T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİLİ ÇOCUKLARDA VEGF-A, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 VE TIMP-2 GENLERİNİN EKSPRESYON VE METİLASYON DÜZEYLERİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLERİN İNCELENMESİ

Bil. Uzm. Nihal İNANDIKLIOĞLU

TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. Osman DEMİRHAN

ADANA
2014

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİLİ ÇOCUKLARDA VEGF-A, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 VE TIMP-2 GENLERİNİN EKSPRESYON VE METİLASYON DÜZEYLERİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLERİN İNCELENMESİ

Bil. Uzm. Nihal İNANDIKLIOĞLU

TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. Osman DEMİRHAN

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu tarafından TF2012D1 nolu proje olarak desteklenmiştir.

ADANA
2014

ÖNSÖZ

Eğitim hayatım boyunca, yirmi üç kromozomluk kütüphanenin yaprakları arasında kendimi kaybetmenin mutluluğunu yaşadım. Okudukça heyecanlandım, heyecanlandıkça merakım ve bu muhteşem kitaplığa hayranlığım arttı ve onun bir okuyucusu olmanın kıvancını yaşadım. Bu sayfalar, kelimeler, heceler ve harfler arasında beni en çok cezbeden kanser genetiği dizinleri oldu. Üç milyar harfle yazılan bu sarmal merdivenden çıkarken en çok ayaklarım kanser genlerine takıldı. Hangisiydi bu mekanizmanın en gözde kromozomu, hangi genleri sever konuşmalarına izin verir, hangilerinin sonsuza dek susmasını isterdi ya da hangi genler onun en yakın dostları haline dönüşebiliyordu... 500 sayfalık 200 kitabı okumak için kaç yılım vardı bilinmez ama beni en çok heyecanlandıran bölümden başlamalıyım diye düşündüm. İyi ki de öyle yapmışım.

Bu nanometre boyutundaki dünyanın içine girdiğimde eşsiz, muhteşem ve sonsuzlukla tabir edebileceğim derya da kaybolurken; bu yolda önüme deniz feneri gibi ışık olan birçok değerli hocam ve meslek arkadaşlarım oldu. Herkesin isimlerini vererek teşekkür etsem sayfalarca isim yazmam gerekecek ama aşağıda saydığım insanlara özellikle minnetimi belirtmek isterim.

Gerek bilimsel gerekse sosyal anlamda tecrübe ve deneyimlerini benimle paylaşan, bilimde bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan, bilgisini ve desteğini esirgemeyen, babacan tavırları ve hoşgörüsüyle her zaman yanımda olan danışmanım Sayın Prof. Dr. Osman DEMİRHAN'a; yol göstericiliği, içtenliği ve desteğini hep hissettiren; kendisini her zaman örnek aldığım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Mülkiye KASAP'a; araştırmamda anabilim dalının olanaklarını bana sunan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. H. Ümit LÜLEYAP'a; moleküler genetiğe merakımı arttıran ve her zaman büyük bir hayranlıkla derslerini dinlediğim değerli hocam Sayın Prof. Dr. Halil KASAP'a; pozitifliği, güler yüzlülüğü ve bilimsel anlamda bana verdiği destekler için hocam Sayın Prof. Dr. Davut ALPTEKİN'e; tez çalışmamda olguları elde etmemde, çalışmanın laboratuvar aşamalarını yürütebilmem için Pediatrik Onkoloji

Bilim Dalı'nın olanaklarını sunan, yardımlarını ve desteğini hiçbir zaman unutmayacağım Sayın Prof. Dr. Atila TANYELİ'ne ve onun nezdinde Pediatrik Onkoloji Bilim Dalı'nın değerli hocalarına, asistanlarına, hemşirelerine ve tüm çalışanlarına; iyi ki de Almanya'ya beni yanına kabul etmiş ve her zaman keşke dönmeseydim dedirten, kişiliğini ve bilimsel duruşunu örnek aldığım, yaptığı işleri hayranlıkla ve saygıyla izlediğim, kanser genetiği alanında kendisinden çok şey öğrendiğim değerli hocam Sayın Dr. Seval TÜRKMEN'e; ne kadar uzağa gitse de bilimsel anlamda gönül bağımızın hiçbir zaman kopmadığı, beni hep destekleyen, yüksek enerjisiyle, sesiyle ve ruhuyla her zaman yanımda olan ablam Sayın Doç. Dr. Sema YILMAZ'a; Pediatrik Onkoloji Blim Dalın'da hem hastalar konusunda hem de tezimin istatistik analizinde bana çok büyük yardımları olan ve ne zaman kapısını çalsam sürekli gülümseyerek beni karşılayan değerli hocam Sayın Doç. Dr. İbrahim BAYRAM'a; eğitim sürecimde bana moral ve destek olan, birlikte hem bilimsel hem de sosyal anlamda nice güzellikleri paylaştığım çalışma arkadaşlarım ve dostlarım Dok. Öğr. Ferda TEKİN TURHAN'a; Ar. Gör. Seda ILGAZ'a, Dok. Öğr. Gamze CÖMERTPAY'a ve Yük. Lis. Öğr. E.Deniz BARÇ'a; Peditrik Onkoloji Bilim Dalı laboratuvarında tez çalışmam süresince labotuvar çalışmamda bana yardımcı olan, çalışmalarımı bitirebilmem için her türlü desteği ve yardımı bana gösteren, kimi zaman arkadaş kimi zaman abla olan Sayın Ayçin ARKAN'a, Nebahat ÖZ'e ve Nurten BAŞEL'e; umutsuzluğa kapıldığım, herşeyin tükenip gittiğini düşündüğüm anlarda her zaman yanımda olan dualarını ve desteklerini hep hissettiğim, beni ben yapan genlerimin mimarlarına canım ANNEM ve BABAMA; ablaları olmaktan her zaman gurur duyduğum, aynı genetik mirasa sahip olduğum, mutluluğumda ve mutsuzluğumda, hayatta her zaman yanımda, bana destek ve moral olan birtanelerim kardeşlerim Recep, Nur ve Rafet'e

Sonsuz Teşekkürler.

Nihal İNANDIKLIOĞLU

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay
ÖNSÖZ III
İÇİNDEKİLER V
TABLO DİZİNİ VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ X
GRAFİK DİZİNİ XI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ XII
ÖZET XIV
ABSTRACT XV
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ 3
2.1.1. EPİDEMİYOLOJİ 3
2.1.2. ETİYOLOJİ 3
2.1.3. LÖSEMİK HÜCRE KARAKTERİZASYONU VE SINIFLANDIRILMASI 4
2.1.3.1. MORFOLOJİK SINIFLANDIRMA 5
2.1.3.2. SİTOKİMYASAL SINIFLANDIRMA 6
2.1.3.3. İMMUNOLOJİK SINIFLANDIRMA 7
2.1.3.4. SİTOGENETİK SINIFLANDIRMA 8
2.1.4. KLİNİK BULGULAR 13
2.1.4.1. KEMİK İLİĞİNİN İNFİLİTRASYONU SONUCU GELİŞEN BULGULAR 13
2.1.4.2. LENFOİD SİSTEMİN TUTULMASI SONUCU GELİŞEN BULGULAR 14
2.1.4.3. EKSTRAMEDÜLLER SİSTEM BULGULARI 14
2.1.4.3.1. SANTRAL SİNİR SİSTEMİ (SSS) BULGULARI 14
2.1.4.3.2. GENİTOÜRİNER BULGULAR 15
2.1.4.3.3. KEMİK VE EKLEM BULGULARI 15
2.1.5. LABORATUVAR BULGULARI 16
2.1.5.1. KAN SAYIMI 16
2.1.5.2. KEMİK İLİĞİ 16
2.1.5.3. KAN BİYOKİMYASI 16
2.1.5.4. BOS 16
2.1.6. PROGNOSTİK FAKTÖRLER 17
2.1.7. TEDAVİ 18
2.1.7.1. REMİSYON İNDÜKSİYONU TEDAVİSİ 18
2.1.7.2. SSS TEDAVİSİ 19
2.1.7.3. KONSOLİDASYON TEDAVİSİ 19

2.1.7.4. İDAME TEDAVİSİ 20
2.2. EPİGENETİK 20
2.2.1. DNA METİLASYONU 21
2.2.2. HİSTON MODİFİKASYONLARI 22
2.2.3. RNA İLE İNDÜKLENEN SESSİZLEŞME 25
2.3. VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ 25
2.3.1. VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ-A 30
2.4. EKSTRASELÜLER MATRİKS BİYOLOJİSİ 33
2.4.1. MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR 33
2.4.2. MATRİKS METALLOPROTEİNAZLARIN SINIFLANDIRILMASI 36
2.4.3. MATRİKS METALLOPROTEİNAZ-2 38
2.4.4. MATRİKS METALLOPROTEİNAZ-9 39
2.4.5. METALLOPROTEİNAZLARIN AKTİVASYONUNUN DÜZENLENMESİ 41
2.5. DOKU İNHİBİTÖRÜ METALLOPROTEİNAZLAR 44
2.5.1. DOKU İNHİBİTÖRÜ METALLOPROTEİNAZ-1 46
2.5.2. DOKU İNHİBİTÖRÜ METALLOPROTEİNAZ-2 47
3. GEREÇ VE YÖNTEM 48
3.1. ARAÇ VE GEREÇLER 48
3.1.1. KİMYASAL MALZEMELER 48
3.1.2. AYGITLAR 48
3.2. ÖRNEKLERİN SAĞLANMASI İÇİN KULLANILAN YÖNTEMLER 49
3.2.1. RT-PCR ÇALIŞMALARI 50
3.2.1.1. TOTAL RNAN İZOLASYON PROTOKOLÜ 50
3.2.1.2. cDNA ELDESİ 51
3.2.1.3. RT-PCR PROTOKOLÜ 52
3.2.1.4. GEN EKSPRESYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ 52
3.2.2. METİLASYON ÇALIŞMALARI 53
3.2.2.1. TOTAL DNA İZOLASYON PROTOKOLÜ 57
3.2.2.2. METİLASYON PROTOKOLÜ 58
3.2.2.3. METİLASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ 60
3.3. İSTATİSTİK ANALİZİ 60
4. BULGULAR 61
4.1. OLGULARIN BELİRLENMESİ 61
4.2. ALL KLİNİK ÖZELLİKLERİ VE SINIFLANDIRILMASI 62
4.3. GENETİK ANALİZLER 65
4.3.1. GEN İFADE ANALİZLERİ 65
4.3.2. GEN METİLASYON ANALİZLERİ 75
4.3.3. İFADE VE METİLASYON ANALİZLERİNİN KARŞILIKLI ETKİLEŞİMİ 84

5. TARTIŞMA 87
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 99
7. KAYNAKLAR 103
8. ÖZGEÇMİŞ 116

TABLO DİZİNİ

Tablo 1.	Fransız-Amerikan-İngiliz (FAB) lenfoblast sınıflandırması alt gruplar ve özellikleri	6
Tablo 2.	Akut lenfoblastik lösemilerde sitokimyamyasal sınıflandırması	6
Tablo 3.	İmmünolojik alt tipe göre klinik özellikler	8
Tablo 4.	Çocukluk çağı ALL'de yaygın genetik değişiklikler	9
Tablo 5.	MTHFR C677T ve A1298C polimorfizm sonuçları	12
Tablo 6.	Genetik risk sınıflandırması	13
Tablo 7.	MMP'ların aracılık ettiği biyolojik aktiviteler	34
Tablo-8.	PCR programı	51
Tablo-9.	PCR bileşen karışımı	52
Tablo-10.	Roche LightCycler 480 için döngü koşulları	52
Tablo-11.	Enzimsiz reaksiyon karışımı	58
Tablo-12.	Enzim reaksiyonu karışımı	58
Tablo-13.	PCR karışımı	59
Tablo-14.	PCR protokolü	59
Tablo-15.	ALL olgu grubunun ve kontrol grubunun demografik özellikleri	61
Tablo-16.	ALL olgu grubunun ve kontrol grubunun yaş (ay) karşılaştırması	61
Tablo-17.	ALL olgularının lökosit, trombosit ve hemoglobin değerleri	62
Tablo-18.	ALL olgularının tanılarına göre dağılımı	64
Tablo 19.	Hasta ve kontrol grubu ekspresyon sonuçları	66
Tablo 20.	VEGFA, TIMP1, TIMP2, MMP2 ve MMP9 gen ifadelerinin rölatif oranlarının ortalaması ve %95 güven aralığı	73
Tablo 21.	ALL olgu grubunda genlerin karşılıklı etkileşimleri	74
Tablo 22.	Kontrol grubunda genlerin karşılıklı etkileşimleri	75
Tablo 23.	ALL olgu ve kontrol grubuna ait VEGFA, TIMP2, MMP2 ve MMP9 genlerinin metilasyon değerleri (%)	76
Tablo 24.	VEGFA, TIMP2, MMP2 ve MMP9 genleri promotor bölgeleri metilasyon oranlarının dağılımı	82

Tablo 25. ALL olgu grubunda genlerin metilasyonlarının karşılıklı etkileşimleri 83
Tablo 26. Kontrol grubunda genlerin metilasyonlarının karşılıklı etkileşimleri 84
Tablo 27. ALL olgu grubunda genlerin ifade ve metilasyon değerlerinin korelasyonu 85
Tablo 28. Kontrol grubunda genlerin ifade ve metilasyon değerlerinin korelasyonu 86

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1.	Nükleozomun yapısı	23
Şekil 2.	Histon molekülleri üzerinde metillenen, asetillenen, ubikütinlenen bölgelerin gösterimi	25
Şekil 3.	VEGF gen ailesi ve yüksek afinite gösterdikleri reseptörler	28
Şekil-4.	a. İnsan VEGF-A geni yapısı, b. Alternatif kesimleme, c. VEGF-A protein yapısı	31
Şekil 5.	MMP2 ve MMP9'un şematik yapısı	40
Şekil 6.	MMP'ler için hücre yüzeyi ile ilişkili aktivasyon kaskadı	43
Şekil 7.	Tez çalışmasında uygulanan yöntem	49
Şekil 8.	Gerçek zamanlı RT-PCR çalışması	50
Şekil 9.	VEGF-A metilasyon bölgesi	53
Şekil 10.	VEGF-A geni amplifikasyon bölgesi CpG adaları	54
Şekil 11.	TIMP-2 metilasyon bölgesi	55
Şekil 12.	TIMP-2 geni amplifikasyon bölgesi CpG adaları	55
Şekil 13.	MMP-2 metilasyon bölgesi	56
Şekil 14.	MMP-2 geni amplifikasyon bölgesi CpG adaları	56
Şekil 15.	MMP-9 metilasyon bölgesi	55
Şekil 16.	MMP-9 geni amplifikasyon bölgesi CpG adaları	57
Şekil 17.	Metilasyon çalışması aşamaları	60

GRAFİK DİZİNİ

Grafik 1.	Çocukluk çağı ALL'de translokasyonların dağılımı	9
Grafik 2.	VEGFA geni ifadesinin rölatif oranlarının ALL olgu ve kontrol grubu ortalaması ve %95 güven aralığı	68
Grafik 3.	TIMP1 geni ifadesinin rölatif oranlarının ALL olgu ve kontrol grubu ortalaması ve %95 güven aralığı	69
Grafik 4.	TIMP2 geni ifadesinin rölatif oranlarının ALL olgu ve kontrol grubu ortalaması ve %95 güven aralığı	70
Grafik 5.	MMP2 geni ifadesinin rölatif oranlarının ALL olgu ve kontrol grubu ortalaması ve %95 güven aralığı	71
Grafik 6.	MMP9 geni ifadesinin rölatif oranlarının ALL olgu ve kontrol grubu ortalaması ve %95 güven aralığı	72
Grafik 7.	VEGFA geni promotor bölgesi metilasyon oranı ALL olgu ve kontrol gruplarına göre dağılımı	78
Grafik 8.	TIMP2 geni promotor bölgesi metilasyon oranı ALL olgu ve kontrol gruplarına göre dağılımı	79
Grafik 9.	MMP2 geni promotor bölgesi metilasyon oranı ALL olgu ve kontrol gruplarına göre dağılımı	80
Grafik 10.	MMP9 geni promotor bölgesi metilasyon oranı ALL olgu ve kontrol gruplarına göre dağılımı	81

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALL	Akut lenfoblastik lösemi
SSS	Santral sinir sistemi
BOS	Beyin omurilik sıvısı
ACTH	Adrenokortikotropik hormon
FAB	French American British
SB	Sudan black
AP	Asit fosfataz
CAE	Kloroasetat esteraz
A-NAE	Alfa-naftil asetat esteraz
B-EST	Alfa-naftil bütirat esteraz
MGP	Metil yeşil pirenin
MPO	Miyeloperoksidaz
PAS	Periodik asit Schiff boyaması
TdT	Terminal deoksinükleotidil transferaz
CD	Yüzey farklılaşma antijenleri
CALLA	Common-ALL
sCD3	Sitoplazmik CD3
sIg	Sitoplazmik immünglobulin
yIg	Yüzey immünglobulin
TdT	Terminal deoksinükleotidil transferaz
LAP	Lenfadenopati
MiRNA	mikro RNA
SiRNA	small-interfering RNA
Xist RNA	X kromozom inaktive eden RNA
HMGN	High mobility group nucleosome-binding
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktörleri
FGF	Keratinosit büyüme faktörü

EGF	Epidermal büyüme faktörü
TNF-α	Tümör nekrosis faktör-α
TGF- β1	Transforming büyüme faktörü- β1
PGE_2	prostaglandin E_2
PIGF	Plasental büyüme faktörü
DAG	Diaçilgliserol
IP3	İnositol trifosfat
ESM	Ekstraselüler matriks
MMP	Matriks metalloproteinazlar
UPA	Ürokinaz-tip plazminojen aktivatörünün
TIMP	Doku inhibitörü metalloproteinazlar

ÖZET

Akut Lenfoblastik Lösemili Çocuklarda VEGF-A, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 VE TIMP-2 Genlerinin Ekspresyon ve Metilasyon Düzeylerindeki Değişikliklerin İncelenmesi

Akut lenfoblastik lösemi (ALL), lenfositik progenitörlerin malign hastalığı olup tek bir B ya da T hücre klonundan köken alır. Blastik hücrelerin kemik iliğinde birikimi ve çoğalması kemik iliği baskılanmasına neden olur ve hastalık tablosu ortaya çıkar. VEGF-A, TIMP-1, TIMP-2, MMP-2 ve MMP-9 genleri solid tümörlerde hastalığın invazyon ve metastazı ile ilişkilendirilmiş ancak hematolojik kanserlerin etiyolojisine etkileri tam olarak bilinmemektedir.

Çalışmamızda, Çukurova Üniversitesi, Pediatrik Onkoloji Bilim Dalı'nda ALL tanısı almış 26 hasta ile bu hastalara yaş ve cinsiyet açısından uygun olan sağlıklı ve ailesinde kanser öyküsü olmayan 26 kontrol dâhil edildi. Hastalarda vasküler endotelyal büyüme faktörü-A (VEGF-A), matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2), matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9), doku inhibitörü matriks metalloproteinaz-1 (TIMP-1) ve doku inhibitörü matriks metalloproteinaz-2 (TIMP-2) genlerinin ifadesi ile metilasyon düzeyi RT-PCR yöntemi ile tarandı. İnceleme sonucunda; VEGF-A, TIMP-1, TIMP-2, MMP-2 ve MMP-9 genlerinin ifadeleri hasta ile kontrol grubu karşılaştırıldığında; VEGF-A ($p<0,05$), TIMP-1 ($p<0,05$), MMP-2 ($p<0,05$) ve MMP-9 ($p<0,05$) genleri için anlamlı bir fark saptanırken, TIMP-2 ($p>0,05$) geninin anlamlı olmadığı tespit edildi. VEGF-A, TIMP-2, MMP-2 ve MMP-9 genlerinin metilasyon yüzdesi hasta ile kontrol grubu arasında karşılaştırıldığında; VEGF-A ($p<0,05$), TIMP-2 ($p<0,05$), MMP-2 ($p<0,05$) ve MMP-9 ($p<0,05$) genleri için anlamlı bir farkın olduğu saptandı. Çalışmamızda, hastaların yaş, lökosit, hemoglobin, trombosit, CD yüzey antijenleri, metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) geni polimorfizmi ve sınıflandırma ölçütleri de istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda hasta grubumuzda tanı anında VEGF-A, TIMP-1, TIMP-2, MMP-2 ve MMP-9 genlerinin ifadeleri ve metilasyon değerlerinin ALL hastalığının tanısında önemli olabileceği, hastalığın takibinde nüks ve mortalite için araştırılması gereken hedef genler olabileceği iler sürülebilir.

Anahtar Kelimeler: Akut lenfoblastik lösemi, VEGF-A, TIMP-1, TIMP-2, MMP-2, MMP-9.

ABSTRACT

The Investigation Of VEGF-A, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 Genes Expression Alterations And Methylation Levels In Children With Acute Lymphoblastic Leukemia.

Acute lymphoblastic leukemia is a malignant disease of lymphocytic progenitors and originates from single B or T cell clone. The accumulation and proliferation of the blast cells in bone marrow leads to bone marrow supression. VEGF-A, TIMP-1, TIMP-2, MMP-2 and MMP-9 genes have been associated with invasion and metastasis of solid tumors but the effects of these genes for the etiology of hematologic cancers are not known completely.

In our study, 26 patients diagnosed with a acute lymphoblastic leukemia were included in Cukurova University Faculty of Medicine, Pediatric Oncology Unit. The control group consisting of 26 healthy children with the same age and gender and have no family history for cancer was recorded. The expression and methylation levels of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) genes were detected by RT-PCR method in children with ALL. There were significant differences in expression of VEGF-A ($p<0,05$), TIMP-1 ($p<0,05$), MMP-2 ($p<0,05$) and MMP-9 ($p<0,05$) of ALL patients compared to the control group, whereas any significant difference was not found in TIMP-2 ($p>0,05$) level statistically. Percentage of methylation of VEGF-A, TIMP-2, MMP-2 and MMP-9 genes were significantly higher in ALL patients than that of control group ($p<0,05$). In our study, age, leukocyte and platelet count, hemoglobin level, CD surface antigens, methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphism and the classification criteria of ALL were evaluated statistically in all patients.

In conclusion, VEGF-A, TIMP-1, TIMP-2, MMP-2 and MMP-9 expression and methylation levels could play an important role in the pathogenesis of ALL and help provide new insights into the investigation of target genes for the following up clinically in children diagnosed with ALL.

Key Words: Acute lymphoblastic leukemia, VEGF-A, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2

1. GİRİŞ

Çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemisi (ALL), kan kanseri olarak adlandırılan kemik iliğindeki anormal hücrelerin kana ve tüm dokulara yayılması sonucu çeşitli belirtiler veren malin bir hastalıktır. ALL ilk kez, Fransız hekim Alfred Velpeau tarafından 1827 yılında ateş, halsizlik ve yaygın ağrı yakınmaları olan hastanın kanının püyle dolu olduğunu yaptığı otopside gözlemlemiştir. Virchow, Bennett ve Craigie adlı araştırıcılar 1845 yılında bu durumu, ayrı bir hastalık olarak tanımlamışlardır. Virchow 1847 yılında, hastalığı lösemi (yunanca leukos beyaz, heima kan) terimini kullanarak tanımlamış ve splenik ve lenfatik olarak ikiye ayırmıştır. Ehrlich'in boyama yöntemlerinin 1891 yılında ortaya çıkması, lösemi subtiplerinin ileri ayırımını sağlamıştır. Splenik ve myeloid lösemi, kısa süre sonra aynı hastalık olarak tanımlanmıştır. Lösemi, 1913 yılında akut veya kronik, lenfatik veya myeloid olarak sınıflandırılmıştır. Çocuklarda ALL'nin özellikle 1-5 yaş arasında daha yüksek olan prevalansı 1917 yılında fark edilmiştir. Löseminin farklı bir hastalık olduğu anlaşıldıktan kısa süre sonra hekimler palyatif tedavi amaçlı kimyasallar kullanmaya başlamışlardır. İlk gelişme, folik asidin lösemi hücrelerinin çoğalmasını hızlandırdığına dair Farber tarafından yönlendirilen ve bir folik asit antimetaboliti olan aminopterinin kullanımıdır. Çarpıcı olarak, çocuklarda ilk kez aylarca süren klinik ve hematolojik tam iyileşmeler gözlenmiştir. Aminopterin ile oluşturulmuş iyileşmelerin, klinik yayınından bir yıl sonra yeni izole edilmiş adrenokortikotropik hormonun (ACTH) lösemi hastalarında hızlı ancak, kısa iyileşmeler sağladığı bildirilmiştir. Eşzamanlı olarak, pürin ve pirimidin sentezi ile etkileşen antimetabolitler sentezlenmiştir. Bulgular merkaptopürin, 6-tioguanin ve allopurinolün klinik kullanıma girişine neden olmuştur. 1962 yılında, St. Jude Çocuk Araştırma Hastanesi'nde remisyon indüksiyonu, güçlendirme veya pekiştirme, klinik belirti vermeyen santral sinir sistemi (SSS) lösemisi için tedavi ve uzatılmış idame tedavilerinden oluşan dört fazlı tam tedavi yaklaşımı geliştirilmiştir. 1970'lerin başlarında çocukların %50'ye yakını, bu yenilikçi tedavi ile iyileştirilmiştir.

Sonunda, ALL klinik, genetik ve immünolojik olarak heterojen hastalıkları tanımlayan geniş bir terim olarak kabul edilerek, risk yönelimli tedaviler geliştirilmiştir.

Klinik anlamda, hastalığı karakterize edebilmek için uygun sınıflandırma ölçütlerinin yanında genetik taramalara da gereksinim duyulmaktadır. ALL alt tipleri belirlenirken, sitogenetik tetkiklerin yapılması, genlerin ya da protein dizilerinin incelenmesi, kemikiliği ve serum protein değerlerinin ölçülmesi, genlerin ekspresyon ve metilasyon düzeylerinin saptanması hastalığın daha homojen alt gruplara ayrılarak sağlıklı ve anlamlı bir şekilde sınıflandırılmasına ve hastalar için en uygun tedavi rejimlerinin belirlenmesine büyük katkı sağlayacaktır. Burada, dikkat edilmesi gereken en önemli husus, hangi genetik metodların izleneceği, hangi gen veya genlerin irdeleneceği, klinik anlamda hastalığın evresinin saptanmasında elde edilecek verilerin sağlıklı bir biçimde yorumlanması için onkologların, patologların ve tıbbi biyologların bir araya gelerek iş birliği içinde çalışmasıdır.

Çocukluk çağı ALL'de sağkalım oranı %70-80'lere ulaşmasına rağmen, hastalığın tekrar etmesi, hala ciddi ve çözülmesi gereken bir problemdir. Tam hastalık belirtilerinin söndüğü kabul edilen bazı olgularda klinik ve sitokimyasal yöntemlerle nükslerin görülmesi, kemik iliğinde tedavi ile yok edilmemiş belli miktarda lösemik hücrenin kaldığının işaretidir. Çalışmada amaçlanan çocukluk çağı ALL'de tanı anında VEGFA, TIMP1, TIMP2, MMP2 ve MMP9 genlerinin ifade ve metilasyon düzeylerinin hastalığın öyküsünde yer alıp almadığını, nüks için işaretçi olup olamayacağını belirlemek ve tedavi protokollerinin saptanması ile olguların yaşam kalitelerine ve maliyeti yüksek olan tedavi ücretleri azaltılarak ekonomiye katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

Çalışma kapsamında hedeflenen başlıca amaçlar;

1. Yeni tanı almış çocuk ALL hastalarında VEGF-A, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-2 genlerinin ifade ve metilasyon düzeylerini saptanması,
2. Her iki yöntemin birbirleri ile olan uyumunun irdelenmesi,
3. VEGF-A, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-2 genlerinin ifade ve metilasyon düzeylerinin prognoza etkisinin ve diğer prognostik faktörlerle ilişkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ

Lösemi; normal myeloid ya da lenfoid hematopoezin, genetik ya da çevresel faktörlerin etkisi ile belirli bir basamakta duraklaması ile birlikte; bazı kemik iliği öncül hücrelerinin klonal artışı olarak tanımlanır. Klonal çoğalma sonucu; neoplastik hücrelerin kemik iliği ve diğer dokuları istila etmesi ve periferik kanda birikmesiyle karakterize olan bir hastalıktır[1].

2.1.1. Epidemiyoloji

ALL, çocuklar arasında en yaygın olan kanser türüdür. On beş yaş altı çocuklar arasında tanımlanan kanserlerin yaklaşık %25'ini ve yeni tanı lösemilerinde yaklaşık %75'ini oluşturur. En sık görülme yaşı 2-5 yaş arasıdır. Erkeklerde, kızlara göre daha yüksek sıklıkta görülmektedir (1:1.2). Amerika Birleşik Devletlerinde, her yıl 20 yaş altı yaklaşık 2900 çocuk ve adölesana ALL tanısı konmaktadır[2]. Çocuklarda, ALL sıklığı 2.8/100.000'dir. Altmış üç Avrupa populasyonun kanser kayıtlarında lösemi sıklığı 1970'lerden 1990'a %1.4 artmıştır. İngiltere'de, 1971-1975 ila 1996-2000 arasında sıklığı 100.000'de 3.83'ten 4.61'e çıkmıştır. İskandinav ülkelerinde, 15 yaş altı çocuklarda sıklığı dengeli kalmıştır (3.3/100.000)[3]. Ülkemizde ise akut lenfoblastik lösemilerin 0-14 yaş arasında insidansı 41.4/1.000.000 olarak bildirilmektedir[4].

2.1.2. Etiyoloji

ALL gelişimine yol açan kesin patogenetik nedenler bilinmemektedir. Sadece birkaç vaka (<%5), Down sendromu, Bloom sendromu, ataksi-telenjiektazi ve Nijmegen kırık sendromu gibi yatkınlığı olan kalıtsal genetik sendromlar ile veya iyonize radyasyon ya da özel kemoterapötik ilaçların maruziyeti ile ilişkilidir[5]. Çocukluk çağı ALL için üzerinde çalışılan yayınlar, giderek artan yüksek doğum ağırlığı bir risk faktörü olarak inandırıcı hale geliyor olsa da ebeveyn mesleği, ebeveyn sigara veya alkol

kullanımı, anne diyeti, prenatal vitamin kullanımı, böcek ilaçları veya çözücülere ve güçlü frekansta manyetik alana maruz kalımı içeren geniş bir liste mevcuttur.[6,7]

ALL patogenezinde rol oynayan faktörleri şu şekilde sıralayabiliriz[8]:

1. İyonize radyasyon ve elektromanyetik alan
2. Kimyasal ajanlar (benzen ve metabolitleri fenol, hidrokinon, katekol, benzenetriol vb.)
3. İlaçlar özellikle alkilleyici ve epipodofilotoksin kullanım sonrası
4. Genetik faktörler:

a. Monozigotik ikizlerde; hayatın ilk beş yılı içinde ikizlerden biri lösemi olursa, ikinci ikizin lösemi olma riski % 20'dir.

b. Lösemili bir hastanın kardeşlerinde de lösemi görülme olasılığı genel populasyona göre dört kat daha fazladır.

c. Kromozomsal bozukluklar:

- Down Sendromu'nda, 10 yaşından önce lösemi riski 1/95'tir.
- Bloom Sendromu'nda, 30 yaşından önce lösemi riski 1/8'dir.
- Fankoni Anemisi'nde, 16 yaşından önce lösemi riski 1/12'dir.

d. Aşağıdaki genetik hastalıklarda insidans yüksek saptanmıştır:

- Konjenital agammaglobunemi
- Poland sendromu
- Shwachman-Diamond sendromu
- Ataksi telenjiektazi
- Li-Fraumeni sendromu
- Nörofibramatozis
- Diamond-Blackfan anemisi
- Kostmann hastalığı
- Wiskott-Aldrich sendromu

2.1.3. Lösemik Hücre Karakterizasyonu ve Sınıflandırılması

Akut lenfoblastik lösemiler; morfolojik, sitokimyasal, immunolojik ve sitogenetik olarak sınıflandırılmaktadır.

2.1.3.1. Morfolojik Sınıflandırma

Bennett ve ark. 1976'da yılında yayınladığı Fransız, Amerikan ve İngiliz hematologlarının ortak çalışması olan FAB (French American British) sınıflamasıdır. Bu sınıflandırmada; ışık mikroskobunda lenfoblastlar morfolojik olarak tanımlanır. Lösemik hücreler farklılaşma olmaması, yaygın kromatin yapısında bir nükleus, bir veya daha fazla nükleolus ve bazofilik sitoplazma ile karakterize edilir. Miyeloid ve lenfoid hücreler arasında farklılaşma zor olabilir. Burada ki, kriterler şunlardır[9,10]:

- Hücre boyutu: miyeloblastlar daha büyüktür.
- Nükleusun kromatin yapısı: miyeloblastlarda heterojen ve lenfoblastlarda homojen ve/veya berraktır.
- Nükleolus: miyeloblastlarda en az iki tanedir.
- Nükleus ve sitoplazma arasındaki oran: lenfoblastlarda belirgin olarak yüksektir.
- Sitoplazma: lenfoblastlarda mavi ve genellikle homojen (bazen vakuollü), miyeloblastlarda granüler ve bazen burgu çubuklu, özellikle akut promiyelositik lösemide olduğu gibi.

Bu sınıflamaya göre ALL, 3'e ayrılır:

Tablo 1. Fransız-Amerikan-İngiliz (FAB) lenfoblast sınıflandırması alt gruplar ve özellikleri[10].

Fransız-Amerikan-İngiliz (FAB) Lenfoblast Sınıflandırması
ALL tanılı çocukların %85 L1 ü Hücre boyutu: küçük hücreler baskındır. ü Nükleer kromatin: genellikle homojendir. ü Nükleer şekil: oval ve neredeyse hücreyi doldurur. ü Nükleolus: normal, bazen yarık veya girintilidir. ü Sitoplazma: çok azdır. ü Bazofili sitoplazması: çok azdır. ü Sitoplazmik vakuolleşme: değişkendir.
ALL tanılı çocukların %14 L2 ü Hücre boyutu: değişkendir. ü Nükleer kromatin: değişken ve heterojendir. ü Nükleer şekil: düzensiz yarık ve ortak girintilidir. ü Nükleolus: bir veya daha fazla ve genellikle büyüktür. ü Sitoplazma: değişken ve kısmen çoktur. ü Bazofili sitoplazması: değişken ve bazen derindir. ü Sitoplazmik vakuolleşme: değişkendir.
ALL tanılı çocukların %1 L3 ü Hücre boyutu: büyük homojen hücrelerdir. ü Nükleer kromatin: nokta nokta ve homojendir. ü Nükleer şekil: normal, yani oval yuvarlaktır. ü Nükleolus: belirgindir, bir veya daha fazladır. ü Sitoplazma: kısmen çoktur. ü Bazofili sitoplazması: oldukça derindir. ü Sitoplazmik vakuolleşme: oldukça belirgindir.

2.1.3.2. Sitokimyasal Sınıflandırma

Blastların bazı boyalarla boyanıp boyanmaması veya az ya da çok boyanmaları lösemi tipini belirlemek için faydalı bir özelliktir. Boyalardan, miyeloperoksidaz, sudan siyahı boyası, periyodik-asit-schiff, asid fosfataz, nonspesifik esteraz, terminal deoksinükleotil transferaz ve demir boyaları kullanılmaktadır. Bunların farklı kombinasyonlarda pozitif olması FAB sınıflamasını desteklemektedir.[1]

Tablo 2. Akut lenfoblastik lösemilerde sitokimyasal sınıflandırması.

FAB	MPO	SB	AP	CAE	A-EST	B-EST	PAS	MGP	Fe	TdT
L1	-	-/np	+*	-	+/z	-/z	+/-	+	-	+
L2	-	-/np	+*	-	-/z	-/z	+/-	+	-	+
L3	-	-	+*	-	-	-	+/-	+	-	+

np: nadir pozitif, *:T-ALL'de unipolar pozitif, z: zayıf, SB: Sudan siyah, AP: Asit fosfataz, CAE: Kloroasetat esteraz, A-NAE: Alfa-naftil asetat esteraz, B-EST: Alfa-naftil bütirat esteraz, MGP: Metil yeşil pirenin, MPO: Miyeloperoksidaz, PAS: Periodik asit Schiff boyaması, TdT: Terminal Deoksinükleotidil transferaz.

2.1.3.3. İmmunolojik Sınıflandırma

İmmunolojideki gelişmeler sonucu, B ve T hücreleri ile ilgili elde edilen yeni bilgiler, akım sitometri ile hücrelerin immunfenotipik olarak tanımlanması ve sınıflandırılmasına imkân vermiştir. Lenfositlerin gelişim aşamalarında yüzeylerinde beliren ve kaybolan farklı antijenik işaretçilere yüzey farklılaşma antijenleri (Cluster of differentiation, CD) denir. CD olarak adlandırılan bu antijenler, bir etiket gibi o hücrenin hangi gelişim aşamasında olduğu hakkında bilgi verir ve lösemilerin sınıflandırılmasına yardımcı olmaktadır[11]. İnsan lösemi hücrelerindeki antijene karşı, antiserum üretimi sonucu daha önce non-T ve non-B ALL olarak tanımlanan lösemi hücrelerinin büyük bir kısmında ortak olarak bulunan CD10 antijeni "common ALL antijen" olarak tanımlanmıştır. Bu antijeni taşıyan lösemiler ise common-ALL (CALLA) olarak adlandırılmıştır.[12]

Seksenli yılların başından beri, miyeloid antijen içeren akut lösemiler olduğu biliniyordu. Blast hücre özelliklerini belirleyen teşhis kriterleri, immünfenotip teknikler ve monoklonal antikorların farklılığı nedeni ile bildirilmiş olan miyeloid antijen pozitif ALL'lerin sıklığı %4.3 ile %22 arasında değişmektedir.[13] İmmunofenotipleme ile ALL, B hücre ve T hücre kaynaklı olarak 2 gruba ayrılmaktadır. Her ne kadar ALL, B serisi (erken pre-B, pre-B, geçiş pre-B, matür B) veya T serisi (erken, orta, geç timosit) yolaklarında bilinen normal matürasyon basamaklarına göre alt gruplara ayrılabilirse de terapötik önem açısından farklılık sadece T hücreli, matür B hücreli ve diğer B hücreli (B hücreli prekürsör) immünfenotipler arasındadır.[4] ALL'nin altı immünolojik alt tipi ve onların klinik özellikleri Tablo 3'te sunulmuştur.

