuna sahip hastalarda, sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlemledik ( $p=0,015$ ). Çalışmamızda elde ettiğimiz bu veriler, ALL immünofenotipleri ile RANTES gen ilişkisinin aydınlatılması açısından yapılacak olan çalışmalara ışık tutacağı düşüncesindeyiz.

Çalışmamızdaki trizomik vakaların RANTES gen ifadesini araştırdığımızda, trizomisi olan vakalar ile trizomisi olmayan vakalar arasında RANTES ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptadık ( $p=0,020$ ). RANTES, 17. kromozomun q kolunda lokalize olan bir gendir (10) ve pediatrik ALL hasta grubumuzda 17. kromozom trizomisi olan hastalar mevcuttur. Bu nedenle elde ettiğimiz verilere doğrultusunda, trizomiye sahip olan bireylerde ALL açısından, bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini düşünüyoruz. Çalışmamızda ayrıca RANTES gen ifade düzeylerinin ALL'de delesyon,

sağ kalım, nüks ve risk grubu ile ilişkisini ilk defa biz araştırdık fakat istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptamadık ( $p=0,422$ ,  $p=0,658$ ,  $p=0,066$ ,  $p=0,125$ ).

RANTES geninin ALL ile ilişkisinin ilk defa araştırıldığı bu tez çalışmasında, RANTES gen ifade düzeyinin remisyon zamanları ile ve translokasyon tipleri ile ilişkisini araştırdık. Remisyon açısından, geç remisyona (33. gün) giren vakaların, erken remisyon (8. Gün) görülen vakalara kıyasla, RANTES gen ifade düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptadık ( $p=0,015$ ). Buna ek olarak;  $t(9;22)$ ,  $t(12;21)$ ,  $t(6;11)$  ve  $t(1;19)$  translokasyonları saptanan ve saptanmayan hastalar arasında RANTES gen ekspresyon düzeylerini karşılaştırdık. Bulgularımıza göre,  $t(9;22)$  translokasyonu taşıyan hastalarda,  $t(1;19)$  translokasyonu bulunan hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptadık ( $p=0,017$ ). RANTES, hastaların remisyona girme zamanlarının tahmin edilmesinde bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği ve ileri çalışmalara öncülük edebileceği kanaatindeyiz.

Çalışmamızda biyobelirteç adayı olarak araştırdığımız bir diğer gen ise TWIST1'dir. TWIST1, hücre farklılaşmasında, morfogenezde, hematopoezde ve tümör oluşumunu desteklemede rol alan çeşitli genlerin transkripsiyonel kontrolünü düzenlemektedir (59,60). *Je E.C ve ark.*'ları, kanserde TWIST1 ifade artışının, hastalarda sağ kalım oranlarını düşürdüğünü göstermişlerdir (63). Çalışmamızda pediatrik ALL olgularında TWIST1 geninin ifade düzeylerini araştırdık ve hastaların sağ kalım oranları ile TWIST1 ifade düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptamadık ( $p=0,921$ ). Daha geniş kohortlarda çalışılması ile anlamlı bir korelasyon saptanabileceği kanaatindeyiz.

Çalışmamızda trizomi açısından TWIST1 ifade düzeyi değişimini araştırdık. Trizomik vakaların TWIST1 ifadesi, trizomik olmayanlara göre istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde arttığını tespit ettik ( $p=0,009$ ). Literatürde, pediatrik ALL'de trizomiler ve TWIST1 ifadesi arasındaki ilişkiyi araştıran herhangi bir bilimsel çalışma henüz mevcut değildir. Bu yönde yapılacak olan çalışmaların TWIST1'in ALL patogenezindeki rolünü aydınlatacağını düşünüyoruz.

Çalışmamızda ayrıca TWIST1 ifade düzeyinin pediatrik ALL'de immünofenotip ile ilişkisi olup olmadığını araştırdık. Bulgularımıza göre, pre B-ALL, pro B-ALL, T-ALL

immünofenotipine sahip olgular ve sağlıklı kontroller arasındaki TWIST1 ifade düzeylerine baktığımızda, istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyona rastlamadık ( $p=0,302$ ). Şimdilik, literatürde bu korelasyonu inceleyen herhangi bir çalışma mevcut değildir.

