

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

**MYELOİD KANSERLERDE KEMİK İLİĞİ MİKROÇEVRESİNİN**  
**METABOLİK PROFİLİNİN İNCELENMESİ**

**Asude Bahar ŞAHİN**

**Kök Hücre Programı**

**Yüksek Lisans Tezi**

**ANKARA**

**2024**



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

**MYELOİD KANSERLERDE KEMİK İLİĞİ MİKROÇEVRESİNİN**  
**METABOLİK PROFİLİNİN İNCELENMESİ**

**Asude Bahar ŞAHİN**

**Kök Hücre Programı**

**Yüksek Lisans Tezi**

**ANKARA**

**2024**

**MYELOİD KANSERLERDE KEMİK İLİĞİ MİKROÇEVRESİNİN  
METABOLİK PROFİLİNİN İNCELENMESİ**

**Öğrenci: Asude Bahar ŞAHİN**

**Danışman: Prof. DR. Fatma Visal OKUR**

Bu tez çalışması 31.05.2024 tarihinde jürimiz tarafından “Kök Hücre Bilimleri Programı’ nda” yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Başkanı:**

*Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU*

*Hacettepe Üniversitesi Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü / Analitik Kimya ABD*

**Tez Danışmanı:**

*Prof. Dr. Fatma Visal OKUR*

*Hacettepe Üniversitesi/Kök Hücre Bilimleri ABD*

**Üye:**

*Prof. Dr. Özcan EREL*

*Yıldırım Beyazıt Üniversitesi / Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri/Tıbbi Biyokimya*

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

*Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN*

**Enstitü Müdürü**

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir<sup>(1)</sup>
- ✘ Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir<sup>(2)</sup>
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir<sup>(3)</sup>

Tarih.27/06/2024

(İmza)

Asude Bahar ŞAHİN

“*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir. \* Kurum ve kuruluşlarla yapılan iş birliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

\* Tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

## ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Fatma Visal OKUR danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

*Asude Bahar ŞAHİN*

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana rehberlik eden, her zaman yanımda olan ve bana yalnızca bir danışman değil, adeta bir aile gibi davranan değerli danışmanım Prof. Dr. Fatma Visal OKUR'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Tez yazma sürecimde ve deneylerimde gösterdiği sonsuz destek ve sabır için minnettarım. Hacettepe Üniversitesi'nde başladığım ilk günden itibaren her zaman yanımda olduğu ve beni sürekli motive ettiği için ona ne kadar teşekkür etsem azdır.

Yüksek lisans tezimi yürütürken deneylerimi gerçekleştirmemde büyük destek olan Prof. Dr. Duygu UÇKAN ÇETİNKAYA'ya en içten teşekkürlerimi sunarım. Bize her konuda destek verip, değerli vaktini ayırdığı ve bizlere rehberlik ettiği için minnettarım.

Ayrıca Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne de teşekkür etmek istiyorum. Bana her zaman destek olan ekip arkadaşım Kemal KAYAŞLI'ya, sevgili arkadaşlarım her an yanımda olan ve her konuda destek olan Feride Mürşide ARSLAN ve Sema DUROĞLU'na, ihtiyaç duyduğumda bana yardım eden Dr. Öğr. Gör. Esin ALPDÜNDAR BULUT, Dr. Öğr. Gör. Burcu ÖZÇİMEN ve Dr. Öğr. Üyesi Cansu ÖZDEMİR SAKA'ya teşekkür ederim. Ayrıca, Kök Hücre Merkezi'nde çalışan ve ihtiyacım olduğunda bana destek olan herkese teşekkür ederim. Tezimin tüm süreci boyunca her aşamada destek olan Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU, Dr. Öğr. Üyesi Cemil Can EYLEM ve Dr. Öğr. Üyesi Tuba REÇBER'e teşekkürlerimi sunarım.

Bu akademik yolculukta her daim yanımda olan, beni destekleyen ve bana güç veren aileme en içten teşekkürlerimi sunarım. Özellikle bana sevgileri, sabırları ve fedakârlıklarıyla her zaman yol gösteren anne ve babama, her zor anımda yanımda olan ve beni motive eden abime ve ablama; ayrıca, eniştem ve yeğenlerime de destekleri için minnettarım. Ailemin her bir üyesine, bana verdikleri sonsuz sevgi ve destek için yürekten teşekkür ederim.

## ÖZET

**ŞAHİN A. B., Myeloid Kanserlerde Kemik İliği Mikroçevresinin Metabolik Profilinin İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2024.** Lösemi tanısında, tedavi sonrasında ve relaps/refrakter hastalık durumunda lösemik hücre metabolizmasında izlenen dinamik değişimlerin en iyi göstergesi lösemi nişinin metabolik profilinin çıkarılmasıdır. Bu amaçla, bu projede *in vivo* lösemik nişteki metabolik ortamı en iyi yansıttığı kabul edilen, kemik iliği plazma örnekleri kullanılarak AML hastaları (N=28) ve sağlıklı vericiler (N=15) arasında karşılaştırmalı metabolom analizleri yapılmıştır. Analizler için 3 ana grup oluşturulmuştur. Birinci grupta lösemik hücre kitlesinin kemik iliği nişinin metabolik profilinde neden olduğu değişimleri değerlendirebilmek için AML hasta örnekleri ile sağlıklı verici örnekleri karşılaştırılmıştır. İkinci grupta, tedavi sonrası lösemik hücre kitlesinin temizlenmesi ile kemik iliği metabolik profilindeki değişimi gösterebilmek amacıyla tedavi sonrası ve tedavi öncesi AML örnekleri karşılaştırılmıştır. Üçüncü grupta ise tedavi sonrası AML ve sağlıklı verici örnekleri karşılaştırılarak iyileşen AML hastalarında kemik iliği metabolik profilindeki normale dönüş değerlendirilmiştir. AML hasta örneklerinde öne çıkan metabolitler/lipidler; anlamlı artış gösteren lipid metabolizması ile ilişkili olan; triacylglycerol, sfingolipidler / metabolitleri, fosfolipidler (fosfotidilkolin, fosfoditel ethanolamin, fosfokolin) ve yağ asitleridir. Yine artmış glikoliz ile ilişkili olarak fosfogliserik asit, isomaltoz, laktobionik asit, sitrik asit düzeylerinde anlamlı artış tespit edilmiştir. Ayrıca AML hastalarında sağlıklı vericiler ile kıyaslandığında en çok etkilenen metabolik yolların; galaktoz, gliserofosfolipid ve askorbat/alderat metabolizması ile ilişkili yollar olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, bu çalışma ile AML’de tanı ve tedavi süreçlerindeki lösemik niş ile sağlıklı hematopoietik nişin metabolik profilleri karşılaştırılmış ve aralarındaki belirgin farklılar gösterilmiştir. Bu bulgular lösemik mikroçevrede meydana gelen, lösemi gelişimi/ilerlemesi veya tedavi direnci ile ilişkili olabilecek metabolik değişimlerin genel profilinin çıkarılmasına katkı sağlayacaktır.

**Anahtar kelimeler:** akut myeloid lösemi, lösemik mikroçevre, metabolom, bütünleşik omiks veri analizi



**ABSTRACT**

**ŞAHİN A. B., Investigation of the metabolic profile of the bone marrow microenvironment in myeloid cancers, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Stem Cell Program Master Thesis, Ankara, 2024.** Metabolic profiling of the leukemic niche is the best indicator of dynamic changes in leukemic cell metabolism at leukemia diagnosis, after treatment, and in relapsed/refractory disease. For this purpose, in this project, comparative metabolome analyses were performed between AML patients (N=28) and healthy donors (N=15) using bone marrow plasma samples, which are considered to best reflect the metabolic environment in the leukemic niche in vivo. Three main groups were formed for the analyses. In the first group, AML patient samples were compared with healthy donor samples to evaluate the changes caused by the leukemic cell mass in the metabolic profile of the bone marrow niche. In the second group, post-treatment and pre-treatment AML samples were compared in order to show the changes in the metabolic profile of the bone marrow niche after the clearance of the leukemic cell mass. In the third group, post-treatment AML and healthy donor samples were compared to evaluate the normalization of the bone marrow metabolic profile in recovered AML patients. The prominent metabolites/lipids in AML patient samples were triacylglycerol, sphingolipids/metabolites, phospholipids (phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphocholine), and fatty acids, which are associated with significantly increased lipid metabolism. Significant increases in phosphoglyceric acid, isomaltose, lactobionic acid, and citric acid levels were also found in relation to increased glycolysis. Also, in AML patients compared to healthy donors, the most affected metabolic pathways were found to be those related to galactose, glycerophospholipid, and ascorbate/aldarate metabolism.

**Key words:** acute myeloid leukemia, leukemia microenvironment, metabolomics, integrated omics data analysis

**İÇİNDEKİLER**

ONAY SAYFASI	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SEMBOLLER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xv
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>5</b>
2.1. Akut Myeloid Lösemi	6
2.2. Pediatrik AML	9
2.3. Kemik İliği Mikroçevresi	9
2.3.1. Niş Bileşenleri	13
2.3.2. HKH Nişinin Diğer Hücre ve Elemanları	15
2.3.3. Myeloid Malignitelerde Kemik İliği Mikroçevresi	16
2.3.4. AML'de Kemik İliği Mikroçevresi-Lösemik Niş	17
2.4. Akut Myeloid Lösemi ve Lösemik Hücre Metabolizması	20
2.4.1. HKH'ler, LKH'ler ve Lösemik Blastlar Arasındaki Metabolik Farklılıklar	21
2.4.2. Glikoz Metabolizması	22

2.4.3. Mitokondriyal Metabolizma	24
2.5. Omiks Teknolojileri	29
2.5.1. Genomik	29
2.5.2. Transkriptomik	30
2.5.3. Proteomik	30
2.5.4. Metabolomik	30
2.5.5. Lipidomik	31
2.5.6. Bütünleşik Omiks Analizler	31
2.5.7. Metabolomik ve Lipidomik İlişkisi	31
2.5.8. Metabolomik ve Lipidomik Analizler	32
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>33</b>
3.1. Hasta ve Sağlıklı Verici Seçimi, Biyolojik Örneklerin Alınması	33
3.1.1 Kemik İliği Örneklerinden Plazma Örneği Toplanması	33
3.2. Metabolomik Analizler	34
3.2.1 Örnek Hazırlama	34
3.2.2 GC-MS Temelli Metabolomik Analizler için Türevlendirme	35
3.2.3 LC-qTOF-MS Temelli Lipidomik Analizler	36
3.2.4 Bütünleşik Veri Analizi için Kullanılan İstatiksel Yöntemler	36
<b>4. BULGULAR</b>	<b>39</b>
4.1. Kemik İliği Plazma Örneklerine ait Bütünleşik (Metabolomik ve Lipidomik) Veri Genel Analiz Sonuçları	41
4.2. Kemik İliği Plazma Örneklerine Ait Bütünleşik Veride Tek Değişkenli Analiz Sonuçları	66

4.3. Kemik İliği Plazma Örneklerine Ait Bütünleşik Veride Çok Değişkenli Analiz Sonuçları	68
4.4. Hiyerarşik Kümeleme Analizleri	74
4.5. Plazma Örneklerine ait Biyobelirteç Analizi	77
4.6. Plazma Örneklerine Ait Yolak Analizi	82
4.7. Diğer Alt Gruplar Arasında Yapılan Karşılaştırmalı Bütünleşik Omiks Veri Analizleri	86
4.8. Diğer Alt Gruplar Arasında Yapılan Karşılaştırmalı Bütünleşik Omiks Verilerinin Çok Değişkenli Analizi	89
<b>5. TARTIŞMA</b>	91
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	95
<b>7. KAYNAKLAR</b>	97
<b>8. EKLER</b>	106
8.1. EK-1 Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri	106
8.2. EK-2 Orijinallik Raporu	107
8.3. EK-3 Dijital Makbuz	108
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	109

## SEMBOLLER VE KISALTMALAR

<b>2-HG</b>	2-hidroksiglutamat
<b>AA</b>	Aplastik anemi
<b>AML</b>	Akut myeloid lösemi
<b>AML-</b>	<i>AML -patient-derived xenograft</i>
<b>PDX</b>	
<b>AMPK</b>	<i>AMP-activated protein kinase</i>
<b>ASXL1</b>	<i>ASXL transcriptional regulator 1</i>
<b>Bcl-2</b>	B-hücreli Lenfoma 2
<b>c-MPL</b>	<i>(C-mannosylation of thrombopoietin receptor)</i>
<b>c-MYC</b>	<i>MYC proto-oncogene, bhlh transcription factor</i>
<b>CEBPA</b>	Ccaat/arttırıcı bağlanma protein alfa
<b>CFU-F</b>	Fibroblast kolonisi yapan ünit
<b>CXCL12</b>	<i>C-X-C motif chemokine ligand 2</i>
<b>FAB</b>	Fransız-Amerikan-İngiliz sınıflandırması
<b>FADH<sub>2</sub></b>	Flavin Adenin Dinükleotid Hidrojen
<b>FLT3</b>	<i>Fms related receptor tyrosine kinase 3</i>
<b>G-CSF</b>	Granülosit koloni stimüle edici faktör
<b>GC-MS</b>	<i>Gas chromatography-mass spectrometer</i>
<b>Gln</b>	Glutamin
<b>GSH</b>	Glutatyon
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Hipoksi-uyarımlı faktör 1 alfa
<b>HIF-2 <math>\alpha</math></b>	Hipoksi-uyarımlı faktör 2 alfa
<b>HKH</b>	Hematopoetik kök hücre
<b>HKHT</b>	Hematopoietik kök hücre transplantasyonu
<b>HKPH</b>	Hematopoetik Kök ve Progenitör Hücreler
<b>HOXA3</b>	<i>Homeobox A3</i>
<b>HOXA5</b>	<i>Homeobox A5</i>
<b>HOXB6</b>	<i>Homeobox B6</i>
<b>ISCT</b>	Hücre ve Gen Tedavisi için Uluslararası Topluluk
<b>JMML</b>	Juvenil myelomonositik lösemi

<b>KHF</b>	Kök hücre faktörü
<b>Kİ</b>	Kemik iliği
<b>KİM</b>	Kemik iliği mikronişi/mikroçevresi
<b>KML</b>	Kronik myeloid lösemi
<b>LBH</b>	Lösemi başlatıcı hücreleri
<b>LC- qTOF- MS</b>	<i>Liquid chromatography in combination with hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry</i>
<b>LDHA</b>	Laktat Dehidrogenaz A
<b>LKH</b>	Lösemik kök hücre
<b>MDS</b>	Myelodisplastik sendrom
<b>MKH</b>	Mezenkimal kök hücreler
<b>MKH</b>	Minimal kalıntı hastalık
<b>MLL</b>	<i>Mixed Lineage Leukemia</i>
<b>MPN</b>	Myeloproliferatif neoplazm
<b>MSH</b>	Mezenkimal stromal hücreler
<b>mTOR</b>	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
<b>NADH</b>	Nikotinamid adenin dinükleotid
<b>NADPH</b>	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
<b>NPM1</b>	Nükleofosmin 1
<b>OPN</b>	Osteoponin
<b>PCA</b>	Temel bileşenler analizi
<b>PF4-</b>	Trombosit faktörü 4
<b>CXCL4</b>	
<b>PK</b>	Periferik kan
<b>PKM2</b>	<i>Pyruvate kinase M2</i>
<b>PLS-DA</b>	Kısmi en küçük kareler farklılaştırma analizi
<b>PTPN11</b>	Protein tirozin fosfataz, non-reseptör tip 11
<b>QC</b>	Kalite Kontrol
<b>RAR<math>\gamma</math></b>	Retinoik asit reseptör gamma
<b>RB1</b>	Retinoblastoma
<b>ROC</b>	<i>Receiver Operating Characteristic</i>

<b>ROS</b>	Reaktif oksijen türleri
<b>RUNX1</b>	<i>Runt-related transcription factor 1</i>
<b>SBDS</b>	Shwachman bodian -diamond sendromu
<b>SLC1A5</b>	<i>Solute carrier family 1 member 5</i>
<b>SLC2A</b>	<i>Solute carrier family 2 member A</i>
<b>TCA</b>	Tri-karboksilik asit
<b>TGF<math>\beta</math>1</b>	Dönüştürücü Büyüme Faktörü beta 1
<b>THD</b>	Türk hematoloji derneği
<b>TP53</b>	Tümör protein 53
<b>TPO</b>	Trombopoetin
<b>VIP</b>	<i>Variable Importance in Projection</i>
<b>WHO</b>	Dünya sağlık örgütü
<b>YAO</b>	Yağ asidi oksidasyonu
<b>YAS</b>	Yağ asidi sentetaz

## ŞEKİLLER

Şekiller		Sayfa
2.1	Normal kemik iliği mikroçevresi.	12
3.1	Kemik iliği örneklerinden plazma örneği ayrılması	34
3.2	Metabolomik ve Lipidomik analizler için örneklem hazırlanma aşamaları	35
4.1	Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 için yapılan karşılaştırmalı analizlerde grup spesifik ve gruplar arası paylaşılan ortak metabolitlerin gösterildiği Venn Diyagramı	63
4.2	Grup 1 için Kemik iliği plazma örneklerinden elde edilen bütünleşik omiks verilerine ait Volkan grafiği	66
4.3	Grup 2 için Kemik iliği plazma örneklerinden elde edilen bütünleşik omiks verilerine ait Volkan grafiği	67
4.4	Grup 3 için plazma örneklerinden bütünleşik omiks verilerine ait Volkan grafiği	68
4.5	Grup 1 için Kemik iliği plazmalardan elde edilen bütünleşik omiks verilerine ait PCA skor grafiği	69
4.6	Grup 2 için Kemik iliği plazmalardan elde edilen bütünleşik omiks verilerine ait PCA skor grafiği	70
4.7	Grup 3 için Kemik iliği plazmalardan elde edilen bütünleşik omiks verilerine ait PCA skor grafiği	71
4.8	Grup 1 için kemik iliği plazma örneklerinden elde edilen bütünleşik omiks verilerine ait. PLS-DA skor grafiği, B. VIP grafiği.	72
4.9	Grup 2 için kemik iliği plazma örneklerinden bütünleşik omiks verilerine ait grafikler. A. PLS-DA skor grafiği B. VIP grafiği	73
4.10	Grup 3 için plazma örneklerinden bütünleşik omiks verilerine ait grafikler. A. PLS-DA skor grafiği, B. VIP grafiği.	74
4.11	Grup 1 için plazma örneklerinden bütünleşik omiks verilerine ait ısı haritası analizi	75
4.12	Grup 2 için plazma örneklerinden bütünleşik omiks verilerine ait Isı haritası analizi	76
4.13	Grup 3 için plazma örneklerinden bütünleşik omiks verilerine ait Isı haritası analizi	77
4.14	Grup 1 için kemik iliği plazma örneklerine ait çok değişkenli ROC eğrisi tabanlı keşif analizi eğrileri	79
4.15	Grup 2 için kemik iliği plazma örneklerine ait çok değişkenli ROC eğrisi tabanlı keşif analizi eğrileri	80
4.16	Grup 3 için kemik iliği plazma örneklerine ait çok değişkenli ROC eğrisi tabanlı keşif analizi eğrileri	81
4.17	Grup 1: sağlıklı verici grubuna karşı AML (yeni tanı-relaps) hastalarına ait yolak analizi etki grafiği.	83
4.18	Grup 2: tedavi sonrası remisyona giren AML hastalarına karşı henüz tedavi almamış olan AML (yeni tanı-relaps) hastalarına ait yolak analizi etki grafiği	84
4.19	Grup 3: sağlıklı verici grubuna karşı tedavi sonrası remisyona giren AML hastalarına ait yolak analizi etki grafiği	85
4.20	Diğer alt gruplarda metabolom sonuçlarının Venn Diyagramı ile karşılaştırılması.	86
4.21	Diğer alt gruplar için PLS-DA skor grafikleri	89



**TABLULAR**

<b>Tablo</b>		<b>Sayfa</b>
<b>2.1</b>	FAB sınıflamasına göre AML alt tipleri	<b>7</b>
<b>4.1</b>	Grup 1 bütünleşik omiks verisi ile tanımlanan metabolitler ve istatistiksel analiz sonuçları	<b>41</b>
<b>4.2</b>	Grup 2 bütünleşik omiks verisi ile tanımlanan metabolitler ve istatistiksel analiz sonuçları	<b>49</b>
<b>4.3</b>	Grup 3 bütünleşik omiks verisi ile tanımlanan metabolitlerin ve istatistiksel analiz sonuçları	<b>56</b>
<b>4.4</b>	Grup 1-2-3 spesifik metabolitler	<b>64</b>
<b>4.5</b>	Diğer alt gruplarda bütünleşik omiks verisinin Venn Diyagramı ile karşılaştırılmasından elde edilen grup spesifik metabolitleri	<b>87</b>

## 1. GİRİŞ

Akut myeloid lösemi (AML) ve diğer myeloid kanserler (myelodisplastik sendrom-MDS, juvenil myelomonositik lösemi-JMML, kronik myeloid lösemi - KML) myeloid öncül hücrelerin anormal proliferasyonu sonucu gelişen, moleküler ve genetik heterojenitesi yüksek olan kanserlerdir (1). Bu çalışma kapsamında myeloid lösemiler için bir model olarak incelenecek olan akut myeloid lösemisinin karakteristik özelliği kemik iliğindeki (Kİ) hematopoietik kök/öncül hücrelerde biriken genetik ve epigenetik değişimler sonucu myeloid öncül hücrelerin anormal klonal proliferasyonu ile sağlıklı hematopoezin baskılanmasıdır. Bunun sonucu olarak hastalarda ciddi sitopeniler ile başlayan klinik tablo tedavi edilmediği takdirde ölümcül kemik iliği yetmezliğine ve ağır enfeksiyonlara neden olmaktadır (2). Risk sınıflamasına göre uygulanan çoklu ilaç kemoterapi uygulamaları ve yüksek riskli hastalara yapılan allojeneik hematopoietik kök hücre transplantasyonu (HKHT) ile hastaların büyük kısmında morfolojik remisyon elde edilmesine rağmen, hastaların hala %30'undan fazlasında relaps (nüks) ve/veya refrakter (dirençli) hastalık gelişmektedir (3). Farklı yaş gruplarındaki hasta kohortlarının karşılaştırıldığı araştırmaların sonuçları, hastalık fenotiplerindeki ve lösemi alt tiplerindeki benzerliklere rağmen AML moleküler profillerinin ve biyolojik özelliklerinin yaş ile birlikte önemli ölçüde değiştiğine işaret etmektedir. Ayrıca tedavi süreçleri sonrası kalan rezidüel lösemik hücrelerin veya relaps hastalık durumunda yeni ortaya çıkan lösemik hücrelerin klonal evaluasyonu sonucu moleküler özelliklerinin de değiştiği, ve ciddi tedavi direnci tablosunun geliştiği düşünüldüğünde tanı anındaki moleküler profillemeye dayalı tedavi rejimlerinin ya da yeni hedefe yönelik tedavilerin özellikle yüksek riskli hastalarda yetersiz kaldığı görülmektedir ve bu hastaların tedavisi için önerilebilecek etkinliği kanıtlanmış kesin tedavi önerileri hala mevcut değildir (4). Özellikle lökomogenez ve relaps/refrakter hastalık gelişiminden sorumlu tutulan lösemik kök hücrelerin (LKH) hedeflendiği tedaviler ile lösemisinin tamamen iyileştirilmesi mümkün olabileceği ön görülmektedir. Ancak lösemik kök hücrelerin karakterizasyonu ve biyolojik davranış özelliklerinin belirlenmesi sağlayacak kanıtlanmış ve kabul görmüş bilimsel veriler hala yeterli düzeyde olmadığından bu hücrelerin genellikle lösemik hücreyi hedefe koyan konvansiyonel veya yenilikçi tedavilere ile eradike edilebilmesi henüz mümkün gözükmemektedir(5). Myeloid lösemilerde allojeneik HKHT sonuçlarının diğer

hematolojik kanserlere kıyasla kısmen iyi oluşu, AML'nin immün regülatuar tedavilere yanıt verme potansiyelinin iyi olacağı beklentisini oluşturduğu için AML hastalarında yeni immünoterapi uygulamalarının (bispesifik monoklonal antikorlar, immün checkpoint inhibitörleri, genetik olarak modifiye edilen kanser antijen-spesifik adoptif T ve NK hücre tedavileri) tek olarak ya da diğer tedaviler ile kombine edilerek etkinliğinin araştırıldığı çok sayıda prelinik ve klinik araştırma devam etmektedir (6). Prelinik ve klinik araştırmalar, AML ve MDS başta olmak üzere myeloid kanserlerde konvansiyonel tedavilere, tekli veya kombine yeni hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarına rağmen tedavi yanıtlarının kısa süreli ve kısıtlı olduğunu ve allojeneik nakil sonrası bile hastalık relapsı gelişebildiğini göstermektedir. Bu alandaki güncel araştırmaların sonuçları lösemik mikroçevrenin, lösemi gelişimindeki rolünün yanı sıra direnç gelişimindeki rolünün de araştırılması gerekliliğini gündeme getirmiştir. Lösemik hücre etkisiyle (hücreler arası etkileşimler ve/veya lösemik hücre sekretomu) kemik iliği mikroçevresindeki mezenkimal kök hücreler (MKH) başta olmak üzere diğer stromal hücreler (osteojenik öncül hücreler, adipositler, endotel ve sinir hücreleri), lösemi hücresinin yaşaması ve devamlılığı için gerekli yolakların aktifleşmesine, metabolik değişimlere ve immün kaçış mekanizmalarının gelişimine katkıda bulunarak bir anlamda kemik iliği mikroçevresinin (niş) yeniden programlanmasına; lösemik hücre varlığını destekleyen ve normal hematopoezi baskılayan bir hale gelmesine yol açarlar (7, 8). Dolayısı ile lösemik mikroçevredeki farklı stromal hücrelerin bu mekanizmaların gelişiminde oynadıkları rollerin ve hücreler arası etkileşimin neden olduğu fonksiyonel sonuçların detaylı araştırılması, tedavi direnci gelişim sürecinin daha iyi anlaşılmasını sağlayarak lösemik mikroçevreninde hedeflendiği, etkinliği daha yüksek olan kombinasyon tedavilerinin geliştirilmesinin yolunu açacaktır. Lökomogenez sürecinde hematopoitik öncül hücrelerde driver mutasyonların birikimi klonal evaluasyona neden olurken, lösemik hücreler ile stromal hücreler arasındaki simbiotik ilişki mezenkimal hücre kökenli stromal hücrelerde gelişen genetik değişimlerin de (Dicer 1, Wnt/ $\beta$ - katenin, SBDS (Shwachman–Diamond–Bodian) ve PTPN11 mutasyonları) genotoksik stres mekanizmalarının aktivasyonuna yoluyla lösemi başlatıcı etki gösterebildiği *in vivo* myeloid kanser fare modellerinde (MDS, AML, myeloproliferatif hastalıklar, JMML) yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (9-12). MKH'deki bu genetik değişimlerin lösemi

