

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**ÇOCUKLUK ÇAĞI HEMATOLOJİK MALİGNİTELERİNDE
MİKRORNA'LARIN PROGNOSTİK ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. FUNDA AKPINAR**

DANIŞMAN
PROF. DR. AZİZ POLAT

DENİZLİ-2015

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**ÇOCUKLUK ÇAĞI HEMATOLOJİK MALİGNİTELERİNDE
MİKRORNA'LARIN PROGNOSTİK ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. FUNDA AKPINAR**

**DANIŞMAN
PROF. DR. AZİZ POLAT**

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 10.06.2014 tarih 2014TPF026 no'lu kararı ile desteklenmiştir.

DENİZLİ-2015

Prof. Dr. Aziz POLAT danışmanlığında Dr. Funda AKPINAR tarafından yapılan "Çocukluk çağı malignitelerinde mikroRNA'ların prognostik etkisi" başlıklı tez çalışması 12.10.2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN : Prof. Dr. Arzu P. Çat

ÜYE : Prof. Dr. Ali AYATA

ÜYE : Doç. Dr. Yorumcu İpek Balcı

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.....

Pamukkale Üniversitesi

Tıp Fakültesi Dekanı Y.

Prof. Dr. Hüseyin BAĞCI

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesi sırasında desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerin benimle paylaşan danışman hocam Prof Dr Aziz POLA'a, tıp eğitimi, akademisyenlik ve hayata dair her konuda kendisinden çok şey öğrendiğim hocam Doç Dr Yasemin Işık Balcı'ya, çalışmanın tamamlanmasında her zaman yanımda olan arkadaşlarım Selcen Bağcı, Merve Gürses, Hazal Tancer Elçi, Elif Bilgihan, Emine Özdemir ve tüm Pamukkale Tıp Fakültesi pediatri bölümü asistan ve intern arkadaşlarıma, miRNA kavramını bana öğreten Prof Dr Hakan Akça'ya çalışmanın istatistiği konusunda yardımını gece gündüz esirgemeyen Hande Şenol'a, pediatri, sınav, ders her konuda akıl danışabildiğim Özlem Gül'e...

Pediatri eğitimimde emeklerini esirgemeyen hocalarım Prof Dr Dolunay Gürses, Doç Dr Fatih Fırıncı, Doç Dr Selçuk Yüksel, Yard Doç Dr Sebahat Yılmaz Ağıladioğlu, Yard Doç Dr Havva Evrengül, Doç Dr Mustafa Doğan, Doç Dr İbrahim Turan, Yard Doç Dr Bayram Özhan, Doç Dr Özmert Özdemir, Yard Doç Dr Halil Kocamaz, Doç Dr Mehmet Akın, Doç Dr Emin Mete, Doç Dr Ahmet Ergin ve Prof Dr Hacer Ergin'e...

Hayatım boyunca her daim arkamda olduklarını bildiğim sevgili annem, babam ve kardeşim Emre'ye...

Varlığı en büyük hediyem olan kızım Aden'e ve tüm sıkıntılarımı, kaprislerimi, isyanlarıma katlanan ve her daim yanımda olan sevgili eşim Alper'e...

Teşekkür ederim...

Ekim 2015

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa No |
|------------------------------------|-----------------|
| ONAY SAYFASI | III |
| TEŞEKKÜR | IV |
| İÇİNDEKİLER | V |
| SİMGELER VE KISALTMALAR | VII |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | VIII |
| TABLolar DİZİNİ | VIII |
| ÖZET | IX |
| İNGİLİZCE ÖZET | XI |
| GİRİŞ VE AMAÇ | 1 |
| GENEL BİLGİLER | 2 |
| ÇOCUKLUK ÇAĞI MALİGNİTELERİ | 2 |
| Akut lösemiler | 2 |
| Epidemiyoloji | 2 |
| Etyopatogenez | 2 |
| Klinik Bulgular | 4 |
| Laboratuar Bulguları ve Tanı | 5 |
| Sınıflama | 5 |
| Genetik | 9 |
| Prognostik Faktörler | 9 |
| Tedavi Evreleri | 11 |
| Akut myeloid lösemi | 11 |
| Minimal Rezidüel Hastalık | 12 |
| Lenfomalar | 12 |
| Hodgkin Lenfoma | 12 |
| Epidemiyoloji | 13 |
| Biyoloji | 13 |
| Sınıflama | 13 |
| Klinik Bulgular | 13 |
| Laboratuar Bulguları ve Tanı | 14 |
| Evreleme | 14 |
| Tedavi | 15 |

| | |
|--|-----------|
| Non-Hodgkin Lenfoma | 15 |
| Epidemiyoloji | 15 |
| Biyoloji | 16 |
| Sınıflama | 16 |
| Klinik Bulgular | 16 |
| Laboratuar Bulguları ve Tanı | 16 |
| Evreleme | 17 |
| Tedavi | 17 |
| MİKRO-RNA | 18 |
| Tanım | 18 |
| Tarihçe | 18 |
| Sentezlenme Basamakları | 18 |
| Fonksiyonları | 19 |
| MikroRNA ve Kanser | 20 |
| miRNA diğer hastalıklar | 21 |
| miRNA hematopoez | 21 |
| miRNA ve hamatolojik kanserler | 22 |
| Tedavide kullanımları | 23 |
| GEREÇ YÖNTEM | 25 |
| MİRNA İÇİN KAN ÖRNEKLERİN TOPLANMASI | 25 |
| Çalışma Basamakları | 25 |
| qRT-PCR miRNA ekspresyon analizi | 25 |
| RNA izolasyon Protokolü | 25 |
| cDNA Eldesi | 26 |
| miRNA Hedef Genleri Analizi | 26 |
| Real-Time Reaksiyonu | 27 |
| Tedavi öncesi ve Tedavi sonrası hastalar arasında farklı | 27 |
| miRNA ekspresyonlarının tanımlanması | |
| Verilerin Değerlendirilmesi | 27 |
| BULGULAR | 28 |
| miRNA Sonuçları | 30 |
| TARTIŞMA | 36 |
| SONUÖLAR | 48 |
| KAYNAKLAR | 49 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

| | |
|--------|--------------------------------|
| ALL | : Akut lenfoblastik lösemi |
| ALP | : Alkaline fosfataz |
| ANA | : A- naphthol asetat |
| AML | : Akut myelositer lösemi |
| AML-M3 | : Akut promyelositik lösemi |
| AMML | : Akut myelomonositik lösemi |
| ATRA | : Trans-retinoic asid |
| BOS | : Beyin omurilik sıvısı |
| DGCR8 | : Drosha ve kofakörü pasha |
| FAB | : French-American-British |
| İTD | : İnternal tandem duplikasyonu |
| LDH | : Laktat dehidrogenaz |
| miRNA | : Mikrorna |
| NAS-DC | : Naphthol as-d kloroasetat |
| NAS-DA | : Naphthol as-d aseta |
| SSS | : Santral sinir sistemi |
| HL | : Hodgkin lenfoma |
| NHL | : Non hodgkin lenfoma |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | Sayfa no |
|--------------------------------------|-----------------|
| Şekil 1: MikroRNA sentez basamakları | 19 |

TABLolar DİZİNİ

| | Sayfa no |
|--|-----------------|
| Tablo 1: ALL'de blastların morfolojik özellikleri | 6 |
| Tablo 2: Akut lösemilerin sitokimyasal özellikleri | 6 |
| Tablo 3: FAB sınıflamasına göre AML tipleri | 7 |
| Tablo 4: ALL'de morfolojik, immünolojik ve sitogenetik özellikleri | 7 |
| Tablo 5: AML'de morfolojik, immünolojik ve sitogenetik özellikler | 8 |
| Tablo 6: Pre-B-cell ALL'de risk sınıflaması | 10 |
| Tablo 7: Hodgkin lenfoma Ann Arbor evrelemesi | 15 |
| Tablo 8: St. Jude evreleme sistemi | 17 |
| Tablo 9: ALL hastalarının demografik özellikleri | 28 |
| Tablo 10: Akut lösemi hastalarının demografik, klinik ve laboratuvar özellikleri | 29 |
| Tablo 11: Çalışmaya dahil edilen lenfoma tanılı hastaların demografik ve klinik özellikleri. | 30 |
| Tablo 12: Lösemi hastaları ve kontrol grubunun miRNA fold düzeylerinin karşılaştırması. | 32 |
| Tablo 13: ALL ve AML hastalarında miRNA ekspresyonları. | 33 |
| Tablo 14: Lenfoma hastaları ve kontrol grubunun miRNA düzeyleri | 34 |
| Tablo 15: Tedavi öncesi ve sonrası değişen miRNA analizleri. | 35 |

ÇOCUKLUK ÇAĞI HEMATOLOJİK MALİGNİTELERİNDE MİCRORNA'LARIN PROGNOSTİK ETKİSİ

ÖZET
Dr Funda AKPINAR

MikroRNA'lar, son zamanlarda kanser biyogenezinde etkili oldukları gösterilmiş, protein kodlamayan RNA'lardır. Etkilerini transkripsiyon sonrası gen modifikasyonu ile göstermektedirler. Çocukluk çağı hematolojik kanseri sıklığı giderek artmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda çocukluk çağı hematolojik malignitelerinde miRNA ekspresyonu ve prognoz ile ilişkisini araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya 26 hasta ve 5 sağlıklı kontrol alındı. Hastaların 21'i akut lösemi (15 ALL, 6 AML), 5'i lenfoma (4'ü NHL, 1'i HL) tanısı almış hastalardan ve 5 sağlıklı kontrolden oluşmaktaydı. Kontrol grubunu yaş ortalaması $9,2 \pm 2,2$ yıl olup 3'ü erkek (%60), 2'si kızdı (%40). Akut lösemi hastalarının dokuzu (%42,9) kız, 12'si (%57,1) erkekti. Akut lösemi hastalarının ortalama yaşı $8,5 \pm 7,2$ yıl, ortanca yaşı 5,7 yıl (1-27) olarak saptandı. Hastalardan kemoterapi öncesi ve tedavinin 1 ayı tamamlandıktan sonra periferik venöz örnek alınarak miRNA analizleri yapıldı.

Akut lösemi hastalarında sağlıklı kontrollere göre let-7b, mir-31, miR-128-1, miR-218, miR-331, miR-372, miR-375, miR-422, miR-451 ve miR-520 ekspresyonları azalmış bulundu. ALL hastalarında miR-375 ekspresyonunun azaldığı, miR-21, miR-222, miR-30, miR-145, miR-146a ve miR-155 ekspresyonunun arttığı saptandı. AML hastalarında miR-155'in ekspresyonu artarken, miR-10, miR-23, miR-218, miR-422, miR-451'in ekspresyonunun azaldığı görüldü. Lenfoma hastalarında kontrol grubuna göre miR-222, miR-30, miR-145, miR-146a, miR-181'in ekspresyonları artarken; let-7b, miR-7, miR-10, miR-23, miR-25, miR-128-1, miR-422 ve miR-451'in ekspresyonları azalmış bulundu. Lösemi hastalarında tedavi sonrası miR-204, miR-7, miR-10, miR-30, miR-155, miR-192, miR-422, miR-451, miR-520, miR-548, miR-375, miR-1, miR-23 ve miR-146a'nın ekspresyonlarının arttığı; let-7b ve miR-132'nin ekspresyonlarının azaldığı saptandı. Lenfoma hastalarında tedavi sonrası miR-200c miR-7, miR-132, miR-21, miR-520, miR-155, miR-375, miR-422, miR-451,

miR-200c, miR-204 ve miR-135b'nin ekspresyonlarının arttığı; let-7b, miR-10 mir-30, miR-222, miR-27a, miR-25 ve miR-145 ekspresyonlarının azaldığı saptandı. Lösemi hastalarının tedavi öncesi lökosit sayıları ile tedaviden sonra değişen miRNA'lardan miR-128-1 ve miR-331 ile lökosit sayısı arasında pozitif yönde ilişki bulundu.

Sonuç olarak miRNA'lar hematolojik malignitelerin patogeneğinde, tedavi yanıtında, relaps ve prognozunda rol oynamaktadırlar. Bu konuda daha fazla hasta sayısı ile yapılacak çalışmalarla kesin bilgiler elde edilecektir.

PROGNOSTIC EFFECT OF MICRORNAS IN HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES OF CHILDHOOD

ABSTRACT

Dr Funda AKPINAR

MicroRNAs are non protein coding RNAs, which are recently shown to be effective in cancer biogenesis. They show their effects by post-transcriptional gene modification. Childhood hematologic cancer frequency is increasing. Therefore in our study, we aimed to investigate miRNA expression and its relationship with the prognosis in childhood malignities.

The study enrolled 26 patients and 5 healthy controls. The patient group consisted of 21 patients diagnosed as acute leukemia (15 ALL, 6 AML), and 5 patients as lymphoma (4 NHL, 1 HL). Mean age of the control group was $9,2 \pm 2,2$ years, 3 of these were male (%60) and 2 were female (%40). Nine of acute leukemia patients (%42,9) were female, 12 were male (%57,1). Mean age of acute leukemia patients was found $8,5 \pm 7,2$ years, median age was found 5,7 years (1-27). Peripheral venous samples were obtained from the patients before chemotherapy and after one month of therapy was completed, and miRNA analysis were performed.

Decreased expression of let-7b, mir-31, miR-128-1, miR-218, miR-331, miR-372, miR-375, miR-422, miR-451 and miR-520 was detected in acute leukemia patients. In ALL patients miR-375 expression was decrease, miR-21, miR-222, miR-30, miR-145, miR-146a and miR-155 expressions were increase. In AML patients whereas miR-155 expression was increase, miR-10, miR-23, miR-218, miR-422, miR-451 expressions were decreased. In lymphoma patients with respect to healthy controls miR-222, miR-30, miR-145, miR-146a, miR-181 expressions were increased whereas let-7b, miR-7, miR-10, miR-23, miR-25, miR-128-1, miR-422 and miR-451 expressions were decrease. After treatment in leukemia patients increased levels of miR-204, miR-7, miR-10, miR-30, miR-155, miR-192, miR-422, miR-451, miR-520, miR-548, miR-375, miR-1, miR-23 and miR-146a levels and decreased levels of let-7b and miR-132 levels were detected. In patients diagnosed with lymphoma, while increased levels of miR-200c miR-7, miR-132, miR-21, miR-520, miR-155, miR-375, miR-422, miR-451, miR-200c, miR-204 and miR-135b were established; decreased levels of let-7b, miR-10 mir-30, miR-222, miR-27a, miR-25 and miR-145 were detected. There is positive relationship in between miR-128-1, miR-331 and leukocyte count in leukemia patients.

In conclusion, miRNAs have a role in pathogenesis, response to the treatment, relaps and prognosis of hematologic malignities. Certain information could be obtained with further studies in this issue.

GİRİŞ VE AMAÇ

'Çocukluk çağı kanserleri' 15 yaşından önce gelişen kanser grubu olup, Çocukluk çağı kanserlerin % 0,5-4,6'sını oluşturmaktadır. Çocuklarda kanser insidansı dünya genelinde milyonda 50 ve 200 arasında değişmektedir (1, 2). Çocukluk çağı kanserlerinin büyük çoğunluğunu lösemiler (%34) oluştururken, lösemileri santral sinir sistemi (SSS) tümörleri (%23), lenfomalar (%12) ve yumuşak doku- kemik kökenli sarkomlar izlemektedir. Ülkemizde tüm çocukluk çağı kanserlerinin %20'sini lenfomalar oluşturmaktadır. Lenfomaların yaklaşık 1/3'ü Hodgkin lenfoma (HL), 2/3'ü Non-Hodgkin lenfomadır (NHL) (3). Nöroblastom bir yaş altı en sık görülen malignite olmakla birlikte yaş ilerledikçe görülme sıklığı azalmaktadır (4).

Tüm lösemilerin üçte ikisi çocukluk çağıında görülürken, üçte biri erişkin yaş grubunda görülmektedir. Akut lenfoblastik lösemi (ALL) görülme sıklığı iki yaştan sonra artmakta, çocukluk çağıında pik yapmakta adölesan ve genç erişkin yaş grubunda azalmakta ve 40 yaş sonrası giderek artmaktadır (5).

MikroRNA'lar, tek sarmallı, yaklaşık 22 nükleotitten oluşan, protein kodlamayan RNA'lardır. Transkripsiyon sonrası gen modifikasyonunda görev almaktadırlar (6). Son zamanlarda özellikle kanser biyogenezinde önemi gösterilen mikroRNA'ların tedaviye yanıt ve hastalığın prognozu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (7).

Literatürde çocukluk çağı lösemi ve lenfomalarında mikroRNA (miRNA) ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı çocukluk ve erken erişkinlik dönemi lösemi ve lenfoma hastalarında kontrol grubuna göre miRNA ekspresyon farklarını değerlendirmek; tedavi öncesi ile kemoterapinin 1 ayı tamamlandıktan sonra miRNA değişimlerini tespit etmektir. Ayrıca tespit edilecek olan miRNA'ların tedaviye yanıtta ve prognozunda etkisi olup olmadığını araştırmaktır.

GENEL BİLGİLER

Dünya Sağlık Örgütü'nün tanımına göre 'kanser'; diğer bir ifade ile 'malign tümör' ya da 'neoplazm'; anormal ve hızlı bir şekilde büyüyerek dokulara ve daha sonra organlara yayılım gösteren hücrelerin oluşturduğu bir grup hastalığın genel adıdır (1). 'Lösemi' ise kemik iliğinden köken alan 'blast ' ya da 'lösemik hücre' olarak adlandırılan anormal beyaz kürelerin çoğalması ile karakterize bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (8). 'Lenfoma' lenf nodlarının tümörü olarak tanımlanmakta, Hodgkin ve Hodgkin dışı lenfoma olarak iki gruba ayrılmaktadır.

ÇOCUKLUK ÇAĞI HEMATOLOJİK MALİGNİTELERİ

Akut Lösemiler

Epidemiyoloji

Çocukluk çağı kanserleri tüm kanserlerin % 0,5-4,6'sını oluşturur. Görülme sıklığı dünya genelinde 50- 200/ 1000 000 arasında değişmektedir (3). Dünyada çocukluk çağı kanserlerinin büyük çoğunluğunu lösemiler (%34) oluştururken, lösemileri santral sinir sistemi tümörleri (%23), lenfomalar (%12) ve yumuşak doku- kemik kökenli sarkomlar izlemektedir. Nöroblastom bir yaş altı en sık görülen malignite olmakla birlikte yaş ilerledikçe görülme sıklığı azalmaktadır (4). Ülkemizde ise Türk Pediatrik Onkoloji grubunun 60'dan fazla merkez ile yaptığı araştırmada pediatrik kanser kayıtlarının %30,33'ünü lösemiler oluşturmakta, lösemileri %18,89 oran ile lenfomalar izlemektedir. Lösemilerin dağılımı incelendiğinde ise lenfoid lösemiler %78,81 oran ile ilk sırada görülmekte, ikinci sırada %16,97 oran ile akut myeloid lösemi, üçüncü sırada ise %1,85 oran ile kronik myeloid lösemi bulunmaktadır (9).

Etyopatogenez

Çocukluk çağı akut lösemilerinde kesin etyoloji bilinmemekle birlikte genetik yatkınlık ve çevresel etkenlerin birlikteliği üzerinde durulmaktadır. Kardeşinde lösemi olan çocuklarda ilk 10 yılda lösemi gelişme riski 2-4 kat fazla olmakta, tek yumurta ikizlerinde bir kardeşte lösemi varsa diğer kardeşte de lösemi görülme olasılığı %20 olarak saptanmaktadır. Bazı kromozomal anomalilerin lösemi riskini arttırdığı

bilinmektedir. Bunlardan en sık görüleni Down Sendromu (1/95 oranında risk vardır) Bloom sendromu (1/8 oranında risk), Fankoni aplastik anemisi (1/12 oranında risk), konjenital agammaglobunemi, Poland Sendromu, Shwachman-Diamond sendromu, Ataksi-Telenjektazi, Li-Fraumeni, Nörofibromatosis, Diamond-Blacfan anemisi, Kostmann sendromu, Wiskott-Aldrich sendromudur (10, 11).

Çevresel etmenlerden iyonize radyasyon maruziyeti, inutero tanısal X-ray, maternal mutajen maruziyeti lösemi etyolojisinde suçlanmaktadır. Benzen gibi organik çözücüler, HTLV-1 gibi bazı virüsler, radyoterapi, alkilleyici ajanlara maruziyetin de lösemi riskini arttırdığı bilinmektedir (10, 11).

“Kinlen” ve “Graves” hipotezi olarak bilinen hipotezde akut lösemi ve Burkitt olmayan lenfomaların belirli bir enfeksiyon etkenine maruziyet sonucuna geliştiği ileri sürülmektedir. Bebeklik döneminde karşılaşılmamış enfeksiyon ajanının daha ileri dönemlerde vücuda girmesi özellikle 2-5 yaşlarında pik yapan ve ALL vakalarının %75’ini oluşturan Pre- B-cell common-ALL gelişiminde risk faktörü oluşturmaktadır (12, 13). Ayrıca doğum kilosu, annenin yaşı, gestasyonel hafta, yüksek sosyoekonomik düzeyin de ALL riskini arttırdığı gösterilmiştir (14).

Akut myelositik lösemide etyolojisinde birçok etmen sorumlu tutulmasına karşın hastaların çoğunda tanımlanabilen bir risk faktörü bulunmamaktadır. En önemli risk faktörü, etyolojisi bilinmeyen haftalar boyunca ilerleyen myelodisplastik sendromdur. Genetik yatkınlık oluşturan faktörler arasında akut myelositer lösemide (AML) farklılaşmayı etkilemeyen ancak proliferasyonu ve/veya hücre sağkalımını artıran Sınıf I mutasyonlar (BCR/ABL, c-KIT, FLT3, ALM, onkojenik Ras, PTPN11, TEL/PDGFR) ve farklılaşmayı ve apoptozu bozan Sınıf II genetik mutasyon ve füzyonlar (AML/ETO ve PML/RARa füzyonları, CEBPA, CBF, CBP/P300, TIF1 ve HOX mutasyonları, MLL rearanjmanları) saptanabilir. FLT3 (Fms-benzeri tirozin kinaz) erken hematopoetik prekürsörlerde ifade edilen ve normal immun sistemin gelişmesi için gerekli olan bir tirozin kinaz reseptörüdür. AML’li çocukların %15 kadarında FLT3 internal tandem duplikasyonu (ITD) vardır (15). Özellikle kromozom 5 ve 7 anormallikleri sekonder AML gelişiminde önemli bir risk faktörü olarak bilinmektedir (16).

Klinik Bulgular

Hastaların en sık başvuru yakınmasını ateş (%60) oluşturmakta ve bunu halsizlik (%50) ve peteşi-purpura gibi kanama bulguları (%48) ile solukluk (%40) izlemektedir. Hastalarda kemik iliği infiltrasyonuna sonucu gelişen anemiye bağlı solukluk, yorgunluk, çarpıntı, solunum güçlüğü gelişebilmekte, nötropeniye bağlı ateş, oral mukozada ülserasyon ve enfeksiyon görülebilmektedir. Trombositopeni peteşi-purpura, mukoz membranlarda kanama ve bazen gastrointestinal, genitoüriner sistem ve intrakranial kanamaya yol açabilmektedir. Blastik hücrelerin lenfoid organlara invazyonu sonucu yaygın lenfadenopati, splenomegali ve hepatomegali oluşmaktadır (10, 11).

