

Kronik Miyeloid Lösemi Hastaları'nda miR-21, miR-150, miR-155 Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması

Investigation of miR-21, miR-150, miR-155 Expression Levels in Chronic Myeloid Leukemia Patients

Hüseyin AVCILAR¹  Hatice ALTIN²  Sevil ŞİMŞEK²  Leylagül KAYNAR³ 

ÖZ

Amaç: MikroRNA (miRNA)'lar proteinlere translasyonu gerçekleştirilmeyen, hücrede biyolojik mekanizmaları etkileyen RNA molekülleridir. miRNA ekspresyon düzeylerinin qPCR ile belirlenmesi KML hastalarının tedavisinin takibinde bilgi verebilir. Bu çalışmada KML hastalarının takibinde kullanılabilecek miR-21, miR-150, miR-155 ekspresyonlarının KML ile ilişkisi araştırılması amaçlanmıştır.

Araçlar ve Yöntem: Bu çalışma, imatinib, nilotinib, dasatinib ilaçlarıyla tedavi edilen 22 KML hastası ve 5 sağlıklı kontrolden elde edilen plazma örneklerinde yapıldı. Hasta ve kontrol periferik kan örneklerinden RNA ve miRNA eldesi Genaxxon miRNA pürifikasyon kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Wiz Script cDNA Sentez Kiti kullanılarak cDNA eldesi yapıldı. cDNA örneklerinden hedeflenen miRNA ekspresyonlarının düzeyleri gerçek zamanlı PCR yöntemi ile analiz edildi.

Bulgular: Kontrol grubu miRNA ekspresyon düzeyleri 1.0 olarak belirlendi. KML yeni tanı grubunda miR-21 kat değişimi ortalama 0.6, miR-150 kat değişimi 0.3 ve miR-155 kat değişimi 0.5 bulundu. İmatinib tedavi grubunda miR-21, miR-150 ve miR-155 için kat değişimi sırasıyla 1.4, 0.5 ve 2.4 kat olarak bulundu. Nilotinib tedavi grubunda miR-21 düzeyi 3.5, miR-150 düzeyi 0.5 ve miR-155 düzeyi 4.3 bulundu. Dasatinib tedavi grubunda miR-21 kat değişimi 0.8, miR-150 kat değişimi 2.1 ve miR-155 kat değişimi 0.5 bulundu. Yapılan çalışmada miR-21 düzeyi ortalama 3.2, miR-150 düzeyi 1.0 ve miR-155 düzeyi 2.8 bulundu. miR-150 düzeyleri yeni tanı grubunda, İmatinib grubunda ve Nilotinib grubunda kontrol örneklerinden daha düşük oranda bulundu. Bu fark istatistiksel olarak yeni tanı grubunda ($p=0.07484$) ve Nilotinib grubunda ($p=0.01541$) anlamlıdır. Hasta ve kontroller arasında miR-21 ve miR-155 düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı.

Sonuç: Bu sonuçlar miRNA-150'nin KML hastalarının izleminde kullanılabileceğini ve ilaç direncinin erken dönemde tespitinde katkı sağlayabileceğini desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: kronik miyeloid lösemi; mikroRNA; mikroRNA-21; mikroRNA-150; mikroRNA-155

ABSTRACT

Purpose: In this study, the relationship between CML and the expression levels of miR-21, miR-150, and miR-155, which could be used in the follow-up of CML patients, was investigated.

Materials and Methods: RNA and miRNA were extracted from peripheral blood samples of patient and control samples. Targeted miRNA expression levels from cDNA samples were analyzed by real-time PCR method.

Results: miRNA expression level was determined as 1.0 in the control group. In the newly diagnosed group, the mean miR-21 fold change was 0.6, miR-150 fold change was 0.3, and miR-155 fold change was 0.5. fold changes for miR-21, miR-150 and miR-155 were found to be 1.4, 0.5 and 2.4 fold, respectively, in the imatinib treatment group. In the nilotinib treatment group, miR-21 level was 3.5, miR-150 level 0.5, and miR-155 level 4.3. In the dasatinib treatment group, fold change was 0.8 for miR-21, 2.1 for miR-150, and 0.5 for miR-155. The mean miR-21 level was found to be 3.2, miR-150 level 1.0 and miR-155 level 2.8. MiR-150 levels were found to be lower in the newly diagnosed group, imatinib group and nilotinib group than in the control samples. This difference between the new diagnosis group ($p=0.07484$) and the nilotinib group ($p=0.01541$) is statistically significant. No significant difference was found between patients and controls in terms of miR-21 and miR-155 levels.

Conclusion: These results support that miRNA-150 can be used as a parameter in the monitoring of treatment of CML patients and can contribute to the early detection of drug resistance.

Keywords: chronic myeloid leukemia; microRNA; microRNA-21; microRNA-150; microRNA-155

Gönderilme tarihi: 30.08.2023; Kabul edilme tarihi: 06.12.2024

¹İmmünoloji Anabilim Dalı, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kayseri, Türkiye.

²Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, Türkiye.

³Tıp Fakültesi, İstanbul Medipol Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.