başlatıcı rolünün, insan örnekleri ile yapılacak prelinik çalışmalarla kanıtlanması gerekmektedir. Diğer yandan, lösemik hücrelerin metabolik stresten ve immün sistem taramasından kaçıp varlıklarını sürdürebilmeleri ve kemorezistan hale gelebilmeleri için Kİ nişi lösemi lehine dinamik bir değişim geçirmektedir. Bu yeniden düzenlenme sürecinde, nişin temel stromal hücre bileşeni olan MKH'ler de lösemik hücreler ile karşılıklı etkileşim sonucu sekresyon ve yüzey belirteç profillerini değiştirerek lösemik hücre varlığını ve tedavi direncini destekleyen disfonksiyonel bir hücre grubu özelliği kazanmaktadırlar. Son yıllarda hedefe yönelik moleküler ve adoptif hücre sel immünoterapi yaklaşımlarının klinik uygulamadaki artan önemi bu yenilikçi tedavilerin etkinliğini artırılması, direnç oluşumun önlenmesi ve kişiye özel hale getirilebilmesi için lösemik mikroçevre modifikasyonunun önemi ortaya çıkarmıştır. Özellikle AML hastalarında farklı genetik varyasyonların varlığı (FLT3 -*Fms related receptor tyrosine kinase3*, c-Myc, ve RAS ilişkili genetik varyasyonlar gibi), farklı hastalık evresi (yeni tanı veya relaps/refrakter hastalık) veya uygulanan tedaviler lösemik hücre metabolizmasında lösemi hücre sine yaşamsal avantaj sağlayıcı ve kemorezistans gelişimine neden olan dinamik değişimlere (artmış glikoliz, glutaminoliz, lipid biyosentezi, mitokondriyal biyogeneze) neden olmaktadır (13). Bu nedenle lösemik hücre metabolizmasındaki değişimler ve bunların tedavi direnç mekanizmaları ile ilişkilendirilmesi giderek daha fazla ilgi çeken bir araştırma alanı haline gelmiştir. Ancak Kİ-MKH'lerinin lösemi hücrelerinin artmış enerji ihtiyaçlarının karşılanmasında ve gelişen oksidatif stresin ortadan kaldırılmasındaki rolünün irdelendiği insan örnekleri ile yapılan çalışmaların sayısı sınırlıdır (14). Ayrıca lösemik hücrelerin artmış metabolik aktivitesi ve değişen metabolik profilleri nedeniyle ortamdaki temel enerji kaynağı besin moleküllerin hızlı tüketimi ve metabolik atıkların birikimi özellikle anti-lösemik yanıtın gelişimi için gerekli olan immün hücrelerin metabolizması değiştirerek, immün hücre disfonksiyonuna yol açmaktadır. Böylece lösemi gelişimini veya tedaviye dirençli lösemik klonların ortaya çıkmasını destekleyici immüsupresif niş ortamı gelişmektedir (15). Lösemi tanısında, tedavi sonrasında ve relaps/refrakter hastalık durumunda lösemik hücre metabolizmasında izlenen dinamik değişimlerin en iyi göstergesi lösemi nişinin metabolik profilinin çıkarılmasıdır. Bu amaçla, projemiz kapsamında *in vivo* lösemik nişteki metabolik ortamı en iyi yansıttığı kabul edilen, kemik iliği plazma örnekleri

kullanılarak karşılaştırmalı metabolom analizleri yapılması planlanmıştır. Bu şekilde lösemik mikroçevrede meydana gelen, lösemi gelişimi/ilerlemesi veya tedavi direnci ile ilişkili olabilecek metabolik değişimlerin genel profilinin çıkarılması hedeflenmiştir. Farklı hastalık evrelerinde (tanı, remisyon ve relaps) yapılacak metabolik niş profillemesi sayesinde mevcut konvansiyonel veya immünoterapötik yaklaşımların etkinliğini artırıcı yeni metabolik hedeflerin tespit edilmesi amaçlanmaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Yeni araştırma sonuçları hematopoietik mikroçevrenin sağlıklı hemataopoezin devamı ve regülasyonu yanında hematolojik kanserlerin gelişiminde, ilerlemesinde, konvansiyonel kemoterapi ve hatta immünoterapi gibi yenilikçi hedefe yönelik tedavilere karşı direnç gelişiminde de kritik rol oynadığını göstermektedir. Dolayısı ile lösemik mikroçevrenin farklı bileşenlerinin detaylı analizi ve bu bileşenler ile ilişkili tedavi direnç mekanizmalarının anlaşılması, lösemi eradikasyonunu sağlayacak yeni hedefe yönelik, kişiye/hastalığa özel terapötik yaklaşımların geliştirilmesini sağlayacaktır. Lökomogenez sürecinde hematopoietik kök/öncül hücrelerde biriken genetik/epigenetik değişimler malign transformasyona neden olurken, kemik iliği mikroçevresi de lösemi gelişimini/yayılımını destekleyecek yönde yeniden düzenlenir. Kemik iliği mikroçevresinin temel stromal hücre grubu olan ve diğer stromal hücre gruplarını (osteoprogenitör hücreler, adipositler, fibroblastlar) öncül hücresi olan MKH'ler lösemi gelişimi ve tedavi süreçleri ile birlikte değişim gösteren bu yeniden düzenlenme mekanizmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Tümör biyolojisinin temel ayırt edici özelliklerinden biri tümör hücresinin metabolik olarak yeniden programlanmasıdır. Farge ve ark. başta olmak üzere farklı gruplar tarafından, lösemik hücrenin metabolik yeniden programlanma mekanizmalarının aydınlatılmasına yönelik yapılan araştırmaların sonuçları lösemik kök hücrelerin ve kemorezistan lösemik hücrelerin mitokondriyal oksidatif fosforilasyona bağımlı olduğunu ve yağ asitlerini enerji kaynağı olarak tercih ettiklerini göstermektedir (13, 16, 17). AML hasta örnekleri kullanılarak yapılan metabolik analizler farklı AML subtiplerinde, lösemik hücrelerin köken aldıkları myeloid öncül hücre farklılaşma evreleri ile ilişkili farklı metabolik profiller gösterdiği, 2-hidroksiglutamat (2-HG), glutasyon (GSH), glutamin (Gln), ve bazı lipid metabolitlerinin AML prognozu ile ilişkili olduğu bulunmuştur (18). Bu araştırmaları takiben yapılan klinik araştırmalarda ise relaps/refrakter myeloid lösemi tedavisinde iyi sonuçlar veren hipometilasyon ajanlarının (azasitidin) ve B-hücreli lenfoma 2 (Bcl2) inhibitörlerinin (venotoklaks) enerji metabolizmasını hedefleyerek lösemik kök hücre eradikasyonunu sağladığını kanıtlamıştır (19). Lösemik hücrelerin metabolik yeniden programlanması ile ilgili çalışmalar genellikle lösemik hücre metabolizması odaklıdır ve *in vitro* deneylerin sonuçlarının teyit edilmesi için *in vivo* lösemik fare modelleri kullanılmaktadır. Oysa

tıpkı hematopoietik kök/öncül hücreler gibi lösemik hücre ve lösemik kök hücrelerinde varlıklarını sürdürebilmeleri ve tedavi dirençli hale gelebilmeleri için lösemik hücre lehine önemli ölçüde değişim geçirmiş olan kemik iliği nişine ihtiyaçları vardır. Mikroçevrenin, lösemik hücre varlığını destekler yönde değişimini sağlayan temel mekanizmalardan biri stromal hücrelerin dinamik lösemik hücre metabolizmasını desteklemesi ve lösemik hücreleri oksidatif hasar yüküne ve hipoksiye karşı korumasıdır. Forte ve ark.'nın Nestin<sup>+</sup> MKH'lerin AML gelişimi ve konvansiyonel kemoterapi direnci ile ilişkisini araştırmak için *in vivo* lösemik fare modeli ile yaptıkları çalışmada MKH'lerin lösemik hücrelerde oksidatif metabolizmayı destekleyerek ve GSH ilişkili antioksidan mekanizmalar ile hücre içi ROS düzeylerinin dengelenmesini sağlayarak lökomogeneze ve kemoterapi direncine katkıda bulunduğunu göstermektedir (14). Bu proje kapsamında lösemik hücre odaklı ve hücredeki metabolik değişimler ile hastalık prognozu ve/veya tedavi yanıtları ile ilişkisini tanımlayarak yeni biyolojik belirteçlerin bulunmasını hedefleyen bu alanda yapılan diğer araştırmalardan farklı olarak lösemik nişteki metabolik değişimlerin bütünden parçaya doğru bir yaklaşım izlenerek değerlendirileceği proje dizaynı ile *in vivo* ortamdaki dinamik metabolik değişimlerin genel bir profili çıkarılacaktır. Projemiz bu yönüyle özgün değer taşımaktadır.

### 2.1. Akut Myeloid Lösemi

Akut myeloid lösemi, kemik iliğindeki myeloid öncül hücrelerin kontrolsüz biçimde çoğalması, kemik iliğinde ve periferik kanda (PK) birikmesi olarak tanımlanan bir hematolojik kanserdir (20). Fransız-Amerikan-İngiliz (FAB) sınıflama sistemine göre AML'nin farklı morfolojik özellikler taşıyan ve farklı myeloid öncüllerden köken alan alt tipleri bulunmaktadır (Tablo 2.1). Kemik iliğindeki hematopoietik kök/öncül hücrelerde meydana gelen ve biriken genetik ve epigenetik bozukluklar; myeloid öncül hücrelerin hematopoietik farklılaşmanın değişik evrelerinde farklılaşma süreçlerinin duraksamasına, kontrolsüz proliferasyon yetkinliği elde etmelerine yol açar ve böylece myeloid öncül hücreler malign transformasyona uğrayarak klonal özellik kazanırlar. (18).

**Tablo 2.1.** FAB sınıflamasına göre AML alt tipleri

Alt Tipi	Adı
M0	Diferansiye olmamış akut myeloblastik lösemi
M1	Minimal matürasyon gösteren akut myeloblastik lösemi
M2	Matürasyon gösteren akut myeloblastik lösemi
M3	Akut promiyelositik lösemi (APL)
M4	Akut myelomonositik lösemi
M4 eos	Eozinofilik akut myelomonositik lösemi
M5	Akut monositik lösemi
M6	Akut eritroid lösemi
M7	Akut megakaryoblastik lösemi

AML yalnızca lösemik hücre morfolojisiyle değil bunun yanında lösemik hücrelerin genetik profillemeleri ve immunofenotiplerine bakılarakta sınıflandırılmaktadır. (Dünya Sağlık Örgütü-WHO sınıflandırması). Buna göre AML dört ana gruba ayrılmaktadır (21). Bu gruplar t(6;9), t(16;16), inv(16) t(8;21) şeklinde inversiyonlar veya translokasyonların varlığı ile veya myelodisplastik özellikler gibi belli genetik bozukluklarla tanımlanmaktadır. ASXL1, RUNX1, TP53 FLT3, gibi AML patogenezinde kritik rol oynayan belirli genlerde meydana gelen mutasyonlar hastalığın gidişatı ile ilgili önemli ön verileri sağlayabilmektedir.



Bundan dolayı tanı anındaki AML risk sınıflandırmasını ve alt tiplerini bilmek hastalığın ilerleyiş sürecini öngörebilmek ve uygun tedavinin seçilebilmesi için çok önemlidir. Çoklu kemoterapötik ajan kombinasyonlarını içeren ilaç tedavileri pediatrik ve yetişkin AML tedavisindeki genel tedavi uygulamasıdır. Patogeneze bağlı olarak AML iki kategoriye ayrılabilir: primer ya da *de novo* AML ve sekonder ya da tedaviye bağlı gelişen AML. Sekonder AML, diğer kanserlerin (sarkomlar, lenfoma ve diğer hematolojik kanserler gibi) tedavi sürecinde uygulanan radyoterapi/kemoterapi maruziyetinden sonra gelişebilmektedir. Bu durum bütün AML vakalarının %5-15'ini teşkil etmektedir. De novo AML ise daha öncesinde herhangi bir maruziyet olmadan meydana gelen primer AML tipidir (22). AML hastalarında hastalık spesifik genetik varyasyonların tespit edilebilmesi ileri moleküler analiz teknolojileri sayesinde mümkün hale gelmiştir. Ve bilinen genetik varyasyonların varlığına göre AML hastaları hastalık prognozuna (tedavi yanıtı, nüks hastalık riski) göre erken dönemde hastalık-risk gruplarına ayrılarak, uygun yoğunlukta tedaviler almaktadırlar. Pediatrik AML hastalarında tanımlanmış olan üç somatik mutasyon (CEBPA, NPM1, FLT3) hastalık prognozu ve tedaviye yanıt açısından önemli göstergelerdir (23). Yüksek nüks oranları ve kötü tedavi sonuçları FLT3 mutasyonları ile, CEBPA mutasyonları ise iyi hastalık prognozu ile ilişkilendirilmektedir. FLT3 mutasyonları pediatrik AML hastalarının %15'inde, CEBPA mutasyonları pediatrik AML hastalarının %5'inde tespit edilmektedir (2, 23). Fanconi Aplastik Anemisi, Down sendromu, Kostmann Sendromu, Klinefelter Sendromu, Diamond Blackfan anemisi, nörofibromatoz gibi bazı kansere yatkınlık sendromlarında, hastaların AML/MDS geliştirme riskleri artmaktadır. %80 oranında AML hastalarında klonal kromozomal anormallikler bulunur. Genel olarak AML hastaları için %75-80 oranında hastalık remisyon oranları bildirilmiş olsa bile, yüksek nüks riski sebebiyle gerçek sağ kalım oranı ortalama %55-65'tir (24, 25). AML genetik ve biyolojik özellikleri dolayısı ile hücre davranış paternleri birbirinden farklı olan lösemik hücre subklonları içeren son derece heterojen bir lösemidir. Lösemik hücrelerin bu heterojenliği, hem hastalık tanı/izleminde hem de lösemi tedavisinde ciddi zorluklara neden olmaktadır. Ayrıca tedaviyi takiben nüks eden AML hastalarında lösemik hücrenin daha dirençli hale gelmesine neden olan klonal evölüsyon gelişmekte ve bu durum tedavi olasılığını daha da düşürmektedir (26).

## 2.2. Pediatrik AML

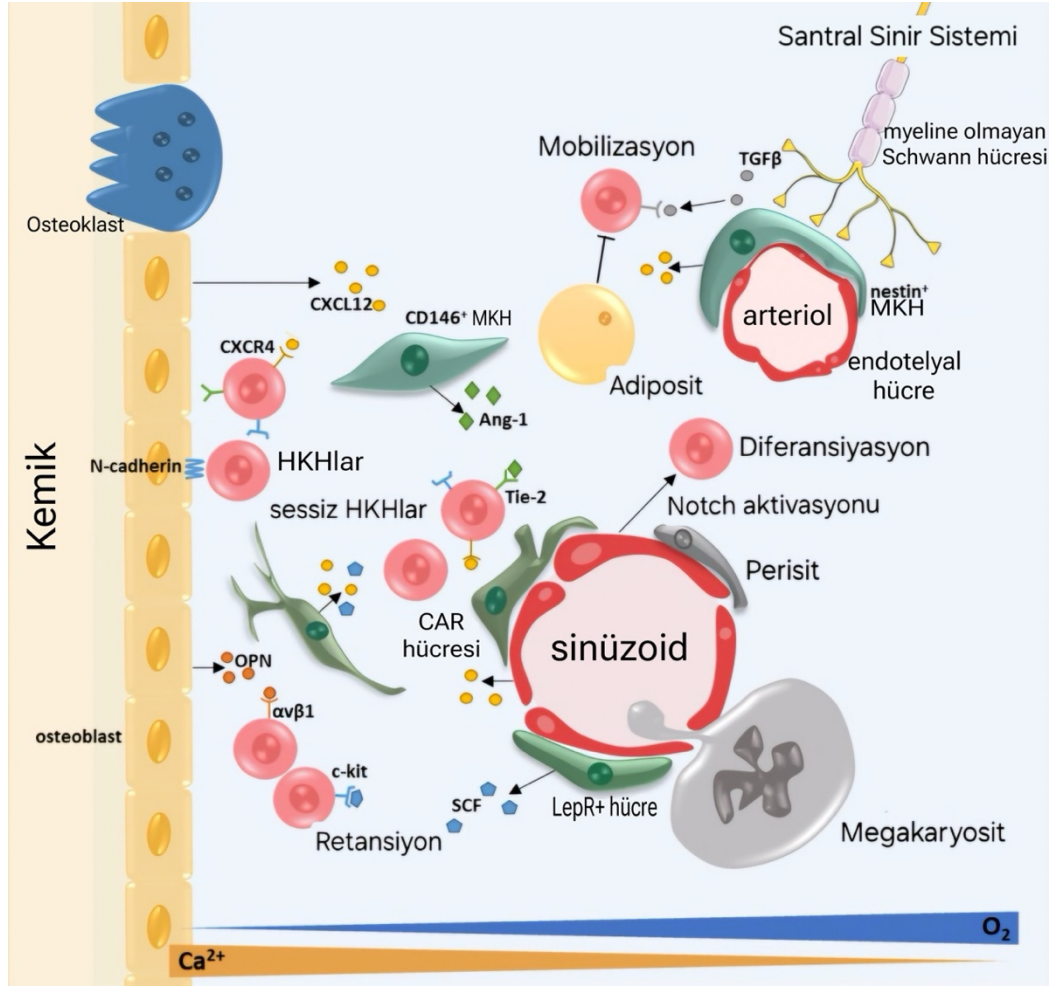
Erişkin ve pediatrik AML hastalarında lösemik hücrelerin genetik/epigenetik özellikleri dolayısı ile lökomogenez mekanizmaları ve lösemik hücrenin biyolojik davranış paternleri oldukça farklıdır. Türk Hematoloji Derneği (THD) tarafından rapor edilmiş veriler ışığında pediatrik ve adolesan AML, tüm çocukluk çağı lösemi vakalarının yaklaşık %15-20' sini oluşturmaktadır. Her yıl ortalama 1200-1500 yeni lösemi vakası 16 yaşın altındaki çocuklarda teşhis edilmektedir. Lösemi çocukluk ya da ergenlik döneminde her yaşta ortaya çıkabilir fakat en sık 2 ile 5 yaş aralığındaki çocuklarda tespit edilmiştir. Yaş, ırk, tanı anındaki ağırlık ve genetik yatkınlık gibi değiştirilemeyen hasta özellikleri AML'li çocuklar için hastalık tedavi sonuçları etkilemektedir. Hastalık risk grubuna dayalı yoğun kemoterapi uygulamaları ve destekleyici bakım ile çocuklarda iyi tedavi sonuçları elde edilebilirken, genç yetişkinler ve ergenlerde tedaviye bağlı morbidite, mortalite oranları ve hastalık nüks oranları yüksektir (27-29). Tanı anındaki bazı hasta ve hastalık ilişkili özellikler örneğin; tanı anındaki periferik kan lökosit sayısı, lösemi alt grubu, tanı yaşı, kemik iliği dışında hastalık tutulumu varlığı hastalık prognozu ile ilgili önemli belirteçler olarak halen kullanılmaktadır. Ayrıca indüksiyon kemoterapisine verilen yanıt değerlendirilmesinde lösemik hücrelerin tedavi duyarlılığı ve hastalık prognozu açısından oldukça bilgi vericidir (29, 30). Lösemik hücrelerin tanı anındaki moleküler ve sitogenetik özelliklerine dayanılarak geliştirilen hastalık risk sınıflaması genel tedavi şemalarını belirlemede temel rol oynamaktadır. Tedavi sürecinde ise tedavi yanıtlarının izlenmesi ve nüks hastalık erken tanısı için moleküler / sitogenetik ve/veya immünofenotipik profillemeye yolu ile yapılan minimal kalıntı hastalık (MKH) tespiti son derece önemlidir ve MKH tedavi sürecindeki hastalarda risk grubunun yükseltilmesini ve tedavi yoğunluğunun ayarlanmasını mümkün kılan önemli bir prognostik belirteçtir.

## 2.3. Kemik İliği Mikroçevresi

Kemik iliğindeki hematopoetik kök hücre (HKH) mikroçevresi “kemik iliği nişi” olarak isimlendirilmektedir. Kemik iliği Nişi (hematopoietik niş); progenitör ve HKH'lerin çoğalması, kendini yenileme, farklılaşma ve migrasyonunu, aynı zamanda devamlılığını ya da hasara cevabı kontrol ederek hematopoetik homeostazi

sağlamaktadır (31). Son derece dinamik ve komplike bir yapısı olan niş, normal kan hücresi üretimini sağlamak için yapısal ve fonksiyonel birçok mekanizmayı regüle etmektedir (32, 33). Hematopoetik (lenfoid ve myeloid hücreler) ve hematopoetik olmayan (mezenkimal kök/stromal hücreler, endotelial hücreler, adipositler) hücreler kemik iliği nişinin hücrel bileşenlerini oluşturmaktadırlar (34). HKH'ler bütün kan hücrelerini yeniden oluşturabilme potansiyeline sahip multipotent kök hücrelerdir. HKH'lerin bu özelliği ilk defa Till ve McCulloch tarafından yapılan araştırmaların sonuçları ile kanıtlanmıştır. Farklı *in vivo* ve *in vitro* fonksiyonel analizler ile HKH'lerin varlığı ve farklılaşma potansiyelleri gösterilebilmektedir. Kemik iliği nişi moleküler, selüler ve asellüler bileşenleri sayesinde HKH'lerin kendini yenileme idame ettirme, farklılaşma ve mobilizasyon gibi yeteneklerini düzenler. Kemik iliği mikroçevresinde hematopoietik kök /öncül hücreler ile stromal hücreler arasında ve hücreler ile ekstraselüler matris elemanları arasında son derece kompleks ve değişken bir etkileşim mevcuttur. Kemik iliği homeostazında, dış uyaranlara uygun hematopoietik yanıtların gelişiminde ve dolayısı ile HKH kaderinin belirlenmesinde önemli rol oynayan nonhematopoietik hücre grupları olarak; mezenkimal kök/stromal hücreler, endotel hücreler, perisitler, megakaryositler, adipositler, sinir sisteminin destek hücreleri, sempatik sinir lifleri, immün sistem hücreleri (T, B lenfositler, monosit/makrofajlar) sayılabilir (Şekil 2.1). Kemik iliği nişi için genellikle endosteal ve vasküler niş olmak üzere iki niş bileşeninden bahsedilir. Bu nişler kemik içine sıkıca bağlıdır. Dinamik olan HKH nişleri fizyolojik taleplere cevap verme özelliğine sahiptir. HKH'lerin endosteuma yakınlığı arttıkça dinlenme durumu da artar. Kemik iliğinin merkezinde bulunan HKH'ler proliferatif özelliktedir. Kemiğe yakın konumlanan endosteal niş HKH'lerin dinlenme durumunun ana belirleyicisidir. Endosteal niş bölgesindeki osteoblastlar (endosteal kemik bölgesi yüzeyinde bulunur) ve osteoblastik progenitörler bu konudaki gerekli düzenlemeyi sağlarlar. Osteoblast hücreleri sayesinde HKH'ler teşvik edilir ve Notch aktivasyonu sağlayarak işlevselliğe katkıda bulunurlar. Notch inhibe olduğunda ise endostealde bulunan HKH'ler sayıca azalmaktadır. Yapılan fare modeli araştırmalarında kemik morfogenezik protein reseptörü inhibisyonunda, osteoblastlar ve HKH'ler sayıca artmıştır. Osteoblastlar ve HKH'lerin arasındaki hücre-hücre iletişimi genellikle N-kaderin ve  $\beta$ -katenin ile sağlanmaktadır. Kemik iliğinin vaskülarizasyonu da sağlıklı hematopoiezini

devamlılığı açısından kritik öneme sahiptir. Nişte endosteum ve medulladaki fenestrated sinüzoidler ve endosteumdaki arteriyoller olmak üzere iki tür damar ağı bulunmaktadır. Kemik iliği mikroçevresi hipoksiktir ve Kİ'nin merkez-medüller zonundaki yoğun vaskülariteden dolayı, sinüzoidlerin olduğu alandan yeniden yapılanma (remodeling) ünitelerinin olduğu alanlara doğru gidildikçe oksijen yoğunluğu daha da azalır (sırasıyla %6 ve 1). Bu hipoksik ortam, HKH'lerin uzun süreli kendini yenilemesi için gerekli olan temel faktörlerden HIF-1 $\alpha$  ve HIF-2 $\alpha$ 'yı ifadesini uyarır (30). Ayrıca endosteal bölgede, Ca<sup>+2</sup> iyonu, kemik remodelinginden dolayı fazla bulunur. Böyle bir mikroçevrede, MSH (mezenkimal stromal hücreler) ve HKH'ler arasındaki iletişim homeostazın sağlanması için zorunludur. Vasküler niş, ilk olarak HKH'lerin proliferasyonunu ve farklılaşmasını desteklemekle tanımlanmıştı ancak şimdi sinüzoidlerin yakınında hareketsiz HKH'ler olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır. Bir çalışma, uzun dönem yeniden popülasyon sağlayan HKPH'lerin yaklaşık %85'inin sinüzoidlere yakın olduğunu göstermektedir. Bu bölgede HKH'ler, leptin reseptör (Lepr<sup>+</sup>), yüksek CXCL12 seviyeli hücreler ve onları destekleyen endotel hücreleri ile temas halindedir. HKH'ler, sinüzoidlere fiziksel olarak yakındır ve arteriollerden uzaktadır. Lepr<sup>+</sup> hücreler, sinüzoidlerin etrafını sarar. NG2<sup>+</sup> hücreler veya polidendrositler, endosteumdaki arteriollere yakındır ve HKPH'lerin bakımında rol oynar. NG2<sup>+</sup> hücrelerin tükenmesi, HKPH'lerin proliferasyonuna ve HSC havuzunun tükenmesine yol açar (30).