Hastaların %5'inde tanı anında santral sinir sistemi invazyonu görülmektedir. Santral sinir sistemi tutulumu sonucu artmış intrakranial basınç bulguları, parankimal tutuluma bağlı fokal nörolojik bulgular, hipotalamik tutulum sonucu gelişen aşırı kilo alma ile birlikte polifaji, hirsutizm ve davranış bozuklukları, arka hipofiz tutulumuna bağlı diabetes insipidus ve spinal kord tutulumu nedeni ile gelişen bel ve bacak ağrısı ve sfinkter problemleri karşımıza çıkabilmektedir. Özellikle AML hastalarında trombus ve infarkta neden olan lökostatiz ve trombositopeni ve koagülopatiye bağlı santral sinir sistemi kanamaları görülebilmektedir (10, 11)..

Over tutulumu çok nadirdir. Testis tutulumu, erkek hastaların %10-23'ünde ağrısız testis şişliği ile kendini göstermektedir. Bazen hematüri, hipertansiyon ve böbrek yetmezliği ile kendini gösteren renal tutulum görülebilmektedir. Gastrointestinal sistem tutulumu sıklıkla ALL vakalarında görülmekte ve en sık kanama ile bulgu vermektedir. Hastaların %25'inin ilk başvuru yakınması olan kemik ağrısının nedeni periostun direk lösemik hücrelerle invazyonu, kemik infarktı ya da lösemik hücreler tarafından kemik iliği kavitesindeki genişlemedir. Cilt tutulumu sıklıkla neonatal lösemi ve AML'de görülmektedir. Otopsi bulgularının %50-60'ında kardiyak tutulum görülmesine karşın hastaların <%5'inde semptomatik kalp hastalığı vardır (10, 11).

Laboratuvar Bulguları ve Tanı

Hemogramda orta ya da ağır anemi vardır. Anemi normositer normokromiktir. Lökosit sayısı artmış, azalmış ya da normal olabilir. Vakaların %92'sinde trombosit sayısı normalin altındadır. Ciddi kanama bulguları ancak trombosit sayısı $<20\ 000/\text{mm}^3$ olduğunda görülür. Periferik yaymada lökopeni olan hastalarda çok az blast görülebilir ya da blast görülmeyebilir. Lökosit sayısı $>10\ 000/\text{mm}^3$ olduğunda blastlar kolayca görülebilir. ALL vakalarında eosinofili görülebilirken, AML vakalarının %20'sine bazofili saptanabilir (10, 11)..

Genellikle kemik iliğinde %80-100 oranında blastlar görülmektedir. Megakaryositler genellikle görülmezler. Kemik iliğinde $>5\%$ blast görülmesi halinde lösemi düşünülmelidir. Ancak ALL tanısı için %30, AML tanısı için %20 blast görülmesi gereklidir. Klonal sitogenetik anomaliler olan $t(8;21)(q22;q22)$, $inv\ 16\ (p13q22)$ ya da $t(16;16)(p13;q22)$ ve $t(15;17)(q22;q12)$ varlığında blast yüzdesine bakılmaksızın AML tanısı konur. Akciğer grafisinde T-hücreli lösemide mediastinal genişleme görülebilir. Serum biyokimyasal parametrelerinden elektrolitler, kan üre azotu, ürik asid, karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri ile immunglobulin düzeyleri değerlendirilmelidir (10, 11).

Beyin omurilik sıvısı (BOS) incelemesinde 5'ten fazla lökosit olması santral sinir sistemi tutulumuna işaret eder. Santral sinir sistemi tutulumu SSS-1 $<5/\text{mm}^3$ ve santrifüjde blast görülmemesi, SSS-2 $<5/\text{mm}^3$ ve santrifüjde blast varlığı, SSS-3 $>5/\text{mm}^3$ ve santrifüjde blast varlığı olarak sınıflandırılır. Travmatik lomber ponksiyon varlığında BOS beyaz küre/ eritrosit oranı kan beyaz küre/eritrosit oranından fazla ise SSS tutulumu olarak kabul edilir (13). Koagülasyon parametreleri özellikle AML vakalarında hipofibrinojemi, faktör V, IX ve X eksikliği olabileceği için ölçülmelidir (10, 11).

Sınıflama

Akut lösemiler morfolojik, sitokimyasal, immünolojik, sitogenetik ve moleküler özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır (10, 11). ALL ve AML'nin FAB (French-American-British) sınıflamasına göre morfolojik sınıflaması Tablo 1 ve Tablo 3'de gösterilmiştir. Sitokimyasal özellikler ise Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 1: ALL'de blastların morfolojik özellikleri (10).

| Sitolojik özellik | L1 | L2 | L3 |
|---------------------------|-------------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| Hücre boyutu | Küçük hücreler baskın | Büyük, heterojen | Büyük ve heterojen |
| Nükleus kromatin | Homojen | Değişken, heterojen | Nokta nokta boyanmış ve homojen |
| Nükleus şekli | Düzenli, aralıklarla çentikleşme | Düzensiz, çentikleşme yaygın | Düzenli oval-yuvarlak |
| Nükleoli | Görülmez ya da küçük ve farkedilmez | >1, genelde büyük | Baskın, >1 veziküller |
| Sitoplazma miktarı | Az | Değişken, genellikle çok | Genellikle çok |
| Sitoplazma bazofilitesi | Hafif ya da orta, nadiren yoğun | Değişken, bazılarında derin | Çok derin |
| Sitoplazma vakuolizasyonu | Değişken | Değişken | Genellikle baskın |

Tablo 2: Akut lösemilerin sitokimyasal özellikleri (10).

| Boyama | ALL | AML | AMML | Eritrolösemi | Megakaryoblastik |
|------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|--|-------------------------|---------------------------|
| Nonenzimatik PAS | Farklı sayıda yaygın granül şeklinde | Negatif ya da yaygın pozitif | Negatif ya da hafif granulasyon | Güçlü pozitif, granüler | Pozitif/negatif |
| Sudan black | Negatif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Negatif |
| Enzimatik | | | | | |
| Peroksidaz | Negatif | Pozitif | Genelde negatif | Pozitif | Negatif |
| ALP | Normal | Düşük | Yüksek | Normal/yüksek | - |
| Esteraz | | | | | |
| NAS-DK | Negatif | Pozitif | Negatif | Negatif | - |
| NAS-DA | Negatif/zayıf Pozitif | Pozitif (florid ile inhibe olmaz) | Güçlü pozitif (florid ile inhibe olur) | Zayıf pozitif | Pozitif/negatif |
| ANA | Negatif | Negatif | Güçlü pozitif | Güçlü pozitif | Pozitif/negatif |
| Asid fosfataz | T-ALL'de pozitif | Negatif | Negatif | Negatif | Pozitif (lokalize patern) |

ALP: alkaline fosfataz, AMML: akut myelomonositik lösemi, NAS-DC: Naphthol AS-D kloroasetat, NAS-DA: Naphthol AS-D aseta, ANA: α- Naphthol asetat.

Tablo 3: FAB sınıflamasına göre AML tipleri (10).

| FAB | Özellik |
|------|--|
| M0 | Diferansiye olmayan AML |
| M1 | Minimal diferansiyonu olan AML (M0'dan farklı olarak MPO ekspresyonu gösterir, morfolojik olarak L2'den ayrılamaz) |
| M2 | Diferansiyasyon ile birlikte AML.Vakaların %50'sini oluşturur |
| M3 | Akut promyelositik lösemi (APL)- hipergranüler tip |
| M3v | APL'nin mikroglandüler varyantı, hiperkositoz ve ciddi koagulopati ile birlikte, prognozu kötüdür. |
| M4 | Akut myelomonositik lösemi |
| M4eo | Eosinofili ile birlikte Akut myelomonositik lösemi |
| M5 | Akut monositik lösemi (M4 ve M5 <2 yaşta sıklık) |
| M5a | Diferansiyasyon olmaksızın akut monositik lösemi |
| M5b | Diferansiyasyon ile birlikte akut monositik lösemi |
| M6 | Akut eritroid lösemi- Eritrolösemi (Diguglielmo hastalığı) |
| M7 | Akut megakaryositik lösemi, trizomi 21 olan çocuklarda sıklık. |

İmmünojenik sınıflama

ALL'de morfolojik, immünojenik ve sitogenetik özellikler tablo 4'de, AML özellikleri tablo 5'de gösterilmiştir.

Tablo 4: ALL'de morfolojik, immünojenik ve sitogenetik özellikleri (10)

| MIC grup | FAB | İmmünojenik belirteç | | | | | | Karyotip |
|--------------------------------|--------|----------------------|-----|------|-----|-----|-----|------------------------------------|
| | | CD2 | CD7 | CD10 | TdT | clg | clg | |
| Akut lenfoblastik lösemi (ALL) | | | | | | | | |
| Erken pre B-hücre | L1, L2 | | - | + | + | - | - | t(4;11); t(9;22) |
| Common ALL | L1, L2 | | - | + | + | - | - | 6q-;near haploid,del(12p), t(9;22) |
| Pre B-hücre ALL | L1 | | - | + | + | + | - | t(1;19), t(9;22) |
| B-hücre ALL | L3 | | - | +/- | - | - | - | t(8;14); t(2;8),t(8;22) |
| Erken pre T-hücre ALL | L1, L2 | + | + | | + | | | t/del(9p) |
| T-hücreli ALL | L1, L2 | + | + | | + | | | 6q- |

Tablo 5: AML'de morfolojik, immünolojik ve sitogenetik özellikler (10).

| MIC grup | FAB | İmmünolojik belirteç | | | | | | Karyotip |
|---------------------------|--------------------------|----------------------|------|------|------|-----|------|--------------------|
| | | CD7 | CD19 | CD13 | CD33 | GPA | CD41 | |
| Akut myeloid lösemi (AML) | | | | | | | | |
| M2/t(8;21) | M2 | - | - | + | + | - | - | t(8;21)(q22;q22) |
| M3/t(15;17) | M3,M3v | - | - | + | + | - | - | t(15;17)(q22q12) |
| M5a/del(11q23) | M5a(M5b,M4) | - | - | + | + | - | - | t/del(11)(q23) |
| M4Eo/inv(16) | M4Eo | - | - | + | + | - | - | del/inv(16)(q23) |
| M1/t(9;22) | M1(M2) | - | - | + | + | - | - | t(9;22)(q34;q11) |
| M2/t(6;9) | Bazofili ile birlikte | - | - | + | + | - | - | t(6;9)(p21-22;q34) |
| | M2 ya da M4 | | | | | | | |
| M1/inv(3) | Trombositoz ile birlikte | - | - | + | + | - | - | inv(3)(q21q26) |
| | M1(M2,M4,M7) | | | | | | | |
| M5b/t(8;16) | Fagositozla M5b | - | - | + | + | - | - | t(8;16)(p11;p13) |
| M2 Baso/t(12p) | Bazofili ile birlikte | - | - | + | + | - | - | t/del(12)(p11-13) |
| | M2 | | | | | | | |
| M4/+4 | M4(M2) | - | - | + | + | - | - | t(9;11)(p22;q23) |

İmmunolojik klonlar arasında lösemi ayırıcı tanısında bir takım hücre antikorları kullanılmaktadır. Bu antikorlardan en az biri o türe özgü olmalıdır. Örneğin B-cell kökeni için CD19, T-cell için CD7, ve myeloid hücreler için CD13 ve CD33 pozitif (>%30) olmalıdır. Buna ek olarak sitoplazmik CD79a kullanımı erken pre-B-cell kökeni, CD3 T-cell için ve sitoplazmik myeloperoksidaz myeloid hücreler için ayırıcı tanıda yardımcıdır. AML-M7'de CD13 ve CD33'e ek olarak CD41, CD42,CD61 pozitifliği ve AML-M6 glikoporin A pozitifliği vardır.

Pre B- cell lösemiler tüm ALL vakalarının %80'ini oluşturmaktadır. Matur B-cell lösemi tipi ALL vakalarının yaklaşık %1-2'sini oluşturur. T-cell lösemi ise ALL vakalarının %15-20'sidir. Bu tür daha ileri yaşta, başvuru anında yüksek beyaz küre sayısı, ekstramedüller hastalık varlığı ve kötü prognoz ile ilişkilidir (10, 11).

Genetik

Çocukluk çağı ALL'lerin %75'inde kromozomal translokasyonlar görülür. Bazı translokasyonlar protein kinazları transkripsiyon faktörlerin aktivasyonu ve onkogenler yoluyla aktive etmektedirler. Bunlar; Tel-AML1 füzyon geni t(12;21)(p13q;q22) iyi prognoz ile ilişkiliyken BCR-ABL füzyon geni t(9;22)(q34;q11) pediatrik vakaların %3-5'inde görülmekte olup erişkin lösemilerinden farklı olarak daha ileri yaş, daha fazla beyaz küre sayısı ve SSS tutulumu ile ilişkilidir. E2A-PBX füzyon geni t(1;19)(q23;p13.3) saptanan hastalarda ise tanı anında yüksek beyaz küre sayısı bulunmakta ve daha yoğun kemoterapi vermek gerekmektedir. MLL rearrangement kromozom 11q23'de bulunmakta ve infant ALL vakalarının %80'ini, çocukların ise %3'ünü ve sekonder AML'lerin %85'ini oluşturmaktadır. Yoğun kemoterapiye rağmen prognoz kötüdür. B-cell ALL'ler kromozom 8q24'de yerleşen MYC genlerini kapsar. B-cell ALL vakalarının %80'inde t(8;14)(q24;q32) saptanmakta, %20'sinde ise t(8;2)(p12;q24) ya da t(8;22)(q24;q11) saptanmaktadır (10, 11).

Prognostik Faktörler

Tanı anında 1-9 yaşları arasında olan ve başlangıç beyaz küre değeri $<50000/\text{mm}^3$ olan hastalar pre-B cell ALL hastalarının 2/3'ünü oluştururlar ve standart risk olarak gruplandırılır. Bu hastaların 5 yıllık hastaliksız yaşam oranı %80'dir. Yüksek risk grubundaki diğer hastaların 5 yıllık hastaliksız yaşam oranı %65'dir (10, 11).

Risk grubu belirlemesi aşağıdaki gibi yapılmaktadır (Tablo 6);

1. Yaş: Bir yaştan küçük ve 10 yaştan büyük hastaların prognozu, 1-10 yaş grubundakilere göre daha kötüdür.
2. Lökosit sayısı: Yüksek lökosit sayısı olan hastaların prognozu daha kötüdür.
3. İmmünofenotip: pre-B-cell ALL'nin prognozu en iyi iken T-cell ALL daha kötü prognozludur. Matur B-cell ALL kötü prognozludur. SSS tutulumu sıktır. Günümüzdeki tedavi protokolleri ile prognozu düzelmiştir.
4. DNA indeksi: 50'den fazla kromozom olan $>1,6$ hiperdiploid ALL hastalarında artmış apoptoz ve kemoterapiye artmış duyarlılık nedeniyle iyi prognozludur. Hipodiploid ALL de kötü prognoz ile ilişkilidir.

5. Sitogenetik: Kromozom 4 ve 10 trizomileri ya da DNA index >1.16 düşük risk B- cell ALL grubuna dahil olur. MLL gen düzenlemesini içeren 11q23'deki translokasyonlar, Philedelphia kromozomu t(9;22)(q34;q11) pozitifliği ve hipodiploidi de ALL hastaları için kötü prognoz kriteridir.

6. SSS hastalığı: Tanı anında SSS tutulumu olması kötü prognozla ilişkilidir.

7. İndüksiyon tedavisine erken yanıt: 8. gün steroid yanıtı, 15. gün kemik iliği yanıtı ve 33. gün remisyon olmalıdır. İndüksiyon tedavisi sonunda remisyona girmeyen hastaların prognozları oldukça kötüdür.

Pre-B cell ALL'de risk gruplarına göre sınıflama tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6: Pre-B-cell ALL'de risk sınıflaması (10).

| Risk grubu | Özellikleri |
|-----------------|---|
| Düşük risk | Yaş >1 yıl, <10 yıl Beyaz küre < 50 000/mm ³ TEL-AML ya da trizomi 4,10,17 |
| Standart risk | Yaş >1 yaş, <10 yaş Beyaz küre < 50 000/mm ³ TEL-AML ya da trizomi 4,10,17 yok |
| Yüksek risk | Yaş >10 yıl Beyaz küre ≥ 50 000/mm ³ SSS-3 ya da testis tutulumu MLL translokasyonu |
| Çok yüksek risk | Phidelpia kromozomu (+) Hipodiploidi (≤45 kromozom) İndüksiyon tedavi yanıtısızlığı |

AML'de kötü prognoz ile ilişkili olan faktörler şunlardır;

1. Beyaz küre > 100 000/mm³,
2. Monozomi 6
3. Sekonder AML
4. FLT 3 ITD
5. İndüksiyon sonrası minimal rezidüel hastalık bulunması

İyi prognoz ile ilişkili olan karyotipler t(8;21), t(15;17), inv 16 iken, monozomi 5, monozomi 7, del (5q) ve (3q) ya da kompleks karyotipler kötü prognozla ilişkilidir (17).

Tedavi Evreleri

Kısa süreli yoğun kemoterapi (yüksek doz MTX, ARA-C, siklofosamid) ile tedavi edilen matür B cell ALL hastaları haricinde ALL tedavisi remisyon indüksiyonu fazı, konsolidasyon fazı ve rezidüel hastalığı yok etmek için idame tedavisi ve SSS profilaksisi şeklindedir. Hastalar risk gruplarına uygun kemoterapi protokolleri ile tedavi edilirler. Remisyon indüksiyonu fazı: Bu tedavinin hedefi başlangıçtaki lösemik hücre yükünün % 99'undan fazlasını yok etmek ve normal hematopoez ve sağlıklı performans durumuna dönüşü sağlamaktır. Bu fazda prednizolon, vinkristin, doxorubucin ve L-aspraginaz kullanılır (10, 11).

Konsolidasyon (yoğunlaşma) fazı: Normal hematopoez ve vücut fonksiyonunu kazanmayla birlikte konsolidasyon tedavisi genellikle ilaç dirençli rezidüel lösemi hücrelerini yok etmek ve relaps riskini azaltmak için verilir. Genellikle yüksek doz metotreksat ve merkaptopurin kullanılır. Metotreksatın 1-2 g/m² dozu, standart risk ALL'li hastalar için yeterlidir. Ancak yüksek doz (5 g/m²) MTX T cell veya yüksek riskli B cell ALL çocuklarda verilir (18).

İdame fazı: Akut lenfoblastik lösemili hastalara relapsı önlemek için idame tedavisi verilir. Hastalara ortalama 12-18 ay boyunca günlük merkaptopürin ve haftalık metotreksat verilir (10, 11).

Akut myeloid lösemi

AML tedavisinin ALL tedavisinden farkı yoğun ve kısa süreli tedavi verilmesidir. Bunun için BFM, DCTER ve MRC 10 gibi benzer protokoller kullanılır. Hastaların %75'inde remisyon %57'sinde uzun dönem sağ kalım sağlanır. Ailede HLA uygun donör varlığında AML-M3 ve Down sendromu hastaları hariç ilk remisyonda hematopoetik kök hücre nakli yapılması önerilir. Uygun donör bulunamaması halinde hastalar yoğun kemoterapiler alırlar (10, 11).

Akut promyelositik lösemi (AML-M3) indüksiyon tedavisinde trans-retinoic asid (ATRA) kullanılır. Remisyon için 1-3 aylık süre gerekir. ATRA tedavisi ile remisyon indüksiyonu sağlandıktan sonra hastalara sitozin arabinozid ve antrasiklin tedavileri verilir. CD33 ekspresyonu pozitif AML hastalarında Gemtuzumab ozogamicin kullanılır (10, 11).

Minimal rezidüel hastalık

Lösemiye ait klinik bulgu olmadığı halde tedaviden kurtulan ve relapslara neden olan hücrelerin varlığı minimal rezidüel hastalık olarak tanımlanır. Hastaların %95'i remisyona girmesine rağmen %15-20'sinde relaps görülmesi hastalığın tedavi ve remisyon süresince de bulunduğu ancak direk mikroskopik inceleme gibi yöntemlerle saptanamadığını düşündürmektedir. Tedavi sırasında rezidüel lösemi olup olmadığı çünkü immatür B hücreleri ve aktive matür lenfositler lenfoblastik hücrelere çok benzemesi nedeni ile kemik iliği yaymalarının morfolojik incelenmesi ile anlaşılamamaktadır. Ayrıca, tek bir bölgeden yapılan kemik iliği aspirasyon yaymaları tüm kemik iliğinin çok küçük bir kısmını gösterir. Bu nedenle klasik yöntemlerle saptanamayan lösemik hücreleri araştırmak için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Morfolojik inceleme ile 5/100 oranında var olan lösemi hücreleri saptanabilirken, flow sitometri ile karyotip incelemesi 1/100, FISH yöntemi ile 1/1000, çift immünojenik belirteç incelemesi ile 1/100 000, PCR yöntemi ile 1/1 000 000 oranında var olan lösemi hücreleri saptanabilir. Bu nedenle minimal rezidüel hastalık hem ilk aşamada hem de relaps durumunda önemli bir prognostik faktördür (19).

Lenfomalar

Lenfomalar (Hodgkin ve Hodgkin Dışı lenfomalar) çocukluk çağı kanserleri içerisinde lösemi ve santral sinir sistemi tümörlerinden sonra üçüncü sıklıkla görülmektedir. Onbeş yaş altı tanı alan kanser olguların yaklaşık %10-15'ini oluştururken 20 yaş altı tanı alan kanser olgularının %15'ini oluşturmaktadır (19). Ülkemizde ise lenfomalar lösemilerden sonra %18 oranında en sık görülen kanser türünü oluşturmaktadır (9).

Hodgkin Lenfoma

Hodgkin Hastalığı ilk kez Thomas Hodgkin tarafından 1832 yılında olan dalak ve lenf dokularının büyümesi ile karakterize bir hastalık olarak tanımlanmıştır. Sternberg ve Reed 1898 ve 1902 yıllarında bir ya da multinukleuslu dev tanısal hücreleri tanımlamıştır (21).

Epidemiyoloji

Çocukluk çağı kanserlerinin yaklaşık %7'sini oluşturan HL, çocuklarda kanser ölümlerinin %1'ini oluşturmaktadır (9). Sıklığı bebeklerde oldukça nadirken, 15-19 yaş grubunda en sık görülen çocukluk çağı kanserini oluşturmaktadır. Tedavi ile 5 yıllık sağ kalım %94'e ulaşmıştır. Hastalık genç erişkin ve >50 yaşta pik yapar. Adölesanlarda kızlarda daha fazla görülürken (erkek/kız: 0,8), 15 yaş altında erkeklerde daha fazla görülmektedir (23).