Tablo 3. İmmünolojik alt tipe göre klinik özellikler[4]

Alt tip	Tipik markerlar	Çocukluk çağı	İlişkili özellikler
B-hücreli prekürsör	CD19+, CD22+, CD79a+, sIg±, ylgμ-, HLA-DR+		
Pre pre B	CD10-	% 5	Yüksek lökosit sayısı, tanıda SSS lösemisi, psödoploidi, MLL gen yeniden düzenlemeleri, kötü prognoz
Erken pre B	CD10+	% 63	1-9 yaş grubu, düşük lökosit sayısı, hiperploidi
Pre B	CD10±, sIg+	% 16	Yüksek lökosit sayısı, psödoploidi, siyah ırk
B hücreli	CD19+, CD22+, CD79a+, sIg+, ylgμ+, sIgκ+ veya sIgλ+	% 3	Erkek predominansı, tanıda SSS lösemisi, abdominal kitle, renal tutulum
T hücre serisi	CD7+, sCI3+		
T hücreli	CD2+, CD1±, CD4±, CD8±,HLA-DR-, TdT ±	% 12	Erkek predominansı, hiperlökositoz, ekstra medüller hastalık
Pre-T hücreli	CD2-, CD1-, CD4-, CD8-, HLA-DR±, TdT+	% 1	Erkek predominansı, hiperlökositoz, ekstramedüller hastalık, kötü prognoz

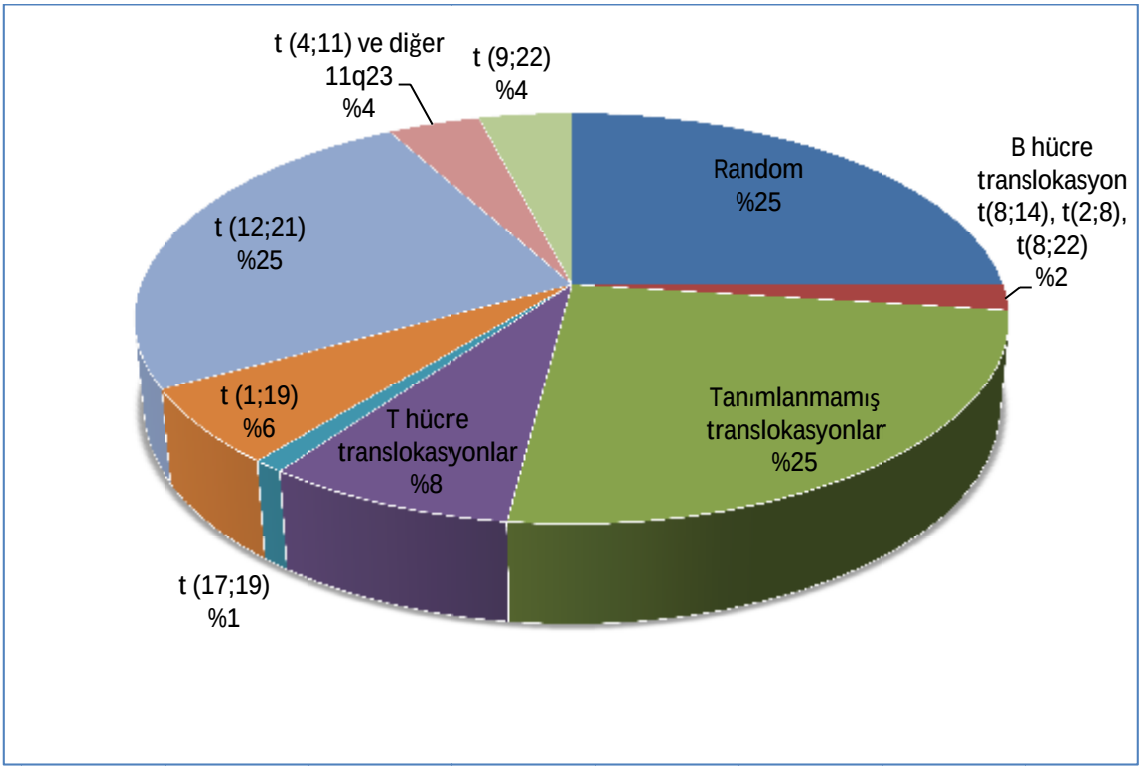
sCD3: sitoplazmik CD3, sIg: sitoplazmik immünglobulin, ylg: yüzey immünglobulin, TdT: terminal deoksinükleotidil transferaz, μ = mu ağır-zincir protein, κ = kappa hafif-zincir protein, λ = lambda hafif-zincir protein.

2.1.3.4. Sitogenetik Sınıflandırma

ALL vakalarının %90'dan fazlasında, lösemik blastlarda bir çeşit spesifik genetik değişikliklere rastlanmaktadır. Bu değişiklikler; sayısal ve yapısal değişiklikleri içerir. Tüm çocukluk çağı ALL vakalarının yaklaşık yarısı tekrarlayan translokasyonlar sahiptir (Grafik 1, Tablo 4). Standart sitogenetik analizler, translokasyonların varlığı ve kromozom sayısal düzensizlikleri olmak üzere lösemik hücre karyotipi hakkında bilgi veren tanıda önemli bir araç olmaya devam etmektedir. Ancak moleküler genetik teknikler, özel genetik değişimleri doğru tespit etmemizi sağlamıştır. Kemik iliği örneklerinin moleküler analiz sonuçları karyotipten daha hassastır. Moleküler analizler, sitogenetik olarak benzer görünen lezyonları ayırt edebilir ve rutin karyotip analizi ile saptanamayan trasnlokasyonları belirleyebilir.[14]

Tablo 4. Çocukluk çağı ALL'de yaygın genetik değişiklikler.

Karyotip	Moleküler Değişim	Frekans
Öncü B-ALL		
t(12;21)(p13;q22)	TEL-AML1	%25
t(1;19)(q23;p13)	E2A-PBX1	%6
t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL	%4
t(4;11)(q21;q23), Diğer11q23	MLL-AF4, Diğer MLL füzyonlar	%4
Hiperdiploid (DI≥1.16)	Bilinmiyor	%20
B hücreli ALL		%2
t(8;14)(q24;q32)	MYC düzensizliği	
t(2;8)(q12;q24)	MYC düzensizliği	
t(8;22)(q24;q11)	MYC düzensizliği	
T hücreli ALL		%8
t(1;14)(p32;q11)	TALI düzensizliği	
t(1;7)(p32;q35)	TALI düzensizliği	
t(7;9)(q34;q32)	TAL2 düzensizliği	
t(7;19)(q34;p13)	LYL1 düzensizliği	
t(10;14)(q24;q11)	HOX11 düzensizliği	
t(7;10)(q35;q24)	HOX11 düzensizliği	
t(11;14)(p15;q11)	LMO1 düzensizliği	
t(7;11)(q35;p13)	LMO2 düzensizliği	
t(11;14)(p13;q11)	LMO2 düzensizliği	
t(1;7)(p34;q34)	LCK düzensizliği	
t(7;9)(q34;q34)	TAN1 düzensizliği	



Grafik 1. Çocukluk çağı ALL'de translokasyonların dağılımı.

Öncü B-ALL; BCR-ABL, E2A-PBX1 ve TEL-AML1 gen füzyonları (aynı zamanda ETV6-CBFA2 olarak da adlandırılır) ve MLL geni yeniden düzenlemeleri gibi klinik olarak önemli moleküler değişimler içerir (Tablo 6). Gelişmelere rağmen, lösemi blastlarında BCR-ABL füzyonu [t(9;22)] taşıyan hastalar, kötü bir prognozla devam ederler ve bunların yaklaşık %30'u olaysız yaşarlar. En son veriler, düşük lökosite sahip BCR-ABL pozitif hastalar ile bu füzyona sahip olmayan hastaların benzer sonuçlara sahip olabileceğini göstermektedir. Bebek ALL vakalarının yaklaşık %80'inde, MLL geni yeniden düzenlemesi mevcuttur. Bebek olmayan ALL vakalarının %3'ü, kemoterapiye rağmen negatif sonuçlarla ilişkilidir.

En önemli translokasyonlar ve klinikle ilişkileri aşağıdaki gibidir[4];

1. TEL-AML1 füzyon geni [t(12:21)(p13q;q22)]: Bu translokasyon sitogenetik analizlerinde vakaların %1'inden azında saptanırken, moleküler tekniklerle pre-B vakalarının %25'inde saptanır. Bu translokasyon, iyi prognozla ilişkilidir.

2. BCR-ABL füzyon geni [t(9:22)(q34;q11)]: Bu translokasyon, pediatrik ALL vakalarının yalnızca %3-5'inde meydana gelir. Ancak erişkin ALL'de tam tersi bir durum gösterir. Bu translokasyon, erişkin vakaların %25'inde ve KML vakalarının %95'inde mevcuttur. Pediatrik BCR-ABL pozitif ALL'de, BCR kırılma noktası 190-kb protein (p190) üretir, KML'de ise farklı bir protein p210 üretilir. Pediyatrik ALL'de t(9;22) genellikle büyük yaş ve tanı anında yüksek lökosit sayısı ile ilişkilidir.

3. E2A-PBX1 füzyon geni [t(1:19)(q23;p13.3)]: Bu translokasyon, tanı anında sıklıkla yüksek lökosit sayısı ile ilişkili olup pre-B stoplazmik Ig pozitif fenotipli vakaların %25 kadarında mevcuttur. Bu alt tipte yoğun tedavi gerekmektedir.

4. Kromozom bandı 11q23'deki MLL gen düzenlemeleri: Bebek ALL vakalarının %80 kadarını, daha büyük çocuklardaki ALL vakalarının %3 kadarını ve topoizomeraz II inhibitörünü ilgilendiren sekonder AML vakalarının %85'ini etkiler. Bu tranlokasyon, yoğun tedaviye rağmen %20'den daha az sağ kalım ile çok kötü prognoz taşır.

5. B hücreli ALL translokasyonları: Bu translokasyon 8q24 kromozomu üzerinde MYC genlerini ilgilendirir. B ALL vakalarının %80 kadarı t(8:14)(q24;q32) taşır, geri kalan vakalar ise t(2:8)(p12;q24) veya t(8;22)(q24;q11) içerir. Tüm bu translokasyonlar, MYC

ekspresyonunu bozarlar ve Burkitt lenfoma tedavisinde kullanılan ajanlarla yoğun olarak tedavi edilmeleri gerekir.

6. Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) polimorfizmi: Metilentetrahidrofolat redüktaz enzimi folat metabolizmasında önemli rol oynayan bir enzimdir. ALL hastalarında, metotreksat ilaç tedavisinden önce MTHFR mutasyon analizi yapılmaktadır. Tablo-5'te Çukurova Üniversitesi Pediatrik Onkoloji bilim dalında yapılan MTHFR sonuçları gösterilmektedir.

Tablo 5. MTHFR geni C677T ve A1298C polimorfizm sonuçları

Hasta No	C677T	A1298C
1	CC (N)	AA (N)
2	CC (N)	AC (HtM)
3	CT (HtM)	AA (N)
4	CC (N)	AA (N)
5	CC (N)	CC (HzM)
6	CT (HtM)	AC (HtM)
7	CC (N)	CC (HzM)
8	CC (N)	AC (HtM)
9	CT (HtM)	AC (HtM)
10	CT (HtM)	AA (N)
11	CT (HtM)	AC (HtM)
12	*	*
13	*	*
14	CC (N)	AC (HtM)
15	CT (HtM)	AC (HtM)
16	CT (HtM)	AA (N)
17	CT (HtM)	AA (N)
18	*	*
19	CT (HtM)	AC (HtM)
20	CC (N)	AC (HtM)
21	CT (HtM)	AC (HtM)
22	TT (HzM)	AC (HtM)
23	CC (N)	AC (HtM)
24	CC (N)	AA (N)
25	TT (HzM)	AA (N)
26	CC (N)	AC (HtM)

N: normal, HzM: homozigot mutasyon, HtM: heterozigot mutasyon, (*: yeterli miktarda DNA elde edilemediği için saptanamadı)

Tablo 6. Genetik risk sınıflandırması[14]

Risk Grubu	Genetik özellikler	Etkilenen Hastalar (%)	Önerilen Tedavi
Düşük Risk	DNA indeksi ≥ 1.16 veya TEL-AML1 füzyonu	40-50	Anti-metabolit tabanlı
Orta Risk	E2A-PBX1 füzyonu	40-50	Yoğun kemoterapi
Yüksek Risk	BCR-ABL füzyonu veya MLL yeniden düzenlenmesi	10	İlk remisyonda allogenik kemik iliği transplantasyonu

2.1.4. Klinik Bulgular

ALL'nin klinik bulguları, lenfoblast infiltrasyonunun neden olduğu kemik iliği yetersizliğinin derecesi ve ekstramedüller organ infiltrasyonu ile belirlenmektedir. ALL'li çocukların üçte ikisi tanı anında hastalığın belirtilerini dört haftadan daha az sürede göstermektedir. Bununla birlikte, birkaç aylık bir öykü de ALL tanısı ile uyumlu olabilir. Genellikle ilk semptomlar spesifik değildir, letarji, geçmeyen bitkinlik, kemik ağrısı veya iştah kaybı şeklindedir. Anemi, kanama ve infeksiyonlar gibi daha spesifik semptomlar lenfoblastların kemik iliği infiltrasyonu sonucudur. Geriye kalan normal hematopoezi engellemektedir. ALL'nin ayırıcı tanısında infeksiyonlar, nöroblastom gibi kemik iliğini tutan çocukluk çağı maligniteleri, kollajen vasküler hastalıklar, immun trombositopenik purpura ve aplastik anemi gibi diğer hematolojik hastalıklar yer almaktadır.[4]

2.1.4.1. Kemik İliğinin İnfiltrasyonu Sonucu Gelişen Bulgular

Kemik iliğinde 3 serinin etkilenmesine bağlı olarak bulgular gelişebilir[16].

Anemi: Solukluk, çabuk yorulma, taşikardi ve dispne nedenidir. Bazen, kalp yetmezliğine neden olacak kadar ağır olabilir.

Nötropeni: Ateşin nedenidir ve fırsatçı bakteriler de dahil olmak üzere tüm bakterilerle enfeksiyon gelişimine yol açar. Oral ve anal lezyonlar oluşur. Virüs ve mantar enfeksiyonları da görülür.

Trombositopeni: Genellikle peteşi, purpura, çabuk morarma ve mukozal membranlardan kanamaya neden olur. Burun kanaması, gastrointestinal ve

intrakranial kanama daha nadir saptanır. Olguların %1-2'si pansitopeni ile başvurur. Yanlışlıkla aplastik anemi tanısı alır, 1-9 ay içinde lösemi tanısı konulur.

2.1.4.2. Lenfoid Sistemin Tutulması Sonucu Gelişen Bulgular

Lösemik blastların yayılımı ile lenfadenopati (LAP), dalak ve karaciğerde büyüme saptanır ve lenfadenopatiler ağrısızdır. Özellikle, T hücreli lösemide mediastinal olanlar sıktır, solunum sıkıntısı ve vena kava superior sendromuna neden olabilir.[15] Sıklıkla, timus içindeki ön mediastinal kitleler T-ALL'li çocukların 2/3'sinde mevcuttur. Fakat diğer immünolojik subtiplerde oldukça enderdir. Lösemik plevral effüzyonlar, T-ALL olan bazı çocuklarda mediastinal kitlelerle ilişkili olabilir.[4]

2.1.4.3. Ekstramedüller Sistem Bulguları

2.1.4.3.1. Santral Sinir Sistemi (SSS) Bulguları

Beyin omurilik sıvısında (BOS), lenfoblastların bulunması ile tanımlanan SSS lösemisi immünolojik alt tiplerine göre değişmekle birlikte, yeni tanılı ALL'li çocukların %1,5 ile %10'unda bulunmaktadır. SSS lösemisi, nispeten daha ender olan matür B hücreli, T hücreli ve yüksek lökosit sayılı lösemilerde daha sıktır. Tanıda SSS lösemisi olan çocuklar çoğunlukla, ense sertliğinin olmadığı artmış intrakranyal basınç belirtileri gibi diffüz veya fokal nörolojik belirtilerle kendilerini gösterirler. Kranyal sinir tutulumu genellikle III, IV, VI ve VII. kranyal sinirler olmak üzere dikkatli nörolojik muayenede kendini belli edebilir.[4] SSS'nin kan ile kontaminasyonu morfolojik değerlendirmeyi zor hatta olanaksız kılabilir. Tanı anında SSS lösemi insidansı kullanılan tanı kriterlerine göre önemli ölçüde değişiklik gösterir. 1986 yılında, Roma Uluslararası Çalışma Grubu serebromeningeal löseminin tanımı olarak sitosantrifüj preparatında ≥ $5x10^6$/L blasttan oluşan lökosit sayısını önermiştir. Tanı anında BOS'da az sayıda blast olmasının SSS lösemisi veya SSS nüksünün gelişimine neden olmadığını bazı araştırmacılar bildirmiştir. Diğer bazı çalışmalar, az sayıda blast varlığında (<5 her büyük büyütmede) ve lomber fonksiyonun tanı anında travmatik olduğu durumlarda lösemik hücrelerin ekilmesi yoluyla SSS nüksü riskinin artmış olduğunu göstermektedir.[4]

2.1.4.3.2. Genitoüriner Bulgular

Sonografi veya dikkatli palpasyonla saptanan testiküler hastalık ALL tanısı sırasında enderdir. Bununla birlikte, lösemik blastlar tanı anında erkek çocukların %25 kadarında çoğunda testis biyopsisi ile saptanmıştır. Gizli testiküler hastalık olasılığı testiküler rekürrensin sıklıkla sistemik nüksü takip etmesi gerçeği ile birleşince pek çok merkez, idame kemoterapisi sırasında ve bitiminden hemen önce rutin bilateral testiküler biyopsi yapılmasını savunmuştur. Ancak, bu uygulama son zamanlarda pek çok merkez tarafından terk edilmiştir. Çünkü çalışmalar göstermiştir ki; tanı anında indüksiyondan sonra, idame sırasında veya kemoterapi kesilmeden önce yapılan testiküler biyopsiler sıklıkla anlamlı oranda yalancı negatiflikle ilişkilidir ve sonradan gelişebilecek testiküler bir nüksü doğru tahmin edememektedir. Bu nedenle, tedavinin sonunda gizli hastalık için rutin testiküler biyopsiler artık önerilmemektedir[4]. Klinik olarak testiküler etkilenme genellikle tek taraflı ağrısız testis büyümesi olarak ortaya çıkar. Tanı testiküler biyopsi ile konmalıdır. Testiküler lösemiden klinik olarak şüphelenildiğinde bilateral testiküler biyopsi endikedir. Çünkü hastalık sıklıkla kontralateral testisi de etkiler.[4]

2.1.4.3.3. Kemik ve Eklem Bulguları

Tanı sırasında %25 olguda saptanır. Lösemik hücrelerin periostu tutmasından, kemik infarktı, ya da kemik iliği mesafesinin artan blast yükü ile genişlemesinden kaynaklanır. En sık, uzun kemiklerde ve sternumda saptanır. Çoğunlukla hastalar artrit, artralji veya romatoid artrit tanısı ile izlenir.[15]

Radyolojik olarak:

1. Medüller veya korteksi kapsayan osteolitik lezyonlar
2. Metafizde radyolusen bandlar
3. Metafizde büyümenin durmasına bağlı artmış dansite
4. Periost altında yeni kemik oluşumu saptanır.

2.1.5. Laboratuar Bulguları

2.1.5.1. Kan Sayımı

Orta düzeyden ağıra kadar giden bir spektrumda anemi gözlenir. Normositik normokrom eritrosit morfolojisi mevcuttur. Anemi ne kadar ağırsa löseminin süresi de o kadar uzun demektir. Yüksek hemoglobin seviyeleri daha hızlı çoğalan lösemiyi düşündürür. Lökosit sayısı artmış, normal ya da azalmış olabilir. Periferik yaymada blastlar lökopenili hastalarda az ya da hiç olmayabilir. Lökosit sayısı 10000/mm3'den çok olduğunda periferde blastlar genellikle çoktur. Eozinofili ALL'li çocuklarda sıklıkla görülür. Hastaların %92'sinde trombosit sayıları normalin altındadır.[4]

2.1.5.2. Kemik İliği

Genellikle, %80-100 oranında blastlar tarafından işgal edilmiştir. Megakaryositler genellikle yoktur. Kemik iliği %5'ten fazla blast içerdiğinde lösemiden şüphelenilmelidir. Ancak, kesin tanı lenfoblastların kemik iliğinde %25'den fazla olması ile konulur. Blastların ayırıcı özelliği diffüz dağılmış nükleer kromatine, bir veya birçok nukleolusa ve bazofilik bir stoplazmaya sahip olmaları ve göreceli olarak differansiye olmamış olmamalarıdır. Ayrıntılı hücre sınıflamalarına izin veren özel kemik iliği çalışmaları histokimya, immün fenotipleme ve sitogenetiği içerir.[4]

2.1.5.3. Kan Biyokimyası

Elektrolitler, üre, ürik asit ve karaciğer fonksiyon testleri değerlendirilmelidir. Yüksek lösemik hücre yükü olan hastalarda sık görülen yüksek ürik asit seviyeleri artmış, pürin anabolizma ve katabolizmasını gösterir. Hiperüriseminin major komplikasyonu ürik asit nefropatisidir ve ardından gelen böbrek yetmezliğidir. Hiperkalsemi kemik iliğinin infiltrasyonundan meydana gelebilir. Hücre yıkımından kaynaklanan artmış fosfor düzeyleri hipokalsemiyi tetikleyebilir.[4]

2.1.5.4. BOS

Hücre varlığı, biyokimyasal inceleme ve sitosantrifüj yapılmalıdır. Şüpheli durumda hücrelere TdT boyası yapılabilir. Genel olarak, beyaz küre sayısı >50.000

olduğunda, fonksiyonun travmatik olma olasılığı sonucunda blastın BOS'a verilmesini engellemek amacı ile BOS alımı önerilmez. Tanıda ilk BOS alımı dikkatle yapılmalı travmatik işlemden kaçınılmalıdır. Bazı protokollerde travmatik ilk BOS örneklemesi durumunda ek intra tekal tedavi önerilmektedir.[15]

ALL'nin BOS tutulumu:

SSS1: BOS'ta hücre saptanmaz, sitosantrifüj temizdir.

SSS2: BOS'ta blast sayısı <5'dir.

SSS3: Blast sayısı >5, kafa çift sinir tutulumu olarak sınıflanır.

2.1.6. Prognostik Faktörler

Yaşları 1 ve 9 arasında ve başlangıç lökosit sayısı <50000/mm3 olan pre-B ALL vakalarının 2/3'sini kapsayan hastaların dört yıllık olaysız sağ kalımı %80'dir. Kalan yüksek riskli hastaların dört yıllık olaysız sağ kalım oranı %65'tir.

1. Yaş: Bir yaşın altında, 10 yaştan büyük çocuklar >1 yaş ve <10 yaş çocuklardan daha kötü prognoza sahiptir, bir yaş altı çocuklar en kötü prognozludur.[4]

2. Lökosit sayısı: Lökosit sayısı yüksek olan çocuklar kötü prognozludur.[4]

3. İmmünfenotip: Erken pre-B hücreli ALL en iyi prognozludur. Olgun T hücreli ALL tanı anında büyük yaş ve yüksek lökosit sayısı ile ilişkisine bağlı olarak daha kötü prognozludur. Olgun B hücreli ALL önceleri, erken nüks ve SSS tutulumu ile kötü prognozluydu. Ancak, yeni agresif tedaviler prognozu iyileştirmektedir.[4]

4. DNA indeksi: Elli kromozomdan fazla, DNA indeksi >1.16 hiperploid ALL, artmış apoptoz ve kemoterapötik ajanlara artmış duyarlılığa bağlı iyi prognoz ile ilişkilendirilmiştir.[4]

5. Sitogenetik: Sayısal kromozom anomalileri tanı ve prognostik açıdan önemlidir. B prekürsör ALL'de kromozom sayısı prognozda önemlidir. Hiperdiploidi (50-60 kromozom) (%25-30), iyi prognozla ilişkilidir. Özellikle, kromozom 4, 10 ve 17'nin trizomilerinin kombinasyonları çok düşük tedavi başarısızlığı ve iyi prognozla ilişkilendirilmiştir. Yüksek hiperdiploidi (59-84 kromozom) ve hipodiploidi (<45 kromozom) kötü prognoz gösterir. BCR/ABL translokasyonu [t(9;22)] (Philadelphia kromozomu), MLL/AF4 yeniden düzenlenmesi [t(4;11)], MYC/IGH translokasyonu

[t(8;14)]; FAB L3 morfolojiyle matür B-hücre ALL ile ilişkilidir. Bu translokasyonlardan herhangi biri saptanırsa daha agresif tedavi rejimleri önerilir ve kötü prognoz ile ilişkilendirilir. Translokasyon (9;22) saptanan hastalara ek tirozin kinaz inhibitör tedavi, MLL yeniden düzenlenmesi olan hastalar anlamlı daha kötü tedavi seyri gösterir, bu nedenle daha yoğun kemoterapi ve/veya hematopoetik kök hücre transplantasyonu ile tedavi uygulanır. ETV6/RUNX1 (TEL/AML1) [t(12;21)] translokasyonu B-prekürsör ALL'li olguların %20-25'inde görülür ve iyi prognozla ilişkilendirilir. Translokasyon (10;14) saptanan T hücreli ALL olguları daha iyi prognoz ile ilişkilendirilir.[4]

6. SSS hastalığı: Tanı anında bu hastalığının varlığı SSS ışınlaması ve ek intratekaller ile tedavinin güçlendirilmesine rağmen, kötü prognostik öneme sahiptir.[4]

7. İndüksiyon tedavisine erken yanıt: İndüksiyon tedavisinin sonunda remisyonda olmayan hastalar çok kötü prognozludur.[4]

2.1.7. Tedavi

Kısa süreli yoğun kemoterapi ile tedavi edilen olgun B hücreli akut lenfoblastik lösemi hastaları haricinde akut lenfoblastik löseminin tedavisi tipik olarak remisyon indüksiyonu fazı, konsolidasyon fazı ve rezidüel hastalığı yok etmek için idame tedavisinden oluşur. Ayrıca tedavi SSS'de sekestre olmuş lösemik hücrelere bağlı gelişebilecek nüksü önlemek için klinik seyrin erken aşamalarında SSS'ye yönlendirilmiştir. Hastalar risk gruplarına uygun kemoterapi protokolleri ile tedavi edilirler.

2.1.7.1. Remisyon İndüksiyonu Tedavisi

Bu tedavide amaç, lösemik hücrelerin ortadan kaldırılmasıdır. Tanı konulur konulmaz başlanılır. Ortalama 4-5 hafta sürer ve arkasından remisyon değerlendirmesi için kemik iliği alınır. Kemik iliğinde blast sayısı <%5 elde edilmesi amaçlanır. Ayrıca tam remisyon için kan tablosu normal sınırlara ulaşmalıdır (nötrofiller >500mm3, trombositler >75.000/mm3 ve Hb12g/dL). Tedavinin bu döneminde, danorubisin, doksorubisin ve L-asparaginaz gibi sitotoksik ajanlar ile vinkristin, prednizon kullanılarak lösemi hücreleri elimine edilir. Bütün ALL'li vakalarda, ilk remisyon oranı %90'dan fazladır. Son zamanlarda, bu dört ilaca sitozin arabinozid, metotreksat, siklofosfamid ve etoposid'i tedavinin 2. bölümünde (faz 2) ekleyen protokoller vardır.

Tüm bu ilaçların kullanılmasına rağmen % 2 olguda remisyon sağlanamayabilir. Yine bu dönem hastaların tedavi komplikasyonları ve enfeksiyonlardan dolayı en sık kaybedildiği dönemdir.[10,15]

2.1.7.2. SSS Tedavisi

ALL' den iyileşen hastalarda, nükslerin SSS'den kaynaklı olduğunun görülmesi üzerine, verilen kemoterapilerin BOS'a geçmediği fikri ortaya atılmış ve yapılan çalışmalar bunu desteklemiştir. Bu verilerin ışığında, SSS'ne yönelik tedavi ALL tedavisinin önemli bir kısmını oluşturmuştur. Tanı sırasında başlayan intratekal tedavilere, BOS tutulumu saptandığında daha yoğunlaşılarak devam edilmektedir. Farmakolojik tedavi yanında hem SSS tutulumu olanlar, hem de profilaksi amacı ile ALL'li çocuk hastaların büyük bir çoğunluğuna geçmişte oldukça yüksek dozlarda (1800-2400cGy) radyoterapi uygulandı. Ancak kranio-spinal radyoterapinin geç yan etkilerinin (hipotalamo-hipofizer aks bozuklukları, kemik gelişim bozuklukları, büyüme hız değişiklikleri, beyin kognitif özelliklerinde değişiklikler) saptanması tedavi protokollerinin tekrar gözden geçirilmesini gerektirdi. Beklenen SSS nükslerinin %2-10 olduğunun bilinmesi, ortalama %90 kişinin gereksiz radyoterapi mi alıyor sorusunu gündeme gelmesi sonucunda son zamanlarda, düşük risk grubunda radyoterapi tedavi protokolünden çıkarıldı. Radyoterapi dozu, profilaksi olarak 1200, SSS tutulumu olanlarda ise 1800cGy' ye çekildi. İntratekal tedavide metotreksat yanında gerektiğinde sitozin arabinozid ve kortikosteroidlerden yaralanılmaya başlanıldı. SSS nüksü saptanan hastalarda dahi radyoterapi olmadan tedavi yapılması yollarına baş vuran çalışmalar bile gündeme gelmeye başladı.[15]

2.1.7.3. Konsolidasyon (Güçlendirme) Tedavisi

Saptanabilen blastların temizlendiğini var sayarak ortalama 4 aylık bir tedaviden sonra normal hematopoez ve vücut fonksiyonunu kazanmasıyla birlikte konsolidasyon tedavisi genellikle ilaç dirençli rezidüel lösemi hücrelerini elimine etmek ve böylece nüks riskini azaltmak için kullanılır. Amerikan ve Alman protokollerinde, konsolidasyon tedavisinin protokol içindeki yerinde farklılık saptanmaktadır. Bazı protokoller,

güçlendirmeyi hemen başlangıç sonrasında SSS tedavisinden önce uygulamakta veya 2 kez hem başlangıçtan hemen sonra hem de SSS tedavisinden sonra vermektedir. Çoğunlukla, tedavide başlangıç tedavisinde kullanılan ilaçların benzeri (prednizolon, deksametazon, doksorubisin, daunorubisin, 6-merkaptopürin, 6-tioguanin vb) kullanılır. Dikkat edilmesi gereken ortalama 6 aylık bir tedavi sonrasında hastanın febril nötropeniden kaybedilmemesidir.[4,15]

2.1.7.4. İdame Tedavi

Akut lenfoblastik lösemili hastaların anlaşılması zor olduğundan dolayı nüksü önlemek veya önüne geçmek için idame tedavisine gereksinim duyulur. Altı aylık yoğun bir ilaç tedavisi ve düşük risk grupları haricinde kafatası ışınlamadan 15-30 gün sonra, iyi klinik ve hematolojik bulgular varlığında yaklaşık 1,5-2 yıl sürecek olan bir tedavi dönemidir. Tedavinin amacı, remisyonun devamlılığının sağlanmasıdır. Günlük merkaptopürin ve her hafta metotreksat, idame rejimlerinin bel kemiğini oluşturur. Pek çok araştırıcı, idame fazı sırasında yeterli doz yoğunluğunu sağlamak için ilaç dozlarının lökosit sayısı $3x10^9$/L altında ve nötrofil sayılarının 0.5 ve $1.5x10^9$/L arasında kalacak şekilde her gün merkaptopürin 50mg/m^2 ve haftada bir gün metotreksat 20mg/m^2 ağızdan uygulanması önerilir. Kemoterapi alımı sırasında hastalarda karaciğer fonksiyonlarında bozulma izlenebilir. Ancak, bilürubin düzeyi 5g/dL üzerine çıkmadığı takdirde tedavi kesilmesi önerilmemektedir. Bazı Amerikan protokollerinde 2 ilaç yerine güçlendirilmiş idame tedavisi kullanır. Vinkristin, prednizolon veya etoposid, sitozin arabinozid tedaviye ilave edilir. Erkek ve düşük risk grubu olup radyoterapi almayan grup haricinde idame tedavisinin 3 yıla uzatılması ise tedavi başarısını değiştirmemiştir.[4,15]

2.2. EPİGENETİK

Epigenetik; genotipik değişikliklerden kaynaklanmayan gen ekspresyonundaki farklılıkları inceleyen bilim dalıdır. Primer nükleotid dizisinde gerçekleşen değişiklikler yerine gen ifadesini değiştiren değişikliklere aracılık eden mekanizmaları ifade eder. Bu olayın, moleküler temeli karmaşıktır ve belli genlerin aktivasyonunun ne zaman ve nasıl

olacağını belirler. Bu süreç içerisinde erişkinlerde hücre yenilenmesi, genomik damgalama ve X kromozom inaktivasyonu gibi olaylar gerçekleşmektedir. Bu sürecin bozulması kanser, otoimmun ve nörolojik hastalıklar gibi sağlık problemlerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır.[16,17,18] Epigenetik mekanizmalar üç ana başlıkta toplanmaktadır[17]:

1. DNA metilasyonu,
2. Histon modifikasyonları,
3. RNA ile indüklenen sessizleşme (RNA-induced silencing).

Bu mekanizmaların birlikte çalışması sonucu, gen ifadesinde kalıtsal değişiklikler meydana gelmektedir. Mekanizmaların herhangi birindeki hata, genlerin ifadesinin aşırı artmasına veya baskılanmasına neden olarak epigenetik hastalıklara yol açmaktadır.[17]

2.2.1. DNA Metilasyonu

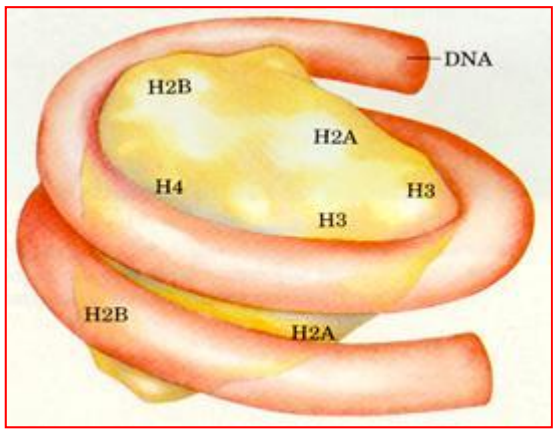
DNA metilasyonu, en çok çalışılan epigenetik mekanizmadır. Gen ifadesinin baskılanmasını sağlamakta embriyonik gelişim, transkripsiyon, kromatin yapısı, X-kromozom inaktivasyonu, genomik damgalanmanın düzenlenmesi ve kromatin kararlılığının korunmasında fonksiyon göstermektedir. DNA metilasyonu, DNA metil transferaz (DNMT) enzimleri tarafından katalizlenir. Genellikle, DNA CpG bölgelerindeki sitozinden metillenir. Stozin birimleri, 5-karbon pozisyonuna metil gruplarının takılmasıyla modifiye edilir. Genomda tekrar dizilerinin ve transpozonların bulunduğu heterokromatinin CpG bölgelerinde metilasyon oranı yüksek görülmekte bu sayede, transkripsiyon baskılanmakta ve transpozonların genom içerisindeki hareketi engellenerek kromozomun kararlı halde kalması sağlanmaktadır. CpG adacıkları, genlerin promotor bölgelerinde bulunan, yaklaşık 500 baz çifti uzunluğunda, %55'ten fazla CG içeren ve metilasyon oranı düşük olan korunmuş dizilerdir. DNA metilasyonunun, transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını engelleyerek veya metilli DNA'ya bağlanan protein kompleksleri sayesinde kromatin yapısını değiştirerek genlerin ifadesini baskıladığı düşünülmektedir. Metillenme, genlerin transkripsiyonunu, hem bazı transkripsiyonel aktivatörlerin bağlanmasını engelleyerek hem de metillenmiş DNA'ya özgül olarak bağlanan represörlerin katılımını sağlayarak engeller.[17,18]

DNA metillenmesi temel olarak, gelişim sürecinde gen inaktivasyonunun sürekliliğine ve korunmasına katkı sağlar. DNA metillenmesinin önemli bir düzenleyici rolü, memeli embriyosunun gelişiminde yer alan bazı genlerin ekspresyonunu denetleyen ve genomik damgalanma olarak bilinen mekanizma şeklinde tanımlanmıştır. Genellikle, diploid kökenli hücrelerde, bir genin hem anne hem de baba kökenli allelleri eksprese olur. Bazı durumlarda sadece, baba kökenli alleli eksprese olur ve anne kökenli allel inaktiftir. Damgalanmış bazı genlerde anne kökenli allel eksprese olurken baba kökenli allel inaktiftir. DNA metillenmesi, damgalanmış genlerin anne kökenli ve baba kökenli allelleri arasındaki ayırımında anahtar rolü oynar. Yalnız anne kökenli kopyası aktif olan H19 geninde, erkeğin cinsiyet hücrelerinin gelişimi sırasında spesifik olarak metillenirken dişininki metillenmez. Döllenme ile genin metilenmiş olduğu baba kökenli allele sahip bir embriyo ürünü verir. Metillenme paternindeki bu farklılık, DNA replikasyonunu takiben metilenmiş atasal ipliğe hidrojen bağları ile bağlanmış yeni sentezlenen iplikteki CpG dizilerini özgül olarak metilleyen bir enzim sayesinde korunur. Baba kökenli H19 alleli bu sayede metilenmiş olarak kalır ve embriyo hücrelerinde ve somatik dokularda transkripsiyonel olarak inaktiftir. Baba kökenli H19 alleli cinsiyet hücre hattında demetile olur ve gelecek kuşağa aktarımda yeni metillenme paterninin oluşturulmasına olanak verir.[18]

2.2.2. Histon Modifikasyonları

Ökaryot hücre DNA'sı, nükleus içerisinde histonlarla sıkıca bağlıdır. Kromatinin temel yapısal birimi nükleozomdur. Nükleozom H2A, H2B H3 ve H4 histonlarının her birinden ikişer adet içeren molekülün etrafına sarılmış 146 baz çiftlik DNA ile, nükleozom çekirdek partikülüne eklenen, DNA'ya bağlı bir histon H1 molekülünden oluşur (Şekil 1). Kromatin daha sonra büyük DNA ilmikleri oluşturmak üzere üst düzey katlanmalar ile daha ileri düzeyde yoğunlaşır. Aktif olarak paketlenen genler, nükleozomda paketlenmiş olarak histonlara bağlı kaldığından, transkripsiyon faktörleri ve RNA polimeraz, kromatin ile etkileşimde bazı problemlerle karşılaşır. DNA'nın, nükleozom etrafına sıkıca dolanmış olması hem transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya

bağlanabilmesini hem de RNA polimerazın kromatin kaplı kalıptan transkripsiyonunu engeller.[18]



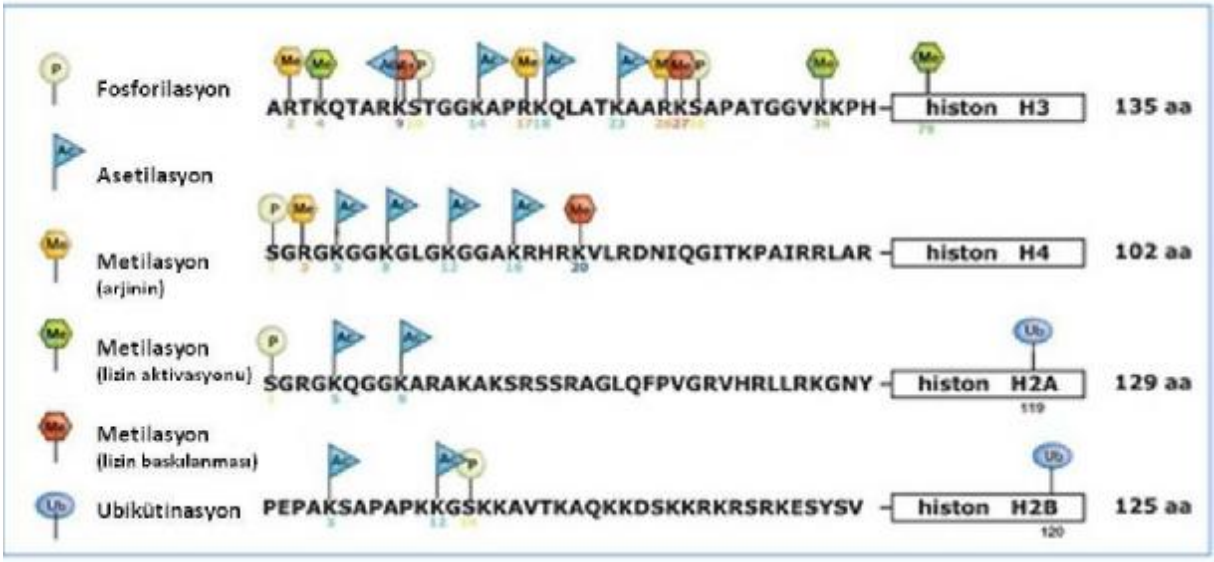
Şekil 1: Nükleozomun yapısı[20]

Histonların modifikasyonu, nükleozomun yeniden düzenlenmesi ve HMGN (high mobility group nucleosome-binding) proteini olarak adlandırılan, iki histon olmayan kromozomal proteinin aktif olarak transkribe olan genlerin nükleozomlarına bağlanması gibi birkaç modifikasyon ve transkripsiyonel aktif kromatinin özelliklerindendir. HMGN proteinlerin nükleozom üzerinde bulunan bağlanma yerleri, histon H1'in bağlanma yeri ile ortaktır. Bu HMGN proteinlerinin, gevşek paketlenmesi kromatin yapısının devamı için, Histon H1'in nükleozom ile etkileşimini bozarak transkripsiyonu uyardıklarını gösterir.[18]

Üzerinde en çok çalışılan histon modifikasyonu asetilasyondur. Histon asetillenmesi, transkripsiyonel olarak aktif kromatinle ilgilidir. Çekirdekde histonlar (H2A, H2B, H3, H4), iki işlevsel bölge içerirler. Biri histon-kıvrım bölgesi olup diğer histonlarla etkileşimde ve DNA'nın nükleozom çekirdek partikülünün çevresine dolanmasında görevlidir. Diğeri, amino-ucu kuyruk bölgesi olup nükleozomdan dışarı uzanır. Amino-ucu kuyruk bölgeleri, lizince zengindir ve özgün lizinlerin asetillenmesi ile değiştirilebilir[19]. Histonların asetilasyonu, histon asetil transferaz ve histon deasetilaz enzim aileleri tarafından düzenlenmektedir. Negatif yüklü asetil grubunun histon proteininin amino-ucuna takılmasıyla pozitif yüklü lizin aminoasiti yükünü kısmen

kaybeder. Kromatinde gevşeme meydana gelir ve transkripsiyon faktörlerinin genlerin promotor bölgelerine bağlanmasını kolaylaştırır. Böylece, transkripsiyon gerçekleşir. Asetilasyon, geri dönüşümlü olarak gerçekleşen bir olaydır. Lizin aminoasitinden asetil grubunun çıkartılmasıyla kromatin tekrar kondense olmakta ve transkripsiyon baskılanmaktadır. Kromatinin belli bir bölgesinde histonların asetile olması, o bölgenin transkripsiyonel açıdan aktif olduğunu gösterirken, deasetile olması transkripsiyonun baskılandığını göstermektedir.[17]

Asetilasyon, histon kuyruklarındaki spesifik aminoasitlerde meydana gelir ve transkripsiyonel aktivitenin değişmesiyle ilişkilidir. Spesifik histon modifikasyonlarının kromatin yapısını etkilemesine ilaveten diğer transkripsiyonel regülatör proteinlere bağlanma bölgesi oluşturarak gen ekspresyonunu etkilediği öne sürülmüştür. Örneğin; transkripsiyonel olarak aktif kromatin histon H3'ün lizin-4'ünün metillenmesi, serin-10'un fosfatlanması ve lizin-9 ile lizin-14'ün asetillenmesini kapsayan bazı özgül modifikasyonlar ile ilişkilidir. Buna karşın lizin-9'un metillenmesi baskılanma ile ilişkilidir.[18] Histonlar sadece, asetillenerek değil serin birimlerini fosfatlanması, lizin ve arjinin metillenmesi ve lizinlere ubükitin eklenmesiyle veya küçük ubikütin benzeri modifiye edici molekül eklenmesi sumolasyon ile de modifiye olurlar (Şekil 2). Fosforilasyon, histon deasetilazlara geri dönüşümlü olarak fosfat gruplarının bağlanmasıdır. Fosfatlar histon deasetilazlara serin, treonin ve tirozin rezidülerinden bağlanır. Fosforilasyon, protein kinazlar ve protein fosfatazlar tarafından gerçekleştirilen bir reaksiyondur.[16] Ubikütin, ileri derecede korunmuş 76 aminoasitlik bir polipeptiddir. Proteinler lizinlerin yan zincirlerindeki amino gruplarına ubikütin takılması ile yıkım için işaretlenirler. Daha sonra, ek ubikütinler eklenerek çoklu ubikütin zincirleri oluşturulur. Böylece, multi ubikütin proteinleri protezom adı verilen proteaz kompleksi tarafından tanınır ve yıkılırlar.[18] Sumolasyon, SUMO (small ubuquitin-like modifier) 1, 2 ve 3 proteinlerinin ubukitin ile birleşmesi olayıdır. Ubikütine benzer bir protein olan SUMO proteinleri lizin rezidülerinden proteinlere bağlanır ve bu olay neticesinde protein degradasyonu engellenir.[16]



Şekil 2: Histon molekülleri üzerinde metillenen, asetillenen, ubikütinlenen bölgelerin gösterimi[20].