Bilindiği üzere TWIST1'in tümörigenezi desteklemesi, *Je E.C* ve *ark.*lerinin belirttiği üzere bir çok kanser türünde yüksek TWIST1 ifadesi ve literatürde ALL patogenezi ile ilgili bir çalışma olmaması sebebiyle, çalışmamızda TWIST1 ifadesi ile nüks arasında bir bağlantı olup olmadığını araştırdık. Sonuçta, nüks durumu ile TWIST1 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenemedi ( $p=0,961$ ). Bununla birlikte, olguların remisyon zamanı ile ilişkisi olup olmadığı konusunda da istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptamadık ( $p=0,096$ ). Kısaca, çalışmamızda pediatrik ALL vakalarında bir çok klinik parametre ile TWIST1 gen ifade düzeyi arasındaki ilişki ilk defa araştırılmıştır. TWIST1'in ALL patogenezindeki rolünün ileri çalışmalar ile aydınlatılabileceği kanaatindeyiz.

VEGFR2, bilinen diğer adı ile KDR, endotelial hücre hücre sinyallerini ileten bir VEGF reseptörüdür. Yapılan çalışmalar sonucunda, VEGFR2 gen ifadesinin baskılandığı durumlarda damar oluşumu (vaskülogenez) ve kan hücrelerinin (hematopoez) gelişiminde defektlere sebep olduğu tespit edilmiştir (64). *Poon R.T* ve *ark.*'ları tarafından yapılan bir çalışmada akut lösemi hastalarında, özellikle akut myeloid lösemi (AML)'de, VEGFR2 geninin ifade düzeyinin, sağlıklı kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (47). *Poon R.T* ve *ark.*'lerinin çalışmasına benzer olarak çalışmamızda, ALL'li pediatrik olgular ve sağlıklı kontrollerin VEGFR2 gen ifade düzeyi arasındaki farkı araştırdık. Literatürden farklı olarak, pediatrik ALL olguları ile sağlıklı kontroller arasında VEGFR2 gen ifade düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlemedik.

*Wang C.* ve *ark.*'ları, akut myeloid lösemi (AML) remisyon hastalarında, yeni tanı alan hastalara göre, VEGFR2 ifade düzeyinin daha düşük seviyede olduğunu rapor etmişlerdir (68). Bundan farklı olarak tez çalışmamızda, vakaların remisyon durumları ve VEGFR2 gen ifadesi arasındaki ilişkiyi araştırdık ve sonuçta istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptamadık ( $p=0,201$ ). Yine *Wang C.* ve *ark.* tarafından yapılan çalışma sonucunda, VEGFR2 ifade düzeyinin nüks eden hastalarda, yeni tanı alan hastalara göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (68). Söz konusu çalışmanın aksine, tez çalışmamızda

nüks olan ve olmayan vakaları karşılaştırdık ve VEGFR2 gen ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptamadık. Daha geniş çaplı çalışmalar ile aydınlatıcı sonuçlar elde edileceği kanısındayız.

Tez çalışmamızda ayrıca, trizomi saptanan ALL hastalarında VEGFR2 ifade düzeyini araştırdık. Trizomiye sahip olgularda, trizomisi olmayanlara göre, VEGFR2 ifade düzeyinin daha yüksek olduğunu tespit ettik ( $p < 0,001$ ). Literatürde bu çalışmamızı destekleyecek herhangi bir çalışma mevcut değildir. Bu durumun kapsamlı çalışmalar ile aydınlatılmasına ihtiyaç duyulduğu kanaatindeyiz. Ayrıca VEGFR2 ifade düzeyi ile t(9;22), t(12;21), t(6;11), t(1;19) translokasyonları arasındaki korelasyonu inceledik. Sonuç olarak, translokasyon taşıyıcısı vakalar ile olmayanlar arasında VEGFR2 ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptamadık ( $p = 0,162$ ). Bu konuda, literatürde bulgularımızı destekleyecek yeterli ve ayrıntılı bilgi mevcut değildir.