Biyoloji

Hodgkin lenfoma tutulan lenf nodunun <%1'ini kapsayan mononükleer Hodgkin ve multinükleuslu Reed-Sternberg hücreleri ile karakterizedir. Lenf nodunun kalan kısımları tümör hücrelerinden salınan sitokinlere yanıt olarak artan lenfosit, eosinofil, makrofaj, plazma hücresi ve fibroblastlar barındırmaktadır. Hodgkin ve Reed-Sternberg hücreleri germinal merkez B hücrelerinden oluşan, immunglobulin sentezlemeyen hücreler olmakla birlikte sitokin ve kemokin sentezleyerek hücre infiltrasyonunu sağlarlar. Reed-Sternberg hücreleri CD20 ve CD79a gibi B hücre antijenlerini eksprese ederken, hemen hemen hepsi CD30 antijeni ve çoğu CD15 antijenini eksprese etmektedir (21, 22).

Sınıflama

Dünya Sağlık Örgütü, Reed-Sternberg hücrelerinin morfolojisi ve infiltrasyon karakterlerine göre HL'ı dörde ayırmıştır.

- Lenfositten zengin HL
- Lenfositten fakir HL
- Miks selüler HL
- Noduler sklerozan tip HL (25).

Klinik Bulgular

Lenfadenopati, vakaların %80'inde ilk başvuru yakınmasıdır. Genellikle servikal, supraklavikular, aksiller ya da daha az sıklıkla inguinal yerleşimli, lastik kıvamında ve ağrısızdır. Lenfadenopati haftalar ya da aylar boyunca devam etmektedir. Olguların yaklaşık %30'unda 'B semptomları' görülür. Bunlar; ateş (38°C'nin üzerinde, ardışık 3

gün boyunca), gece terlemeleri, kilo kaybıdır (son 6 ayda %10'dan fazla). Vakaların yaklaşık %60-80'ninde intratorasik tutulum bulunmaktadır. Servikal lenfadenopatisi bulunan hastaların 2/3'ünde mediastinal tutulum bulunmaktadır. Mediastinal kitleler genellikle asemptomatiktir. Ancak bazen öksürük ve göğüs ağrısı bulunabilir. Mediastendeki iri kitleler dispne, öksürük, stridor, perikardiyal efüzyon ya da süperior vena kava sendromuna yol açabilmektedir (21, 22).

Laboratuvar Bulguları ve Tanı

Belirgin, tanı koydurucu bir laboratuvar bulgusu yoktur. Genellikle tanı anında sedimentasyon hızı artmıştır. Nötrofili, monositoz, lenfopeni, normokromik normositik anemi, artmış C-reaktif protein düzeyi, kemik invazyonunu düşündüren artmış alkalen fosfataz düzeyi saptanabilir. Görüntüleme yöntemleri kesin tanıda yol gösterici olmakla birlikte hastalığın yaygınlığını göstermede önemlidir. Bu amaçla ultrason, bilgisayarlı tomografi ve pozitron emisyon tomografi kullanılır.

Hastalığın kesin tanısı histopatolojik inceleme ile konulur. Tanı için genellikle eksizyonel biyopsi yapılmaktadır çünkü ince iğne aspirasyonu hem histolojik sınıflama ve moleküler çalışma için yeterli dokuyu sağlamaz hem de lenf nodunun tamamı incelenmediğinden yanıltıcı olabilmektedir. Büyük mediastinal kitlesi olan vakalarda hava yolu obstrüksiyon riski nedeniyle bu vakaların genel anestezi altında biyopsi örnekleme yapılmamalıdır (21, 22).

Evreleme

Hastalığın evrelemesi Ann Arbor evrelemesi ile yapılmaktadır (Tablo 7). Hastalık evrelendikten sonra risk gruplarına ayrılır.

Risk sınıflaması şöyledir:

- Düşük risk: Bulky hastalığı olmayan Evre IA ya da IIA
- Orta risk: Evre IB ya da IIB, evre IA ya da IIA; evre IIAE, evre IIIA, ya da evre IVA hastalık
- Yüksek risk: Evre IIIB ya da evre IVB (21, 22).

Tablo 7: Hodgkin lenfoma Ann Arbor evrelemesi (21).

| Evre | Tanımlama |
|-----------------------------|--|
| I | Tek lenf nodu bölgesi ya da tek enstralenfatik organ/bölge tutulumu |
| II | Diyaframın aynı tarafında >2 lenf nodu bölgesi tutulumu ya da diyaframın aynı tarafında bir ekstralenfatik organ/bölge ve onun bölgesel lenf nodu tutulumu |
| III | Diyaframın her iki tarafında dalak tutulumun da dahil olabileceği (IIIs) lenf nodu bölgesinin tutulumu ya da ekstralenfatik organın lokalize devamlı tutulumu (IIIE) ya da her ikisi (IIISE) |
| IV | Lenf nodu tutulumuna bakılmaksızın >1 ekstralenfatik organ ya da dokunun yaygın tutulumu |
| Her evreye dahil edilebilir | |
| A | B semptomu olmaması |
| B | Ateş (>38°C 3 ardışık gün), gece terlemeleri ya da açıklanamayan kilo kaybı (son 6 ayda vücut ağırlığının >%10) |
| E | Tek ektranodal bölgenin tutulumu |

Tedavi

Hastaların tedavisi risk gruplarına göre düzenlenmektedir. Tedavide kemoterapi ve radyoterapi kullanılır. Kemoterapide etkili rejimler COPP, OPPA, OEPA, ABVD'dir (21, 22).

Non- Hodgkin Lenfoma (NHL)

Non- Hodgkin lenfomalar, lenfoid kaynaklı malign lenfomalar olup, HL olarak sınıflandırılmayan grubu oluşturmaktadır. Erişkin NHL'lerin aksine çocukluk çağı NHL'leri ileri evre ve hızlı ilerleme gösterir (21, 22).

Epidemiyoloji

Çocukluk çağı kanserleri içinde 5. sıklıkla görülen NHL'lar gelişmiş ülkelerin çocukluk çağı kanserlerinin %7'sini oluşturmaktadır (4). Ortanca tanı yaşı 10 yıl iken insidans yaş ile artmaktadır. İnsidans yaş, ırk gibi etkenlerde etkilenmekle birlikte en sık görülen alt tipleri Burkitt lenfoma, difüz B hücreli lenfoma, lenfoblastik T ya da B hücreli lenfoma, anaplastik hücre lenfomadır.

Kazanılmış ya da konjenital immünyetmezlik sendromları NHL ile ilişkilidir. Özellikle yaygın değişken immünyetmezlik, Wiskott-Aldrich sendromu, Ataksi Telenjektazi ve X'e bağlı lenfoproliferatif sendrom hastalarında sıklığı artmaktadır (21, 22).

Biyoloji

Neoplastik hücreler dar sitoplazmalı, aynı boyutta ve kromatin ile gevşek boyanmış büyük nükleusludur. Hücreler FAB sınıflamasındaki L1, L2 tür hücrelere benzemektedir (21, 22).

Sınıflama

Dünya Sağlık Örgütüne göre NHL'ler histoloji, immüfenotip ve genetik özelliklerine göre aşağıdaki gibi sınıflanmıştır (22);

- Lenfoblastik lenfoma: Yaklaşık %25'ni oluşturur.
- Matur B cell lenfoma
- Burkitt lenfoma: Endemik, sporadik ve immünyetmezlikle ilişkili Burkitt lenfoma tipleri vardır.
- Diffüz large B cell lenfoma
- Primer mediastinal büyük B hücreli: Mediastenden köken alan lenfomalardır.
- Jüvenil foliküler lenfoma: erişkinlerdeki vakaların 1/3'ünü oluşturmaktayken çocuklarda %2'den daha az vakada görülmektedir.
- Anaplastik large cell lenfoma

Klinik Bulgular

Klinik bulgular HL'dakine benzer olarak tutulan bölgenin yerine göre değişmekle birlikte ağrısız büyümüş lenf nodlarıdır. Lenf nodları HL'dan daha hızlı büyümektedirler. İleri evrelerde solunum yollarına bası sonucu hırıltılı solunum, yüzde şişme, solunum sıkıntısı görülür. Burkitt lenfomada karın ağrısı görülür. B semptomları vakaların %30'unda ve sıklıkla anaplastik büyük hücreli lenfomada görülmektedir. Burkitt lenfoma ileoçekal bölgeyi tutar. İnvajinasyon ilk bulgu olabilir. Mediastinal kitleler daha çok lenfoblastik lenfomada görülür. Özellikle anaplastik büyük hücreli lenfomada ciltte tek ya da multipl mavi cilt-cilt altı nodüller, büyük ülseratif lezyonlar ve yaygın multiple papillematöz lezyonlar görülebilir (21, 22).

Laboratuvar bulguları ve tanı

Anemi, trombositopeni ya da lökopeni hastalarda kemik iliği invazyonu, hipersplenizm ya da gastrointestinal kan kaybına bağlı olarak görülebilir. Hiperürisemi Burkitt lenfoma ya da lenfoblastik lenfoma gibi hızlı büyüyen tümörlerde tümör lizis

sendromuna bağlı saptanabilir. Tümör yükünün fazla olması, karaciğer invazyonu ya da hızlı büyüyen tümör dokusu varlığında laktat dehidrojenaz (LDH) artışı görülebilir. Görüntüleme yöntemleri hastalığın yaygınlığını saptamak için kullanılır. Bu açıdan Pozitron emisyon tomografisi bilgisayarlı tomografiden daha duyarlıdır (21, 22).

Kesin tanı tutulan organın patolojik incelemesi ile konur.

Evreleme

Çocukluk ağı NHL hastalarında St. Jude evreleme kullanılmaktadır (Tablo 8).

Tablo 8: St. Jude evreleme sistemi (21).

| Evre | Tanım |
|------|--|
| I | •Abdomen ve mediasten hariç tek ekstrasnodal bölge ya da tek anatomik lenf nodu bölgesi tutulum |
| II | • Tek eksrtranodal bölge ve onun bölgesel lenf nodu tutulumu •Diyafiramın aynı tarafında ≥ 2 lenf nodu bölgesinin tutulumu •Diyafiramın aynı tarafında iki ekstrasnodal bölge tutulumu •Tamamen çıkarılabilir olan, bölgesel lenf nodu tutulumuna bakılmaksızın primer gastrointestinal tümör (genellikle ileoçekal bölge) |
| III | •Diyafiramın farklı taraflarına 2 ekstrasnodal tutulum •Diyafiramın st ya da altında ≥ 2 lenf nodu bölgesi tutulumu •Herhangi primer intratorasik tümör (mediastinal, plevral ya da timik) •Yaygın primer intraabdominal hastalık •Herhangi paraspinal ya da epidural tümör |
| IV | •Yukarıdakilere ek olarak SSS, kemik iliği ya da her ikisinin tutulumu |

Tedavi

Pediyatrik NHL'da tedavi hastalığın evresine ve hücre tipine göre kemoterapi kombinasyonlarını içerir (21, 22).

MİKRO-RNA

Tanım

MikroRNA'lar genom üzerinde protein kodlayan intron ve ekzon bölgeleri ve protein kodlamayan RNA genlerinden transkripsiyonu sağlanan fakat proteine translasyonu gerçekleşmeyen fonksiyonel RNA molekülleridir. MiRNA'lar fonksiyon olarak gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayan, yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda tek iplikçikli bir RNA molekül çeşididir. İnsan genomunda miRNA'ları kodlayan yüksek seviyede korunmuş yüzlerce gen bölgesi keşfedilmiştir. Şu ana kadar yaklaşık 1000 miRNA tanımlanmıştır (25).

Tarihçe

İlk miRNA Lee ve arkadaşları tarafından 1993 yılında keşfedilmiş olup, 'micro RNA' terimi 2001 yılından itibaren kullanılmaya başlanmıştır. İlk defa Caenorhabditis elegans isimli nematodda tanımladığı ilk miRNA, lin-4, lin 14 geninin mRNA'sının 3'UTR bölgesine bağlanarak işlev gördüğü bulunmuştur. (26, 27).

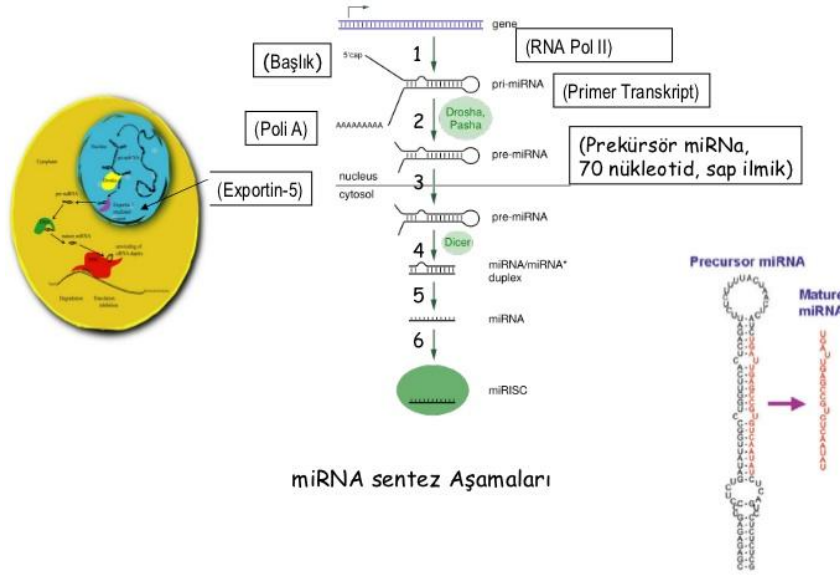
Sentezlenme Basamakları

MikroRNA sentezi primer miRNA'ların transkripsiyonu, pre-miRNA oluşumu ve miRNA'nın aktif halinin oluşumu basamakları ile gerçekleşmektedir.

1. MikroRNA'lar primer transkript olarak RNA polimeraz II enzimi tarafından genomik DNA'da sentezlenir. Primer miRNA 'cap' ve 'poli A' kuyruğuna sahip ilmiik yapısındadır.
2. Nukleusta primer miRNA, RNAaz III enzim ailesinin bir endonukleazı olan Drosha ve kofakörü Pasha (DGCR8) (microprocessor kompleks) tarafından yaklaşık 70 nükleotid uzunluğunda pre-miRNA'ya dönüştürür.
3. Pre-miRNA molekülü Exportin 5 ve RAN-GTP'ye bağlı olarak sitoplazmaya taşınır.
4. Pre-miRNA'lar sitoplazmada RNAaz III enzim ailesinde Dicer adlı nükleaz ile kesilerek 18-24 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA: miRNA dubleksine çevrilir.
5. Dicer ve partner proteini çift iplikli miRNA molekülünü keserek çift iplikçigi açar.
6. Dicer aynı zamanda RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi (RNA-

induced silencing complex: RISC) oluşumunu başlatır (Şekil 1).

MiRNA'lar aktif RISC kompleksine entegre olduktan sonra argonate proteinleri yardımı ile mRNA yıkımına ya da proten translasyonunun baskılanmasına neden olurlar (28, 29).



Şekil 1: mikroRNA sentez basamakları (28).

Fonksiyonları

Matur miRNA'lar hedef genlerin ekspresyonunu azaltarak protein sentezinin düzenlenmesine katılırlar. MikroRNA'lar kendi nükleotid dizilerine komplementer hedef genleri tanıma özelliğine sahiptirler. MikroRNA, RISC ile kompleks oluşturarak mRNA'ya bağlanır ve protein translasyonunun inhibisyonu ya da mRNA'nın yıkımına neden olur (30). MikroRNA'nın hedef mRNA'ya bağlanma şekli sonucunda mRNA yıkımı ya da translasyonun inhibisyonu durumu gelişir. Bunun nedeni miRNA hedef mRNA'nın 3' ucundaki translasyona uğramayan bölgeye bağlanırsa tam olmayan komplementerlik oluşmasına ve bu translasyon baskılanmaktadır. Ancak tam komplementasyon var ise miRNA hedef mRNA'nın 'open reading frame' bölgesine bağlanır ve Argonaute 2 tarafından mRNA yıkımı gerçekleşir (28). Her bir miRNA birden fazla mRNA ekspresyonunu düzenlerken, mRNA'ların da birden fazla miRNA tarafından hedef olabildiği saptanmıştır (31).

MikroRNA ve Kanser

MikroRNA'lar hücre proliferasyonu ve apoptoz gibi bir çok biyolojik süreçte görev almaları nedeniyle kanser biyogenezinde de etkili oldukları düşünülmektedir. İlk olarak Calin ve arkadaşlarının (32) 2001 yılında kronik lenfositik lösemili hastalarda yaptıkları moleküler çalışmada vakaların %50'sinde 13q14 gen bölgesinde delesyon saptanmış ve bu bölgelerde sadece miR-15a ve miR-16-1 genlerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Daha sonra kronik lenfositik lösemili vakaların %68'inde bu miRNA ekspresyonlarının azaldığı ya da olmadığı gösterilmesi ile miRNA'ların kanser biyogenezindeki önemi ortaya çıkmıştır.

MikroRNA'lar hedef mRNA'nın moleküler yolaktaki rolüne göre onkojenik ya da tümör supresor özellik kazanabilirler. MikroRNA'ların kanser vakalarındaki etkileri ile ilgili birkaç mekanizma tanımlanmıştır.

1. Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon analizleri miRNA ekspresyonları ile ilişkili birçok DNA kopya bozuklukları göstermiştir (33). Örneğin; nöroblastom, kolorektal kanser, meme kanseri, over tümöründe kromozom 1'in kısa kolunda delesyon görülmesidir. Bu bölge miR-34a genini barındırmakta bu nedenle hastalığın seyrinde önem arz etmektedir (34-37).

2. MikroRNA'lar onkojenik transkripsiyon faktörleri tarafından aktive edilebilir ya da baskılanabilir. Örneğin; MYC geninin fazla ekspresyonu birçok kanserde kötü prognozla ilişkilidir (38). Birçok miRNA'nın MYC tarafından kontrol edildiği ve bunun sonucunda miRNA ekspresyonunda artış ya da azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (39).

3. MikroRNA ekspresyonu epigenetik mekanizmalarla düzenlenmektedir. Tümörlerde tümör süpresor genlerdeki promoter bölgesindeki CpG bölgesinin hipermetilasyonu, genomik hipometilasyon ya da normal olmayan histon modifikasyonu kanser gelişiminde önemli mekanizmalardandır. Birçok kanserde DNA demetilleyici ajanların ya da histon deasetilaz inhibitörlerinin miRNA artışına neden olduğu gösterilmiştir (40).

4. MiRNA sentezlenme basamağında görevli olan Drosha ve Dicer enzimlerinin düzeyleri azalmış olan kanser hücrelerinde daha agresif seyir gözleendiği gösterilmiştir (41).

5. MikroRNA RISC kompleksinin aktivitesini düzenleyen proteinlerdeki (AGO2, GW182, DDX5) ekspresyon farklılıkları ile kanserler arasında ilişki

gösterilmiştir (42).

miRNA diğer hastalıklar

MiRNA'ların sadece kanser yolaklarında değil, sistemik lupus eritematoz gibi inflamatuvar hastalıklar, miyokardit gibi kardiyak hastalıklar, nefritik sendrom gibi glomerüler hastalıklar hepatit gibi enfeksiyon hastalıklar ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir (43-45).

MiRNA hematopoez

Sadece patolojik durumlarda değil, normal hücre işleyişi için de mikroRNA'ların önemli olduğu bilinmektedir. Normal hematopoezin hemen her basamağında mikroRNA'ların etkili olduğu gösterilmiştir (47). Megakaryopoezde miRNA-34a'nın megakaryosit farklılaşmasında etkili olduğu, miRNA-155'in megakaryopoezi downregüle ettiği, miRNA-146a ve miRNA-145'in immun sistemi aktive ederek megakaryopoez aşamasında yer aldığı farklı çalışmalarda gösterilmiştir (48-50).

T-hücre farklılaşmasında da miRNA'ların etkili olduğunu gösteren bir çalışmada doğal, efektör ve CD8 T-hücrelerinde miRNA-16, miRNA 142-3p, miRNA,150, miRNA 15b ve let-7f'nin diğerlerinden 7 kat fazla olduğu saptanmıştır (51). MiRNA'ların T-hücrelerdeki farklılaşmanın yanı sıra olgun ve peripheral T-hücrelerde miRNA-181a'nın daha az eksprese olurken çift pozitif T-hücrelerinde artmış ekspresyonunun bulunması T-hücreleri reseptör sensitivitesinde de miRNA'ların etkili olduğunu düşündürmüştür (52). Bunun yanı sıra miR-150'nin T- hücre farklılaşmasında etkili olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (53-55). Literatürde miR-155'in CD34+ hücrelerinin T helper 1 yönünde farklılaşmalarında etkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (56, 57).

B-lenfositlerdeki miRNA ekspresyonlarının incelendiği bir çalışmada germinal merkezde miRNA-106a, miRNA-181b ve miRNA-17-5p ve miRNA-150 ekspresyonunun fazla olduğu görülmüştür (58). miRNA-150'nin pro-B hücreden pre-B hücreye geçişini cMyb üzerinden bloke ettiği saptanmıştır (59). Bir çalışmada miRNA-181'in B hücre serisinde arttığı gösterilmiş ve miRNA-181'in B-hücre farklılaşmasında kritik öneme sahip olduğunu düşündürmüştür (60).

MiRNA ve hematolojik kanserler

Kanserleşme sürecinde miRNA'ların etkisinin gösterildiği ilk çalışma 2001 yılında Calin ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada KLL hastalarının yaklaşık yarısında 13q14 gen bölgesindeki delesyonun görülmesi üzerinden yola çıkarak aynı gen bölgesinde lokalize olan miRNA-15 ve miRNA-16'nın da KLL vakalarının büyük kısmında (%68) down regüle olduğu saptanmıştır (61).

Daha sonraki yıllarda yapılan bir çalışmada (62) yedi erişkin ALL hastasının miRNA analizleri yapılmış ve altı sağlıklı kontrolle karşılaştırılmıştır. ALL hastalarında miR-128b, miR-204, miR-218, miR-331 ve miR-181-1'in ekspresyonlarının arttığı, miR-135b, miR-132, miR-199, miR-139 ve miR-150'nin ekspresyonlarının azaldığı saptanmıştır. Yeni tanı almış 40 pre-B cell ALL hastalarında yapılan başka bir çalışmada miR-222, miR-339, miR-142-3p'nin upregüle, miR-451, miR-373'ün down regüle olduğu gösterilmiştir (63). Pediatrik ALL hastalarının alt gruplarının miRNA analizleri incelendiğinde miR-148, miR-151 ve miR-424 ekspresyonlarının B ve T cell ALL ayırımında kullanılabileceği saptanmıştır (64). ALL hastalarının tedaviye dirençlerinin miRNA ekspresyonları araştırıldığında miR-18a, miR-193a, miR-218, miR-532, miR-550, miR-625, miR-633, miR-638'in prednizolon direnci ile ilişkili olduğu farklı çalışmalarda belirtilmiştir (65, 66). Zhang ve arkadaşlarının (65) çalışmasında ALL'de SSS relapsı, risk gruplarında göre miRNA analizleri yapıldığında 18 hastanın 4'ünde bir yıl içinde SSS relapsı gelişmiş. Bu hastaların miRNA analizlerinde miR-7, miR-198 ve miR-663'ün üç kat arttığı, miR-126, miR-345, miR-222 ve miR-551a'nın ise azaldığı gösterilmiştir. Başka bir çalışmada miR-16 upregülasyonunun kötü prognozla ilişkili olduğu, hastalısız sağ kalımı azalttığı gösterilmiştir (67). MiRNA'lar ve ALL'de sağ kalım ile ilişkisi incelenmiş miR-223, miR-708, miR-223 ve miR-27a ekspresyon artışını hastalısız sağ kalım ile orantılı olduğu bulunmuştur (68).