**Şekil 2.1. Normal Kemik İliği Mikroçevresi.** HKH'ler kemik iliğindeki bu mikroçevre ile düzenlenmektedir. Osteoblastlardan ve osteoklastlardan oluşan niş, endosteal niş olarak adlandırılır ve bu niş endosteuma yakın konumlanmıştır. Kemik iliğindeki niş ise sinüzoidlere yakın olan vasküler niştir. Mikroçevreleri farklı hücre tipleri oluşturmaktadır. Bunlar; MSH'ler (LepR+ hücreleri, CAR hücreleri, Nestin+ hücreleri ve CD146+ hücreleri), endotel hücreleri, megakaryositler, adipositler ve sempatik sinir sistemi (SSS).

HKH ve MSH arasındaki iletişim, kemik iliği mikroçevresindeki homeostazın ve hematopoietik kök hücrelerin işlevlerinin düzenlenmesinde kritik bir rol oynar. KİM'deki HKH ve MSH'ler arasındaki iletişimde görevli olan bazı sitokin, sitokin reseptörleri ve adezyon molekülleri gösterilmiştir. CXCL12 (SDF-1) – CXCR4, KHF (kök hücre faktörü) – c-kit, vasküler hücre aderans molekülü-1 (VHAM-1) – VLA-4 ( $\alpha 4\beta 2$ ), anjiyopietin-1 (Ang-1) ve Tie-2, trombopietin (TPO) – MPL bunlara örnektir. Yapılan in vitro araştırmalar, kemik iliği mikroçevresi hücrelerinin (özellikle

osteoblastlar) CXCL12, KHF, Ang-1 IL-6 ve Jagged 1 (Jag1, Notch ligand) gibi hematopoietik sitokinleri sekrete ettiğini göstermiştir. KHF ve IL-6; normal hematopoezi, HKH'lerin idame ve sessizliğini destekleyici niteliktedir. KHF, başlıca kemik iliğindeki perivasküler hücreler tarafından ifade edilir. Anti-apoptotik olan Ang-1 HKH'lerin sessizlik durumunu düzenlerken, TGFβ1 de HKH sessizliğini tetiklemektedir. Endosteal bölgede bulunan osteoblastların ürettiği bir glikoprotein olan OPN, anjiyogeneze görevlidir. OPN, HKH'lerin yüzeyinde konumlanan αvβ1 integrinini tanır; inflamatuvar cevapta, HKH'lerin lokalizasyonunda, proliferasyonunda ve mobilizasyonunda işlevseldir. OPN eksikliği olan bir fare modeli, OPN'nin kemik iliğindeki HKH'leri tuttuğunu ve sayılarını olumsuz yönde düzenlediğini göstermektedir. Osteoblastlar yüzeylerinde TPO'yu ifade eder. TPO, hematopoetik kök ve progenitör hücrelerin (HKPH) yüzeyinde bulunan c-MPL (*C-mannosylation of thrombopoietin receptor*) reseptörünü aktive eder. Bu TPO/c-MPL etkileşimi, β-integrin yolunun aktivasyonu yoluyla kök hücre sessizliğini indükler.

### 2.3.1. Niş Bileşenleri

#### Mezenkimal Kök/ Stromal Hücreler

Cohnheim, 1867'de kemik iliğinde hem yenileyici hem de hematopoetik olmayan hücreleri çığır açıcı bir şekilde ilk kez tanımladıktan (35) sonra 1970 yılında Dr. Friedenstein, kemik iliği içinde HKH'lara benzeyen ve ileride Stro-1 antikoru kullanılarak ayırt edilecek olan mezenkimal stromal hücrelerin varlığını ortaya koymuştur. Hücre ve Gen Tedavisi için Uluslararası Topluluk (ISCT), mezenkimal stromal/kök hücreleri kültür kabı plastiğine yapışabilmesi; adipojenik, osteojenik ve kondrojenik kaderlere doğru farklılaşma kapasiteleri ve özel morfolojileriyle tanımlar (36). Standart karakterizasyon için de kullanıldığı üzere; MSH'ler heterojen bir hücre gurubudur ve pozitiflik gösterdikleri belirteçler CD73+, CD90+, CD105+ iken; CD34, CD31-, CD45RA-, CD14-, CD19-, HLA-DR- belirteçleri açısından negatif fenotiptedirler. Kemik iliğinde %0,01 kadar az oranda görülen MKH'ler, KİM ve HKH (özellikle CAR hücreleri-CXCL12-zengin retiküler hücreler, nestin<sup>+</sup> hücreler ve CD146<sup>+</sup> hücreler) arasındaki ilişkide çok büyük bir role sahiptir (37). LepR<sup>+</sup> (leptin reseptörü) hücreleri, MKH'ların erişkin kemik iliğindeki kaynağı olmakla birlikte

bölgedeki oranı %0,3'tür ve stres durumlarında proliferere olmaları dışında sessiz bir halde bulunurlar. Kemik iliğindeki mononükleer hücrelerin %3'ünü oluşturan CD146+ alt tipindeki MKH hücreleri, Ang-1 ve CXCL12 eksprese ederler ve büyük oranda vasküler nişte bulunurlar. Tie-2 ve CXCR4 ifadelenmesi ile ise HKH ve endotelial hücrelerle etkileşirler (30, 38). Kemik iliği mononükleer hücrelerinin %0,08'ini temsil eden ve nöral krest kökenli olan nestin+ hücreler ise çoğunlukla perivasküler alanda bulunurlar (30, 38). Bu hücreler sempatik sinir sistemi nöronları ile ilişki halindedir. Ayrıca hedef dokuya yerleşmesine yardımcı olup HKH'lerin mobilizasyonunu baskırlar. HKH sessizliğini sağlayan ve çokça ifade edilen idame genleri arasında OPN, CXCL12, KHF, Ang1, VCAM-1 ve IL-7 bulunmaktadır (30, 38). Fakat nestin+ hücrelerin yüzeyindeki nestin ifadesi in vitro ortamda hızla düşen bir trend gösterir çünkü difere olmaktadır. Yine bir MKH alt türü olan CAR hücreleri ise genellikle endosteal bölgede bulunup kemik iliğindeki oranı %0,27 civarındadır. Yüksek CXCL12 ve KHF ifadeleri sayesinde HKH'lerin kendini yenileme özelliklerini ve hücre döngüsünü kontrol ederler. Hatta, en sessiz özellikteki HKH'lerin CAR hücreleriyle yakın temasta olduğu gösterilmiştir. Bu özellik CXCL12 ifadesi susturulan in vivo modelde de ispat edilmiş ve HK sayısının azaldığı görülmüştür. Bu bulguya göre HKH havuzunun idamesini ve çoğalmasını düzenledikleri anlaşılabilir (30).

#### Endotelial Hücreler

Kemik iliğindeki hem HKH'ler hem de MSH'ler, endotelial hücreler ile temas halindedir. Endotelial hücrelerin kemik iliği nişinde HKH'lerin düzenlenmesinde etkili olduğu birkaç farklı çalışmada gösterilmiştir. Örneğin VE-kadherin ve VEGFR2 ifadesi bozulmuş olan bir fare modelinde, daha az HKPH ve daha çok farklılaşmış hücre gözlemlenmiştir (30, 39). Başka bir fare Sele<sup>-/-</sup> modelinde, endotelial hücrelerin yüzeyindeki E-selektin'lerin delesyonu yapılmıştır. BrdU testi sonucunda HKH metabolizmasındaki devinimin yabancı tip veya P-selektin susturulmuş farelere kıyasla azaldığı ve hücrelerin %30 civarında bir kısmının G0 fazında olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak bu modelde HKPH sessizliğinin arttığı görülmüştür (40). Bu çalışmalar endotelial hücrelerin HKH'lerin proliferasyonu ve sessizliğinde etkili olduğunu kanıtlar niteliktedir.

### 2.3.2. HKH Nişinin Diğer Hücre ve Elemanları

Sempatik sinir sistemi nöronları, adipositler, makrofajlar ve megakaryositler kemik iliği mikronişinde HKH kaderinin belirleyen ve düzenleyen majör elemanlardandır. Sempatik sinir sistem nöronları, HKH mobilizasyonunda etkilidir (41). Kemik iliğinde çoğunlukla beta adrenerjik nöron uçları bulunmaktadır. Sempatik sinir sisteminde çokça miyelinize olmayan Schwann hücresi bulunmaktadır. Bu hücreler nişi TGFβ1 aracılığıyla düzenler. Sempatik sinir sistemi, perivasküler mikroçevre hücrelerinin CXCL12 ifadenmesini ve sirkadiyen salınım aracılığıyla da HKH'lerin retansiyonunu düzenler. Kemik iliğindeki adipoz doku mezenkimal kökenlidir. Çeşitli kanıtlara göre, adipokin ve adiponektin üretimleri sayesinde HKH'lerin nişteki çoğalma ve idamelerini desteklerler. Öte yandan nişteki adiposit sayısı HKH sayısı ile ters orantılıdır, adiposit sayısının düşmesi HKH engraftmanını güçlendirmektedir. Son çalışmalara göre, adipositik hücreler, dipeptidil peptidaz (DPP4 / CD26; apoptoz ve immün cevapla ilgili bir protein) aracılığıyla kemik iliği nişinin rejenerasyonunu ve hematopoezi inhibe etmektedir. CD169+ hücrelerin (makrofajlar) silindiği bir fare modelinde, HKH'lerin nişteki retansiyonunun negatif etkilendiği gözlemlenmiştir. Makrofajlar, osteokalsin ve CXCL12 ifade etmekle beraber MSH'ların CXCL12 ekspresyonunu da düzenleme, HKH'lerin nişteki retansiyonunu ve osteoblastların hayatta kalımını sağlama işlevleri vardır. Granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF) kullanımı osteoblastik hücre sayısını azaltır ve endosteumdaki makrofaj sayısının tükenmesine sebep olur ki bu da makrofajların HKH'lerin retansiyonunda osteoblastları desteklediğini göstermektedir. Vasküler nişle ilişkili olan megakaryositler HKH'lerle sıkı bağlantıdadır. HKH proliferasyonunu IGFBP-3, IGF-1 gibi çeşitli sitokinler aracılığıyla; HKH sessizliğini de platelet faktör 4 (PF4-CXCL4) salgılayarak düzenlerler. Megakaryositlerin silindiği bir fare modelinde yapılan çalışmaya göre; megakaryosit kaybı, HKH idamesini azaltarak farklılaşmayı tetikler. Megakaryositlerin α-granüllerinde PF4 ile birlikte bulunan TGFβ1 de, HKH sessizliğinin korunmasında görevlidir.



### 2.3.3. Myeloid Malignitelerde Kemik İliği Mikroçevresi

Lösemi gelişiminde hematopoietik mikroçevrenin (kemik iliği nişi) etkisinin araştırılmasında fare modelleri sıkça kullanılmıştır. *Osx-GFP-Cre+ Dicer1 fl/fl* fare modellerinde, Niş myelodisplastik sendrom gelişimini desteklediği gösterilmiştir. Bu modeller ile osteoprojenitör hücrelerde *Dicer1* geninin delesyonunun, insan MDS'deki bozulmuş hematopoezi taklit ettiği kanıtlanmıştır. Bu modellerin osteoprojenitör hücrelerindeki *SBDS* geninin ifadesi azalmaktadır. *SBDS* silinmiş farelerde de MDS fenotipi gelişmektedir. Bu fare modelinde yapılan başka bir çalışmada, yüksek oksidatif stres ve DNA hasarı sebebiyle MKH'lerin fonksiyon göstermeyen mitokondrilere sahip olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, kemik iliği stromasının myeloid malignansilerin gelişiminde potansiyel bir rolü olabileceği ileri sürülmektedir (42). AML fare modelinde osteoblastların aktif mutasyonu sonucu elde edilen sonuçlara göre, beta-katenin yolağının overekspresyonu, myeloid ve lenfoid öncül hücrelerin farklılaşma kapasitesini azaltarak MDS/AML gelişimine sebep olmaktadır (10). Ayrıca bu osteoblastlarda NOTCH ligandı olan *Jagged-1*'in de ifadelenmesinde artış olduğu gösterilmiştir. AML hastalarından alınan kemik iliği biyopsilerinde de osteoblastlarda  $\beta$ -katenin'in; HKH'lerde ise Notch sinyalinin arttığını gösterilmiştir. Böylece bu iki bulgu arasındaki ilişki insanlarda AML gelişim sürecinde de önemli olabilir diye düşünülmüştür. Myeloid malignitelerde kemik iliğindeki neoplastik myeloid hücrelerin nişle çapraz etkileşimi hastalığın gelişiminde ve seyrinde önemlidir. Myeloid kanserli hastaların kemik iliği nişinde modifikasyonlar görülmektedir. AML ve MDS hastalarında anjiyogenezde meydana gelen artış buna bir örnektir (30, 43-45). Benzer vaskülerite bozulması ve anjiyogenez artışı AML-PDX fare modelinde de saptanmıştır (30, 46). Philadelphia negatif myeloproliferatif neoplazm (MPN) hastalarında izlendiği gibi, MDS hastalarında da kemik iliği fibrosizi yaygın olarak bulunmaktadır. Myeloid malignitelerdeki niş modifikasyonlarını araştırmak için kemik iliği mezenkimal kök hücreleri (MKH) kullanılabilir. AML, MDS, Philadelphia negatif MPN ve KML hastalarında, bu MKH'lerdeki fonksiyonel değişikliklerin myeloid hastalıkların doğal seyriyle bağlantılı olduğu çalışmalarla gösterilmiştir. Öte yandan, BCR-ABL pozitif kronik myeloid lösemi fare modelinde PTH reseptörünün aktivasyonu ile osteoblastik hücreler değiştirilmiş ve KML tablosunda düzelmeye saptanmıştır (47). Ancak, bu modelde MLL-AF9 ile

indüklenen akut myeloid lösemi gelişimi artmıştır. Bu sebeple, farklı myeloid lösemilerin gelişiminde birbirinden farklı niş koşullarının rol oynadığı söylenebilir. Philadelphia negatif (t(9:22) translokasyonu taşımayan) myeloproliferatif neoplazmların (MPN) gelişiminde ve ilerlemesinde kemik iliği mikroçevresinin etkisinin gösterilmeye çalışıldığı fare modelleri de mevcuttur. Örneğin hem mikroçevrede hem de hematopoetik hücrelerde retinoblastoma (RB1) geninin silindiği bir fare modelinde MPN hastalığı geliştiği izlenmiştir. Aynı grubun bir diğer çalışmasına göre, retinoik asit reseptör gamma (RAR $\gamma$ ) geninin nişten silinmesiyle MPN benzeri bir hastalık tablosu oluşmaktadır. Osteoblast ve endotelial hücreler olmaksızın, nestin<sup>+</sup> mezenkimal kök hücrelerde Ptpn11 aktivasyonu yapıldığında, hematopoetik kök hücreler için zararlı etki yaparak MPN gelişimine sebep olabilmektedir. Bu hücrelerin fazlaca ürettiği CCL3 (C-C motif kemokin ligand 3), IL-1 $\beta$  gibi proinflamatuvar sitokinler salınan monositlerin HKH nişine toplanmasına sebep olur. Lösemik başlatıcı hücrelerin çoğalımının ve MPN ilerleyişinin gözlemlendiği Jak2V617F fare modellerinde, kemik iliğindeki nestin ekspresyonunun ve nestin<sup>+</sup> hücrelerin sayısında düşüş görülmüştür (48). Scl-tTA/ABL çift transgenik fareler de MPN modeli için kullanılmıştır. Bu modelde, lösemik başlatıcı hücrelerin mikronişteki osteoblastik hücrelerinde sıra dışı bir artışa sebep olup miyelofibroz inflamatuvar bir ortam oluşturduğu tespit edilmiştir. TGF $\beta$  ve Notch yolaklarının görev aldığı bu lösemik nişte, HKH'ler yerine lösemik başlatıcı hücrelerin artışı teşvik edilmektedir (30, 48).

#### **2.3.4. AML'de Kemik İliği Mikroçevresi-Lösemik Niş**

AML, heterojen klonal bir hastalıktır. Periferik kan veya kemik iliğindeki immatür myeloid öncüllerinden köken olan lösemik blastların ekspansiyonu ile karakterizedir. Tedavi edilmemiş AML hastalarının MKH'lerinde de hastalık ilişkili genetik varyasyonlar, bunlar içinde de en sık translokasyon görülmektedir (49). Fakat bu anomaliler, aynı hastanın HKH'lerinde görülen ve lökomogenezden sorumlu olan anomalilerden farklı olmaktadır. DNA sekanslama yöntemiyle AML-MKH'lerinden elde edilen verilere göre; bu hücrelerde, plektin ve kromatin remodeling genleri de dahil olmak üzere, birden çok mutasyon izlenebilmektedir (50). Ayrıca, PITX2 ve HOXB6 genlerinde hipermetilasyon; HOXA3 ve HOXA5 genlerinde hipometilasyon

olmak üzere DNA metilasyon modifikasyonlarının varlığı da da gösterilmiştir (51). Adezyon molekülleri (50), inflamatuvar sitokinler (30, 52-54), Notch yolağı ve CXCL12 de dahil olmak üzere, gen ifadenmesi modifikasyonları da literatürde bildirilmiştir (30). MKH ve HKH'ler arasındaki etkileşimi hem fizyolojik hem de özellikle kanserlerde olmak üzere patolojik durumlarda, CXCL12/CXCR4 etkileşimi sağlamaktadır. CXCR4, normal hematopoetik hücreler ve AML hücrelerinde bolca ifade edilmekle birlikte AML blastlarında yüksek CXCR4 ifadenmesi kötü prognozun bir işaretçisidir. Ksenotransplantasyon modellerinde, CXCR4 ve CXCL12 arasındaki etkileşimin bozulması, apoptoz oranında bir artışa ve löseminin gerilemesinin neden olmaktadır ki bu, mikroçevrenin korunmasında sorun olduğunu düşündürmektedir (30). CXCR4 antagonisti kullanılarak ekspresyonun inhibe edildiği durumlarda AML blastlarında artmış apoptoz izlenmektedir. Bu hücre ölümü; BCL-2, MCL-1 ve siklin D1'i aşağı doğru regüle eden miR-15a/miR16-1'in yukarı doğru regülasyonu ile sağlanır. Genetik modifiye Cxcl12<sup>fl</sup> farelerde CAR hücrelerinde ve perivasküler MKH'lerde CXCL12 delesyonu, HKH'lerin sessizlik ve kendini yenileme potansiyelini düşürürken; osteoprogenitörlerde CXCL12 delesyonu, HKH mobilizasyonu artırıp idamesi ve sessizliğini etkilememektedir. Ek olarak, Kİ MKH'leri lösemik hücrelerle kokültüre edildiğinde CXCL12 mRNA düzeylerinde artış görüldüğü belirtilmiştir (30, 55). AML-MKH'lerinin klonojenik potansiyelinin (CFU-F- Fibroblast kolonisi yapan ünit) tanı anında düşük olduğu (51, 53, 55) ve hastalar tedavi sonrası tam remisyonda girdiğinde ise normal potansiyellerini tekrar kazandıkları gösterilmiştir [135]. AML Kİ MKH'lerinin *in vitro* ortamda normal Kİ MKH'lerine göre daha az proliferatör olup senesense daha hızlı girdiği (55) ve idame sürelerinin kültür ortamında kısalıp ikinci pasajı geçemedikleri bilinmesine rağmen; düşük, orta ve yüksek risk gruplu olmak üzere fazla sayıda AML hastasından alınan örneklerin kullanıldığı bir çalışmada, AML-MKH'lerin klonojenik potansiyellerinin, immünsüpresif kapasitelerinin ve IL-10 gibi antiinflamatuvar sinyallerinin sağlıklı MKH'lere göre arttığı da gösterilmiştir (56). AML-MKH'lerin farklılaşmasıyla ilgili veriler farklılık göstermektedir. Farklılaşma yeteneklerinde herhangi bir değişiklik olmadığını gösteren çalışmalar bulunsa da, osteojenik farklılaşmalarında azalma olduğunu belirten ve osterix ile osteokalsin gibi osteoblastik soya ait gen ekspresyonlarının azalmasıyla ilişkilendirilmiş çalışmalar da bulunmaktadır. AML

hastalarının kemik iliğinde normalden daha fazla CD146(-) 166(+) osteoblastik hücre bulunduğu da gözlemlenmiştir (55). Bazı çalışmalara göre, sadece kötü prognozlu AML hasta MKH'lerinin adipo/osteojenik potansiyelde azalma olmaktadır (56). Ancak son araştırmalar, AML-MKH'lerinde adipojenik potansiyelde azalma ve osteojenik farklılaşmasında artış olduğunu göstermektedir. Bu çalışmalardan biri, primer AML hastalarında kemik iliğinde görülen adipogenezdeki azalmanın, lösemik hücrelerin Kİ adipositlerini baskılamasının sonucu olarak myelo-eritroid olgunlaşmasının bozulmasına neden olduğunu ortaya koymuştur. Diğer bir çalışma ise, AML kaynaklı osteojenik farklılaşmasının lösemik büyümeyi desteklediğini belirtmiştir (57, 58). MKH'lerin hematopoezi sürdürme kabiliyeti hem *in vitro* olarak 2D ve 3D ko-kültür modelleri aracılığıyla hem de *in vivo* olarak immün yetmezlikli farelerde ksenogreftler aracılığıyla incelenebilmektedir. AML-MKH'leri kullanılarak yapılan kokültür deneylerinde, uzun-sürelilikültür-başlatıcı-hücrelerden (LTC-IC-long-term culture initiating cells) elde edilen veriler, bu hücrelerin normal bir hematopoezi destekleme kapasitesinde bozulma olduğunu göstermektedir. Normal HKH'ler ile AML-MKH'lerin LTC-IC kültüründen sonra yapılan colony forming assay ile metilselülozda az sayıda myeloid koloni gelişimi gözlenmiştir. Ayrıca, AML hastalarından elde edilen MKH'lerin, lösemi başlatıcı hücreleri (LIC-leukemia initiating cells), sağlıklı MKH'lerden *in vitro* ortamda daha iyi desteklediği bildirilmiştir. Bazı ksenograft deneylerinde, AML hücrelerinin otolog MKH'lerle birlikte enjekte edilmesini incelenmiş, ancak birlikte enjekte edildiklerinde MKH'lerin engraftman seviyesini iyileştirmediği bulunmuştur. Yakın geçmişte, matrigel ve benzeri materyaller kullanılarak *in vivo* olarak MKH'lerle enjekte edilen subkütan iskeleler tanımlanmıştır ve enjekte edildiği farelerde LBH'lerin oranını artırdığı gösterilmiştir. Benzer şekilde, sağlıklı MKH'lerle çalışılan bu iskelelerin implantasyonu, normal HKH'lerin engraftmanını da iyileştirmektedir (59, 60). Kullanılan MKH'lerde HIF-1 $\alpha$  geninin durdurulması durumunda, iskeledeki engraftman azalmaktadır. Böylelikle, bu 3D iskelelerin insan niş ortamını taklit ettiği ve lösemik hücrelerin engraftmanını iyileştirdiği görülmektedir. Bu ve benzeri çok sayıda araştırmanın sonuçları kemik iliği mikroçevresinin lösemik hücreler için koruyucu bir kalkan sağladığını göstermektedir. MKH'lerle etkileşim lösemik hücreleri apoptozdan korumakta ve kemoterapiye karşı dirençli hale gelmelerine

neden olmaktadır. Ayrıca, bu etkileşim lösemik hücrelerdeki farklılaşma duraksamasına katkıda bulunmakta, lösemik hücrelerin kendini yenileme potansiyellerine ve genel sağ kalımlarının korunmasına da neden olmaktadır (30). Araştırmalar, AML-MKH'lerinin sağlıklı MKH'lerle benzer kemoprotektif yetenekler sergilediğini, ancak daha yüksek immünosupresif ve anti-inflamatuar özelliklere sahip olduklarını ve daha düşük pro-inflamatuar sitokinlerin ekspresyonununa sahip olduklarını ortaya koymaktadır. MKH'lerin lösemik hücreler üzerindeki koruyucu rolü, başta CXCR4/CXCL12 aksı olmak üzere çeşitli sitokinlerden etkilenmektedir. Diğer yandan, AML hücrelerinin kemik iliği mikroçevresini de değiştirerek ve kökültürde sağlıklı MKH'lerin çoğalmasını engelledikleri gösterilmiştir. Bu da AML'de lösemik hücreler ile kemik iliği mikroçevresi arasında lösemi gelişimini ve yayılımını destekler yönde karşılıklı bir etkileşim olduğunu kanıtlayan bir bulgudur (30).