2.2.3. RNA İle İndüklenen Sessizleşme

RNA'ların, histon modifikasyonlarının ve DNA metilasyonunun başlaması için itici güç oluşturduğu bu sayede, heterokromatin bölgenin oluşumuna katkıda bulunarak kalıtsal olarak sessizleştirilmesini sağladığı düşünülmektedir. Son yıllarda, kodlamayan RNA'ların epigenetik süreçte bazı kromozom bölgelerinde kromatin yoğunlaşmasına ve heterokromatin oluşumuna öncülük eden bir histon modifikasyonuna neden olarak, transkripsiyonun baskılanmasında önemli rol oynadığı görülmektedir. RNA interferans olarak bilinen, posttranskripsiyonel ve posttranslasyonel sessizleştirilmelerde görevli olan miRNA (mikro RNA), siRNA (small-interfering RNA) ve X kromozom inaktivasyonundan sorumlu olan Xist RNA'ların memelilerdeki gen ekspresyonunun düzenlenmesinde oynadıkları role örnek verilebilir.[17,18]

2.3. VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF)

Trombosit kaynaklı büyüme faktörü süperailesinin üyesi olan vasküler endotelyal büyüme faktörü ailesi endotel hücreleri için özgül etkilere sahip olan multifonksiyonel bir büyüme faktörü ailesidir. Kobay derisinde bir vasküler sızıntı

başlattığı için vasküler permeabilite faktörü olarak isimlendirilmiştir. 1980'lerin sonunda, bu aileden ilk özel anjiogenik büyüme faktörü ayrıştırıldı ve buna vaskülotropin veya vasküler endotelial büyüme faktörü adı verildi. Son yıllarda, VEGF üzerine yapılan çalışmalar bu ailenin trombosit kaynaklı büyüme faktörleri (PDGF) süperailesinin önemli bir üyesi olduğunu ortaya koymuştur.[21] VEGF geni, 6. kromozomun kısa kolunda (6p12) yer alır. Moleküler ağırlığı 45 kDA olup bazik yapıda, heparin bağlayan ve homodimerik bir glikoproteindir.[22]

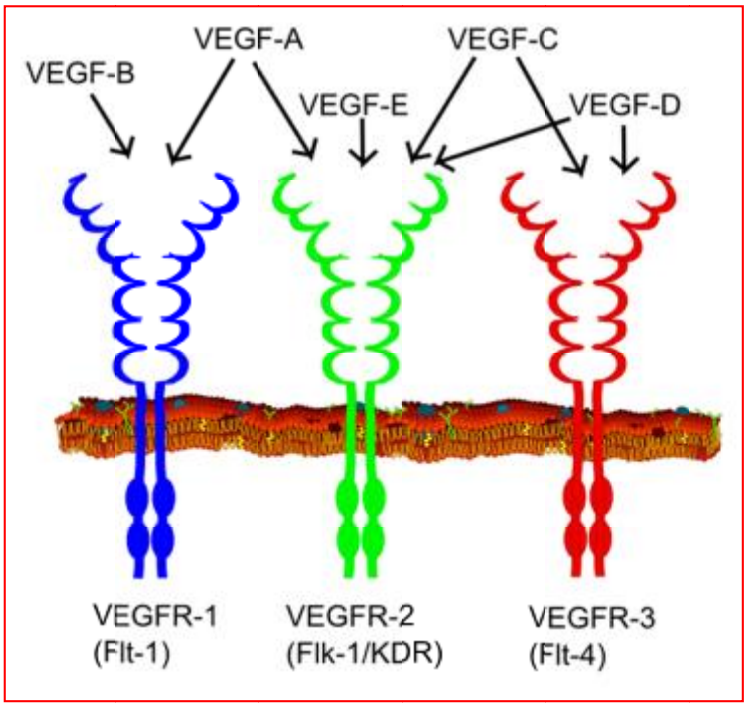
VEGF, endotel hücresinin proliferasyonuna, hücre göçüne ve farklılaşmasına sebep olur.[21] Programlanmış hücre ölümünü inhibe eder ve invitro şartlarda kan damarlarının geçirgenliğini arttırır ve vaskülojenezisin düzenlenmesinde önemli rol oynar. VEGF arter, ven ve lenfatik damarlardaki mikro- ve makro-vasküler endotel hücreleri için oldukça özgül, etkin bir mitojen ve anjiyojenik bir büyüme faktörüdür. VEGF hipoksi, bazı sitokinler ya da aktive onkogenlerin uyarısı ile artabilir.[22,23] Embriyogenez, yara iyileşmesi, tümör büyümesi, miyokardial iskemi, oküler neovasküler hastalıklar ve romatoid artrit gibi kronik inflamatuar hastalıkları da kapsayan fizyolojik ve fizyopatolojik olaylarda yer alır.[21] Megakaryositler, VEGF'nin önemli kaynağıdır. Trombositlerin α granüllerinde depo edilirler. Yapılan araştırmalar; endotel hücreleri lökosit, megakaryosit, ovaryum follikülleri, korpus luteum, akciğer alveoler hücreleri, renal glomerül visseral epitelyum hücreleri, kardiyak myositler, böbrek proksimal tübül hücreleri, adrenal korteksin tüm hücreleri, Leydig hücreleri, aktive makrofajlar, arteriyolleri çevreleyen fibroblastlar, bronşiyal ve koroid pleksus epitelyum hücreleri, hepatositler ve malign tümör hücrelerinde (karaciğer, mesane, böbrek, over, mide, kolon, beyin ve meme kanserleri) VEGF sentezlendiğini göstermektedir.[24]

Endotel hücreleri için önemli bir mitojen olan ve migrasyon etkisine sahip bu faktör, fizyolojik olarak ovulasyondan hemen önce ovaryum folliküllerinden salgılanarak yeni damarların oluşumunu arttırırken, ovulasyondan sonra bu salgılama görevini korpus luteum üstlenir. Erken implantasyon döneminde embriyo trofoblastlarınca salgılanır. Embriyolojik gelişimin ilk dönemlerinin sonuna doğru VEGF biraz azalırken, organogenez döneminde oldukça yükselir. Yine VEGF, yetişkinde

akciğer alveolar hücrelerinde, böbrek glomerüllerinde, proksimal tübüllerde ve düşük seviyede de olsa karaciğer hepatositleri ve beyinde gösterilmiştir. Ayrıca, adrenal korteksin tüm hücrelerinde ve testiste testosteron üreten leydig hücrelerinde, VEGF yapımına ait mRNA'ların sentezlendiği gösterilmiştir. VEGF'ün demonstrasyonu için yapılan immunositokimyasal çalışmalarda aktive makrofajlarda, arteriolleri çevreleyen fibroblastlarda, akciğer bronşiyol epitelinde, koroid pleksus epitelinde ve renal glomerül visseral epitelinde varlığı gösterilmiştir.[21] VEGF mRNA'sının transkripsiyonu; trombosit kaynaklı büyüme faktörü-BB (PDGF-BB), keratinosit büyüme faktörü (FGF-7), epidermal büyüme faktörü (EGF), tümör nekrosis faktör-α (TNF-α), transforming büyüme faktörü- β1 (TGF- β1) ve interlökin- β1 gibi çeşitli faktörler tarafından başlatılır. Böylece, bu maddelerin mitojenik olmadığı ve VEGF salgılanmasına yol açarak mitojeniteyi arttırdıkları gösterilmiştir.[21]

Ayrıca, protein büyüme faktörlerinin haricinde, forbol esterleri ve prostaglandin E_2 (PGE_2) gibi bazı küçük mediatörlerin de VEGF ekspresyonunu düzenledikleri görülmüştür. Hipoksi de, VEGF ve reseptörlerinin yapımını uyararak anjiogenezi başlatan en etkili uyarıcılardan biri olabilir. Buna örnek olarak, büyüyen tümörlerin hipoksik merkezleri oluşturması ve bunu engellemek için tümör hücrelerinden VEGF ekspresyonu ve yeni damar yapımı gösterilebilir. Aynı zamanda, tıkanmış kalp damarlarına bağlı gelişen hipoksi sonrasında da VEGF ekspresyonu artmaktadır. Hipoksinin VEGF'i arttırma mekanizmasının sadece bir kısmı çözülebilmiştir. VEGF yapımı, hipoksi tarafından tetiklenirken, CO tarafından da baskılanmaktadır. Hipoksinin yanında, azalan pH ve sitokinler ile de VEGF ekspresyonu artmaktadır.[21]

VEGF gen ailesi içinde 7 VEGF üyesi tanımlanmıştır. Bunlar; VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-F, VEGF-E ve plasental büyüme faktörüdür (PIGF). Temel olarak anjiogenez, lenfanjiogenez ve damar geçirgenliğini düzenleyen bu faktörlerin tanımlanan VEGF reseptörlerine bağlanma özellikleri farklıdır. Vasküler endotel hücrelerinde, VEGF'nin yüksek afinite gösterdiği, VEGFR-1/ Flt-1, VEGFR-2/ Flk-KDR ve VEGFR-3/ Flt-4 olmak üzere 3 reseptör tanımlanmıştır[25] (Şekil 3).



Şekil 3: VEGF gen ailesi ve yüksek afinite gösterdikleri reseptörler[29].

VEGF-R'lerinin aktivasyonu; VEGF'nin reseptörü ile birleşmesini takiben reseptöre G proteinleri bağlanır ve fosfolipaz-C'yi aktifleştirirler. Aktiflenmiş fosfolipaz C'nin etkisi ile ikinci haberciler olan diaçilgliserol (DAG) ve inositol trifosfat (IP3) oluşur. DAG, protein kinaz C'yi aktive ederken; IP3 de hücre içi kalsiyum seviyesini arttırıp, kalsiyum-kalmodulin kompleksi oluşturarak kalmodulin kinazları aktive eder. Hücre içi sinyal iletim proteinleri, bu kinazlar aracılığıyla fosforile edilerek endotel hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve diferansiasyonunu sağlar. VEGF'nin reseptörlerine bağlanmasını, heparan-sülfat proteoglikanları düzenlemektedir. Yüksek heparin konsantrasyonunun VEGF bağlanmasını azalttığı ve düşük heparin konsantrasyonunun bağlanmayı arttırdığı bildirilmiştir.[26]

VEGF-A: VEGF-A geni, kromozom 6p21.3 bölgesinde yer almaktadır. Aynı zamanda, human-VEGF olarak bilinir. VEGF-A, bazı makalelerde sadece VEGF olarak adlandırılmaktadır. VEGF-A'nın şu ana kadar bilinen altı adet izoformu vardır. Bunlar; $VEGF_{121}$, $VEGF_{145}$, $VEGF_{165}$, $VEGF_{183}$, $VEGF_{189}$ ve $VEGF_{206}$ olarak isimlendirilmişlerdir. Bu isimlerdeki sayılar, içerdikleri aminoasit sayılarını göstermektedir. Bu izoformlardan

$VEGF_{121}$ hariç, hepsi heparine bağlanmaktadır. $VEGF_{121}$, $VEGF_{145}$ ve $VEGF_{165}$ salgılandığında kolayca diffüze olur ve erimiş formları sıvılarda saptanabilir. $VEGF_{189}$ ve $VEGF_{206}$ ise salgılandığı halde hücresel olarak kalır ve varlıkları testlerle kolayca saptanamaz. $VEGF_{206}$, VEGF'ün orijinal karakteristik formu olup, yaklaşık 34-46 kDa ağırlığında homodimerik bir glikoproteindir. $VEGF_{165}$, $VEGF_{121}$'in aksine hücre yüzeyindeki veya ekstrasellüler matriksteki proteoglikanlara ve heparine bağlanan formdur. $VEGF_{189}$, heparin ve heparan sülfat proteoglikanına bağlanmayı tetikler ve arttırır[22]. VEGF-A anjiojenezisle en güçlü ilişkisi olan ve üzerinde en çok çalışma yapılan faktördür, anti-VEGF tedavilerin çoğu bu faktör üzerinde yoğunlaşmaktadır. Genellikle, VEGF diye kısaca ifade edilen bu faktör aslında VEGF-A'dır. VEGFR1 ve VEGFR2 yoluyla etki eder ve hipoksi ile aktive olduğu gösterilen tek VEGF üyesidir.[25]

VEGF-B: Başlangıçta, VEGF-A ile %23'ü homolog olan bir sinyal peptitinin bölünmesinden sonra, 186 amino asitli bir protein olarak oluşur. Sonra, ekzon-6'da oluşan bir alternatif kesimleme ile tamamen farklı terminal COOH- grupları içeren 167 aminoasitli bir proteine dönüşür. VEGF-B, vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü-1 (VEGFR-1)'e bağlanarak monositlerin aktivasyonu ve farklılaşmalarında rol alır.[22] VEGF-B, VEGFR1'e bağlanarak etki eder, hücre dışı matriks parçalanması, hücre yapışma ve göçünde rol oynar. Kalp, iskelet kası ve pankreasta fazla miktarda bulunur ve endotel hücre fonksiyonunu düzenler.[25]

VEGF-C: VEGF-benzeri protein olarak da bilinir. VEGF-A ile %16'sı benzeyen 388 aminoasitten oluşmuştur. Lenfatik damarların oluşmasında (lenfanjiogenez) rol oynamaktadır. VEGFR-2 ve VEGFR- 3'e bağlanarak vasküler ve lenfatik endoteliyal hücrelerde mitojenik etki yapar. Bir deneyde, transjenik farenin derisinde VEGF-C'nin fazla salgılanmasının endotel hücre proliferasyonuna ve lenfatik damarlarda genişlemeye neden olduğu, bununla beraber vasküler doku oluşmadığı rapor edilmiştir. VEGF-C'nin, Kaposi sarkomunda önemli oranda rol aldığı görülmüştür ve lenfanjiojenezi düzenler. Ayrıca VEGF-C yara iyileşmesinde rol oynar. Plasental büyüme faktörü, VEGFR1'e bağlanır ve endotel hücrelerinde en çok bulunan VEGF üyesidir. VEGFA'ya bağlı endotel hücre çoğalmasını indüklerken kendi başına zayıf mitojenik etkilidir[21,25].

VEGF-D: 334 aminoasitten oluşan ve VEGF-A'ya %31 oranında aynı amino asitler içeren bir proteindir. C-terminal uçlarında zengin sistein domainleri içerir. Bu da, VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanarak VEGF-C ile benzer işlevler yapar.[21]

VEGF-E: VEGF-A ile aminoasit dizilimi %25 oranında aynı olan bir polipeptittir. Güçlü bir mitojen ve permeabilite arttırıcı faktördür. VEGFR-1'e bağlanmayı başaramaz ama VEGFR-2'ye seçici olarak bağlanarak etkisini gösterir.[21]

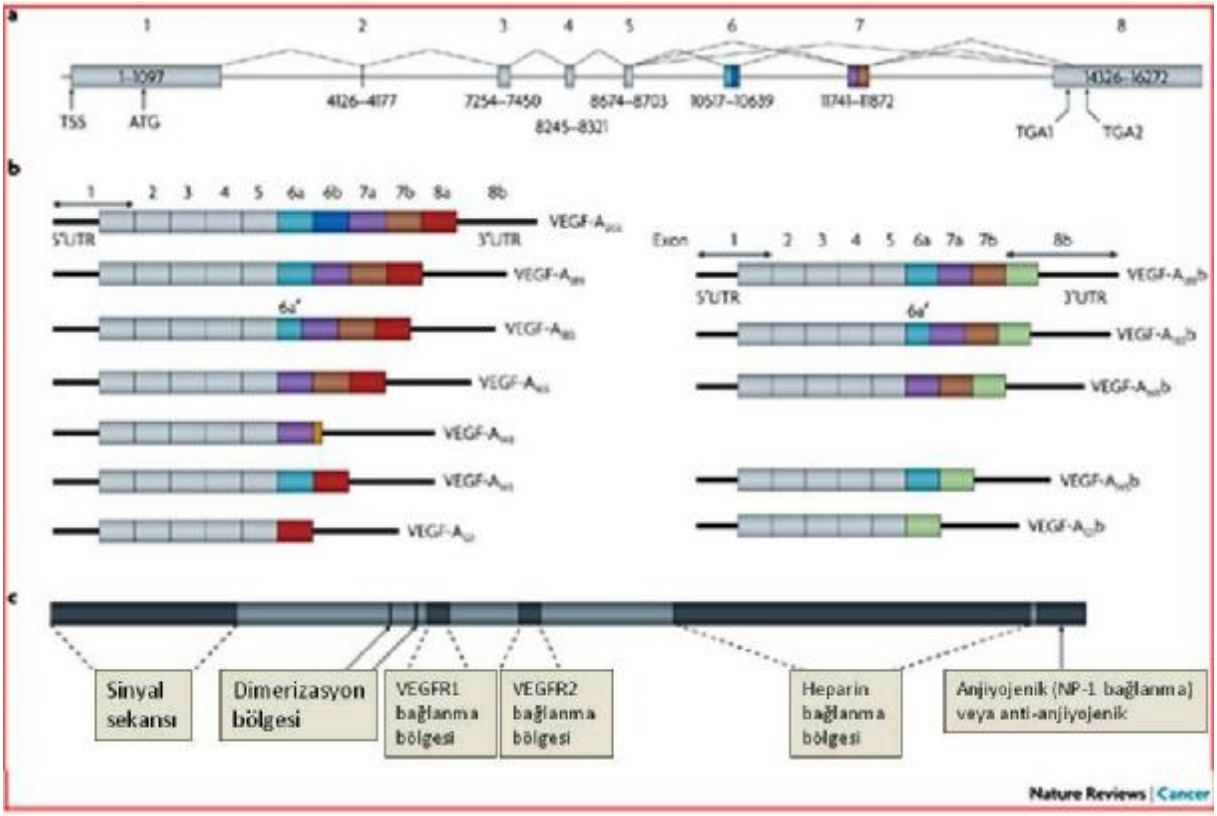
VEGF-F: VEGF ailesinin tanımlanan ilk üyesidir. Sinyal peptitlerinin bölünmesi sırasında önce 131 amino asite sahiptir. Daha sonra yeni aminoasitlerin eklenmesiyle VEGF-A ile %37 oranında benzeşen ve 152 aminoasit içeren son şekli oluşur ve VEGF-B gibi VEGFR-1'e bağlanarak etki gösterir.[21]

2.3.1. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü-A (VEGF-A)

VEGF-A'nın insanlarda tanımlanan 9 izoformu vardır. Bunlar; VEGF121, VEGF145, VEGF148, VEGF162, VEGF165, VEGF165b,VEGF183, VEGF189, VEGF206'dır. Bu izoformlar içinde VEGF165b, diğerlerinden farklı olarak endojen inhibitör izoformdur ve VEGFR2 üzerinden etkilidir. En çok bilinen major izoformlar VEGF121, VEGF165, VEGF189 ve VEGF206'dır[25] (Şekil 4).

VEGF-A izoformlarının içerdikleri aminoasit sayıları ve heparine bağlanma özellikleri farklıdır. İzoformlar, içerdikleri aminoasit sayıları ile numaralandırılır. VEGF165 ve daha büyük izoformlar reseptör bağlayıcı bölge ve heparin bağlayıcı bölge içerirken daha küçük diffüze olabilen izoformlar, heparine bağlanmazlar sadece, reseptör bağlayıcı bölge içerirler. Büyük izoformlar (ör; VEGF189, VEGF206), heparin bağlayıcı bölge ile hücre dışı matrikse bağlanırlar ve depo izoform olarak adlandırılırlar. VEGF165 ise ara bölgededir, hem diffüze olabilir, hem de kısmen hücre dışı matrikse bağlanabilir. Çalışmalar, en çok bulunan ve anjiojeneziste ana rolü oynayan izoformun VEGF165 olduğunu göstermektedir. En küçük izoform olan VEGF121, heparine bağlanmadığı için hücre yüzeyinde ve bazal membranlarda yer alan heparin ya da heparan sülfat proteoglikanlara bağlanamaz ve diffüze olabilir. Biyolojik aktivitesi, VEGF165'e göre daha azdır. Heparine bağlanan VEGF-A izoformları, plazmin gibi proteolitik enzimlerle hızla parçalanır. Bu nedenle, hücre dışı proteolizin, VEGF

biyoyararlanımını düzenlemede önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Plazmin etkisiyle VEGF121 dışındaki izoformlar daha küçük olan VEGF110'a dönüşürler. VEGF110, endotel hücre büyümesini uyarır, damar geçirgenliğini arttırır ve mitojenik aktivitesi VEGF165'den daha azdır. Farelerde 3 değişik izoform saptanmıştır: VEGF120, VEGF164 ve VEGF188. Bu izoformların, insandaki eşdeğerleri sırasıyla VEGF121, VEGF165 ve VEGF189'dur[25] (Şekil 4).



Şekil-4: a. İnsan VEGF-A geni yapısı. b. Alternatif kesimleme. c. VEGF-A protein yapısı.[27]

Pek çok çalışma ile VEGF-A'nın çeşitli fonksiyonları gösterilmiştir. Bunlar;

- Vaskülojenez, anjiojenez ve lenfanjiojenezi düzenler.
- Damar geçirgenliğinde artış ve retinal lökostaza neden olur.
- Endotel hücrelerinin büyüme ve farklılaşması için gereklidir. Ayrıca, monositler için kemotaktiktir.
- Endotel hücrelerinde apoptozisi engelleyerek hücre devamlılığını sağlar.

- Nöron koruyucu etkileri vardır. VEGF'in inaktive edildiği farelerde, nörodejeneratif hastalık gelişmesi ve hipoksi ile uyarılan VEGF'ün nöron koruyucu etkisinin olduğunu düşündürmektedir. Retina ganglion hücrelerinde ve aksotomi yapılan farelerde VEGF'in RGH ölümünü yavaşlatmaktadır.
- Pro-inflamatuar etkilidir. VEGF, lökositlere bağlanabilir. VEGF reseptörleri, inflamatuar hücrelerde ve trombositlerde gösterilmiştir.

VEGF'in, normal retinadaki kesin rolü tam olarak anlaşılamamıştır. Gözde aşırı VEGF engellenmesi, VEGF'in bilinmeyen fonksiyonlarını engelleyerek (ör; endotel hücre devamlılığı için fizyolojik düzey) yan etki oluşturup oluşturmadığı bilinmemektedir[25]. VEGF-A hem vaskülojenez, hem de anjiojenezde önemli rol oynar. Ancak, embriyoda ve erişkinde VEGFA'nın rolü değişkenlik gösterir. Örneğin; gelişmekte olan farelerde yeni oluşmakta olan damarlar, doğum sonrası 4. haftaya kadar VEGF-A'ya gereksinim duyarlar. Fakat daha sonra, damarların devamlılığı için VEGF-A'ya gereksinim yoktur. VEGF eksikliği, embriyojenez sırasında ölüme yol açarken, doğum sonrası VEGF-A engellenmesi ölümü arttırmaktadır. Farelerde, VEGF164 ve VEGF188 yokluğu anormal pulmoner vasküler gelişimi de içeren damar gelişim defektleri oluşturmaktadır.

Erişkin ratlarda, gelişimini tamamlamış damarlar üzerine VEGF-A'nın etkisi gösterilmiştir. Kalp, böbrek, akciğer, trakea ve beyin damar endoteline bağlanan VEGF-A'nın bu damarların devamlılığı üzerine etkilerinin olduğu düşünülmektedir. Sistemik olarak VEGF inhibisyonundan sonra farelerde trakede kapiller kayıp görülmüştür. Bu etki, selektif VEGF165 inhibisyonu yapılanlarda ortaya çıkmamıştır. VEGF-A'nın erişkinde göz damarlarının devamlılığı üzerine etkileri hakkındaki bilgiler son derece kısıtlıdır. VEGF-A, retina pigment epiteli (RPE) hücrelerinden salgılanarak, RPE ve koryokapillaris arasında parakrin sinyal oluşturur ve koriyokapillaris gelişimi için gereklidir. Normal erişkin maymun ve farelerde koroid, RPE, retina ve iris dokularında VEGF121 ve VEGF165 izoformları gösterilmiştir. Olgunlaşmamış damarlarda devamlılığı sağlama rolü oynarken, olgun damarlarda bu etki görülmez. Yeni oluşmakta olan damarlardaki VEGF bağımlılığı, gelişmiş damarlarda görülmez. Damarların hücre dışı matriks ve perisitlerle kaplanmasının VEGF bağımlılığını azalttığı gösterilmiştir.[25]

2.4. EKSTRASELÜLER MATRİKS BİYOLOJİSİ

Ekstraselüler matriks (ESM), hücreler arası boşlukta özel bir ortam oluşturan bağ dokusunun başlıca bileşenidir. Hücreleri bir arada tutma görevinin yanında organ fonksiyonlarının normal olarak gerçeklesmesinde rolü olan dinamik ve interaktif bir yapıdır[29]. Bunun yanı sıra, hücre büyümesi ve farklılaşmasını kontrol eden pek çok hormon içeren rezervuar görevi yapar. Bu yapı, hücrelerin özel fonksiyonları gerçekleştirmesi için kendilerini yönlendirecek hücre içi sinyalleşme yolları ile direk ya da indirek olarak etkileşmesini sağlar.[30] Hücre ve matriks etkileşmeleri, ESM bileşenlerinin hidrolizinden sorumlu olan proteolitik enzimler tarafından düzenlenir. Bu enzimler, ESM yapısının bileşimini ve bütünlüğünü düzenleyerek matriks molekülleri tarafından oluşturulan sinyallerin kontrolü, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve ölümünde de temel rol oynar.[31,32] Bu enzim sistemlerinin içinde matriks metalloproteinazlar (MMP) önemli bir grubu oluşturmaktadır. MMP'lar, ekstrasellüler matriks komponentlerini yıkıma uğratan çinko ve kalsiyum bağımlı nötral endopeptidazlardır.[33] Organizmada fizyolojik olayların sürdürülmesinde MMP aktivitesi ile onların spesifik endojen doku inhibitörleri (TIMP) arasında sürekli bir denge söz konusudur[34]. MMP'lar ve TIMP'ler kemiğin yeniden yapılanması, blastokist implantasyonu, ovulasyon, servikal dilatasyon, yara iyileşmesi, embriyo gelişimi, anjiogenez, inflamasyon, apoptozis ve immun cevap gelişimi gibi birçok biyolojik süreçte rol oynarlar. Ayrıca, kanserde hücre invazyonu, metastazında ve kan beyin bariyerinin yıkılmasında rolleri vardır. Kardiyovasküler hastalıklar, periodontit, artrit, nefrit, glomerülonefrit, kornea ülserasyonu, karaciger fibrozisi, amfizem, astım, fibrotik akciğer hastalığı ve ateroskleroz gibi hastalıklarda da önemli yer tutar.[35]

2.4.1. Matriks Metalloproteinazlar

Birçok farklı türlerde tanımlanan MMP'lar, katalitik aktivitelerinde çinko veya kalsiyum bağımlı çalışan endopeptidazlardır ve birbirleri ile ileri derecede sekans homolojisi gösterirler. ESM'in yapısal proteinlerini parçalayabilme yeteneklerinden dolayı "Matriksinler" olarak da adlandırılan MMP'ların bugüne kadar 64 farklı türü tanımlanmıştır. Bunlardan 23'ü insanlarda bulunur. Her bir tür farklı yapısal özelliklere

ve biyolojik işlevlerinde farklılıklara sahiptir. Her bir türün aktif substratları, aktive ettikleri proMMP'lar birbirinden farklılık göstermektedir. MMP'lar, ESM substratlarına ek olarak proteinaz inhibitörleri, hücre-hücre adezyon molekülleri, kan pıhtılaşma faktörleri, kemotaktik moleküller, latent büyüme faktörleri, büyüme faktörlerine bağlı proteinler ve hücre yüzey reseptörleri gibi çeşitli proteinler üzerinde etkilidirler[36,37,38] (Tablo 7).

Tablo 7: MMP'ların aracılık ettiği biyolojik aktiviteler[45]

Biyolojik Etki	Sorumlu MMP'lar	Kestiği substrat
Keratinosit göçü ve yeniden epitelizasyon	MMP-1	Tip I kollajen
Osteoklast aktivasyonu	MMP-13	Tip I kollajen
Nörit büyümesi	MMP-2	Kondroitinsülfat proteoglikan
Adiposit farklılaşması	MMP-7	Fibronektin
Hücre göçü	MMP-1,-2, -3	Fibronektin
Hücre göçü	MT1-MMP	CD44
Meme epiteli hücre apoptozu	MMP-3	Basal membran
Meme epitelyal alveol oluşumu	MMP-3	Basal membran
Epitel-mesenkimal dönüşüm (meme epitelyal hücreleri)	MMP-3	E-kaderin
İnflamatuar fenotipli mezenkimal hücre farklılaşması	MMP-2	Tespit edilmedi
Trombosit agregasyonu	MMP-1	Tespit edilmedi
Angiostatin benzeri fragment üretimi	MMP-3	Plazminojen
	MMP-7	Plazminojen
	MMP-9	Plazminojen
	MMP-12	Plazminojen
Endostatin benzeri fragment üretimi	MMPs	Tip XVIII kollajen
Geliştirilmiş kollojen afinitesi	MMP-2, -3, -7, -9, -13	BM-40 (SPARC/Osteonektin)
Böbrek tubüloneojenez	MT1-MMP	Tip I kollajen
bFGF salınımı	MMP-3, -13	Perlekan
Artan IGF1 biyoyararlanımı ve hücre çoğalması	MMP-1, -2, -3, -7, -19	IGFBP-3
	MMPs	IGFBP-5
	MMP-11	IGFBP-1
VEGF aktivasyonu	MMPs	CTGF
Epitelyal hücre göçü	MMP-2, MT1-MMP, MMP-19	Laminin 5γ2 zincir
	MT1-MMP	Lamin 5β3
Apoptosis (amnion epitelyal hücreleri)	Kollajenaz	Tip I kollajen
Pro-inflamatuar	MMP-1, -3, -9	Öncü IL-1β'den IL-1β işlenmesi
Tümör hücre direnci	MMP-9	ICAM-1
Anti-inflamatuar	MMP-1, -2, -9	IL-1β degredasyonu
Anti-inflamatuar	MMP-1, -2, -3, -13, -14	Monocyte kemoatraktant

		protein-3
TGF-β artan biyoyararlanım	MMP-2,-3,-7	Dekorinin
Bozulmuş hücre agregasyonu ve artan hücre invazyonu	MMP-3, MMP-7	E-kaderin
Artan hücre adezyonu ve yayılımı	MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP	Hücre yüzeyi doku transglutaminaz
Fas-reseptör aracılıklı apoptoz	MMP-7	Fas ligand
Pro-inflamatuar	MMP-7	Pro-TNFα
Osteoklast aktivasyonu	MMP-7	RANK ligand
Reduced IL-2 response	MMP-9	IL-2Rα
PAR1 aktivasyonu	MMP-1	Proteaz aktive reseptor 1
Vazokonstriktör üretimi	MMP-2	Büyük endotelin
Vazodilatörün vazokonstriktör dönüşümü	MMP-2	Adrenomedullin
Vazokonstriksiyon ve hücre büyümesi	MMP-7	Heparin-bağlayıcı EGF
Nörodejenerasyona yol açan nöronal apoptozis	MMP-2	Stroma hücre-türevli faktör 1α (SDF-1)
TGFβ biyoyararlanım	MMP-9	Öncü TGFβ
Timik neovaskülerizasyon	MMP-9	Kollajen IV
Hipertrofik kondrosit apoptozis ve osteoklast göçü	MMP-9	Galactin-3
Uterus epiteline embriyo tutulumu	MT1-MMP	MUC1, bir transmembran musin

MMP'lar ya hücre membranına bağlı bulunurlar ya da hücre dışına salınırlar. Hücre yüzeyinde bulunduğu durumlarda heparin sülfat glikozaminoglikanlarına bağlı olarak bulunurlar. Tüm MMPlerin N-terminallerinde bir predomainleri, aktivasyon esnasında uzaklaştırılan bir prodomainleri ve bir de katalitik domainleri vardır. Matrilizin (MMP-7) hariç, tüm MMP'lar hemopeksin/vitronektin benzeri domain ve bunu katalitik bölgeye bağlayan prolince zengin bir bağlantı domaini içerirler. Bu bağlantı domaini, MMP-7 ve MMP-26'da bulunmaz.[39,40,41] MMP'ların çoğu, inaktif proenzimler olarak salınır. Onyedi-yirmi dokuz aminoasitlik sinyal peptidi ve 77-87 aminoasitten oluşan propeptid domaininden meydana gelirler. Proenzimlerin sürekliliğini sağlayan katalitik çinko bağlayan sistein bölgesi içeren HEBXHXBGBXHS özel bir sekans vardır. Yaklaşık, 170 aminoasitten oluşan katalitik bölge ise metiyonin ve çinko-bağlayıcı bölge içeren özel bir bölgedir. Bu bölge MMP'ların stabilitesi, enzimatik aktivitesi ve üç boyutlu yapısı için gerekli olan kalsiyum ve çinko iyonları içermektedir.[36,38,39,42] Hemopeksin benzeri bölge, Hem (demirli porfirin proteini) grubu

bağlayan moleküllere benzerliği nedeniyle hemopeksin olarak adlandırılır. Katalitik bölgeye, 5-10 aminoasitlik prolince zengin bir bölge ile bağlanır. Bu bölgenin fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte substrat seçiciliğini sağladığı ileri sürülmektedir. Substrata bağlanma ve TIMP'ler ile etkileşime girmede fonksiyonel rolü vardır.[43] MMP-2 ve MMP-9 ise ek fibronektin-benzeri domain tekrarları aracılığı ile kollajen ve jelatine yüksek afinite ile bağlanmayı sağlayarak proteolitik aktiviteyi arttırır. Substrat spesifisitesiyle ilgili bölge hemopeksine benzeyen karboksil ucudur ve 210 kadar aminoasitten oluşur.[36,38,42,43] MMP ailesi ortak özellikleri, kollajenaz-1 (MMP-1) ile sekans homolojisi göstermeleri; propeptitteki sistein dönüşüm motifinin PRCGXPD MMP'ları proMMP zimojen formunda tutması ve katalitik domainde bulunan çinko bağlayıcı motif HEXGHXXGXXH olmasıdır.[38]