İmmünofenotip açısından VEGFR2 ifade düzeylerini incelediğimizde, pre B-ALL, pro B-ALL, T-ALL immünofenotip grupları ile sağlıklı kontrol grubunu kıyaslandığımızda, istatistiksel olarak anlamlı bir saptamadık ( $p = 0,235$ ). Ayrıca hastaların FAB sınıflamasına göre VEGFR2 ifade düzeylerinin değişip değişmediğini araştırdık. Bulgularımıza göre, FAB sınıflandırması (L1, L2, L1+L3 ve L1+L2) ve VEGFR2 ifadesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptamadık ( $p = 0,368$ ).

Sonuç olarak, tez çalışmamızda CXCR4, PDGFRB, RANTES, TWIST1 ve VEGFR2 (KDR) genlerinin pediatrik ALL olguları ile sağlıklı kontrolleri arasındaki ifade düzeylerini karşılaştırdık. Bu tez çalışması, RANTES ve TWIST1 gen ifade düzeyleri ile ALL patogenezi arasındaki ilişkinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Çalışmamızda, söz konusu genler ve olguların bir çok klinik özellikleri arasındaki ilişki araştırıldı. Neticede, her bir genin ifadesinin farklı klinik özelliklere göre değiştiğini belirledik. Bu çalışma ile ALL'de RANTES ifade düzeyinin değiştiğini saptadık. Bulgularımız ışığında RANTES geninin ALL patogenezinde önemli rolü olduğu ve biyobelirteç olarak değerlendirilebileceği düşüncesindeyiz. ALL patogenezinde ve MRD'de bir çok farklı etkenin rol oynaması nedeniyle söz konusu genlerin bu süreçteki rollerinin aydınlatılması için daha geniş çapta araştırmalara ihtiyaç duyulduğu kanaatindeyiz.

## KAYNAKLAR

1. Alicia G Arroyo, Joy T Yang, Helen Rayburn, Richard O Hynes. Differential Requirements for  $\alpha 4$  Integrins during Fetal and Adult Hematopoiesis Cell, Volume 85, Issue 7, Pages 997-1008. Pubmed PMID: 8674127.
2. Michael A. Rieger and Timm Schroeder doi: 10.1101/cshperspect.a008250 Cite this article s Cold Spring Harb Perspect Biol 2012;4:a00825
3. Margarita G, and Gueorgui B. (Ed.). (2013). Leukemia. InTech Press ISBN:978- 953-51-1127-6, 252 pages. DOI: 10.5772/45914
4. Kay, A. B. (2015). The early history of the eosinophil. Clinical & Experimental Allergy, 45(3), 575-582.
5. Elif Atıcı (2007). Tıp Tarihinde Kanser ve Lösemi Türk Onkoloji Dergisi 2007;22(4):197-204
6. Bhojwani et al.(2015). Biology of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Pediatr Clin North Am. February ; 62(1): 47–60. doi:10.1016/j.pcl.2014.09.004.
7. Rafei H., Kantarjian H.M. , Jabbour E.J. (2019): Recent advances in the treatment of acute lymphoblastic leukemia, Leuk Lymphoma. May 16:1-16.
8. <https://www.cancer.org/cancer/acute-lymphocytic-leukemia/about/key-statistics.html>
9. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/aly1.html>
10. Lanzkowski et.al. Manual of Pediatric Hematology and Oncology. DOI: 10.1016/B978-0-12-375154-6.00017-3
11. M. Tulstrup • U.K. Stoltze (2017). Epidemiology and Etiology of Childhood ALL. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia, DOI 10.1007/978-3-319-39708-5\_1
12. <http://www.ctf.edu.tr/stek/pdfs/45/4516.pdf>
13. [http://www.tphd.org.tr/wp-content/uploads/2017/11/Akut\\_Lenfoblastik\\_LosemiCanan\\_Vergin.pdf](http://www.tphd.org.tr/wp-content/uploads/2017/11/Akut_Lenfoblastik_LosemiCanan_Vergin.pdf)
14. Kızıltaş A. (2008).Çocukluk çağı akut lösemilerde serum fas ve fas ligand düzeyleri. Çukurova Üni. Tıp Fak. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları, uzmanlık tezi.
15. Pui C-H, Crist WM, Look AT. (1990). Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 1990;76:1449-1463