Sorumlu Yazar: Hüseyin Avcılar, İmmünoloji Anabilim Dalı, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kayseri, Türkiye. e-posta: avcilarh@hotmail.com

Makaleye atf için: Avcılar H, Altın H, Şimşek S, Kaynar L. Kronik miyeloid lösemi hastaları'nda miR-21, miR-150, miR-155 ekspresyon düzeylerinin araştırılması. Ahi Evran Med J. 2025;9(1):74-81. DOI: 10.46332/aemj.1327364



GİRİŞ

Kronik Miyeloid Lösemi (KML) kemik iliğinde myeloid hücrelerin çoğalması, periferik kanda olgun ve genç miyeloid seri hücrelerinin aşırı artması, kan profilinde bazofili ve trombositosis splenomegali ile seyreden bir hemotopetik kök hücre hastalığıdır. KML myeloproliferatif hastalık sınıfına girer. Tüm lösemilerin %15'lik kısmını, yetişkin lösemilerinin %20'sini KML oluşturur. KML insidansı 1/100.000'dir, yaşla görülme sıklığı artar, çocuklarda nadiren görülür, erkeklerde kadınlara göre daha sıktır.^{1,2} KML tanısı konulan hastaların %92'sinde Philadelphia (Ph) kromozomu pozitifdir. KML moleküler patogenezinde BCR-ABL1 füzyon geni etkisiyle 9. ve 22. kromozomlar arasında oluşan translokasyon sonucunda Ph kromozomu meydana gelir. BCR/ABL gen füzyonu, artmış tirozin kinaz aktivitesine neden olarak; hücre çoğalma, maturasyon ve adezyon sinyal yollarının aktivitesine neden olarak apoptozu inhibe eder ve malign hücre transformasyonuna yol açar. Bu da KML patogenezinin temelini oluşturur.^{3,4}

Hastalığın seyri, erken tanı konulması, yeni tedavi yöntemleriyle iyileşmiş ve yaşam süresi uzamıştır. KML tedavisinde yaygın olarak hidroksiüre, interferon, kemoterapi ve allojenik kök hücre nakli yöntemleri kullanılırken 2000'li yıllarda bu tedavilerin yerini BCR/ABL1 proteini hedef alan tirozin kinaz inhibitörleri (TKI) almıştır. KML patogenezinde BCR/ABL1 önemli bir rol oynadığının bulunması bu proteini hedef alan spesifik tedavilerin geliştirilmesini sağlamıştır. BCR-ABL1'nin hedefleyen TKI'leri KML tedavisinde altın standart haline gelmiştir. Toplamda beş TKI, KML'nin birinci basamak tedavisi için onaylanmıştır. Bu moleküller imatinib dasatinib nilotinib, bosutinib ve ponatinib tedavileridir.⁵ TKI'leri KML tedavisinde devrim yaratmış fakat bazı hastalarda TKI'lerine karşı direnç gelişmiştir. KML'deki TKI direnci BCR-ABL'ye bağımlı ve BCR-ABL'den bağımsız mekanizmalar olmak üzere iki temel mekanizma üzerinden gelişir. Birincil direnç oluşma nedeni *BCR-ABL* proteininin aşırı ekspresyonu ve TKİ bağlanma bölgesinde nokta mutasyonları oluşmasıdır. *BCR-ABL* proteininin bağlanma bölgesindeki nokta mutasyonları sonucu TKİ'nin bağlandığı bölgede konformasyonel değişiklik gelişir ve ilaç afinetinde azalma sonucu bağlanma gerçekleşmez. Bunun so-

nucunda hücre sinyal yollarının aktivasyonu sonucu lösemik transformasyonda ve hücre proliferasyonunda artma, apoptosiste azalma oluşur.⁶ *BCR-ABL* bağımsız direnç mekanizmaları lösemik kök hücreleri ve ilaç farmakokinetiğindeki değişiklikler sonucu gelişir. TKİ'lerin gastrointestinal sistemdeki emilim bozukluğu ilaç plazma düzeyinin düşmesine ve ilaç etkinliğinin azalmasına neden olur. İlacın hücre içi konsantrasyonunu ayarlayan influx ve efflux pompalarının aşırı çalışması da ilaç hücre içi konsantrasyonunun azalmasına neden olarak ilaç etkinliğini azaltır. Her iki mekanizma da klinik dirence neden olabilir.⁷

Genom üzerinde protein kodlamayan alanda, RNA genlerinden transkripsiyonu sağlanan, proteinlere translasyonu gerçekleştirilmeyen fonksiyonel RNA moleküllerine mikroRNA (miRNA) denir.⁸ miRNA'lar hedef gen ekspresyonunu etkileyerek protein sentezinin düzenlenmesinde ve birçok biyolojik süreçte rol alırlar.⁹⁻¹⁰ miRNAlar enfeksiyon, kardiyovasküler, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi birçok hastalığın patogenezi mekanizmalarında da önemli rol alırlar.¹¹ Yapılan çalışmalarda miRNA ifadesinin bozulmasıyla kanser mekanizması arasında güçlü bir bağ olduğu bulunmuştur. Kanser mekanizmalarında önemli rolü olan hücre ölümü, gelişmesi, büyümesi, farklılaşması ve metabolizması gibi süreçlerde miRNA'ların düzenleyici rolü vardır.¹²⁻¹³ miRNA'lar karsinogenezi onkogen veya tümör baskılayıcı olarak görev alırlar.¹⁴⁻¹⁵ miRNA'ların anormal ekspresyonu KML hastalığının patogenezinde, kliniğinde ve ilaç direnç mekanizmalarında rolüne dair çalışmalar vardır.¹⁶ miRNA'lar hem BCR-ABL'ye bağımlı ve BCR-ABL'den bağımsız mekanizmaları etkileyerek TKI ilaç direncinde rol oynar. Bazı miRNA'ların ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler TKİ ilaç direnci hakkında bilgi verebilir. miR-29, miR-30a, miR-196, miR-203, miR320a, miR424 'ün BCR::ABL1 ekspresyon seviyelerini regülasyonunda rol oynar. Bu miRNA'ların ekspresyonunu artması BCR::ABL1 ekspresyon seviyelerini azaltarak hücre proliferasyonunu inhibe ederken, ekspresyon seviyelerinin azalması tedaviye dirençle ilişkilidir. miR-221, miR-153-3p, miR-577, miR-214 BCR-ABL'den bağımsız mekanizmaları etkileyerek TKI ilaç direncinde rol oynarlar.¹⁷