Lenfomalarda yapılan ilk çalışma Metzler ve arkadaşlarının çalışmasıdır. Araştırmada hastalarda miR-155'i kodlayan BIC ekspresyonunun Burkitt lenfomalı çocuklarda arttığı gösterilmiştir (69). B cell lenfomada miR-17-92'nin p21 kontrolü ile hücreyi G1/S fazında durdurarak lenfogenezini düzenlediği gösterilmiştir (70). Diffüz büyük B cell lenfomada miR-155'in ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (71). Burkitt lenfoma, diffüz büyük B cell lenfoma gibi agresif seyirli lenfomaların MYC ekspresyonunun bu durumla ilişkili olduğu bilinmektedir. Bir çalışmada miR-29'un

down regüle olmasının hücre döngüsünü aktive ettiği, daha sonra miR-494 ekspresyonunun azalarak MYC upregülasyonu ile sonuçlandığını göstermişlerdir (72).

Tedavide Kullanımları

MikroRNA fonksiyonlarını inhibe eden ya da düzelden birçok prelinik hayvan çalışmaları yapılmıştır. MikroRNA'lar antisense oligonükleotidler (antagomir ya da antimir) tarafından inhibe edilebilmektedir. Antagomirler miRNA'ların hedefine bağlanmasını yarışmalı olarak inhibe eden sentetik moleküllerdir. Hayvan modellerinde intratümöral enjeksiyonu sonucunda tümör boyutunda küçülme gözlenmiştir. Anti-miR-17-5p'nin nöroblastom hücrelerine enjeksiyonu sonucunda 1 hafta gibi kısa bir sürede tümör hücrelerinin yok olduğu gösterilmiştir (73).

MikroRNA'ları bloke eden antagomirlerin yanında miRNA down regülasyonunu ya da kayıplarını önlemek amacıyla üretilen miRNA 'mimetik' ya da 'mimik'leri kullanılmıştır. MikroRNA mimikleri endojen miRNA'nın benzeri kılavuz dizi ve kılavuz diziye komplementer 'passenger' dizi içermektedir. Antagomirler konjugasyona ihtiyaç duymazken miRNA mimikler konjugasyon ya da enkapsülasyon işlemi gerektirmektedirler. Kolon kanseri olan *xenograftlara* aterokolajen-miR-34a kompleksi enjeksiyonu sonrasında tümör büyümesinin orta derecede süprese olduğu gösterilmişken, prostat kanseri olan fare modellerinde miR-16-aterokolajen kompleksinin verilmesi sonucu kemik metastazının tamamen inhibisyonu gözlenmiştir (74, 75).

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Ağustos 2014- Eylül 2015 tarihleri arasında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir Dr Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim Araştırma Hastanesi ve Ankara Çocuk Sağlığı Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim araştırma Hastanesi'nde yeni tanı almış, akut lösemi ve lenfoma hastalarında yapıldı. Çalışma için Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan onay alındı. (13.08.2013 tarihli 11 sayılı karar). Ayrıca hasta ve ebeveynlerinden ve kontrol grubundan bilgilendirilmiş onam formu alındı.

Hastaların çalışmaya dahil edilme kriterleri

- 0-25 yaş arası
- Yeni tanı almış akut lösemi ya da lenfoma olması
- Kemoterapi almamış olması

Olguların çalışmaya dahil edilmeme kriterleri

- Çalışmaya katılmayı reddetme
- Kalıtsal veya benign hematolojik hastalığı olması.
- Genetik sendroma sekonder gelişmiş lösemi ve lenfoma olması

Hastaların demografik, klinik ve laboratuvar özellikleri formlara kaydedildi. Bu formlarda bulunan bilgiler şunlardır:

- Doğum tarihi
- Tanı tarihi
- Tanı yaşı
- Tanı konulan hastane
- Cinsiyeti
- Lösemi/ lenfoma tipi
- FAB sınıflaması
- İmmunfenotipik sınıflama
- Tanı anındaki lökosit sayısı
- Tanı anında periferik yaymadaki blast oranı (%)
- Tanı anında kemik iliğindeki blast oranı (%)
- Sitonegetik analiz sonucu
- Risk grubu

- Lenfomalarda evre
- ALL hastaları için 8. gün steroide yanıt durumu
- ALL hastaları için 33. gün remisyon durumu
- AML hastaları için 15. gün remisyon durumu
- Hastaları remisyon/relaps durumları
- Hastaları son durumları (yaşıyor, exitus)

MİRNA İÇİN KAN ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

Çalışmaya alınan akut lösemi ve lenfoma hastalarından tedavi öncesi ve tedavi sonrası 2.5 mL venöz kan örnekleri elde edildi. RNA'nın kimyasal yapısından dolayı RNA seviyesi hızlı bir şekilde azalmaya başlamaktadır. Çalışmanın güvenilirliği açısından alınan örnekler içinde RNA'yı stabilize eden kimyasal bulunan özel tüplerde saklandı. Bu sayede örneklerin alındıkları yerden izolasyonun yapılacağı laboratuara kadar RNA seviyelerinin korunması amaçlandı. Bu çalışmada stabilizatör olarak (PAXgen) kullanıldı. Bu tüpler içerisine alınan örnekler RNA yapı ve miktarlarını 18-25 °C'de 3 gün, 2-8°C'de 5 gün koruyabilmektedirler. -70 °C'de ise yaklaşık 50 ay depolanabilir.

Çalışma Basamakları

- Periferik venöz kan örneği alınması
- Plazma ekstrasyonu
- RNA izolasyonu
- cDNA sentezi
- qRT-PCR miRNA ekspresyon analizi
- Verilerin analizi

qRT-PCR miRNA ekspresyon analizi

RNA İzolasyonu Protokolü

1. Hastalardan toplanan 2,5 ml kan örnekleri lökosit çalışmaları için eritrosit liziz tampon (1/5) ile muamele edilip 1800-2000 rpm de 10 dakika santrifüj edilerek elde edilen pellet ve lenfoma çalışmaları için kan örnekleri 4000 rpm de 7 dakika santrifüj edilerek elde edilen serum örnekleri taze olarak RNA izolasyonu için kullanıldı.

2. RNA izolasyonu için Qiagen miRNeasy kit (katalog no:217184, Germany) kullanıldı. Protokol ise; lökosit çalışmaları için elde edilen pellet ya da serum (100 µl) örneğine qiazol 900 µl ilave edilerek oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
3. Ardından 180 µl kloroform ilave edilerek 15 saniye vorteks edildi. Santrifüj işlemi 12000 xg de 15 dakika +4°C de gerçekleştirildi.
4. Oluşan üst berrak faz alınarak toplam hacmin 1,5 katı %96'lık saf alkol eklendi.
5. Daha sonra kit içerisinde bulunan kolonlardan 8000 xg de 15 saniye santrifüj edildi.
6. Kit içerisinde bulunan RWT ve RPM solüsyonları ile peş peşe 700 µl ve 500 µl konularak 8000 xg de 15 saniye santrifüj edilerek kolon yıkandı.
7. % 80'lik alkol 500 µl konularak 8000 xg de 2 dakika santrifüj işlemi yapıldı.
8. 8000 xg de 4 dakika alkol buharlaştırma işlemi için santrifüj edildi.
9. Son olarak 20000 xg de 1 dakika RNase içermeyen su koyularak RNA elde edildi. Elde edilen RNA -80°C de saklandı.

cDNA Eldesi

İzolasyonu gerçekleştirilen RNA'lar üretici firmanın belirttiği şekilde elde edildi (miScript II RT kit Qiagen, Germany). Total RNA (1ng-4 ng) 8 µl, HiSpec tamponu 4 µl, nucleis mix 2 µl, miScript RT 2 µl, saf su 4 µl toplam 20 µl olacak şekilde reaksiyon miksi hazırlandı. Reaksiyon şartları; 37°C de 60 dakika, 95°C de 5 dakika 1 siklus olarak gerçekleştirildi. Ardından reaksiyon sonunda örnekler -20°C de saklandı.

miRNA Hedef Genleri Analizi

miRNA hedef genleri miRGen target veritabanı kullanılarak belirlendi. (<http://www.diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/miRGen/v3/Targets.cgi>). Yapılan analizde akut lösemi ve lenfoma ile ilişkili hedef genler belirlendi.

Real-Time Reaksiyonu

Real time reaksiyonu için elde edilen cDNA'lar kullanıldı. Bunun için Qiagen (Germany) özel olarak dizayn edilen hsa-miR-1, hsa-let-7b, hsa-miR-7, hsa-miR-10, hsa-miR-21, hsa-miR-222, hsa-miR-23, hsa-miR-27a_1, hsa-miR-25, hsa-miR-30, hsa-miR-31, hsa-miR-132, hsa-miR-135 b, hsa-miR-1281, hsa-miR-145, hsa-miR-146a, hsa-miR-150, hsa-miR-155, hsa-miR-181, hsa-miR-192, hsa-miR-200b, hsa-miR-200c, hsa-miR-204, hsa-miR-218, hsa-miR-331, has-miR-372, hsa-miR-375, hsa-miR-422, hsa-miR-451, hsa-miR-494, hsa-miR-499, hsa-miR-520, hsa-miR-548,

primerleri kullanıldı. Normalizatör olarak U6 kullanıldı. 12,5 µl master miks, 1 universal primer µl, 1 µl primer, 5,5 µl RNase içermeyen su, 5 µl cDNA olarak toplam hacim 25 µl olacak şekilde hazırlandı. Reaksiyon şartları; 95°C de 15 dakika bir basamak, 94°C 30 saniye, 55°C 30 saniye, 70°C 15 saniye 40 basamak olarak gerçekleştirildi.

Tedavi öncesi ve Tedavi Sonrası hastalar arasında farklı mikroRNA ekspresyonlarının tanımlanması

qRT-PCR sonuçları analiz edilerek tedavi öncesi ve tedaviye hastalar arasında farklılık gösteren mikroRNA'ların ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar biyoinformatik destek alınarak saptandı.

Verilerin Değerlendirilmesi

qRT-PCR çalışmalarının istatistiksel analizi için, çalışmalarda elde edilen Ct değerleri kat değişim analizi için delta delta Ct analizi yapıldı. Gruplar arasındaki farklar $2^{-\Delta\Delta CT} = ((\Delta CT(\text{hasta}) - \Delta CT(\text{u6}) - (\Delta CT(\text{kontrol}) - \Delta CT(\text{u6})))$ formülü ile hesaplandı. Verilerin analizinde SPSS 20.0 paket programı kullanıldı. Araştırmada hastaların özellikleri için tanımlayıcı istatistik yapıldı, ALL-AML miRNA ekspresyon farklılıklarının kontrol grubu ile karşılaştırılması için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Risklere göre sınıflandırılan ALL hastalarının miRNA ekspresyon farklılıkları için Kruskal-Wallis analizi yapıldı. Lökosit sayısı, periferik yayma ve kemik iliğindeki blast yüzdesi ile miRNA ekspresyonlarındaki değişim arasındaki ilişki Spearman korelasyonu ile yapıldı. Tüm testlerde $p < 0,05$ anlamlılık düzeyi olarak belirlendi.

BULGULAR

Çalışmaya 26 hasta ve 5 sağlıklı kontrol alındı. Hastaların 21'i akut lösemi, 5'i lenfoma idi. Kontrol grubuna herhangi kronik hastalığı olmayan sağlıklı çocuklar alındı. Kontrol grubunu yaş ortalaması $9,2 \pm 2,2$ yıl olup 3'ü erkek (%60), 2'si kızdı (%40). Akut lösemi hastalarının dokuzu (%42,9) kız, 12'si (%57,1) erkekti. Akut lösemi hastalarının ortalama yaşı $8,5 \pm 7,2$ yıl, ortanca yaşı 5,7 yıl (1-27) olarak saptandı. ALL hastalarının 2'si erişkin (22 ve 27) yaş grubunda idi. Lösemi hastalarının 15'i (%71,4) ALL, 6'sı (%28,6) AML idi. Akut lenfoblastik lösemi hastalarının 2'si (%13) T cell ALL, 13'ü (%86,6) B cell ALL idi. FAB sınıflamasına göre ALL hastalarının 5'i L1, üçü L2, biri L3 olarak tanımlandı. Altı hastanın FAB sınıflaması belirtilmedi. AML hastaları FAB sınıflamasına göre 3'ü M2, 2'si M4, 1'i M0'dı. AML hastalarının birinde hastada inv(16) birinde de t(8:21) pozitifliği saptandı. BFM protokolüne göre risk gruplarına ayrıldığında ALL hastalarının 4'ü (%26,6) standart risk grubunda, 8'i (%53,3) orta risk, 3'ü (%20) yüksek risk grubuna girdi. AML hastalarının dördü düşük (%66,6), ikisi (%33,3) yüksek risk grubunda idi. ALL hastalarının tamamında 8. gün steroid yanıtı alınırken, sadece bir hasta 33. günde remisyona girmedi (%4,8). AML hastalarının tamamı 1. ayında remisyona girdi. Hastaların başvuru anındaki ortalama lökosit değeri $29\ 535 \pm 32\ 499$ /mm³, periferik yaymada blast oranı ortalama %75,9 (12-100) iken kemik iliğinde ortalama blast oranı %85,1 (16-100) olarak saptandı. ALL hastalarının tamamında Philedelphia kromozomu negatifti. Bir hastada hiperdiploidi, iki hastada t(12:21) saptandı. Akut lösemi hastalarının demografik, klinik ve laboratuvar özellikleri tablo 9'de gösterilmiştir.

Tablo 9: ALL hastalarının demografik özellikleri.

| | | | | |
|----------------------------|--|--------------------------|-------|--------------|
| Cinsiyet | Kız:9 (%42,9) | Erkek:12 (%57,1) | | |
| Yaş | Ort:8,5 \pm 7,2 yıl | Ortanca: 5,75 (1-27) yıl | | |
| Lösemi tipi | ALL: 15 (%71,4) | AML: 6 (%28,6) | | |
| İmmunfenotip | B-cell: 19 (%90,5) | T-cell: 2 (%9,5) | | |
| FAB-ALL | L1:5 | L2:3 | L3: 1 | Bilinmiyor:6 |
| FAB-AML | M0:1 | M2:3 | M4:2 | |
| BFM risk grubu- ALL | SRG: 4 | MRG:8 | HRG:3 | |
| BFM risk grubu-AML | Düşük: 4 | Yüksek: 2 | | |
| Lökosit sayısı | $29\ 535 \pm 32\ 499$ /mm ³ (770-110 000) | | | |
| PY blast yüzdesi | %75,9 (12-100) | | | |
| Kİ blast yüzdesi | %85,1 (16-100) | | | |

Tablo 10: Akut lösemi hastalarının demografik, klinik ve laboratuvar özellikleri.

| Hasta no | Yaş (yıl) | Cinsiyet | Tip | İmm unfe notip | FAB | Sitogenetik | Risk grubu | Remisyon Durumu |
|----------|-----------|----------|-----|----------------|-----|---------------|------------|-------------------|
| 1 | 3 | K | ALL | B-cell | L1 | t(12:21) | Standart | Remisyonunda |
| 3 | 22 | E | ALL | B-cell | | - | Yüksek | Exitus |
| 4 | 6 | K | ALL | B-cell | L1 | t(12:21) | Orta | Remisyonunda |
| 7 | 5 | E | AML | | M0 | - | Yüksek | Remisyonunda |
| 8 | 4,5 | K | AML | | M4 | Inv 16 | Düşük | Remisyonunda |
| 10 | 13 | K | AML | | M2 | t(8:21) | Düşük | Remisyonunda |
| 12 | 4 | E | ALL | B-cell | L3 | - | Yüksek | Relaps |
| 13 | 27 | K | AML | | M2 | - | Düşük | Remisyonunda |
| 14 | 13 | E | ALL | B-cell | L2 | - | Orta | Remisyonunda |
| 16 | 2 | E | ALL | B-cell | L1 | - | Standart | Remisyonunda |
| 17 | 13,5 | E | ALL | B-cell | L2 | - | Orta | Remisyonunda |
| 18 | 4 | E | ALL | T-cell | | - | Orta | Remisyonunda |
| 19 | 14 | E | ALL | T-cell | | - | Yüksek | Remisyona girmedi |
| 20 | 5 | E | ALL | B-cell | | - | Standart | Remisyonunda |
| 21 | 1 | K | ALL | B-cell | | - | Orta | Takipten çıktı |
| 22 | 7 | E | ALL | B-cell | | hiperdiploidi | Orta | Remisyonunda |
| 23 | 2 | E | AML | | M4 | t(4:11) | Yüksek | Remisyonunda |
| 24 | 16 | E | AML | | M2 | - | Düşük | Remisyonunda |
| 26 | 2 | K | ALL | B-cell | L1 | - | Standart | Tedavisi sürüyor |
| 27 | 14 | K | ALL | B-cell | L1 | - | Orta | Remisyonunda |
| 28 | 2 | K | ALL | B-cell | L2 | - | Orta | Remisyonunda |

Lenfoma hastalarının biri HL (%20), dördü NHL tanısı aldı. Hastaların dördü erkek, biri kızdı. Ortalama yaşları $8,1 \pm 3,34$ yıl, ortanca 6,5 yıl (5-13,5). Hodgkin lenfomalı hasta noduler sklerozan tip iken, NHL hastalarının ikisi Burkitt lenfoma, biri büyük B hücreli lenfoma, biri lenfoblastik lenfoma tanısı aldı. Hastaların ikisinde mediasten tutulumu, ikisinde de kemik iliği tutulumu vardı. Hastalarda santral sinir sistemi tutulumu yoktu. Hastaların ikisinde c-MYC geni pozitif saptandı. Lenfoma hastalarının başvuru anında ortalama lökosit sayısı $6960 \pm 2126 /\text{mm}^3$, ortalama hemoglobin değeri $12,5 \pm 0,63$ g/dl, ortalama trombosit sayısı $305800 \pm 1343 /\text{mm}^3$, ortalama laktat dehidrogenaz düzeyi 452 ± 316 IU/ml, eritrosit sedimentasyon hızı 22 ± 21 /saat, ortalama C-reaktif protein değeri $1,2 \pm 1,3$ mg/dl, ortalama ürik asit düzeyi $4,2 \pm 3,3$ mg/dl olarak saptandı.

Lenfoma tanılı hastaların demografik özellikleri tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11: Çalışmaya dahil edilen lenfoma tanılı hastaların demografik ve klinik özellikleri.

| Hasta no | Yaş (yıl) | Cinsiyet | Tanı | Evre | Risk | Sitogenetik | Tedaviye yanıt durumu |
|----------|-----------|----------|----------|--------|--------|-------------|-----------------------------------|
| 2 | 6,5 | E | NHL (BL) | Evre 1 | Risk 2 | c-myc | Yanıt var |
| 5 | 5 | E | NHL | Evre 3 | Risk 2 | - | Yanıt var |
| 6 | 13,5 | E | NHL(BL) | Evre 4 | Risk 3 | c-myc | Yanıt var |
| 9 | 6,5 | K | HL(NS) | Evre 2 | Risk 2 | - | Yanıt var |
| 15 | 9 yaş | Erkek | NHL(LL) | Evre 2 | Risk 2 | - | Yanıt var, tedavisi devam etmekte |

HL: Hodgkin lenfoma, NHL: non-Hodgkin lenfoma, BL: Burkitt Lenfoma, NS: Nodüler sklerozan tip, LL: lenfoblastik lenfoma.

MiRNA sonuçları

Hastalarda 33 adet miRNA'nın ekspresyon düzeyleri tedaviden önce ve tedavinin 1. ayında incelendi. İncelenen miRNA'lar literatürde kanser patogenezinde rol oynadıkları gösterilmiş miRNA'lardan seçildi. Bunlar; miR-1, let-7b, miR-7, miR-10, miR-21, miR-222, miR23, miR-27a, miR-25, miR-30, miR-31, miR-132, miR-135b, miR-128-1, miR-145, miR-146a, miR-150, miR-155, miR-181, miR-192, miR-200b, miR-200c, miR-204, miR-218, miR-331, miR-371, miR-375, miR-422, miR-451, miR-494, miR-499, miR-520, miR-548 idi. Standardizasyon için u6 kullanıldı.

Akut lösemili hastalarda tespit edilen miRNA düzeylerinin, kontrol grubuna göre karşılaştırması ve tedavi öncesi ve sonrasında kaç kat değiştikleri 'fold change analizi' yapılarak hesaplandı. MiRNA fold change analizleri tablo 12-13'de gösterildi.

Akut lösemili hastaların sağlıklı kontrollerle karşılaştırmasında miR-21, miR-222, miR-30, miR-145, miR-146a ve miR-181'in ekspresyonlarının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek; let-7b, miR-128-1, miR-218, miR-331, miR-422, miR-451, miR-520, miR-31, miR-372 ve miR-375'in ekspresyonunun ise anlamlı olarak düşük olduğu saptandı. Akut lösemi ve kontrol grubunun miRNA fold change analizleri tablo 11'da gösterildi. Kontrol grubuna göre AML hastalarında miR-155 ekspresyonunun arttığı, miR-10 miR-23, miR-218, miR-422, miR-451'in ekspresyonunun azaldığı saptanırken, ALL hastalarında kontrol grubuna göre miR-21, miR-222, miR-30, miR-

145, miR-146a, miR-155 ekspresyonunun arttığı, miR-375 ekspresyonununun azaldığı bulundu (Tablo 13).

Lenfoma hastalarının miRNA düzeyleri kontrol grubu ile miRNA karşılaştırıldığında let-7b, miR-7, miR-10, miR-23, miR-25, miR-128-1, miR-375, miR-422'in lenfoma hastalarında kontrol grubuna göre düşük olduğu, miR-21, miR-222, miR-145, miR-146a ve miR-181'in lenfoma hastalarında yüksek olduğu saptandı (Tablo 14).

Toplam 21 akut lösemi, 5 lenfoma tanılı hastadan kemoterapi öncesi ve 17 lösemi ve 5 lenfoma tanılı hastadan tedaviden 1 ay sonra izole edilen miRNA'ların fold change yapıldı. İki kat ve üzeri artış anlamlı kabul edildi. Hastalardan biri kemik iliği nakli olduğu, ikisi takipten çıktığı ve biri tedavisinin 1 ayı tamamlanmadığı için kontrol miRNA analizleri yapılamadı. En fazla artış gösteren miRNA, miR-331 olmasına karşın sadece 5 hastada izolasyonu yapılabildiği için istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmedi. Buna göre en fazla ekspresyonu değişen miRNA; lösemi hastalarında tedavi sonrası 30 kat artış gösteren miR-375 ve lenfoma hastalarında 29 kat artan miR-200c idi. Bunların dışında lösemi hastalarında miR-1, miR-23, miR-146a, miR-192 ve miR-548'in lösemi hastalarında tedavi sonrası ekspresyonlarının arttığı ve let-7b ve miR-132'nin ekspresyonunun azaldığı bulundu. Lenfoma hastalarında tedavi sonrası ekspresyonu artan miRNA'lar miR-7, miR-21, miR-132, miR-135b, miR-200c iken, ekspresyonu azalan miRNA'lar let-7b, miR-10, miR-222, miR-27a, miR-25 ve miR-145 idi. Diğer miRNA'ların düzeylerinde tedavi öncesi ve sonrasında anlamlı değişiklik saptanmadı (Tablo 15).