16. Harris MB, Shuster JJ, Carroll A, et al.(1992). Trisomy of leukemic cell chromosomes 4 and 10 identifies children with B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia with very low risk of treatment failure: a Pediatric Oncology Group Study. *Blood* 1992;79:3316-3324.
17. Uzunhan-Aksu T., Karakaş Z., (2012). Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemisi. doi:10.5222/j.child.2012.006.
18. Smith OP, Hann IM. Clinical features and therapy of lymphoblastic leukemia. In: Arceci RJ, Hann IM, Smith OP (2006). *Pediatric Hematology*, Third Edition. Blackwell Publishing 2006:450-81.
19. Saultz, J. N., & Garzon, R. (2016). Acute myeloid leukemia: a concise review. *Journal of clinical medicine*, 5(3), 33.
20. George P, Hernandez K, Hustu O, Borella L, Holton C, Pinkel D. (1968). A study of “total therapy” of acute lymphocytic leukemia in children. *J Pediatr* 1968;72:399-408
21. Riehm H, Gadner H, Henze G, Langermann H-J, Odenwald E. (1980). The Berlin childhood acute lymphoblastic leukemia therapy study, 1970-1976. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1980;2:299-306.
22. Nguyen K, Devidas M, Cheng SC, et al.(2008). Factors influencing survival after relapse from acute lymphoblastic leukemia: a Children’s Oncology Group study. *Leukemia* 2008;22:2142-50.
23. Raetz EA, Bhatla T. (2012). Where do we stand in the treatment of relapsed acute lymphoblastic leukemia? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012;2012: 129-36.
24. Moriyama T, Relling MV, Yang JJ. (2015). Inherited genetic variation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2015 May 21 (Epub ahead of print).
25. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children Stephen P. Hunger, M.D., and Charles G. Mullighan, M.D *n engl j med* 373;16 nejm.org October 15, 2015
26. Stock W. (2010). Adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010:21-9.
27. Pulte D, Gonds A, Brenner H. (2009). Improvement in survival in younger patients with acute lymphoblastic leukemia from the 1980s to the early 21st century. *Blood* 2009;113:1408-11.

28. DeAngelo DJ, Stevenson KE, Dahlberg SE, et al. (2015). Long-term outcome of a pediatric-inspired regimen used for adults aged 18-50 years with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2015; 29:526-34.
29. Patıroğlu T. (2011) : Lösemide minimal rezidüel hastalık. XXXVII. Ulusal Hematoloji Kongresi. 76-81.
30. Özbek U. (2011) : Lösemide Minimal Rezidüel Hastalık. Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi temel moleküler hematoloji kursu. 46-48.
31. Campana D. (2009). Detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia. *Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology*, 1-15.
32. Brüggemann M1, Schrauder A, Raff T, Pfeifer H, Dworzak M, Ottmann OG, Asnafi V. et al. (2010) : Standardized MRD quantification in European ALL trials: proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment *Leukemia*. Mar;24(3):521-35.
33. Paiva B, van Dongen JJ, Orfao A. (2015) : New criteria for response assessment: role of minimal residual disease in multiple myeloma. *Blood*. May 14;125(20):3059-68
34. van Dongen JJ, van der Velden VH, Brüggemann M, Orfao A. (2015) : Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood*. Jun 25;125(26):3996-4009.
35. Kazuyuki Matsuda, Mitsutoshi Sugano, Takayuki Honda (2012): PCR for monitoring of minimal residual disease in hematologic malignancy. *Clinica Chimica Acta* 413 (2012) 74–80 doi:10.1016/j.cca.2011.10.022
36. Cave H, van der Werften Bosch J, Suciu S, et al. (1998). Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Eng J Med* 1998;339:591
37. Dick JE. (2008). Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 112: 4793 – 4807
38. Laiosa CV, Stadtfeld M, Graf T. (2006). Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification. *Annu Rev Immunol* 24: 705–738.