miRNA'ların ekspresyonunun disregülasyonu kanser hücrelerinde onkogenik veya tümör baskılayıcı etkilerin ortaya çıkmasına neden olur. Tümör hücrelerinde onkogenik miRNA ekspresyonunun artması karsinogenesin başlamasına ve tümör progresyonuna neden olur. Tümör baskılayıcı miRNA'lar ise kanser gelişimine engel olurlar. Bu miRNA'ların ekspresyonunun azalması onkogen aktivasyonuna ve tümör gelişimine neden olur.¹⁸⁻¹⁹ miRNA'lar kanser tiplerinde kontrolsüz büyüme ya da anti-apoptik özellik gösterirler. MiR155 hem ilk keşfedilen onkogenik miRNA'lardan olup lenfoma ve lösemi oluşumunu arttırdığı belirtilmiştir. Yapılan çalışmalarda ise miR-155'in B hücreli lenfoma, meme, pankreas, akciğer ve Hodgkin lenfoma gibi kanser tiplerinde artmış ekspresyonu belirtilmiştir.²⁰ MiR-21 antiapoptotik özellik gösteren, akciğer, kolon, esofagus ve pankreas kanserlerinde ekspresyonu artan onkogenik özellik gösteren miRNA'dır.²¹ KML hastalarında ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir.²² MiR-150, megakaryositik-eritroid öncül hücreler, lenfoid hücreler ve NK hücrelerin gelişiminde rol alan miyeloid hücre farklılaşmasında rol almayan miRNA olarak tanımlanmıştır. MiR-150'nin hedefi, lenfosit gelişiminin birden fazla aşaması için kritik öneme sahip c-Myb transkripsiyon faktörüdür. Yapılan çalışmalarda miR-150 ekspresyonu KML hastalarında azaldığı bulunmuştur.²³ Yapılan miRNA ilişkili çalışmalar hematolojik malignitelerde miRNA'ların belirteç olarak önemini göstermiştir. KML hastalarının tedavi sürecinin izleminde miRNA analizleri belirteç olarak kullanılabilmektedir. KML hastalarında miRNA düzeylerinin qPCR ile gen ekspresyonun belirlenmesi KML tedavi seyri açısından ek bilgi verebilir.²⁴ Bu çalışmada KML hastalarının takibinde kullanılabilecek ve regülatör görevi olabileceğini düşünülen miR-21, miR-150, miR-155 ekspresyonlarını qPCR ile araştırarak KML ile ilişkilerinin ortaya konması amaçlandı.

ARAÇLAR ve YÖNTEM

Hasta Örnekleri

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji-Onkoloji Bilim Dalı'nda takibi yapılan 18-85 yaş aralığında, KML tanısı konulmuş onkolojik ve hematolojik başka malignitesi olmayan 22 hasta üzerinde Mayıs 2018-Eylül 2019 tarihleri arasında yapıldı. "Herhangi bir onkolojik ve hematolojik malignitesi, nörolojik/kronik

hastalık öyküsü olmayan 18-85 yaş aralığında kadın ve erkekten oluşan 5 birey, sağlıklı kontrol grubu olarak seçildi. (Güven aralığı %95, testin gücü %99 olacak şekilde örneklem büyüklüğü 5 olacak şekilde hesaplandı). Hasta ve kontrol grubundaki bireyler bilgilendirilmiş gönüllü olur formunu imzaladıktan sonra çalışmaya dahil edildi. Bu çalışma için Erciyes Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan onay alındı (26.01.2018 tarih ve 2018/52 sayı). Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL 2018-8012 kodlu bilimsel araştırma projesi ile desteklenmiştir. Bu araştırma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yürütüldü. Çalışma için hastalardan ve kontrol grubundan miRNA çalışmaları için EDTA'lı tüpe 10 cc kan alındı. Örnekler -20'de çalışma zamanına kadar saklandı.

Tam Kandan Serum Eldesi Total RNA ve RNA'dan miRNA İzolasyonu

EDTA'lı tüpe 10 cc alınan tam kan örneği 3500 gx'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant şeffaf sıvı kısım 2 mL'lik ependorf tüpe alındı, pellet atıldı. Örneklerden RNA ve miRNA eldesi Genaxxon miRNA Purifikasyon kiti (lot no:585873) kullanılarak üretici firma protokolü uygulanarak gerçekleştirildi. İzole edilmiş miRNA ve RNA'lar -20 ° C'de buzdolabında saklandı. Total RNA, miRNA kalite ve miktarı Nano-Drop (Thermo Fisher Scientific, USA) kullanılarak değerlendirildi.