2.4.2. Matriks Metalloproteinazların Sınıflandırılması

MMP ailesinin üyeleri yapılarına ve substrat spesifisitelerine göre kollajenazlar, jelatinazlar, stromelizinler, matrilizinler, membran-tipi MMP'ler (MT-MMP'ler) ve diğerleri olmak üzere altı ana sınıfa ayrılırlar. İnsanlarda şu ana kadar belirlenmiş 23 MMP ailesi üyesi belirlenmiştir[36,38,44,45] (Tablo 7):

1. Kollajenazlar: Kollajenaz-1 (interstisyel kollajenaz /MMP-1/fibroblast kollojenaz), kollajenaz-2 (nötrofil kollajenaz /MMP-8) ve kollajenaz-3 (MMP-13) olmak üzere üç üye tanımlanmıştır. Nötral pH'da fibriler kollajenlerin doğal heliks yapısını tek bir peptid bağı üzerinden parçalarlar. Böylece kollajen molekülü 1/4 ve 1/3 uzunluğunda iki parçaya ayrılır. Bu parçalar, denatüre olarak kendiliğinden gelişigüzel sarmal yapı oluşturan jelatin peptidlerine dönüşürler.[36,38,44,45]

1.a. Kollajenaz-1 (MMP-1): İnaktif şekli, 55 kDa ağırlığında ve aktif şekli 43 kDa agırlıgındadır. Keratinositler, fibroblastlar, makrofajlar, kondrositler ve düz kas hücreleri tarafından sentezlenmektedir. Bu enzim, tercihen tip III kollajen üzerinden etkilidir.[36,38,44,45]

1.b. Kollajenaz-2 (MMP-8): İnaktif şekli 75 kDa olup, aktif şekli 58 kDa büyüklüğünde ve nötrofillerde üretilir. Diğer kollajenazlardan farklı olarak, intraselüler özgül

granüllerde depolanır ve inflamatuar durumlarda salgılanır. Tip I kollajen degredasyonunda daha aktiftirler.[36,38,44,45]

1.c. Kollajenaz-3 (MMP-13): Meme kanserinde, fetal ossifikasyonda, osteoartrit ve romatoid artrit gibi dejeneratif eklem hastalıklarında sentezlendiği bulunmuştur. Tip II kollajen, kıkırdak proteoglikanı olan agregan ve tenasin, fibronektin ve tip IV kollajen gibi bazal membran komponentleri üzerinden de etkilidir.[36,38,44,45]

2. Jelatinazlar: Tip IV kollajenazlar olarak da isimlendirilirler. Bu grupta, 72 kDa ağırlığında jelatinaz A (MMP-2) ve 92 kDa ağırlığında jelatinaz B (MMP-9) olmak üzere iki enzim bulunmaktadır. Bu enzimlerin birincil yapıları ve substrat özgüllükleri birbirine benzemektedirler. Fakat farklı genler tarafından kodlanır ve düzenlenmeleri farklılık gösterir. Katalitik bölgeleri, hemopeksin benzeri bölge ve katalitik bölge içinde üç kez tekrar eden fibronektin benzeri bölgeler içerirler. Hemopeksin benzeri bölge, TIMP'lar ile aktivitenin düzenlenmesinde ve projelatinaz A'nın membranla ilişkili olarak aktivasyonunda yer alır. Fibronektin benzeri bölge ise özellikle tip I jelatin, tip IV kollajen ve elastin parçalanmasında rol almaktadır. Temel olarak, denatüre kollajenleri (jelatinler) öğütürler. Katalitik domainlerin de tip II fibronektin domaininin 3 tekrarı bulunabilmekte ve jelatine, kollajenlere ve laminine bağlanabilmektedirler.[36,38,44,45]

3. Stromelizinler: Stromelizin-1 (MMP-3) ve stromelizin-2 (MMP-10) bu grupta yer alan yüksek proteolitik aktiviteye sahip proteoglikanazlardır. Agregan kor proteini, fibronektin, laminin, tenasin, kollajen tip IV, IX, X ve XI gibi ESM komponentlerini parçalarlar.[36,38,44,45]

4. Matrilizinler: Matrilizin (MMP-7), en düşük molekül ağırlıklı metalloproteinazdır. Molekülün inaktif şekli 28 kDa ve aktif şekli 19 kDa ağırlığındadır. Fibronektin, laminin, proteoglikanlar, elastin, gelatin, tip IV kollajen, agregan ve entaktin gibi oldukça geniş substrat özgüllüğü vardır. Matrilizinlerde, hemopeksin domaini bulunmamaktadır.[36,38,44,45]

5. Membran tipi MMP'lar (MT-MMP'lar): Tip-I transmembran proteinler MT1, MT2, MT3, MT4-MMP'ler (MMP-14, MMP-15, MMP-16 ve MMP-24) ve glikozilfosfatidilinositol (GPI)-gömülü proteinler MT5-MMP ve MT6-MMP (MMP-17 ve

MMP-25) bu rupta yer alır. MT1-MMP tip-I, tip-II ve tip-III kollajenleri ve diğer ESM bileşenlerini yıkar ve proMMP'leri MMP'ye aktive eder.[38]

6. Diğer MMP'lar: MMP-3'ten (stromelizin-1) sekans ve substrat spesifisitesi açısından farklıdırlar. Bunlar, MMP-11, MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-22, MMP-23 ve MMP-28'dir.[38]

2.4.3. Matriks Metalloproteinaz-2 (MMP-2)

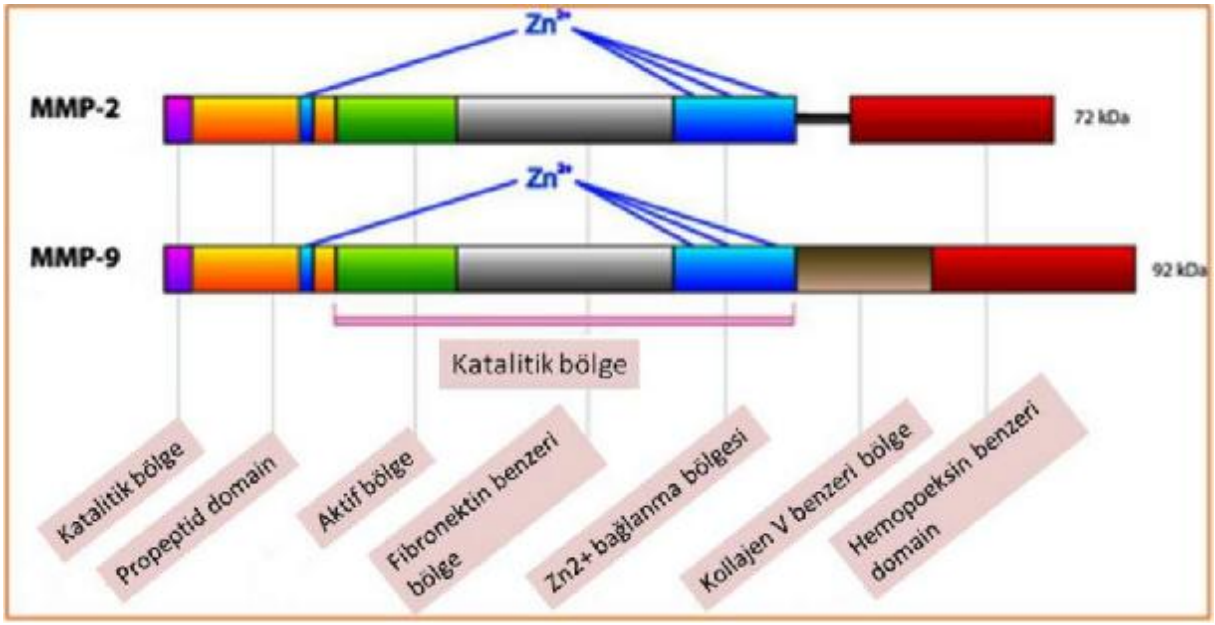
Bir jelatinaz olan MMP-2, çinko bağımlı bir endopeptidaz olup zimojen formda sentezlenir ve salgılanır. Tip IV kolajenaz veya jelatinaz A olarak da isimlendirilen MMP-2'nin aktif olmayan formu 72 kDa ve aktif formu 66 kDa ağırlığındadır. MMP-2 geni, 16. kromozomun q13-q21 bölgesi üzerine yerleşmiştir. İnsanda, MMP-2 geni 17 kb'dır ve 13 ekson içerir. MMP-2'ye ait bu gen bölgesinin yaklaşık 3.1 kb'ı transkribe olan bölgeyi, 1.9 kb'ı promotor bölgeyi, yaklaşık 1 kb'ı da intronik sekansı oluşturmaktadır.[46] MMP-2'nin birinci görevi ekstraselüler matriksin parçalanmasıdır. Fizyolojik olarak, MMP-2 diğer matriksinlerle bağlantılı çalışır. Ayrıca, MMP-2 Tip IV, V, VII, X kollajeni, jelatini, elastini, fibronektini ve laminini parçalar. Bununla birlikte, büyüme faktörlerini bağlayan proteinler ve reseptörler dâhil başka birçok molekülün de yıkımında rol aldığı bilinmektedir.[43] Bazal membranın en önemli yapısal bileşenidir. Keratinositler, fibroblastlar, endotel hücreleri, kondrositler, osteoblastlar ve monositler gibi birçok hücre ve dönüşmüş değişik hücrelerden salınırlar ve sıklıkla malignant tümörlerde miktarı yükselir.[39,46] Protein yapısında predomain, prodomain, bağlantı domaini, katalitik bölge ve hemopeksin benzeri bölgeyi içermektedir (Şekil 5). Predomain bölgesi sinyal sekansını, prodomain bölgesi serbest çinko bağlayan tiyol (SH) grubunu, katalitik bölge çinko bağlanma bölgesini ve kollajen fibronektin tip II bölgelerini içermektedir. Predomain bölgesi N-terminal sinyal sekansı içerir ve proteini endopazmik retikuluma yönlendirir. Prodomain herhangi bir tahrip veya ayrılma olana kadar enzimin sessiz kalmasını devam ettirir. Hemopeksin benzeri domain bölgesi doku metalloproteinaz inhibitörü (TIMP) ve bazı substratların bağlanma bölgelerini, membran aktivasyon bölgesini ve bazı proteolitik aktivitelerin olduğu bölgeleri içerir. Katalitik bölgede zengin sistein tekrarı olan üçlü kuyruk dizisi bulunmaktadır. Bu bölge, kollajen tip II

bağlanan fibronektin tekrarlarına benzemektedir. Bu benzerlik, domeine kollajen ve elastine bağlanma ve ayırma yeteneği sağlamaktadır.[47] MMP-2 ifadesi, transkripsyonal, post-transkripsyonal ve post-translasyonel olarak düzenlenmektedir.[39] MMP-2 ifadesi genellikle, akut lenfoblastik lösemi, akut myeloblastik lösemi, gastrointestinal adenokarsinom, kolorektal kanser, gastrik karsinoma, pankreatik karsinoma, meme kanseri, melonoma ve malignant glioma gibi birçok kanserde görülmektedir.[48]

2.4.4. Matriks Metalloproteinaz-9 (MMP-9)

Jelatinaz B ve tip IV kollajenaz olarak da isimlendirilen MMP-9 geni, 20. kromozomun q11.2-q13.1 bölgesinde bulunur ve 13 ekzon içerir. MMP-9 proteinin inaktif formu 92 kDa ve aktif formu 84 kDa ağırlığındadır.[35] MMP-9 geni, MMP-2'den farklı olarak, TATA kutusu, AP-1 elementi, SP-1 transkripsiyonal faktörü, TRE ve NF-kB bağlanma bölgelerine sahiptir. MMP-9'un ekspresyonu, transkripsiyonel seviyede kontrol edilir.[43,45,48] MMP-9, ilk olarak insan nötrofillerinden izole edilen nötral bir proteaz olarak tanımlanmıştır. MMP-9 bronş epitel hücreleri, alveolar tip II hücreleri, fibroblast, düz kas ve endotel hücreleri tarafından üretilir. Ayrıca tümör hücresi, nötrofil, eosinofil, monosit, lenfosit, makrofaj, doğal öldürücü hücreler, dentritik ve mast hücreleri de üretir. MMP-9 jelatini, tip IV bazal membran kollajeni, tip III, tip V kollajeni, elastini, fibronektini, proteoglikanı ve laminleri parçalar.[43] Çinko bağımlı endopeptidaz MMP-9 diğer proteolitik enzimler gibi önce inaktif proenzim veya zimojenler olarak sentezlenir ve salgılanır. Predomaininde N-terminal sinyal dizisini bulundurur. Propeptid kısmını taşıyan prodomaini serbest çinko bağlayan tiyol (SH) grubunu bulundurur ve enzimi ayrılma veya bir yıkım oluncaya kadar inaktif formda tutar. Katalitik bölge ise korunmuş çinko bağlanma bölgesini bulundurur. Bu bölgeye bağlı hemopeksin/vitronektin benzeri domaini TIMP bağlanma bölgesini, membran aktivasyonu ve bazı substrat bağlanma ve proteolitik aktivitelerinin olduğu bölgeyi içerir. MMP-9'un katalitik domaininde zengin sistein tekrarı olan üçlü kuyruk dizisi bulunmaktadır. Bu bölge, kollajen tip II bağlanan fibronektin tekrarlarına benzemektedir. Bu benzerlik, domeine kollajen, elastine bağlanma ve ayırma yeteneği sağlamaktadır.[47] MMP-9'un düzenlenmesi, TIMP-3 ile kontrol altında tutulmaktadır.

MMP-9 ifadesi interlökinler, interferonlar, epidermal büyüme faktörü, sinir gelişim faktörü, temel fibroblast gelişme faktörü, vasküler endoteliyal gelişme faktörü, trombosit gelişimi faktörü, tümör nekrozu faktörü, dönüştürücü büyüme faktörü, ekstraselüler matriks metalloproteinaz indükleyici EMMPRIN ve osteopontin gibi bazı sitokinler ve büyüme faktörleri ile düzenlenmektedir.[48] MMP-9, TIMP-1,-3,-4 ve α2 makroglobulin tarafından inhibe edilir.[49] MMP-9 normal hücrelere göre akut lenfoblastik lösemide, akut myeloblastik lösemide, kolorektal kanserde, mesane kanserinde, gastrointestinal adenokarsinomda, melonomada, akciğer tümöründe, meme adenokarsinomasında, hepatoselüler karsinomada ve gliomalarda daha fazla salgılandığı saptanmıştır.[48] MMP-9 'un in vitro ve deneysel metastazda tümör hücre invazyonunu ilerlettiği gösterilmiştir. MMP-9, invaziv kanserlerde tümör gelişimine ve metastaza ekstraselüler matriks, bazal membran ve bağ dokusunu zedeleyerek katkıda bulunur. MMP-2 ve MMP-9 etkili bir şekilde kollajen IV ve laminin-5'i parçalayabildiği ve bu iki molekül, ESM'in ana bileşenleri oldukları için metastatik kanser hücrelerinin bazal membrandan geçişini kolaylaştırdıkları bilinmektedir.[50]



Şekil 5: MMP2 ve MMP9'un şematik yapısı[59]

2.4.5. Metalloproteinazların Aktivasyonunun Düzenlenmesi

MMP'lar, pre-proenzimler olarak sentezlenir. Sinyal peptidi, translasyon sırasında çıkarılır ve proMMP'lar oluşturulur. Bu zimojenlerin aktifleştirilmesi, MMP aktivitesinin önemli bir düzenleyici adımıdır. MMP'ler 13 tanedir ve pro MMP olarak sentezlenir. Pro halindeki bu enzimlerin aktif hale gelebilmeleri için proteinaz duyarlı bölgesinden bir proteinaz tarafından kesilmesi gerekmektedir. Bu "stepwise" olarak adlandırılan bir mekanizmadır. On proMMP propeptidin sonunda furin-benzeri proproteini dönüştürücü tanıma sekansına [RX[K/R]R] sahiptirler. Bunlar, hücre içinde aktive edilir ve salgılanır veya hücre yüzeyine bağlı aktif enzimler olarak yer alırlar. Bu MMP'ların, aktivitelerini enzimin dokuya spesifik lokasyonu ve inaktivasyonu endojen inhibitörleri veya proteolizis ile düzenlenir. MT1 - MMP durumunda, hızla endositoz ve kısmen hücre yüzeyine geridönüşüm olur. Aterosklerotik plakta makrofajlar, fürin ve PC5 pro-MT1-MMP intraselüler olarak aktive eden proprotein dönüştürücüleridir.[45]

MMP'ların bir başka özelliği, muhtemelen çoğunun kolaylıkla molekülün yapısı nedeniyle cıva bileşikleri, SH reaktifleri ve kaotropik maddeler ile muamele edilerek aktive olmasıdır. Bu özellik, laboratuvarda proMMP'ları aktif hale getirmek için kullanılır. Diğer taraftan, hipokloröz asit ve peroksinitrit gibi oksidanlar propeptid içindeki sistein anahtarının sistein ile reaksiyonu sonucu proMMP'ları aktive eder ve bu aktivasyon işlemi inflamatuar koşullar altında yer alabilir. Ancak, uzun bir reaksiyon enzimi inaktive edebilir.[45] MMP'lerin tümü, preproenzim olarak sentezlenir ve bunların çoğu latent zimojen form olan pro-enzim formunda salgılanır. Latent zimojenlerin aktivasyonu hücre içinde, MT-MMP'ler aracılığıyla hücre yüzeyinde, diğer proteazların etkisiyle ekstrasellüler aralıkta ya "aktivasyon kaskadı" olarak adlandırılan şekilde ya da önceden aktive olmuş MMP'lerin diğerlerini aktive etmesiyle meydana gelebilir. MMP'lerin proteolitik aktiviteleri 3 basamakta düzenlenir. Bunlar transkripsiyon, pro-enzimin aktivasyonu ve enzim aktivitesinin engellenmesidir.[51]

1. Transkripsiyonel Düzenleme

MMP gen ekspresyonu tümör nekrozis faktör-α (TNF-α), interlökin-1 (IL-1) gibi inflamatuar sitokinlerle, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi birçok büyüme faktörü, hormonlar, onkogenler, tümör

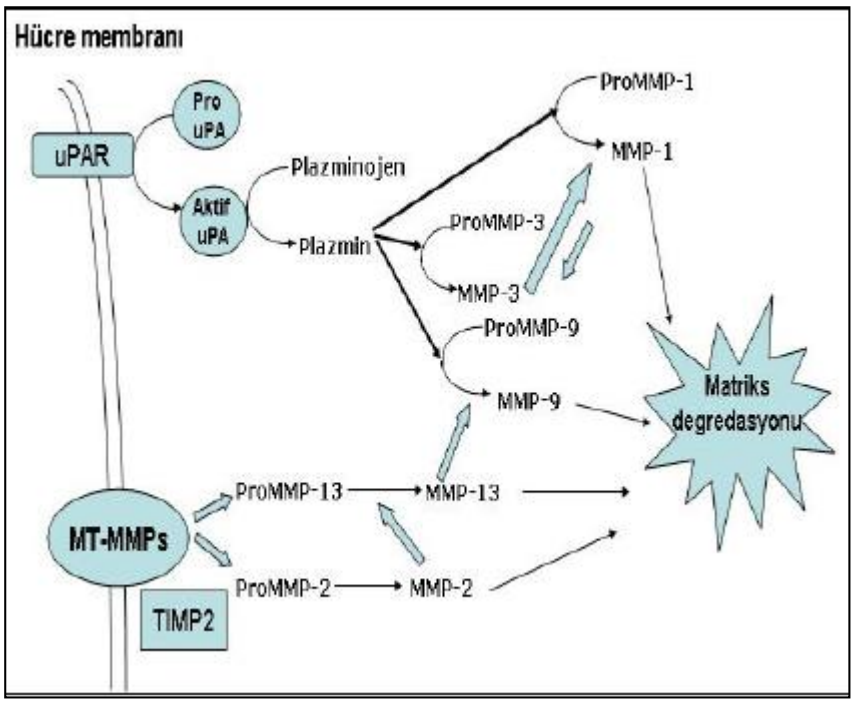
promotörleri ve kimyasal ajanlar ile stimüle edilir. Örneğin; ultraviole B' ye maruz kalmak, dermiste MMP-1, MMP-3 ve MMP-9'un gen ekspresyonunda artışa yol açmaktadır. Yine, hücre-matriks ve hücre-hücre etkileşimleri de integrinlerin mediatörlüğü ile MMP ekspresyonunu indükleyebilmektedir. Dönüştürücü büyüme faktörü-β (TGF-β), heparin, kortikosteroidler, retinoidler, prostaglandin E_2 (PGE_2) ve diğer eikozanoidler ise MMP gen transkripsiyonunu inhibe ederler.[51,52,53]

2. Proenzimin Aktivasyonu Aşamasında Düzenleme

MMP'lar sentez edildikten sonra inaktif proenzim (zimojen) olarak salıverilirler. Enzimin pro- bölgesindeki sisteinin sülfidril grubu ile aktif bölgedeki çinko arasındaki etkileşim latentliğin sürdürülmesinden sorumludur. Propeptid içeren inaktif MMP'ler, otokataliz, doku veya plazma proteinazları, fırsatçı bakterialproteinazlar, ürokinaz plazminojen aktivatör/plazmin sistemi ile veya diğer MMP'lar ile aktifleşirler. Çeşitli hücrelerde (endotel hücresi, monosit-makrofaj, düz kas hücresi), ifade edilen ürokinaz-tip plazminojen aktivatörünün (uPA) aktif formu plazminojeni plazmine dönüştürür. Oluşan plazminin, pro-MMP'ları aktive eder. uPA ifadesinin steroid hormonlar, hücresel onkogenler, sitokin ve büyüme faktörleri aracılığıyla düzenlenir. uPA'nın in vitro olarak inhibisyonunun matriks yıkımını anlamlı şekilde azalttığı ve uPA geni bulunmayan farelerde damar hasarı sonrası neointima hücre tabakası gelişiminin durduğu gösterilmiştir[51,52]. uPA aracılı aktivasyon kaskadında bir MMP'nin aktivasyonu, diğer bir MMP'nin aktivasyonuna yol açar, aktifleşen enzim bir diğer MMP'yi aktive edecek şekilde pozitif bir döngü oluşturur. Bu şekilde plazmin pro formdaki MMP-1, MMP-3 ve MMP-9'u aktif formuna dönüştürür. Daha sonra, MMP-3, pro-MMP-1'i MMP-1'e dönüştürür ve MMP-1 de pro-MMP-9'u aktif formuna dönüştürür.[51,53]

MT-MMP'ler de diğer MMP'lerin özellikle MMP-2'nin aktivatörüdürler. Oluşturdukları proteolitik aktivasyon plazminojen/plazmin aktivatör sistemine benzer şekilde hücre yüzeyinde gerçekleşir. Bununla birlikte, MMP-2 ve MMP-9 (jelatinazlar) aktive olmuş doku makrofajları tarafından üretilen (özellikle aterosklerotik plak içindeki köpük hücre makrofajları) serbest radikal (SR)'lerin etkisiyle ESM içinde kendiliğinden aktive olabilir. Böylece oksidatif stres, aktif olmayan MMP zimojenlerinin

aktivasyonunu tetikleyerek lokal metalloproteinaz aktivitesinin artmasına ve arteriyel duvarın yeniden modelenmesine katkıda bulunur. MMP 'ların büyük kısmı, ekstrasellüler olarak aktive edilmektedir. Fakat MMP-11, -14, -15, -16,- 17 ve -28 furin benzeri serin proteazlar ile intrasellüler olarak aktive edilebilmektedirler.[51,52,53]



Şekil 6: MMP'ler için hücre yüzeyi ile ilişkili aktivasyon kaskadı[51]

3. MMP Enzim Aktivitesinin İnhibisyonu

MMP aktivitesinin kontrolünde, spesifik doku inhibitörleri olan TIMP'ler (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases-TIMPS) anahtar rol oynarlar. Bundan başka α2-makroglobulin, heparin, tetrasiklinler ve sentetik inhibitörler de aktif MMP inhibitörleri arasında yer alırlar. TIMP'ler bağ dokusu metabolizmasının düzenlenmesinde temel olan proteinlerdir. Pek çok dokuda ve vücut sıvılarında bulunurlar. MMP'lere bağlanarak latent enzim formunun aktivasyonunu ve katalitik aktivitenin sürdürülmesini de inhibe ederler. Böylece, TIMP'ler MMP enzim aktivitesini ve MMP/TIMP dengesini sıkı kontrol altında tutarlar.[51] TIMP'ler değişik MMP türlerine göre özgüllük gösterirler. Örneğin; MMP-2 tercihen TIMP-2 ile MMP-9 ise TIMP-1 ile

inhibe edilir. Aktif MMP inhibitörlerinden biri olan α2-makroglobulin yüksek molekül ağırlıklı bir serum proteini olup aktif MMP-2'ye bağlandığında onun total molekül ağırlığını arttırarak hareket yeteneğini kısıtlar.[35,51] Tetrasiklin analogları, non-selektif MMP inhibitörleri olarak kabul edilir. MMP molekülünün çinko içeren aktif bölgesine bağlanarak enzimin aktivitesini kaybetmesine neden olurlar. Son yıllarda, peptid ve peptid olmayan yapıda sentetik MMP inhibitörleri üretilmiştir (Marimastat, Batimastat, Prinomastat, Doksisiklin, Metastat gibi). Bu inhibitörler, en çok kanser tedavisi, kardiyovasküler hastalıklar, artrit, peridontal hastalıklar, psöriyazis ve makula dejenerasyonu gibi farklı hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Sentetik MMP inhibitörlerinden BB-94 (batimastat), BB-2516 (marimastat), Ro 32-3555 (Trocade), RS-130 830, BAY 12-9566 ve CGS-27023A (MMI-270)'nın etkinliklerinin yetersiz olması veya istenmeyen etkileri nedeniyle klinik denemelerine son verilmiştir.[51]

2.5. DOKU İNHİBİTÖRÜ METALLOPROTEİNAZLAR (TIMP)

Doku inhibitörü metalloproteinazlar (TIMP), MMP'ların aktif şekillerini inhibe etme yeteneğindeki 21 ve 28 kDa moleküler ağırlıklı bir protein ailesidir[54]. TIMP'ler, bağ dokusu metabolizmasının düzenlenmesinde temel rol oynarlar.[55] Matriks yıkımı ve şekillenmesi arasındaki dengeyi korurlar.[43] MMP'lara bağlanarak latent enzim formunun aktivasyonunu ve katalitik aktivitenin sürdürülmesini de inhibe ederler. TIMP'lerin, MMP inhibitörü olarak davranışlarının yanında MMP'lerin aktif olmalarında da önemli rol oynarlar. TIMP'ler, MMP enzim aktivitesini ve MMP/TIMP dengesini kontrol altında tutarlar. Pek çok dokuda ve vücut sıvılarında bulunurlar[55]. TIMP'ler, MMPler gibi vasküler kas hücresi, endotel hücresi, makrofajlar, fibroblastlar, alveolar epitelyum hücreleri, kan hücreleri ve bağ dokusu hücreleri tarafından sentez edilirler.[43,55] Trombositlerde, amnion sıvısı, sinovial sıvı gibi vücut sıvılarında bulundukları gösterilmiştir. TIMP'lerin aktivitesi EGF, TGF-β, IL-Iβ, IL-6, retinoik asit, onkostatin, forbol esterleri, sitokinler ve temel fibroblast büyüme faktörü gibi ajanlarla artar. Konkonovalin A, deksametazon tedavisi sonunda TIMP aktivitesi inhibe olur. TIMP'lerin kemik yeniden yapılanması, meme bezlerinin küçülmesi, korpus luteumun prematür hasarının önlenerek hamileliğin devamının sağlanması gibi fizyolojik süreçlerin

düzenlenmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. TIMP'ler, doku hasarı ve anjiogenezisi içeren çeşitli malign olmayan hastalıklarda da yer alırlar.[43] Klinik alanda, TIMP'lerin tedavi amaçlı kullanımı daha az dikkat çekicidir. Bunun nedeni, biyolojik aktif proteinlerin üretimindeki zorluklar ve ilaç dağılımının optimize edilememesidir. Ayrıca TIMP'ler, MMP inhibitör etkilerinden başka birçok fonksiyonu olan proteinlerdir. TIMP'lerin yalnız MMP inhibisyonu özelliğinin olmaması onların yalnız başına tedavide kullanımlarını engellemektedir.[55]

İnsanlarda TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 ve TIMP-4 olmak üzere tanımlanmış dört TIMP üyesi bulunmaktadır.[55] Aralarında yaklaşık olarak %41-52 sekans benzerliği bulunur. On iki tane korunmuş sistein rezidüsüne sahip olmaları, altı adet disülfid bağı oluşturmaları ve metalloproteinazlar ile nonkovalent kompleksler oluşturarak inhibe etmeleri ortak özellikleridir. Yapısındaki disülfid bağları moleküle yüksek pH ve ısıya karşı direnç sağlar. N-terminal bölge, MMP aktivitesinin inhibe edilebilmesi için gerekli olan bölgeyi oluşturmaktadır. N-terminalinde bulunan Cys1, His7 ve Gln9 rezidüleri MMP'ların aktif bölgelerinde bulunan çinko ile etkileşimlerinden sorumludur[56-58]. TIMP'ler MMP aktivitesini inhibe etme yönünden benzerlik göstermekle beraber matriksteki lokalizasyonları ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi yönünden aralarında farklar vardır.[55]

1. TIMP-1: Yaklaşık olarak 20 kDa, glikozillenmiş aktif formu 28.5 kDa ağırlığında bir siyaloglikoproteindir. Özellikle, makrofajlar olmak üzere pek çok hücre tarafından üretilir ve salgılanır.[43]

2. TIMP-2: 21 kDa ağırlığında, 194 aminoasit içeren glikozillenmiş bir proteindir. TIMP-1 ile homolog özellik gösteren 12 sistein kalıntısı içerir. Tümör büyümesi ve invazyonunu baskılayıcı etkiye sahiptir.[43,56]

3. TIMP-3: 21 kDa ağırlığında glikolize olmamış MMP inhibitörüdür. Heparin sülfat içeren TIMP-3, proteoglikanlara bağlanarak hücre dışı matrikse dahil olur. TIMP-3, diğer TIMP moleküllerinden farklı olarak çözünebilir formda değil, ESM komponentlerine bağlı olarak bulunur. TIMP-3, ekstrasellüler matriksten transforme olmuş hücrelerin ayrılmasını kolaylaştırır ve morfolojik değişiklikleri başlatır. TIMP-1 ile %30 ve TIMP-2 ile %38 sekans homolojisi göstermektedir.[56-58] TIMP-3, MMP-1,-2,-3,-9

ve -13'ü inhibe eder. TIMP-3 hücresel büyüme, hücresel ölüm ve doku tamiri gibi birçok önemli rolü vardır. Kültürde, liposakkarid ile stimüle edilen astrositlerden TIMP-3 salgılanır. Bunlar da nöronlarda MMP-2'nin aktivasyonunu engelleyerek KBB'ni MMP-2'den korur. Fakat, TIMP-3'ün artmış konsantrasyonu hücre ölümünü arttırır.[54,55] TIMP-3, ekstrasellüler matrikse sıkıca bağlıdır. Ayrıca TIMP-3 ve TNF-α dönüştürücü enzimi engelleyerek apoptozisi uyarır. TNF-α reseptörlerinin hücre yüzeyinde stabilizasyonunu sağlar.[52]

4. TIMP-4: TIMP-4 molekülü, TIMP ailesinin en son tanımlanmış olan üyesi olup 22 kDa ağırlığındadır. TIMP-1 ile %37, TIMP-2 ve TIMP-3 ile %51 sekans homolojisi göstermektedir.[56,57] proMMP-2'nin hemopeksin domainine bağlanan ve MT1-MMP'yi inhibe eden bir proteindir. Son zamanlarda, TIMP-4'ün MT1-MMP 'nin inhibitörü olduğu ve böylece MMP-2 aktivasyonunun ideal bir inhibitörü olduğu bildirilmiştir. Tümör invazyonunu ve metastazını inhibe ettiği gösterilmiştir.[43,55,56] TIMP-4 ise ekstrasellüler matriksin hemostazisini ve apoptozisin stimülasyonunu sağlar.[52]

2.5.1. Doku İnhibitörü Matriks Metalloproteinaz-1 (TIMP-1)

Primer gen ürünü, X kromozomu üzerinde tanımlanmıştır. TIMP-1 molekülü, 184 aminoasit içermektedir. On iki adet sistein rezidüsünün oluşturduğu altı disülfid bağı içerir. Glikozil gruplarının eklenmesi sonucu aktifleşir.[43,56] Molekül ağırlığı yaklaşık olarak 20 kDa, glikozillenmiş aktif formu 28.5 kDa ağırlığında bir siyaloglikoproteindir. Özellikle, makrofajlar olmak üzere pek çok hücre tarafından üretilir ve salgılanır. Trombositlerde rezidü olarak bulunur ve çeşitli dokular ile amnion sıvısı, sinovyal sıvı gibi vücut sıvılarında yer alır.[43] TIMP-1, tüm aktifleşmiş kollejenazları inhibe etme yeteneğindedir. Özellikle, MMP-9'u inhibe eder.[43,57] TIMP-1, proMMP-9'a bağlanarak proMMP-9/TIMP-1 kompleksini oluşturur. Bu kompleks, bütün aktif MMP'ları inhibe eder ve daha aktif stabil form olan proMMP-9/TIMP-1/MMP kompleksini oluşturur. MMP'lar üzerine inhibitör etkileriyle tümör büyümesini, invazyon ve metastazını inhibe ettiği gösterilmiştir.[57,58] Deneysel çalışmalarla, TIMP-1'in tümör tarafından teşvik edilen anjiogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir. TIMP-1 seviyesinin artmasının invazyon ve metastazın azalması ile bağlantılı olduğu ileri sürülmüştür. TIMP-1'in eritrosit üretimini

arttırıcı etkisi vardır. Ayrıca, hücre yüzey reseptörlerine bağlanması ile ortaya çıkan direkt sellüler etkisi ile çeşitli hücre tiplerinde replikasyonu uyarır.[43,56] Trombosit kaynaklı büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü, forbol esterleri ve IL-1 TIMP-1'in fibroblastlardan ekspresyonunu arttırır. TNF-α'nın düşük konsantrasyonları TIMP-1 üretimini artırırken, yüksek konsantrasyonları üretimi baskılar.[57,58]

2.5.2. Doku İnhibitörü Matriks Metalloproteinaz-2 (TIMP-2)

TIMP-2 molekülü, 194 aminoasit içeren, 21 kDa ağırlığında glikozillenmiş bir proteindir. TIMP-1 ile homolog özellik gösteren 12 sistein rezidüsü vardır. TIMP-1 ve TIMP-2'nin aminoasit dizilişi %40 oranında benzerlik gösterir. Tümör büyümesi ve invazyonunu baskılayıcı etkiye sahiptir.[43,56] MMP-2'nin aktifleşmesinde görev almasına rağmen, yüksek konsantrasyonlarda proMMP-2'nin aktivasyonunu önler. Dağılımı iyi bilinmemekle birlikte eklem kıkırdaklarından izole edilmiştir. Fibroblastlarda proMMP-2 ile birlikte salınır.[55] Aktive olmuş MMP'lara bağlanma yönünden TIMP-1 ile benzerdir. Bununla birlikte ek olarak pro-MMP-2 ile birebir kompleks yapar. TIMP-2, TIMP-1'den farklı bir şekilde düzenlenir, forbol esterleri ile üretimi uyarılmaz ve TGF-β ile inhibe olmaz. TIMP-2'nin kan beyin bariyerinin proteolitik sızıntısını azalttığı saptanmıştır. TIMP-2, MMP-9 dışındaki MMP'ları inhibe eder. Spesifik olarak MMP-2'yi inhibe eder.[43,56] TIMP-1 ve TIMP-2 bazı tümör hücreleri için büyüme faktörleridir. Yüksek TIMP düzeylerinin kanser progresyonu ile birliktelik gösterdiği bildirilmiş ve bazı tümör tiplerinde kötü prognostik değerin göstergesi olduğu bildirilmiştir. TIMP-1 ve TIMP-2'nin yüksek oranda eksprese olması, farklı orijinli tümörlerin metastaz oluşumu ve tümör büyümesini azaltırken, ekspresyonunun downregülasyonunun da tümör yayılımını engellediği bildirilmiştir.[52]

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Araç ve Gereçler

3.1.1. Kimyasal Malzemeler

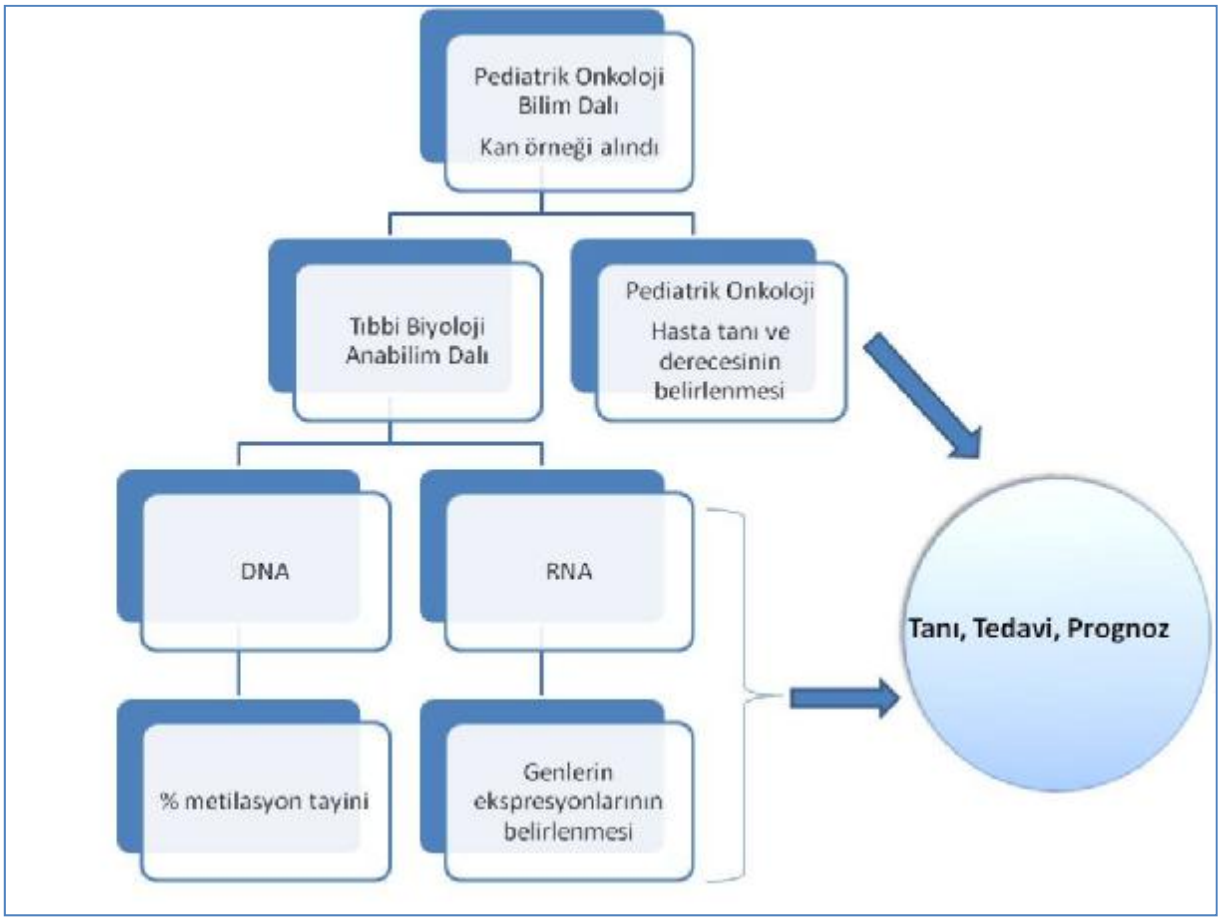
- Etanol (Merck)
- 2-merkaptoetanol (Merck)
- RT² HT First Strand Kit (Qiagen/ Kat No: 330411)
- Custom RT² Profiler PCR Array (Qiagen/Kat No: 330131)
- EpiTect® Methyl II DNA Restriction Kit (Qiagen/ Kat No: 335452)
- EpiTect® Methyl II Custom PCR Array (Qiagen/Kat No: 335112)
- RT² SYBR Green ROX qPCR Mastermix (Qiagen/Kat No: 330523)
- RT² SYBR Green ROX qPCR Mastermix (Qiagen/Kat No: 330522)
- PureLink RNA Mini Kit (İnvitrogen/ Kat. No: 12183-018A)
- Column-Pure Blood Genomic DNA Mini Kit (Applied Biological Materials Inc./ Kat No:D203-Mini-1)

3.1.2. Aygıtlar

- Roche LightCycler 480 (Roche)
- Santrifüj (Biofuge pico-Heraeus)
- Derin Dondurucular (MDF-U2086S Ultra Low-Sanyo)
- Buzdolabı (RDD 1280-Regal)
- Steril Plastik Pipet (Axygen)
- Steril Disposable Farklı Büyüklükte Enjektör (2 ml, 5 ml, 10 ml)
- Otomatik Pipetler (Eppendorf)
- Thermobrite (Stat Spin)
- Su Banyosu (Gen-Probe)
- PCR cihazı (Bioder XP Cycler)

3.2. Örneklerin Sağlanması İçin Kullanılan Yöntemler

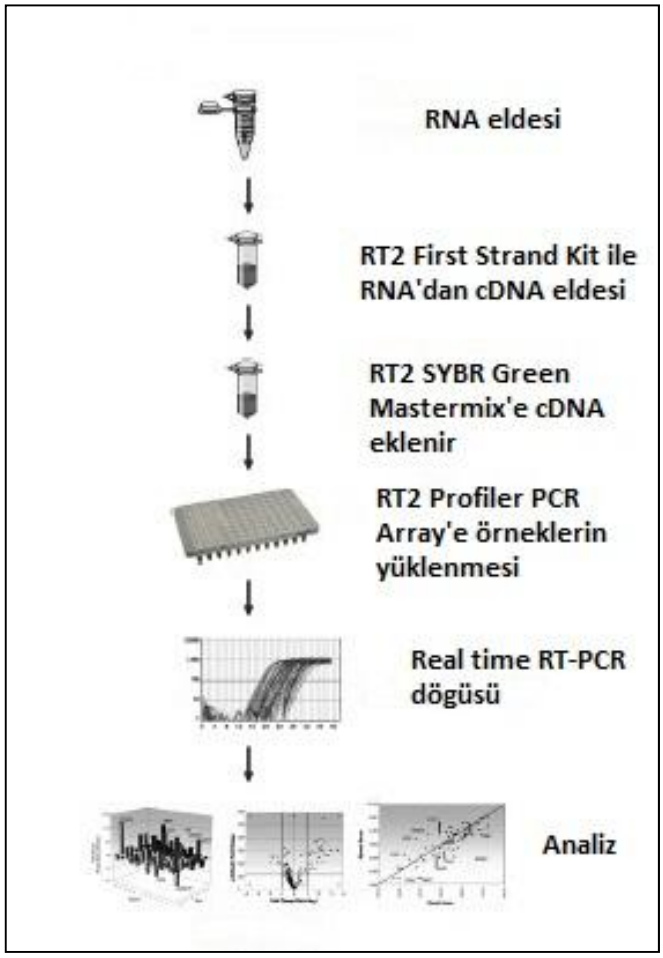
Çalışmamız, Mart 2012- Haziran 2014 tarihleri arasında Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Aynı fakültenin Pediatrik Onkoloji Kliniğine ALL ön tanısı alan 26 hasta ile bu hastalara yaş ve cinsiyet açısından uygun olan sağlıklı ve ailesinde kanser öyküsü olmayan Pediatri Polikliniğine gelen kontrol grubu olarak seçilmiş 26 çocuk etik onayları alındıktan sonra, çalışmamızın amacı doğrultusunda her birinden RNA ve DNA izolasyonu için EDTA'lı tüplere 5 ml kan örneği alındı. RNA ve DNA izolasyonunda, izolasyon kitleri kullanıldı. Hasta ve kontrol gruplarından elde edilen veriler kendi aralarında karşılaştırıldı. Tez çalışması kapsamında uygulanan yöntem Şekil 7'de gösterilmiştir.