39. Moses BS, Slone WL, Thomas P, Evans R, Piktel D, Angel PM, Walsh CM, Cantrell PS, Rellick SL, Martin KH, Simpkins JW, Gibson LF. (2016) :Bone marrow microenvironment modulation of acute lymphoblastic leukemia phenotype. *Exp Hematol.* Jan;44(1):50-9.e1-2
40. <https://evrimagaci.org/kemik-iligi-disinda-kan-hucrerinin-uretimi-7492>
41. Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ. (2012). Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* 481: 457 – 462
42. Doulatov S, Notta F, Eppert K, Nguyen LT, Ohashi PS, Dick JE. (2010). Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nat Immunol* 11: 585–593.
43. Holzwarth C, Vaegler M, Gieseke F, et al. (2010). Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *BMC Cell Biol.* 2010;11:11
44. The Hematopoietic Stem Cell Niche— Home for Friend and Foe? Daniela S. Krause,<sup>1,2,3\*</sup> David T. Scadden,<sup>2,3</sup> and Frederic I. Preffer
45. Dai J. and Rabie A.B.M.(2007). VEGF: an Essential Mediator of Both Angiogenesis and Endochondral Ossification. *J Dent Res* 86(10):937-950.
46. Erdem F, Gündoğdu M. (2005). Anjiojenesis Ve Anti-Anjiojenik Tedavi AÜTD 2005; 37: 1-6.
47. Poon RT, Fan ST, Wong J. (2001). Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol* 2001;19(4):1207-25.
48. Padro T, Ruiz S, Bieker R, et al. (2000). Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2000; 95: 2637-44
49. Klagsbrun M, D'Amore P.(1996). Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996; 7: 259-70
50. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, and Persico G. (1996). Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3 *Circulation* 93:1493-95

51. Merindol N1, Riquet A1, Szablewski V2, Eliaou JF3, Puisieux A4, Bonnefoy N5. (2014) :The emerging role of Twist proteins in hematopoietic cells and hematological malignancies. *Blood Cancer J.* Apr 25;4:e206.
52. Li Yang et.al.(2015):Twist promotes reprogramming of glucose metabolism in breast cancer cells through PI3K/AKT and p53 signaling pathways *Oncotarget*, Vol. 6, No. 28
53. Howard T.D., Paznekas W.A et.al. (1997). Mutations in TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome. *Nat Genet*, 1997. 15(1): p. 36-41.
- 54.[https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000122691;r=7:19020991-19117636](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000122691;r=7:19020991-19117636)
- 55.[https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TWIST1&keywords=twist1#genomic\\_location](https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TWIST1&keywords=twist1#genomic_location)
56. Maia A.M. et.al. (2012). Computational modeling of the bHLH domain of the transcription factor TWIST1 and R118C, S144R and K145E mutants. *BMC Bioinformatics*, 2012. 13: p. 184.
57. Kadesch T.,(1993). Consequences of heteromeric interactions among helix-loop-helix proteins. *Cell Growth Differ*, 1993. 4(1): p. 49-55.
58. Singh, S. and Gramolini A.O.(2009). Characterization of sequences in human TWIST required for nuclear localization. *BMC Cell Biol*, 2009. 10: p. 47
59. Lister, J.A. and Baron M.H. (1998). Induction of basic helix-loop-helix protein-containing complexes during erythroid differentiation. *Gene Expr*, 1998. 7(1): p. 25-38.
60. Pettersson A.T.et.al. A possible inflammatory role of twist1 in human white adipocytes. *Diabetes*. 59(3): p. 564-71.
61. Hamamori, Y.et.al. (1999). Regulation of histone acetyltransferases p300 and PCAF by the bHLH protein twist and adenoviral oncoprotein E1A. *Cell*,1999. 96(3): p. 405-13.
62. Maestro R.,et.al. (1999). Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis. *Genes Dev*, 1999. 13(17): p. 2207-17.
63. Je E.C., Lca B.S., and Ga G.A.(2013). The Role of Transcription Factor TWIST in Cancer Cells. *J Genet Syndr Gene Ther*, 2013. 4(124).
64. Terman B.I., Dougher Vermazen M.,Maglione D.,Lassam N.J.,Gasporadowicz D., and Bohlen P. (1992).Identification of the KDR tyrosine kinase a reseptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys.Res Commun* 1992;187:1579-86