#### **2.4. Akut Myeloid Lösemi ve Lösemik Hücre Metabolizması**

Hücrel ihtiyaçlara göre enerji üretimine izin veren dinamik süreçlere metabolizma denir. Hücrenin farklılaşma, çoğalma ve *quiescence* (sessizlik) durumları metabolizmaya bağlıdır. Normal hematopoietik kök hücreler karakteristik olarak sessiz olup, hayatta kalmalarını sürdürmek ve multipotent progenitörler üretebilmek için, kemik iliği nişinde, metabolik profillerini düşük seviyede tutmaktadırlar. AML 'de lösemik hücre kütesinin büyük kısmının hücre döngüsü çok hızlı olduğundan, fazla miktarda enerji kaynağına gereksinim duymaktadırlar. Normal hematopoietik kök hücreler ile lösemik kök hücreler ve lösemik hücreleri arasında genotipik ve fenotipik farklılıklar bulunmaktadır. Ayrıca, bu hücre gruplarının her biri kendi içlerinde de yüksek oranda çeşitlilik sergilemektedirler. Araştırmalar, lösemik kök hücre-LKH (lösemi başlatıcı hücre) olarak adlandırılan ve çok nadir görülen immatür CD34+/CD38- lösemik hücre alt grubunu, immün yetmez farelere transfer ederek, bu farelerde lösemi geliştiğini göstermiş, böylece bu hücrelerin lösemi başlatma potansiyelleri tanımlamıştır. Daha olgun bir immünfenotip taşıyan CD34+/CD38+ AML lösemik hücreleri ise, aynı şartlar altında lösemi geliştirici etki gösterememişlerdir. LKH'ler ile normal hematopoietik kök hücreler benzer CD34+/CD38- yüzey immunofenotiplerini taşıdıkları için, bu LKH'leri hedef alabilecek belirgin hücre yüzeyi işaretçileri (CD32, CD44, CD47, CD123, TIM3,

CD45RA ve CD96) üzerinde yoğun çalışmalar sürdürülmektedir (61-64). Normal hematopoietik kök hücreler gibi, lösemi kök hücreleri de AML hastalarının kemik iliği nişinde yer alırlar, bu durum onların yaşamını destekler ve kemoterapiye dirençli hale gelmelerine neden olur. Kemik iliğindeki lösemik mikroçevrede oksijen düşüklüğü, daha az reaktif oksijen türü (ROS) üretilmesine yol açar; bu durum, LKH'leri genel AML lösemik hücre popülasyonundan ayırmanın yanı sıra, hücrelerin sessiz durumlarının korunmasına, hücre-içi anaerobik metabolizmanın desteklenmesine ve kök hücre özelliklerinin devam ettirilmesine yardımcı olmaktadır. Tüm bu özellikler sayesinde LKH'ler kemoterapinin etkisinden korunabilmektedirler. Bunun tersine, dolaşımdaki AML blastları yüksek ROS düzeylerine sahiptir, proliferasyonlarını desteklemek artan enerji ihtiyaçları nedeni ile metabolik aktiviteleri yüksektir.

#### **2.4.1. HKH'ler, LKH'ler ve Lösemik Blastlar Arasındaki Metabolik Farklılıklar**

AML metabolizması ilgili araştırmalar, normal hematopoietik kök hücrelerin, lösemik kök hücrelerin ve AML blastlarının kendine özgü ve farklı metabolik profillere sahip olduğunu göstermektedir. Normal HKH'lerin minimal enerji ihtiyacına kıyasla, lösemik blastlar, artan hücre döngüsünü desteklemek adına daha fazla ATP üretimine ihtiyaç duymaktadırlar. Lösemik blastlar, glikoliz ve pentoz-fosfat yolu gibi metabolik süreçleri artırarak, amino asitler, nükleotitler, yağ asitleri ve elektron taşıyıcıları gibi makromoleküler yapı taşlarını üretir. Buna karşılık, LKH'lerin bölünmeyi yavaşlatarak/durdurarak sessiz kalma ve kendini yenileme kabiliyetlerini sürdürebilmek için mitokondriyal metabolizmaya bağımlı oldukları gözlemlenmiştir. AML'de yeniden düzenlenen temel metabolik yollar arasında glikoliz, oksidatif fosforilasyon, amino asit ve lipid sentezi bulunmaktadır. (63). Lösemik hücrelerin bu metabolik yeniden programlanma kabiliyeti lösemi hücrelerinin değişen mikroçevre koşullarına hızla adapte olmasının ve varlığını sürdürebilmesinin temel mekanizmalarından biridir.

### 2.4.2. Glikoz Metabolizması

Yaklaşık bir asır önce Dr. Otto Warburg, oksijen varlığında bile tümör hücrelerinin glikozu fermente ederek pirüvatı tri-karboksilik asit (TCA) döngüsüne girmesine izin vermek yerine laktata dönüştürmeyi tercih ettiğini keşfetmiştir. Bu durum, kanser hücrelerinin hızlı bölünmelerini desteklemek için gereken yüksek düzeyde ATP üretimini sağlamaktadır. Glikoz metabolizmasının biyoenerjetik işlevinin yanı sıra, bu süreç aynı zamanda ribonükleotitlerin sentezi için pentoz üreten pentoz-fosfat yolunu, amino asitleri üreten serin biyosentezini ve evrensel bir elektron taşıyıcı olan NADPH'i (Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) üreten tek karbon metabolizması gibi başka yolları da kapsamaktadır (48, 63). Bu nedenle, glikoliz yalnızca enerji sağlamakla kalmayıp, aynı zamanda kanser hücrelerinin devamlılığı için gerekli moleküler yapı taşlarını teminini de mümkün kılmaktadır. AML hücreleri, SLC2A (*Solute Carrier Family 2 Member A*) ailesi genler tarafından kodlanan ve GLUT olarak adlandırılan özel bir membran taşıyıcısı aracılığıyla glikozu hücre içine alarak glikolizi başlatır. Hem AML hücre hatlarında hem de hasta örneklerinden alınan blastlarda gözlemlenen yüksek glukoz seviyeleri, GLUT1 ve laktat dehidrogenazın yüksek düzeyde ifadesi ile ilişkili olup, bu durum ilaç direncini ve tümör hücrelerinin hayatta kalmasını artırır. Ayrıca, tanı anında AML hastalarının serumlarında sağlıklı bireylerle kıyaslandığında daha fazla pirüvat ve laktat bulunmuş ve bu da kötü prognoz ile bağlantılı olarak değerlendirilmiştir (63). Pirüvat ve laktat, sırasıyla PKM2 (*Pyruvate kinase M2*) ve LDHA tarafından katalize edilen son glikolitik reaksiyonlarda üretilen iki önemli glikoliz bileşiğidir. PKM2'deki mutasyonlar, normal hematopoietik kök hücrelere zarar vermeden, progenitör hücre fonksiyonlarını bozarken, LDHA'nın yokluğu hem HKH'lerin hem de progenitör hücrelerin işlevlerinde ciddi kısıtlamalara neden olmaktadır ve bu da farklı hematopoetik hücre alt tipleri arasında belirgin bir metabolik farklılık olduğunu göstermektedir (63, 65). Glikoliz, AMPK (*AMP-activated protein kinase*) ve PI3K/Akt/mTOR (*Mechanistic target of rapamycin*) dahil olmak üzere bir sinyal molekülleri ağı aracılığıyla kontrol edilir. Bu ağ, normal hematopoez için gerekli olan oksidatif fosforilasyon, pentoz fosfat yolu ve nükleotid biyosentezi gibi diğer tüm metabolik yollarla bağlantılıdır. AML gelişimi ile, birçok metabolik yolak işlevinde bozulma gözlemlenmektedir. Bu durum lösemik hücrelerin artmış proliferasyonuna destek olarak lösemi gelişimine

katkıda bulunmaktadır. Örneğin, AMPK'nın işlev kaybına neden olan mutasyonların GLUT1 taşıyıcısının downregülasyonu yoluyla glukoz akışını bozarak lökomogenezi baskıladığı gösterilmiştir. Benzer şekilde, mTOR kompleks-1 (mTORC1), normal hematopoietik kök hücrelere kıyasla lösemik kök hücrelerde daha fazla aktiftir ve mTORC1'in baskılanmasının lösemik süreci durdurduğu gözlemlenmiştir (38). mTORC1, glikoliz ve pentoz fosfat yolu dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlerde birçok hücresel sürecin düzenlenmesinde kritik bir rol oynar. Ayrıca, mTORC1 glukoz tüketimini artırır ve inhibisyonu, AML hücrelerinin enerji üretimini glikolizden oksidatif fosforilasyona kaydırmasına neden olur, bu da oksidatif stres ve DNA hasarına sebep olur (63, 65). Bu yüzden, lösemik blastlar genellikle enerji üretimi için glikolitik yollara bağlı kalsalar da metabolik süreçlerini yeniden düzenleyerek kemoterapiye dirençli hale gelebilmekte ve oksidatif fosforilasyona geçiş yapabilmektedirler. Ayrıca, AML hastalarında sık rastlanan ve kötü prognozla ilişkili bir mutasyon olan Fms benzeri tirozin kinaz-3 iç tandem duplikasyonu (FLT3-ITD) taşıyan AML hücrelerinde glikoliz, hücre sağkalımı için yüksek glukoz akışını sürdürmek üzere pentoz fosfat yolu ile ilişkilidir (63, 66). Aynı bir çalışmada, glukoz-6-fosfat dehidrojenaz pentoz fosfat yolunun önemli bir düzenleyicisi olarak tanımlanmış ve aşırı ekspresyonu olumsuz prognozla ilişkilendirilmiştir (67). Glukoz-6-fosfat dehidrojenazın inhibisyonu ve FLT3'ün lestaurtinib ile farmakolojik baskılanması, FLT3-ITD taşıyan AML hücrelerinde belirgin bir anti-lösemik etki göstermiş ve yeni bir terapötik yaklaşım olarak belirlenmiştir. AML blastlarından farklı olarak, normal HKH'ler ve LKH'lerde pentoz-fosfat yolunun işlevi kapsamlı olarak incelenmemiştir, bu hücreler üzerinde daha fazla *in vivo* ve *in vitro* çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Karbonhidrat metabolizmasının ve glikolizin önemli bir düzenleyicisi olan kemik iliği mikroçevresi hem HKH'lerin hem de düşük ROS seviyelerine sahip LKH'lerin hayatta kalmasında kritik bir role sahiptir. Normal HKH'ler enerjilerini çoğunlukla glikoliz yoluyla elde ederken, düşük ROS içeren LKH'ler enerji üretimlerini mitokondriyal solunum ile sağlar. Buna karşın, hızlı bir şekilde bölünen lösemik blastlar periferik kanda daha yüksek düzeyde glukoz ve fruktoz tüketebilir. Aynı zamanda, fruktoz alımının engellenmesinin lösemi gelişimini yavaşlattığı ve nişte hızlı çoğalan lösemik hücreler üzerinde Ara-C' nin sitotoksik etkisini artırdığı gözlemlenmiştir. Bu bulgu nişte hızla çoğalan lösemik hücrelerin Ara-



C'ye karşı kemoterapi direncini karbonhidrat metabolizmasına dayanarak geliştirdiğini göstermektedir. Genel olarak, normal HKH'ler ve hızlı çoğalan AML blastları LKH'lere göre daha fazla glukoz içeriği ve glikolitik aktiviteye sahiptir, bu da lökomogenezde glukoz metabolizmasının önemine işaret etmektedir.

### 2.4.3. Mitokondriyal Metabolizma

Mitokondri; karbonhidratlar, amino asitler ve yağ asitleri gibi besinlerin TCA döngüsünde bir araya geldiği çoklu metabolik süreçlerin merkezinde ve kanser hücrelerinde temel bir enerji kaynağı olarak görülmektedir. Biyoenerjetik rollerinin yanı sıra, mitokondri ayrıca TCA döngüsü, glutaminoliz, oksidatif fosforilasyon ve yağ asidi oksidasyonu (YAO) gibi temel metabolik işlevleri desteklemekte ve düzenlemektedir. Bu mitokondriyal süreçlerden bazıları AML hücrelerinde önemli derecede modifikasyona uğramaktadır ve bu hücrelerin hayatta kalması ve fonksiyonlarının devam ettirebilmesi için kritik bir rol oynamaktadırlar (63, 68, 69).

#### TCA veya Krebs Döngüsü:

Trikarboksilik asit (TCA) döngüsü, glikoliz sürecinden elde edilen NADH (Nikotinamid Adenin Dinükleotid) ve FADH<sub>2</sub> (Flavin Adenin Dinükleotid Hidrojen) gibi yüksek enerjili elektron taşıyıcılarını toplayıp, mitokondrideki elektron taşıma zincirine aktarır. Sağlıklı hematopoetik kök hücreler piruvatın tetiklediği düzenli bir metabolik döngüye sahiptirler. Fakat AML'de lösemik hücrelerde, bu süreçler arasındaki bağlantıyı kesilmekte ve piruvat laktata çevrilmektedir. Bu durum, AML hücrelerinin enerji sağlamak için glutamat gibi alternatif karbon kaynaklarını kullanmalarına olanak tanımaktadır. Bu sebeple, glutamin metabolizmasına yönelik tedaviler, AML'ye karşı etkili olabilmektedir (70, 71). Lösemik hücreler TCA döngüsündeki ara ürünleri tamamlamak amacıyla glutamatu  $\alpha$ -ketoglutarata çevirirler, bu dönüşüm glutamat dehidrogenaz aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bu bilgiyle uyumlu olarak, CRISPR/Cas9 araştırmaları, AML hücre hatlarının TCA döngüsüne katkı sağlamak için a-KG üretimi için gerekli olan glutamin taşıyıcıları ve glutaminaz enzimlerini arttırdığını göstermiştir. Bu artış, bir BCL-2 inhibitörü olan venetoclax'a karşı hücrelerin direncini artırır. Araştırmalar ayrıca, lösemik hücrelerin glutamini sitrata dönüştürüp TCA döngüsüne dahil edebildiğini, böylece metabolik

esnekliklerini koruduklarını göstermektedir. ROS düzeyi düşük LKH'ler, yüksek miktarda  $^{13}\text{C}_{16}$  palmitat olarak bu molekülü sitrat ve malat gibi TCA döngüsü ara ürünlerine dönüştürürken(72), ROS düzeyi yüksek AML hücrelerinde bu durum gözlemlenmemektedir. Ayrıca, uzun süreli sessiz kalan HKH'lerde yapılan metabolomik profillemeler, düşük TCA metabolit seviyeleri göstermiştir; bu durum hücrel hipoksiye yanıt veren HIF-1 $\alpha$  transkripsiyon faktörü tarafından düzenlenmektedir. HIF-1 $\alpha$  işlev kaybına sahip HKH'ler, glikolizden daha az bağımlı hale gelmekte ve hücrel dinlenme kapasitelerinde azalma yaşamaktadır (63, 73-76).

### Oksidatif Fosforilasyon

Başlangıçta, kanser hücrelerinin hayatta kalmak için esas olarak glikolize bağımlı oldukları ve mitokondriyal solunumun bu hücrelerde bozulduğu varsayılmıştır. Ancak, güncel araştırma sonuçları, lösemik hücrelerin hayatta kalabilmek için oksijeni oksidatif fosforilasyon yoluyla kullanarak yüksek seviyelerde ATP ürettiğini ve elektronları TCA döngüsüne aktardığı göstermektedir. Oksidatif fosforilasyon, enerji sağlamanın yanı sıra, mitokondriyal zarın geçirgenliğini düzenleyerek apoptoz ve hücre çoğalması arasındaki dengeyi de kontrol etmektedir ve redoks biyolojisinde önemli bir rol oynamaktadır (77). Normal hematopoetik kök hücreler, mitokondriyal solunum hızlarını düşürerek ve glikolize dayanarak dinlenme durumlarını korurlar. Bunun yanında başka bir çalışmada, (Škrčić ve ark.), AML'de lösemik blastların, normal HKH'lere göre daha yüksek mitokondriyal biyogeneze ve bazal oksijen tüketimine sahip olduğunu göstermiştir (78). Ancak, çalışmalar dinlenme halindeki HKH'lerin, oksidatif stresle başa çıkarken yedek kapasite olarak bilinen yüksek glikolitik aktivite ve elektron akışı ile enerji üretimlerini maksimize edebildiğini, fakat AML blastlarının mitokondriyal oksidatif stres karşısında savunmasız olduğunu da göstermiştir (63, 79, 80). Dinlenme halindeki HKH'lere benzer şekilde, lösemik kök hücrelerde düşük oksijen tüketimi ve oksidatif fosforilasyon seviyelerine sahiptir, ancak yine de hayatta kalmak için bu metabolik yola bağımlıdır. Yapılan bir çalışmada, primer AML örneklerindeki CD34+ CD38- LKH popülasyonunda mitokondriyal ATP-bağımlı Clp proteazın (ClpP) aşırı ifade edildiği bulunmuştur (81). Bu nedenle, artmış ClpP ifadesi, AML hastalarında yükselmiş oksidatif fosforilasyonun bir biyobelirteci olabilir. Buna paralel olarak,

Jones ve ark. tarafından yapılan metabolomik ve gen ifade analizleri, LKH'in zenginleştirilmiş alt gruplarının metabolik olarak durağan olan popülasyonlar olduğunu ve HKH'lerin aksine, enerji üretimi için amino asit metabolizmasına bağımlı olduklarını göstermiştir (63, 72). Mitokondriyal metabolizma, TCA döngüsü ve oksidatif fosforilasyon, LKH'lerde ve belirli koşullar altında AML blastlarında ATP molekülleri üretmek için kritik yollardır.

#### Amino Asit Metabolizması

Yirmi standart amino asit, proteinlerin, nükleotidlerin, lipidlerin ve glutatyon (GSH) gibi bileşenlerin biyosentezi için gerekli olup, tümör hücrelerinin çoğalması için hayati öneme sahiptirler (82). Tüm amino asitler içinde, özellikle glutamin, AML'de lösemik hücrelerinin yaşaması ve çoğalması için kritik öneme sahiptir. Glutamin ve glukoz, lösemi gelişim sürecinde sadece TCA döngüsünde  $\alpha$ -ketoglutarat sağlamakla kalmaz, aynı zamanda lösinin AML hücrelerine aktarılmasında da temel bir rol oynarlar ve mTORC1 aracılıklı protein sentezini aktivasyonunu tetikler. Glutamin, SLC1A5 (*Solute carrier family 1 member 5*) taşıyıcısı aracılığıyla AML hücrelerine taşınır ve glutaminoliz adı verilen bir süreçte glutamata ve  $\alpha$ -ketoglutarata dönüşür (83). Normal hematopoietik kök hücrelere göre, lösemik blastlar çoğalmak ve hayatta kalmak için daha fazla glutamin tüketmektedirler. Düşük reaktif oksijen türleri (ROS-düşük) seviyesine sahip olan, tanı anındaki lösemik kök hücreler, hayatta kalmak için oksidatif fosforilasyona dayanan amino asit metabolizmasına bağımlıdır (72). Nüksetmiş akut myeloid lösemi hastalarından alınan lösemik kök hücreler ise, yağ asidi metabolizmasını artırarak ve özellikle palmitat alımını teşvik ederek amino asit kaybını önlemeye uyum sağlamaktadırlar. Bu durum, LKH'lerin metabolik adaptasyon kabiliyetini ve tedavi direnci geliştirme potansiyelini göstermektedir. Ayrıca, nüks hastalık durumundaki LKH'lerin enerji üretimi için alternatif yolları nasıl kullanabildiklerini göstermektedir. Glutamin metabolizması dışında, AML hücreleri hayatta kalmak için arginin gibi diğer amino asitlere de ihtiyaç duyar. Arginin, nükleotid üretimi için amin grupları ve aspartat sağlamada hayati öneme sahiptir. Normal HKH'lerin aksine, arginosüksinat sentetaz-1 mutasyonuna sahip AML hücreleri sitrülün ve aspartattan arginin üretemez ve dışarıdan arginin alımına bağımlı hale gelir. Arginin katabolizması, AML blastlarında antijenlere karşı

başıklık tepkisini engeller ve bu nedenle plazma arginin seviyesinin ölçülmesi, AML hastalarının immünoterapi stratejilerine yanıtının tespitinde önemli gibi gözükmektedir (84, 85). Genel olarak, amino asit metabolizması ve içeriği, LKH'lerde AML blastlarına göre daha dikkate değerdir ve LKH popülasyonunu hedef almak için stratejik bir fırsat sunmaktadır (63).

### Lipit Metabolizması

Glikoz ve glutaminden sonra, lipitler kanser hücrelerinin çoğalması ve hayatta kalması için önemli üçüncü bir kaynak olarak kabul edilir. Lipitler yalnızca enerji kaynağı olarak değil, aynı zamanda hücre zarının biyogenezi ve çeşitli sinyal yollarının düzenlenmesi için gerekli olan işlevsel yağ asitleri sağlama görevini üstlenmektedirler (86). AML hücrelerinde, normal hematopoietik hücrelere kıyasla lipid metabolizması bozulmuştur, bu da lipid sentezinin hedeflenmesinin AML tedavisinde olası faydalar sunabileceğini düşündürmektedir. AML tanısı almış hastaların periferik kan plazmasında yapılan lipidomik analizler, bazı serbest yağ asitlerinin, özellikle araşidonik asitin artış gösterdiğini ve genel yağ asidi ile kolesterol seviyelerinin düşüş gösterdiğini ortaya koymuştur (87). Bu değişikliklerin nedeninin, artmış yağ asidi oksidasyonu (YAO) olabileceği öngörülmektedir. YAO, asetil-CoA ara ürünü aracılığıyla TCA döngüsünü besler ve bu da sitratın artışına ve dolayısıyla de novo yağ asidi sentezinin başlamasına neden olur (88). Yağ asidi oksidasyonu AML hücrelerinde regülasyonu bozulmuş olan önemli bir metabolik yollardan biridir. Yağ asitlerinin oksidasyonu sürecinde asetil-CoA üretilmekte ve asetil-CoA, TCA döngüsüne girerek ATP üretimini desteklemektedir. Bu süreç, lösemik hücrelerin hayatta kalmasına ve durgun kalmasına yardımcı olmaktadır. Ayrıca, glikoliz ve amino asit katabolizması yoluyla da TCA döngüsüne ek asetil-CoA sağlanmaktadır. Öte yandan, yağ asidi sentetaz (YAS) adlı enzim, AML hücrelerinde yağ asidi sentezini katalizler ve bu hücrelerin proliferasyonu için gereklidir. YAS, sağlıklı bireylerden türetilmiş normal hematopoetik kök hücrelerde düşük seviyelerde ifade edilirken, AML hastalarında aşırı ifade edildiği gösterilmiştir (63). YAS inhibitörleri, RNAi veya epigallokateşin-3-gallat kullanılarak, akut promiyelositik lösemi hücrelerinde granülositik farklılaşmanın hızlandığı ve bu hücreleri ATRA tedavisine yeniden duyarlı hale getirilebildiği gösterilmiştir. Bu süreçte lizozomal biyogenezin

ve otofajinin rol oynadığı öne sürülmüştür (89). Yağ asidi oksidasyonu sürecine dahil olan aralarında karnitin palmitoiltransferaz-1A ve karnitin taşıyıcı CT2'nin de bulunduğu birçok enzim ve taşıyıcılar, AML hücrelerinde normal hematopoetik kök hücrelere kıyasla fazla ifade edilmektedir. Sessiz HKH'ler, sessizlik durumlarını korumak için YAO oranlarını temel bir seviyede tutmaktadırlar. HKH'lerin kaderi, durgunluktan çıktıklarında geçirdikleri hücre bölünmesi tipine bağlıdır (90). Asimetrik bölünme, iki yavru hücre oluşturur; bu hücrelerden biri kendini yenileme yeteneğini kazanır ve sessiz kalırken, diğeri farklılaşır ve sistemik dolaşıma girmektedir. Buna karşılık, simetrik bölünme, yalnızca hücre çoğalması ve farklılaşma yeteneğine sahip iki yavru hücre üretmektedir. YAO metabolizması, asimetrik bölünmeyi desteklemekte ve böylece HKH'lerin kendini yenileme kabiliyetinin korunmasına katkıda bulunmaktadır (91). YAO HKH'lerde olduğu gibi, LKH'lerin korunması için de önemlidir ve venetoklaks direncinde kilit bir rol oynamaktadır. Dirençli, ROS düzeyi düşük LKH'lerde yapılan transkripsiyonel profillemeler, RAS yolaklarında mutasyonlarla birlikte YAO'da artış ve CD36 ifadesinde yükselme göstermektedir. CD36, CD36+ LKH popülasyonunda lipid alımını kolaylaştıran önemli bir yağ asidi taşıyıcısıdır. Bu CD36+CD34+ hücreler, gonadal yağ dokularında önemli ölçüde zenginleşmiştir, bu da onları venetoklaksın yıkıcı etkilerinden korunmasına katkı sağlarken ve devamlılıkları için gerekli olan YAO'yu kullanmalarına olanak tanımaktadır. Buna ek olarak, AML blastları ile kemik iliği adiposit hücreleri arasındaki etkileşim, lipolizi tetiklemektedir, böylece adipositlerden AML'ye yağ asitlerinin salınmasını sağlanmakta ve AML hücrelerinin hayatta kalması ve *in vivo* ortamda çoğalmaları desteklenmektedir (63). Yağ asitleri ve ilgili metabolik yolların yanı sıra, sfingolipidler de lökomogenezde hücre çoğalması ile hücre ölümü arasındaki dengeyi düzenleyerek kritik bir rol oynamaktadırlar. Sfingolipidlerin oluşumu ve işlevselliği, AML hücrelerinde bulunan onkogenik proteinler olan sfingozin kinazlar ve asit seramidazlara bağlıdır. Sfingozin-1-fosfat, sfingozin kinaz-1 tarafından üretilen biyoaktif bir lipittir. AML hücrelerinin hayatta kalmaları ve ölmeleri üzerinde aktif bir şekilde sürekli etkisini göstermektedir (63).