Revers Transkripsiyon ile miRNA'dan cDNA Eldesi

Çalışma hsa-miR-21, hsa-miR-150, hsa-miR-155 'nin primerleri (Suarge Biyoteknoloji, Ankara, Türkiye) kullanılarak Wiz ScriptcDNA Sentez Kiti (Wiz Script, katalog no: W2211-1) ile yapıldı. Her örnekten çift çalışma yapıldı. Ters transkripsiyon 25 °C de 10 dakika, 25°C'de 120 dakikada gerçekleştirildi. Son olarak 85 °C de 5 dakika bekletilerek Ters transkriptaz enziminin denatürasyonu sağlandı. Elde edilen cDNA örnekleri %2'lik agaroz jelde koşuldu. Hemen kullanılmayan cDNA'lar +4 °C de saklandı.

Q-PCR (Kantitatif-PCR)

Gerçek-zamanlı PCR (qPCR) işlemi için Amplifyme SG Universal Mix (BLIRT, Polonya) ve miRNA qPCR SL Assay (Suarge Biyoteknoloji, Türkiye) qPCR primerleri kullanıldı. qPCR işlemi StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Scientific, ABD) cihazında gerçekleştirildi. hsa-miR-21, hsa-miR-150, hsa-miR-155 ve endojen kontrol olarak U6 kullanılara kuyucuk başına 1,5 µL cDNA eklendi. qPCR ile elde edilen Ct değerleri U6 endojen kontrole göre normalize edilip $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile değerlendirildi. Sentezlenen cDNA'lara RT-SYBR Green qPCR kiti kullanılarak denatürasyon (95 °C' de 20 saniye), hibridizasyon ve primer bağlanması (95 °C' de 20 saniye ve 60 °C' de 30 saniye (45 döngü)) ve polimerizasyon ve erime eğrisi (95 °C' de 15 saniye ve 60 °C'de 1dk) ve uzama (95 °C' de 15 saniye) basamaklarından oluşan 40 tekrarlık PCR protokolü uygulandı. Referans gen olarak U-6 kullanıldı.

mi-RNA seviyeleri için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Analizi ile Kat Değişimlerinin Hesaplanması

Gerçek zamanlı PCR çalışmasından sonra tüm örneklerin Cycle threshold (Ct) değerleri ile excel dosyası hazırlandı. U6 25 civarında, miR21 35 civarında, miR150 36 civarında, miR155 36 civarında cycle (Ct) değerleri gösterdi. Bütün Ct değerleri 25 ile 40 arasında dağılım gösterdi. Çıkan Ct değerleri referans gen Ct değerleri oranlanarak normalleştirildi. Kat-değişimi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$); test örneğindeki normalize gen ekspresyonunun ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), kontrol örneğindeki normalleştirilmiş gen ekspresyonuna ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) oranıdır. Kat değişim değerleri <1 ise azalmış (aşağı regüle) olarak kabul edildi. Kat değişim değerleri >1 ise artmış (yukarı regüle) olarak kabul edildi. Örneklerin referans gene göre normalizasyonu yapıldı. Kontrol grubundaki genlerinden elde edilen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri ile hasta grubu değerleri karşılaştırmak için student t-testi kullanıldı ve p değerleri buna göre hesaplandı.

İstatiksel Analiz

Gerçek zamanlı PCR veri analizi, Gen Globe Veri Analiz Merkezi (<https://geneglobe.qiagen.com/us/analyze>) kullanılarak analiz yapıldı. $\Delta\Delta Ct$ metoduyla ham veriler, U6

housekeeping geni kullanılarak normalleşme yapıldı. Sonuçlar Student t-testi uygulanarak p değerleri hesaplandı. %95 güven aralığında "p<0.05" olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Hasta grupları ve kontrol grubu yaş ve cinsiyet bakımından değerlendirilmesi One Way Anova tek yönlü varyans analiz yöntemiyle yapıldı.

BULGULAR

Hasta ve Kontrol Grubunun Özellikleri

Bu çalışmaya hasta grubu olarak 22 birey, kontrol grubu olarak 5 birey olmak üzere toplam 27 birey alındı. Çalışmaya katılan hasta ve kontrol bireylerin 14'ü kadın, 13'ü erkektir. Cinsiyetler açısından değerlendirildiğinde hasta ve kontrol gruplarında bulunan kadınların yaş ortalamaları 46 ± 4 yıl, erkeklerin ise 48 ± 4 yıl olarak hesaplanmıştır. KML tanısı alan hastalar yeni tanı ve ilaç grubu olarak ayrıldı. İlaç grubuna daha önceden ilaç tedavisi olarak imatinib, nilotinib ve dasatinib verilen KML tanısıyla takip edilen hastalar dahil edildi.

Çalışmamızda yer alan 22 KML tanılı hastanın 5 tanesi henüz tedavi almadan yeni tanı aldığı anda, 5 tanesi imatinib, 8 tanesi nilotinib ve 4 tanesi dasatinib tedavisinde iken çalışmaya dahil edildi. Nilotinib tedavisi alan 8 KML hastasından 4 'ü tanı konulduğunda direk nilotinib tedavisi başlanan, diğer 4'ü ise imatinib direnci görülerek nilotinibe geçilen hasta örnekleridir. Dasatinib tedavisi alan 4 KML hastası öncesinde imatinib ve nilotinibe direnç geliştirerek yanıt alınamayan hasta örnekleridir.

Gruplara Göre miRNA Ekspresyon Düzeyleri

Hasta ve kontrol grupları örneklerinde gerçek zamanlı PCR yöntemiyle miR-21, miR-150, miR-155 ekspresyon düzeylerine, housekeeping gen U6 ekspresyon düzeyine bakıldı. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ analizi ile kat değişimleri hesaplandı. Hasta grupları ilaç kullanımına göre ayrılarak; kontrol grubuna göre kat değişimleri hesaplandı.