65. B. L. Ziegler, M. Valtieri, G. Almeida Porada, R. De Maria, R. Müller et al. (1999). KDR Receptor: A Key Marker Defining Hematopoietic Stem Cells. *Science* 1999:Vol. 285. no. 5433, pp. 1553 – 1558
66. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=KDR&keywords=KDR>
67. <https://www.nature.com/articles/s41436-018-0260-9>
68. Wang C, Chen FY, Zhu JS, Xu YP, Han JY (2004). Ouyang RR. Dynamic observation of vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF-receptors expression in acute leukemia. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. 2004 Nov;43(11):845-8.
69. Appay, V., Rowland-Jones, S.L., (2001). RANTES: a versatile and controversial chemokine, *Trends Immuno*, 22, 83–87p.
70. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6352>
71. Lacy P, Mahmudi-Azer S, Bablitz B., Hagen SC., Valezquez JR., Man SPF., Moqbel R., (1999): Rapid mobilization of intracellularly stored RANTES in response to interferon in human eosinophils. *Blood* 94:23-32.
72. <https://www.genecards.org/Search/Keyword?queryString=RANTES>
73. *Cancer Immunol Immunother* (2006) 55: 830–840 DOI 10.1007/s00262-005-0080-z  
Astrid Marta Olsnes Æ Dmitri Motorin Æ Anita Rynningen Andrey Y. Zaritskey Æ Øystein Bruserud T lymphocyte chemotactic chemokines in acute myelogenous leukemia (AML): local release by native human AML blasts and systemic levels of CXCL10 (IP-10), CCL5 (RANTES) and CCL17 (TARC).
74. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CCL5&keywords=ccl-5>
75. <https://www.jimmunol.org/content/181/11/7944>
76. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7852>
77. Y.-R. Zou, A. H. Kottmann, M. Kuroda, I. Taniuchi, and D. R. Littman (1998). “Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development,” *Nature*, vol. 393, no. 6685, pp. 595–599.
78. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CXCR4>
79. A. Caruz et al./*FEBS Letters* 426 (1998) 271–278, Genomic organization and promoter characterization of human CXCR4 gene.
80. A. Peled, S. Klein, K. Beider, J. A. Burger, and M. Abraham (2018). “Role of CXCL12 and CXCR4 in the pathogenesis of hematological malignancies,” *Cytokine*, vol. 109, pp. 11–16.

81. D. Passaro, M. Irigoyen, C. Catherinet et al. (2015). "CXCR4 is required for leukemia-initiating cell activity in T cell acute lymphoblastic leukemia," *Cancer Cell*, vol. 27, no. 6, pp. 769–779.
82. F. Ferrandino, G. Bernardini, G. Tsaouli et al. (2018). "Intrathymic Notch3 and CXCR4 combinatorial interplay facilitates T- cell leukemia propagation," *Oncogene*, vol. 37, no. 49, pp. 6285–6298.
83. T. Nagasawa, S. Hirota, K. Tachibana et al. (1996). "Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1," *Nature*, vol. 382, no. 6592, pp. 635–638.
84. B. A. Teicher and S. P. Fricker (2010). "CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer," *Clinical Cancer Research*, vol. 16, no. 11, pp. 2927–2931.
85. W. Shen, L. J. Bendall, D. J. Gottlieb, and K. F. Bradstock (2001). "The chemokine receptor CXCR4 enhances integrin-mediated in vitro adhesion and facilitates engraftment of leukemic precursor-B cells in the bone marrow," *Experimental Hematology*, vol. 29, no. 12, pp. 1439–1447.
86. S. Konoplev, J. L. Jorgensen, D. A. Thomas et al., "Phosphorylated CXCR4 is associated with poor survival in adults with B-acute lymphoblastic leukemia," *Cancer*, vol. 117, no. 20, pp. 4689–4695, 201
87. A. Corcione, N. Arduino, E. Ferretti et al. (2006). "Chemokine receptor expression and function in childhood acute lymphoblastic leukemia of B-lineage," *Leukemia Research*, vol. 30, no. 4, pp. 365–372.
88. L. C. J. van den Berk, A. van der Veer, M. E. Willemse et al. (2014). "Disturbed CXCR4/CXCL12 axis in paediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia," *British Journal of Haematology*, vol. 166, no. 2, pp. 240–249.
89. F. Mowafi, A. Cagigi, L. Matskova, O. Björk, F. Chiodi, and A. Nilsson (2008). "Chemokine CXCL12 enhances proliferation in pre-B-ALL via STAT5 activation," *Pediatric Blood & Cancer*, vol. 50, no. 4, pp. 812–817.
90. B. K. Khandany, G. Hassanshahi, H. Khorramdelazad et al. (2012). "Evaluation of circulating concentrations of CXCL1 (Gro- $\alpha$ ), CXCL10 (IP-10) and CXCL12 (SDF-1) in ALL patients prior and post bone marrow transplantation," *Pathology, Research and Practice*, vol. 208, no. 10, pp. 615–619.
91. A. Rashidi and G. L. Uy (2015). "Targeting the microenvironment in acute myeloid leukemia," *Current Hematologic Malignancy Reports*, vol. 10, no. 2, pp. 126–131.