Lösemi hastalarının lökosit sayıları ile tedavi öncesi ve sonrası miRNA ekspresyonları karşılaştırıldığında sadece miR-128-1 ve miR-331 ile lökosit sayısı arasında pozitif yönde orta derecede ilişki bulundu (sırayla $p=0,026$; $r=0,537$ ve $p=0,037$; $r=0,9$).

Lösemi hastalarının tanı anındaki kemik iliğindeki blast oranı ile tedavi öncesi ve sonrası miRNA değişimleri arasındaki ilişkide; miR-21 ve miR-27a ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı artış bulundu (sırayla $p=0,001$, $r=0,74$ ve $p=0,08$, $r=0,636$). Tanı anında bakılan periferik yaymadaki blast oranı ile sadece miR-200c ekspresyonu negatif ilişkili olarak anlamlı bulundu ($r=-0,586$, $p=0,035$).

Tablo 12: Lösemi hastaları ve kontrol grubunun miRNA fold düzeylerinin karşılaştırması.

| MiRNA | | Median (Min - Max) | p | MiRNA | | Median (Min - Max) | p |
|-----------------|---------------|-----------------------------------|--------|----------------|---------------|---|---------|
| miR1 | lösemi (n=21) | 12,57 (0 - 18458,53) | 0,659 | miR146a | lösemi (n=21) | 2234,91 (0,01 – 704,38 x10 ³) | 0,001* |
| | kontrol (n=5) | 20,86 (15,96 - 21,53) | | | kontrol (n=5) | 32,61 (26,39 - 35,38) | |
| let7b | lösemi (n=21) | 0,71 (0 - 636,49) | 0,034* | miR150 | lösemi (n=21) | 35,31 (0 - 11051,85) | 0,659 |
| | kontrol (n=5) | 16,69 (15,76 - 18,06) | | | kontrol (n=5) | 24,2 (20,52 - 30,57) | |
| miR7 | lösemi (n=21) | 38,91 (0 - 21203,28) | 0,569 | miR155 | lösemi (n=21) | 127,47 (0 - 46148,62) | 0,157 |
| | kontrol (n=5) | 24,19 (22,4 - 25,64) | | | kontrol (n=5) | 28,5 (25,96 - 33,71) | |
| miR10 | lösemi (n=21) | 4,4 (0 - 6374,07) | 0,374 | miR181 | lösemi (n=21) | 3134,46 (0 - 5071566,49) | 0,001* |
| | kontrol (n=5) | 25,38 (22,85 - 26,14) | | | kontrol (n=5) | 22,89 (17,58 - 24,89) | |
| miR21 | lösemi (n=21) | 353,61 (0 - 288058,04) | 0,003* | miR192 | lösemi (n=21) | 49,11 (0 - 34588,38) | 0,057 |
| | kontrol (n=5) | 17,65 (11,94 - 24,2) | | | kontrol (n=5) | 22,16 (18,53 - 29,93) | |
| miR222 | lösemi (n=21) | 100,99 (0 - 52064,05) | 0,003* | miR200b | lösemi (n=21) | 136,62 (0 - 81471,06) | 0,224 |
| | kontrol (n=5) | 22,26 (18,15 - 25,96) | | | kontrol (n=5) | 33,08 (31,95 - 44,9) | |
| miR23 | lösemi (n=21) | 1,14 (0 - 1325,21) | 0,157 | miR200c | lösemi (n=21) | 85,87 (0 - 55261,99) | 0,659 |
| | kontrol (n=5) | 16,1 (15,78 - 18,1) | | | kontrol (n=5) | 34,25 (29,59 - 35,67) | |
| miR27a | lösemi (n=21) | 13,87 (0 - 4918,49) | 0,659 | miR218 | lösemi (n=21) | 2,82 (0 - 614,81) | 0,012* |
| | kontrol (n=5) | 20,93 (20,08 - 26,99) | | | kontrol (n=5) | 29,03 (25,35 - 31,21) | |
| miR25 | lösemi (n=21) | 13,95 (0 - 1353,05) | 0,486 | miR331 | lösemi (n=20) | 0 (0 – 68,04x10 ⁷) | 0,001* |
| | kontrol (n=5) | 22,53 (19,26 - 24,9) | | | kontrol (n=5) | 18,64 (16,3 - 19) | |
| miR30 | lösemi (n=21) | 229,13 (0 - 42524,3) | 0,023* | miR372 | lösemi (n=21) | 0 (0 - 0,24) | 0,0001* |
| | kontrol (n=5) | 25,05 (13,36 - 29,01) | | | kontrol (n=5) | 20,93 (19,36 - 25,53) | |
| miR31 | lösemi (n=21) | 0 (0 - 0,98) | 0,001* | miR375 | lösemi (n=21) | 0,01 (0 - 13,78) | 0,0001* |
| | kontrol (n=3) | 17,78 (15,52 - 18,45) | | | kontrol (n=5) | 17,67 (17,65 - 25,04) | |
| miR132 | lösemi (n=21) | 61,65 (0 - 9449,35) | 0,659 | miR422 | lösemi (n=21) | 0,24 (0 - 388,02) | 0,003* |
| | kontrol (n=5) | 29,89 (23,33 - 34,9) | | | kontrol (n=5) | 19,67 (14,56 - 24,89) | |
| miR135b | lösemi (n=21) | 17,9 (0 - 81924,08) | 1 | miR451 | lösemi (n=21) | 0,57 (0 - 3800,57) | 0,003* |
| | kontrol (n=5) | 21,09 (16,97 - 26,6) | | | kontrol (n=5) | 7,53 (5,33 - 10,54) | |
| miR128-1 | lösemi (n=21) | 1,28 (0 – 21,89x10 ⁸) | 0,049* | miR520 | lösemi (n=20) | 1,21 (0 – 54,82x10 ¹²) | 0,042* |
| | kontrol (n=5) | 31,55 (25,78 - 35,67) | | | kontrol (n=5) | 32,6 (29,66 - 33,36) | |
| miR145 | lösemi (n=21) | 972,8 (0 - 739402,3) | 0,012* | miR548 | lösemi (n=21) | 4,18 (0 - 14915,24) | 0,659 |
| | kontrol (n=5) | 27,4 (25,49 - 33,27) | | | kontrol (n=5) | 34,45 (21,35 - 36,8) | |

Tablo 13: ALL ve AML hastalarında miRNA ekspresyonları.

| | | Median (Min - Max) | p | | | Median (Min - Max) | p |
|---------------|---------------|---------------------------|--------|----------------|---------------|------------------------------|--------|
| let7b | ALL (n=16) | 0,58 (0 - 636,49) | 0,044* | miR145 | ALL (n=16) | 1144,25 (3,22 - 739402,3) | 0,003* |
| | AML (n=10) | 0,59 (0 - 87,06) | | | AML (n=9) | 341,56 (0 - 1456,21) | |
| | kontrol (n=5) | 16,69 (15,76 - 18,06) | | | kontrol (n=5) | 27,4 (25,49 - 33,27) | |
| miR7 | ALL (n=16) | 48,98 (2,03 - 21203,28) | 0,141 | miR146a | ALL (n=16) | 4087,64 (309,97 - 704382,72) | 0,002* |
| | AML (n=9) | 13,57 (0 - 59,06) | | | AML (n=9) | 1945,6 (0,01 - 87197,55) | |
| | kontrol (n=5) | 24,19 (22,4 - 25,64) | | | kontrol (n=5) | 32,61 (26,39 - 35,38) | |
| miR10 | ALL (n=16) | 20,48 (0 - 6374,07) | 0,013* | miR155 | ALL (n=16) | 304,64 (12,08 - 46148,62) | 0,032* |
| | AML (n=9) | 2,11 (0 - 19,81) | | | AML (n=9) | 34,39 (0 - 430,54) | |
| | kontrol (n=5) | 25,38 (22,85 - 26,14) | | | kontrol (n=5) | 28,5 (25,96 - 33,71) | |
| miR21 | ALL (n=16) | 917,28 (0,79 - 288058,04) | 0,003* | miR192 | ALL (n=16) | 133,37 (1,2 - 34588,38) | 0,004* |
| | AML (n=9) | 200,3 (0 - 901,39) | | | AML (n=9) | 43,65 (0 - 98,91) | |
| | kontrol (n=5) | 17,65 (11,94 - 24,2) | | | kontrol (n=5) | 22,16 (18,53 - 29,93) | |
| miR222 | ALL (n=16) | 200,73 (11,3 - 52064,05) | 0,003* | miR200b | ALL (n=16) | 302,93 (12,33 - 81471,06) | 0,018* |
| | AML (n=9) | 49,45 (0 - 314,3) | | | AML (n=9) | 30,78 (0 - 1462,28) | |
| | kontrol (n=5) | 22,26 (18,15 - 25,96) | | | kontrol (n=5) | 33,08 (31,95 - 44,9) | |
| miR23 | ALL (n=16) | 6,68 (0,22 - 1325,21) | 0,011* | miR218 | ALL (n=16) | 3,45 (0 - 614,81) | 0,041* |
| | AML (n=9) | 0,56 (0 - 5,46) | | | AML (n=9) | 0,79 (0 - 696,51) | |
| | kontrol (n=5) | 16,1 (15,78 - 18,1) | | | kontrol (n=5) | 29,03 (25,35 - 31,21) | |
| miR27a | ALL (n=16) | 58,07 (2,09 - 4918,49) | 0,032* | miR375 | ALL (n=16) | 0,02 (0 - 13,78) | 0,001* |
| | AML (n=9) | 4,77 (0 - 368,62) | | | AML (n=9) | 0 (0 - 1,7) | |
| | kontrol (n=5) | 20,93 (20,08 - 26,99) | | | kontrol (n=5) | 17,67 (17,65 - 25,04) | |
| miR30 | ALL (n=16) | 283,18 (5,84 - 42524,3) | 0,003* | miR422 | ALL (n=16) | 0,82 (0,05 - 388,02) | 0,002* |
| | AML (n=9) | 57,12 (0 - 241,52) | | | AML (n=9) | 0,12 (0 - 1,27) | |
| | kontrol (n=5) | 25,05 (13,36 - 29,01) | | | kontrol (n=5) | 19,67 (14,56 - 24,89) | |
| miR31 | ALL (n=16) | 0,02 (0 - 0,98) | 0,007* | miR451 | ALL (n=16) | 1,38 (0 - 3800,57) | 0,005* |
| | AML (n=9) | 0 (0 - 0,17) | | | AML (n=9) | 0,37 (0 - 2,35) | |
| | kontrol (n=3) | 17,78 (15,52 - 18,45) | | | kontrol (n=5) | 7,53 (5,33 - 10,54) | |

Tablo 14: Lenfoma hastaları ve kontrol grubunun miRNA düzeyleri.

| MiRNA | | Median (Min - Max) | p | MiRNA | | Median (Min - Max) | p |
|-----------------|---------------|--------------------------|--------|----------------|---------------|---|--------|
| miR1 | lenfoma (n=5) | 32,72 (0 - 126,41) | 0,69 | miR146a | lenfoma (n=4) | 1703,47 (574,44 - 4347,59) | 0,016* |
| | kontrol (n=5) | 19,93 (17,33 - 21,79) | | | kontrol (n=5) | 30,96 (27,59 - 34,2) | |
| let7b | lenfoma (n=5) | 0,01 (0 - 0,63) | 0,008* | miR150 | lenfoma (n=4) | 29,62 (3,16 - 59,38) | 0,286 |
| | kontrol (n=5) | 16,77 (14,36 - 18,3) | | | kontrol (n=5) | 25,26 (23,71 - 26,11) | |
| miR7 | lenfoma (n=4) | 15,67 (10,72 - 19,59) | 0,016* | miR155 | lenfoma (n=4) | 52,55 (9,74 - 221,94) | 0,286 |
| | kontrol (n=5) | 24,64 (20,27 - 26,93) | | | kontrol (n=5) | 28,89 (27,3 - 31,89) | |
| miR10 | lenfoma (n=4) | 8,21 (0,57 - 19,81) | 0,032* | miR181 | lenfoma (n=4) | 1485,43 (721,07 - 3650,81) | 0,016* |
| | kontrol (n=5) | 27,07 (19,61 - 29,53) | | | kontrol (n=5) | 22,16 (15,7 - 29,93) | |
| miR21 | lenfoma (n=4) | 704,22 (41,53 - 1000,15) | 0,016* | miR192 | lenfoma (n=4) | 85,91 (12,54 - 299,83) | 0,286 |
| | kontrol (n=5) | 24,77 (17,71 - 27,65) | | | kontrol (n=5) | 20,24 (14,55 - 33,08) | |
| miR222 | lenfoma (n=4) | 178,93 (63,47 - 774,97) | 0,016* | miR200b | lenfoma (n=4) | 75,7 (3,1 - 191,87) | 0,286 |
| | kontrol (n=5) | 24,56 (14,87 - 25,33) | | | kontrol (n=5) | 33,36 (31,77 - 36,67) | |
| miR23 | lenfoma (n=4) | 1,92 (0,45 - 8,01) | 0,016* | miR200c | lenfoma (n=4) | 21,24 (5,67 - 2278,71) | 0,286 |
| | kontrol(n=5) | 15,02 (12,89 - 20,88) | | | kontrol (n=5) | 35,29 (33,94 - 36,93) | |
| miR27a | lenfoma (n=4) | 12,63 (1,28 - 67,84) | 0,286 | miR218- | lenfoma (n=4) | 12,8 (0,57 - 696,51) | 0,286 |
| | kontrol (n=5) | 21,83 (20,08 - 23,12) | | | kontrol (n=5) | 28,18 (27,09 - 33,53) | |
| miR25 | lenfoma (n=4) | 8,37 (2,48 - 9,93) | 0,016* | miR331 | lenfoma (n=4) | 43,9x10 ⁴ (0 - 53,16x10 ⁵) | 1 |
| | kontrol (n=5) | 20,24 (17,66 - 29,29) | | | kontrol (n=5) | 15,76 (11,55 - 24,98) | |
| miR30 | lenfoma (n=4) | 209,16 (55,18 - 257,07) | 0,016* | miR372 | lenfoma (n=4) | 0 (0 - 51,49x10 ⁵) | 0,286 |
| | kontrol (n=5) | 22,37 (19,25 - 26,8) | | | kontrol (n=5) | 20,4 (13,27 - 26,08) | |
| miR31 | lenfoma (n=4) | 0 (0 - 0) | 0,016* | miR375 | lenfoma (n=4) | 0 (0 - 0,04) | 0,016* |
| | kontrol (n=5) | 19,07 (13,3 - 20,32) | | | kontrol (n=5) | 18,16 (12,61 - 27,07) | |
| miR132 | lenfoma (n=4) | 17,88 (0,24 - 38,75) | 0,286 | miR422 | lenfoma (n=4) | 0,29 (0,1 - 3,05) | 0,016* |
| | kontrol (n=5) | 29,93 (28,91 - 31,09) | | | kontrol (n=5) | 18,86 (14,52 - 24,2) | |
| miR135b | lenfoma (n=4) | 19,09 (10,57 - 26,39) | 0,413 | miR451 | lenfoma (n=4) | 0,6 (0,18 - 2,35) | 0,016* |
| | kontrol (n=5) | 21,55 (18,93 - 27,5) | | | kontrol (n=5) | 7,71 (5,96 - 11,81) | |
| miR128-1 | lenfoma (n=4) | 3,7 (0,33 - 7,53) | 0,016* | miR520 | lenfoma (n=4) | 0,32 (0,06 - 42,83x10 ¹⁰) | 0,286 |
| | kontrol (n=5) | 30,4 (29,64 - 32,39) | | | kontrol (n=5) | 34,24 (31,91 - 35,66) | |
| miR145 | lenfoma (n=4) | 495,59 (341,56 - 841,02) | 0,016* | miR548 | lenfoma (n=4) | 66,29 (0,44 - 172,98) | 1 |
| | kontrol (n=5) | 29,14 (28,36 - 30,38) | | | kontrol (n=4) | 33,87 (29,97 - 34,95) | |

Tablo 15: Tedavi öncesi ve sonrası değişen miRNA analizleri.

| MiRNA | | Ort ± SD | Median (Min - Max) | MiRNA | | Ort ± SD | Median (Min - Max) |
|-----------------|---------------|---------------|-----------------------|----------------|---------------|------------------|-------------------------|
| miR1 | lösemi (n=17) | 9,11 ±14,95 | 3,48 (0,59 - 62,68) | miR150 | lösemi (n=17) | 4,25 ±4,06 | 2,89 (0,04 - 13,74) |
| | lenfoma (n=5) | 2,01 ±1,93 | 1,04 (0,04 - 4,08) | | lenfoma (n=3) | 2,98 ±1,71 | 2,06 (1,93 - 4,96) |
| let7b | lösemi (n=17) | 0,52 ±0,26 | 0,55 (0,02 - 1,01) | miR155 | lösemi (n=17) | 13,31 ±26,04 | 5,17 (0,16 - 108,38) |
| | lenfoma (n=5) | 0,63 ±0,76 | 0,23 (0,09 - 1,91) | | lenfoma (n=3) | 5,3 ±4,44 | 4,14 (1,55 - 10,2) |
| miR7 | lösemi (n=17) | 23,32 ±27,67 | 4,79 (0,78 - 72) | miR181 | lösemi (n=17) | 16,68 ±28,6 | 2,95 (0,2 - 88,03) |
| | lenfoma (n=5) | 54,62 ±71,96 | 4,32 (0,96 - 133,44) | | lenfoma (n=5) | 4,1 ±3,85 | 1,72 (0,51 - 8,28) |
| miR10 | lösemi (n=15) | 11,34 ±18,98 | 3,58 (0,38 - 72,5) | miR192 | lösemi (n=17) | 11,3 ±23,4 | 3,46 (0,08 - 96,34) |
| | lenfoma (n=5) | 0,96 ±0,7 | 0,47 (0,46 - 1,87) | | lenfoma (n=5) | 9,29 ±12,48 | 1,27 (0,22 - 27,47) |
| miR21 | Löseme (n=17) | 14,54 ±40,65 | 1,53 (0,09 - 170,07) | miR200b | lösemi (n=15) | 8,93 ±12,48 | 2,55 (0,3 - 36,25) |
| | lenfoma (n=5) | 6,78 ±7,04 | 5,62 (0,06 - 14,22) | | lenfoma (n=4) | 5,32 ±6,32 | 2,85 (0,95 - 14,62) |
| miR222 | lösemi (n=17) | 3,54 ±3,74 | 1,96 (1,01 - 14,93) | miR200c | lösemi (n=14) | 15,22 ±43,97 | 2,53 (0,14 - 167,73) |
| | lenfoma (n=5) | 1,11 ±1,64 | 0,05 (0,03 - 3,78) | | lenfoma (n=5) | 35,99 ±30,69 | 29,65 (2,07 - 77,71) |
| miR23 | lösemi (n=17) | 9,98 ±14,88 | 4,32 (0,08 - 53,82) | miR204 | lösemi (n=17) | 39,36 ±74,27 | 6,41 (0,08 - 242,19) |
| | lenfoma (n=5) | 2,38 ±2,44 | 0,93 (0,05 - 5,03) | | lenfoma (n=5) | 3,08 ±0,55 | 3,16 (2,19 - 3,71) |
| miR27a | lösemi (n=17) | 2,55 ±3,39 | 0,95 (0,07 - 11,79) | miR218 | lösemi (n=14) | 19,56 ±26,38 | 2,46 (0,11 - 62,68) |
| | lenfoma (n=5) | 2,14 ±3,44 | 0,4 (0,08 - 8,11) | | lenfoma (n=2) | 104,34 ±119,31 | 104,34 (19,97 - 188,71) |
| miR25 | lösemi (n=17) | 3,13 ±5,68 | 0,99 (0,16 - 22,16) | miR331 | lösemi (n=5) | 134,35 ±79,66 | 165,42 (3,89 - 209,38) |
| | lenfoma (n=5) | 0,73 ±0,89 | 0,16 (0,12 - 2,13) | | miR372 | lösemi (n=12) | 43,57 ±100,54 |
| miR30 | lösemi (n=17) | 7,9 ±19,47 | 2,46 (0,12 - 82,71) | miR375 | lösemi (n=17) | 1664,91 ±4653,99 | 30,06 (0,18 - 18432,96) |
| | lenfoma (n=5) | 1,29 ±1,4 | 0,38 (0,1 - 3,07) | | lenfoma (n=5) | 396,33 ±869,1 | 8,46 (0,36 - 1951) |
| miR31 | lösemi (n=17) | 8,63 ±23,39 | 1,82 (0,02 - 98,36) | miR422 | lösemi (n=17) | 18,14 ±30,74 | 6,63 (0,65 - 114,56) |
| | lenfoma (n=5) | 7,84 ±9,12 | 2,16 (1,12 - 22,32) | | lenfoma (n=5) | 5,2 ±5,3 | 4,59 (0,01 - 10,63) |
| miR132 | lösemi (n=16) | 11,61 ±29,09 | 0,38 (0,13 - 116,16) | miR451 | lösemi (n=16) | 20,25 ±37,71 | 5,07 (0,34 - 152,22) |
| | lenfoma (n=5) | 49,42 ±70,9 | 8,82 (0,76 - 164,28) | | lenfoma (n=5) | 64,29 ±114,56 | 15,45 (0,13 - 268,73) |
| miR135b | lösemi (n=17) | 16,31 ±26,18 | 2,71 (0,77 - 99,73) | miR494 | lösemi (n=16) | 11,58 ±23,74 | 2,75 (0,06 - 96,34) |
| | lenfoma (n=5) | 28,42 ±33,03 | 12,82 (12,47 - 87,43) | | lenfoma (n=5) | 2,53 ±2,41 | 3,2 (0,13 - 5,9) |
| miR128-1 | lösemi (n=17) | 20,33 ±40,06 | 2,48 (0,01 - 147,03) | miR499 | lösemi (n=11) | 39,62 ±117,72 | 1,75 (0,16 - 394,16) |
| | lenfoma (n=3) | 93,33 ±150,43 | 13,09 (0,04 - 266,87) | | miR520 | lösemi (n=11) | 45,34 ±95,79 |
| miR145 | lösemi (n=17) | 5,35 ±7,32 | 1,88 (0,13 - 26,35) | miR548 | lösemi (n=16) | 425,58 ±1546,55 | 3,69 (0,05 - 6208,38) |
| | lenfoma (n=5) | 0,79 ±0,83 | 0,3 (0,04 - 1,69) | | lenfoma (n=4) | 16,86 ±22,34 | 8,87 (0,19 - 49,52) |
| miR146a | lösemi (n=17) | 5,67 ±6,15 | 3,18 (0,08 - 19,97) | | | | |
| | lenfoma (n=5) | 1,25 ±0,6 | 1,55 (0,19 - 1,61) | | | | |

TARTIŞMA

Çalışmamızda 21 ALL, 6 AML ve 5 lenfoma tanılı hastadan tedavi öncesi ve tedavinin 1 ayı tamamlandıktan sonra alınan örneklerde çalışılan miRNA profilleri 5 sağlıklı kontrol ile karşılaştırıldı. Buna göre lösemi hastalarında miR-21, miR-30, miR-145, miR-146ai miR-181, miR-222 ekspresyonları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmış saptanırken; let-7b, miR-128-1, miR-218, miR-331, miR-422, miR-451, miR-520, miR-31, miR-372, miR-375 ekspresyonları azalmış olarak saptandı. AML hastalarında miR-155 ekspresyonu artarken, miR-10, miR-23, miR-218, miR-422, miR-451 ekspresyonları azalmış olarak saptandı. ALL hastalarında artan miRNA'lar; miR-21, miR-222, miR-30, miR-145, miR-146a, miR-155 idi. Lenfoma hastalarında ise miR-21, miR-222, miR-145, miR-146a ve miR-181'in ekspresyonunun arttığı; let-7b, miR-7, miR-10, miR-23, miR-25, miR-128-1, miR-375 ve miR-422'in ekspresyonunun azaldığı bulundu. Tedaviden sonra lösemi hastalarında miR-204, miR-375, miR-1, miR-23 ve miR-146a, miR-192 ekspresyonu artarken, let-7b ve miR-132 ekspresyonu azaldı. Lenfoma hastalarında tedaviden sonra miR-200c, miR-7, miR-132, miR-21, miR-548, miR-204 ve miR-135b ekspresyonunun arttığı, let-7b, miR-10, miR-222, miR27a, miR-25 ve miR-145 ekspresyonlarının azaldığı tespit edildi.