Çalışmada miR-21 kat değişimi yeni tanı grubunda 0.6 (p=0.2602), imatinib grubunda 1.4 (p=0.6121), nilotinib grubunda 3.5 (p=0.08872) ve dasatinib grubunda 0.8 (p=0.35) olarak bulundu. miR-150 kat değişimi yeni tanı grubunda 0.3 (p=0.007484), imatinib grubunda 0.5

(p=0.2688), nilotinib grubunda 0.5 (p=0.01541) ve dasatinib grubunda 2.1 (p=0.1463) olarak bulundu. miR-155 kat değişimi yeni tanı grubunda 0,5 (p=0.2601), imatinib grubunda 2.4 (p=0.2445), nilotinib grubunda 4.3 (p=0.09963) ve dasatinib grubunda 0.5 (p=-0.1863) olarak bulundu.

Yeni tanı grubu, kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında miR-150 açısından anlamlı bir farklılık tespit edildi (p=0.007484). miR-155 ve miR-21 açısından yeni tanı ve kontrol grubu arasında fark tespit edilmedi (Tablo 1). **İmatinib tedavi grubu** hastalar ve kontrol grubu karşılaştırıldığında her üç miRNA içinde anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 2). **Nilotinib tedavi grubu** hastalar ve kontrol grubu karşılaştırıldığında miR-150 ile arasında anlamlı bir fark saptandı, fakat miR-21 ve miR-155 açısından anlamlı bir fark tespit edilmedi (Tablo 3). **Dasatinib tedavi grubu** hastalar ve kontrol grubu karşılaştırıldığında her üç miRNA içinde anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 4). Tüm gruplar birlikte değerlendirildiğinde yeni tanı grubunda miR-150, miR-155 ve miR-21 seviyeleri en düşük bulundu. miR-155 ve miR-21 için yüksek seviyeler nilotinib tedavi grubunda, miR-150 için ise dasatinib tedavi grubunda yüksek olarak bulundu (Şekil 1).

Çalışılan miRNA'lerden miR-21 ve miR-155 yeni tanıda düşük seviyede ölçülürken hem imatinib hem nilotinib kolunda yukarı regüle bulundu. Ancak sonuçlar arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunmadı (p>0.05). miR-

21 kat değişimi 1.4 (imatinib), 3.5 (nilotinib) bulundu. **miR-155** kat değişimi=2.4 (imatinib), 4.3 (nilotinib); Sonuçlarımız bu ilaç gruplarındaki hastalarda yanıt sağlanmadığı şeklinde yorumlandı.

Tablo 1. Yeni tanı grubunun kontrol grubuna göre kat değişimleri ve p-değerleri.

Grup 1 (Yeni Tanı Grubu)		
Gen Adı	Kat-Değişimi	p-değeri
U6	1	Housekeeping gen
miR-21	0.6	0.2602
miR-150	0.3	0.007484
miR-155	0.5	0.2601

Tablo 2. Tedavi kolunda İmatinib grubun kontrol grubuna göre kat değişimleri ve p-değerleri.

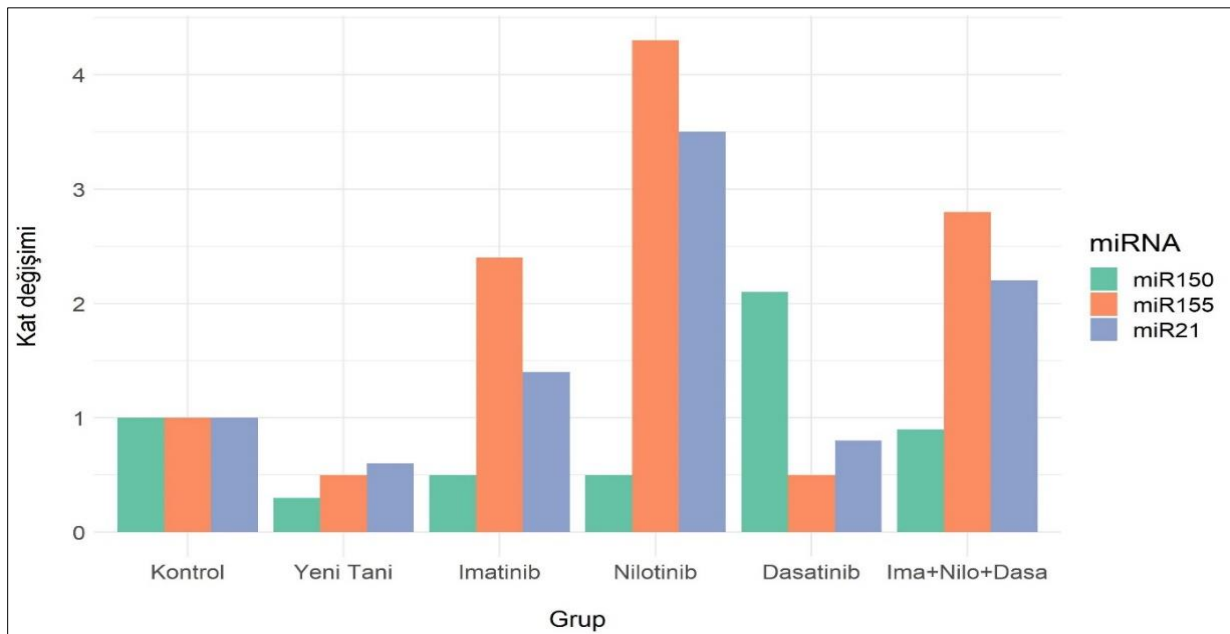
Grup 2 (İmatinib)		
Gen Adı	Kat-Değişimi	p-değeri
U6	1	Housekeeping gen
miR-21	1.4	0.6121
miR-150	0.5	0.2688
miR-155	2.4	0.2445

Tablo 3. Tedavi kolunda Nilotinib grubun kontrol grubuna göre kat değişimleri ve p-değerleri.