92. L. A. Pitt, A. N. Tikhonova, H. Hu et al.(2015). "CXCL12-producing vascular endothelial niches control acute T cell leukemia maintenance," *Cancer Cell*, vol. 27, no. 6, pp. 755–768.
93. F. Ferrandino, P. Grazioli, D. Bellavia, A. F. Campese, I. Screpanti, and M. P. Felli (2018). "Notch and NF- $\kappa$ B: coach and players of regulatory T-cell response in cancer," *Frontiers in Immunology*, vol. 9.
94. Tsaouli G. (2019). Notch/CXCR4 Partnership in Acute Lymphoblastic Leukemia Progression. *Journal of Immunology Research* Volume 2019, Article ID 5601396, 11 pages <https://doi.org/10.1155/2019/5601396>
95. Aydemir B., Sarı-Karadag E. (2009). Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörünün Yapısı, Fonksiyonları ve Gelişim Üzerine Etkileri. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*Yıl: 2009 Cilt: 4 Sayı: 3 Sayfa: 209-214.
96. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PDGFRB&keywords=PDGFR>
97. [https://www.researchgate.net/figure/Flowchart-demonstrating-the-PDGF-ligand-receptor-interaction\\_fig1\\_289519556](https://www.researchgate.net/figure/Flowchart-demonstrating-the-PDGF-ligand-receptor-interaction_fig1_289519556)
98. Moorman AV. (2012). The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Blood Rev.* 2012;26(3):123-135.
99. Claire Schwab. (2016). EBF1-PDGFRB fusion in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL): genetic profile and clinical implications, *BLOOD*, 5 MAY 2016 x VOLUME 127, NUMBER 18
100. Yingchi Zhang, Yufeng Gao, Hui Zhang, Jingliao Zhang, Fuhong He, Ales Hn'ızda, Maoxiang Qian, Xiaoming Liu, Yoshihiro Gocho, Ching-Hon Pui, Tao Cheng, Qianfei Wang, Jun J. Yang, Xiaofan Zhu, and Xin Liu. (2018). PDGFRB mutation and tyrosine kinase inhibitor resistance in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *blood* 17 MAY 2018 | VOLUME 131, NUMBER 20
101. Aydın-Sayitoglu M., Hematoloji'de Real Time PCR, İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul
102. Wilhelm J, Pingoud A. (2003). Real-Time polymerase chain reaction, *ChemBioChem*, 2003;4:1120-1128
103. Gibson UE, Heid CA, Williams PM. (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 1996;6:995- 1001