MiR-204, 9q21.12 lokalizasyonunda, proliferasyon, anjiogenez, anti-apoptoz etkileri olan JAK2 üzerinden etki ettiği gösterilen bir miRNA'dır. Meme kanserli hastalarda yapılan bir araştırmada, kanserli dokularda miR-204 ekspresyonunun azaldığı ve tümör süpresor etki gösterdiği saptanmıştır (76). MiR-204'ün malignitelere etki mekanizmasının araştırıldığı diğer çalışmada, renal hücreli kanser vakalarında miR-204'ün direk olarak SOX4 geni üzerinden tümör süpresor etki gösterdiği saptanmıştır (77).

Zanette ve arkadaşları (62) 2007 yılında 7 ALL ve 6 KLL hastasında malign hücreler ile normal CD19+ hücreleri karşılaştırmışlar, ALL hastalarında apoptozu indükleyen miR-204 ve miR-218; sitokin sinyal süpresörü-1'in hedefi olan ve bu yol ile STAT yolağını düzenleyen miR-331; B-hücre farklılaşmasını düzenleyen miR-181b ekspresyonunun arttığını bulmuşlardır. ALL hastalarında en fazla down regüle olan miRNA'lar miR-135b, miR-132, miR-199, miR-139 ve miR-150 olarak saptanmış ve KLL- ALL gibi hematolojik kanserlerde miRNA'ların patogenezdaki önemine dikkat çekmiştir. Doksan beş erişkin AML hastasında yapılan bir çalışmada (78) miR-204'ün hastaların remisyona girmeleri ve yaşam süreleri ile

ilişkili olduğu saptanmıştır. Diğer faktörlerden bağımsız olarak azalmış miR-204 ekspresyonunun yaşam oranında kısalma ve artmış ekspresyonunun remisyona girme oranında artış ile karakterize olduğu bulunmuştur. Araştırmamızda da hem lösemi hem de lenfoma hastalarında tedaviden sonra miR-204 ekspresyonun artmış olduğu bulundu. Bu sonuç miR-204'ün tümör süpresor etkili olduğunu doğrulamaktadır. Biz lösemi ve lenfoma hastalarımızda herhangi bir değişiklik bulamadık. Bu konuda daha fazla hastada çalışmalara ihtiyaç vardır.

MiR-331 12q22 lokalizasyonunda bulunan süpresor sitokin sinyal-1 üzerinden STAT aktivasyonunu gerçekleştirerek JAK/STAT yolağını bozarak kanser patogenezinde yer alan miRNA'dır. Zanette ve arkadaşlarının çalışmasında (62) miR-331'in ALL hastalarında arttığı ve KLL'den ayırmada kullanılabileceği belirtilmiştir. Hepatoselüler karsinomlu olgularda doku örneklerinde yapılan bir araştırmada, özellikle lenf nodu metastazı olan olgularda daha fazla olarak miR-331-3p ekspresyonunun artmış olduğu saptanmıştır. Artmış miR-331-3p'nin epitelium mezankimal geçiş üzerinden metastazı arttırdığı ve dolayısıyla kötü prognoz ve kısa yaşam oranı ile ilişkili olduğu bulunmuştur (79). Akut lösemi hücrelerinden oluşan hücre kültüründe yapılan bir araştırmada, doksurubisin direnci ile mikroRNA'ların arasındaki ilişki araştırılmış ve ilaç direnci gelişimi için önemli olan P-glikoprotein artışı ile miR-331-5p ve miR-27a arasında negatif ilişki olduğu saptanmıştır. Bu mikroRNA'ların ayrıca olgulardaki relaps ile ilişkili olabileceği de belirtilmiştir (80). Erişkin AML'li 95 hastanın kemik iliğinden alınan örneklerde yapılan bir araştırmada artmış miR-331 ekspresyonunun AML hastalarında kötü prognoz ile ilişkili olduğu ve tedavi sonrası miR-331 düzeyleri ile remisyona girme arasında ilişki olmamasına karşın kemoterapi sonrasında miR-331 düzeylerinde daha fazla düşüş olanların remiyon sürelerinin arttığı gösterilmiştir (81). Bizim çalışmamızda literatürün aksine miR-331'in lösemi hastalarında azaldığını, lenfoma hastalarında değişmediğini saptadık. Biz ayrıca miR-331 ekspresyonu ile tanı anındaki lökosit sayısı arasında doğru orantılı ilişki saptadık. Çalışmamızda da miR-331 ekspresyonundaki değişim ile lökosit sayısı arasındaki ilişki prognostik etkisini göstermektedir. MiR-331 ile lenfoma hastalarında ilişki bulamamış olmamız hasta sayısının az olmasından kaynaklanıyor olabilir. Hasta sayımız az olduğu için daha fazla sayıda hasta ile yapılmış çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

MiR-128-1, miR-128a'nın eş anlamlısı olarak kullanılmakta ve 2q21.3 lokalizasyonunda bulunmaktadır. CpG hipometilasyonu ile ilişkili olan miR-128'nin lösemi patogenezinde rol oynadığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Elli dört AML ve

18 ALL hastasında Mi ve arkadaşlarının (80) yaptığı çalışmada, ALL hastalarında miR-128a, miR-128b, miR-151, j-miR-5, miR-130b ve miR-210'un daha fazla eksprese olduğu, let-7b, miR-223, let-7e, miR-125a, miR-130a, miR-221, miR-222, miR-23a, miR-23b, miR-24, miR-27a, miR-27b, let-7a, let-7c, miR-199b, miR-26a, miR-335 ve miR-21'in AML hastalarında daha fazla eksprese olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada myeloid gen olan miR-223; miR-128a ve miR-128b; let-7b ekspresyonlarındaki farklılığın %97 doğruluk oranı ile ALL-AML ayırıcı tanısında kullanılabileceği belirtilmiştir.

Pediyatrik akut lösemi hastalarında SSS relapsı, prednizon yanıtı ve prognoz ile miRNA ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada (65), AML hastalarında miR-100, miR-125b, miR-335, miR-146a ve miR-99a ekspresyonunun arttığı, ALL hastalarında da miR-128b, miR-213, miR-210, miR-130b, miR-146a, miR-34a ekspresyonunun arttığı saptanmıştır. SSS relapsı olan 4 hastada 3 kattan fazla artan miRNA'ların miR-7, miR-198 ve miR-633 olduğunu, azalan miRNA'ların miR-126, miR-345 miR-551a olduğunu bulmuşlardır. Kötü prognoz ve relaps olan hastalarda miR-7, miR-216, miR-100'ün önemli derecede arttığı, miR-486, miR-191, miR-150, miR-487 ve miR-342'nin azaldığı tespit edilmiştir. Bu miRNA'lar içinde bizim lösemi hastalarında sadece miR-222'nin artışı söz konusu idi. Hastalarımızın hiçbirinde SSS relapsı görülmedi.

Çocukluk çağı ALL hastalarında sitogenetiğin miRNA ile ilişkisini araştıran bir çalışmada (82) 20 MLL rearrangement olan infant lösemi, hiperdiploidi, TEL-AML1, BCR-ABL, E2APBX translokasyonlar olan 38 non-infant lösemi, ve 19 sitogenetik olarak normal bulunan pre B-cell ALL hastaları olarak 3 grupta incelenmiştir. MLL-rearrangement olan hastalarda artan miRNA'lar miR-128a, miR-142, miR-150, miR-181, miR-30e, miR193, miR-34b, miR-365, miR-582, miR-708 olarak saptanmıştır. miR-708'in ikinci grupta en fazla arttığı, miR-196b'nin en fazla MLL-rearrangement olan infant hastalarında arttığı saptanmıştır. Biz genetik sonuçlarla miRNA arasında ilişki tespit etmedik.

Toplam 128 pediyatrik ALL hastasında yapılan bir çalışmada miR-100, miR-196b ve let-7e'nin azaldığı, miR-181 ve miR-128'in arttığı saptanmıştır. T-cell ALL hastalarında miR-196b'nin, B-cell ALL hastalarında ise t(12:21) ve hiperdiploid olmayan hastalarda miR-100'ün arttığı saptanmıştır (83). Bizim hastalarımızın tamamına yakını (19/21) B-cell ALL idi. Fakat biz miR-100 ve miR-196'yı çalışmadık. Aynı çalışmada indüksiyon tedavisinin 28. gününde kötü yanıtı

olanlarda miR-125a-5p ve let-7e'nin ekspresyonlarının az olduğu tespit edilmiş ve let-7e'nin 15. gün minimal rezidüel hastalığı olanlarda ekspresyonunun fazla olduğu gösterilmiştir. Ancak miRNA'lardan hiçbirinde 5 yıllık sağ kalım ile ilişki bulunamamıştır (83).

Ülkemizde Duyu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (84), 43 ALL (34 B-cell, 9 T-cell) ve 15 kontrol grubunun tedavi öncesi ve tedavinin 6. ayında miRNA analizleri yapılmış ve miR-128, miR-146a, miR-155, miR-181a ve miR-195'in ALL hastalarında arttığı ve tedaviden 6 ay sonra miR-146a, miR-155, miR-181a ve miR-195'in belirgin olarak azaldığı gösterilmiştir. MiR-548, miR-3140 ve miR-181b'nin T cell ALL'de, miR-708, miR-181b ve miR-369-3p'nin B cell ALL'de daha fazla eksprese olduğu saptanmıştır. Bizim hem lösemi hem de lenfoma hastalarında tedavi öncesinde miR-128 azalmış, miR-146a ve miR-181 artmış bulundu. B-cell lösemi hastalarında ise miR-181 artmış bulundu. Tedavi sonrasında ise miR-375, miR-1, miR-23, miR-146a, miR-192, miR-204 ve miR-548 artarken, let-7b ve miR-132 azalmış olarak saptandı. MiR-181 ve miR-146a'nın azalmamasının nedeni olarak tedaviden kısa süre miRNA analizi yapmamız olabilir.

MiR-181 hem B hem de sitotoksik T hücre farklılaşmasında önemlidir (85). Ülkemizden Duyu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (84), miR-181a'nın ALL hastalarında arttığı ve tedaviden 6 ay sonra belirgin olarak azaldığı gösterilmiştir. Otuz dört pediatrik ALL hastası ile 5 sağlıklı kontrolün karşılaştırıldığı bir başka çalışmada (86) ALL hastalarında miR-708, miR-210, miR-181b, miR-345, miR-125p, miR-324'ün arttığı, miR-23a, miR-27a ve miR-23b'nin azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca miR-708 ve miR-181b'nin yüksek risk grubunda standart ve orta risk grubuna göre daha fazla eksprese olduğu saptanmıştır. Bizim çalışmamızda da miR-181'in ekspresyonunun lösemi hastalarında arttığı gösterilmiştir. Bizim hastalarımızın sadece 3'ü yüksek risk grubundaydı. Bunlarda da miR-181 yüksekti ancak hasta sayısı az olduğu için istatistiksel değerlendirme yapılamadı.

Let-7b 22q13.21 lokalizasyonunda bulunan tümör süpresor etki gösterdiği düşünülen bir miRNA'dır. Renal karsinomlarda yapılan bir çalışmada, miR-let-7b ve 7c'nin karsinomlu dokularda ekspresyonunun belirgin olarak azaldığı gösterilmiş ve miR-let-7b'deki azalmanın patolojik evreleme ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Aynı çalışmada dokulara 5-FU ile birlikte miR-let-7b ve 7c verildiğinde dokuların kemoterapiye duyarlılığının arttığı ve miR-let-7b ve 7c'deki azalmanın renal hücreli karsinomda kemorezistans ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (87). Benzer şekilde

hepatoselüler karsinomlu hastalarda yapılan çalışmada let-7b'nin Bcl-xl ekspresyonu üzerinden 5-FU sensitivitesini arttırdığı gösterilmiştir (88). Gastrik kanserli olgularda yapılan bir araştırmada miR-let-7b ekspresyonu az olan dokuların metastaz potansiyellerinin daha fazla olduğu ve dokulara in vivo olarak miR-let-7b verildiğinde tümör metastaz ile ilişkili gen olan ING1 ekspresyonu üzerinden tümör migrasyon ve metastazını azalttığı gösterilmiştir (89). Lenfomalı köpeklerde yapılan bir araştırmada 61 lenfomalı ve 40 sağlıklı köpeğin serum örnekleri incelenmiş, let-7b; miR-223, miR-25, miR-92a ve miR-423a'nın lenfoma grubunda ekspresyonunun azaldığı saptanmıştır (90). Miu ve arkadaşlarının (81) yaptığı çalışmada let-7b'nin AML hastalarında ALL hastalarına kıyasla daha fazla eksprese olduğu ve ALL-AML ayırımında kullanılabileceği belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda let-7b'nin hem lösemi hem de lenfoma hastalarında belirgin azalmış olduğu bulundu. Tedaviden sonra ise let-7b'nin ekspresyonunda belirgin değişiklik görülmedi. Bu tedavi süresinin kısa olmasına bağlı olabilir.

MiR-7, 15q26.1 lokalizasyonunda bulunmaktadır. Epidermal büyüme faktörü reseptörü ve fokal adezyon kinaz ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilen miR-7'in servikal kanserli dokuda ekspresyonunun azaldığı, metastatik olgularda ekspresyonunun az olduğu gösterilmiştir (91). Servikal ve meme kanserinde tümör süpresor etki gösteren miR-7, küçük hücreli akciğer kanserinde kemorezistansta etkilidir ve over kanserinde ileri evre hastalarda ekspresyonunun düşük evredekilere kıyasla daha fazla olduğu saptanmıştır (92, 93). Çinde yapılan bir çalışmada 49 çocuk ALL hastaları ile kontrol grubu olarak 12 immün trombositik purpura hastasının miRNA profilleri karşılaştırıldığında yüksek risk grubunda miR-7, miR-216 ve let-7i ekspresyonlarının arttığı, miR486, miR191, miR150, miR487 ve miR341'nin ekspresyonlarının azaldığı görülmüştür (66). Takiplerinde SSS relapsı olan dört ALL hastasının dahil olduğu bir çalışmada miR-7, miR-551a, miR-633'ün ekspresyonu artarken, miR-126, miR-345, miR-222 ve miR-551a'nın ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, retrospektif olarak prednizolon yanıtına göre grupladıkları hastalarda miR-18a, miR-532, miR-218, miR-625, miR-193a, miR-638, miR-550 ve miR-633'ün steroid yanıtını ön görmede kullanılabileceği belirtilmiştir (65). Çalışmamızda miR-7 düzeyi lenfoma hastalarında düşük, lösemilerde normal bulundu. Bunun yanı sıra tedaviden sonra her iki grupta da ekspresyonun artması hematolojik malignitelere tümör süpresor etki gösterdiğini düşündürmektedir.

Foliküler lenfoma ve foliküler hiperplazi ayırımında miRNA'ların etkisini araştıran bir çalışmada, 44 miRNA incelenmiştir. Let-7a ve miR-9'un tümör süpresor etki gösteren bu gende down regülasyona neden oldukları bulunmuştur. Foliküler lenfoma hastalarında hiperplazi hastalarında farklı miRNA ekspresyonları olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada let-7a, let-7f, miR-7-1, miR-9, miR-20a, miR-20b, miR-30b, miR-96, miR-98, miR-194, miR-195, miR-221, miR-374a, miR-374b, miR-451, miR-454, miR-502-3p, miR-523-3p, miR-664, miR-1274b, miR-1274a ve miR-1260 ekspresyonunun lenfoma hastalarının çoğunda ve foliküler hiperplazi hastalarının bir kısmında arttığı bulunmuş ve kemoterapi yanıtının bu grupta daha iyi olduğu belirtilmiştir (94). Çalışmamızda lenfoma hastalarında kontrol grubuna göre miR-7 ve miR-25 ekspresyonunun azaldığı görüldü. Bizim lenfoma hastalarımızda mir-21, miR-222, miR-145, miR-146a ve miR-181 ekspresyonunu artmış, let-7b, miR-7, miR-10, miR-23, miR-25 miR-128-1 miR-375 ve miR-422 ekspresyonu azalmış bulundu. Fakat hasta sayısı çok az idi.

Nukleofosmin mutasyonu ve bunun sonucunda tümör süpresor p53/ARF yolağını inaktivasyon ile ilişkilendirilen miR-10 özellikle AML patogenezinde önemli olup 17q21.32 lokalizasyonuna yerleşmiştir. Zhi ve arkadaşlarının (95) 108 yeni tanı AML, 39 remisyonda AML ve 21 relaps AML vakasını aldığı çalışmalarında miR-10a-5p ekspresyonu ile AML prognozu arasındaki ilişki araştırılmış, kontrol grubuna göre miR-10a-5p'nin arttığı gözlenirken AML-M3 grubu ile sağlıklı kontroller arasında ekspresyon farklılığı gözlenmemiştir. MiR-10a-5p'nin tanısal değeri araştırıldığında %79,6 sensitivite ve %80 spesifite ile potansiyel biyomarker olduğu saptanmıştır. Remisyondaki hastalar ile relaps olgular kıyaslandığında miR-10a-5p ekspresyonunun relaps olgularında artmış olduğu ve AML progresyonu ile ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır. MiR-10a-5p ile sağ kalım karşılaştırıldığında yüksek ekspresyonu olanların sağ kalımının daha az olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda miR-10 ekspresyonu AML hastalarında ALL ve kontrole göre belirgin azalmıştı. Çalışmamızda miR-10 ekspresyonunun AML hastalarında azalmış olmasının hasta sayımızın yetersizliğinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda hem lenfoma hem de lösemi hastalarında arttığı saptanan miR-21, 17q23.1 lokalizasyonunda birçok kanser türünde etkili olduğu gösterilmiş bir mikroRNA'dır. Lökomogeneizde rolü bulunan ve tümör süpresor etki gösteren PTEN geni ekspresyonunu azaltarak etki göstermektedir (96). Glioblastom, akciğer kanseri, prostat, meme, pankreas, kolon, baş boyun kanserleri, mide, özofagus ve karaciğer kanserlerinde ekspresyonunun arttığı gösterildiği gibi KLL, lenfoma ve

multiple myeloma gibi hematolojik kanserlerde de arttığı gösterilmiştir (96, 97). MiR-21 hemen tüm kanserlerde artan onkogen olarak işlev görmektedir (98). Akut myelositer lösemi ile miR-21 arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada, miR-21 ekspresyonunun AML'de özellikle nukleofosmin mutasyonu olan AML hastalarında arttığı saptanmıştır (99). BCL-ABL pozitif KML hastalarında yapılan bir araştırmada; miR-21 artışı ile imatinib direnci arasında ilişki olabileceğini sonucuna varılmıştır (100). MiR-21 ile lenfoma arasındaki ilişki de birçok çalışmada incelenmiş ve miR-21 upregulasyonu ve lenfoma arasında pozitif ilişki bulunmuştur (101). NK hücreli lenfoma/lösemide miR-21 ve miR-155'in ekspresyonlarının arttığı ve miR-21'in NK hücresi lenfomagenezi indükleyerek onkomir olarak etki gösterdiği saptanmıştır (102). Klasik HL olgularında miR-21 ve miR-30D ekspresyonlarının inhibe edilmesinin doxorubicin ile indüklenen apoptoz duyarlılığını arttırdığı saptanmıştır (103). Diffüz büyük B hücreli lenfomalarda miR-21 ile ilgili farklı sonuçlar mevcuttur. Bai ve arkadaşlarının (104) yaptığı çalışmada miR-21'in down regüle olmasının kemoterapi duyarlılığını arttırdığı gösterilmişken, Krichevsky ve arkadaşlarının (105) yaptığı çalışmada yüksek tümöral miR-21 düzeyinin daha iyi prognostik sonuçlar doğurduğu gösterilmiştir. Viruslerle ilişkili lenfomalarda mikroRNA'ların araştırıldığı çalışmalar göstermiştir ki Epstein-Barr virus tarafından kodlanan Epstein-Barr nükleer antijen 2 ile transfekte olmuş B hücreli lenfoma hücrelerinde miR-21 ile bu viral antijen arasında pozitif ilişki olduğu saptanmıştır. Bu ilişki Burkitt lenfoma hücrelerinde gösterilememiş olmasına karşın Epstein-Barr nükleer antijen 2 antijeninin mikroRNA üzerinden etki göstererek B hücresine girdiği düşünülmektedir (106). Çalışmamızda da literatüre uygun olarak miR-21 ekspresyonunun lenfoma hastalarında arttığı gösterilmiş, tedaviden sonra ekspresyonunun arttığı saptanmıştır. Tedaviden sonra azalması beklenirken artmış olması tedavi süresinin kısalığından kaynaklanabilir. Çalışmamızdaki diğer bir sonuç da kemik iliği blast oranı ile miR-21 ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunmasıydı.

2q.35 lokalizasyonunda bulunan miR-375 farklı kanserlerde tümör süpresor ve onkojenik etkisi gösterilmiş bir miRNA'dır. Bu etkisini hücre proliferasyonu migrasyonu ve invazyonunu azaltarak gösterdiği ve G1 evresinde hücre döngüsünü durdurarak apoptozu indüklediği gösterilmiştir (107). Wang ve arkadaşları (107) 106 pediatrik AML hastasında miR-375 ekspresyonunun kontrol grubuna göre arttığını saptamıştır. Özellikle AML-M7 alt grubunda miR-375 ekspresyonunun arttığı ve artmış ekspresyonun kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Farklı kanser türlerinde miR-375'in prognostik etkilerinin değerlendirildiği bir metaanalizde özofagus kanseri ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde miR-375'in down

regülasyonunun kötü prognozla ilişkili olduğu, metastatik meme kanseri olgularında ise artmış miR-375 ekspresyonunun kötü prognoza işaret ettiği belirtilmiştir (108). Solid tümörlerde miR-375'in prognoz ile ilişkisinin değerlendirildiği bir derlemede, 16 çalışma incelenmiş, artmış miR-375 ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olduğu belirtilmiştir. Alt grup incelemelerinde özellikle özofagus kanserinin sağ kalım ile miR-375 arasında ters orantı olduğu gösterilmiştir (109). Bizim çalışmamızda Wang ve arkadaşlarının aksine AML, ALL ve lenfoma hastalarında azalmış miR-375 ekspresyonu saptandı. Tedavi sonrasında ise miR-375 ekspresyonu arttı. Bu durum miR-375'in tümör süpresör etkide olduğunu düşündürmesine karşın daha fazla sayıda hasta ile çalışmalar yapılması gerektiği kanaatindeyiz.