Grup 3 (Nilotinib)		
Gen Adı	Kat-Değişimi	p-değeri
U6	1	Housekeeping gen
miR-21	3.5	0.08872
miR-150	0.5	0.01541
miR-155	4.3	0.09963

Tablo 4. Tedavi kolunda Dasatinib grubun kontrol grubuna göre kat değişimleri ve p-değerleri.

Grup 4 (Dasatinib)		
Gen Adı	Kat-Değişimi	p-değeri
U6	1	Housekeeping gen
miR-21	0.8	0.35
miR-150	2.1	0.1463
miR-155	0.5	0.1863



Şekil 1. Tüm grupların kat değişimi.

TARTIŞMA

KML, periferik kanda miyeloid, eritroid ve trombosit hücrelerinde artışa neden olan, kemik iliğinde belirgin miyeloid hiperplaziye yol açan, Philadelphia kromozomu %95 pozitifliği ile karakterize edilen malign bir klonal hematopoietik kök hücre hastalığıdır. MikroRNA'lar, ökaryot hücrelerinde yaygın olarak eksprese edilen protein kodlamayan gen ekspresyonunu düzenleyen küçük mRNA molekülleridir. mikroRNA'lar hücrelerin gelişiminde, farklılaşmasında, apoptozda ve çoğalma gibi kritik biyolojik süreçlerde rol oynarlar. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda farklı mikroRNA moleküllerinin KML patogeneğinde rol oynadığı bulunmuştur.²⁵

Bu çalışmada, yeni KML tanısı almış ve imatinib, nilotinib, dasatinib tedavisi alan KML hastalarında miR-21, miR-150, miR155 ekspresyon seviyeleri araştırıldı. Hasta ve sağlıklı kontrol grubu miRNA düzeylerinin belirlenmesindeki amaç miRNA'ların KML tanısı konulma aşamasında ya da uygulanan ilaç tedavisinin etkinliğinin takibi esnasında farklılıklara bakılarak ilaç değişimi ya da direnç durumunun belirlenmesinde miRNA'ların rolünü araştırmaktır. Daha önceki araştırmaların ışığında, miRNA'ların KML tanı aşamasında bir biyobelirteç olarak kullanımı, KML hastalarının tedavi sürecinde miRNA'ların yeri ve anlamı açısından değerlendirilmesi üzerine yoğunlaşıldı. KML hastalarında belirli aralıklarla miR-21, mi-R150 ve mir-155 düzeylerine bakılarak ilaç yanıtının değerlendirilmesi açısından fikir verebileceği öngörüldü. Kanser gelişim mekanizmalarında miRNA'ların apoptozda rol oynadığının bulunması kanser oluşumlarında da miRNA'ların etkili olduğunu düşündürmüştür. Bir miRNA'nın kanserli hücrede sentezlenme miktarı kanserin tanısında ve tedavi süreçlerinde önemli rol oynar.²⁶

miR-21 önemli tümör süpresör genleri hedef olarak çeşitli neoplazmaların gelişiminde rol alır. Kronik lenfositik lösemi (KLL), Akut miyeloid lösemi (AML) gibi hematolojik maligniteler, prostat, akciğer, kolon, karaciğer ve meme gibi kanser türlerinde miR-21 in ekspresyonun fazla seviyede olduğu görülmüştür.²⁷ miR-21'in hematolojik malignitelerde arttığı bulunmuş, birçok çalışmada malign transformasyonu arttırarak hastalık ilerlemesinin patogeneğinde rol alır. Mirza ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada yeni tanı ve tedavi alan KML hastalarında miR-21 seviyeleri arasında

anamlı bir kat artışı bulunmuştur. İmatinib tedavisi alan KML hastalarında miR-21 ekspresyonu yaklaşık 9 kat arttığı gözlenmiştir. Bu çalışmada yeni tanı ile kronik faz hastaları arasında anlamlı farklılık saptanmıştır. Kronik faz ile blastik ve akselere faz değerlendirildiğinde 3-5 kat artış tespit edilmiştir.²⁸ Bizde çalışmamızda miR-21 açısından yeni tanı ile tedavi kolu karşılaştırıldığında, imatinib ve nilotinib kolunda katsayı anlamında fark tespit edilmiştir. miR-21'in yeni tanı almış grupta azaldığını, (yeni tanı:0.6) imatinip (1.4) ve nilotinip (3.5) tedavi grubunda kat artışı gösterdiği, dasatinip tedavi grubunda (0.8) düşük düzeyde olduğu bulundu.

miR-150, lenfoid farklılaşması açısından önemli bir miRNA'dır. miR-150 T ve B hücrelerinde eksprese edilebilirken progenitör hücrelerinde eksprese edilmez. miR-150 için lenfopoezde pre-B hücrelerinin mature B hücrelerine geçtiği basamakta rol alır. Transgenik farelerle yapılan çalışmalarda miR-150 lenfosit gelişimine etki ettiği ve mature B hücrelerinin alt grup hücrelerinin gelişiminde rol aldığı belirlenmiştir.²⁷