Şekil 7: Tez çalışmasında uygulanan yöntem

3.2.1. RT-PCR Çalışmaları

Pediatrik Onkoloji Polikliniğine, ALL tanısı alan hasta grubundan (26) ve Pediatri Polikliniğine gelen kontrol grubundan (26) alınan kan dokularından RNA izolasyonu yapıldı. Gerçek zamanlı RT-PCR çalışması Şekil 8'de gösterilmiştir.



Şekil 8: Gerçek zamanlı RT-PCR çalışması

3.2.1.1. Total RNA İzolasyon Protokolü

1. 200 µl kan örneği 1,5 ml'lik RNaz olmayan eppendorf tüpe konuldu.
2. Üzerine 2-merkaptoetanol ile hazırlanan 200 µl lizis tamponu eklendi.
3. Vortekslendikten sonra 12.000 g'de 2 dakika santrifüj edildi.
4. Süpernatant temiz bir 1,5 ml RNazsız tüpe alındı.
5. 200 µl 100%'lük etanol eklenip vortekslendi.

6. Vortekslenen örneği kitin içinden çıkan toplama tüpün üzerine yerleştirilmiş filtreli tüplere aktarıldı ve 12.000 g'de 15 saniye santrifüj edildi.
7. Filtreli tüplerin üzerine 700 µl yıkama tamponu-1 eklendi, 12.0000 g'de 15 saniye santrifüj edildi.
8. Filtreli tüpler yeni toplama tüplerinin üzerine konulup, 500 µl yıkama tamponu-2 eklendi ve 12.000 g'de 15 saniye santrifüj edildi.
9. Alttaki sıvı atıldı, filitreli tüpler aynı toplama tüpüne konulup tekrar 500 µl yıkama tamponu-2 konuldu ve 12.000 g'de 15 saniye santrifüj edildi.
10. Filtreli tüpleri kurutmak için 12.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı ve filtreli tüp yeni bir tüpe yerleştirildi.
11. Filtreli tüpün merkezine 30µl – 3x100µl RNaz'sız su eklendi ve oda sıcaklığında 1 dakika bekletildi.
12. ≥12.000 g'de 2 dakika santrifüj edildi.
13. Elde edilen RNA - 80◦C'de muhafaza edildi.

3.2.1.2. cDNA Eldesi

1. 96 kuyucuklu plakaya her bir örnek için 6 µl genomik DNA eliminasyon tamponu ve 8 µl RNA (25 ng-5µg) pipetaj yapılarak karıştırıldı.
2. 1000 g'de 1 dakika santrifüj edildi ve 37◦C'de 5 dakika inkübe edildi.
3. Çıkan ürün buz üzerine alındı. Üzerine 6 µl BC4 tamponu eklendi ve 1000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
4. Tablo 8'de yer alan döngü gerçekleştirildi.

Tablo 8: PCR programı

Döngü Sayısı	Süre	Sıcaklık
1	15 dakika	42◦C
1	5 dakika	95◦C
-	∞	4 ◦C

5. Çıkan ürün buz üzerine alındı. Hemen kullanılacaksa 91 µl su eklendi. Eğer kullanılmayacak ise -20◦C'ye konuldu.

3.2.1.3. RT-PCR Protokolü

1. Her bir örnek için PCR karışımı aşağıdaki tabloya (Tablo 9) göre hazırlandı.

Tablo 9: PCR bileşen karışımı.

Bileşik	Miktar
2xRT^2 SYBR Green Mastermix	12.5 µl
cDNA	2.5 µl
Su	10.5 µl
Toplam	25 µl

2. Her bir kuyucuğa hazırlanan karışımdan 25 µl dağıtıldı.
3. Aşağıdaki tabloda (Tablo 10) yer alan döngü gerçekleştirildi.

Tablo 10: Roche LightCycler 480 için döngü koşulları.

Döngü Sayısı	Süre	Sıcaklık
1	10 dakika	95 ◦C
45	15 saniye	95 ◦C
	1 dakika	60 ◦C

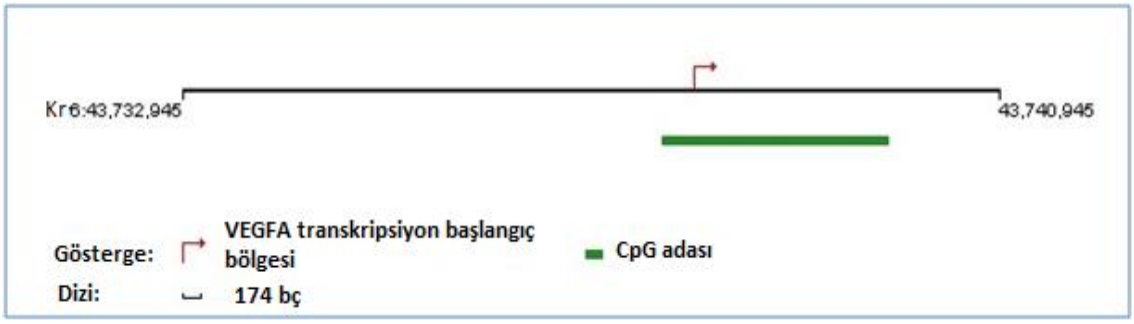
3.2.1.4. Gen Ekspresyonun Değerlendirilmesi

Gen ekspresyonu sonuçları www.sabiosciences.com/pcarraydataanalysis.php internet adresi üzerinden gerçekleştirildi. Sistem üzerinden girilen eşik döngü (C_T; cycle threshold) değerleri web tabanlı yazılım programı olan RT^2 Profiler PCR Array Data Analysis Version 3.5 ile karşılaştırmalı C_T yöntemini ($\Delta\Delta C_T$) kullanılarak genlerin ifade değerleri hesaplandı.

3.2.2. Metilasyon Çalışmaları

Pediatrik Onkoloji Polikliniğine, ALL tanısı alan hasta grubundan (26) ve Pediatri Polikliniğine gelen kontrol grubundan (26) alınan kan dokularından DNA izolasyonu yapıldı. VEGFA, TIMP2, MMP2 ve MMP9 genlerinin metilasyon bölgeleri Şekil 9, Şekil 11, Şekil 13 ve Şekil 15'de gösterilmiştir.

İncelemelerini yaptığımız VEGF-A (Gene ID:7422), MMP-2 (Gene ID:4313), MMP-9 (Gene ID:4318) ve TIMP-2 (Gene ID:7077) genlerinin sekans bilgilerini www.ncbi.nlm.nih.gov internet adresinden elde ettik. Araştırmalarımızda kullandığımız kitlerde yer alan referans aralığı ve transkripsiyon başlangıç noktası bilgilerini kullanarak incelenen bölgenin ilgili genler üzerindeki yerleşimlerini tespit ettik. Bu bölgeleri, CpG adası içerikleri açısından inceledik (Şekil 10, Şekil 12, Şekil 14, Şekil 16). TIMP1 geni promotör bölgesinde (transkripsiyon başlangıç noktasının 5 kb yukarı bölgesinden 3 kb aşağı bölgesi olarak tanımlanan) CpG adası tespit edilemediğinden, bu genin metilasyon analizi yapılamadı.

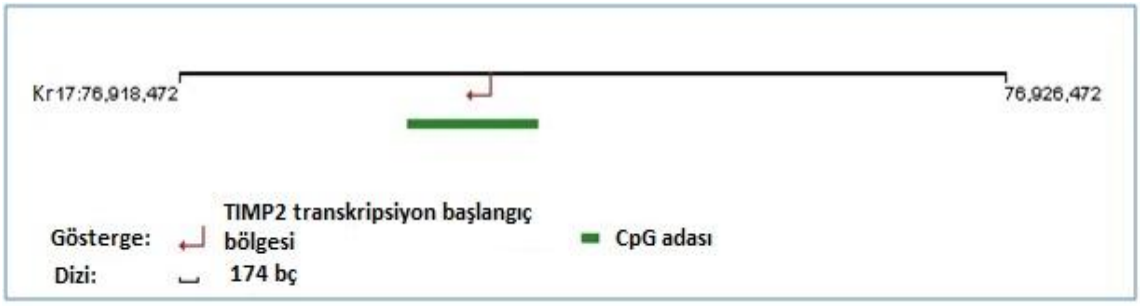


Şekil 9: VEGFA geninin metilasyon bölgesi

cgcacgtaac ctcactttcc tgctccctcc tcgccaatgc cccgcgggcg cgtgtctctg gacagagttt
ccgggggcgg atgggtaatt ttcaggctgt gaaccttggt gggggtcgag cttccccttc attgcggcgg
gctgcgggcc aggcttcact gagcgtccgc agagcccggg cccgagccgc gtgtggaagg gctgaggctc
gcctgtcccc gccccccggg gcgggccggg ggcgggggtcc cggcgggggcg gagccatgcg ccccccccctt
ttttttttaa aagtcggctg gtagcgggga ggatcgcgga ggcttggggc agccgggtag ctcggaggtc
gtggcgctgg gggctagcac cagcgctctg tcgggaggcg cagcggttag gtggaccggt cagcggactc
accggccagg gcgctcggtg ctggaatttg atattcattg atccgggttt tatccctctt ctttttctt aaacattttt
ttttaaaact gtattgtttc tcgttttaat ttatttttgc ttgccattcc ccacttgaat cgggccgacg gcttggggag
attgctctac ttccccaaat cactgtggat tttggaaacc agcagaaaga ggaaagaggt agcaagagct
ccagagagaa gtcgaggaag agagagacgg ggtcagagag agcgcgcggg cgtgcgagca gcgaaagcga
caggggcaaa gtgagtgacc tgcttttggg ggtgaccgcc ggagcgcggc gtgagccctc ccccttggga
tcccgcagct gaccagtcgc gctgacggac agacagacag acaccgcccc cagccccagc taccacctcc
tcccggccg gcggcggaca gtggacgcgg cggcgagccg cgggcagggg ccggagcccg cgcccggagg
cggggtggag ggggtcgggg ctcgcggcgt cgcactgaaa cttttcgtcc aacttctggg ctgttctcgc
ttcggaggag ccgtggtccg cgcgggggaa gccgagccga gcggagccgc gagaagtgct agctcgggcc
gggaggagcc gcagccggag gagggggagg aggaagaaga gaaggaagag gagagggggc cgcagtggcg
actcggcgct cggaagccgg gctcatggac gggtgaggcg gcggtgtgcg cagacagtgc tccagccgcg
cgcgctcccc aggccctggc ccgggcctcg ggccgggggag gaagagtagc tcgccgaggc gccgaggaga
gcgggccgcc ccacagcccg agccggagag ggagcgcgag ccgcgccggc cccggtcggg cctccgaaac
catgaacttt ctgctgtctt gggtgcattg gagccttgcc ttgctgctct acctccacca tgccaaggta agcggtcgtg
ccctgctggc gccgcgggcc gctgcgagcg cctctcccgg ctggggacgt gcgtgcgagc gcgcgcgtgg
gggctccgtg ccccacgcgg gtccatgggc accaggcgtg cggcgtcccc ctctgtcgtc ttaggtgcag
ggggaggggg cgcgcgcgct aggtgggagg gtaccggagg agaggctcac cgcccacgcg ggccctgccc
acccaccgga gtcaccgcac gtacgatctg ggccgaccag ccgagggcgg gagccggagg aggaggccga
gggggctggg cttgcgttgc cgctgccggc tgaagtttgc tcccggccgc tggtcccgga cgaactggaa
gtctgagcag cgggggcggg agccagagac cagtgggcag ggggtgctcg gaccttggac cgcgggaggg
cagagagcgt ggaggggggca gggcgcagga gggagagggg gcttgctgtc actgccactc ggtctcttca
gccctcgccg cgagtttggg aaaagttttg gggtggattg ctgcggggac ccccctcccc tgctgggcca
cctgcgccgc gccaacccgg cccgtcccgg ctcgcgtccc gctcggtgcc cgccctcccc cgcccggccg
ggtgcgcgcg gcgcggagcc gattacatca gcccgggcct ggccggccgc gtgttccgg agcctcggct

gcccgaatgg ggagcccaga gtggcgagcg gcacccctcc ccccgccagc cctcgcgcgg aaggtgacct ctcgaggtag ccccagcccg g

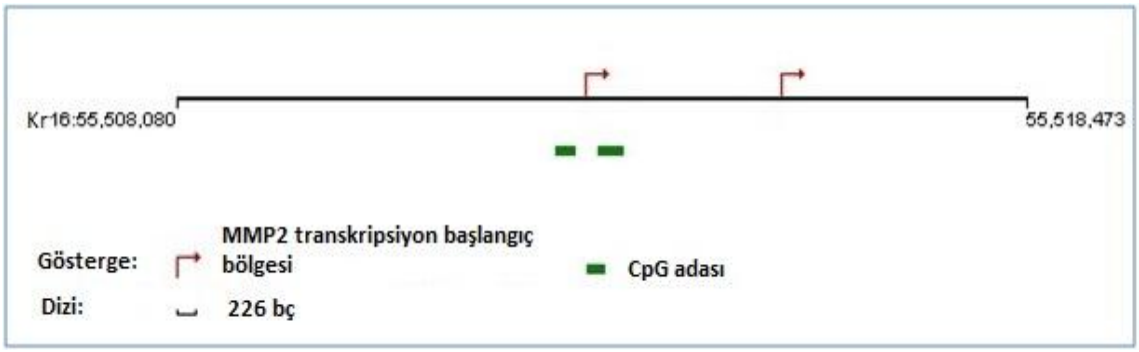
Şekil 10: VEGF-A geni amplifikasyon bölgesi CpG adaları



Şekil 11: TIMP-2 geninin metilasyon bölgesi

ttcct ggaacacaaa actgttttgg gaaaagtcct tcggctccca catttgtgga ctaagagagg aaactgtgag cggaacccag ccaatgcctc tgctgcgatc ctactggctc ctgggcgcct gggcccaccc ccgtctcttg ttggctggtc aaaaatatgg ccagtttata taaaatcctg ttttgttcac agtaaccaca ccccccaccc cccaactaaa ctggccaggc gcacttaaaa ttctaaggcc tccatttgaa aaagggatcc tgtcagtttc tcaataggcc acccgcccac agaaacgggg aggtggcgac agggaacggc ccctgctcca aaggacaccc cttggctcgc cccgaggctg ggctcgaagg gacccgggg tggcgggga cggagcagcg tagccctcca gagtcgagct gaaggggaaa gggtagcggg tgggtcgcct ggtgccctgg aagaacgggc gcgagtccca cgcgctgagt cagggacccc gggcgcagaa ggccacgcag cggggaccgg ggtcgggggg ctgggggcgt ccgggcgcac ccccgcgcgg gtgcgggtcg cgggcgccag gtggtgcggg aagccccga cgtgccaggc cgggcacaac aaaagcgcgg gctgggggga ggcgcgggcg gaggggagg agggggctgc tgggagcgcc cagagcctgc attggccgcc agccaccggg aggaggagca gaaaatcctc cgagcgcaat aaaactgcgg cccggcccaa gcccgcagca aacacatccg tagaaggcag cgcggccgcc gagagccgca gcgccgctcg cccgccgtcc cccacccgc cgcccgccc ggcgaattgc gcccgcgcc cctcccctcg cgccccgag acaaagagga gagaaagttt gcgcggccga gcggggcagg tgaggagggt gagccgcgcg ggaggggccc gcctcggccc cggctcagcc cccgcccgcg cccccagccc gccgccgcga gcagcgcccg gacccccag cggcggcccc cgcccgccca gccccccggc ccgccatggg cgccgcggcc cgcaccctgc ggctggcgct cggcctcctg ctgctggcga cgctgcttcg cccggccgac gcctgcagct gctcccggt gcacccgcaa caggcgtttt gcaatgcaga tgtagtgatc agggccaaag cggtcagtga gaaggaagtg gactctggaa acgacattta tgg

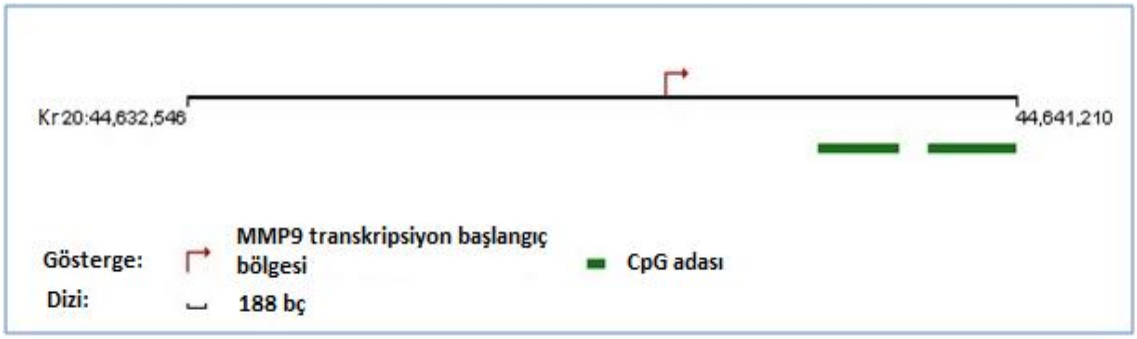
Şekil 12: TIMP-2 geni amplifikasyon bölgesi CpG adaları



Şekil 13: MMP-2 geninin metilasyon bölgesi

cgcgggggcc ggaccatgag ccgctgagcc gggcaaaccc caggccaccg agccagcgga ccctcggagc gcagccctgc gccgcggagc aggctccaac caggcggcga ggcggccaca cgcaccgagc cagcgacccc cgggcgacgc gcggggccag ggagcgctac gatggaggcg ctaatggccc ggggcgcgct cacgggtccc ctgagggcgc tctgtctcct gggctgcctg ctgagccacg ccgccgccgc gccgtcgccc atcatcaagt tccccggcga tgtcgccccc aaaacgg

Şekil 14: MMP-2 geni amplifikasyon bölgesi CpG adaları



Şekil 15: MMP-9 geninin metilasyon bölgesi

c ggaagacttg ccgcgggcgg tgattgacga cgcctttgcc cgcgccttcg cactgtggag cgcggtgacg ccgctcacct tcactcgcgt gtacagccgg gacgcagaca tcgtcatcca gtttggtgtc gcgggtgaga acgtgaggag ggaaaatcca agagacctgg gcgggtcag ggaagggagg accacggaga gcgtggaggc agcagtggcc ccggcttcct cttgcctgcc cgcgctgccc tggcttatac ggcccctcct gccagacagt gcacagggcc agggcgccag gctgggagag cttcgcgcag gcgggatttc agcccgcact tatttcggag cccttgcctt gggcagcgca caatctgcgc agcagtactc ggctaaccct cttcctctcg acctgtttct tcagagcacg gagacgggta tcccttcgac gggaaggacg ggctcctggc acacgccttt cctcctggcc ccggcattca gggagacgcc catttcgacg atgacgagtt gtggtccctg ggcaagggcg tcggtgagat tctgagtcct cctggcccct gattcccttc attctctccc actcatcacc cgccgcccta actccggtcc cccctcctcc tgcagtggtt ccaactcggt ttggaaacgc agatggcgcg gcctgccact tccccttcat cttcgagggc cgctcctact ctgcctgcac caccgacggt cgctccgacg gcttgccctg gtgcagtacc acggccaact acgacaccga cgaccggttt ggcttctgcc ccagcgagag tgagtgaggg ggctcgccga gggctggggg cgc

Şekil 16: MMP-9 geni amplifikasyon bölgesi CpG adaları

3.2.2.1. Total DNA İzolasyon Protokolü

1. 300µl – 500µl kanı bir mikrosantrifüj tüpüne alındı. 3.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi ve süpernatan atıldı.
2. 0.8 ml TBP tampondan tüpe ilave edilerek vortekslendi ve 3.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatan atıldı. Bu aşama bir defa daha tekrarlandı.
3. 0.5 ml TBM tampondan tüpe ilave edilerek vortekslendi. Daha sonra, 3 µl proteinaz-K ilave edildi ve 55 ◦C'de 30 dakika inkübe edildi.
4. 5.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
5. Supernatan yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve %100 etanolden 250 µl üzerine eklenerek vortekslendi.
6. Karışım, kolona aktarıldı ve 2 dakika tam hızda santrifüj edildi. Tüpün altında kalan sıvı kısım atıldı.
7. 500 µl yıkama solüsyonu ilave edildi ve 1 dakika santrifüj edildi. Tüpün altında kalan sıvı kısım atıldı. Bu aşama bir defa daha tekrarlandı.

8. 1 dakika daha santrifüj edildi.
9. Kolon temiz bir 1.5 ml santrifüj tüpüne yerleştirildi. Kolondaki membranın merkezine 30-50 µl elüsyon solüsyonu ilave edildi. Oda ısısında tüpler 5 dakika inkübe edildi.
10. Kolondan DNA'nın yıkanması için 1 dakika mikrosantrifüjde santrifüj edildi.

3.2.2.2. Metilasyon Protokolü

1. Tablo 11'da yer alan enzimsiz reaksiyon karışımı hazırlandı. RNaz/DNaz olmayan steril su toplam hacim 120 µl olacak şekilde eklendi.

Tablo 11: Enzimsiz reaksiyon karışımı.

Bileşikler	Miktar
Genomik DNA (1 µg)	Değişken
5x Restriksiyon Dijesyon Solüsyonu	26 µl
Su	Değişken
Toplam	120 µl

2. Tablo 12'de yer alan enzim reaksiyonu hazırlandı.
3. Hazırlanan 4 tüp (Mo: enzim yok, Ms: metilasyona duyarlı enzim, Md: metilasyona bağımlı enzim, Msd: metilasyona duyarlı ve metilasyona bağımlı enzimler) 37◦C'de 6 saat veya 1 gece inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonunda 65◦C'de 20 dakika enzimler sıcakla inaktive edilerek reaksiyon sonlandırıldı.

Tablo 12: Enzim reaksiyonu karışımı

Bileşik	Mo	Ms	Md	Msd
Reaksiyon karışımı	28 µl	28 µl	28 µl	28 µl
Metilasyona duyarlı enzim A	-	1 µl	-	1 µl
Metilasyona bağımlı enzim B	-	-	1 µl	1 µl
Su	2 µl	1 µl	1 µl	-
Toplam	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl

5. 1.5 ml'lik tüplere 4 farklı enzim (Mo, Ms, Md, Msd) için PCR reaksiyonu Tablo 13'ye göre hazırlandı.
6. Her bir tüp çok iyi vortekslendi ve her bir kuyucuğa 25 µl hazırlanan karışım eklendi.
7. Tablo-14'te yer alan PCR protokolüne göre hazırlanan örnekler cihaza yerleştirildi.

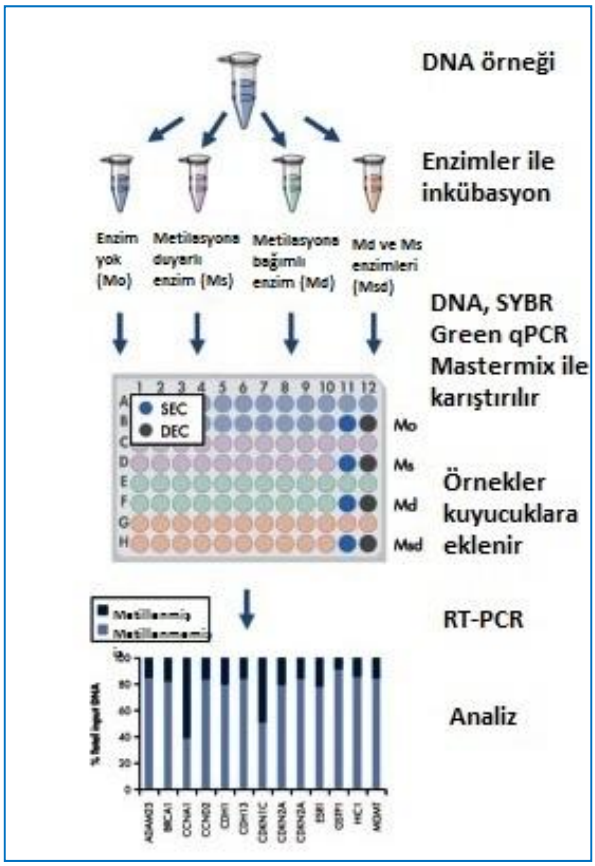
Metilasyon çalışması aşamaları Şekil 17'te gösterilmiştir.

Tablo 13: PCR karışımı.

Bileşik	Mo	Ms	Md	Msd
PCR Master Mix	330 µl	330 µl	330 µl	330 µl
Mo karışımı	30 µl	-	-	-
Ms karışımı	-	30 µl	-	-
Md karışımı	-	-	30 µl	-
Msd karışımı	-	-	-	30 µl
Su	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl
Toplam	660 µl	660 µl	660 µl	660 µl

Tablo 14: PCR protokolü.

Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
95◦C	10 dakika	1
99◦C	30 saniye	3
72◦C	1 dakika	
97◦C	15 saniye	40
72◦C	1 dakika	



Şekil 17: Metilasyon çalışması aşamaları

3.2.2.3. Metilasyonun Değerlendirilmesi

Öncelikle, EpiTect Methyl II PCR Array Microsoft Excel tabanlı veri analizi yapan dosya www.sabiosciences.com/dna_methylation_data_analysis.php internet adresi üzerinden indirildi. Genlerin eşik döngü (C_T cycle threshold) değerleri web tabanlı yazılım programına girildi ve otomatik olarak genlerin % metilasyon değerleri hesaplandı.

3.3. İstatistik Analizi

Verilerin istatistik analizinde, SPSS 16.0 paket programı kullanıldı. Kesikli değişkenlerde sayı ve yüzde olarak, sürekli değişkenler ise ortalama ve standart sapma olarak özetlendi. Tüm testlerde anlamlılık düzeyi $p<0.05$ alındı.

4. BULGULAR

4.1. Olguların Belirlenmesi

Bu çalışmada; Çukurova Üniversitesi Pediatrik Onkoloji Bilim Dalı'nda ALL tanısı almış 26 hasta çalışıldı. Çalışmamıza katılmayı kabul etmiş ve gönüllü onam formu imzalamış hasta ve kontrol grubundan kan örnekleri alındı. Hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri Tablo 15'te verildi. Buna göre; ALL hasta grubunun 11'inin kız (%42.3) ve 15'nin erkek (%57.7) olduğu görüldü. Yaş ortalaması hasta grubunda 6,94 yıl (83,38 ay) ve kontrol grubunda 6,13 yıl (73,61 ay) olduğu görüldü (Tablo 16).

Tablo 15: ALL hasta grubunun ve kontrol grubunun demografik özellikleri

			Tanı		Total
			ALL	Kontrol	
Cinsiyet	Kız	N	11	16	27
		%	42,3	61,5	51,9
	Erkek	N	15	10	25
		%	57,7	38,5	48,1
Toplam		N	26	26	52

Tablo 16: Hasta ve kontrol grubunun yaş (ay) karşılaştırması

Tanı	N	Ortalama	SD	Minimum	Maksimum
ALL	26	83,38	54,87	7	203
Kontrol	26	73,61	41,21	8	120

4.2. ALL Klinik Özellikleri ve Sınıflandırması

Çukurova Üniversitesi, Pediatrik Onkoloji Bilim Dalı'nda ALL tanısı almış 26 olgunun tanı anındaki lökosit, trombosit, hemoglobin değerleri Tablo 17'da görülmektedir.

Tablo 17: Hasta grubunun lökosit, trombosit ve hemoglobin değerleri.

Hasta No	Lökosit/mm3	Trombosit/mm3	Hemoglobin/ g/dl
1	3800	63000	10,10
2	43800	15000	5,50
3	60300	33800	6,80
4	4800	33600	8,85
5	15670	55000	5,80
6	454000	76600	10,00
7	45000	30000	7,70
8	181000	55900	8,00
9	2300	36000	12,70
10	107400	91300	5,80
11	1620	39900	7,60
12	4000	124000	8,67
13	90600	64000	5,50
14	24400	25000	4,80
15	77700	25900	5,63
16	4330	21100	10,00
17	6680	91600	10,20
18	2700	192000	11,30
19	13800	11000	8,50
20	3100	66000	9,10
21	37500	28000	9,80
22	6600	343000	13,30
23	140100	57000	5,80
24	3640	192000	9,70
25	3000	148000	8,40
26	14700	87000	9,90

ALL hastalarının ortalama lökosit/mm3 değeri 52020,76; ortalama trombosit/mm3 değeri 77142,31 ve ortalama hemoglobin g/dl değeri 8,44 olarak rapor edildi. Hastaların (n=26) 24'ünde (%92,3) anemi, (n=26) 9'unda (%34,6) nötropeni ve (n=26) 21'inde (%80,8) trompositopeni görüldü. Bununla birlikte hastaların (n=26) 6'sında (%23,1) hem anemi, hem nötropeni ve hem de trombositopeni tespit edildi. Çukurova Üniversitesi Pediatrik Onkoloji Bilim Dalı'nda ALL tanısı almış 26 hastanın FAB klasifikasyonları, immunofenotiplendirmeleri ve BFM göre evreleri, alt tipleri, sağ kalım ve olay durumları Tablo 18'de verildi.

Tablo 18: Hasta grubunun tanılarına göre dağılımı

Hasta No	FAB	İmmünfenotip	BFM	Sağ Kalım	Olay
1	L2	B ALL CD10+,CD19+,CD22+,CD34+	MRG	Hayatta	Remisyon
2	L2	B ALL CD10+, CD19+,CD22+	MRG	Hayatta	Remisyon
3	L1	B ALL CD10+,CD19+,CD20+,CD22+	MRG	Hayatta	Remisyon
4	L2	B ALL CD10+,CD13+,CD19+,CD20+,CD22+,CD34+	MRG	Hayatta	Remisyon
5	L1	B ALL CD10+,CD19+,CD22+,CD34+	MRG	Takip dışı	Remisyonda değil
6	L2	T ALL CD2+,CD3+,CD7+	MRG	Hayatta	Remisyon
7	L1	B ALL CD19+,CD22+	MRG	Hayatta	Remisyon
8	L2	B ALL CD13+,CD19+,CD22+,CD33+, CD34+	HRG	Takip dışı	Remisyonda değil
9	L2	COMMON ALL CD10+,CD19+,CD22+, CD34+	MRG	Eksitus	Remisyon
10	L2	T ALL CD2+,CD13+,CD19+,CD22+,CD33+,CD34+, CD117+	MRG	Eksitus	Nüks
11	L2	B ALL CD10+,CD19+,CD22+,CD34+	MRG	Hayatta	Remisyon
12	L1	COMMON ALL CD10+,CD13+,CD19+,CD22+, CD34+	MRG	Hayatta	Remisyon
13	L2	T ALL CD2+,CD7+,CD10+	HRG	Eksitus	Nüks
14	L2	B ALL CD10+,CD19+,CD22+,CD34+	MRG	Eksitus	Remisyonda değil
15	L2	B ALL CD10+,CD19+,CD22+	MRG	Takip dışı	Remisyon
16	L2	B ALL CD10+,CD19+,CD22+,CD34+	MRG	Hayatta	Remisyon
17	L1	T ALL CD3+,CD34+	MRG	Hayatta	Remisyon
18	L2	T ALL *	MRG	Hayatta	Remisyon
19	L1	B ALL *	MRG	Hayatta	Remisyon
20	L2	B ALL *	MRG	Takip dışı	Remisyon
21	L2	B ALL CD2+,CD10+,CD19+,CD22+, CD34+	HRG	Hayatta	Remisyon
22	L2	B ALL *	HRG	Hayatta	Nüks
23	L2	B ALL CD10+,CD19+,CD20+,CD22+, CD34+	MRG	Hayatta	Remisyon
24	L1	B ALL *	MRG	Hayatta	Remisyon
25	L1	B ALL CD10+,CD19+,CD22+,CD34+	MRG	Hayatta	Nüks
26	L2	B ALL CD10+,CD19+,CD22+,CD34+	MRG	Takip dışı	Remisyon

(MRG: orta risk grubu, HRG: Yüksek risk grubu; * : yeterli sayıda blast olmadığı için tespit edilemedi)

FAB klasifikasyonuna göre; ALL hastaların 8'inin (%30.8) L1, 18'inin (%69.2) L2 alt grubunda yer aldığı tespit edildi. BFM grubunun prognostik kriterlerine göre ise hastaların 22'sinin (84,6) MRG ve 4'ünün (%15.4) HRG olduğu tespit edildi. Akım sitometrisi ile yapılan immünofenotipik inceleme sonucunda hastaların 19'u (%73.1) B-ALL, 5'i (%19.2) T-ALL ve 2'si (%7.7) Common ALL olarak sınıflandırıldı (Tablo 18).

Hastaların takipleri sırasında remisyona giren hastaların 4'ünde (%17.4) nüks olduğu görüldü. Hastalığı tekrarlayan hastalar incelendiğinde; FAB sınıflamasına göre ALL-L1 tanılı hastaların (n=8) 1'inde (%12.5) ve ALL-L2 tanılı hastaların (n=18) 3'ünde (%16.6) nüks gözlendi. BFM grubunun prognostik kriterlerine göre hastaların 2'si MRG ve 2'si HRG risk grubundaydı. İmmünofenotipik dağılımları incelendiğinde B-ALL tanılı hastaların (n=19) 2'sinde (%10.5) ve T-ALL tanılı hastaların (n=5) 2'sinde (%40) nüks görüldü. Nüksün 2 hastada (10 ve 13 nolu) SSS tutulumu diğer 2 hastada kemik iliği tutulumu gösterdiği tespit edildi. SSS tutulumu şeklinde nüks gösteren ALL hastalarının 2'si kaybedildi. ALL'li hastaların 4'ü (%15.4) kaybedildiği; bu hastalar FAB sınıflamasına göre incelendiğinde 4 hastada L2 alt grubundaydı. BFM grubunun prognostik kriterlerine göre hastaların 3'ü MRG ve 1'i HRG risk grubundaydı. İmmünofenotipik dağılımlarına göre; hastalardan 1'inin B-ALL, 1'inin Common ALL ve 2'sinin T-ALL olduğu görüldü.

4.3. Genetik Analizler

4.3.1. Gen İfadesi Analizleri

Çukurova Üniversitesi, Pediatrik Onkoloji Bilim Dalı'nda ALL tanısı almış 26 çocuğun ve kontrol grubunun, ACTB ve GAPDH kontrol genleri ile VEGF-A, TIMP-1, TIMP-2, MMP-2 ve MMP-9 genleri Qiagen RT^2 Profiler PCR Array kitleri gerçek zamanlı RT-PCR ile ifade analizleri gerçekleştirildi. Bununla birlikte gen ifadelerinin kantitasyonu RT^2 Profiler PCR Array Data Analysis Version 3.5 ile yapıldı. Gen ifade sonuçları tablo 19'da verildi.