Araştırmamızda hem lösemi hem de lenfoma hastalarında ekspresyonu artan miR-145 kromozom 5q32'de lokalizedir. AML'ye ilerleyen miyelodisplastik sendromların %10-20'sini oluşturan 5q sendromu ile aynı lokalizasyonda bulunan miR-145 arasında ilişki olduğu düşünülmektedir. Bu bölgedeki delesyonların hastalarda miR-145 ve miR-146 kaybına da yol açtığı ve bu miRNA'ların hedefleri olan Toll-inteleukin-1 reseptör kısmı içeren adaptör protein ve tümör nekroz faktör reseptör ile ilişkili faktör 6'nın kaybı ile sonuçlandığı saptanmıştır. Bu durumun trombositoz, hafif nötropeni ve megakaryositik displazi ile ilişkili olduğu bulunmuştur (110). Hematolojik maligniteler dışında akciğer kanseri, kolorektal kanser, meme kanseri, prostat kanseri gibi malignitelerle de ilişkili olduğu gösterilmiş olan miR-145 tümör süpresör etki göstermektedir (111- 113). Sigara dumanına maruz bırakılan ratlarda miR-145'in down regüle olduğu gösterilerek tümör süpresör etkisi deneysel olarak gösterilmiştir (114). İn vitro ve in vivo yapılan çalışmalarda c-MYC'i etkilediği saptanmıştır. Erişkin T hücreli lösemi/lenfoma tanısı almış 40 hastanın tedavi öncesi alınan biyopsi örneklerinde miR-130b, miR-145, miR-150 ve miR-223 ekspresyonları incelenmiş, miR-130b'nin artmış, miR-150, miR-223 ve miR-145'in azalmış olduğu saptanmıştır. Ancak sadece miR145'in azalması ile hastalığın prognozu arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (115). Birçok kanser patogenezinde etkili olduğu bilinen ve ekspresyonu p53 geni tarafından düzenlenen c-MYC protoonko geni ile miRNA ekspresyonu arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalarda p53'un miR-145 transkripsiyonunu indüklediği gösterilmiştir. MiR-145 ayrıca c-MYC ile doğrudan ilişkilidir. MiR-145 c-MYC ekspresyonunu azaltmasına karşın hücrelere anti-miR-145 transfekte edildiğinde ise c-MYC ekspresyonu artmaktadır. Bu sonuçlar göstermiştir ki miR-145 p53 ve c-MYC arasındaki ilişkiyi sağlayarak hücre döngüsünü düzenlemektedir (116). Kırk sekiz erişkin AML hastasında yapılan bir çalışmada, AML hastalarında miRNA ve mRNA ekspresyon profilleri araştırılmış ve

miR-23a, miR-145, miR-196a, miR128a ve miR-26a ekspresyonlarının pro-apoptotik genlerle pozitif ilişkili olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak AML olgularında miR-145, miR-26a ve miR-128a'nın apoptoz ile ilişkili olduğu in vitro olarak gösterilmiştir (117). Çalışmamızda literatürün aksine miR-145'in ekspresyonunun artmasının nedeni hasta sayısının az olması ve lösemi hastalarının alt gruplarındaki sayıların yetersiz kalmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Tedaviden sonra miR-145 ekspresyonunun lenfomada azalması, lenfomada onkojenik etki gösterdiğini düşündürse de bu konuda daha fazla hasta sayısı ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğu kanısındayız.

Onkojenik etkisi olduğu düşünülen miR-146a 5q33.3 lokalizasyondadır. Akut promyelositik lösemi hücre kültüründe ATRA tedavisi ile miRNA değişimlerinin incelendiği bir çalışmada tedavi ile miR-146a'nın azaldığı, Smad4'ün ise arttığı gösterilmiştir (118). Başka bir çalışmada miR-146a'nın etkisi 32 AML-M3 ve 10 demir eksikliği anemisi hastası incelenmiş ve AML-M3 hastalarında miR-146a'nın kontrol grubuna göre arttığı ve miR-146a ekspresyonu ile lökosit sayısının pozitif ilişkili olduğu saptanmıştır. MiR-146a'nın yaş ve blast yüzdesi ile ilişkisi bulunmazken Smad4 proteini ve T-helper/T-süpresör oranı ile negatif ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlarla miR-146a'nın lökomogenezde onkojenik etki gösterdiği düşünülmüştür (119). İran'da çocukluk çağı ALL'si ile miR-146a ve miR-499 miRNA'ların polimorfizmi arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada 75 ALL hastası ve kontrol grubu olarak 115 sağlıklı çocuk incelenmiş ve miR-146a'nın rs291064 G>C varyantının ALL riskini arttırdığı bulunmuştur (120). Spinello ve arkadaşlarının 38 AML (M1:7, M2:6, M3:11, M4:7) hastasında miR-146a'nın etki mekanizmasını hücre kültürlerinde inceledikleri çalışmalarında CXCR4 protein ekspresyonunun M4/M5 grubunda daha fazla olduğu ve miR-146a ile CXCR4 ekspresyonunun ters orantılı olduğu gösterilmiştir (121). Bizim çalışmamızda da hem lösemi hem de lenfoma hastalarında literatüre uygun olarak miR-146a'nın ekspresyonunun arttığı bulundu ancak lökosit sayısı ve blast yüzdesi ile bir ilişki saptanmadı.

Mir-155 21q21.3'de lokalize olan hematolojik malignitelerle ilişkisi gösterilmiş bir miRNA'dır. İlk kez 2005 yılında Eis ve arkadaşları tarafından B-cell lenfoma hücrelerinde primer miRNA olan BIC geni ve miR-155'in ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (122). Daha sonra HL, primer mediastinal ve diffüz büyük B hücreli lenfomalarda da BIC ve miR-155 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (123), Kluver ve arkadaşları (124) Burkitt lenfoma hastalarında miR-155 ve BIC ekspresyonunun

olmadığını bildirmişlerdir. Metzler ve arkadaşlarının (69) 21 Burkitt lenfoma, 11 pre B cell ALL, 4 T-cell ALL tanılı çocukta yaptıkları araştırmalarında Burkitt lenfoma hastalarında miR-155'in 100 kata kadar arttığı ancak bu artışın lösemik hücrelerde görülmediği saptanmıştır. Bu çalışmanın aksine normal karyotipli FLT3 internal tandem duplikasyonu olan 50 AML hastasında ve 50 diğer sitogenetik anomalisi olan AML hastasında yapılan çalışmada miR-155'in arttığı ve kötü prognozla ilişkilendirildiği gösterilmiştir (125). Çalışmamızda miR-155 ekspresyonu lösemi ve lenfoma hastalarında artmamıştı. Ancak AML hastalarında artmış miR-155 ekspresyonu saptandı. Lenfoma hastalarında ekspresyon farkı saptamamızın nedeni olarak hastalardan periferik kan örneğinden miRNA analizi yapılmış olduğunu düşünmekteyiz.

MiR-200 ailesi de kanser patogeneğinde önemli olduğu düşünölen ve birçok araştırmaya konu olmuş mikroRNA'lardandır. Özellikle miR-200c'nin meme kanserli olgularda KRAS yolağı üzerinden anti onkojenik etki gösterdiği, miR-200 ailesinin azalmasının meme kanserli olgularda lenf nodu metastazını arttırdığı saptanmıştır (126, 127). Benzer şekilde renal hücreli karsinom hayvan modellerinde in vitro olarak miR-200c'nin kanser hücrelerinde hücre büyümesini inhibe ettiği ve hücre döngüsünü G0/G1 evresinde duraklattığı gösterilmiştir (128). MiR-200c'nin farklı kanserlerdeki tümör süpresor etkilerinin gösterilmesine karşı Shao ve arkadaşlarının (129) yaptıkları sistematik derlemede miR-200c'nin düşük ekspresyonlarının erken evredeki kanser hastalarında kötü prognozla ilişkili olduğu ancak, ileri evredeki kanser hastalarında yüksek miR-200c ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda lösemi ve lenfoma hastalarında miR-200b ve miR-200c ekspresyonunda fark saptanmadı.

Kromozom 4p'de yerleşen miR-218'in miR-204 ile birlikte HeLa hücrelerinde apoptozu indüklediği ve birçok farklı kanser türünde ekspresyonunun azaldığı saptanmıştır (130). Bunun yanı sıra meme kanseri hastalarında miR-218 düzeyinde etoposid sensitif olgularda dirençli olgulara göre yaklaşık 8 kat azalma olduğu gösterilmiştir (131). Servikal kanser hastalarında hastalığın klinik evresi ile miR-218 arasında negatif ilişki olduğu tespit edilmiş ve HPV pozitif kanser dokularında da miR-218 ekspresyonunun azaldığı saptanmıştır (132). Literatürle uyumlu olarak lösemi hastalarında miR-218'in ekspresyonundaki azalma tümör süpresor etkide olduğunu doğrulamaktadır. Lenfoma hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı fark

bulunamadı. Hematolojik malignitelerde miR-218'in rolü ile ilgili daha fazla sayıda hasta ile yapılmış çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

MiR-372'nin renal hücreli karsinomda down regüle olan ve etkisini IGF -2 binding protein 1 üzerinden gösteren tümör süpresor miRNA'dır (133). Renal hücreli karsinomun aksine kolorektal kanserde miR-372 ileri evre tümör, artmış tümör boyutu ile ilişkilendirilmiş ve biyomarker olabileceği belirtilmiştir (134). Benzer şekilde oral skuamoz hücreli kanserde de miR-372 ve miR-373'ün artmış ekspresyonlarının metastaz, lenfovasküler invazyon ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu bulunmuştur (135). Çalışmamızda tedaviden sonra miR-371 ekspresyonunun arttığı saptandı. Bu sonuç literatürde daha önce bildirilmemiştir. Bu konu ile ilgili daha geniş çalışmalar yapılmalıdır.

MiR-451 kromozom 17c11.2 bölgesine yerleşmiştir. KML hastalarında miR-451'in etki mekanizmasını araştırmada, hastalarda Philadelphia kromozom pozitifliği ve miR-451 ekspresyonu arasında ilişki olup olmadığı araştırılmış ancak doğrudan ilişkili olmadığı, farklı etkilerle miR-451 ekspresyonunun KML patogenezinde yer aldığı belirtilmiştir (136). T cell ALL patogenezinde önemli olduğu bilinen NOTCH1 sinyal yolağı üzerinde miRNA'ların etkileri karşılaştırıldığında NOTCH1 nedeniyle gelişen T-cell ALL modellerinde miR-451'in tümör süpresor etki gösterdiği saptanmıştır. MiR-451'in ayrıca MYC mRNA üzerinden etki ettiği, fare T-cell ALL modellerine miR-451 eklendiğinde myc ekspresyonunun yaklaşık 10 kat azaldığı gösterilmiştir (137). Ju ve arkadaşlarının (63) 1 yaştan büyük 40 pre-B cell ALL tanılı hastaları dahil ettikleri çalışmalarında miRNA analizlerini 6 normal kemik iliği ile kıyaslamış, normal hücrelere göre pre-B cell ALL hastalarında miR-451'un azaldığı ve miR-339'un arttığı tespit edilmiştir. Çalışılan diğer miRNA'lardan miR-142 ve miR-222'nin arttığı, miR-373'ün azaldığı saptanmıştır. Bizim çalışmamızda da miR-451 ekspresyonu hem lenfoma hem de lösemi hastalarında azalmış olarak saptandı. MiR-451'in her iki grupta da tedaviden sonra artması hematolojik kanserlerde tümör süpresor etkide olduğunu düşündürdü.

Araştırmamızda sadece lösemi hastalarında anlamlı düzeyde artış saptadığımız miR-520e, miR-520 ailesine dahil tümör süpresor etki gösteren miRNA'dır. MiR-520 ailesi ile yapılan çalışmalarda meme kanserinde TGF-B ve NK-KB sinyal yolağı üzerinden anti-onkojen olarak etki gösterdiği, benzer şekilde gliom hücrelerinde de kanser süpresör etkilerinin görüldüğü saptanmıştır (138,

139). MiR-520 ailesinin anti kanser etkide olduğunun gösterildiği başka bir çalışmada ise kolorektal kanserlerde miR-520d-5p'nin metastazı engellediği saptanmıştır (140). Çalışmamızda da lenfoma hastalarında miR-520 ekspresyonunda farklılık saptanmazken, lösemi hastalarında artmış ekspresyon olduğu bulundu. Lösemi hastalarında artmış miR-520 ekspresyonu ilk defa çalışmamızda gösterilmiştir.

Literatürde miR-548 ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. Meme kanserli olguların dokularında yapılan bir çalışmada miR-548-3p'nin ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. MiR-548-3p'nin meme kanseri hücrelerinde proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği ancak kanserli hücrelerde ECSH1'in ekspresyonunun belirgin olarak artmış olduğu saptanmıştır. Bu nedenle miR548-3p'nin etkisini ECHS1 üzerinden gerçekleştirdiği belirtilmiştir (141). Bizim çalışmamızda miR-548 ekspresyonunun lösemi ve lenfoma hastalarında farklılık göstermemesine karşın tedaviden sonra her iki grupta da artması yeni bir bulgudur.

MiR-222, miR-221 ile birlikte Xp11.3'e lokalize olmuş in vitro çalışmalarda protoonkogen olan ETS1'i etkileyerek lösemik hücrelerde proliferasyonu inhibe ettiği ve hücre döngüsünü ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (142). Heidari ve arkadaşları (143) miR-221/miR-222 kümesinin beyin gelişiminde etkili olduğu, kortekste ekspresyonu azken, serebellumda artmış olduğunu göstermiştir. MiR-222'nin miR-221 ile p27 protein ekspresyonunu azaltarak proliferasyonu ile akut lösemide SSS relapsında etkili olduğu belirtilmiştir. Rommer ve arkadaşları (144) pri-miR-221 ve 222 ekspresyonunun AML hastalarında arttığını göstermiş ve pri-miR221/miR222 oranının myeloid hücre kültürlerinde azaldığını, dolayısıyla lökomogenezde etkili olduğunu saptamışlardır. Wang ve arkadaşlarının çalışmasında da miR-222'nin AML hastalarında ALL'ye kıyasla daha fazla eksprese olduğu saptanmıştır (76). Araştırmamız da miR-222 ekspresyonu hem lösemi hem de lenfoma hastalarında artmış olarak saptandı. Tedaviden sonra lenfoma hastalarında miR-222 ekspresyonunun azaldığı saptandı. Bu durum miR-222'nin onkojenik etkisini doğrulamaktadır.

Sonuç olarak miRNA'lar hematolojik malignitelerin patogeneğinde, tedavi yanıtında, relaps ve prognozunda rol oynamaktadırlar. Bu konuda yapılacak çalışmalarla kesin bilgiler elde edilecektir.

SONUÇLAR

- Akut lösemi hastalarında sağlıklı kontrollere göre miR-21, miR-222, miR-30, miR-145, miR-146a, miR-181'in ekspresyonları artmış bulundu.
- Akut lösemi hastalarında sağlıklı kontrollere göre let-7b, mir-31, miR-128-1, miR-218, miR-331, miR-372, miR-375, miR-422, miR-451 ve miR-520 ekspresyonları azalmış bulundu.
- ALL hastalarında miR-375 ekspresyonunun azaldığı, miR-21, miR-222, miR-30, miR-145, miR-146a ve miR-155 ekspresyonunun arttığı saptandı.
- AML hastalarında miR-155'in ekspresyonu artarken, miR-10, miR-23, miR-218, miR-422, miR-451'in ekspresyonunun azaldığı görüldü.
- Lenfoma hastalarında kontrol grubuna göre miR-222, miR-30, miR-145, miR-146a, miR-181'in ekspresyonları artmış bulundu.
- Lenfoma hastalarında kontrol grubuna göre let-7b, miR-7, miR-10, miR-23, miR-25, miR-128-1, miR-422 ve miR-451'in ekspresyonları azalmış bulundu.
- Lösemi hastalarında tedavi sonrası miR-204, miR-7, miR-10, miR-30, miR-155, miR-192, miR-422, miR-451, miR-520, miR-548, miR-375, miR-1, miR-23 ve miR-146a'nın ekspresyonlarının arttığı saptandı.
- Lösemi hastalarında tedavi sonrası let-7b ve miR-132'nin ekspresyonlarının azaldığı saptandı.
- Lenfoma hastalarında tedavi sonrası miR-200c miR-7, miR-132, miR-21, miR-520, miR-155, miR-375, miR-422, miR-451, miR-200c, miR-204 ve miR-135b'nin ekspresyonlarının arttığı saptandı.
- Lenfoma hastalarında tedavi sonrası let-7b, miR-10 mir-30, miR-222, miR-27a, miR-25 ve miR-145 ekspresyonlarının azaldığı saptandı.
- Lösemi hastalarının tedavi öncesi lökosit sayıları ile tedaviden sonra değişen miRNA'lardan miR-128-1 ve miR-331 ile lökosit sayısı arasında pozitif yönde orta derecede ilişki bulundu.
- Lösemi hastalarının tanı anındaki kemik iliğindeki blast oranı ile miR-21 ve miR-27a'nın tedaviden sonra değişimi arasında istatistiksel olarak pozitif yönde ilişki tespit edildi.

- Tanı anında bakılan periferik yaymadaki blast oranı ile tedaviden sonra miR-200c ekspresyonundaki değişim arasında negatif yönde istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulundu.

KAYNAKLAR

1. http://www.who.int/cancer/media/news/Childhood_cancer_day/en/ Erişim tarihi: 27.02.2015.
2. IARC World Cancer Report 2014 Lyon France <http://www.iarc.fr/en/publications/books/wcr/index.php>.
3. Büyükpamukçu M, Atahan L, Caglar M, Kutluk T, Akyüz C, Hazar V. Hodgkin's disease in Turkish children: clinical characteristics and treatment results of 210 patients. *Pediatr Hematol Oncol* 1999; 16(2): 119-29.
4. Kaatsch P. Epidemiology of childhood cancer. *Cancer Treat Rev* 2010; 36 (4); 277-85.
5. Burke PW, Douer D. Acute lymphoblastic leukemia in adolescents and young adults. *Acta Haematol* 2014; 132 (3-4): 264-73.
6. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell* 2004;116(2): 281-97.
7. Kusenda B, Mraz M, Mayer J, Pospisilova S. MicroRNA biogenesis, functionally and cancer relevance. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacy, Olomouc, Czechoslovakia* 2006;150(2): 205-15.
8. <http://www.cancer.gov/types/leukemia>. "Leukemia". *NCI*. Retrieved 13 June 2014 Erişim tarihi: 04.05.2015.
9. Kutluk T. Çocukluk Çağı Kanserlerinin Epidemiyolojisi ve Türkiye'deki Durum. *Türkiye Klinikler J Pediatr Sci* 2009; 5(4): 1-8.
10. P. Lanzkowsky, Leukemias. In: Lanzkowsky P. *Manual of Pediatric Hematology and Oncology*. 5th Ed. Elsevier Academic Press, USA, 2011: 518-66.
11. Lewis B Silverman. Acute Lymphoblastic Leukemia. In *Oncology of Infancy and Childhood*. Elsevier Academic Press, USA, 2009: 295-330.
12. Kinlen L. Infections and immune factors in cancer: the role of epidemiology. *Oncogene* 2004; 23: 6341-8.
13. Greaves MF. Speculations on the cause of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1988;2:120–5.
14. Murray L, McCarron P, Bailie K, Middleton R, Davey Smith G, Dempsey S. et al. Association of early life factors and acute lymphoblastic leukaemia in childhood: historical cohort study. *British Journal of Cancer* 2002;86(3):356-361.
15. Ross ME, Mahfouz R, Onciu M, Liu HC, Zhou X, Song G, et al. Gene expression profiling of pediatric acute myelogenous leukemia. *Blood* 2004;104:3679–87.
16. Barnard DR, Woods WG. Treatment-related myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia in survivors of childhood cancer – An update. *Leukemia Lymphoma* 2005; 46 (5): 651-63.

17. Wheatley K, Burnett A, Goldstone A, Gray R, Hann I, Harrison C et al. A simple, robust, validated and highly predictive index for the determination of risk-directed therapy in acute myeloid leukaemia derived from the MRC AML 10 trial. United Kingdom Medical Research Council's Adult and Childhood Leukaemia Working Parties. *Br J Haematol* 1999;107 (1): 69–79.
18. Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2006;354:166-78.
19. Mopett J, Burke A A G, Steward CG, Oakhill A, Goulden NJ. The clinical relevance of detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Pathol* 2003; 56 (4):249-53.
20. Ward E, DeSantis C, Robbins A, Kohler B, Jemal A. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014; 64(2); 83-103.
21. Reiter A and Fernando AA. Malign Lymphomas and Lymphadenopathies. In *Oncology of Infancy and Childhood*. Elsevier Academic Press, USA, 2009: 417-505.
22. P. Lanzkowsky, Hodgkin Lymphoma. In: Lanzkowsky P. *Manual of Pediatric Hematology and Oncology*. 5th Ed. Elsevier Academic Press, USA, 2011: 599-623.
23. Smith MA, Seibel NL, Altekruse SF, Ries LA, Melbert DL, O'Leary M et al. Outcomes for children and adolescents with cancer: challenges for twenty-first century. *J Clin Oncol* 2010; 28(15): 2625-34.
24. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4th Ed. 2008.
25. <http://www.mirbase.org/cgi--bin/browse.pl> Erişim tarihi: 05.05.2015
26. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75: 843–854.
27. Ruvkun G. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science* 2001; 294: 797–799.
28. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 2005;123:631-640.
29. Sun W, Li YSJ, Huang HD, Shyy JYJ, Chien S. microRNA: A Master Regulator of Cellular Processes for Bioengineering Systems. *Annu Rev Biomed Eng* 2010;12:1-27.
30. Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev.* 2009;28:369–378.

31. Pillai RS. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA* 2005;11:1753–1761.
32. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E et al. Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(24): 15524-9.
33. Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, et al. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;24(103):9136–41.
34. Weith A, Martinsson T, Cziepluch C, Bruderlein S, Amler LC, Berthold F, et al. Neuroblastoma consensus deletion maps to 1p36.1–2. *Genes, Chromosomes and Cancer* 1989;2(1):159–66.
35. Leister I, Weith A, Bruderlein S, Cziepluch C, Kangwanpong D, Schlag P, et al. Human colorectal cancer: high frequency of deletions at chromosome 1p35. *Cancer Research* 1990;22(50):7232–5.
36. Bieche I, Champeme MH, Matifas F, Cropp CS, Callahan R, Lidereau R. Two distinct regions involved in 1p deletion in human primary breast cancer. *Cancer Research* 1993;9(53):1990–4.
37. Herzog TJ, Kowalski LD, Liu H, Arlt M, Swisher E. Evaluation of a region on chromosome 1p in ovarian serous carcinoma that is frequently deleted in uterine papillary serous carcinoma. *Gynecol Oncol* 2001;82(1): 139-42.
38. Vita M, Henriksson M. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Seminars in Cancer Biology* 2006;4(16):318–30.
39. Chang TC, Yu D, Lee YS, Wentzel EA, Arking DE, West KM, et al. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nature Genetics* 2008;1(40):43–50.
40. Lujambio A, Esteller M. CpG island hypermethylation of tumor suppressor microRNAs in human cancer. *Cell Cycle* 2007;12(6):1455–9.
41. Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nature Genetics* 2007;5(39):673–7.
42. Wang D, Huang J, Hu Z. RNA helicase DDX5 regulates microRNA expression and contributes to cytoskeletal reorganization in basal breast cancer cells. *Molecular and Cellular Proteomics* 2012;2(11).
43. Qu B, Shen N. miRNAs in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *Int J Mol Sci*. 2015 Apr 28;16(5):9557-72.