Yapılan çalışmalarda KML teşhis ve tedaviye yanıtında biyobelirteç olarak miR-150' nin; KML ve AML'yi ayırt etmek için miR-155'in ve apoptoz aktivitesi için miR-21'in rolünün olduğu ileri sürülmüştür. Yeh ve arkadaşları, KML hastaları için iyi ve kötü prognostik belirteç olabilecek miRNA'ları göstermişlerdir. Yapılan çalışmada KML'de en sık bozulan miRNA'larının içerisinde miR-150'nin de olduğu bulunmuşlardır.²⁴ KML hastalarında, teşhis ve tedavi yanıtında biyobelirteç olarak miR-150'nin, teşhis için biyobelirteç olarak miR-203'ün, KML ve AML'yi ayırt etmek için miR-17'nin, teşhis ve ilaç yanıtı için miR-10'un, ilaç direnç takibi tespitinde biyobelirteç olarak miR-29a/b'nin rolü olabileceği ileri sürülmüştür.²⁹ miR-150 ifadesinin KML'nin yeni tanı aşamasında azaldığını gösteren çalışmalar vardır. Srutova ve arkadaşları yaptıkları araştırmada miR-150 seviyelerinde kontrol grubuyla kıyaslandığında KML grubunda miR-150 seviyesinde azalma bulunmuşlardır.³⁰ Yeni tanı konmuş 50 KML hastasında RT-PCR yöntemi ile yapılan çalışmada miR-150'nin azalmasının KML'nin tanısall bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği gösterilmiştir.³¹ Yeni tanı konmuş KML hastaların mononükleer hücrelerinde ve kemik iliğinden bakılan CD34 + hücrelerinde miR-150'nin

azalmasını sağlıklı donörlere göre anlamlı bulmuştur. Tedavi edilmeyen KML hastalarında miR-150'nin da azalmış olduğu bulunmuştur.³² Bizim de çalışmamızda, miR-150 gen ifadesi yeni tanı grubunda kat değişimi ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu (kat değişimi=0.3, p=0.007484). Tedavi alan hasta grubu miR-150 gen ifadesi kontrol grubuna göre değerlendirildiğinde nilotinib kolunda istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0.01541). (Tablo 3).

miR-155 ile yapılan çalışmalarda, çeşitli malignitelerde artışı tespit edilmiştir. KML tanısı konulan hastalarda miR-155 seviyesinin sağlıklı bireylere göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Srutova ve arkadaşları KML hastalarında miR-155 ekspresyon seviyelerini kontrol grubuna göre daha yüksek bulmuştur.³⁰ Biz de çalışmamızda sağlıklı bireyler ve ilaç grubundaki miR-155 seviyesini karşılaştırdığımızda; imatinib ve nilotinib tedavi kollarında anlamlı kat artışı bulduk (imatinib:2.4, nilotinib:4.3). Bizim çalışmamızda ilaç grupları arası farklılıklar göstermekle beraber, net bir kat artışı ve miRNA-155 seviyesinde artış tespit edilememiştir.

Çalışmamızda miR-21 için yeni tanı ile dasatinib ilaç grubu arasında bir farklılık bulunmazken, imatinib ve özellikle nilotinib kolunda kat sayı açısından fark tespit edildi. Ancak sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır (p=0.6121 imatinib, p=0.08872 nilotinib). Hasta öyküsüyle değerlendirildiği durumlarda ve hasta sayısının arttığı çalışmalarla desteklenmesiyle birlikte miR-21 hastalık ilerleyişi ve yanıt açısından bir parametre olarak kullanılabilir. Tedaviye yanıtı olmayan KML hastalarında miR-150 ifade düzeylerinin azalmasının tedavi direnci ile ilişkisinin ek çalışmalarla doğrulanması gereklidir. Yeni tanı grubunda sonuçlar bu durumu doğrulamaktadır. Örnek grupları arasında nilotinib kolundaki ifade düzeyinin azalması istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur (p=0.01541). Bu sonuçların örnek sayısının artırıldığı yeni çalışmalarla desteklenmesi, miR-150 gen ifadesinin tanı anında bakılması ve tedavi sürecinde izlenmesi, ilaç direnci takibi açısından önemli olabilir. KML hastalarında miR-155'nin prognostik belirteç olarak kullanılabilmesi için örnek sayısı artırılmış yeni çalışmalara ihtiyaç vardır. Çünkü miR-155 ifade düzeyi, yeni tanı ile tedavi alan gruplar karşılaştırıldığında, ilk basamak tedavilerle son basamak tedavi arasında kat farklılık bulunmuştur. Yeni tanı ile dasatinib kolunda ise benzer oranlar elde edilmiştir.

Ancak daha sağlıklı veri elde edebilmek için örnek sayısı artırılmış yeni çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Çıkar Beyannamesi

Herhangi bir çıkar çatışmasının olmadığını yazarlar beyan etmektedirler.

Bilgilendirme

Çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL 2018-8012 kodlu bilimsel araştırma projesi ile desteklenmiştir.

Etik Kurul İzni

Bu çalışma için Erciyes Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan onay alındı (26.01.2018 tarih ve 2018/52 sayı).