## 2.5. Omiks Teknolojileri

Omiks teknolojileri; Proteinler,transkriptler,genler,lipitler, metabolitler veya biyolojik sistemlerde var olan farklı bileşenlerin aralarında olan etkileşimleri araştırarak, kişiye özel tedavi stratejileri geliştirilmesine, hastalıklarda erken teşhise, hastalıkların mekanizmalarının anlaşılabilmesine imkan sunar (92). Bilhassa kanser benzeri karmaşık hastalıkların erken tanı ve tedavisinde ve biyobelirteçlerin bulunmasında etkin bir yeri vardır. Günümüzde karmaşık birçok hastalığın başlıcada kanserin araştırılma süreçlerinde, ilaç keşiflerinde omiks teknolojileri kullanılmaktadır (93).Kanser hastaları için kişiselleştirilmiş hedefli tedaviye doğru ilerlerken, bu bilgileri tedavi sonuçlarını iyileştirmek için karar verme sürecine dahil etmek için metabolizmanın kanserden nasıl etkilendiğini anlamamız önemlidir "Metabolomik, kanser biyobelirteçlerini ve tümör oluşumunu tetikleyen unsurları tespit etmede kritik bir bilimsel yöntemdir (94). Omiks verilerin entegrasyonu, kanserin moleküler temelini daha iyi anlamamıza ve tedavi stratejilerini daha hassas bir şekilde yönlendirmemize yardımcı olur. Genomik, proteomik ve metabolomik verilerin birlikte kullanılması, daha kapsamlı bir biyolojik resim sunar ve bu da kişiselleştirilmiş tıp uygulamalarının yaygınlaşmasına katkıda bulunur. Örneğin, bireysel tümör profillerine dayalı tedavi planları, hastanın genetik ve biyokimyasal özelliklerine göre özelleştirilebilir ve bu da tedavi etkinliğini artırır (95, 96).

### 2.5.1. Genomik

Genomik, organizmaların epigenetik, genetik dizi bilgilerini araştırır. Biyolojik ürünlerin işlevlerini yapılarını öğrenmeyi hedefler. Sistematik şekilde organizmada var olan DNA'yı, / genomunu analiz eder. Fonksiyonel ve yapısal olarak iki farklı ana alt grubu vardır (97). DNA dizilimi, genom haritalaması gibi yöntemler ile organizmanın genetik olarak sahip olduğu bilgilerini karakterize eden yapısal genomiktir. Genlerin ekspresyon desenlerini; miktar, zaman, biçim olarak analiz eden fonksiyonel genomiktir.

### 2.5.2. Transkriptomik

RNA dizileme ve protein kodlamayan genler çalışmalarına ele alan bir bilim dalıdır. Belirli bir hücrede ya da özel koşullarda genom tarafınca üretilen tüm RNA transkriptlerin bütünü, esasen transkriptomu, yüksek verimlilikle analiz eder. Protein üretimde şablon görevinde olan, çevresel faktörlerle değişebilen, her an aktif bir şekilde ifade edilen genleri ifade etmekte olan transkriptom biyoinformatik yöntemler ve dizileme ile incelenir. Tüm bu analizler hücre düzeyinde olan işleyişi kavramak ve hastalıkların gelişim mekanizmasını anlamada önemli bir yere sahiptir. Bunun yanı sıra mRNA seviyesindeki anormallikleri ve onkogenез süreçlerindeki etkilerini belirleyerek kanser araştırmalarında önemli bilgiler sunar (98).

### 2.5.3. Proteomik

Bir hücrede, dokuda ya da organizmada meydana gelen tüm proteinlerin ifadelerini, etkileşimlerini, modifikasyonlarını inceler. Bu disiplin proteinlerin nasıl bir şekilde işlediklerini, nasıl etkileşim kurduklarını anlayabilmek için protein ağlarını kullanarak bilginin akışını elde eder. Sürekli değişen yapısı sayesinde biyobelirteç keşifleri için önemlidir. Proteomik, hastalıkların erken tanısında, hastalık süreçlerinin takibinde ve yeni ilaçlar geliştirilmesinde kritik bir role sahiptir. Kanser araştırmalarında özellikle, protein etkileşimlerini ve kanserin oluşum mekanizmalarını daha iyi kavrayabilmek amacıyla kullanılır. Kütle spektrometrisi, proteomun daha detaylı incelenmesine olanak sağlar. Bu durumda; proteomik analizlerin hücresel süreçleri gerçek zamanlı olarak görüntü sağlama yeteneğini artırır.

### 2.5.4. Metabolomik

Düşük moleküler ağırlıklı olan organik ve inorganik (<1.500 Da) metabolitleri detaylı bir şekilde inceler (99). Metabolitler çeşitli biyolojik bileşenlerin temelindedirler. Enerji üretimi sinyalizasyon, metabolizma ve düzenleme gibi durumlarda kritik bir yere sahiptir. Lipidlerin biyosentezi, glukoz ve glutamin metabolizması, mitokondriyal işlevler şeklideki hücresel durumları detaylıca analiz eder. Bu süreçlerden elde edilen sonuçlar patofizyolojik süreçlerin anlaşılıp

tanımlanmasında, biyobelirteç keşiflerinde, ilaç etkinliklerini öğrenebilmekte kullanılır.

### **2.5.5. Lipidomik**

Sistem biyolojisinin dallarından biri olan lipidomik; lipid metabolizmasını kapsamlı olarak inceler. Canlı organizmalardaki özgün olan farklılıkların biyokimyasal temellerine ışık tutmayı hedefler. Son on yıl içerisinde gelişmiştir (100). Hücre ve organellerin zar kısmında bulunur. Enerji deposu, sinyalizasyon, membran matrisleri gibi kapsamlı fonksiyonlarda önemli bir yeri vardır.

### **2.5.6. Bütünleşik Omiks Analizler**

Omiks çalışmaları; daha çeşitli verileri sunmayı hedefler. Çok faktörlü kompleks hastalıklarda geleneksel metotlar yeterli gelmeyebilir. Bu metotlarda çoğunlukla tek bir metabolit-gen -protein üzerine odaklanılmasından dolayı. Bu araştırmaların amacı incelenen biyoloji sistemi daha detaylı anlamak, fenotip ve genotip arasında olan nedensel ve işlevsel ilişkileri ortaya koymak adına lipid-protein-metabolit gibi ara moleküler düzeydeki bileşenleri incelemenin önemini vurgular. Bütünleşik omiks yaklaşımları proteomik, metabolomik ve lipidomik metodolojisinden gelen bilgileri kullanılarak genotip ile fenotip ilişkilerini aydınlatmaya dayalıdır (101, 102).

### **2.5.7. Metabolomik ve Lipidomik İlişkisi**

Hücre metabolik ürün olan lipitler çoğunlukla metabolomik çalışmaların bir kısmı olarak ele alınır ve bunların içerisinde bazı lipit sınıflarını da belli bir aşamaya kadar inceler (103). Fakat lipitlerin suya çözünmeyen yapısı özgün-kimyasal ve fizikler yapılarıncı metabolomik çalışmalardan ayrı olarak değerlendirilmelidir. Sınıflandırılan lipitler yüzlerce daha yüksek miktarda bireysel lipit türüne sahiptir. Metabolik ağlardaki değişimlerini-farklılaşmalarını kimyasal yapıları direkt sunmaz. Bundan dolayı analizlerde lipidomik metabolomikten ayrı olarak yapılması kritiktir.



### 2.5.8. Metabolomik ve Lipidomik Analizler

Hedeflenmiş ve hedeflenmemiş olarak temelde ikiye ayrılırlar. Hedefe yönelik olan şekilde belirli bir moleküler grupta olan kısıtlı sayıdaki molekülün verilerini niceliksel olarak toplayarak bunlarında alakalı biyokimyasal yollardaki farklılıkları incelemek üzerine odaklanmış yaklaşımlarla değerlendirir. Nicel ya da yarı nicel şeklinde, iç standartlar yardımıyla hedeflenmemiş analizler gerçekleşir. Hedeflenmiş olan çalışmalarda analizi belirlenen metabolit-lipitlerin standartları ele alınıp optimize edilen analitik yöntemlerle analiz yapılır. Hedeflenmeyen analizde ise örnekte var olan bilinmeyen tüm moleküllerde dahil kapsamlı analiz yapılır. Hedeflenmemiş analizlerin esas amacı örnekte var olan metabolom-lipidom profilini detaylı bir şekilde ortaya koymaktır. Gaz kromatografisi kütle spektrometresi (GC-MS) sistemleri, gaz kromatografisi ve kütle spektrometresi tekniklerinin entegrasyonu ile meydana gelir. Analiz sırasında, örnekler ilk olarak GC kolonunda ayrılır ve daha sonra bir transfer hattı aracılığıyla kütle spektrometre cihazına aktarılır. Kromatografi içinde, iki veya daha çok bileşen içeren bir numune, kolon içindeki iki farklı faz arasında dağıtılarak bileşenlerin birbirinden ayrılması ile gerçekleşir. Bu süreçte hareketli faz gaz formundadır ve numuneler bu hareketli ve sabit fazlar arasında dağılıma tabi tutulur. GC, karışımları ayırmak için kullanılırken, kütle spektrometresi ayrılan bileşenlerin yapısal tanımlanmasını mümkün kılar. Sıvı kromatografisi-kuadropol uçuş zamanlı kütle spektrometresi (LC-qTOF-MS) teknolojileri sıvı kromatografisinin ayırıştırma kapasitesi ile kütle spektrometresinin analiz yeteneklerinin bir araya getirildiği sistemler olarak tanımlanabilir. İncelenen örnekler, fiziksel karakteristiklerine bağlı olarak sınıflandırılır ve hem quadropol hem de uçuş zamanlı algılayıcılar kullanılarak, oldukça düşük konsantrasyon seviyelerinde dahi, bileşenlerin tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesi ( $\mu\text{g/L}$  ve  $\text{ng/L}$  düzeyde) mümkün kılınır.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

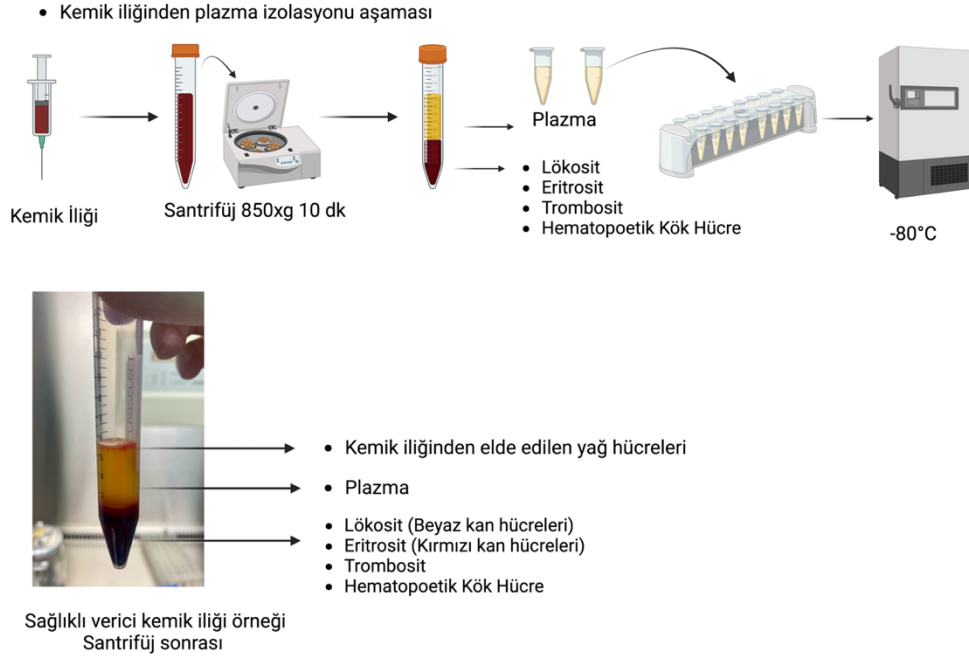
#### 3.1. Hasta ve Sağlıklı Verici Seçimi, Biyolojik Örneklerin Alınması

Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi'nde bulunan Kemik İliği Transplantasyon Merkezi'nde, farklı hastalıklar için hematopoetik kök hücre nakilleri gerçekleştirilmektedir. Bu nakil işlemi öncesinde, sağlıklı vericilerden kemik iliği ürünü toplanmaktadır. Bunun yanı sıra Pediatrik Hematoloji Bölümü'nde tanı alan AML hastalarında da tanı ve izlem amaçlı kemik iliği örnekleri rutin testler kapsamında alınmaktadır. Elde edilen bu örneklerin bir kısmı hasta/ebeveyn onamları alındıktan sonra, etik kurul onayları (HÜ Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu, GO 22/981) alınmış olan ilgili laboratuvar araştırmaları kapsamında kullanılmak üzere Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne (PEDI-STEM) gelmektedir. Kemik iliği örneklerinden elde edilen plazma ve mononükleer hücreler araştırmada kullanılmak üzere dondurularak hücre arşivinde saklanmaktadır. Çalışmamızda da bu hasta ve sağlıklı gönüllü vericilere ait kemik iliği plazma örnekleri kullanılmıştır. Kemik iliği plazma örnekleri 15 sağlıklı verici ve 28 AML hastasından (23 AML yeni tanı, 5 nüks (relaps) AML (remisyon) elde edilmiştir. Analizlerde 28 yeni tanı veya nüks hastalıkla gelen AML hasta örneği ve 5 tanede remisyon hastalık anında alınan AML Kİ plazma örneği olmak üzere toplam 33 örnek kullanılmıştır. Ayrıca 4 tanı-remisyon çifti, 1 relaps-remisyon çifti olan AML hasta örneği mevcut olduğu için toplamda 5 hastanın tedavi öncesi ve tedavi sonrası kemik iliği plazma örnek çiftlerinin değerlendirilmesi mümkün olmuştur. Kontrol grubu örnekleri AML hasta ortalama yaş aralığı ile eşleştirilerek seçilmiştir. AML tanısı olan 28 hastanın yaş ortalaması 10,5 (minimum: 2,5 – maksimum: 16), erkek/kız oranı: 10/18. AML tanılı hastalarda en sık görülen alt tip M4-M5 olarak izlenmiştir. Hasta grubuna sekonder AML hastaları da dahil edilmiştir. Sağlıklı vericilerin yaş ortalaması 11,06 (minimum:5 – maksimum: 16) ve erkek/kız oranı: 7/8'dir.

##### 3.1.1. Kemik İliği Örneklerinden Plazma Örneği Toplanması

Gelen Kemik iliği örneği heparinli şırıngadan şırınganın ucu çıkartılarak 15 mL olan santrifüj tüpüne aktarılmıştır. 805 x g frenli oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj (Eppendorf, kat no #5810) sonrası saydam açık renkli ve düzgün

ayrılmış plazma tabakası oluşmuştur. Bu tabaka eppendorf tüplerine aktarılarak, daha sonra kullanılmak için  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de dondurularak saklanmıştır.



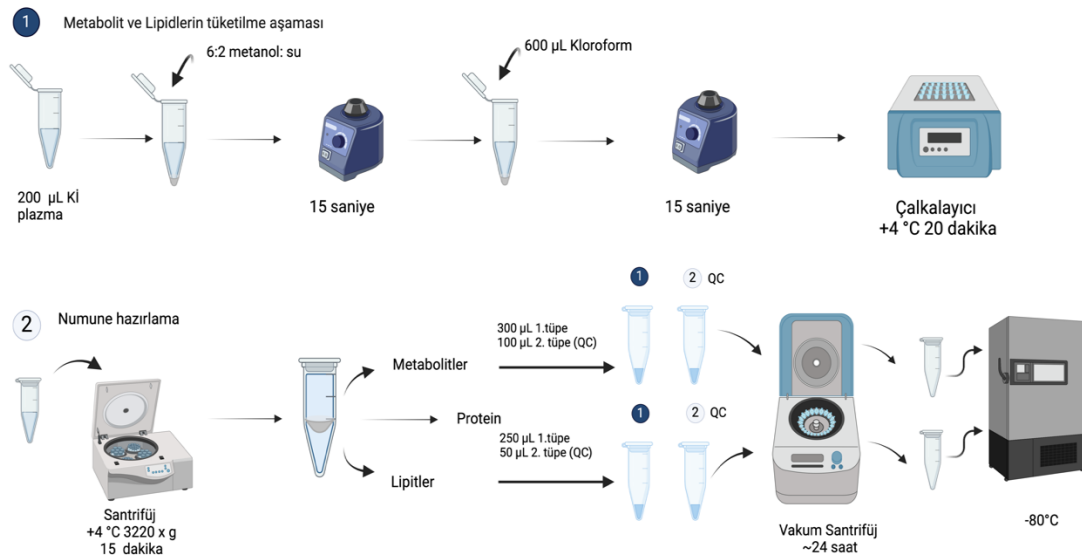
**Şekil 3.1.** Kemik iliği örneklerinden plazma örneği ayrılması (104).

### 3.2. Metabolomik Analizler

#### 3.2.1. Örnek Hazırlama

Derin dondurucuda saklanan ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) plazma örnekleri çözdürülmüştür. Çözdürülen örneklerden  $200\ \mu\text{L}$  çekilip yeni  $2\ \text{mL}$ 'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Her bir santrifüj tüpüne 6:2 oranında Metanol:su (Merck/67-56-1, Isolab/7732-18-5)  $800\ \mu\text{L}$  eklenmiştir. 15 saniye boyunca vorteks yapılmıştır. Vorteks sonrasında her bir santrifüj tüpüne  $600\ \mu\text{L}$  Kloroform (Merck/67-66-3) eklenmiştir. 15 saniye boyunca vorteks yapılmıştır.  $+4^{\circ}\text{C}$  ayarlanmış etüv içerisinde, örnekler çalkalayıcı (dakikada  $\sim 250$  devirde) üzerine konularak 20 dakika boyunca bekletilmiştir. Bekleme esnasında santrifüj  $+4^{\circ}\text{C}$  ayarlanır. Örnekler  $3220\ \text{x g}$   $+4^{\circ}\text{C}$  'de 15 dakika santrifüj (Eppendorf, kat no #5810 R) edilmiştir. Santrifüj sonrası örnekler dikkatlice cihazdan alınmıştır. Tüplerde 3 faz görünmektedir üst fazı metanol:su, ara fazı pellet, alt fazı ise kloroform fazından oluşmuştur. Her bir örneğin oluşan üst fazından, ara fazına dokunmadan GC-MS analizleri için  $300\ \mu\text{L}$  çekilip yeni santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Metabolomik

analizler için gerekli olan kalite kontrol (QC) havuzları oluşturmak amacıyla, tüplerde kalan üst fazdan, 100'er  $\mu\text{L}$  çekilerek, 50 mL'lik santrifüj tüpüne aktarma yapılmıştır. Oluşan alt fazdan daha sonraki LC-qTOF-MS çalışmalarında kullanılmak için 250'şer  $\mu\text{L}$  çekilip yeni santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Lipidomik analizler için gerekli olan kalite kontrol (QC) havuzları oluşturmak amacıyla, tüplerde kalan üst fazdan, 50'şer  $\mu\text{L}$  çekilerek, 50 mL'lik santrifüj tüpüne aktarma yapılmıştır. 80°C'de dondurularak saklanmıştır. Ara fazda oluşan pellet daha sonrasında proteomik çalışmaları yapılmak amacıyla tüpte bırakılmış, direkt- 80°C'de dondurularak saklanmıştır. Metabolomik ve lipidomik analizler için olan santrifüj tüpleri 24 saat boyunca vakumlu santrifüjde uçurulmaya bırakılmış, 24 saatin sonunda -80 °C'e kaldırılmıştır.



**Şekil 3.2.** Metabolomik ve Lipidomik analizler için örneklem hazırlanma aşamaları (104).

### 3.2.2. GC-MS Temelli Metabolomik Analizler için Türevlendirme

-80 °C'deki metabolomik analizler için olan örnekler ve QC tüpleri 10 dakika vakumlu santrifüjde tekrardan uçurulur. Kuruluğa kadar uçurulmuş, örneklere 20  $\mu\text{L}$  MeOX (piridin içerisinde 20 mg/mL) (Sigma/593-56-6) çözeltisi eklenmiştir ve örnekler 30 °C'ye ayarlanmış etüvde 90 dakika boyunca çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminde örneklere 50  $\mu\text{L}$  MSTFA + %1 TMCS

(Sigma/24589-78-4) eklenmiştir ve örnekler 15 saniye boyunca vorteks yapılmıştır. Vorteks sonrasında örnekler 37 °C ayarlanmış etüvde 30 dakika boyunca çalkalayıcı üzerinde inkübe edilerek türevlendirilmiştir. Türevlendirilen örnekler GC-MS viallerine aktarılmıştır. GC-MS (Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra, Kyoto, Japan) cihazında analiz yapılmıştır.

### 3.2.3. LC-qTOF-MS Temelli Lipidomik Analizler

80°C den alınan örneklerin oda sıcaklığına gelmesi beklenir. Tüm tüpler bir arada 48 tüp (Sağlıklı verici + AML) +6 Adet QC-C Tüpü =54 Tüp. Viallere insertleri yerleştir ve numaralandır. 7:3 IPA: Asetonitril (Isolab/67-63-0, Isolab/75-05-8) solüsyonundan her bir eppendorfa 200 µl eklenir. Hazırlanan bu solüsyon tüpte pipetaj yapılır ve her bir eppendorf içerisine 200 µl olacak şekilde eklenir. Her bir tüp 1 dakika boyunca vortekslenir. Tüplerdeki süpernatant kısmı pellete dokunmadan 190 µl çekilip viallere aktarıldı. Hazır olan örnekler run işlemi için LC-qTOF-MS (Agilent 6530 accurate-mass, California, USA) cihazına alınır. Cihaz analiz kısmından önce faz için solüsyonlar hazırlanır. Solüsyon A (1000 ML): 6:4 Su: Asetonitril ,10 mM (Milimolar, Amonyum Format, %0,1 Formik asit. Solüsyon B (1000 ML) 7:4 IPA: Asetonitril ,10 mM (Milimolar) Amonyum Format (Sigma/540-69-2), %0,1 Formik asit (Merck/64-18-6).

### 3.2.4. Bütünleşik Veri Analizi için Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

Metabolomik ve lipidomik analizler için bütünleşik veride, veri dekonvolüsyonu, pik hizalama, normalizasyon ve veri matrisi oluşturma işlemleri MS-DIAL (ver. 4.92) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen nihai veri matrisi çok değişkenli analizlerin yapılması için MetaboAnalyst programına aktarılmıştır. Temel Bileşen Analizi-*Principal Component Analysis* (PCA), çok değişkenli analizler kapsamında kısmi en küçük kareler farklılaştırma analizi-*Partial Least Squares Discriminant Analysis* (PLS-DA), analizlerindeki farklılaşmaya neden olan metabolitlerin bulunması için Projeksiyondaki Değişken Önem Derecesi-*Variable important in projection* (VIP) grafiklerinden yararlanılmıştır. En yüksek VIP değerine sahip metabolit veya lipit ayırımında en büyük etkiye sahip metabolit veya lipit olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna karşı hasta grupları arasında istatistiksel olarak

anlamli değişen metabolitler ve lipitler t-testi ile belirlenmiş ve gruplara ait ortalama ve standart hata değerleri hesaplanmıştır. Yine T-testi sonuçları kullanılarak Volkan grafikleri oluşturulmuştur. Örneklerin veya metabolitlerin benzerliklerine göre gruplandırılması için ısı haritası analizi kullanılmıştır. AML'de kullanılabilecek potansiyel metabolik biyobelirteçlerin belirlenmesi için ayırt edici gücü (kontrol grubuna karşı) yüksek olan metabolitler çok değişkenli İşlem karakteristik eğrisi - *Receiver Operating Characteristic* (ROC) kullanılarak biyobelirteç analizleri gerçekleştirilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalar sonrası elde edilen önemli metabolitlerin rol oynadığı çeşitli biyoenerji/metabolik yolakların etki düzeylerini değerlendirmek için yolak analizleri yapılmıştır.

Herhangi bir istatistiksel test kullanmadan, varyans-covaryans matrisi veya korelasyon matrisi üzerinden özdeğerler ve özvektörler hesaplayarak veri boyutunu azaltır ve veri setindeki ana bileşenleri ortaya çıkarır. Veri setinde sistemik bir hata olup olmadığını görselleştirir. AML ve sağlıklı verici örnekleri arasındaki genel metabolik farklılıkları belirlemek için kullanılmıştır.

Sınıflandırma başarısını değerlendirmek için çapraz doğrulama (cross-validation) ve permütasyon testleri yapılır. PLS-DA'nın temel amacı, veri setindeki sınıflar arasındaki ayırımı maksimize edecek şekilde boyut indirgeme yapmaktır. PLS-DA analizinde, VIP skorları, gruplar arasında önemli metabolik farklılıkları gösteren bileşenleri belirlemeye yardımcı olur. VIP skorları yüksek olan bileşenler, analiz edilen koşullar altında özellikle önemli olan metabolitleri işaret eder.