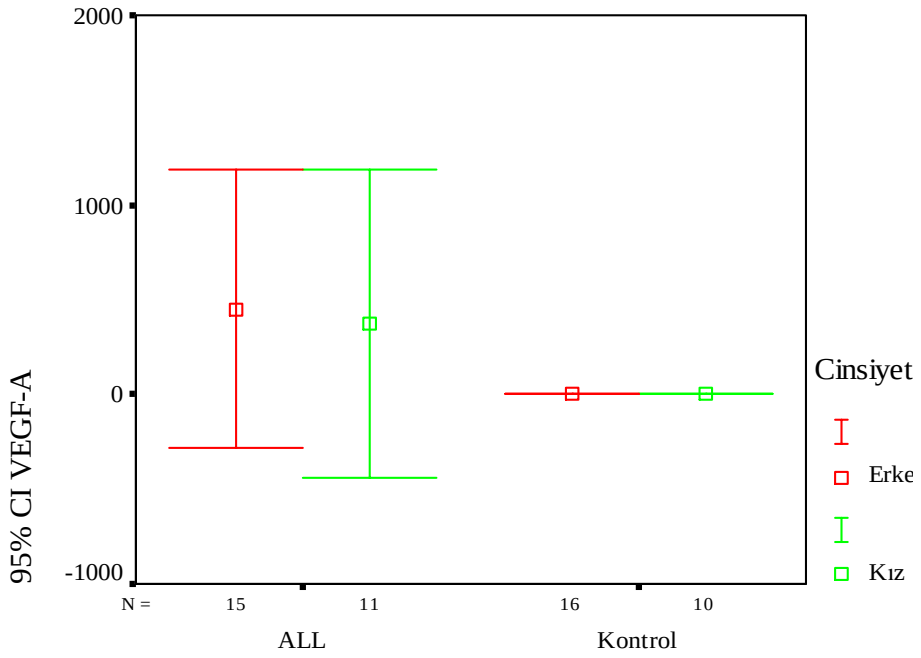
Tablo 19: Hasta ve kontrol grubu ifade sonuçları

Vaka No	ACTB	GAPDH	VEGFA	TIMP1	TIMP2	MMP2	MMP9
Hasta Grubu							
H1	27,67	31,31	40,00	33,52	29,84	40,00	27,89
H2	36,34	35,92	33,81	29,02	28,75	32,32	26,88
H3	16,98	20,19	30,63	23,39	26,15	35,08	28,83
H4	26,21	28,22	35,33	32,16	33,88	40,00	33,10
H5	19,50	23,88	23,88	24,99	23,63	24,56	23,77
H6	18,87	21,00	27,92	26,58	26,11	35,82	27,32
H7	21,13	25,62	29,96	27,37	27,14	32,52	26,84
H8	19,38	22,46	33,37	28,53	28,35	40,00	27,47
H9	33,41	30,64	35,85	37,82	35,23	35,71	34,06
H10	17,36	19,72	28,90	23,21	25,22	33,17	24,17
H11	24,17	28,93	33,10	32,89	30,59	35,64	28,31
H12	29,37	33,55	34,60	35,26	34,37	33,88	32,88
H13	19,10	23,28	30,27	27,75	26,32	40,00	24,07
H14	22,04	23,18	31,80	30,33	28,30	37,24	31,03
H15	29,58	32,14	40,00	36,30	40,00	37,19	35,11
H16	37,23	40,00	35,02	35,38	34,88	34,62	33,35
H17	24,99	29,66	37,96	32,74	32,30	39,62	29,95
H18	18,69	22,95	29,13	27,14	26,18	37,25	24,85
H19	32,68	28,85	31,84	36,43	31,99	31,56	31,99
H20	21,12	23,57	30,28	30,56	28,06	37,39	25,59
H21	23,46	25,47	30,64	30,79	40,00	40,00	34,60
H22	14,98	18,37	23,46	25,14	22,53	30,78	18,76
H23	17,95	21,75	28,89	26,56	29,27	40,00	26,11
H24	13,51	17,28	22,23	22,71	20,70	25,58	28,18
H25	18,59	21,34	27,10	28,06	24,35	35,08	22,64
H26	17,84	20,35	28,54	25,76	25,75	34,64	25,25
Kontrol Grubu							
K1	23,78	28,65	34,70	31,05	31,69	40,00	31,31
K2	26,46	30,60	40,00	33,05	33,77	40,00	34,23
K3	27,50	31,84	35,79	35,37	34,21	40,00	37,01
K4	23,23	27,80	35,51	30,70	29,94	40,00	28,47

K5	27,91	31,73	36,47	35,73	34,86	40,00	36,11
K6	25,44	30,01	36,34	33,05	33,20	40,00	32,20
K7	28,80	33,05	36,31	35,14	37,76	40,00	37,22
K8	28,23	33,02	40,00	35,35	36,06	40,00	34,24
K9	33,30	35,66	38,49	40,00	40,00	40,00	40,00
K10	27,03	30,79	40,00	34,33	33,77	40,00	37,19
K11	29,32	32,83	40,00	34,29	35,50	40,00	36,25
K12	25,73	30,13	35,49	32,22	32,88	40,00	32,44
K13	25,17	29,64	36,23	32,25	33,22	40,00	31,96
K14	27,61	31,20	40,00	33,74	33,84	40,00	33,14
K15	28,59	32,61	40,00	36,45	34,98	40,00	35,61
K16	26,27	30,84	40,00	33,17	33,37	40,00	34,25
K17	32,99	34,90	40,00	37,85	36,59	40,00	40,00
K18	26,83	31,25	32,88	33,39	34,12	40,00	36,26
K19	28,36	32,54	40,00	35,11	34,80	40,00	34,74
K20	28,02	32,25	40,00	34,30	35,72	40,00	36,98
K21	25,73	30,52	35,48	32,31	32,71	33,52	34,93
K22	26,26	30,21	35,77	33,13	33,86	40,00	32,94
K23	26,70	30,16	40,00	35,98	33,52	40,00	33,69
K24	23,47	28,09	34,63	31,28	30,99	40,00	31,55
K25	24,37	28,94	35,32	34,68	31,05	40,00	29,96
K26	26,46	30,31	36,11	33,28	33,93	40,00	33,75

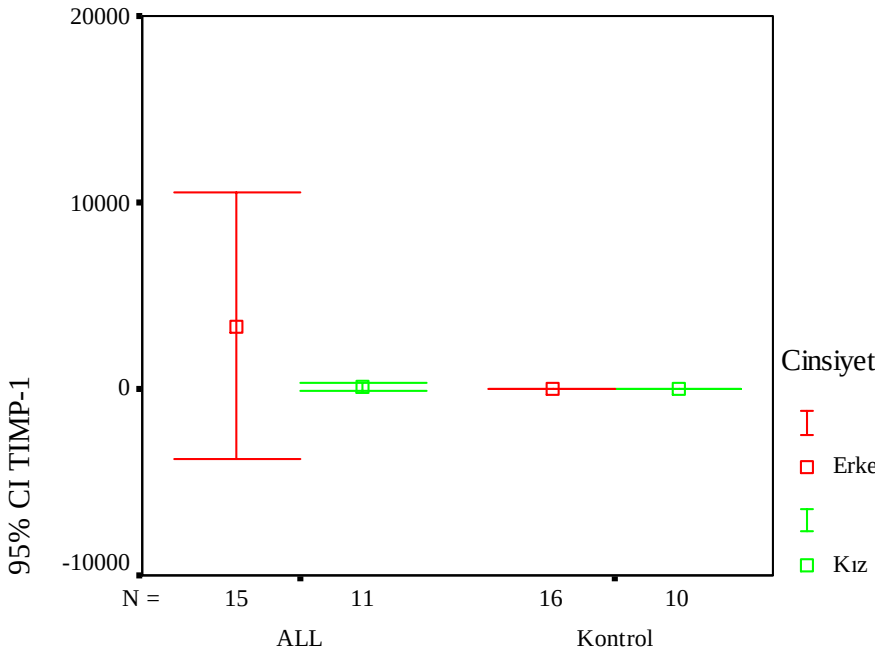
H: Hasta, K: Kontrol, ACTB: β-aktin, GAPDH: Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz.

Hastaların VEGF-A geni ifadesi ile yaş, lökosit, trombosit ve hemoglobin düzeyi karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilemedi (p>0,05). Sadece, VEGF-A geni ifadesi ile CD10 hücre yüzey antijeni arasında istatistiksel olarak pozitif anlamlı bir ilişki (n=21; p<0,05; r=0,443) görüldü. VEGF-A geni ifadesinin hasta ile kontrol grubu arasında anlamlı olduğu (p<0,05) saptandı (Grafik 2 ve Tablo 20).



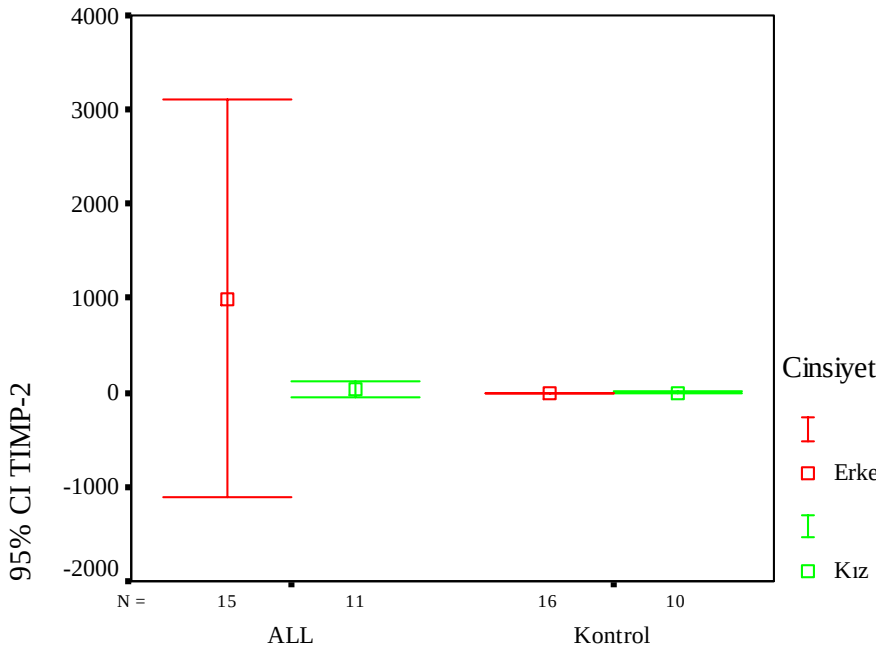
Grafik 2: VEGF-A geni ifadesinin rölatif oranlarının hasta ve kontrol grubu ortalaması ve %95 güven aralığı

Hastaların TIMP-1 geni ifadesi ile yaş, lökosit, hemoglobin ve CD yüzey antijen değerleri karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin olmadığı tespit edildi (p>0,05). Sadece, TIMP-1 geni ifadesi ile trombosit değeri arasında negatif anlamlı bir ilişki (p<0,05; r=-0,589) görüldü. TIMP-1 geni ifadesinin hasta ile kontrol grubu arasında anlamlı olduğu (p<0,05) saptandı (Grafik 3 ve Tablo 20).



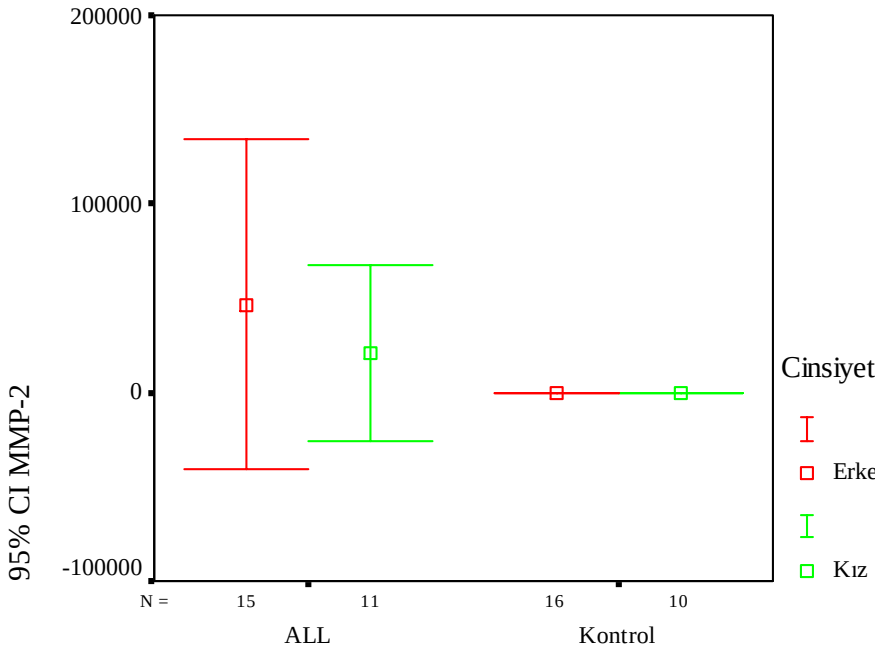
Grafik 3: TIMP-1 gen ifadesinin rölatif oranlarının hasta ve kontrol grubu ortalaması ve %95 güven aralığı

Hastaların TIMP-2 geni ifadesi ile yaş, trombosit, hemoglobin ve CD yüzey antijen değerleri karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilemedi (p>0,05). Sadece TIMP-2 geni ifadesi ile lökosit değeri arasında istatistiksel olarak negatif anlamlı bir ilişki (p<0,05; r=-0,461) görüldü. TIMP-2 geni ifadesinin hasta ile kontrol grubu arasında karşılaştırıldığında anlamlı bir fark (p<0,05) saptanamadı (Grafik 4 ve Tablo 20).



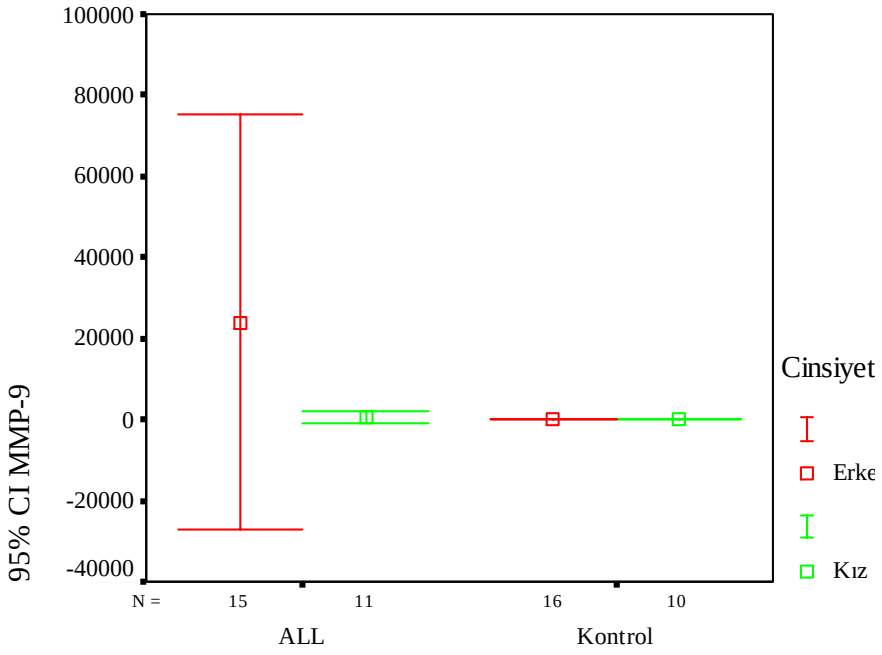
Grafik 4: TIMP-2 gen ifadesinin rölatif oranlarının hasta ve kontrol grubu ortalaması ve %95 güven aralığı

Hastaların MMP-2 geni ifadesi ile yaş, lökosit, trombosit, hemoglobin ve CD yüzey antijen değerleri karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilemedi (p>0,05). MMP-2 geni ifadesinin hasta ile kontrol grubu arasında anlamlı olduğu (p<0,05) saptandı (Grafik 5 ve Tablo 20).



Grafik 5: MMP-2 gen ifadesinin rölatif oranlarının hasta ve kontrol grubu ortalaması ve %95 güven aralığı

Hastaların MMP-9 geni ifadesi ile yaş, trombosit ve hemoglobin değerleri karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilemedi (p>0,05). Ancak MMP-9 geni ifadesi ile CD10 hücre yüzey antijeni arasında pozitif anlamlı (n=21; p<0,05; r=0,470); (n=21) CD20 (n=21; p<0,05; r=-0,637) ve (n=26) lökosit (p<0,05; r=-0,443) değerleri arasında negatif anlamlı bir ilişki görüldü. MMP-9 geni ifadesinin hasta ile kontrol grubu arasında anlamlı olduğu (p<0,05) saptandı (Grafik 6 ve Tablo 20).



Grafik 6: MMP-9 gen ifadesinin rölatif oranlarının hasta ve kontrol grubu ortalaması ve %95 güven aralığı

Tablo 20: VEGF-A, TIMP-1, TIMP-2, MMP-2 ve MMP-9 gen ifadelerinin rölatif oranlarının ortalaması ve %95 güven aralığı

Tanı		VEGFA	TIMP1	TIMP2	MMP2	MMP9
ALL	N	26	26	26	26	26
	Ortalama	416,19	1970,39	589,82	35881,59	14132,09
	SD	1250,70	9801,18	2892,48	126330,98	70171,07
	Minimum	0	0,27	0	0	0,2
	Maksimum	5007,93	50012,46	14766,09	610655,84	358099,26
Kontrol	N	26	26	26	26	26
	Ortalama	2,03	0,89	1,28	0,04	4,59
	SD	5,13	0,76	1,91	0,19	3,99
	Minimum	0	0	0	0	0
	Maksimum	23,59	3,29	10,41	1	15,56
p		0,007*	0,001*	0,284	0,000*	0,015*

*p<0,05

Genlerin ifade oranlarının karşılıklı etkileşimleri incelendiğinde; hasta grubunda VEGF-A geninin, TIMP-2 (p<0,05; r=0,638), MMP-2 (p<0,05; r=0,627) ve MMP-9 (p<0,05; r=0,472) genleri ile; TIMP-1 geninin, TIMP-2 (p<0,05; r=0,453), MMP-2 (p<0,05; r=0,488) ve MMP-9 (p<0,05; r=0,410) genleri ile; TIMP-2 geninin, VEGF-A, TIMP-1 yanında MMP-2 (p<0,05; r=0,646) ve MMP-9 (p<0,05; r=0,740) genleri ile; MMP-2 geninin, VEGF-A, TIMP-1, TIMP-2 yanında MMP-9 (p<0,05; r=0,573) geni ile pozitif anlamlı ilişki gösterdiği bulundu. Kontrol grubunda ise VEGF-A geni ile TIMP-2 geninin (p<0,05; r=0,457) negatif anlamlı bir ilişki gösterdiği belirlenmiş ve bu genlerin ifade oranlarının birbirleri ile ilişkileri Tablo 21 ve Tablo 22'de gösterilmiştir.

Tablo 21: Hasta grubunda genlerin karşılıklı etkileşimleri

		VEGF-A	TIMP-1	TIMP-2	MMP-2	MMP-9
VEGFA	Spearman Korelasyon	1				
	p					
	N	26				
TIMP1	Spearman Korelasyon	0,338	1			
	p	0,091				
	N	26	26			
TIMP2	Spearman Korelasyon	0,638**	0,453*	1		
	p	0,000	0,020			
	N	26	26	26		
MMP2	Spearman Korelasyon	0,627**	0,488*	0,646**	1	
	p	0,001	0,012	0,000		
	N	26	26	26	26	
MMP9	Spearman Korelasyon	0,472*	0,410*	0,740**	0,573**	1
	p	0,015	0,037	0,000	0,002	
	N	26	26	26	26	26

*p<0,05 **p<0,01

Tablo 22: Kontrol grubunda genlerin karşılıklı etkileşimleri

		VEGF-A	TIMP-1	TIMP-2	MMP-2	MMP-9
VEGFA	Spearman Korelasyon	1				
	p					
	N	26				
TIMP1	Spearman Korelasyon	-0,212	1			
	p	0,299				
	N	26	26			
TIMP2	Spearman Korelasyon	-0,457*	0,123	1		
	p	0,019	0,548			
	N	26	26	26		
MMP2	Spearman Korelasyon	0,153	0,147	0,040	1	
	p	0,457	0,475	0,846		
	N	26	26	26	26	
MMP9	Spearman Korelasyon	-0,367	0,090	0,740	0,273	1
	p	0,065	0,663	0,00	0,177	
	N	26	26	26	26	26

*p<0,05 **p<0,01

4.3.2. Gen Metilasyon Analizleri

ALL tanısı almış 26 hasta ve kontrol grubunun VEGF-A, TIMP-2, MMP-2 ve MMP-9 genlerinin Qiagen EpiTect Methyl II PCR array kitleri ile gerçek zamanlı RT-PCR cihazında metilasyon analizleri gerçekleştirildi. Metilasyon değerlerinin kantitasyonu yapıldı ve sonuçları Tablo 23'te verilmiştir.

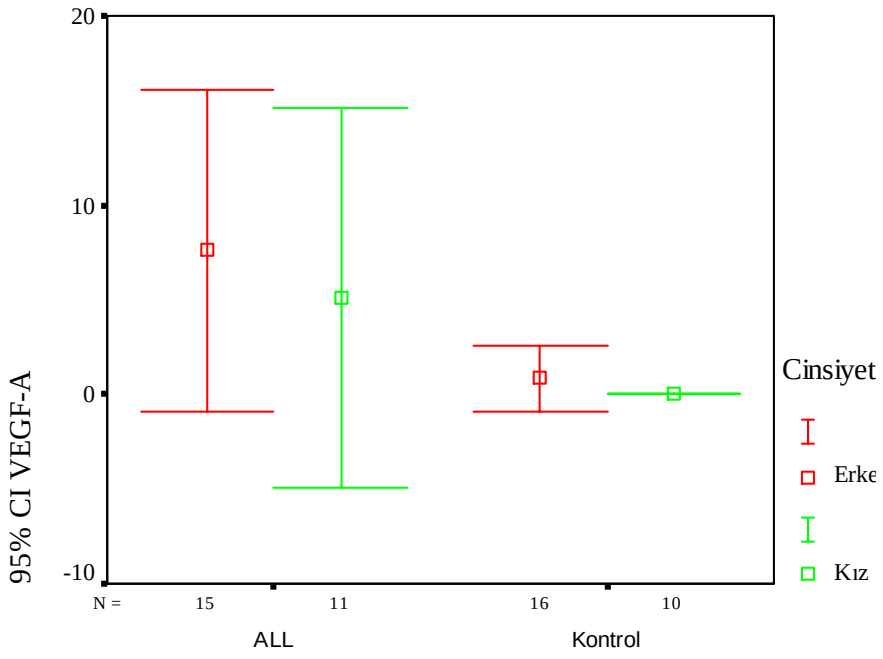
Tablo 23: Hasta ve kontrol grubuna ait VEGF-A, TIMP-2, MMP-2 ve MMP-9 genlerinin metilasyon değerleri(%)

Vaka No	VEGF-A		TIMP-2		MMP-2		MMP-9	
	UM (%)	M(%)	UM(%)	M(%)	UM(%)	M(%)	UM(%)	M(%)
Hasta Grubu								
H1	88,26	11,74	77,44	22,56	78,01	21,99	48,53	51,47
H2	90,58	9,42	98,87	1,13	50,00	50,00	50,00	50,00
H3	99,99	0,01	46,34	53,66	99,92	0,08	35,19	64,81
H4	99,51	0,49	99,25	0,75	8,19	91,81	93,68	6,32
H5	99,91	0,09	99,91	0,09	98,04	1,96	79,15	20,85
H6	99,99	0,01	47,71	52,29	12,0	88,0	6,14	93,86
H7	98,91	1,09	98,75	1,25	99,73	0,27	89,36	10,64
H8	99,92	0,08	99,58	0,42	8,21	91,79	*	*
H9	99,77	0,23	99,43	0,57	99,96	0,04	91,30	8,70
H10	99,96	0,04	99,95	0,05	99,97	0,03	99,72	0,28
H11	98,42	1,58	97,12	2,88	96,48	3,52	90,37	9,63
H12	99,98	0,02	99,95	0,05	99,97	0,03	97,11	2,89
H13	99,98	0,02	99,96	0,04	70,44	29,56	50,00	50,00
H14	99,98	0,02	99,97	0,03	99,99	0,01	37,23	62,77
H15	99,98	0,02	99,97	0,03	49,32	50,68	97,23	2,77
H16	50,0	50,0	55,98	44,02	64,87	35,13	50,00	50,00
H17	96,41	3,59	78,36	21,64	88,88	11,12	38,15	61,85
H18	99,97	0,03	99,92	0,08	40,90	59,10	42,68	57,32
H19	99,97	0,03	99,95	0,05	99,99	0,01	97,56	2,44
H20	99,91	0,09	99,75	0,25	99,95	0,05	84,34	15,66
H21	50,00	50,00	50,00	50,00	50,0	50,00	50,00	50,00
H22	62,25	37,75	50,00	50,00	60,21	39,79	50,00	50,00
H23	99,97	0,03	99,65	0,35	20,88	79,12	91,63	8,37
H24	97,37	2,63	94,40	5,60	97,20	2,80	75,19	24,81
H25	99,57	0,43	99,11	0,89	34,40	65,60	89,50	10,50
H26	99,24	0,76	99,00	1,00	99,36	0,64	91,57	8,43
Kontrol Grubu								
K1	99,98	0,02	99,93	0,07	99,99	0,01	98,13	1,87
K2	99,98	0,02	99,97	0,03	99,99	0,01	96,78	3,22

K3	99,99	0,01	99,97	0,03	99,99	0,01	95,51	4,49
K4	99,96	0,04	99,97	0,03	99,99	0,01	99,33	0,67
K5	99,92	0,08	99,94	0,06	99,99	0,01	96,55	3,45
K6	99,98	0,02	99,97	0,03	99,99	0,01	98,27	1,73
K7	99,99	0,01	99,98	0,02	99,99	0,01	97,60	2,40
K8	99,98	0,02	99,97	0,03	99,99	0,01	98,66	1,34
K9	99,99	0,01	99,82	0,18	99,99	0,01	96,56	3,44
K10	99,99	0,01	99,95	0,05	99,99	0,01	96,00	4,00
K11	99,98	0,02	99,97	0,03	99,99	0,01	96,32	3,68
K12	99,98	0,02	99,96	0,04	99,99	0,01	97,44	2,56
K13	99,98	0,02	99,96	0,04	99,99	0,01	97,70	2,30
K14	99,98	0,02	99,96	0,04	99,99	0,01	97,87	2,13
K15	99,98	0,02	99,97	0,03	99,99	0,01	96,83	3,17
K16	99,98	0,02	99,96	0,04	99,99	0,01	96,59	3,41
K17	99,98	0,02	99,96	0,04	99,99	0,01	94,38	5,62
K18	87,12	12,88	83,50	16,50	88,94	11,06	67,80	32,20
K19	99,98	0,02	99,96	0,04	99,93	0,07	96,12	3,88
K20	99,97	0,03	99,94	0,06	99,99	0,01	95,22	4,78
K21	99,94	0,06	99,96	0,04	99,96	0,04	97,79	2,21
K22	99,96	0,04	99,61	0,39	99,98	0,02	93,54	6,46
K23	99,98	0,02	99,96	0,04	99,99	0,01	97,74	2,26
K24	99,96	0,04	99,98	0,02	99,99	0,01	99,20	0,80
K25	99,97	0,03	99,97	0,03	99,99	0,01	99,17	0,83
K26	99,97	0,03	99,56	0,44	99,99	0,01	94,06	5,94

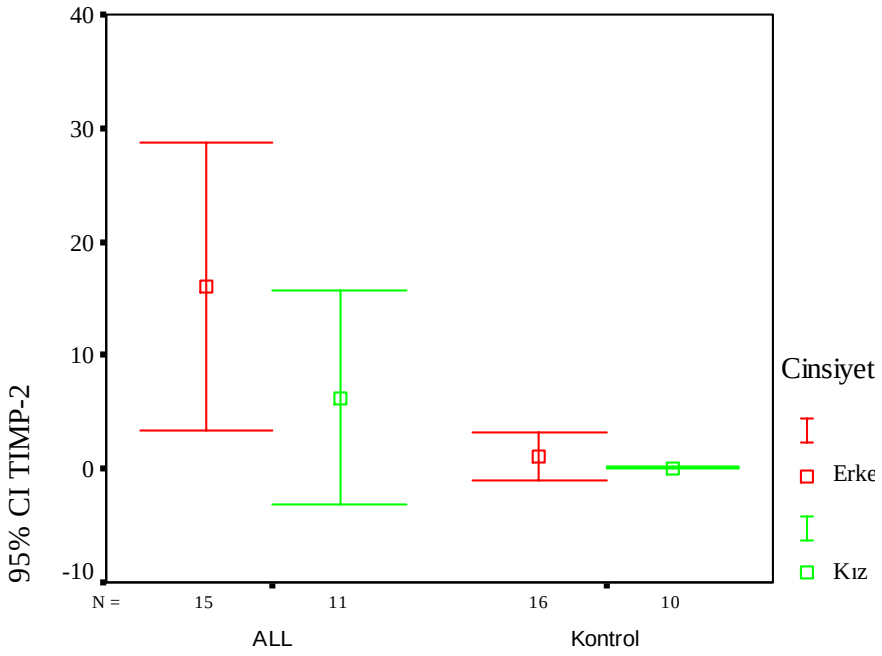
H: Hasta, K: Kontrol, M: metilasyon %'si; UM: metile olmayan %'si, (*: saptanamadı)

Hastaların (n=26) VEGF-A geni metilasyon düzeyi ile yaş, trombosit, hemoglobin ve CD yüzey antijen değerleri karşılaştırıldığında; aralarında anlamlı bir ilişki tespit edilemedi (p>0,05). Sadece VEGF-A geni metilasyon düzeyi ile lökosit değerleri arasında negatif anlamlı bir ilişki (p<0,05; r=-0,405) görüldü. VEGF-A geni metilasyon değerinde hasta ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olduğu (p<0,05) saptandı (Grafik 7 ve Tablo 24).



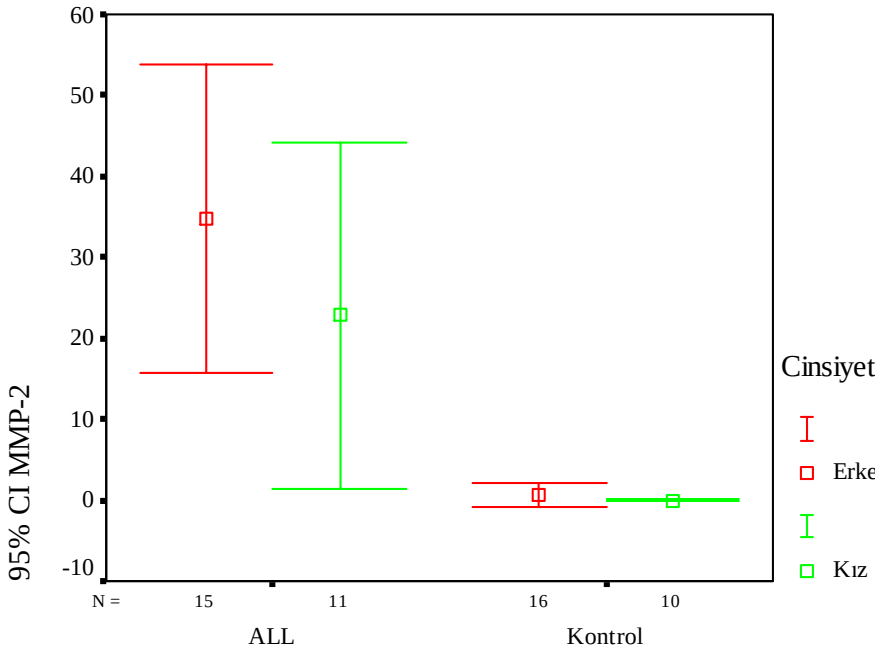
Grafik 7: VEGF-A geni promotor bölgesi metilasyon oranı hasta ve kontrol gruplarına göre dağılımı

Hastaların (n=26) TIMP-2 geni metilasyon düzeyi ile yaş, lökosit, trombosit, hemoglobin ve CD yüzey antijen değerleri karşılaştırıldığında; aralarında anlamlı bir ilişki tespit edilemedi (p>0,05). TIMP-2 geni metilasyon değerinde hasta ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olduğu (p<0,05) saptandı (Grafik 8 ve Tablo 24).



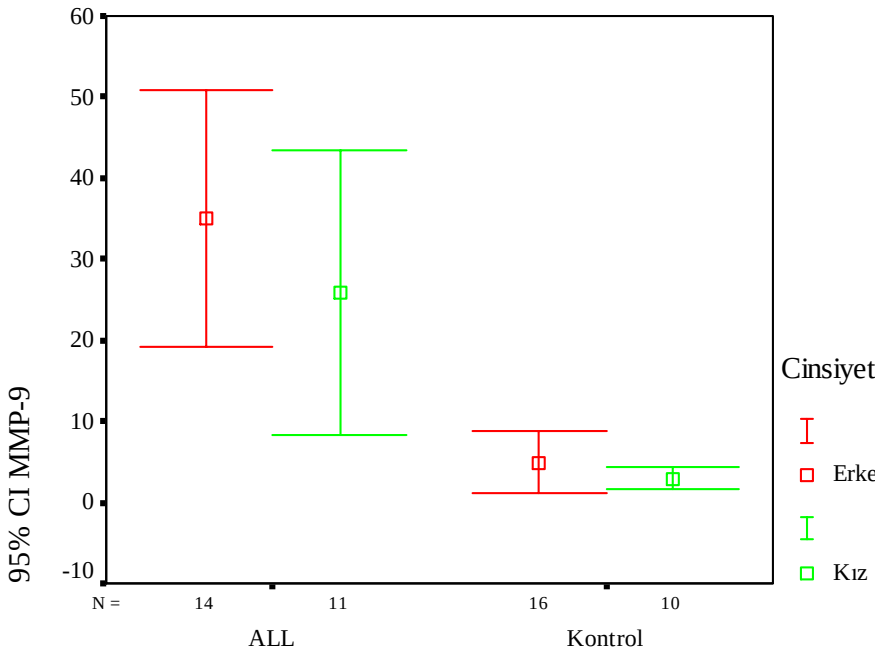
Grafik 8: TIMP-2 geni promotor bölgesi metilasyon oranı hasta ve kontrol gruplarına göre dağılımı

Hastaların (n=26) MMP-2 geni metilasyon düzeyi ile yaş, lökosit, trombosit, hemoglobin ve CD yüzey antijen değerleri karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir ilişki tespit edilemedi (p>0,05). MMP-2 geni metilasyon değerinde hasta ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olduğu (p<0,05) saptandı (Grafik 9 ve Tablo 24).



Grafik 9: MMP-2 geni promotor bölgesi metilasyon oranı hasta ve kontrol gruplarına göre dağılımı

Hastaların (n=26) MMP-9 geni metilasyon düzeyi ile yaş, lökosit, trombosit ve hemoglobin değerleri karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir ilişki tespit edilemedi (p>0,05). Sadece MMP-9 geni metilasyon değeri ile CD22 hücre yüzey antijeni arasında negatif anlamlı bir ilişki (p<0,05; r=-0,477) görüldü. MMP-9 geni metilasyon değerinde hasta ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olduğu (p<0,05) saptandı (Grafik 10 ve Tablo 24).



Grafik 10: MMP-9 geni promotor bölgesi metilasyon oranı hasta ve kontrol gruplarına göre dağılımı

Tablo 24: VEGF-A, TIMP-2, MMP-2 ve MMP-9 genleri promotor bölgeleri metilasyon oranlarının dağılımı

Tanı		VEGFA	TIMP2	MMP2	MMP9
ALL	N	26	26	26	26
	Ortalama	6,55	11,91	29,74	30,96
	SD	14,92	19,89	33,20	26,70
	Minimum	0,01	0,03	0,01	0,28
	Maksimum	50,00	53,66	91,81	93,86
Kontrol	N	26	26	26	26
	Ortalama	0,52	0,71	0,44	4,19
	SD	2,52	3,22	2,17	5,92
	Minimum	0,01	0,02	0,01	0,67
	Maksimum	12,88	16,50	11,06	32,20
p		0,000*	0,000*	0,000*	0,000*

*p<0,05

Genlerin metilasyon oranlarının karşılıklı etkileşimleri incelendiğinde; hasta grubunda, VEGF-A geni ile TIMP-2 ($p<0,05$; $r=0,546$) geni ve TIMP-2 geni ile MMP-9 ($p<0,05$; $r=0,519$) geni arasında pozitif anlamlı ilişki olduğu rapor edildi. Kontrol grubunda ise VEGF-A geni ile MMP-2 ($p<0,05$; $r=0,440$) geni ve TIMP-2 geni ile MMP-9 ($p<0,05$; $r=0,594$) geni arasında pozitif anlamlı bir ilişki olduğu tespit edildi. Genlerin metilasyon oranlarının birbirleri ile ilişkileri Tablo 25 ve Tablo 26'da gösterildi.

Tablo 25 Hasta grubunda genlerin metilasyonlarının karşılıklı etkileşimleri

		VEGF-A	TIMP-2	MMP-2	MMP-9
VEGFA	Spearman Korelasyon	1			
	p				
	N	26			
TIMP2	Spearman Korelasyon	0,546**	1		
	p	0,004			
	N	26	26		
MMP2	Spearman Korelasyon	0,146	0,265	1	
	p	0,477	0,190		
	N	26	26	26	
MMP9	Spearman Korelasyon	0,075	0,519**	0,192	1
	p	0,722	0,008	0,359	
	N	25	25	25	25

*p<0,05 **p<0,01

Tablo 26: Kontrol grubunda genlerin metilasyonlarının karşılıklı etkileşimleri

		VEGF-A	TIMP-2	MMP-2	MMP-9
VEGFA	Spearman Korelasyon	1			
	p				
	N	26			
TIMP2	Spearman Korelasyon	0,250	1		
	p	0,218			
	N	26	26		
MMP2	Spearman Korelasyon	0,440*	0,368	1	
	p	0,025	0,064		
	N	26	26	26	
MMP9	Spearman Korelasyon	-0,017	0,594**	0,347	1
	p	0,933	0,001	0,082	
	N	26	26	26	26

*p<0,05 **p<0,01

4.3.3. İfade ve Metilasyon Analizlerinin Karşılıklı Etkileşimi

Hasta ve kontrol grubunda genlerin ifade ve metilasyon oranlarının karşılıklı etkileşimleri incelendi ve birbirleri ile ilişkileri Tablo 27 ve Tablo 28'de gösterildi.

Genlerin ifade ve metilasyon değerlerinin karşılıklı etkileşimleri incelendiğinde hasta grubunda; MMP-2 geninin metilasyonu ile MMP-2 geninin ifadesi arasında negatif anlamlı ($p<0,05$; $r=-0,488$) bir ilişki olduğu saptandı. Kontrol grubunda ise MMP-2 geni metilasyonu ile MMP-2 geninin ifadesi arasında pozitif anlamlı ($p<0,05$; $r=0,466$) ve MMP-9 geninin metilasyonu ile MMP-9 genin ifadesi arasında negatif anlamlı ($p<0,05$; $r=-0,427$) bir ilişki olduğu belirlendi.