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyanı

Ana fikir/Planlama: HA, LK. Veri toplama/İşleme: HA, HA, SÖ, LK. Veri analizi ve yorumlama: HA, HA, SÖ. Literatür taraması: HA, HA, LK. Yazım: HA, HA, SÖ. Gözden geçirme ve düzeltme: HA, HA, LK. Danışmanlık: HA, LK.

KAYNAKÇA

1. Karaman A, Medeni ŞS, Sevindik ÖG ve ark. Kronik myeloid lösemi tanılı hastalarımızın retrospektif değerlendirilmesi. DEU Tıp Fak. Der. 2016;30(3):103-112.
2. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia advances in biology and new approaches to treatment. N Engl J Med. 2003;349(15):1451-1464.
3. Sağ ŞÖ. Kronik Miyelositer Lösemilerde Füzyon Gen Kalitatif ve Kantitatif Değerlerinin FISH ve Moleküler Genetik Yöntemlerle Karşılaştırılması. Tıpta Uzmanlık Tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi; 2010.
4. Di Bacco A, Keeshan K, McKenna SL, Cotter TG. Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia: deregulation of cell growth and apoptosis. Oncologist. 2000;5(5):405-415.
5. Ali MA. Chronic Myeloid Leukemia in the Era of Tyrosine Kinase Inhibitors: An Evolving Paradigm of Molecularly Targeted Therapy. Mol Diagn Ther. 2016;20(4):315-333.
6. Sun J, Hu R, Han M, et al. Mechanisms underlying therapeutic resistance of tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. Int J Biol Sci. 2024;20(1):175-181.
7. Younes S, Ismail MA, Al-Jurf R, Ziyada A ve ark. Management of chronic myeloid leukaemia: current treatment options, challenges, and future strategies. Hematology. 2023;28(1):2196866.

8. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet.* 2010;11(9):597-610.
9. Almeida MI, Reis RM, Calin GA. MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutat Res.* 2011;717(1-2):1-8.
10. Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1803(11):1231-1243.
11. Reid G, Kirschner MB, Van Zandwijk N. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2011;80(2):193-208.
12. Etheridge A, Lee I, Hood L, ve ark. Extracellular microRNA: a new source of biomarkers. *Mutat Res.* 2011;717(1-2):85-90.
13. Lujambio A and Lowe SW. The microcosmos of cancer. *Nature.* 2012;482(7385):347-355.
14. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(11):857-866.
15. Cho WC. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Mol Cancer.* 2007;60(6):1-7.
16. Saydam F, Degirmenci İ. Güneş HV. MikroRNA'lar ve kanser. *Dicle Med J.* 2011;38(1):113-120.
17. Rudich A, Garzon R, Dorrance A. Non-Coding RNAs Are Implicit in Chronic Myeloid Leukemia Therapy Resistance. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(20): 12271.
18. Bansal M, Ansari S, Verma M. Role of miRNAs to control the progression of Chronic Myeloid Leukemia by their expression levels. *Med Oncol.* 2024;41(2):55.
19. Seven M, Karatas OF, Duz MB, Ozen M. The role of miRNAs in cancer: from pathogenesis to therapeutic implications. *Future Oncol.* 2014;10(6):1027-1048.
20. Fatica A, Bozzoni I. Role of microRNAs in hematological malignancies. *Expert Rev Hematol.* 2009;2(4): 415-423.
21. Feng YH, Tsao CJ. Emerging role of microRNA-21 in cancer. *Biomed Rep.* 2016;5(4):395.
22. Navabi A, Akbari B, Abdalsamadi M, Naseri S. The role of microRNAs in the development, progression and drug resistance of chronic myeloid leukemia and their potential clinical significance. *Life Sci.* 2022;296:120437.
23. Moris VA, Zhang A, Yang T ve ark. MicroRNA-150 expression induces myeloid differentiation of human acute leukemia cells and normal hematopoietic progenitors. *PLoS One.* 2013;8(9):75815.
24. Yeh CH, Moles R, Nicot C. Clinical significance of microRNAs in chronic and acute human leukemia. *Mol Cancer.* 2016;15(1):1-16.
25. Zhao H, Wang D, Du W, Gu D, Yang R. MicroRNA and leukemia: tiny molecule, great function. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2010;74(3):149-155.
26. Kerscher EA, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(4):259-269.
27. Yurt M, Ayyildiz O, Karakus A, Nursal AF, Isi H. MicroRNAs expression profiles as biomarkers and therapeutic tools in Turkish patients with chronic myeloid leukemia. *Bratisl Lek Listy.* 2020;121(2):159-163.
28. Mirza MAB, Guru SA, Abdullah SM, Rizvi A, Saxena A. microRNA-21 expression as prognostic and therapeutic response marker in chronic myeloid leukaemia patients. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2019;20(8):2379-2383.
29. Pehlivan M. Kronik miyeloid lösemi (KML) hastalarında sFRP1 geninin promotör bölgesinin epigenetik ve genetik değişikliklerinin incelenmesi. *Tıpta Uzmanlık Tezi. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi;*2008.
30. Srutova K, Curik N, Burda P, et al. BCR-ABL1 mediated miR-150 downregulation through MYC contributed to myeloid differentiation block and drug resistance in chronic myeloid leukemia. *Haematologica.* 2018;103(12):2016-2025.
31. Fallah P, Amirizadeh N, Poopak B ve ark. Expression pattern of key micro RNA s in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Int J Lab Hematol.* 2015;37(4):560-568.
32. Flamant S, Ritchie W, Guilhot J ve ark. Micro-RNA response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica.* 2010;95(8):1325-1333.