Volkan grafikleri oluşturmak için genellikle t-testi veya ANOVA kullanılır. Bu istatistiksel testler, her bir metabolitin anlamlılığını (p-değeri) ve etki büyüklüğünü (rneğin, kat değişimi) hesaplamak için kullanılır. Bu, AML'yi karakterize eden potansiyel biyobelirteçleri belirlemeye yardımcı olabilir. Volkan grafikleri,  $-\log_{10}(p\text{-değeri})$  ile kat değişim arasındaki ilişkiyi gösterir ve genellikle diferansiyel ifade analizinde kullanılır. Bu grafik, istatistiksel olarak anlamlı ve biyolojik olarak önemli değişiklikleri olan metabolitleri/biyobelirteçleri belirlemeye yardımcı olur.

Isı Haritası Analizi oluştururken genellikle hiyerarşik kümeleme analizi kullanılır. Bu analiz, örneklerin veya metabolitlerin benzerliklerine göre

gruplandırılmasını sağlar. Örnekler arasındaki benzerlikleri ve farklılıkları görsel olarak ortaya çıkarmak için kullanılır.

ROC eğrisi analizi, bir sınıflandırıcı veya belirtecin performansını değerlendirmek için kullanılır. ROC eğrisi, gerçek pozitif oranı (TPR) ile yanlış pozitif oranı (FPR) arasındaki ilişkiyi grafik üzerinde gösterir. AUC (Area Under the Curve-Eğri Altı Alan), modelin performansını değerlendirmek için kullanılır. ROC analizi, bir biyobelirtecin hastalığı tanıma yeteneğini değerlendirir. Bu, metabolitlerin AML tanısında kullanılabilirliğini değerlendirmek için kullanılır.

ROC Görünümü: Bu görünüm, seçilen özellikler için ROC eğrilerini görselleştirir. Eğriler, sınıflandırma modelinin performansını değerlendirmek için kullanılır ve her eğri, modelin farklı kesme noktalarındaki duyarlılık ve özgüllüğünü gösterir.

Olasılık Görünümü: Bu görünüm, her bir örnek için sınıflandırma modelinin tahmin olasılıklarını gösterir. Bu olasılıklar, modelin örneklerin hangi sınıfa ait olduğu konusunda ne kadar emin olduğunu yansıtır.

Tahmin Görünümü: Bu görünüm, model tarafından yapılan tahminlerin bir özeti sunar. Hangi örneklerin hangi sınıfa atandığını ve modelin genel doğruluğunu görmek için kullanılır.

Önemli Bileşenler: İstatistiksel olarak anlamlı özelliklerin listesini sunar. Bu özellikler, modelin sınıfları ayırt etmede kullandığı ve yüksek performans gösterdiği anahtar bileşenlerdir.

Yolak analizi, belirli metabolik yolakların hastalık durumuyla nasıl ilişkili olduğunu belirlemek için kullanılır. Yeni terapötik hedeflerin araştırılmasına ve hastalığın moleküler mekanizmalarının keşfedilmesine yardımcı olur.

#### 4. BULGULAR

Lösemi tanısında, tedavi sonrasında ve relaps/refrakter hastalık durumunda lösemik hücre metabolizmasında izlenen dinamik değişimlerin en iyi göstergesi lösemi nişinin metabolik profilinin çıkarılmasıdır. Bu amaçla, projemiz kapsamında *in vivo* lösemik nişteki metabolik ortamı en iyi yansıttığı kabul edilen, kemik iliği plazma örnekleri kullanılarak AML hastaları ve sağlıklı vericiler arasında karşılaştırmalı metabolom analizleri yapılmıştır. Bu amaçla belirlenen gruplar arasındaki tüm metabolik değişimlerin tespit edilebilmesi için iki farklı analitik platform kullanılarak (GC-MS ve LC-qTOF-MS); hedeflenmemiş metabolom/lipidom analizleri gerçekleştirilmiştir. Karşılaştırmalı analizler için 3 ana grup oluşturulmuştur. Birinci grupta (Grup 1), lösemik hücre kitlesinin kemik iliği nişinin metabolik profilinde neden olduğu değişimleri değerlendirebilmek için AML hasta örnekleri (n=28, yeni tanı ve relaps hastalık) ile sağlıklı verici örnekleri (n=15) karşılaştırılmıştır. İkinci grupta (Grup 2), tedavi sonrası lösemik hücre kitlesinin temizlenmesi ile kemik iliği metabolik profilindeki değişimi gösterebilmek amacı ile indüksiyon kemoterapisi verildikten sonra remisyona giren AML hasta örnekleri (n=5) ile tedavi öncesi AML hasta örnekleri (n=28) karşılaştırılmıştır. Üçüncü grupta ise (Grup 3), tedavi sonrası remisyona giren AML örnekleri (n=5) ile verici örneklerine (n=15) karşılaştırılarak iyileşen AML hastalarında kemik iliği metabolik profilindeki değişim ile ilgili bilgi edinilebileceği öngörülmüştür. Ayrıca AML tanı, remisyon ve relaps hastalık süreçlerinde kemik iliği nişinde metabolik profilin değişimi ile ilgili daha detaylı bilgi edinilebilmek için 5 farklı alt grup (Grup5-8) daha oluşturulmuştur (Şekil 4.20 ve tablo 4.4). Ancak bu gruplara ait bütünleşik veriler ile yapılan detaylı analizler sunulmamıştır. Belirlenen üç ana grup için bütünleşik veriler kullanılarak tüm istatistiksel analizler yapılmıştır. Belirlene 3 ana grupta metabolitlerin karşılaştırılması için t-test yapılmış,  $p < 0.05$ 'in olan istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren metabolitler ile üçlü Venn diyagramı oluşturulmuştur. Daha sonra bu gruplar (Grup1-3) içerisinde her bir gruba spesifik olan dolayısı ile AML'de hastalık süreci ilişkili değişken metabolik profili belirlemede önemli olabilecek metabolitler belirlenmiştir. PCA, PLS-DA, VIP grafiği, volkan grafiği, ısı haritası analizi yapılarak elde edilen veriler görselleştirilerek tek değişkenli ve çok değişkenli istatistiksel analiz sonuçları her üç grup için ayrı ayrı sunulmuştur. Ayrıca sadece GC-MS analiz platformundan elde



edilen metabolik veriler kullanılarak (lipidom analiz verileri dahil edilmeksizin) yolak analizleri gerçekleştirilmiştir. Yolak analizleri ile AML'de hastalık ile ilişkili ve hastalık sürecinde (tanı, remisyon, relaps hastalık) önemli olabilecek sağlıklı vericiler ile yapılan karşılaştırmada farklılık gösteren önemli metabolik yolaklar belirlenmiş ve bu yolakların ilişkili olduğu seçilmiş metabolitler gösterilmiştir. Diğer alt gruplar sırasıyla; Grup 4,5,6,7, ve 8 olarak isimlendirilmiştir. Grup 4'te; yeni tanı AML (n=23) örnekleri ile sağlıklı verici örnekleri (n=15), Grup 5'te relaps AML tanısı ile gelen örnekler (n=5) ile sağlıklı verici örnekleri (n=15), Grup 6'da remisyonadaki hasta örnekleri ile (n=5) AML yeni tanı hasta örnekleri (n=23), Grup 7'de AML yeni tanı hasta örnekleri ile (n=23) relaps AML örnekleri (n=5), ve Grup 8'de ise aynı hastalardan alınmış (n=5) tanı/relaps hastalık anında alınan örnekler ile remisyon örnek çiftleri karşılaştırılmıştır.

#### 4.1. Kemik İliği Plazma Örneklerine ait Bütünleşik (Metabolomik ve Lipidomik) Veri Genel Analiz Sonuçları

Grup 1'e ait analizler kapsamında AML hasta (tanı/relaps hastalık) ile sağlıklı verici örnekleri incelendiğinde toplam 257 metabolit tespit edilmiş ve bunlardan 84 tanesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 4.1).

**Tablo 4.1.** Grup 1 bütünleşik omiks verisi ile tanımlanan metabolitler ve istatistiksel analiz sonuçları

METABOLİT	AML (tanı /relaps hastalık) (ortalama ± SH)	SAĞLIKLI VERİCİ (ortalama ± SH)	P değeri
CAR 18:1	1.016±0.135	1.046±0.151	0.888
Cer 40:1;2O Cer 18:1;2O/22:0	0.483±0.169	1.463±0.882	0.157
CL 69:1 CL 16:0 18:0 18:0 17:1	1.173±0.24	0.62±0.156	0.121
DG 32:0 DG 16:0_16:0	0.747±0.258	0.831±0.124	0.819
<b>DG 34:2 DG 16:0_18:2</b>	1.017±0.31	0.09±0.048	0.036
FA 14:0	0.949±0.143	1.085±0.142	0.544
FA 16:0	0.892±0.1	1.144±0.106	0.114
FA 16:1	0.977±0.179	1.087±0.204	0.704
<b>FA 18:0</b>	0.917±0.026	1.142±0.091	0.005
<b>FA 18:3</b>	0.58±0.09	1.905±0.338	0.000
FA 20:3;3O	1.382±0.665	0.548±0.115	0.369
FA 22:5	0.863±0.288	1.422±0.253	0.207
FA 38:8	1.171±0.21	0.611±0.063	0.062
FA 42:5	0.775±0.277	1.623±0.537	0.127
Hex2Cer 34:1;2O Hex2Cer 18:1;2O/16:0	0.703±0.192	1.569±0.965	0.253
Hex3Cer 34:1;2O Hex3Cer 18:1;2O/16:0	0.977±0.093	1.08±0.293	0.677
LPC 14:0/0:0	0.872±0.092	0.998±0.132	0.430
LPC 16:0/0:0	0.956±0.083	1.135±0.136	0.240
LPC 16:1/0:0	0.93±0.118	0.87±0.132	0.754
LPC 18:0/0:0	0.92±0.081	1.194±0.111	0.053
LPC 18:1/0:0	0.888±0.07	1.13±0.115	0.065
LPC 18:2/0:0	0.871±0.101	1.181±0.158	0.092
LPC 18:3/0:0	0.988±0.048	1.047±0.081	0.502
<b>LPC 19:0/0:0</b>	0.759±0.094	1.548±0.162	0.000
<b>LPC 20:0/0:0</b>	0.641±0.092	1.741±0.135	0.000

LPC 20:3/0:0	0.845±0.1	1.159±0.119	0.061
LPC 20:4/0:0	1±0.139	0.883±0.103	0.575
<b>LPC 22:0/0:0</b>	0.214±0.029	2.676±0.979	0.001
LPC 22:6/0:0	0.947±0.125	0.965±0.214	0.938
<b>LPC 24:0/0:0</b>	0.612±0.079	1.73±0.498	0.005
LPC O-18:0	0.981±0.153	1.066±0.106	0.705
MG 16:0	0.972±0.072	1.17±0.036	0.061
MG 20:0	0.96±0.045	1.138±0.122	0.107
<b>NAE 13:0</b>	0.914±0.079	1.2±0.054	0.018
<b>NAE 20:0</b>	0.888±0.081	1.283±0.139	0.012
PC 31:0	1.01±0.107	0.916±0.23	0.673
<b>PC 32:2 PC 16:1_16:1</b>	0.559±0.078	1.677±0.339	0.000
PC 33:2 PC 15:0_18:2	1.021±0.096	0.956±0.417	0.844
<b>PC 33:4</b>	1.107±0.154	0.496±0.178	0.018
PC 34:1 PC 16:0_18:1	0.85±0.4	0.006±0.001	0.133
<b>PC 34:3</b>	0.75±0.1	1.321±0.271	0.022
<b>PC 34:4</b>	0.534±0.071	1.764±0.399	0.000
PC 35:1	0.703±0.376	0.073±0.016	0.230
PC 35:3	0.797±0.087	1.334±0.465	0.140
PC 35:4 PC 17:2_18:2	0.929±0.108	1.068±0.282	0.586
<b>PC 36:0</b>	0.029±0.006	0.076±0.013	0.001
PC 36:1 PC 16:0_20:1	0.73±0.339	0.596±0.329	0.800
PC 36:2 PC 18:1_18:1	0.8±0.263	0.748±0.556	0.925
PC 36:3	0.867±0.197	0.824±0.202	0.889
<b>PC 36:4 PC 18:2_18:2</b>	0.454±0.055	2.161±0.885	0.012
<b>PC 36:5</b>	0.4±0.055	2.176±0.404	0.000
PC 37:2	0.752±0.153	1.406±0.358	0.057
PC 37:5 PC 17:1_20:4	0.837±0.118	1.216±0.391	0.253
PC 37:6	0.128±0.024	2.918±2.673	0.157
PC 38:4	0.877±0.101	1.161±0.326	0.305
PC 38:6	0.85±0.056	1.296±0.441	0.181
PC 38:7	1.15±0.062	0.76±0.278	0.082
PC 40:4	0.796±0.392	0.336±0.037	0.399
PC 40:5	0.384±0.063	0.566±0.054	0.063
PC 40:6	0.898±0.421	0.49±0.117	0.488
PC 40:7	0.897±0.115	1.113±0.246	0.369
<b>PC 40:8</b>	0.687±0.087	1.623±0.253	0.000
PC O-33:1 PC O-17:1_16:0	1.091±0.598	0.689±0.096	0.629
PC O-34:0	0.911±0.365	0.224±0.04	0.179
<b>PC O-34:0;20 PC O-17:0 17:0;20</b>	0.775±0.14	1.654±0.47	0.030

PC O-34:2	0.788±0.239	0.792±0.206	0.991
PC O-35:0 PC O-19:0_16:0	0.265±0.08	0.354±0.063	0.458
<b>PC O-37:0 PC O-19:0_18:0</b>	0.04±0.013	1.1±0.233	0.000
<b>PC O-37:1 PC O-19:1_18:0</b>	0.66±0.117	1.663±0.284	0.000
<b>PC O-37:3 PC O-19:2_18:1</b>	0.537±0.053	2.012±0.39	0.000
PC O-37:7	0.975±0.114	1.103±0.337	0.663
PC O-39:3 PC O-19:0_20:3	1.207±0.346	0.9±0.11	0.528
<b>PC O-39:4 PC O-19:0_20:4</b>	0.609±0.094	1.867±0.259	0.000
PC O-39:5 PC O-17:0_22:5	0.995±0.161	1.121±0.165	0.619
PC O-39:6 PC O-21:4_18:2	1.158±0.306	1.038±0.243	0.794
<b>PC O-40:4</b>	0.601±0.098	1.72±0.281	0.000
<b>PC O-41:7 PC O-19:1_22:6</b>	0.525±0.083	1.966±0.411	0.000
PC O-50:8	1.415±0.547	0.062±0.037	0.079
PE O-35:1 PE O-17:0_18:1	0.782±0.128	1.109±0.225	0.181
PE O-35:2 PE O-17:0_18:2	0.823±0.196	1.363±0.235	0.098
<b>PE O-37:1 PE O-19:0_18:1</b>	0.772±0.145	1.478±0.264	0.014
<b>PE O-37:2 PE O-19:0_18:2</b>	0.774±0.036	1.501±0.226	0.000
<b>PE O-37:3 PE O-19:1_18:2</b>	0.626±0.101	1.697±0.251	0.000
PE O-37:4 PE O-17:0_20:4	0.794±0.188	1.375±0.21	0.059
PE O-39:3 PE O-19:0_20:3	0.814±0.198	1.506±0.375	0.079
<b>PE O-39:4 PE O-19:0_20:4</b>	0.673±0.18	1.619±0.277	0.005
PE O-39:5 PE O-21:4_18:1	0.837±0.146	1.196±0.163	0.130
PE P-38:4 PE P-18:0_20:4	0.878±0.418	0.48±0.06	0.494
<b>PI 58:11</b>	1.52±0.248	0.018±0	0.000
PI O-37:1 PI O-19:0_18:1	0.851±0.149	1.355±0.267	0.081
PI O-37:3 PI O-19:1_18:2	0.533±0.148	0.413±0.165	0.611
<b>PI O-39:4 PI O-19:0_20:4</b>	1.438±0.347	0.049±0.017	0.006
<b>PI O-39:5 PI O-19:1_20:4</b>	1.217±0.135	0.273±0.115	0.000
PI O-39:6 PI O-17:0_22:6	0.898±0.16	0.721±0.293	0.565
<b>SL 48:6;O</b>	0.763±0.107	1.518±0.183	0.000
SL 49:4;O	1.431±0.872	0.41±0.118	0.400
SM 30:2;2O	0.771±0.182	0.853±0.113	0.757
<b>SM 31:1;2O</b>	0.686±0.081	1.376±0.263	0.003
<b>SM 32:0;2O SM 19:0;2O/13:0</b>	0.734±0.095	1.348±0.338	0.032
<b>SM 32:2;2O SM 18:2;2O/14:0</b>	0.713±0.084	1.371±0.15	0.000
<b>SM 32:6;3O</b>	1.095±0.073	0.814±0.089	0.023
SM 33:1;2O	0.775±0.086	1.306±0.375	0.080
SM 33:2;2O SM 16:2;2O/17:0	0.787±0.113	1.204±0.226	0.071
SM 34:1;2O	0.904±0.15	0.984±0.198	0.752

SM 34:1;3O	0.78±0.067	1.494±0.557	0.092
<b>SM 34:2;2O SM 18:2;2O/16:0</b>	0.612±0.054	1.787±0.481	0.002
SM 35:1;2O	1.033±0.198	0.721±0.095	0.273
SM 35:2;2O	0.889±0.12	1.112±0.323	0.440
<b>SM 35:4;2O</b>	1.081±0.184	0.483±0.134	0.033
SM 36:1;2O SM 27:1;2O/9:0	1.019±0.331	0.368±0.077	0.163
SM 36:2;2O	0.963±0.074	1.004±0.352	0.883
SM 36:4;2O SM 19:2;2O/17:2	0.923±0.255	0.953±0.346	0.945
SM 38:1;2O SM 25:1;2O/13:0	1.575±1.353	0.012±0.005	0.406
SM 38:2;2O	0.873±0.272	0.883±0.294	0.981
SM 39:1;2O	0.748±0.334	0.17±0.062	0.217
SM 40:1;2O	0.616±0.452	0.314±0.069	0.631
SM 40:2;2O SM 18:1;2O/22:1	0.885±0.207	0.513±0.27	0.289
SM 41:1;2O SM 18:1;2O/23:0	0.808±0.526	0.104±0.031	0.337
SM 41:2;2O	1.113±0.468	0.076±0.074	0.116
<b>SM 42:1;2O SM 18:1;2O/24:0</b>	0.58±0.247	1.703±0.599	0.048
<b>SM 42:2;2O</b>	0.235±0.065	2.6±1.609	0.050
<b>SM 43:1;2O SM 18:1;2O/25:0</b>	0.402±0.176	2.191±0.844	0.010
SM 43:2;2O SM 18:1;2O/25:1	1.024±0.27	0.579±0.12	0.250
<b>SMGDG 38:4</b>	1.137±0.198	0.406±0.275	0.036
<b>SMGDG 49:6</b>	0.478±0.047	2.146±0.346	0.000
SMGDG O-35:1 SMGDG O-17:0 18:1	1.105±0.341	0.267±0.097	0.084
<b>SMGDG O-35:2 SMGDG O-17:0 18:2</b>	1.437±0.181	0.028±0.017	0.000
<b>SMGDG O-37:2 SMGDG O-19:0 18:2</b>	1.241±0.187	0.425±0.134	0.005
<b>SMGDG O-37:4 SMGDG O-17:0 20:4</b>	1.317±0.203	0.047±0.02	0.000
SMGDG O-39:3 SMGDG O-19:0 20:3	0.107±0.021	2.934±2.041	0.063
<b>SMGDG O-41:6 SMGDG O-19:0 22:6</b>	1.448±0.323	0.065±0.048	0.003
<b>ST 27:1;O</b>	0.982±0.114	0.661±0.157	0.105
<b>TG 24:0 TG 8:0_8:0_8:0</b>	0.151±0.007	2.868±0.897	0.000
<b>TG 26:0 TG 8:0_8:0_10:0</b>	0.327±0.021	2.494±0.886	0.002
<b>TG 27:0 TG 8:0_9:0_10:0</b>	0.413±0.04	2.241±0.731	0.001
TG 28:0 TG 8:0_10:0_10:0	0.688±0.085	1.718±0.818	0.096
TG 30:0 TG 10:0_10:0_10:0	1.206±0.413	0.371±0.188	0.161
<b>TG 44:1 TG 12:0_14:0_18:1</b>	0.162±0.022	0.467±0.185	0.032

<b>TG 46:1 TG 14:0_16:0_16:1</b>	0.467±0.191	1.544±0.513	0.023
<b>TG 48:1 TG 14:0_16:0_18:1</b>	1.225±0.29	0.106±0.049	0.008
TG 48:2 TG 14:0_16:1_18:1	1.033±0.436	1.01±0.403	0.972
TG 48:3 TG 12:0_18:1_18:2	0.412±0.353	0.267±0.077	0.767
TG 48:4 TG 12:0_18:2_18:2	0.375±0.118	0.332±0.077	0.807
<b>TG 49:1 TG 15:0_17:0_17:1</b>	0.401±0.079	1.272±0.464	0.018
<b>TG 50:0 TG 16:0_16:0_18:0</b>	0.283±0.062	0.051±0.031	0.011
TG 50:2 TG 16:0_16:1_18:1	0.816±0.172	0.904±0.731	0.880
TG 50:3 TG 16:0_16:1_18:2	0.629±0.31	0.366±0.124	0.549
<b>TG 50:4 TG 16:1_16:1_18:2</b>	0.234±0.062	0.696±0.283	0.044
<b>TG 51:1 TG 16:0_17:0_18:1</b>	1.526±0.295	0.208±0.054	0.002
<b>TG 52:1 TG 16:0_18:0_18:1</b>	1.453±0.35	0.379±0.185	0.037
TG 52:2 TG 16:0_18:1_18:1	0.952±0.351	1.417±0.79	0.538
TG 52:3 TG 16:0_17:1_19:2	0.447±0.074	2.142±1.938	0.235
TG 52:4 TG 16:1_18:1_18:2	0.351±0.179	0.115±0.042	0.346
TG 52:5 TG 16:1_18:2_18:2	1.432±1.254	0.083±0.062	0.438
TG 53:2 TG 17:0_18:1_18:1	1.158±0.233	0.83±0.235	0.370
TG 53:3 TG 17:0_17:1_19:2	0.638±0.181	1.01±0.198	0.201
TG 54:2 TG 16:0_18:1_20:1	1.278±0.323	0.792±0.394	0.362
<b>TG 54:5 TG 18:1_18:2_18:2</b>	0.226±0.058	2.672±1.507	0.031
TG 54:6 TG 18:2_18:2_18:2	0.458±0.397	0.694±0.342	0.695
<b>TG 54:7 TG 18:2_18:2_18:3</b>	0.402±0.223	1.667±0.707	0.040
<b>TG 56:3 TG 18:1_18:1_20:1</b>	0.315±0.036	2.574±1.071	0.006
2-keto-L-gulonic acid	1.125±0.204	0.858±0.304	0.459
2-ketocaproic acid	1.018±0.096	0.986±0.1	0.831
2-ketoisocaproic acid	0.907±0.127	1.073±0.128	0.404
2,3-dihydroxybenzoic acid	1.01±0.154	1.062±0.182	0.834
2,3-dimethylsuccinic acid	0.921±0.116	1.212±0.128	0.123
3-aminoisobutyric acid	1.048±0.108	1.101±0.103	0.751
<b>3-Phosphoglyceric acid</b>	0.831±0.122	1.289±0.097	0.016
4-guanidinobutyric acid	1.495±0.836	0.352±0.037	0.326
6-phosphogluconic acid	1.327±0.358	0.42±0.073	0.074
8-aminocaprylic acid	1.083±0.15	0.775±0.098	0.166
Acetol	0.918±0.138	1.415±0.293	0.088
Acetyl-L-serine	1.035±0.105	0.975±0.115	0.721
Alanine	0.851±0.19	1.247±0.319	0.263
Allo-inositol	1.097±0.13	0.937±0.184	0.475
Alpha ketoglutaric acid	1.214±0.322	0.724±0.135	0.286
Alpha-glucosamine 1-phosphate	1.118±0.203	1.029±0.256	0.792
Arabitol	0.936±0.087	1.182±0.079	0.069