Tablo 27: Hasta grubunda genlerin ifade ve metilasyon değerlerinin korelasyonu

		VEGFA	TIMP1	TIMP2	MMP2	MMP9	VEGFA#	TIMP2#	MMP2#	MMP9#
VEGFA	SK.	1								
	p									
	N	26								
TIMP1	SK.	0,338	1							
	p	0,091								
	N	26	26							
TIMP2	SK.	0,638**	0,453*	1						
	p	0,000	0,020							
	N	26	26	26						
MMP2	SK.	0,627**	0,488*	0,646**	1					
	p	0,001	0,012	0,000						
	N	26	26	26	26					
MMP9	SK.	0,472*	0,410*	0,740**	0,573**	1				
	p	0,015	0,037	0,000	0,002					
	N	26	26	26	26	26				
VEGFA#	SK.	0,347	0,052	0,228	0,136	0,332	1			
	p	0,083	0,800	0,262	0,507	0,097				
	N	26	26	26	26	26	26			
TIMP2#	SK.	0,129	-0,038	-0,036	-0,132	-0,083	0,546**	1		
	p	0,530	0,854	0,860	0,520	0,686	0,004			
	N	26	26	26	26	26	26	26		
MMP2#	SK.	-0,169	-0,278	-0,366	-0,488**	-0,153	0,146	0,265	1	
	p	0,410	0,169	0,066	0,011	0,456	0,477	0,190		
	N	26	26	26	26	26	26	26	26	
MMP9#	SK.	-0,129	-0,175	0,042	-0,258	-0,196	0,075	0,519**	0,192	1
	p	0,538	0,403	0,843	0,213	0,347	0,722	0,008	0,359	
	N	25	25	25	25	25	25	25	25	25

*p<0,05 **p<0,01; #: Metilasyon sonucu; SK.: Spearman Korelasyon

Tablo 28: Kontrol grubunda genlerin ifade ve metilasyon değerlerinin korelasyonu

		VEGFA	TIMP1	TIMP2	MMP2	MMP9	VEGFA#	TIMP2#	MMP2#	MMP9#
VEGFA	SK.	1								
	p									
	N	26								
TIMP1	SK.	-0,212	1							
	p	0,299								
	N	26	26							
TIMP2	SK.	-0,457*	0,123*	1						
	p	0,019	0,548							
	N	26	26	26						
MMP2	SK.	0,153	0,147	0,040	1					
	p	0,457	0,475	0,846						
	N	26	26	26	26					
MMP9	SK.	-0,367	0,090	0,273	-0,227	1				
	p	0,065	0,663	0,177	0,265					
	N	26	26	26	26	26				
VEGFA#	SK.	0,167	0,076	0,061	0,300	0,153	1			
	p	0,415	0,712	0,768	0,136	0,455				
	N	26	26	26	26	26	26			
TIMP2#	SK.	0,269	0,113	-0,180	0,027	-0,267	0,250	1		
	p	0,184	0,582	0,379	0,894	0,187	0,218			
	N	26	26	26	26	26	26	26		
MMP2#	SK.	0,250	0,248	0,053	0,446*	-0,047	0,440*	0,368	1	
	p	0,219	0,222	0,798	0,022	0,820	0,025	0,064		
	N	26	26	26	26	26	26	26	26	
MMP9#	SK.	0,148	0,345	0,121	-0,147	-0,427*	-0,017	0,594**	0,347	1
	p	0,471	0,084	0,555	0,475	0,030	0,933	0,001	0,082	
	N	26	26	26	26	26	26	26	26	26

*p<0,05 **p<0,01, #: Metilasyon sonucu; SK.: Spearman Korelasyon

5. TARTIŞMA

ALL, lenfoblastların anormal bir şekilde kontrolsüz ve aşırı çoğalması sonucunda kemik iliğinin anormal hücreler ile dolması ve buradan kana, beyin-omurilik gibi diğer organ ve dokulara yayılması sonucu belirti veren malign bir kanser türüdür. Genetik ve epigenetik mekanizmalardaki değişimler, ALL gibi birçok kanser türünün temelinde yatan başlıca temel nedenlerdir. Onkogeneze dâhil olan genlerin hipometilasyonu veya hipermetilasyonu ve buna paralel olarak ifadelerinde gerçekleşen değişimler kanserin gelişimine öncülük etmektedir. Çocukluk çağı ALL olgularında, hastalığın gelişimine neden olan genetik değişimler, sinyal yolaklarındaki onkogen ve tümör supresör genlerdeki mutasyonlar geniş oranda çalışılmıştır. Tam remisyonda olan hastalarda nüksün ortaya çıkmasının altında yatan genetik ve epigenetik değişimler halen tam olarak bilinmemektedir. Çalışmamızda, hastaların tanı anında nükse ve/veya anjiyogeneze neden olabilecek olan VEGF-A, TIMP-1, TIMP-2, MMP-2 ve MMP-9 genlerinin ifadesi ve metilasyon değerlerindeki değişiklikler araştırıldı.

ALL, on beş yaş altı çocuklar arasında en yaygın görülen kanserdir. Hastalık en sık 2-5 yaşlar arası görülmektedir. Erkeklerde, kızlara göre daha yüksektir (1:1.2).[60] Çalışmamızda yer alan hastaların, yaş ortalaması 7 yıl, kızların erkeklere oranı ise 1:1.36 olarak hesaplandı. Bu oranların literatür bilgileri ile uyumlu olduğu görüldü. Lökosit, trombosit ve hemoglobin değerleri, ALL hastalarında prognozu belirleyen önemli faktörlerdir. ALL hastalarında, trombositopenin eşik değeri 100.000/mm^3 olarak kabul edilmiştir. Genelde, hastalarda trombosit miktarı 100.000/mm^3'ün altındadır.[10] Çalışmamızda; hastalarımızın 21'inde trombosit değeri 100.000/mm^3'ün altında ve ortalama trombosit miktarının 77.142,31/mm^3 olduğu saptandı. Bu hastalara trombositopeni tanısı konuldu. Hemoglobin değerleri, sağlıklı 6 ay-4 yaş aralığındaki çocuklarda 11-12,5 g/dl, 5-7 yaş çocuklarda 11,5-13 g/dl ve 8-11 yaş aralığındaki çocuklarda 12-13,5 g/dl olmalıdır.[10] Hasta grubumuz bu kriterlere göre değerlendirildi ve 24 olguya anemi teşhisi konuldu (Tablo 16). ALL hastalarının %53'ünde lökosit değeri 10.000/mm^3'ün altında, %30'unda 10.000-49.000/mm^3 aralığında ve %17'inde

50.000/mm^3 üzerinde olduğu ifade edilmiştir.[10] Hastalarımızda ise %46'sının lökosit değeri 10.000/mm^3'ün altında, %27'sinin 10.000-49.000/mm^3 aralığında ve %27'sinin 50.000/mm^3 üzerinde olduğu bulundu. Hastalarımızdaki değerler literatür ile uyumlu ancak, 50.000/mm^3 üzerindeki hasta yüzdemizin daha fazla olduğu gözlendi. Bu hastalarımızın, 3'nün B-ALL ve 3'nün T-ALL olduğu tespit edildi. Yüksek lökosit (>50000/mm3), B-ALL hastalarının %16.8'inde ve T-ALL hastalarının %60'ında tespit edildi. Literatürdeki çalışmalarda da benzer oranlarda yüksek lökosit saptandığı bildirilmiştir.[61,62] ALL'de tanı anında trombositopeni tek başına yeterli değildir. Bunun yanında tam kan sayımı, kemik iliği aspirasyonu, flow sitometri ve sitogenetik değerlendirmeler hastalığın ayırımında önemli diğer parametrelerdir. Ayrıca trombositopeni, ALL tanılı hastalarda kemoterapiye ikincil kemik iliği baskılanması veya hastalığın nüks olması sonucunda da gelişebilir.[63] Bir çalışmada, B-ALL tanısı almış 2 yaşındaki bir erkek çocuğunda, trombositopeni ve makrositoz gözlemlenmesi üzerine 4 nesil aile bireylerinin genetik taramaları sonucunda, otozomal kalıtım gösteren yeni bir trombositopeni ailesi ve makrositoz tespit edilmiştir.[64] Buda bize, trombositopeninin tek başına ALL tanısına yardımcı olamayacağını ancak, ailesel trombositopeninin ALL gelişimine neden olabileceğini düşündürmektedir. Bu konunun ileride yapılacak daha detaylı çalışmalarla aydınlatılacağını düşünmekteyiz.

Hastalarımızın immünofenotip alt grupları açısından dağılımı değerlendirildiğinde; 19'u (%73,1) B-ALL, 5'i (%19,2) T-ALL ve 2'si (%7,7) common ALL olarak sınıflandırıldı (Tablo 17). Hastalarımızda görülen T-ALL oranındaki düşüklük sosyo-ekonomik düzeye ve çevresel faktörlere bağlanabilir. Gelişmiş ülkelerde; ABD ve Batı Avrupa ülkelerinde, T-ALL sıklığı ortalama %13 olarak bildirilirken, Bulgaristan'da %28, Fransa'da %20, Yunanistan'da %26 ve İtalya'da %28,1 oranlarında bildirilmiştir.[65] Fas'ta 1996-2000 yılları arasında, 100 çocukta T-ALL oranı %37 olarak bulunmuştur.[66] Hastalarımızın sağ kalım oranının, %80,9 (n=21) olduğu saptandı. Almanya'da 82 merkezde, 1981 - 2000 yılları arasında elde edilen verilere göre genel sağ kalım oranını %85 olduğu rapor edilmiştir.[67] Hastalarımızın sağ kalım oranı bu çalışma ile benzerlik göstermektedir. Hastaların izlenimleri sırasında, remisyona giren ALL hastalarının %17,4'ünde nüks görüldü. Nüks gelişen hastalar incelendiğinde; immünofenotipik

dağılımları sonucu 2 hastanın B-ALL ve 2 hastanın T-ALL olduğu saptandı. Avusturya, Almanya ve İsviçre'de toplam 2169 çocuk hasta ile ilgili bir çalışmada, nüks oranı %16,2 olarak bulunmuştur.[68] Bu çalışmadaki nüks oranı, hastalarımızdaki oran ile benzerlik göstermektedir.

MTHFR; 5,10 metilen tetrahidrofolatın (MTHF) 5-metil tetrahidrofolata (THF) dönüşümünü katalizleyen ve folat metabolizmasında önemli rol oynayan bir enzimdir. Folat ise homosisteinin metilasyonu ve nükleotid sentezi gibi pek çok biyokimyasal yolda görev yapan bir vitamindir.[69] C677T polimorfizmi sonucunda bu bölgede normalde olması gereken alanin aminoasiti yerine valin aminoasitinin geçmesi sonucu enzimin yapısı bozulduğu için flavin adenin dinükleotidin (FAD) enzime bağlanması etkilenmekte ve MTHFR enzim aktivitesi %55-65 oranında azalmaktadır. Sonuçta, reaksiyon ürünü olan 5,10-MTHF oluşamamakta, yolakta 5-MTHF'nin birikmesine bu da, homosistein birikimine neden olmaktadır.[70] A1298C polimorfizmi, enzimin S-adenozil metiyonin regülatör bölgesini kodlayan karboksi terminal bölgesinde meydana gelir. S-adenozil metiyonin bağlanma bölgesinde meydana gelen konformasyonel değişiklik, enzim aktivitesinin engellenmesine neden olur. C1298C genotipine sahip bireylerde, MTHFR aktivitesinin %60 oranında olduğu bildirilmiştir.[70]

ALL hastalarında, metotreksat ilaç tedavisinden önce MTHFR mutasyon analizi yapılmaktadır. MTHFR C677T ve A1298C mutasyonları olan hastalarda, bu ilacın serumdaki seviyesinde artış ve toksisite görülür. Tedaviden önce, bir işaretçi olarak bu mutasyonlar taranır. Bu ilacın ağır yan etkilerine karşı, sağlam hücreleri korumak adına metotreksat antidotu ve folik asit aktif formu olan kalsiyum folinat verilir. Mutasyon taşıyan hastalara verilen kalsiyum folinat miktarı, mutasyon taşımayanlara oranla daha fazladır. Bununla ilgili bir çalışmada; ALL'li çocuklarda, C677T (CT, TT) (p=0,009) ve A1298C (AC, CC) (p=0,02) polimorfik varyantları taşıyanlarda metotreksat toksisitesinin anlamlı olarak yüksek olduğu gösterilmiştir.[71] Erişkin ve çocuk ALL, AML ve KML hastaları üzerinde yapılan bir çalışmada ise T677T homozigot varyant tipin, C677T heterozigot varyant tipe oranla daha az olduğu rapor edilmiştir.[72] Diğer bir çalışmada, 144 ALL'li çocukta, C677T polimorfizminin kontrol grubuna oranla yüksek olduğu bildirilmiştir.[73] Çalışmamızda ise, ALL hastalarımızın C677T polimorfizm sonuçları

değerlendirildiğinde (n=23); %47,8'inin CC normal, %43,5'inin CT heterozigot ve %8,7'sinin TT homozigot polimorfizmi taşıdığı saptandı (Tablo 18).

MTHFR'nin C677T mutasyonunun, kardiyovasküler hastalıklar, nöral tüp defektleri, felç, Down sendromu, diabetes mellitus, migren, meme ve endometrial kanser gibi hastalıklarda bir risk faktörü olabileceği ileri sürülmüştür.[74-77] Yapılan çalışmalarda, MTHFR'nin T677T genotipli hastalarda, akut lösemi, kolerektal ve akciğer kanserlerine yakalanma riskinin azaldığı, endometrial kanser riskinin arttığı ileri sürülmüştür.[78,79] 677T/1298C heterezigot mozaik bireylerde, nöral tüp defektlerinde önemli bir artışın olduğu bildirilmiştir.[75,76] Buna karşılık, C677C/A1298A homozigot normal bireylerde ALL gelişimi fazla iken, C677T/A1298C heterozigot bireylerde ALL gelişiminin daha az görüldüğü saptanmıştır.[75,79] Bir çalışmada; nüks geçiren ALL hastalarında, nüks etmeyen hastalara ve kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde düşük oranda MTHFR aktivitesi rapor edilmiş ve ALL hastalarında saptanacak MTHFR düzeyinin nüks için ayırıcı bir faktör olabileceği kanısına varılmıştır.[80] C677T polimorfizmi açısından değerlendirildiğinde hastalarımızın 2'sinde TT homozigot polimorfizmi saptanmış, bu hastaların B-ALL olduğu ve kemik iliği tutulumu geçirdikleri tespit edilmiştir. Yukarıdaki çalışmalar; ALL'de, MTHFR'nin C677T ve A1298C polimorfizmlerinin hastalığın tedavisinde önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Buna paralel olarak, varyantların hastalığın nüksü ile ilişkili olup olmadığı ileride yapılacak daha kapsamlı moleküler genetik çalışmalar ile gösterebilecektir.

Trombosit kaynaklı büyüme faktörleri süperailesinin üyesi olan vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ailesi, endotel hücreleri için özgüldür. Vücutta, hem fizyolojik olaylarda hem de tümör büyümesi ve yayılmasını içeren patolojik birçok hastalığın etiyolojisinde yer almaktadır. VEGF-A, endotel hücrelerinin büyüme ve farklılaşması için gereklidir. Vaskülogenez, anjiogenez ve lenfanjiogenezi düzenler. Damar geçirgenliğinde artışa neden olur ve monositler için kemotaktiktir. Endotel hücrelerinde, apoptozisi engelleyerek hücre devamlılığını sağlar ve pro-inflamatuar etkilidir. VEGF-A, lökositlere bağlanabilir. VEGF-A reseptörleri, inflamatuar hücrelerde ve trombositlerde gösterilmiştir.[21,24,25] Genelde, solid tümörlerde çalışılmış olan VEGF ailesi, hematolojik malignensilerde son 15 yıldan itibaren çalışılmaktadır. Hematolojik

kanserlerde ifade edildiği, lösemik hücrenin çoğalmasını, yaşamı ve kemoterapi direncine aracı olduğu bildirilmiştir.[81] VEGF-A geninin ifadesinin, periferal T hücreli lenfoma, diffüz büyük B hücreli lenfoma, mantle hücreli lenfoma, primer efüzyon lenfoması gibi agresif lenfomalarda; ayrıca kronik lenfositer lösemi, kronik myeloid lösemi, akut myeloblastik lösemi ve ALL'de arttığı saptanmıştır.[82-84] Artmış VEGF-A ifadesi, yavaş seyirli lenfomaların agresif forma dönüşümü ve kötü prognozla ilişkilendirilmiştir.[85] Serum VEGF düzeylerinin, Hodgkin dışı lenfomada olaysız sağ kalım ile ilişkili olduğu da saptanmıştır.[86] Çalışmamızda, ALL hastalarının tanı anındaki VEGF-A gen ifade düzeyi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) olduğu bulundu. Hastaların %38.5'inde, ortalamanın üzerinde ifade edildiği kaydedildi. Bu hastalarımızın 2'si common ALL ve 8'i B-ALL alt tipine sahip oldukları görüldü. Yine, bu hastalardan 2'sinin B-ALL olduğu, kemik iliği nüksü geçirdiği ve bir hastanın kaybedildiği fark edildi. Ancak, SSS nüksü olan hastalarımızda (n=2), VEGF-A geninin ortalamanın altında ifade edildiğini saptadık. Bununla birlikte, VEGF-A gen ifadesinin diğer genlerin ifadeleri ile ilişkisi incelendiğinde, TIMP-2, MMP-2 ve MMP-9 genleri ile birlikte anlamlı olarak artış gösterdiği saptandı (Tablo 19, Tablo 20).

ALL hastalarının, plazmasında tanı anındaki VEGFA düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmaz iken zamanla, nüks geçiren hastalarda anlamlı ölçüde artığı bildirilmiştir.[87] Bununla birlikte, hiperdiploid olan hastalarda; VEGFA'nın yüksek düzeyde ifade edildiği gösterilmiştir.[87] Yine, nüks olan ALL tanılı çocuklarda VEGF-A'nın serum konsantrasyonunun nüks olmayanlara oranla anlamlı düzeyde yüksek olduğu bildirilmiştir.[88] VEGF-A ifade düzeylerinin incelendiği bir çalışmada; tanı, remisyon ve nüksteki kemik iliği ifade düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olmadığı bildirilmiştir.[89] Diğer bir çalışmada ise, VEGF-A'nın ifade düzeyi, nüks olan ALL'li çocuklarda yeni tanılı ALL'li çocuklara kıyasla anlamlı oranda yüksek bulunmuştur.[90] VEGF-A geni ifadesi, serum konsantrasyonu ve promotor bölgesi 2578C>A ve 634G>C nükleotid değişimlerinin yüksek nüks riski olan ALL'li çocuklarda, düşük nüks riski olanlara oranla anlamlı olduğu ve bu değişimlerin çocukluk çağı ALL'de prognostik etkiye sahip olabileceği ifade edilmiştir.[91] Ayrıca, VEGF-A gen ifadesinin nükslü hastalarda ilk 14 günde maksimum düzeye ulaştığı ve kemik iliği tutulumu olan

hastalarda, SSS tutulumu olan hastalara oranla daha yüksek olduğu bildirilmiştir.[88] VEGF-A'nın idrardaki ölçümlerinde, tanı anındaki ALL'li çocuklarda bir değişim gözlenmez iken; nüks gözlenen olgularda yüksek oranda bulunduğu bildirilmiştir.[92] Bizde çalışmamızda genin ifadesini, kemik iliği tutulumu olan hastalarda SSS tutulumu olanlara oranla yüksek bulmuş olsakta vaka sayımızın azlığından dolayı anlamlı bulamadık. Fakat ileride sadece nüks etmiş hastalar üzerinde yapılacak çalışmalar bu farkı netleştirecektir.

VEGF-A geninin akciğer kanserinde MMP-9 ile birlikte artış gösterdiği[93], ALL tanılı çocuklarda MMP-2 ve MMP-9 genlerinin ifadesinin VEGF-A tarafından uyarıldığı[94], servikal kanserlerde TIMP-2 geni ile birlikte artış gösterdiği ve bu kanser türü için TIMP-2 ile birlikte bir belirteç olabileceği bildirilmiştir.[95] Bununla birlikte, bir beyin tümörü olan adamantinom kraniyofarinjiyom tanılı hastalarda MMP-2, MMP-9 ve TIMP-2 ile birlikte arttığı ifade edilmiştir.[96] VEGF-A'nın ifadesi hastalarımızda, kontrol grubuna oranla anlamlı olsa da; kemik iliği tutulumu olanlarda, SSS tutulumu olan hastalarımıza oranla yüksek bulunsa da; VEGF-A'nın ALL tanılı çocuklarda hangi genleri nasıl etkilediği ve ifadesindeki artışın hangi değer aralığında olmasının nüks veya sağ kalım oranı için prognostik bir işaretçi olabileceğini ileride yapılacak daha geniş kapsamlı çalışmalar gösterecektir. Mevcut bulgularımız, bu konuda ileride yapılacak çalışmalara kaynak oluşturacaktır.

Ekstrasellüler matriks (EM) proteinleri ve proteoglikanları, organizmalara sadece yapısal destek sağlamakla kalmayıp aynı zamanda hücre çoğalması, farklılaşması ve hareketi yanında yapışma ve doku morfogenezisi gibi pekçok biyolojik aktivitesi olan karmaşık ve dinamik bir yapıdır. EM, tümör dokusunun büyümesi ve yayılmasını önlemek için primer bir bariyer olarak görev yapar. MMP'ler, EM ile bazal membran bileşenlerini parçalama yeteneğine sahip ve aktif bölgesinde çinko içeren, kalsiyuma bağımlı homolog bir enzim ailesidir. Dokunun yeniden yapılanması, morfogenezis, yara iyileşmesi ve normal gelişimsel süreç gibi fizyolojik durumlarda önemli rol oynadıkları gibi tümör hücresi invazyonu, anjiyogenezis ve metastaz gibi patolojik süreçlerde de yer alırlar.[40-52] MMP'leri, inhibe eden bazı faktörler tanımlanmıştır. Bunlardan biri, genel proteinaz inibitörü olarak bilinen ve yüksek

molekül ağırlığı nedeni ile dokulara girmesi zor olan α-2-makroglobulin, diğeri ise antikollajenaz akiviteye sahip olan serum C-reaktif proteindir. Bunun yanı sıra, bazı spesifik MMPs doku inhibitörleri (TIMP) tanımlanmıştır. TIMP'ler, in-vivo koşullarda MMP aktivasyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynar.[43] TIMP'ler, MMP'ler ile koordineli olarak ifade edilmektedirler. Aktif enzimi inhibe etme özelliğine sahip iken otoaktivasyonu inhibe etmemektedir. Bu durum enzimlerin, TIMP'ler ile inaktive olana kadar etki göstermesini sağlamaktadır. Bu şekilde, ekstrasellüler matriks yıkımı kontrol altında tutulmaktadır. TIMP'lerin MMP inhibisyon aktivitesine ek olarak, mitojenik ve hücre büyümesini indükleme aktivitesi de vardır.[43,52,53]

Kanser hücreleri, EM bariyerini aşmak için MMP'leri kullanırlar. Kanser gelişiminde, hücresel organizasyon ve kontakt inhibisyon kaybı ana mekanizmalardan biridir. MMP'ler, hücrelerin hem diğer hücrelere, hem de EM elemanlarının kontakt inhibisyon mekanizmalarını etkiler. Memeli epitelyum hücrelerinde, hücre-hücre bağlantısında desmoplakin ve E-kadhrein kaybına neden olur.[53,55] Çeşitli solid kanser türlerinde yapılan çalışmalarda; MMP'lerin tümör hücrelerinin konak immün cevaptan kaçmasında da görev aldığı, anjiogenez de ise VEGF, FGF ve TGF beta gibi bazı proanjiogenik faktörlerin MMP'ler tarafından aktive edildiği belirtilmiştir.[97,98] MMP-2, MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-2'nin yüksek oranlarda olması hastalığın kötü prognozu ile ilişkilendirilmiştir.[99,100] Ayrıca, oral yassı hücreli karsinomda, renal karsinomda, prostat, mide ve pankreas kanserlerinde fazla ifade edildiği ve tanısal bir faktör olabilceği bildirilmiştir.[101-105] Hematolojik kanserlerde, MMP'lerin ve TIMP'lerin rolü tam olarak aydınlatılamamıştır. Normal kemik iliği dokusunda yer alan eritroblastlarda, megakaryositlerde ve myeloid hücrelerde tespit edilmiştir.[43,50,52] Lösemilerde artan MMP ifadesinin sadece invazyon ve metastazda değil aynı zamanda kanserin büyümesinde de önemli olabileceği vurgulanmıştır.[48] Çalışmamızda ise, ALL hastalarının tanı anındaki MMP-2 geninin ifadesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) olduğu ve hastaların %76,9'unda ortalamanın üzerinde ifade edildiği saptandı. Bu hastalarımızın 2'sinin common ALL, 4'ünün T-ALL ve 14'ünün B-ALL olduğu gözlendi. Yine, bu hastaların 2'sinin B-ALL olduğu ve kemik iliği, 1'inin T-ALL olduğu ve SSS nüksü geçirdiği ve öldüğü, bunun dışında 2 hastanın daha öldüğü rapor

edildi. MMP-9 gen ifadesini kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda, istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) olduğu ve hastaların %61,5'inde ortalamanın üzerinde ifade edildiği bulundu. Bu hastalardan, 2'sinin common ALL, 3'ünün T-ALL ve 11'inin B-ALL olduğu; ayrıca 2'sinin B-ALL olup kemik iliği, 1'inin T-ALL olup SSS tutulumu geçirdiği ve öldüğü, bunun dışında 1 hastanın daha öldüğü gözlendi. MMP-2 ve MMP-9 gen ifadeleri kontrol grubuna oranla yüksek olan hastalarımız risk gruplarına göre değerlendirildiğinde; MMP-2 ifadesi yüksek olan 20 hastanın orta risk grubunda, MMP-9 ifadesi yüksek olan 16 hastanın 2'sinin yüksek ve 14'ünün orta risk grubunda yer aldığını rapor ettik. MMP-2 gen ifadesinin diğer genlerin ifadeleri ile ilişkisi incelendiğinde, VEGF-A, TIMP-1 ve TIMP-2 genleri ile birlikte; bunun yanı sıra MMP-9 geninin, VEGF-A, TIMP-1, TIMP-2 ve MMP-2 genleri ile birlikte anlamlı bir artış gösterdiği bulundu (Tablo 20, Tablo 21).

Literatürde, ALL ile MMP-2 ve MMP-9 genleri arasındaki ilişki ile ilgili az sayıda araştırmaya rastlandı. Araştırmalarda, AML blastlarında ve lösemik hücre hatlarında (HEL, HL-60, K-562 ve KG-1), hem MMP-2 hem de MMP-9'un ifade edildiği ve normal kemik iliği mononüklear hücrelerinde de (olgunlaşmamış CD34+ hücreleri hariç) yalnızca MMP-9 salgılandığı bulunmuştur.[106,107] ALL tanılı çocukların kemik iliği örneklerinin immun boyamalarında, bu hastaların %12'sinin (n=55) MMP-2 ve MMP-9'a pozitif reaksiyon verdiği ve hastalardan 6'sının yüksek riskli ALL grubunda olduğu tespit edilmiştir.[108] Ancak, yeni tanılı ALL'li hastaların %67,1'inde, MMP-2 geninin ifadesinin tespit edilemediği, düşük risk grubunda yer alan hastalarda ise MMP-9 gen ifadesinin anlamlı düzeyde yüksek olduğu bildirilmiştir.[109] Çocukluk çağı ALL'nin klinik karakteri ile MMP (MMP-2, MMP-9) ve TIMP (TIMP-1, TIMP-2) genlerinin ifadelerinin incelendiği bir araştırmada anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.[56] Lenf nodüllerine, karaciğere, dalağa ve akciğerlere lösemik hücrelerin infiltrasyonu ile karakterize edilen T-ALL'de, bu infiltrasyonda MMP-2 ve MMP-9'un etkin olduğu ileri sürülmüştür.[110] Diğer bir çalışmada, hepatosplenomegalisi olan ALL hastalarında, MMP-2/TIMP-1 ve MMP-2/TIMP-2 arasında anlamlı bir ilişkinin olduğu ve MMP/TIMP arasındaki dengenin, ekstramedüller organlara lösemik hücrelerin infiltrasyonu ile yakında ilişkili olabileceği ifade edilmiştir.[56] Buna karşın, MMP2/TIMP2 ve MMP9/TIMP1 oranları ile

hayatta kalma ve lösemi hücrelerinin başka organlara infiltrasyonu arasında anlamlı bir ilişkinin olmadığı bildirilmiştir.[109] Hastalığın tekrarladığı ALL tanılı çocuklarda, yüksek MMP-2 ve MMP-9 ifadesi ile hücrelerin apoptoza gidişi arasında da negatif bir ilişkinin olduğu belirtilmiştir.[111] Ayrıca, MMP-9 geninin yüksek ifadesinin, düşük sağ kalım oranı ile ilişkili olduğu ve çocukluk çağı B-ALL'de hastalığın seyri için MMP-9 ifadesinin bağımsız bir faktör olabileceği ileri sürülmüştür.[111] T-ALL'de artan hipoksinin, MMP-2 ve MMP-9 ifadelerini artırdığı ve bunun sonucunda invazivliği artan bir T-ALL tablosu ile sonuçlandığı saptanmıştır.[112] Meme kanserinde de, hipoksinin ve hipoksi indüklenebilir-1-α'nın (HIF1-α) fazla ifadesinin MMP'ler aracılığı ile tümörün invazyonunda ve yayılımında etkili olabileceği belirtilmiştir.[113] Araştırmalarda bu genlerin artan ifadeleri ile lösemik hücrelerin diğer organlara infiltrasyonu arasında bir bağ olabileceği ifade edilmiş olup; çalışmamızda da artan gen ifadelerini nüks olan ve kaybedilen hastalarda daha sık gözlemlememiz yapılan çalışmaları teyit etmektedir. Buna rağmen, nüks eden ve kaybedilen vaka sayımızın az olması bulgularımızı anlamsız kılsa da; ileride daha çok vaka ile yapılacak çalışmalar bu bulguları anlamlandırabilir.

Çoğu solid tümörlerde ve hematolojik malignansilerde, MMP'ler ile TIMP'ler arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir.[53,55,56,97-100] Sadece hasta sayısı az olan çalışmalarda, herhangi bir ilişkinin varlığından söz edilmemektedir.[56,108,114,115] TIMP'lerin, ekstrasellüler matriksin düzenlenmesi ve MMP'lerin inhibisyonu ile metastaz gelişimine karşı koruyucu bir etkisi olduğu bilinmektedir. Hayvan deneylerinde, malign neoplaziler üzerinde TIMP1'in yararlı etkileri gösterilmiştir.[109,116] Son çalışmalarda, TIMP'lerin aktivitelerinin daha karmaşık olduğu ve tümörün gelişimi sırasında MMP'lerin baskılanmasının yanında diğer genlerin aktivitesini de etkilediği gösterilmişitir.[114,117,118] Artan TIMP1 ifadesinin meme kanseri, papiller tiroid karsinomu, kolorektal kanser, renal karsinom ve non-Hodgkin lenfoma gibi kanser türlerinde kötü prognoz ile ilişkilendirilmiş ve tümörün agresif davranışı ile artan TIMP-1 ifadesinin bağlantılı olabaileceği ileri sürülmüştür.[119-123] Yine, artan TIMP-2 ifadesi kolorektal karsinomda, hepatoselüler karsinomda, pankreatik ve gastrik kanserlerde umut verici prognostik bir işaretleyici olarak tanımlanmıştır.[124-127] Lösemilerde ise; B-hücreli Burkitt lenfoma hücre hatlarında yüksek TIMP-1 ifadesi ve neoplastik T-hücre hatlarında

yüksek TIMP-2 ifadesi ile protein seviyesi tespit edilmiştir.[128-129] Çalışmamızda, hastalarımızın tanı anındaki TIMP-1 gen ifade düzeyi, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin ($p<0,05$) olduğu bulundu (Tablo 20). Hastalarımızın %65,4'ünde TIMP-1 geni ifadesinin ortalamanın üzerinde olduğunu saptadık. Bu hastalardan 2'sinin common ALL, 3'ünün T-ALL ve 12'sinin B-ALL olduğu; 1'nin T-ALL olup SSS nüksü geçirdiği ve öldüğü, bunun dışında 2 hastanın daha öldüğü kaydedildi (Tablo 17, Tablo 20).

Hastalarımızın tanı anındaki TIMP-2 gen ifade düzeyi, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı ($p>0,05$), ancak TIMP-2 geninin hastaların %30,8'inde ortalamanın üzerinde ifade edildiği bulundu. Bu hastalardan 2'sinin common ALL ve 6'sının B-ALL olduğu; 1'nin B-ALL olup kemik iliği nüksü geçirdiği ve 1 hastanın da öldüğü tespit edildi. Hastalarımızda genlerin, diğer genlerin ifadeleri ile ilişkisi incelendiğinde, TIMP-1 geninin TIMP-2, MMP-2 ve MMP-9 genleri ile birlikte; TIMP-2 geninin de, MMP-2 ve MMP-9 genleri ile birlikte anlamlı olarak artış gösterdiği bulundu (Tablo 21). Lenfoblastik neoplazili hücre hatları üzerinde yapılan in-vivo bir çalışmada; T-immunofenotipi ile TIMP-2 ifadesi arasında bir ilişkinin olduğu vurgulanmıştır.[130] ALL tanılı çocuklarda ise; TIMP-2 ve MMP-2 genlerinin T-ALL hastalarında daha yüksek ifade edildiği saptanmıştır.[109] Yine, TIMP-1 geninin ifadesinin yüksek olması ile ALL hastalarının 5 yıldan daha az olaysız sağ kalımı arasında anlamlı bir ilişki olduğu belirtilmiştir.[109] Tanı anındaki yüksek TIMP-1 ifadesinin lösemik hücrelerin SSS infiltrasyonuna eğilimini gösteren bir işaretçi olduğu da ifade edilmiştir.[130] SSS tutulumu olan ALL'li bebeklerde, yüksek TIMP-2 düzeyi ile SSS tutulumu arasında bir ilişki bulunurken, TIMP-1 ifadesi ile ilgili herhangi bir ilişki bulunamamıştır.[56]

Küçük hücreli akciğer kanserinde, yüksek MMP-9 ifadesinin lenf nodülüne metastaz ile ilişkili olduğu ve TIMP-1 ile birlikte artış gösterdiği;[131,132] agresif meme tümörlerinde tümör kaynaklı MMP-9, TIMP-1, MMP-13, ve Her2/neu ifadesiyle birlikte pozitif ilişki gösterdiği saptanmıştır.[133] Mesane, prostat, agresif beyin tümörlerinde ve kolorektal kanserlerde, MMP-2 ve MMP-9'un birlikte artış gösterdiği rapor edilmiştir.[134-137] Böbrek kanserlerinde MMP-2, MMP-9 ve TIMP-2 'de ve akciğer

kanserinde MMP-2, TIMP-2 ve MMP-2/TIMP-2 seviyelerinin birlikte arttığı rapor edilmiştir.[138,139] Bu sonuçlar göstermektedir ki; ALL hastalarında tanı anında VEGF-A, TIMP-1, MMP-2 ve MMP-9 genlerindeki ifade artışının klinik izlemde ve hastalığın seyrinde yeni bilgiler sunabilir. SSS ve kemik iliği gibi farklı tutulumlarda ve daha geniş vaka sayılarında yapılacak moleküler çalışmalar, bu genlerin nüks ile olan ilişkisini daha iyi aydınlatacak ve hastalığın tedavisinde yeni yöntemlerin ortaya çıkmasını sağlayacaktır.

DNA metilasyonu, günümüzde en çok çalışılan epigenetik mekanizmadır. DNA, DNA metil transferaz enzimleri tarafından, CpG bölgelerindeki sitozin nükleotidlerinden metillenir. Sitozin birimleri, 5-karbon pozisyonuna metil gruplarının takılmasıyla 5-metilsitozin halini alır. CpG adacıkları, genlerin promotor bölgelerinde bulunan yaklaşık 500 baz çifti uzunluğunda, %55'ten fazla CG içeren ve metilasyon oranı düşük korunmuş nükleotid dizileridir. Metillenme genlerin transkripsiyonunu, bazı transkripsiyonel aktivatörlerin bağlanmasını engelleyerek veya metillenmiş DNA'ya özgül olarak bağlanan represörlerin katılımını sağlayarak engeller.[17,18] Kısacası metilasyon, genin ifadesini baskılayan genetik bir süreçtir. Kanserlerde de hastalığın ilerleyişi ile genlerin metilasyon durumu önemli ölçüde değişmektedir.[140,141] Epigenetik sonuçlar, tümör-supresör genlerin hipermetile ve proto-onkogenlerin hipometile olduğunu göstermiştir[142].