104. Kern W, Haferlach C, H Torsten, Schnittger S. (2008). Monitoring of Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer* 2008;112:4–16.
105. Cave H, van der Werft Bosch J, Suciu S, et al. (1998). Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Eng J Med* 1998;339:591
106. Shook D, Coustan-Smith E, Ribeiro R, Rubnitz J et al (2009). Minimal residual disease quantitation in acute myeloid leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma*. ; 9(Suppl 3): S281–S285
107. Q. Ma, D. Jones, and T. A. Springer, (1999). “The Chemokine Receptor CXCR4 Is Required for the Retention of B Lineage and Granulocytic Precursors within the Bone Marrow Microenvironment,” *Immunity*, vol. 10, no. 4, pp. 463–471.
108. L. C. J. van den Berk, A. van der Veer, M. E. Willemse et al., (2014). “Disturbed CXCR4/CXCL12 axis in paediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia,” *British Journal of Haematology*, vol. 166, no. 2, pp. 240–249.
109. Savlı H., Hatırnaz O., Sirma S., Özdemir S., Özbek U. (2004). Quantification of the FLI1 and CXCR4 gene expressions in acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients with t(12,21). *Turk J Haematol.* 2004 Jun 5;21(2):87-92.
110. Sison E.A.R., Rau R.E., McIntyre E., Li L., Small D., Brown P. (2013). MLL-rearranged acute lymphoblastic leukaemia stem cell interactions with bone marrow stroma promote survival and therapeutic resistance that can be overcome with CXCR4 antagonism. *Br J Haematol.* 2013 Mar;160(6):785-97. doi: 10.1111/bjh.12205. Epub 2013 Jan 7.
111. März M, Meyer S, Erb U, Georgikou C, Horstmann MA, Hetjens S, Weiß C, Fallier-Becker P, Vandenhaute E, Ishikawa H, Schrotten H, Dürken M, Karremann M. (2018). Pediatric acute lymphoblastic leukemia-Conquering the CNS across the choroid plexus. *Leuk Res.* 2018 Aug;71:47-54. doi: 10.1016/j.leukres.2018.07.001. Epub 2018 Jul 8.
112. den Boer ML, Cario G, Moorman AV, Boer JM, de Groot-Kruseman HA, Fiocco M, Escherich G, Imamura T, Yeoh A, Sutton R, Dalla-Pozza L, Kiyokawa N, Schrappe M, Roberts KG, Mullighan CG, Hunger SP, Vora A, Attarbaschi A, Zaliouva M, Elitzur S, Cazzaniga G, Biondi A, Loh ML, Pieters R; Ponte di Legno (2020). Childhood ALL Working Group. Outcomes of paediatric patients with B-cell acute lymphocytic leukaemia with ABL-class fusion in the pre-tyrosine-kinase inhibitor era: a multicentre,

retrospective, cohort study. *Lancet Haematol.* 2021 Jan;8(1):e55-e66. doi: 10.1016/S2352-3026(20)30353-7. Epub 2020 Dec 22.



**ETİK KURUL KARARI**



## İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

### PEDİATRİK AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMI OLGULARINDA MINİMAL REZİDÜEL HASTALIĞIN MOLEKÜLER DÜZEYDE DEĞERLENDİRİLMESİ-2

#### ORJİNALLIK RAPORU

|                   |                     |            |                  |
|-------------------|---------------------|------------|------------------|
| % <b>12</b>       | % <b>10</b>         | % <b>4</b> | % <b>5</b>       |
| BENZERLİK ENDEKSİ | İNTERNET KAYNAKLARI | YAYINLAR   | ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ |

#### BİRİNCİL KAYNAKLAR

|          |                                                                                                          |             |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>1</b> | <b>nek.istanbul.edu.tr:4444</b><br>İnternet Kaynağı                                                      | % <b>2</b>  |
| <b>2</b> | <b>Submitted to Istanbul University</b><br>Öğrenci Ödevi                                                 | % <b>2</b>  |
| <b>3</b> | <b>www.researchgate.net</b><br>İnternet Kaynağı                                                          | % <b>1</b>  |
| <b>4</b> | <b>"Acute Lymphoblastic Leukemia",<br/>International Manual of Oncology Practice,<br/>2015.</b><br>Yayın | <% <b>1</b> |
| <b>5</b> | <b>tbgder.org</b><br>İnternet Kaynağı                                                                    | <% <b>1</b> |
| <b>6</b> | <b>Submitted to Fatih University</b><br>Öğrenci Ödevi                                                    | <% <b>1</b> |
| <b>7</b> | <b>adudspace.adu.edu.tr:8080</b><br>İnternet Kaynağı                                                     | <% <b>1</b> |
| <b>8</b> | <b>www.scribd.com</b><br>İnternet Kaynağı                                                                |             |

## ÖZGEÇMİŞ