Aspartic acid	0.929±0.21	1.136±0.263	0.554
<b>Beta-glutamic acid</b>	1.19±0.211	0.586±0.088	0.049
<b>Capric acid</b>	0.385±0.033	2.275±0.631	0.000
<b>Citric acid</b>	0.905±0.087	1.383±0.125	0.003
Diocetyl phthalate	1.323±0.703	0.4±0.029	0.346
Erythrose 4-phosphate	1.189±0.269	0.712±0.286	0.267
<b>Estrone</b>	0.987±0.088	0.616±0.038	0.005
Fructose	0.99±0.159	0.905±0.123	0.721
Fucose	1.09±0.099	0.974±0.086	0.440
Glucoheptonic acid	0.93±0.117	1.204±0.129	0.149
Gluconic acid	0.994±0.079	1.171±0.109	0.195
Gluconic acid lactone	0.969±0.134	1.393±0.165	0.061
Glucosaminic acid	0.934±0.103	1.167±0.089	0.144
Glucuronic acid	0.995±0.079	1.17±0.109	0.198
Glutamic acid	1.104±0.226	0.899±0.166	0.542
Glyceraldehyde	1.197±0.359	0.637±0.143	0.273
Glyceric acid	0.941±0.105	1.109±0.102	0.304
<b>Glycerol 1-phosphate</b>	0.835±0.133	1.306±0.096	0.021
Glycine	1.05±0.212	1.232±0.069	0.543
Heptadecanoic acid	0.926±0.075	0.751±0.038	0.108
Homoserine	1.001±0.142	1.017±0.119	0.941
Iminodiacetic acid	0.889±0.178	1.209±0.297	0.331
Inosine	0.964±0.279	1.392±0.134	0.287
<b>Isomaltose</b>	0.346±0.052	2.337±0.263	0.000
Isopropyl beta-D-1-thiogalactopyranoside	0.93±0.117	1.203±0.129	0.150
Lactic acid	0.814±0.124	1.601±0.88	0.240
<b>Lactobionic acid</b>	0.48±0.06	2.284±0.612	0.000
<b>Tablo devami</b>			
Lactose	0.635±0.359	0.788±0.1	0.761
<b>Lactulose</b>	0.863±0.08	0.579±0.034	0.015
Lauric acid	0.938±0.063	0.953±0.054	0.873
Leucrose	0.832±0.138	1.457±0.464	0.113
Maleic acid	1.23±0.307	0.761±0.067	0.275
Malic acid	1.34±0.608	0.654±0.069	0.417
Malonic acid	1.034±0.139	0.712±0.22	0.202
<b>Maltitol</b>	0.562±0.048	1.818±0.364	0.000
Maltose	0.903±0.184	1.221±0.171	0.265
<b>Maltotriitol</b>	0.441±0.09	2.248±0.44	0.000
<b>Melezitose</b>	0.675±0.064	1.79±0.451	0.002
Melibiose	0.92±0.111	1.202±0.122	0.117

Methyl-beta-D-galactopyranoside	1.291±0.244	0.722±0.249	0.143
Methylmalonic acid	1.263±0.397	0.576±0.15	0.225
Mucic acid	1.068±0.188	0.847±0.261	0.494
<b>Myo-inositol</b>	0.659±0.15	1.804±0.25	0.000
<b>N-acetyl-5-hydroxytryptamine</b>	1.08±0.316	0.014±0.003	0.018
N-acetyl-D-mannosamine	0.958±0.127	1.227±0.124	0.179
N-acetyl-L-aspartic acid	1.097±0.303	0.859±0.224	0.597
<b>N-ethylglycine</b>	1.216±0.148	0.717±0.078	0.023
Norleucine	0.97±0.111	0.998±0.103	0.869
Norvaline	0.933±0.096	1.065±0.113	0.403
<b>O-phosphocolamine</b>	1.257±0.399	0.054±0.008	0.034
Oleic acid	0.774±0.082	0.711±0.084	0.630
Ornithine	1.094±0.147	0.757±0.1	0.123
Oxalic acid	1.056±0.148	0.84±0.078	0.310
<b>Palatinose</b>	0.324±0.05	2.384±0.287	0.000
Palmitoleic acid	0.899±0.118	0.828±0.117	0.700
<b>Phosphoric acid</b>	1.121±0.199	0.523±0.034	0.035
Proline	1.029±0.145	0.993±0.167	0.878
Pyroglutamic acid	0.981±0.136	1.17±0.102	0.350
Pyrophosphate	0.625±0.221	0.41±0.235	0.541
Pyrrole -2-carboxylic acid	1.048±0.19	0.701±0.139	0.222
Ribitol	0.95±0.261	0.912±0.067	0.916
Saccharic acid	0.914±0.09	1.021±0.076	0.436
Sarcosine	1.426±0.443	0.558±0.262	0.181
<b>Sedoheptulose anhydride monohydrate</b>	0.917±0.231	1.709±0.271	0.040
Serine	0.961±0.176	1.004±0.158	0.872
<b>Sorbitol</b>	0.605±0.062	1.935±0.289	0.000
<b>Stearic acid</b>	0.956±0.096	0.637±0.034	0.023
Succinic acid	1.004±0.091	0.995±0.082	0.949
Tagatose	1.09±0.113	0.776±0.049	0.054
<b>Tartaric acid</b>	0.851±0.106	1.425±0.119	0.002
Tartronic acid	1.037±0.105	0.913±0.056	0.413
Threo-beta-hydroxyaspartic acid	1.046±0.193	0.767±0.122	0.326
Threonine	0.266±0.112	2.985±2.909	0.205
Threose	1.151±0.178	0.857±0.169	0.290
Trans-cyclohexane-1,2-diol	0.946±0.068	1.002±0.095	0.630
Trehalose	0.474±0.113	0.313±0.062	0.327
<b>Tryptophan</b>	1.14±0.154	0.684±0.063	0.041



Urea	0.935±0.124	1.279±0.179	0.115
Xanthosine	1.11±0.235	0.541±0.037	0.086

\*Grup 1: AML hasta (tanı/relaps hastalık) ile sağlıklı verici örnekleri (n=28 vs n=15)

Grup 2'ye ait analizler kapsamında, AML hasta (tanı/relaps hastalık) ile remisyon örnekleri incelendiğinde toplam 257 metabolit tespit edilmiş ve bunlardan 64 tanesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 4.2).

**Tablo 4.2.** Grup 2 bütünlük omiks verisi ile tanımlanan metabolitler ve istatistiksel analiz sonuçları

METABOLİT	AML (tanı /relaps hastalık) (ortalama ± SH)	AML (remisyon) (ortalama ± SH)	P değeri
CAR 18:1	1.016±0.135	0.773±0.162	0,466
<b>Cer 40:1;2O Cer 18:1;2O/22:0</b>	0.483±0.169	2.509±0.583	0,000
CL 69:1 CL 16:0_18:0_18:0_17:1	1.173±0.24	1.172±0.392	0,998
<b>DG 32:0 DG 16:0_16:0</b>	0.747±0.258	2.922±0.764	0,003
<b>DG 34:2 DG 16:0_18:2</b>	1.017±0.31	3.636±1.727	0,014
FA 14:0	0.949±0.143	1.028±0.054	0,821
FA 16:0	0.892±0.1	1.175±0.207	0,270
FA 16:1	0.977±0.179	0.87±0.189	0,808
FA 18:0	0.917±0.026	1.036±0.143	0,168
FA 18:3	0.58±0.09	0.639±0.109	0,790
FA 20:3;3O	1.382±0.665	0.22±0.152	0,472
FA 22:5	0.863±0.288	0.502±0.136	0,606
FA 38:8	1.171±0.21	1.212±0.332	0,937
FA 42:5	0.775±0.277	0.39±0.178	0,567
Hex2Cer 34:1;2O Hex2Cer 18:1;2O/16:0	0.703±0.192	0.957±0.112	0,587
Hex3Cer 34:1;2O Hex3Cer 18:1;2O/16:0	0.977±0.093	0.889±0.054	0,700
<b>LPC 14:0/0:0</b>	0.872±0.092	1.726±0.383	0,003
LPC 16:0/0:0	0.956±0.083	0.843±0.133	0,590
<b>LPC 16:1/0:0</b>	0.93±0.118	1.782±0.54	0,022
LPC 18:0/0:0	0.92±0.081	0.864±0.197	0,790
LPC 18:1/0:0	0.888±0.07	1.239±0.204	0,069
LPC 18:2/0:0	0.871±0.101	1.182±0.269	0,245
LPC 18:3/0:0	0.988±0.048	0.926±0.069	0,606
LPC 19:0/0:0	0.759±0.094	0.708±0.288	0,842
LPC 20:0/0:0	0.641±0.092	0.789±0.215	0,535
LPC 20:3/0:0	0.845±0.1	1.393±0.393	0,064
LPC 20:4/0:0	1±0.139	1.352±0.438	0,355
LPC 22:0/0:0	0.214±0.029	0.372±0.085	0,051
LPC 22:6/0:0	0.947±0.125	1.403±0.467	0,202
LPC 24:0/0:0	0.612±0.079	0.985±0.179	0,075
LPC O-18:0	0.981±0.153	0.907±0.258	0,847

MG 16:0	0.972±0.072	0.648±0.016	0,071
MG 20:0	0.96±0.045	0.808±0.068	0,185
NAE 13:0	0.914±0.079	0.881±0.069	0,865
NAE 20:0	0.888±0.081	0.778±0.033	0,576
PC 31:0	1.01±0.107	1.196±0.281	0,509
<b>PC 32:2 PC 16:1_16:1</b>	0.559±0.078	1.441±0.275	0,000
PC 33:2 PC 15:0_18:2	1.021±0.096	1.016±0.22	0,983
PC 33:4	1.107±0.154	1.914±0.63	0,078
<b>PC 34:1 PC 16:0_18:1</b>	0.85±0.4	4.824±1.072	0,001
<b>PC 34:3</b>	0.75±0.1	1.436±0.202	0,011
<b>PC 34:4</b>	0.534±0.071	1.317±0.319	0,001
<b>PC 35:1</b>	0.703±0.376	5.441±5.358	0,046
PC 35:3	0.797±0.087	1.135±0.262	0,155
PC 35:4 PC 17:2_18:2	0.929±0.108	1.193±0.264	0,351
<b>PC 36:0</b>	0.029±0.006	9.208±7.185	0,003
<b>PC 36:1 PC 16:0_20:1</b>	0.73±0.339	3.721±1.212	0,003
<b>PC 36:2 PC 18:1_18:1</b>	0.8±0.263	2.875±0.671	0,005
<b>PC 36:3</b>	0.867±0.197	2.272±0.473	0,009
PC 36:4 PC 18:2_18:2	0.454±0.055	0.575±0.168	0,420
<b>PC 36:5</b>	0.4±0.055	0.831±0.251	0,013
PC 37:2	0.752±0.153	1.17±0.336	0,292
PC 37:5 PC 17:1_20:4	0.837±0.118	1.263±0.246	0,165
PC 37:6	0.128±0.024	0.128±0.026	0,988
PC 38:4	0.877±0.101	1.208±0.239	0,210
PC 38:6	0.85±0.056	0.953±0.122	0,477
PC 38:7	1.15±0.062	0.882±0.119	0,094
<b>PC 40:4</b>	0.796±0.392	4.13±1.704	0,007
<b>PC 40:5</b>	0.384±0.063	5.751±5.485	0,018
PC 40:6	0.898±0.421	3.1±1.192	0,056
PC 40:7	0.897±0.115	1.238±0.256	0,254
PC 40:8	0.687±0.087	0.886±0.152	0,365
PC O-33:1 PC O-17:1_16:0	1.091±0.598	1.426±1.426	0,829
<b>PC O-34:0</b>	0.911±0.365	3.823±2.009	0,019
PC O-34:0;20 PC O-17:0_17:0;20	0.775±0.14	0.299±0.119	0,170
<b>PC O-34:2</b>	0.788±0.239	2.815±1.287	0,012
<b>PC O-35:0 PC O-19:0_16:0</b>	0.265±0.08	7.051±4.176	0,000
<b>PC O-37:0 PC O-19:0_18:0</b>	0.04±0.013	6.079±2.582	0,000
PC O-37:1 PC O-19:1_18:0	0.66±0.117	0.913±0.215	0,396
PC O-37:3 PC O-19:2_18:1	0.537±0.053	0.554±0.095	0,899
PC O-37:7	0.975±0.114	0.831±0.075	0,604

PC O-39:3 PC O-19:0_20:3	1.207±0.346	0.141±0.092	0,209
PC O-39:4 PC O-19:0_20:4	0.609±0.094	0.587±0.13	0,925
PC O-39:5 PC O-17:0_22:5	0.995±0.161	0.668±0.083	0,406
PC O-39:6 PC O-21:4_18:2	1.158±0.306	0.002±0	0,125
PC O-40:4	0.601±0.098	1.076±0.478	0,125
PC O-41:7 PC O-19:1_22:6	0.525±0.083	0.761±0.164	0,270
PC O-50:8	1.415±0.547	1.492±0.665	0,954
<b>PE O-35:1 PE O-17:0_18:1</b>	0.782±0.128	1.895±0.587	0,007
PE O-35:2 PE O-17:0_18:2	0.823±0.196	0.899±0.204	0,875
PE O-37:1 PE O-19:0_18:1	0.772±0.145	0.846±0.467	0,851
PE O-37:2 PE O-19:0_18:2	0.774±0.036	0.76±0.024	0,875
PE O-37:3 PE O-19:1_18:2	0.626±0.101	1.001±0.144	0,141
PE O-37:4 PE O-17:0_20:4	0.794±0.188	1.031±0.293	0,613
PE O-39:3 PE O-19:0_20:3	0.814±0.198	0.524±0.252	0,553
PE O-39:4 PE O-19:0_20:4	0.673±0.18	0.971±0.273	0,509
PE O-39:5 PE O-21:4_18:1	0.837±0.146	1.328±0.292	0,191
<b>PE P-38:4 PE P-18:0_20:4</b>	0.878±0.418	3.241±1.465	0,049
PI 58:11	1.52±0.248	1.035±0.254	0,427
PI O-37:1 PI O-19:0_18:1	0.851±0.149	0.768±0.248	0,823
<b>PI O-37:3 PI O-19:1_18:2</b>	0.533±0.148	5.375±2.717	0,000
PI O-39:4 PI O-19:0_20:4	1.438±0.347	1.399±0.157	0,963
<b>PI O-39:5 PI O-19:1_20:4</b>	1.217±0.135	1.965±0.443	0,049
<b>PI O-39:6 PI O-17:0_22:6</b>	0.898±0.16	2.405±0.497	0,001
SL 48:6;O	0.763±0.107	0.773±0.313	0,972
SL 49:4;O	1.431±0.872	0.356±0.13	0,611
<b>SM 30:2;2O</b>	0.771±0.182	2.72±1.495	0,012
<b>SM 31:1;2O</b>	0.686±0.081	1.631±0.495	0,002
<b>SM 32:0;2O SM 19:0;2O/13:0</b>	0.734±0.095	1.445±0.52	0,026
<b>SM 32:2;2O SM 18:2;2O/14:0</b>	0.713±0.084	1.496±0.329	0,003
SM 32:6;3O	1.095±0.073	1.025±0.14	0,703
<b>SM 33:1;2O</b>	0.775±0.086	1.34±0.362	0,031
<b>SM 33:2;2O SM 16:2;2O/17:0</b>	0.787±0.113	1.584±0.311	0,011
SM 34:1;2O	0.904±0.15	1.584±0.086	0,070
SM 34:1;3O	0.78±0.067	0.753±0.145	0,875
SM 34:2;2O SM 18:2;2O/16:0	0.612±0.054	0.812±0.109	0,148
SM 35:1;2O	1.033±0.198	1.65±0.412	0,227
SM 35:2;2O	0.889±0.12	1.288±0.25	0,199
<b>SM 35:4;2O</b>	1.081±0.184	2.099±0.409	0,038
<b>SM 36:1;2O SM 27:1;2O/9:0</b>	1.019±0.331	2.79±0.278	0,034
SM 36:2;2O	0.963±0.074	1.193±0.26	0,272

SM 36:4;2O SM 19:2;2O/17:2	0.923±0.255	1.575±0.422	0,312
SM 38:1;2O SM 25:1;2O/13:0	1.575±1.353	0.744±0.253	0,800
SM 38:2;2O	0.873±0.272	2.065±0.586	0,095
<b>SM 39:1;2O</b>	0.748±0.334	4.901±2.445	0,002
<b>SM 40:1;2O</b>	0.616±0.452	5.206±3.032	0,008
<b>SM 40:2;2O SM 18:1;2O/22:1</b>	0.885±0.207	3.104±1.235	0,003
<b>SM 41:1;2O SM 18:1;2O/23:0</b>	0.808±0.526	4.763±2.917	0,027
SM 41:2;2O	1.113±0.468	3.138±1.3	0,110
SM 42:1;2O SM 18:1;2O/24:0	0.58±0.247	1.244±0.653	0,311
SM 42:2;2O	0.235±0.065	0.484±0.163	0,151
SM 43:1;2O SM 18:1;2O/25:0	0.402±0.176	0.776±0.506	0,429
SM 43:2;2O SM 18:1;2O/25:1	1.024±0.27	2.126±0.811	0,137
SMGDG 38:4	1.137±0.198	2.013±0.635	0,112
SMGDG 49:6	0.478±0.047	0.487±0.107	0,934
SMGDG O-35:1 SMGDG O-17:0_18:1	1.105±0.341	2.608±1.377	0,134
SMGDG O-35:2 SMGDG O-17:0_18:2	1.437±0.181	1.469±0.295	0,944
SMGDG O-37:2 SMGDG O-19:0_18:2	1.241±0.187	1.377±0.357	0,774
SMGDG O-37:4 SMGDG O-17:0_20:4	1.317±0.203	2.083±0.6	0,167
SMGDG O-39:3 SMGDG O-19:0_20:3	0.107±0.021	0.197±0.104	0,176
SMGDG O-41:6 SMGDG O-19:0_22:6	1.448±0.323	1.297±0.237	0,848
<b>ST 27:1;O</b>	0.982±0.114	2.12±0.523	0,002
TG 24:0 TG 8:0_8:0_8:0	0.151±0.007	0.153±0.008	0,877
TG 26:0 TG 8:0_8:0_10:0	0.327±0.021	0.287±0.033	0,443
TG 27:0 TG 8:0_9:0_10:0	0.413±0.04	0.565±0.154	0,187
TG 28:0 TG 8:0_10:0_10:0	0.688±0.085	0.591±0.118	0,649
TG 30:0 TG 10:0_10:0_10:0	1.206±0.413	1.735±0.884	0,618
<b>TG 44:1 TG 12:0_14:0_18:1</b>	0.162±0.022	7.294±4.335	0,000
TG 46:1 TG 14:0_16:0_16:1	0.467±0.191	2.353±2.152	0,057
TG 48:1 TG 14:0_16:0_18:1	1.225±0.29	2.419±0.695	0,120
TG 48:2 TG 14:0_16:1_18:1	1.033±0.436	0.786±0.64	0,820
<b>TG 48:3 TG 12:0_18:1_18:2</b>	0.412±0.353	6.492±6.263	0,025
<b>TG 48:4 TG 12:0_18:2_18:2</b>	0.375±0.118	6.504±2.572	0,000
<b>TG 49:1 TG 15:0_17:0_17:1</b>	0.401±0.079	3.537±3.243	0,020
<b>TG 50:0 TG 16:0_16:0_18:0</b>	0.283±0.062	7.865±7.83	0,019
<b>TG 50:2 TG 16:0_16:1_18:1</b>	0.816±0.172	2.316±1.019	0,014
<b>TG 50:3 TG 16:0_16:1_18:2</b>	0.629±0.31	4.979±2.555	0,001
<b>TG 50:4 TG 16:1_16:1_18:2</b>	0.234±0.062	6.201±5.246	0,007
TG 51:1 TG 16:0_17:0_18:1	1.526±0.295	0.428±0.255	0,134
TG 52:1 TG 16:0_18:0_18:1	1.453±0.35	0.325±0.115	0,189
TG 52:2 TG 16:0_18:1_18:1	0.952±0.351	0.018±0.008	0,276

TG 52:3 TG 16:0_17:1_19:2	0.447±0.074	0.67±0.136	0,239
<b>TG 52:4 TG 16:1_18:1_18:2</b>	0.351±0.179	7.287±6.353	0,010
TG 52:5 TG 16:1_18:2_18:2	1.432±1.254	1.333±0.537	0,974
TG 53:2 TG 17:0_18:1_18:1	1.158±0.233	0.625±0.169	0,350
TG 53:3 TG 17:0_17:1_19:2	0.638±0.181	2.994±2.792	0,053
TG 54:2 TG 16:0_18:1_20:1	1.278±0.323	0.066±0.017	0,128
TG 54:5 TG 18:1_18:2_18:2	0.226±0.058	0.32±0.052	0,504
<b>TG 54:6 TG 18:2_18:2_18:2</b>	0.458±0.397	4.955±3.364	0,009
<b>TG 54:7 TG 18:2_18:2_18:3</b>	0.402±0.223	2.348±1.643	0,026
<b>TG 56:3 TG 18:1_18:1_20:1</b>	0.315±0.036	0.115±0.064	0,034
2-keto-L-gulonic acid	1.125±0.204	0.641±0.313	0,345
2-ketocaproic acid	1.018±0.096	1.258±0.42	0,403
2-ketoisocaproic acid	0.907±0.127	0.974±0.298	0,837
2,3-dihydroxybenzoic acid	1.01±0.154	1.388±0.551	0,381
2,3-dimethylsuccinic acid	0.921±0.116	0.89±0.24	0,914
3-aminoisobutyric acid	1.048±0.108	0.653±0.096	0,140
3-Phosphoglyceric acid	0.831±0.122	1.248±0.163	0,176
4-guanidinobutyric acid	1.495±0.836	0.204±0.019	0,524
6-phosphogluconic acid	1.327±0.358	0.302±0.067	0,242
8-aminocaprylic acid	1.083±0.15	1.496±0.618	0,349
Acetol	0.918±0.138	0.702±0.171	0,525
Acetyl-L-serine	1.035±0.105	0.906±0.222	0,634
<b>Alanine</b>	0.851±0.19	2.194±0.723	0,018
Allo-inositol	1.097±0.13	0.894±0.184	0,529
Alpha ketoglutaric acid	1.214±0.322	1.436±0.466	0,782
Alpha-glucosamine 1-phosphate	1.118±0.203	1.416±0.37	0,561
Arabitol	0.936±0.087	1.207±0.129	0,215
Aspartic acid	0.929±0.21	0.934±0.337	0,993
Beta-glutamic acid	1.19±0.211	1.112±0.441	0,885
<b>Capric acid</b>	0.385±0.033	0.64±0.237	0,044
<b>Citric acid</b>	0.905±0.087	0.448±0.106	0,040
Diocetyl phthalate	1.323±0.703	1.474±0.905	0,931
Erythrose 4-phosphate	1.189±0.269	0.864±0.338	0,626
<b>Estrone</b>	0.987±0.088	1.949±1.082	0,050
Fructose	0.99±0.159	1.312±0.3	0,426
Fucose	1.09±0.099	0.773±0.158	0,204
Glucoheptonic acid	0.93±0.117	0.487±0.065	0,126
Gluconic acid	0.994±0.079	0.801±0.146	0,333
Gluconic acid lactone	0.969±0.134	1.001±0.181	0,923
Glucosaminic acid	0.934±0.103	1.112±0.195	0,498

Glucuronic acid	0.995±0.079	0.8±0.146	0,331
Glutamic acid	1.104±0.226	0.337±0.195	0,171
Glyceraldehyde	1.197±0.359	0.845±0.498	0,693
Glyceric acid	0.941±0.105	0.847±0.239	0,729
Glycerol 1-phosphate	0.835±0.133	1.229±0.26	0,249
Glycine	1.05±0.212	0.787±0.341	0,620
Heptadecanoic acid	0.926±0.075	1.447±0.63	0,097
Homoserine	1.001±0.142	1.149±0.434	0,701
Iminodiacetic acid	0.889±0.178	1.108±0.447	0,637
Inosine	0.964±0.279	0.747±0.195	0,750
<b>Isomaltose</b>	0.346±0.052	1.327±0.674	0,002
Isopropyl beta-D-1-thiogalactopyranoside	0.93±0.117	0.487±0.065	0,128
Lactic acid	0.814±0.124	0.893±0.231	0,801
Lactobionic acid	0.48±0.06	0.565±0.156	0,591
Lactose	0.635±0.359	1.657±1.226	0,307
<b>Lactulose</b>	0.863±0.08	2.353±1.555	0,026
<b>Lauric acid</b>	0.938±0.063	1.504±0.544	0,037
Leucrose	0.832±0.138	1.12±0.26	0,412
Maleic acid	1.23±0.307	0.72±0.143	0,494
Malic acid	1.34±0.608	0.614±0.092	0,622
<b>Malonic acid</b>	1.034±0.139	2.595±0.975	0,004
<b>Maltitol</b>	0.562±0.048	1.399±0.277	0,000
Maltose	0.903±0.184	1.258±0.407	0,456
<b>Maltotriitol</b>	0.441±0.09	1.281±0.634	0,016
Melezitose	0.675±0.064	0.763±0.07	0,578
Melibiose	0.92±0.111	0.818±0.203	0,715
Methyl-beta-D-galactopyranoside	1.291±0.244	0.687±0.285	0,318
Methylmalonic acid	1.263±0.397	0.455±0.244	0,405
Mucic acid	1.068±0.188	0.725±0.413	0,479
Myo-inositol	0.659±0.15	0.601±0.217	0,878
N-acetyl-5-hydroxytryptamine	1.08±0.316	0.016±0.003	0,170
N-acetyl-D-mannosamine	0.958±0.127	1.066±0.269	0,740
N-acetyl-L-aspartic acid	1.097±0.303	0.77±0.354	0,661
N-ethylglycine	1.216±0.148	1.284±0.304	0,857
Norleucine	0.97±0.111	1.312±0.485	0,303
Norvaline	0.933±0.096	1.379±0.465	0,139
O-phosphocolamine	1.257±0.399	0.248±0.188	0,301
<b>Oleic acid</b>	0.774±0.082	1.41±0.619	0,050
Ornithine	1.094±0.147	1.422±0.582	0,440
Oxalic acid	1.056±0.148	0.943±0.248	0,759

<b>Palatinose</b>	0.324±0.05	1.306±0.683	0,002
Palmitoleic acid	0.899±0.118	1.172±0.166	0,354
Phosphoric acid	1.121±0.199	1.059±0.394	0,902
Proline	1.029±0.145	1.185±0.623	0,716
Pyroglutamic acid	0.981±0.136	0.791±0.212	0,576
Pyrophosphate	0.625±0.221	0.158±0.055	0,385
Pyrrole -2-carboxylic acid	1.048±0.19	1.81±0.552	0,141
Ribitol	0.95±0.261	1.971±0.984	0,174
Saccharic acid	0.914±0.09	1.39±0.346	0,072
Sarcosine	1.426±0.443	1.422±1.121	0,998
Sedoheptulose anhydride monohydrate	0.917±0.231	0.582±0.571	0,578
Serine	0.961±0.176	1.794±0.744	0,114
Sorbitol	0.605±0.062	0.609±0.079	0,978
Stearic acid	0.956±0.096	1.624±0.901	0,122
Succinic acid	1.004±0.091	0.885±0.268	0,628
Tagatose	1.09±0.113	1.2±0.187	0,695
Tartaric acid	0.851±0.106	0.625±0.27	0,417
Tartronic acid	1.037±0.105	1.32±0.376	0,338
Threo-beta-hydroxyaspartic acid	1.046±0.193	1.728±0.806	0,232
Threonine	0.266±0.112	0.658±0.566	0,269
Threose	1.151±0.178	1.019±0.375	0,773
Trans-cyclohexane-1,2-diol	0.946±0.068	1.112±0.145	0,345
<b>Trehalose</b>	0.474±0.113	6.63±2.566	0,000
Tryptophan	1.14±0.154	0.989±0.201	0,691
Urea	0.935±0.124	1.11±0.298	0,587
Xanthosine	1.11±0.235	1.722±0.939	0,369

\* Grup 2: AML hasta (tanı/relaps hastalık) ile remisyon (n=28 vs n=5)



Grup3'e ait analizler kapsamında, AML remisyon örnekleri ile sağlıklı verici örnekleri incelendiğinde toplam 257 metabolit tespit edilmiş ve bunlardan 76 tanesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 4.3).