Çalışmamızda; VEGF-A, TIMP-2, MMP-2 ve MMP-9 genlerinin metilasyon yüzdeleri, hasta ve kontrol grubu arasında karşılaştırıldığında, hastalarda bütün genlerin metilasyon yüzdesinin anlamlı düzeyde yüksek olduğu rapor edildi ($p<0,05$) (Tablo 24). VEGF-A, TIMP-2, MMP-2 ve MMP-9 gen ifadesinin yüksek olduğu hastalarda, bu genlerin metilasyon oranı düşük beklenirken, yüksek tespit edildi. Nitekim bir çalışmada TIMP-2 geninin promotor bölgesinin çeşitli noktalardan metillendiği, ancak bu durumun genin ifadesini etkilemediği bildirilmiştir. Çelişki gibi gözüken bu duruma neden olarak, genin ifadesindeki artışın veya azalışın nokta mutasyonları ile ilgili olabileceği ileri sürülmüştür.[143] Bununla birlikte, nöroblastoma hücrelerinde TIMP-2 geninin promotor bölgesindeki nokta mutasyonun genin ifadesi ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir.[144] Aynı zamanda, T-ALL ve T-hücreli lenfoblastik

lenfoma hücre hatlarında; önemli ölçüde azalmış p21 gen ifadesinin, promotor bölgedeki CpG metilasyonundan bağımsız olduğu ileri sürülmüştür.[145] Fakat PAX5 geninin metilasyonunun B-ALL'de %10-15 iken, T-ALL'de %85 olduğu ve buna paralel olarak gen ifadesinin B-ALL'de T-ALL'ye oranla yüksek olduğu açıklanmıştır.[146] Ayrıca, metil grubunu DNA'ya bağlayan DNA metil transferaz-1 (DNMT-1) gen ifadesinin, akut lösemili hastalarda,[147] DNMT-1, DNMT3A ve DNMT3B genlerinin de AML tanılı hastalarda anlamlı bir artış gösterdi bildirilmiştir.[148] Bu çalışmalar da, kanser hücrelerinde metilasyon düzeyinin arttığını göstermektedir. Kanser hücre hatlarında mikroarray tabanlı bir çalışmada da, genomun farklı bölgelerinde hipermetilasyon ve gen kopya sayısında artış olduğu bildirilmiştir.[149] Hipermetilasyon mekanizmaları ve genomik kararsızlık arasındaki ilişki açık olmamasına rağmen, kopya sayı değişimi ile hipermetilasyon ve hipometilasyonun spesifik genlerin anormal transkripsiyonu için potansiyal mekanizmalar olduğu, çeşitli kanser türlerinde kanser gelişimine neden oldukları ileri sürülmüştür.[150-152]

Tüm bu sonuçlar, genlerin ifadesi ve metilasyon değerleri arasında gözlenen farklılığın nedenleri olarak; genin promotor bölgesindeki nokta mutasyonları veya delesyonların, genin kopya sayısındaki değişimlerinin ve belki de transkripsiyon faktörlerindeki yapısal değişimlerin etkili olabileceğini göstermektedir. Kanser gibi kompleks hastalıklarda, gen ifadesinin sadece metilasyon durumu ile değil, genin kopya sayısı ve promotor bölgedeki delesyon ve nokta mutasyonlarının etkili olabileceği söylenebilir. İleride, daha çok ve farklı hasta grupları üzerinde yapılacak genetik çalışmalar, bu konudaki soru işaretlerini ortadan kaldıracaktır. Tüm bu çalışmalar, ALL'li hastaların tanısına önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. ALL tanısı almış 26 çocuk hastanın %42,3'ü kız ve %57,7'si erkek, yaş ortalaması 7 yıl (83,38 ay) olarak bulundu.
2. Hastaların ortalama lökosit değeri 52020,76/mm3; ortalama trombosit değeri 77142,31/mm3 ve ortalama hemoglobin değeri 8,44g/dl olarak hesaplandı. Hastaların %92,3'ünde anemi, %34,6'sında nötropeni ve %80,8'inde trombositopeni teşhis edildi. Bununla birlikte, hastaların %23,1'inde anemi, nötropeni ve trombositopeni birlikte tespit edildi.
3. FAB klasifikasyonuna göre; hastaların %30.8'inin L1 ve %69.2'sinin L2 alt grubunda yer aldığı görüldü. BFM tanı prognostik kriterine göre; hastaların %84,6'sı MRG ve %15.4'ü HRG olduğu bulundu. Akım sitometrisi ile yapılan immünofenotipik inceleme sonucunda; hastaların %73.1'i B-ALL, %19.2'si T-ALL ve %7.7'si common ALL olarak sınıflandırıldı.
4. Remisyona giren 23 hastanın %17.4'ünde nüks görüldü. Nüks gelişen hastalar; FAB sınıflamasına göre, 1'i L1 ve 3'ü L2 alt grupta yer almaktaydı. BFM grubunun prognostik kriterlerine göre; hastaların 2'si MRG ve 2'si HRG risk grubunda olduğu görüldü. İmmünofenotipik dağılımlarına göre; hastaların 2'si B-ALL ve 2'si T-ALL olarak sınıflandırıldı. Nüksün, 2 hastada (10 ve 13 nolu) SSS tutulumu, diğer 2 hastada ise kemik iliği tutulumu gösterdiği tespit edildi. SSS tutulumu gösteren 2 ALL hastası yaşamını kaybetti.
5. Yirmi üç hastada MTHFR geninin C677T polimorfizm sonuçlarına göre; %47,8'inin CC normal, %43,5'nin CT heterozigot ve %8,7'sinin TT homozigot olduğu saptandı. Aynı zamanda, TT homozigot polimorfizm taşıyan 2 hastanın B-ALL olduğu ve bu hastalarda kemik iliği tutulumu olduğu da görüldü. Aynı genin A1298C polimorfizm sonuçları değerlendirildiğinde; %34,8'nin AA normal, %56,5'nin AC heterozigot ve %8,7'sinin CC homozigot polimorfizm taşıdığı saptandı. Aynı zamanda, CC homozigot polimorfizm taşıyan 2 hastanın B-ALL

olduğu rapor edildi. Bu hastaların, %26.1'nin her iki polimorfizm için heterozigot (CT/AC) olduğu tespit edildi.

6. VEGF-A, TIMP-1, TIMP-2, MMP-2 ve MMP-9 genlerinin ifadesi ile yaş, lökosit, trombosit, hemoglobin ve CD yüzey antijen değerleri karşılaştırıldığında; VEGF-A gen ifadesi ile CD10 yüzey antijeni arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin ($n=21$; $p<0,05$; $r=0,443$) olduğu, TIMP1 gen ifadesi ile trombosit değeri arasında negatif anlamlı bir ilişkinin ($p<0,05$; $r=-0,589$) olduğu bulundu. Bununla birlikte TIMP2 geni ifadesi ile lökosit değeri arasında negatif anlamlı bir ilişki ($p<0,05$; $r=-0,461$) ve MMP9 geni ifadesi ile CD10 yüzey antijeni arasında anlamlı bir ilişki ($n=21$; $p<0,05$; $r=0,470$); ($n=21$) CD20 ($n=21$; $p<0,05$; $r=-0,637$) ve lökosit ($p<0,05$; $r=-0,443$) değerleri arasında negatif anlamlı bir ilişki olduğu görüldü.
7. VEGF-A, TIMP-1, TIMP-2, MMP-2 ve MMP-9 genlerinin ifade düzeyleri, hasta ile kontrol grubu arasında karşılaştırıldığında; VEGF-A ($p<0,05$), TIMP-1 ($p<0,05$), MMP-2 ($p<0,05$) ve MMP-9 ($p<0,05$) için anlamlı bir farkın olduğu ancak, TIMP-2 ($p>0,05$) geni için anlamlı olmadığı tespit edildi.
8. Genlerin ifade oranlarının karşılıklı etkileşimleri incelendiğinde; hasta grubunda VEGFA genin TIMP2 ($p<0,05$; $r=0,638$), MMP2 ($p<0,05$; $r=0,627$) ve MMP9 ($p<0,05$; $r=0,472$) genleri ile; TIMP1 genin TIMP2 ($p<0,05$; $r=0,453$), MMP2 ($p<0,05$; $r=0,488$) ve MMP9 ($p<0,05$; $r=0,410$) genleri ile; TIMP2 genin VEGFA, TIMP1 yanında MMP2 ($p<0,05$; $r=0,646$) ve MMP9 ($p<0,05$; $r=0,740$) genleri ile; MMP2 genin VEGFA, TIMP1, TIMP2 yanında MMP9 ($p<0,05$; $r=0,573$) geni ile anlamlı ilişki gösterdiği bulundu.
9. VEGF-A, TIMP-2, MMP-2 ve MMP-9 genlerinin metilasyon düzeyi ile hastaların yaş, lökosit, trombosit, hemoglobin ve CD yüzey antijen değerleri karşılaştırıldığında; VEGF-A geninin metilasyon düzeyi ile lökosit değerleri arasında negatif anlamlı bir ilişki ($p<0,05$; $r=-0,405$) ve MMP9 geninin metilasyon değeri ile CD22 hücre yüzey antijeni arasında negatif anlamlı bir ilişki olduğu görüldü ($p<0,05$; $r=-0,477$).

10. VEGF-A, TIMP-1, TIMP-2, MMP-2 ve MMP-9 genlerinin metilasyon yüzdesi hasta grubu ile kontrol grubu arasında karşılaştırıldığında; VEGF-A ($p<0,05$), TIMP-2 ($p<0,05$), MMP-2 ($p<0,05$) ve MMP-9 ($p<0,05$) için anlamlı bir fark saptandı.
11. Hasta grubunda genlerin metilasyon oranlarının karşılıklı etkileşimleri incelendiğinde; VEGFA geninin, TIMP2 ($p<0,05$; $r=0,546$) geni ile ve TIMP2 geninin, MMP9 ($p<0,05$; $r=0,519$) geni ile anlamlı ilişki gösterdiği rapor edildi.
12. Genlerin ifade ve metilasyon değerlerinin karşılıklı etkileşimleri incelendiğinde; hasta grubunda, MMP2 geni metilasyon ve ifade düzeyleri arasında anlamlı ($p<0,05$; $r=-0,488$) bir ilişkinin olmadığı gözlendi.
13. Çalışmamızda; tanı anında VEGF-A, TIMP-1, MMP-2 ve MMP-9 genlerinin yüksek olduğu hastalarda nüks gelişimine ve mortalitesine bakıldığında; bu hastaların 4'ünde nüks geliştiği, nüks olan 2 ve nüks olmayan 2 hastanın yaşamını yitirdiği görüldü. Bu hastalarımızda ($n=6$) VEGF-A, TIMP-1, TIMP-2, MMP-2 ve MMP-9 gen ifadelerinin yüksek bulunması bu değerin nüks ve mortalite için tanıda bir belirleyici olabileceğini düşündürmektedir. Ancak ALL'li çocuklarda, hastalığın tekrarlaması konusunda ileride yapılacak daha çok sayıda hastanın yer aldığı çalışmaların, bu konuya daha çok açıklık getireceğini düşünmekteyiz.
14. DNA metilasyonunun genom organizasyonunda önemli bir role sahip olduğu fakat kanserde bu mekanizmanın rolünün karmaşık olduğu; ancak yapılan çalışmalarla bu konunun biraz daha netleşmeye başladığı anlaşılmaktadır. Kanser oluşumunun erken sürecindeki metilasyon değişikliklerinin nasıl oluştuğu ve metilasyonun gen ifadesi üzerindeki etkileri aydınlatılırsa hasta kayıplarının sayısında azalma ve hastalığın ilerleyişinin durdurulmasında umut verici ilerlemeler sağlanacaktır. Hastalarımızda, VEGF-A, TIMP-2, MMP-2 ve MMP-9 genlerinin metilasyon yüzdesinin anlamlı olarak yüksek bulunması, genlerin ifadesi üzerinde metilasyon etkisinin tahmin edilenden daha karmaşık ve araştırılması gereken bir konu olduğunu düşündürmektedir.

15. Literatürde; çeşitli genlerin ifadesinde ve metilasyonundaki artış araştırıcıları, genlerin kopya sayı değişimlerine, promotor bölgelerinde delesyon veya nokta mutasyonlarına ve transkripsiyon faktörlerinde oluşabilecek yapısal değişimlere yönlendirmiştir. Çalışmamızda da; VEGF-A, TIMP-1, TIMP-2, MMP-2 ve MMP-9 genlerinin ifadesindeki ve metilasyonundaki artışın altında yatan nedenlerin bu genlerin kopya sayısı değişimlerinin, promotor bölgesindeki delesyon ve nokta mutasyon taramaları ve transkripsiyon faktörlerinin yapısal değişimlerinin olabileceği ileri sürülebilir.

KAYNAKLAR

1. Silverman BL, Sallan SE. Acute lymphoblastic leukemia. In: Nathan DG, Orkin SH, Ginsburg D, Look TA, Eds. Hematology of infancy and childhood, 6th ed, Philadelphia, WB Saunders Co, 2003; 1135-1166.

2. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010. Bethesda, National Cancer Institute.

3. Steliarova-Foucher E, Stiller C, Kaatsch P, Berrino F, Coebergh JW. Childhood cancer incidence trends in Europe, 1970-1999. *Lancet* 2005; 365: 2088.

4. Uzunhan T, Karakaş Z. Çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemisi. *Çocuk Dergisi* 2012;12(1):6-15.

5. Hjalgrim LL, Westergaard T, Rostgaard K, et al. Birth weight as a risk factor for childhood leukemia: a meta-analysis of 18 epidemiologic studies. *Am J Epidemiol* 2003; 158: 724–35.

6. Ahlbom A, Day N, Feychting M, et al. A pooled analysis of magnetic fields and childhood leukaemia. *Br J Cancer* 2000; 83: 692–98.

7. Buffler PA, Kwan ML, Reynolds P, Urayama KY. Environmental and genetic risk factors for childhood leukemia: appraising the evidence. *Cancer Invest* 2005; 23: 60–75.

8. Arceci RJ, Hann IM, Smith OP. Pediatric Hematology 3th ed Malden, Massechusetts Blackwell, 2006 pp 450-81.

9. Celkan T. Akut Lenfoblastik Lösemi, Özkan A (edt.). *Pediatrik Onkoloji* 2009;(451-462).

10. Imbach P., Kühne Th., Arceci R. Pediatric Oncology: A Comprehensive Guide. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2006.

11. Campana D, Behm FG. Immunophenotyping of leukemia. *J Immunol Methods.* 2000;243(1-2): 59-75.

12. Dewald GW, Ketterling RP, Wyatt WA, Stupca PJ. Cytogenetic studies in neoplastic hematologic disorders. In Clinical Laboratory Medicine, Second edition. Edited by KD McClatchey. Baltimore, Williams and Wilkens, 2002.

13. Pui C-H, Rubnitz JE, Hancock ML, et al. Reappraisal of the clinical and biologic significance of myeloid-associated antigen ekspression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1998;16:3768-3773.

14. Rubnitz JE, Pui CH. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *The Oncologist* 1997, 2:374-380.

15. Celkan T. Çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemisi. *Klinik Gelişim* 2007, 20(2):14-26.

16. İzmirli M. Epigenetik Mekanizmalar ve Kanser Tedavisinde Epigenetik Yaklaşımlar. *Van Tıp Dergisi*: 2013;20(1): 48-51.

17. Bora G, Erdem Yurter H. Epigenetik hastalıklar ve tedavi yaklaşımları. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2007; 38:48-54.

18. Geoffey M. Cooper, Robert E. Hücre: Moleküler Yaklaşım. İzmir Tıp Kitapevi, İzmir, 2006.

19. Erişim:www.kimyam.net/2013/07/dna-deoksiribonukleik-asit.html. 28.02.2014.

20. Erişim:www.shechterlab.org/2009/science/chromatin-and-the-histone-code/ 28.02.2014.

21. Yazır Y, Gonca S, Filiz S, Dalçık H. Endotel Hücreleri İçin Önemli Bir Protein Ailesi; Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (Vegf), Ailenin Üyeleri, Yapısı ve Sentezi. *C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi* 2004;26 (4):181 – 184.

22. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med* 2005;9:777-794.

23. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:C1358-C1366.

24. Zachary I, Gliki G. Signalling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res* 2001;49:568-81.

25. Erol N. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü ve Anti-VEGF Ajanlar. *Ret-Vit* 2007;15:Özel Sayı:35-40.

26. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;146:1029-39.

27. Harper SJ, Bates DO. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nature Reviews Cancer* 2008;8:880-887.

28. Eri**ş**im: http://www.onclive.com/ 16.02.2014

29. Tayebjee MH, MacFadyen RJ, Gregory YH. Lip Extracellular matrix biology: a new frontier in linking the pathology and therapy of hypertension? *Journal of Hypertension* 2003,21:2211–2218.

30. Lodish H BA, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Moleculer Cell Biology. 4th ed. New York: W.H. Freeman and Company; 1999.p.968-93.

31. Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J* 1998;12(12):1075-95.

32. Garcia-Touchard A, Henry TD, Sangiorgi G, Spagnoli LG, Mauriello A, Conover C, et al. Extracellular proteases in atherosclerosis and restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(6):1119-27.

33. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002; 90(3):251-62.

34. Lambert E, Dasse E, Haye B, Petitfrere E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;49(3):187-98.

35. Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274(31):21491-4.

36. Bode W, Maskos K. Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Biol Chem* 2003;384:863-872.

37. Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol* 2001;11:S37-S43.

38. Visse R., Nagase H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases Structure, Function, and Biochemistry. *Circ Res.* 2003;92:827-839.

39. Arulmozhi D. Kandasamy, Ava K. Chow, Mohammad A.M. Ali, and Richard Schulz. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. *Cardiovascular Research* 2010;85, 413–423

40. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 2005;9(2): 267-285.

41. Kuzuya M, Iguchi A. Role of matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *J Atheroscler Thromb.* 2003; 10(5): 275-282.

42. Lijnen HR. Metalloproteinases in development and progression of vascular disease. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003-2004; 33: 275-81.

43. Apakkan S, Özmen D, Bayındır O, Metalloproteinazlar, inhibitörleri ve ilişkili Fizyolojik ve Patolojik Durumlar. *Turkiye Klinikleri J Med Sci,* 2001;21:332-342.

44. Toi M, Ishigaki S, Tominaga T. Metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Breast Cancer Res Treat* 1998;52:113-124.

45. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research.* 2006;69:562 – 573.

46. Price S, Greaves DR, Watkıns H. Identification Of Novel, Functıonal Genetic Variants In The Human Matrix Metalloproteinase -2 Gene. *The Journal Of Biological Chemistry* 2001;10:7549,7558.

47. Morgunova E. et al. Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed, Science 1999;284: 1667-1670.

48. G. Klein, E. Vellenga, M.W. Fraaije, W.A. Kamps, E.S.J.M. de Bont. The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 2004;50:87–100.

49. Chakrabarti S, Patel KD. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. *Exp Lung Res* 2005; 31(6):599-621.

50. Jhon A, Tuszynskı G. The Role Of Matrix Metalloproteinases In Tumor Angiogenesis And Tumor Metastasis. *Pathology Oncology Research*. 2001;7: 14-23.

51. Reel B. Matriks Metalloproteinaz Enzimleri ve Ateroskleroz. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2006, 26:527-537.

52. Görüroğlu Öztürk Ö. Matriks Metalloproteinaz Enzim Ailesi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi. Archives Medical Review Journal* 2013; 22(2):209-220.

53. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. Biol Chem 1997;378:151-60.

54. Lorenzl DS, Albers PA, LeWitt JW, Chirichigno SL, Hilgenberg ME, Cudkowicz MF. Tissue inhibitors of Matrix metalloproteinases are elevated in cerebrospinal fluid of Neurodegenerative diseases. *Journal of the Neurological Sciences* 2003; 207:71-76.

55. Öncel M. Matriks Metalloproteinazlar ve Kanser. *Eur J Basic Med Sci* 2012;2(3): 91-100.

56. Suminoe A, Matsuzaki A, Hattori H, Koga Y, Ishii E, Hara T. Expression of matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor of MMP (TIMP) genes in blasts of infant acute lymphoblastic leukemia with organ involvement. *Leukemia Research* 2007;31:1437–1440.

57. Bode W, Maskos K. Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Biol Chem* 2003;384:863-872.

58. Brew K, Dinakarpandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: Evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000;1477:267-283.

59. Tveita et al. Glomerular matrix metalloproteinases and their regulators in the pathogenesis of lupus nephritis. *Arthritis Research & Therapy* 2008;10:229.

60. Nigro L.L. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2013;35:245-252.

61. Pui CH, Crist WM. Acute lymphoblastic leukemia. In: Pui CH editor. Childhood Leukemias Cambridge: *University Press,* 1999, s: 288-312.

62. Uckun FM, Sensel MG, Sun L et al. Biology and treatment of children Tlineage acute lymphoblastic leukaemia*. Blood* 1998;91: 735–46.

63. Bayhan T, Ünal **Ş**, Gümrük F, Çetin M. Immune thrombocytopenic purpura during maintenance phase of acute lymphoblastik leukemia: a rare co-existence requiring high degree of suspicion. A case report and review of literature. *Turk J Hematol*, TJH 33341.

64. Escher R, Wilson P, Carmichael C, Suppiah R, Liu M, Kavallaris M, Cannon P, Michaud J, Scott HS. A pedigree with autosomal dominant thrombocytopenia, red cell macrocytosis, and an occurrence of t(12:21) positive pre-B acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2007;39:107–114.

65. Taskov H, Dimitrova E, Serbinova M, et al. Immunological subtypes of childhood acute lymphoblastic leukemia in Bulgaria. *Leuk Res*. 1995;19(11):877-81.

66. Dakka N, Bellaoui H, Khattab M, et al. Immunologic profile and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) in Morocco. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2007;29(8):574-80.

67. Moricke A, Zimmermann M, Reiter A, et al. Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia* 2010 Feb;24(2):265-84.

68. Möricke A, Reiter A, Zimmermenn M. Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival. *Blood* 2008;11:4477-89.

69. Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylen tetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: HuGE review. *American Journel of Epidemiology*, 2000; 151:862-877.

70. İzmirli M, Aldemir Ö, Gögebakan B, Alptekin D. MTHFR 677 C>T Polimorfizmi ile ilintili olduğu düşünülen hastalıklara dair Türk populasyonundaki çalışmalar. *Dicle Tıp Dergisi,* 2014; 41 (1): 244-256.

71. Kantar M, Kosova B, Cetingul N, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C gene polymorphisms and therapy-related toxicity in children treated for acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2009;50:912-917.

72. Deligezer U, Akisik E, Dalay N. Genotyping of the MTHFR gene polymorphism, C677T in patients with leukemia by melting curve analysis. *Mol Diagn* 2003;7:181-185.

73. Balta G, Yuksek N, Ozyurek E, Ertem U, Hicsonmez G, Altay C, Gurgey A. Characterization of MTHFR, GSTM1, GSTT1, GSTP1, and CYP1A1 genotypes in childhood acute leukemia. *Am J Hematol.* 2003;73(3):154-60.

74. Markus HS, Ali N, Swaminathan R, Sankaralingam A, Molloy J, Powell J. A common polymorphism in the Methylenetetrahydrofolat Reductase gene, homocysteine, and ischemic cerebrovascular disease. *Stroke.* 1997;28;1739-1743.

75. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, Rozen R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in Methylenetetrahydrofolat Reductase. *Nat Genet.* 1995;10;111-3.

76. Choi BO, Kim NK, Kim SH, Kang MS, Lee S, Ahn JY, Kim OJ, Kim S, Oh D. Homozygous C677T mutation in the MTHFR gene as an independent risk factor for multiple small-artery occlusions. *Thrombosis Research.* 2003;111;39-44.

77. Lopaciuk S, Bykowska K, Kwiecinski H, Mickielewicz A, Czlonkowska A, Mendel T,Kuczynnska-Zardzewialy A, Szelagowska D, Windyga J, Schroder W, Hermann FH, Jedrzejowska H. Factor V Leiden, prothrombin gene G20210A variant, and Methylenetetrahydrofolat Reductase C677T genotype in young adults with ischemic stroke. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2001;7;346-350.

78. Morita H, Kurihara H, Tsubaki S, Sugiyama T, Hamada C, Kurihara Y, Shindo T, Ohhashi Y, Kitamura K, Yazaki Y. Methylenetetrahydrofolat Reductase Gene Polymorphism and Ischemic Stroke in Japanese. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.* 1998;18;1465-1469.

79. Li Z, Sun Li, Zhang H, Liao Y, Wang D, Zhao B, Zhu Z, Zhao J, Ma A, Han Y, Wang Y, Shi Y, Ye J, Hui R. Elevated Plasma Homocysteine Was Associated With Hemorrhagic and Ischemic Stroke, but Methylenetetrahydrofolat Reductase Gene C677T Polymorphism Was a Risk Factor Thrombotic Stroke. *Stroke.* 2003;34(9);2085-2090.

80. Kuzelicki NK, Milek M, Jazbec J, Mlinaric-Rascan I. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) low activity genotype reduce the risk of relapse-related acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Leukemia Research* 2009;33:1344–1348.

81. Aliparast MR, Almasi S, Sanaat Z, Movasaghpoor A, Dizaji RK, Bazargani HS. Akut Miyeloid Lösemili İranlı Hastaların Periferik Kan Mononükleer Hücrelerinde VEGF-A ve VEGF-C Gen Ekspresyonu. *Turk J Hematol.* 2013; 30(2): 137-143.

82. Beamon Agarwal KNN, Re: Doussis-Anagnostopoulou et al Vascular endothelial growth factor (vegf) is expressed by neoplastic hodgkin-reed-sternberg cells in hodgkin's disease. *J Pathol* 2002; 197: 677-683.

83. Chen H, Treweeke AT, West DC, Till KJ, Cawley JC, Zuzel M et al. In vitro and in-vivo production of vascular endothelial growth factor by chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2000; 96(9):3181-7.

84. Lozano-Santos C, Martinez-Velasquez J, Fernandez-Cuevas B, Polo N, et al.Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA) Gene Polymorphisms Have an Impact on Survival in a Subgroup of Indolent Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Plos One.* 2014;9(6):101063.

85. Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, Weng AP, Kutok JL, Aguiar RCT et al. Diffuse large b-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 2002; 8(1):68-74.

86. Francesco Bertolini MP, Fedro P, Saverio C, Alberto A, Pier Francesco F, Emilia C, Aron G, Giovanni M. Angiogenic growth factors and endostatin in non-hodgkin's lymphoma. *Br. J. Haematol.* 1999; 106(2):504-9.

87. Schneider P, Vasse M, Corbi`ere C, Legrand E, Marie-Cardine A, Boquet C, Cazin L, Vannier JP. Endostatin variations in childhood acute lymphoblastic leukaemia—Comparison with basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor. *Leukemia Research* 2007;31:629–638.

88. Avramis IA, Panosyan EH, Dorey F, et al. Correlation between HighVascular Endothelial Growth Factor-A Serum Levels and Treatment Outcome in Patients with Standard-Risk Acute Lymphoblastic Leukemia: A Report from Children's Oncology Group Study CCG-1962. *Clin Cancer Res* 2006;12:6978-6984.

89. Leblebisatan G, Antmen B, **Şaş**maz **İ**, Kılınç Y. Vascular Endothelial Growth Factor Levels in Childhood Acute Lymphoblastic and Myeloblastic Leukemia. *Indian J Hematol Blood* Transfus 2012;28(1):24–28.

90. Koomagi R, Zintl F, Sauerbrey A, Volm M. Vascular Endothelial Growth Factor in Newly Diagnosed and Recurrent Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia as Measured by Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction. *Clinical Cancer Research* 2001;7,3381–3384.

91. Demacq C,Vasconcellos VB, Izidoro-Toledo TC, Silva Silveira V, Canalle R, Queiroz RGP, Tone LG, Tanus-Santos JE. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and endothelial nitric oxide synthase (NOS3) polymorphisms are associated with high relapse risk in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Clinica Chimica Acta* 2010;411:1335–1340.

92. Schneider P, Vasse M, Legrand E, Callat MP, Vannier JP. Have urinary levels of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular vascular endothelial growth factor, a prognostic value in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2003;122:163–4.

93. Yurdakul A, Akyürek N, Yılmaz **Ş**, Karakaya J, Memi**ş** L, Öztürk C. Prognostic impact of matrix metalloproteinases (MMP-9 and MMP-2) and vascular endothelial growth factor expression in non-small cell lung cancer. *Turk J Med Sci* 2012; 42 (2): 281-288.

94. Florent Poyer, Bérénice Coquerel, Rassa Pegahi, Lionel Cazin, Vic Norris, Jean-Pierre Vannier, Marek Lamacz. Secretion of MMP-2 and MMP-9 induced by VEGF autocrine loop correlates with clinical features in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Research.* 2009:33:407-417.

95. Braicu EI, Gasimli K, Richter R, Nassir M, Kümmel S, Blohmer JU, Yalcinkaya I, Chekerov R, Ignat I, Ionescu A, Mentze M, Fotopoulou C, Pop C, Lichtenegger W, Sehouli J; Tumor Bank Ovarian Cancer (TOC); German North Eastern Society for Gynecological Oncology (NOGGO). Role of serum VEGFA, TIMP2, MMP2 and MMP9 in monitoring response to adjuvant radiochemotherapy in patients with primary cervical cancer--results of a companion protocol of the randomized NOGGO-AGO phase III clinical trial. *Anticancer Res.* 2014 Jan;34(1):385-91.

96. Gong J, Zhang H, Xing S, Li C, Ma Z, Jia G, Hu W. High expression levels of CXCL12 and CXCR4 predict recurrence of adamanti-nomatous craniopharyngiomas in children. *Cancer Biomark.* 2014 Jan 1;14(4):241-51.

97. Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, Lien HC, Huang SC, Lin RH. A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression1. *Cancer Res.* 2001;61:237–42.

98. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 2005;9:267-85.

99. Gohji K, Fujimoto N, Fujii A, Komiyama T, Okawa J, Nakajima M. Prognostic significance of circulating matrix metalloproteinase-2 to tissue inhibitor of metalloproteinases-2 ratio in recurrence of urotelial cancer after complete resection. *Cancer.* 1996;56(14):3196-8.

100. Sier CFM, Kubben FJGM, Ganesh S, Heerding MM, Griffioen G, Hanemaaijer R. Tissue levels of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 are related to the overall survival of patients with gastric carcinoma. *Br J Cancer* 1996;74:413.

101. Lu L, Xue X, Lan J, et al. MicroRNA-29a upregulates MMP2 in oral squamous cell carcinoma to promote cancer invasion and anti-apoptosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2014;68:13–19.

102. Moroz A, Delella FK, Lacorte LM, Deffune E, Felisbino SL. Fibronectin induce MMP2 expression in human prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2013;430:1319-1321.

103. Yang FQ, Liu M, Yang FP, Zhang XL, Yang B, Guo CC, Huang JH, Che JP, Yan Y, Zheng JH. Matrix metallopeptidase 2 mediates MHC class I polypeptide-related sequence A (MICA) shedding in renal cell carcinoma. *Actas Urológicas Españolas (English Edition)*, 2014;38:172-178.

104. Allgayer H, Heiss MM, Schildberg FW. Prognostic factors in gastric cancer. *British Journal of Surgery* 1997, 84, 1651-64.

105. Evans JD, Ghaneh P, Kawesha A, Neoptolemos JP. Role of Matrix Metalloproteinases and their inhibitors in pancreatic cancer. *Digestion.* 1997; 58:520-8.

106. Janowska-Wieczorek A, Marguez LA, Matsuzaki A, Hashmi HR, Larrat LM, Boshkov LM, et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and -9) and tissue Inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and -2) in acute myelogenous leukaemia blasts: comparison with normal bone marrow cells. *Br J Haematol* 1999;105:402.

107. Ries C, Loher F, Zang C, Petrides PE. Matrix metalloproteinase production by bone marrow mononuclear cells from normal individuals and patients with acute and chronic myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Clin Cancer Res* 1999;5:1115.

108. Kuittinen O, Savolainen ER, Koistinen P, Möttönen M, Turpeenniemi-Hujanen T. MMP-2 and MMP-9 expression in adult and childhood acute lymphatic leukemia (ALL). *Leukemia Research* 2001;25:125–132.

109. Scrideli CA, Abdala Cortez MA, Yunes JA, Paula Queiróz RG, Valera ET, Mata JF, Caminada Toledo SR, Pavoni-Ferreira P, de Martino Lee ML, Petrilli AS, Brandalise SR, Tone LG. mRNA expression of matrix metalloproteinases (MMPs) 2 and 9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMPs) 1 and 2 in childhood acute lymphoblastic leukemia: Potential role of TIMP1 as an adverse prognostic factor. *Leukemia Research* 2010;34:32–37.

110. DeClerck YA, Mercurio AM, Stacks MS, Chapman HA, et al. Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section. *Am J Pathol* 2004,164:1131-1139.

111. Schneider P, Costa O, Legrand E, et al. In vitro secretion of matrix metalloprotease 9 is a prognostic marker in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Res.* 2010;34,24–31.

112. Zou J, Li P, Lu F, Liu N, Dai J, Ye J, et al. Notch1 is required for hypoxia-induced proliferation, invasion and chemoresistance of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Journal of Hematology & Oncology.* 2013, 6:3.

113. Munoz-Najar UM, Neurath KM, Vumbaca F, Claffey KP. Hypoxia stimulates breast carcinoma cell invasion through MT1-MMP and MMP-2 activation. *Oncogene* 2006, 25:2379–2392.

114. Hornebeck W, Lambert E, Petitfrere E, Bernard P. Beneficial and detrimental influences of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in tumor progression. *Biochimie* 2005;87:377–83.

115. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001;25:402–8.

116. Ikenaka Y, Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Noguchi R, Tsujinoue H, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) inhibits tumor growth and angiogenesis in the TIMP-1 transgenic mouse model. Int J Cancer 2003;105:340–6.

117. Chirco R, Liu XW, Jung KK, Kim HR. Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer Metastasis Rev*. 2006;25:99–113.

118. Duffy MJ, McGowan PM, Gallagher WM. Cancer invasion and metastasis: changing views. *J Pathol* 2008;214:283–93.

119. Hawthorn L, Stein L, Varma R, Wiseman S, Loree T, Tan D. TIMP1 and SERPINA overexpression and TFF3 and CRABP1 underexpression as biomarkers for papillary thyroid carcinoma. *Head Neck* 2004;26:1069–83.

120. Nielsen HJ, Brunner N, Frederiksen C, Lomholt AF, King D, Jorgensen LN, et al. Plasma tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1): a novel biological marker in the detection of primary colorectal cancer Protocol outlines of the Danish-Australian endoscopy study group on colorectal cancer detection. *Scand J Gastroenterol* 2008;43:242–8.

121. Kallakury BV, Karikehalli S, Haholu A, Sheehan CE, Azumi N, Ross JS. Increased expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 correlate with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:3113–9.

122. Kossakowska AE, Urbanski SJ, Edwards DR. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) RNA is expressed at elevated levels in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1991;77:2475–81.

123. Kossakowska AE, Urbanski SJ, Janowska-Wieczorek A. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors—expression, role and regulation in humanmalignant non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2000;39:485–93.

124. Erdamar AS, Aydın O, Demir G, Doğusoy G, Goksel S. MMP-2 and TIMP-2 expression in colorectal carcinoma: could be used as poor prognostic marker. XXIVth International Congress of the International Academy of Pathology, October 5-11, 2002, Amsterdam, the Netherlands, Histopathology 2002.

125. Qin LX, Tang ZY. The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8(3):385-392.

126. Li P, Xu Q, Zhang D, Li X, Han L, Lei J, Duan W, Ma Q, Wu Z, Wang Z. Upregulated miR-106a plays an oncogenic role in pancreatic cancer. *FEBS Lett.* 2014;588(5):705-12.

127. Zhu M, Zhang N, He S, Lui Y, Lu G, Zhao L. MicroRNA-106a targets TIMP2 to regulate invasion and metastasis of gastric cancer. *FEBS Lett.* 2014;588(4):600-7.

128. Guedez, L., Courtemanch, L. & Stetler-Stevenson, M. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 induces differentiation and an antiapoptotic phenotype in germinal center B cells. *Blood*. 1998; 92, 1342–1349.

129. Stetler-Stevenson, M., Mansoor, A., Lim, M., Fukushima, P., Kehrl, J., Marti, G., Ptaszynski, K., Wang, J. & Stetler-Stevenson, W.G. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in reactive and neoplastic lymphoid cells. *Blood.* 1997; 89, 1708–1715.

130. Stetler-Stevenson M, Mansoor A, Lim M, Fukushima P, Kehrl J, Marti G, et al. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in reactive and neoplastic lymphoid cells. *Blood* 1997;89: 1708–15.

131. Wang J, Miao LJ, Wu YM, Wu YJ, Wang XC. Expression of AKT2, Cyclin D1, and MMP-9 and Their Correlations to Clinicopathologic Features of Non-small Cell Lung Cancer. *Ai Zheng* 2006;25(1):69-72.

132. Soydinç H, Çamlıca H, Duranyıldız D, et al. Matriks metalloproteinazlar ve akciğer kanseri. *Türk Onkoloji Dergisi*. 2006;21:53-56.

133. Zhang B, Cao X, Liu Y, et al. Tumor-derived matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) correlates with poor prognoses of invasive breast cancer. *BMC Cancer* 2008; 83: 1-10.

134. Gerhards S, Jung K, Koenig F, et al. Excretion of matrix metalloproteinases 2 and 9 in urine is associated with a high stage and grade of bladder carcinoma. *Urology* 2001; 57: 675-9.

135. Hilska M, Roberts PJ, Collan YU, et al. Prognostic significance of matrix metalloproteinases-1, -2, -7 and -13 and tissue inhibitors of metalloproteinases-1, -2, -3 and -4 in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2007; 121: 714-23.

136. Morgia G, Falsaperla M, Malaponte G, et al. Matrix metalloproteinases as diagnostic (MMP-13) and prognostic (MMP-2, MMP-9) markers of prostate cancer. *Urol Res* 2005;33: 44-50.

137. Sawaya RE, Yamamoto M, Gokaslan ZL, et al. Expression and localization of 72 kDa type IV collagenase (MMP-2) in human malignant gliomas in vivo. *Clin Exp Metastasis* 1996; 14: 35-42.

138. Öncel M, Aköz M, Öncel M, Kıyıcı A, Apilioğulları B. MMP-2, TIMP-2, and MMP-2/TIMP-2 complex levels in epidermoid lung cancer. *Turk J Med Sci* (2013) 43: 104-109.

139. Gürocak Ö, Sözen S, Üre İ, Erdem Ö, Akyol G, Alkibay T. Impact of tissue matrix metalloproteinase and its inhibitors on prognosis of patients with renal cell carcinoma. *Türk Üroloji Dergisi*: 2008; 34 (2): 149-154.

140. Weber M, et al., Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat. Genet.* 2005. 37, 853–862.

141. Wilson IM, et al., Epigenomics: mapping the methylome. *Cell Cycle* 2006, 5, 155–158.

142. Karpinets TV, Foy BD. Tumorigenesis: the adaptation of mammalian cells to sustained stress environment by epigenetic alterations and succeeding matched mutations. *Carcinogenesis* 2005;26, 1323–1334.

143. Hammani K, Blakis A, Morsette D, Bowcock AM, Schmutte C, Henriet P, DeClerck YA. Structure and characterisation of the human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene, *J. Biol. Chem.* 1996;271:25498–25505.

144. Cappabianca L, Farina AR, Tacconelli A, Mantovani R, Gulino A, Mackay AR. Reconstitution of TIMP-2 expression in SH-SY5Y neuroblastoma cells by 5-azacytidine is mediated transcriptionally by NF-Y through an inverted CCAAT site. *Experimental Cell Research*. 2003;286:209–218.

145. Scott SA, Kimura T, Donga WF, Ichinohasama R, Bergen S, Kerviche A, Sheridan D, DeCoteau JF. Methylation status of cyclin-dependent kinase inhibitor genes within the transforming growth factor beta pathway in human T-cell lymphoblastic lymphoma/leukemia. *Leukemia Research*. 2004;28:1293–1301.

146. Hüttera G, Kaiser M, Neumann M, Maximilian Mossner, et al. Epigenetic regulation of PAX5 expression in acute T-cell lymphoblastic leukemia. *Leukemia Research* 2011;35:614–619.

147. Melki JR, Clark S. DNA methylation changes in leukaemia. *Cancer Biology.* 2002:12;347–357.

148. Mizuno S, Chijiwa T, Okamura T, Akashi K, Fukumaki Y, Niho Y, Sasaki H. Expression ofDNAmethyltransferasesDNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 2001;97:1172–1179.

149. Park JJ, Kang JK, Hong S, Ryu ES, Kim J, Lee JH, Seo JS. Genome-wide combination profiling of copy number and methylation offers an approach for deciphering misregulation and development in cancer cells. *Gene* 2008;407:139–147.

150. Santini V, Kantarjian HM, Issa JP. Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications. *Ann. Intern. Med.* 2001;134, 573–586.

151. Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J. Pathol.* 2002;196, 1–7.

152. Fruhwald MC, Plass C. Global and gene-specific methylation patterns in cancer: aspects of tumor biology and clinical potential. *Mol. Genet. Metab.* 2002;75, 1–16.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Yozgat'ın Yerköy ilçesinde doğdu. İlköğretimini Yerköy Mehmet Akif Ersoy İlkokulu'nda ve Yerköy Şehit Şaban Karadoğan Ortaokulu'nda, lise eğitimini Yozgat Erdoğan Akdağ Anadolu Öğretmen Lisesi'nde tamamladı. 2006 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu. 2007 yılında Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı. 2010 yılında yine Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda doktora öğrenimine başladı.