44. van den Hoogen P, van den Akker F, Deddens JC, Sluijter JP Curr Heart Failure in Chronic Myocarditis: A Role for microRNAs? *Genomics* 2015;16(2):88-94.
45. Ramezani A, Devaney JM, Cohen S, Wing MR, Scott R, Knoblach S, Singhal R et al. Circulating and urinary microRNA profile in focal segmental glomerulosclerosis: a pilot study. *Eur J Clin Invest* 2015;45(4):394-404.
46. Xing T, Xu H, Yu W, Wang B, Zhang J. Expression profile and clinical significance of miRNAs at different stages of chronic hepatitis B virus infection. *Int J Clin Exp Med.* 2015;15;8(4):5611-20.
47. Undi RB, Kandi R, Gutti RK. MicroRNAs as Haematopoiesis Regulators. *Adv Hematol* 2013;2013:695754.
48. Navarro F, Gutman D, Meire E, Cáceres M, Rigoutsos I, Bentwich Z, Lieberman J. miR-34a contributes to megakaryocytic differentiation of K562 cells independently of p53. *Blood* 2009;114 (10): 2181–92.
49. P. Romania, V. Lulli, E. Pelosi, M. Biffoni, C. Peschle, and G. Marziali, MicroRNA 155 modulates megakaryopoiesis at progenitor and precursor level by targeting Ets-1 and Meis1 transcription factors *British Journal of Haematology.* 2008;143:4: 570–580.
50. Starczynowski DT, Kuchenbauer F, Argiropoulos B, Sung S, Morin R, Muranyi A. Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q- syndrome phenotype. *Nature Medicine* 2010;16:49–58.
51. H.Wu,J.R.Neilson, P.Kumaretal.,miRNA profiling of native, effector and memory CD8 T cells. *PLoS ONE* 2007;2:10:e1020.
52. T. M. Laufer. T-cell sensitivity: a MicroRNA regulates the sensitivity of the T-cell receptor. *Immunology and Cell Biology* 2007;85:5:346–7.
53. Monticelli S, Ansel KM, Xiao C, Socci ND, Krichevsky AM, Thai TH, et al. MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system. *Genome Biol.* 2005;6(8):R71.
54. Zhou B, Wang S, Mayr C, Bartel DP, Lodish HF. miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(17):7080–5.
55. Bender TP, Kremer CS, Kraus M, Buch T, Rajewsky K. Critical functions for c-Myb at three checkpoints during thymocyte development. *Nat Immunol.* 2004;5(7):721–9.
56. Thai TH, Calado DP, Casola S, Ansel KM, Xiao C, Xue Y, et al. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science.* 2007;316(5824):604–8.
57. Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR, et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science.* 2007;316(5824):608–11.

58. L. P. Tan, M. Wang, J.-L. Robertus et al., miRNA profiling of B-cell subsets: specific miRNA profile for germinal center B cells with variation between centroblasts and centrocytes. *Laboratory Investigation* 2009;89:6:708-16.
59. C. Xiao, D. P. Calado, G. Galler et al., miR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. *Cell* 2007;131:1:146–59.
60. C.-Z. Chen, L. Li, H. F. Lodish, and D. P. Bartel, MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 2004;303:5654:83–86.
61. Calin GA¹, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 26;99(24):15524-9.
62. Zanette DL, Rivadavia F, Molfetta GA, et al. miRNA expression profiles in chronic lymphocytic and acute lymphocytic leukemia. *Braz J Med Biol Res* 2007;40:1435–1440.
63. Ju X, Li D, Shi Q, Hou H, Sun N, Shen B. Differential microRNA expression in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol* 2009;26:1–10.
64. Fulci V, Colombo T, Chiaretti S, Messina M, Citarella F, Tavolaro S, Guarini A et al. Characterization of B- and T-lineage acute lymphoblastic leukemia by integrated analysis of MicroRNA and mRNA expression profiles. *Genes Chromosomes Cancer* 2009;48:1069–1082.
65. Zhang H, Luo XQ, Zhang P, Huang LB, Zheng YS, Wu J et al. MicroRNA patterns associated with clinical prognostic parameters and CNS relapse prediction in pediatric acute leukemia. *PLoS ONE* 2009;4:e7826.
66. Xu L, Liang YN, Luo XQ, Guo HX. Association of miRNAs expression profiles with prognosis and relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2011;32:178–81.
67. Kaddar T, Chien WW, Bertrand Y, Pages MP, Rouault JP, Salles G, Ffrench M, Magaud JP et al. Prognostic value of miR-16 expression in childhood acute lymphoblastic leukemia relationships to normal and malignant lymphocyte proliferation. *Leuk Res* 2009;33:1217–23.
68. Han BW, Feng DD, Li ZG, Luo XQ, Zhang H, Li XJ, Zheng LL et al. A set of miRNAs that involve in the pathways of drug resistance and leukemic stem-cell differentiation is associated with the risk of relapse and glucocorticoid response in childhood ALL. *Hum Mol Genet* 2011;20:4903–15.
69. Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes*

- Chromosomes Cancer. 2004;39(2):167.
70. Tagawa H, Ikeda S, Sawada K. Role of microRNA in the pathogenesis of malignant lymphoma. *Cancer sci* 2013;104(7):801-9.
71. Eis PS, Tam W, Sun L, Chadburn A, Li Z, Gomez MF et al. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 3627–32.
72. Zhang X, Zhao X, Fiskus W, Lin J, Lwin T, Rao R et al. Coordinated silencing of MYC-mediated miR-29 by HDAC3 and EZH2 as a therapeutic target of histone modification in aggressive B-cell lymphomas. *Cancer Cell* 2012; 22: 506–23.
73. Fontana L, Fiori ME, Albini S, Cifaldi L, Giovinnazzi S, Forloni M, et al. Antagomir-17-5p abolishes the growth of therapy-resistant neuroblastoma through p21 and BIM. *PLoS ONE* 2008;5(3):e2236.
74. Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, Nakagama H. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;39(104): 15472–7.
75. Takeshita F, Patrawala L, Osaki M, Takahashi RU, Yamamoto Y, Kosaka N, et al. Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell-cycle genes. *Molecular Therapy* 2010;1(18):181–7.
76. Wang X, Qiu W, Zhang G, Xu S, Gao Q, Yang Z. MicroRNA-204 targets JAK2 in breast cancer and induces cell apoptosis through the STAT3/BCI-2/survivin pathway. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(5):5017-25.
77. Wu D, Pan H, Zhou Y, Zhang Z, Qu P, Zhou J, Wang W. Upregulation of microRNA-204 inhibits cell proliferation, migration and invasion in human renal cell carcinoma cells by downregulating SOX4. *Mol Med Rep.* 2015 Aug 27.
78. Butrym A, Rybka J, Baczyńska D, Tukiendorf A, Kuliczowski K, Mazur G. Low expression of microRNA-204 (miR-204) is associated with poor clinical outcome of acute myeloid leukemia (AML) patients. *J Exp Clin Cancer Res.* 2015;34:68.
79. Chang RM, Yang H, Fang F, Xu JF, Yang LY. MicroRNA-331-3p promotes proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma by targeting PH domain and leucine-rich repeat protein phosphatase. *Hepatology* 2014;60(4):1251-63.

80. Shuangli Butrym A, Rybka J, Baczyńska D, Tukiendorf A, Kuliczkowski K, Mazur G. Expression of microRNA-331 can be used as a predictor for response to therapy and survival in acute myeloid leukemia patients. *Biomark Med* 2015;9(5):453-60.
81. Mi S, Lu J, Sun M, Li Z, Zhang H, Neilly MB et al. MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(50):19971-6.
82. Schotte D, Chau JC, Sylvester G, Liu G, Chen C, van der Velden VH, Broekhuis MJ et al. Identification of new microRNA genes and aberrant microRNA profiles in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2009;23(2):313-22
83. de Oliveira JC, Scrideli CA, Brassesco MS, Morales AG, Pezuk JA, Queiroz Rde P, Yunes JA, Brandalise SR, Tone LG. Differential miRNA expression in childhood acute lymphoblastic leukemia and association with clinical and biological features. *Leuk Res* 2012;36(3):293-8.
84. Duyu M, Durmaz B, Gunduz C, Vergin C, Yilmaz Karapinar D, Aksoylar S, Kavakli K et al. Prospective evaluation of whole genome microRNA expression profiling in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Biomed Res Int.* 2014;2014:967585.
85. E. Sonkoly, M. Staňle, and A. Pivarcsi, MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. *Seminars in Cancer Biology* 2008;18; 2.131–140.
86. Li X, Li D, Zhuang Y, Shi Q, Wei W, Ju X. Overexpression of miR-708 and its targets in the childhood common precursor B-cell ALL. *Pediatr Blood Cancer* 2013;60(12):2060-7.
87. Peng J, Mo R, Ma J, Fan J. let-7b and let-7c are determinants of intrinsic chemoresistance in renal cell carcinoma. *World J Surg* 2015; 8;13:175.
88. Ma J, Guo R, Wang T, Pan X, Lei X. Let-7b binding site polymorphism in the B-cell lymphoma-extra large 3'UTR is associated with fluorouracil resistance of hepatocellular carcinoma. *Mol Med Rep* 2015;11(1):677-81.
89. Han X, Chen Y, Yao N, Liu H, Wang Z. MicroRNA let-7b suppresses human gastric cancer malignancy by targeting ING1. *Cancer Gene Ther* 2015 ;22(3):122-9
90. Fujiwara-Igarashi A, Igarashi H, Mizutani N, Goto-Koshino Y, Takahashi M, Ohno K, Tsujimoto H. Expression profile of circulating serum microRNAs in dogs with lymphoma. *Vet J* 2015;205(2):317-21.
91. Hao Z, Yang J, Wang C, Li Y, Zhang Y, Dong X, Zhou et al. MicroRNA-7 inhibits metastasis and invasion through targeting focal adhesion kinase in cervical cancer. *Int J Clin Exp Med.* 2015;15:8 (1):480-7.

92. Liu H, Wu X, Huang J, Peng J, Guo L. miR-7 modulates chemoresistance of small cell lung cancer by repressing MRP1/ABCC1. *Int J Exp Pathol*. 2015;96(4):240-7.
93. Swiercz A, Chechlinska M, Kupryjanczyk J, Dansonka-Mieszkowska A, Rembiszewska A, Goryca K, Kulinczak M, Zajdel et al. miR-7 expression in serious ovarian carcinomas. *Anticancer res* 2015;35(4):2423-9.
94. Wang W, Corrigan-Cummins M, Hudson J, Maric I, Simakova O, Neeplapu SS, Kwak LW, Janik JE, Gause B, Jaffe ES, Calvo KR. MicroRNA profiling of Follicular lymphoma identifies microRNAs related to cell proliferation and tumor response. *Haematologica*.2012. Apr;97(4):586-94.
95. Zhi Y, Xie X, Wang R, Wang B, Gu W, Ling Y, Dong W, Zhi F, Liu Y. Serum level of miR-10-5p as a prognostic biomarker for acute myeloid leukemia. *Int J Hematol* 2015;102(3):296-303.
96. Fu X, Han Y, Wu Y, Zhu X, Lu X, Mao F, et al. Prognostic role of microRNA-21 in various carcinomas: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Invest* 2011;41:1245–53.
97. Rossi S, Shimizu M, Barbarotto E, Nicoloso MS, Dimitri F, Sampath D, et al. MicroRNA fingerprinting of CLL patients with chromosome 17p deletion identify a miR-21 score that stratifies early survival. *Blood* 2010;116:945–52.
98. Volinia S, Galasso M, Costinean S, Tagliavini L, Gamberoni G, Drusco A, et al. Reprogramming of miRNA networks in cancer and leukemia. *Genome Res* 2010;20:589–99.
99. Riccioni R, Lulli V, Castelli G, Biffoni M, Tiberio R, Pelosi E, Lo-Coco F, Testa U. miR-21 is overexpressed in NPM1-mutant acute myeloid leukemias. *Leuk Res* 2015;39(2):221-8.
100. Wang WZ, Pu QH, Lin XH, Liu MY, Wu LR, Wu QQ, Chen YH et al. Silencing of miR-21 sensitizes CML CD34(+) stem/progenitor cells to imatinib-induced apoptosis by blocking PI3K/AKT pathway. *Leuk Res* 2015;39(10):1117-24.
101. Sekar D, Hairul Islam VI, Thirugnanasambantham K, Saravanan S. Relevance of miR-21 in HIV and non-HIV-related lymphomas. *Tumour Biol* 2014;35(9):8387-93.
102. Yamanaka Y, Tagawa H, Takahashi N, Watanabe A, Guo YM, Iwamoto K, Yamashita J et al. Aberrant overexpression of microRNAs activate AKT signaling via down-regulation of tumor suppressors in natural killer–cell lymphoma/leukemia. *Blood* 2009;114(15):3265–75.
103. Sánchez-Espiridión B, Martín-Moreno AM, Montalbán C, Figueroa V, Vega F, Younes A, Medeiros LJ et al. MicroRNA signatures and treatment response in

- patients with advanced classical Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* 2013;162(3):336–47.
104. Bai H, Wei J, Deng C, Yang X, Wang C, Xu R. MicroRNA-21 regulates the sensitivity of diffuse large Bcell lymphoma cells to the CHOP chemotherapy regimen. *Int J Hematol* 2013;97(2):223–31.
 105. Krichevsky AM, Gabriely G. miR-21: a small multi-faceted RNA. *J Cell Mol Med*. 2009;13(1):39–53.
 106. Rosato P, Anastasiadou E, Garg N, Lenze D, Boccellato F, Vincenti S, Severa M et al. Differential regulation of miR-21 and miR-146a by Epstein–Barr virus-encoded EBNA2. *Leukemia* 2012;26(11):2343–52.
 107. Wang Z, Hong Z, Gao F, Feng W. Upregulation of microRNA-375 is associated with poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia. *Mol Cell Biochem* 2013;383(1-2):59-65.
 108. Shao Y, Geng Y, Gu W, Huang J, Ning Z, Pei H. Prognostic significance of microRNA-375 downregulation in solid tumors: a meta-analysis. *Dis Markers*. 2014;2014:626185.
 109. Hu A, Huang JJ, Xu WH, Jin XJ, Li JP, Tang YJ, Huang XF et al. MiR-21/miR-375 ratio is an independent prognostic factor in patients with laryngeal squamous cell carcinoma. *Am J Cancer Res*. 2015 Apr 15;5(5):1775-85.
 110. Starczynowsky DT, Kuchenbauer F, Argiropoulos B, Sung S, Morin R, Muranyi A et al. Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q-syndrome phenotype. *Nat Med* 2010;(1):49-58.
 111. Ozen M, Creighton CJ, Ozdemir M, Ittmann M. Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. *Oncogene* 2008; 27:1788–93.
 112. Schepeler T, Reinert JT, Ostenfeld MS, Christensen LL, Silahtaroglu AN, Dyrskjot L, et al. Diagnostic and prognostic microRNAs in stage II colon cancer. *Cancer Res*. 2008; 68:6416–24.
 113. Sempere LF, Christensen M, Silahtaroglu A, Bak M, Heath CV, Schwartz G, et al. Altered MicroRNA expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer. *Cancer Res*. 2007; 67:11612–20.
 114. Izzotti A, Calin GA, Arrigo P, Steele VE, Croce CM, De Flora S. Downregulation of microRNA expression in the lungs of rats exposed to cigarette smoke. *FASEB J* 2009; 23:806–12.
 115. Xia H, Yamada S, Aoyama M, Sato F, Masaki A, Ge Y et al. Prognostic impact of microRNA-145 down-regulation in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Hum Pathol* 2014;45(6):1192-8.

116. Sachdeva M, Zhu S, Wu F, Wu H, Walia V, Kumar S et al. p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(9):3207-12.
117. Havelange V, Stauffer N, Heaphy CC, Volinia S, Andreeff M, Marcucci G, Croce CM, Garzon R. Functional implications of microRNAs in acute myeloid leukemia by integrating microRNA and messenger RNA expression profiling. *Cancer*. 2011;15;117(20):4696-706.
118. Zhong H, Wang HR, Yang S, Zhong JH, Wang T, Wang C, Chen FY. Targeting Smad4 links microRNA-146a to the TGF-beta pathway during retinoid acid induction in acute promyelocytic leukemia cell line. *Int J Hematol*. 2010 Jul;92(1):129-35.
119. Xu L, Zhong H, Wan H, Chen FY, Zhong J, Xiao F. miR-146a expression level as a novel putative prognostic marker for acute promyelocytic leukemia. *Dis Markers*. 2014;2014:150604.
120. Hasani SS, Hashemi M, Eskandari-Nasab E, Naderi M, Omrani M, Sheybani-Nasab M. A functional polymorphism in the miR-146a gene is associated with the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a preliminary report. *Tumour Biol*. 2014 ;35(1):219-25.
121. Wu D, Pan H, Zhou Y, Zhang Z, Qu P, Zhou J, Wang W. Upregulation of microRNA-204 inhibits cell proliferation, migration and invasion in human renal cell carcinoma cells by downregulating SOX4. *Mol Med Rep*. 2015 Aug 27.
122. Eis PS, Tam W, Sun L, Chadburn A, Li Z, Gomez MF et al. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(10):3627-32.
123. Kluiver J, Poppema S, de Jong D, Blokzijl T, Harms G, Jacobs S. BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *Pathol*. 2005;207(2):243-9.
124. Kluiver J, Haralambieva E, de Jong D, Blokzijl T, Jacobs S, Kroesen BJ et al. Lack of BIC and microRNA miR-155 expression in primary cases of Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006;45(2):147-53.
125. Salemi D, Cammarata G, Agueli C, Augugliaro L, Corrado C, Bica MG et al. miR-155 regulative network in FLT3 mutated acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2015;39(8):883-96.
126. Song C, Liu LZ, Pei XQ, Liu X, Yang L, Ye F, Xie X, Chen J, Tang H, Xie X. miR-200c inhibits breast cancer proliferation by targeting KRAS. *Oncotarget*. 5.

127. Xu F, He H, Huang W, Lin Y, Luo S, Du Q, Duan R. Decreased expression of MicroRNA-200 family in human breast cancer is associated with lymph node metastasis. *Clin Transl Oncol* 2015 Jul 23.
128. Wang X, Chen X, Han W, Ruan A, Chen L, Wang R et al. miR-200c Targets CDK2 and Suppresses Tumorigenesis in Renal Cell Carcinoma. *Mol Cancer Res*. 2015 Aug 6.
129. Shao Y, Geng Y, Gu W, Huang J, Pei H, Jiang J. Prognostic role of tissue and circulating microRNA-200c in malignant tumors: a systematic review and meta-analysis. *Cell Physiol Biochem* 2015;35(3):1188-200.
130. Lu YF, Zhang L, Wayne MM, Fu WM, Zhang JF. MiR-218 mediates tumorigenesis and metastasis: Perspectives and implications. *Exp Cell Res*. 2015;334(1):173-82.
131. K. Moitra, K. Im, K. Limpert, A. Borsa, J. Sawitzke, R. Robey, N. Yuhki, et al., Differential gene and microRNA expression between etoposide resistant and etoposide sensitive MCF7 breast cancer cell lines, *PLoS ONE* 7 (2012) e45268.
132. Y.Li, J.Liu, C.Yuan, B.Cui, X.Zou, Y.Qiao, High-risk human papilloma virus reduces the expression of microRNA-218 in women with cervical intra epithelial neoplasia, *J.Int.Med.Res* (2010;38:1730–6).
133. Huang X, Huang M, Kong L, Li Y. miR-372 suppresses tumour proliferation and invasion by targeting IGF2BP1 in renal cell carcinoma. *Cell Prolif*. 2015;48(5):593-9.
134. Yu J, Jin L, Li W, Jiang L, Hu Y, Zhi Q, Zhu X. Serum miR-372 is a diagnostic and prognostic biomarker in patients with early colorectal cancer. *Anticancer Agents Med Chem*. 2015 Jul 16.
135. Tu HF, Chang KW, Cheng HW, Liu CJ. Upregulation of miR-372 and -373 associates with lymph node metastasis and poor prognosis of oral carcinomas. *Laryngoscope*. 2015 Jul 7.
136. Lopotová T1, Záčková M, Klamová H, Moravcová J. MicroRNA-451 in chronic myeloid leukemia: miR-451-BCR-ABL regulatory loop? *Leuk Res* 2011;35(7):974-7.
137. Li X, Sanda T, Look AT, Novina CD, von Boehmer H. Repression of tumor suppressor miR-451 is essential for NOTCH1-induced oncogenesis in T-ALL. *J Exp Med* 2011;208(4):663-75.
138. Keklikoglou I, Koerner C, Schmidt C, Zhang JD, Heckmann D, Shavinskaya et al. MicroRNA-520/373 family functions as a tumor suppressor in estrogen receptor negative breast cancer by targeting NF- κ B and TGF- β signaling pathways. *Oncogene* 2012; 31: 4150-63.

139. Chen L, Zhang W, Yan W, Han L, Zhang K, Shi Z, Zhang J et al. The putative tumor suppressor miR-524-5p directly targets Jagged-1 and Hes-1 in glioma. *Carcinogenesis* 2012; 33: 2276-2282.
140. Yan L, Yu J, Tan F, Ye GT, Shen ZY, Liu H, Zhang Y et al. SP1-mediated microRNA-520d-5p suppresses tumor growth and metastasis in colorectal cancer by targeting CTHRC1. *Am J Cancer Res.* 2015;5(4):1447-59.
141. Shi Y, Qiu M, Wu Y, Hai L. MiR-548-3p functions as an anti-oncogenic regulator in breast cancer. *Biomed Pharmacother.* 2015 pii: S0753-3322(15)00171-7.
142. Coskun E, Neumann M, Schlee C, Liebertz F, Heesch S, Goekbuget N, Hoelzer D, et al. MicroRNA profiling reveals aberrant microRNA expression in adult ETP-ALL and functional studies implicate a role for miR-222 in acute leukemia. *Leuk Res.* 2013;37(6):647-56.
143. Heidari N, Saki N, De Filippis L, Shahjahani M, Teimouri A, Ahmadzadeh A. Central nervous system niche involvement in the leukemia. *Clin Transl Oncol.* 2015 Aug 5.
144. Rommer A, Steinleitner K, Hackl H, Schneckenleithner C, Engelmann M, Scheideler M, et al. Overexpression of primary microRNA 221/222 in acute myeloid leukemia. *BMC Cancer.* 2013 Jul 29;13:364.