**Tablo 4.3.** Grup 3 bütünleşik omiks verisi ile tanımlanan metabolitlerin ve istatistiksel analiz sonuçları

METABOLİT İSİMLERİ	AML (remisyon) (ortalama±SH)	Sağlıklı verici (ortalama±SH)	P değeri
CAR 18:1	0.773±0.162	1.046±0.151	0.343
Cer 40:1;2O Cer 18:1;2O/22:0	2.509±0.583	1.463±0.882	0.518
CL 69:1 CL 16:0_18:0_18:0_17:1	1.172±0.392	0.62±0.156	0.131
<b>DG 32:0 DG 16:0_16:0</b>	2.922±0.764	0.831±0.124	0.000
<b>DG 34:2 DG 16:0_18:2</b>	3.636±1.727	0.09±0.048	0.001
FA 14:0	1.028±0.054	1.085±0.142	0.823
FA 16:0	1.175±0.207	1.144±0.106	0.891
FA 16:1	0.870±0.189	1.087±0.204	0.570
FA 18:0	1.036±0.143	1.142±0.091	0.558
<b>FA 18:3</b>	0.639±0.109	1.905±0.338	0.049
FA 20:3;3O	0.22±0.152	0.548±0.115	0.151
FA 22:5	0.502±0.136	1.422±0.253	0.057
<b>FA 38:8</b>	1.212±0.332	0.611±0.063	0.011
FA 42:5	0.390±0.178	1.623±0.537	0.211
Hex2Cer 34:1;2O Hex2Cer 18:1;2O/16:0	0.957±0.112	1.569±0.965	0.724
Hex3Cer 34:1;2O Hex3Cer 18:1;2O/16:0	0.889±0.054	1.08±0.293	0.716
<b>LPC 14:0/0:0</b>	1.726±0.383	0.998±0.132	0.032
LPC 16:0/0:0	0.843±0.133	1.135±0.136	0.257
<b>LPC 16:1/0:0</b>	1.782±0.54	0.87±0.132	0.026
LPC 18:0/0:0	0.864±0.197	1.194±0.111	0.157
LPC 18:1/0:0	1.239±0.204	1.13±0.115	0.642
LPC 18:2/0:0	1.182±0.269	1.181±0.158	0.997
LPC 18:3/0:0	0.926±0.069	1.047±0.081	0.424
<b>LPC 19:0/0:0</b>	0.708±0.288	1.548±0.162	0.019
<b>LPC 20:0/0:0</b>	0.789±0.215	1.741±0.135	0.002
LPC 20:3/0:0	1.393±0.393	1.159±0.119	0.447
LPC 20:4/0:0	1.352±0.438	0.883±0.103	0.135
LPC 22:0/0:0	0.372±0.085	2.676±0.979	0.199
LPC 22:6/0:0	1.403±0.467	0.965±0.214	0.348
LPC 24:0/0:0	0.985±0.179	1.73±0.498	0.411
LPC O-18:0	0.907±0.258	1.066±0.106	0.505

<b>MG 16:0</b>	0.648±0.016	1.17±0.036	0.000
MG 20:0	0.808±0.068	1.138±0.122	0.147
<b>NAE 13:0</b>	0.881±0.069	1.2±0.054	0.006
NAE 20:0	0.778±0.033	1.283±0.139	0.056
PC 31:0	1.196±0.281	0.916±0.23	0.526
PC 32:2 PC 16:1_16:1	1.441±0.275	1.677±0.339	0.706
PC 33:2 PC 15:0_18:2	1.016±0.22	0.956±0.417	0.937
<b>PC 33:4</b>	1.914±0.63	0.496±0.178	0.007
<b>PC 34:1 PC 16:0_18:1</b>	4.824±1.072	0.006±0.001	0.000
PC 34:3	1.436±0.202	1.321±0.271	0.817
PC 34:4	1.317±0.319	1.764±0.399	0.545
PC 35:1	5.441±5.358	0.073±0.016	0.082
PC 35:3	1.135±0.262	1.334±0.465	0.813
PC 35:4 PC 17:2_18:2	1.193±0.264	1.068±0.282	0.811
<b>PC 36:0</b>	9.208±7.185	0.076±0.013	0.031
<b>PC 36:1 PC 16:0_20:1</b>	3.721±1.212	0.596±0.329	0.002
PC 36:2 PC 18:1_18:1	2.875±0.671	0.748±0.556	0.057
<b>PC 36:3</b>	2.272±0.473	0.824±0.202	0.004
PC 36:4 PC 18:2_18:2	0.575±0.168	2.161±0.885	0.324
PC 36:5	0.831±0.251	2.176±0.404	0.080
PC 37:2	1.17±0.336	1.406±0.358	0.723
PC 37:5 PC 17:1_20:4	1.263±0.246	1.216±0.391	0.947
PC 37:6	0.128±0.026	2.918±2.673	0.561
PC 38:4	1.208±0.239	1.161±0.326	0.937
PC 38:6	0.953±0.122	1.296±0.441	0.665
PC 38:7	0.882±0.119	0.76±0.278	0.808
<b>PC 40:4</b>	4.13±1.704	0.336±0.037	0.001
PC 40:5	5.751±5.485	0.566±0.054	0.100
<b>PC 40:6</b>	3.1±1.192	0.49±0.117	0.001
PC 40:7	1.238±0.256	1.113±0.246	0.788
PC 40:8	0.886±0.152	1.623±0.253	0.121
PC O-33:1 PC O-17:1_16:0	1.426±1.426	0.689±0.096	0.365
<b>PC O-34:0</b>	3.823±2.009	0.224±0.04	0.004
PC O-34:0;2O PC O-17:0_17:0;2O	0.299±0.119	1.654±0.47	0.120
<b>PC O-34:2</b>	2.815±1.287	0.792±0.206	0.020
<b>PC O-35:0 PC O-19:0_16:0</b>	7.051±4.176	0.354±0.063	0.009
<b>PC O-37:0 PC O-19:0_18:0</b>	6.079±2.582	1.1±0.233	0.003
PC O-37:1 PC O-19:1_18:0	0.913±0.215	1.663±0.284	0.162
<b>PC O-37:3 PC O-19:2_18:1</b>	0.554±0.095	2.012±0.39	0.049
PC O-37:7	0.831±0.075	1.103±0.337	0.654

<b>PC O-39:3 PC O-19:0_20:3</b>	0.141±0.092	0.9±0.11	0.001
<b>PC O-39:4 PC O-19:0_20:4</b>	0.587±0.13	1.867±0.259	0.013
PC O-39:5 PC O-17:0_22:5	0.668±0.083	1.121±0.165	0.140
<b>PC O-39:6 PC O-21:4_18:2</b>	0.002±0	1.038±0.243	0.026
PC O-40:4	1.076±0.478	1.72±0.281	0.264
PC O-41:7 PC O-19:1_22:6	0.761±0.164	1.966±0.411	0.116
<b>PC O-50:8</b>	1.492±0.665	0.062±0.037	0.001
PE O-35:1 PE O-17:0_18:1	1.895±0.587	1.109±0.225	0.140
PE O-35:2 PE O-17:0_18:2	0.899±0.204	1.363±0.235	0.295
PE O-37:1 PE O-19:0_18:1	0.846±0.467	1.478±0.264	0.249
PE O-37:2 PE O-19:0_18:2	0.76±0.024	1.501±0.226	0.080
PE O-37:3 PE O-19:1_18:2	1.001±0.144	1.697±0.251	0.139
PE O-37:4 PE O-17:0_20:4	1.031±0.293	1.375±0.21	0.406
PE O-39:3 PE O-19:0_20:3	0.524±0.252	1.506±0.375	0.163
PE O-39:4 PE O-19:0_20:4	0.971±0.273	1.619±0.277	0.221
PE O-39:5 PE O-21:4_18:1	1.328±0.292	1.196±0.163	0.691
<b>PE P-38:4 PE P-18:0_20:4</b>	3.241±1.465	0.48±0.06	0.003
<b>PI 58:11</b>	1.035±0.254	0.018±0	0.000
PI O-37:1 PI O-19:0_18:1	0.768±0.248	1.355±0.267	0.245
<b>PI O-37:3 PI O-19:1_18:2</b>	5.375±2.717	0.413±0.165	0.004
<b>PI O-39:4 PI O-19:0_20:4</b>	1.399±0.157	0.049±0.017	0.000
<b>PI O-39:5 PI O-19:1_20:4</b>	1.965±0.443	0.273±0.115	0.000
<b>PI O-39:6 PI O-17:0_22:6</b>	2.405±0.497	0.721±0.293	0.010
SL 48:6;O	0.773±0.313	1.518±0.183	0.057
SL 49:4;O	0.356±0.13	0.41±0.118	0.812
<b>SM 30:2;2O</b>	2.72±1.495	0.853±0.113	0.039
SM 31:1;2O	1.631±0.495	1.376±0.263	0.639
SM 32:0;2O SM 19:0;2O/13:0	1.445±0.52	1.348±0.338	0.885
SM 32:2;2O SM 18:2;2O/14:0	1.496±0.329	1.371±0.15	0.699
SM 32:6;3O	1.025±0.14	0.814±0.089	0.243
SM 33:1;2O	1.34±0.362	1.306±0.375	0.961
SM 33:2;2O SM 16:2;2O/17:0	1.584±0.311	1.204±0.226	0.391
SM 34:1;2O	1.584±0.086	0.984±0.198	0.106
SM 34:1;3O	0.753±0.145	1.494±0.557	0.462
SM 34:2;2O SM 18:2;2O/16:0	0.812±0.109	1.787±0.481	0.266
<b>SM 35:1;2O</b>	1.65±0.412	0.721±0.095	0.004
SM 35:2;2O	1.288±0.25	1.112±0.323	0.767
<b>SM 35:4;2O</b>	2.099±0.409	0.483±0.134	0.000
<b>SM 36:1;2O SM 27:1;2O/9:0</b>	2.79±0.278	0.368±0.077	0.000
SM 36:2;2O	1.193±0.26	1.004±0.352	0.770

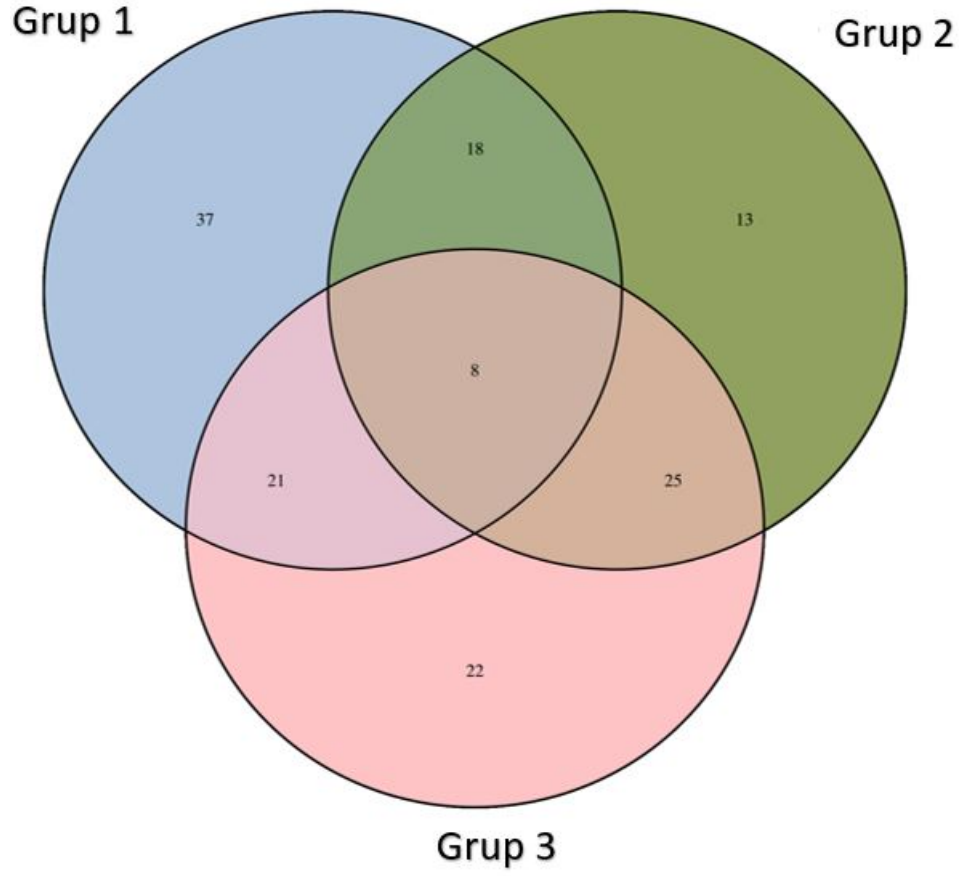
SM 36:4;2O SM 19:2;2O/17:2	1.575±0.422	0.953±0.346	0.353
<b>SM 38:1;2O SM 25:1;2O/13:0</b>	0.744±0.253	0.012±0.005	0.000
SM 38:2;2O	2.065±0.586	0.883±0.294	0.068
SM 39:1;2O	4.901±2.445	0.17±0.062	0.002
<b>SM 40:1;2O</b>	5.206±3.032	0.314±0.069	0.008
<b>SM 40:2;2O SM 18:1;2O/22:1</b>	3.104±1.235	0.513±0.27	0.006
<b>SM 41:1;2O SM 18:1;2O/23:0</b>	4.763±2.917	0.104±0.031	0.009
<b>SM 41:2;2O</b>	3.138±1.3	0.076±0.074	0.000
SM 42:1;2O SM 18:1;2O/24:0	1.244±0.653	1.703±0.599	0.685
SM 42:2;2O	0.484±0.163	2.6±1.609	0.466
SM 43:1;2O SM 18:1;2O/25:0	0.776±0.506	2.191±0.844	0.363
<b>SM 43:2;2O SM 18:1;2O/25:1</b>	2.126±0.811	0.579±0.12	0.005
<b>SMGDG 38:4</b>	2.013±0.635	0.406±0.275	0.015
<b>SMGDG 49:6</b>	0.487±0.107	2.146±0.346	0.014
<b>SMGDG O-35:1 SMGDG O-17:0_18:1</b>	2.608±1.377	0.267±0.097	0.007
<b>SMGDG O-35:2 SMGDG O-17:0_18:2</b>	1.469±0.295	0.028±0.017	0.000
<b>SMGDG O-37:2 SMGDG O-19:0_18:2</b>	1.377±0.357	0.425±0.134	0.006
<b>SMGDG O-37:4 SMGDG O-17:0_20:4</b>	2.083±0.6	0.047±0.02	0.000
SMGDG O-39:3 SMGDG O-19:0_20:3	0.197±0.104	2.934±2.041	0.457
<b>SMGDG O-41:6 SMGDG O-19:0_22:6</b>	1.297±0.237	0.065±0.048	0.000
<b>ST 27:1;O</b>	2.12±0.523	0.661±0.157	0.002
TG 24:0 TG 8:0_8:0_8:0	0.153±0.008	2.868±0.897	0.103
TG 26:0 TG 8:0_8:0_10:0	0.287±0.033	2.494±0.886	0.175
TG 27:0 TG 8:0_9:0_10:0	0.565±0.154	2.241±0.731	0.211
TG 28:0 TG 8:0_10:0_10:0	0.591±0.118	1.718±0.818	0.445
<b>TG 30:0 TG 10:0_10:0_10:0</b>	1.735±0.884	0.371±0.188	0.032
<b>TG 44:1 TG 12:0_14:0_18:1</b>	7.294±4.335	0.467±0.185	0.010
TG 46:1 TG 14:0_16:0_16:1	2.353±2.152	1.544±0.513	0.592
<b>TG 48:1 TG 14:0_16:0_18:1</b>	2.419±0.695	0.106±0.049	0.000
TG 48:2 TG 14:0_16:1_18:1	0.786±0.64	1.01±0.403	0.781
TG 48:3 TG 12:0_18:1_18:2	6.492±6.263	0.267±0.077	0.085
<b>TG 48:4 TG 12:0_18:2_18:2</b>	6.504±2.572	0.332±0.077	0.000
TG 49:1 TG 15:0_17:0_17:1	3.537±3.243	1.272±0.464	0.259
TG 50:0 TG 16:0_16:0_18:0	7.865±7.83	0.051±0.031	0.083
TG 50:2 TG 16:0_16:1_18:1	2.316±1.019	0.904±0.731	0.328
<b>TG 50:3 TG 16:0_16:1_18:2</b>	4.979±2.555	0.366±0.124	0.004
TG 50:4 TG 16:1_16:1_18:2	6.201±5.246	0.696±0.283	0.074
TG 51:1 TG 16:0_17:0_18:1	0.428±0.255	0.208±0.054	0.208
TG 52:1 TG 16:0_18:0_18:1	0.325±0.115	0.379±0.185	0.873
TG 52:2 TG 16:0_18:1_18:1	0.018±0.008	1.417±0.79	0.329

TG 52:3 TG 16:0_17:1_19:2	0.67±0.136	2.142±1.938	0.672
TG 52:4 TG 16:1_18:1_18:2	7.287±6.353	0.115±0.042	0.053
<b>TG 52:5 TG 16:1_18:2_18:2</b>	1.333±0.537	0.083±0.062	0.001
TG 53:2 TG 17:0_18:1_18:1	0.625±0.169	0.83±0.235	0.636
TG 53:3 TG 17:0_17:1_19:2	2.994±2.792	1.01±0.198	0.220
TG 54:2 TG 16:0_18:1_20:1	0.066±0.017	0.792±0.394	0.310
TG 54:5 TG 18:1_18:2_18:2	0.32±0.052	2.672±1.507	0.388
<b>TG 54:6 TG 18:2_18:2_18:2</b>	4.955±3.364	0.694±0.342	0.040
TG 54:7 TG 18:2_18:2_18:3	2.348±1.643	1.667±0.707	0.662
TG 56:3 TG 18:1_18:1_20:1	0.115±0.064	2.574±1.071	0.209
2-keto-L-gulonic acid	0.641±0.313	0.858±0.304	0.705
2-ketocaproic acid	1.258±0.42	0.986±0.1	0.358
2-ketoisocaproic acid	0.974±0.298	1.073±0.128	0.726
2,3-dihydroxybenzoic acid	1.388±0.551	1.062±0.182	0.467
2,3-dimethylsuccinic acid	0.89±0.24	1.212±0.128	0.232
<b>3-aminoisobutyric acid</b>	0.653±0.096	1.101±0.103	0.029
3-Phosphoglyceric acid	1.248±0.163	1.289±0.097	0.831
<b>4-guanidinobutyric acid</b>	0.204±0.019	0.352±0.037	0.038
6-phosphogluconic acid	0.302±0.067	0.42±0.073	0.389
8-aminocaprylic acid	1.496±0.618	0.775±0.098	0.073
Acetol	0.702±0.171	1.415±0.293	0.191
Acetyl-L-serine	0.906±0.222	0.975±0.115	0.776
Alanine	2.194±0.723	1.247±0.319	0.184
Allo-inositol	0.894±0.184	0.937±0.184	0.901
Alpha ketoglutaric acid	1.436±0.466	0.724±0.135	0.056
Alpha-glucosamine 1-phosphate	1.416±0.37	1.029±0.256	0.444
Arabitol	1.207±0.129	1.182±0.079	0.879
Aspartic acid	0.934±0.337	1.136±0.263	0.691
Beta-glutamic acid	1.112±0.441	0.586±0.088	0.083
Capric acid	0.64±0.237	2.275±0.631	0.162
<b>Citric acid</b>	0.448±0.106	1.383±0.125	0.001
<b>Diocetyl phthalate</b>	1.474±0.905	0.4±0.029	0.044
Erythrose 4-phosphate	0.864±0.338	0.712±0.286	0.779
<b>Estrone</b>	1.949±1.082	0.616±0.038	0.037
Fructose	1.312±0.3	0.905±0.123	0.151
Fucose	0.773±0.158	0.974±0.086	0.266
<b>Glucoheptonic acid</b>	0.487±0.065	1.204±0.129	0.006
Gluconic acid	0.801±0.146	1.171±0.109	0.092
Gluconic acid lactone	1.001±0.181	1.393±0.165	0.220
Glucosaminic acid	1.112±0.195	1.167±0.089	0.777

Glucuronic acid	0.8±0.146	1.17±0.109	0.092
Glutamic acid	0.337±0.195	0.899±0.166	0.088
Glyceraldehyde	0.845±0.498	0.637±0.143	0.580
Glyceric acid	0.847±0.239	1.109±0.102	0.254
Glycerol 1-phosphate	1.229±0.26	1.306±0.096	0.732
Glycine	0.787±0.341	1.232±0.069	0.060
Heptadecanoic acid	1.447±0.63	0.751±0.038	0.062
Homoserine	1.149±0.434	1.017±0.119	0.682
Iminodiacetic acid	1.108±0.447	1.209±0.297	0.864
<b>Inosine</b>	0.747±0.195	1.392±0.134	0.023
Isomaltose	1.327±0.674	2.337±0.263	0.105
<b>Isopropyl beta-D-1-thiogalactopyranoside</b>	0.487±0.065	1.203±0.129	0.006
Lactic acid	0.893±0.231	1.601±0.88	0.655
Lactobionic acid	0.565±0.156	2.284±0.612	0.130
Lactose	1.657±1.226	0.788±0.1	0.224
Lactulose	2.353±1.555	0.579±0.034	0.051
Lauric acid	1.504±0.544	0.953±0.054	0.093
Leucrose	1.12±0.26	1.457±0.464	0.689
Maleic acid	0.72±0.143	0.761±0.067	0.772
Malic acid	0.614±0.092	0.654±0.069	0.763
<b>Malonic acid</b>	2.595±0.975	0.712±0.22	0.010
Maltitol	1.399±0.277	1.818±0.364	0.532
Maltose	1.258±0.407	1.221±0.171	0.924
Maltotriitol	1.281±0.634	2.248±0.44	0.270
Melezitose	0.763±0.07	1.79±0.451	0.214
Melibiose	0.818±0.203	1.202±0.122	0.130
Methyl-beta-D-galactopyranoside	0.687±0.285	0.722±0.249	0.940
Methylmalonic acid	0.455±0.244	0.576±0.15	0.687
Mucic acid	0.725±0.413	0.847±0.261	0.814
<b>Myo-inositol</b>	0.601±0.217	1.804±0.25	0.017
N-acetyl-5-hydroxytryptamine	0.016±0.003	0.014±0.003	0.748
N-acetyl-D-mannosamine	1.066±0.269	1.227±0.124	0.549
N-acetyl-L-aspartic acid	0.77±0.354	0.859±0.224	0.841
<b>N-ethylglycine</b>	1.284±0.304	0.717±0.078	0.017
Norleucine	1.312±0.485	0.998±0.103	0.341
Norvaline	1.379±0.465	1.065±0.113	0.341
O-phosphocolamine	0.248±0.188	0.054±0.008	0.077
Oleic acid	1.41±0.619	0.711±0.084	0.074
Ornithine	1.422±0.582	0.757±0.1	0.083
Oxalic acid	0.943±0.248	0.84±0.078	0.599

Palatinose	1.306±0.683	2.384±0.287	0.103
Palmitoleic acid	1.172±0.166	0.828±0.117	0.144
<b>Phosphoric acid</b>	1.059±0.394	0.523±0.034	0.027
Proline	1.185±0.623	0.993±0.167	0.674
Pyroglutamic acid	0.791±0.212	1.17±0.102	0.093
Pyrophosphate	0.158±0.055	0.41±0.235	0.552
<b>Pyrrole -2-carboxylic acid</b>	1.81±0.552	0.701±0.139	0.010
Ribitol	1.971±0.984	0.912±0.067	0.069
Saccharic acid	1.39±0.346	1.021±0.076	0.127
Sarcosine	1.422±1.121	0.558±0.262	0.274
Sedoheptulose anhydride monohydrate	0.582±0.571	1.709±0.271	0.064
Serine	1.794±0.744	1.004±0.158	0.126
<b>Sorbitol</b>	0.609±0.079	1.935±0.289	0.019
Stearic acid	1.624±0.901	0.637±0.034	0.061
Succinic acid	0.885±0.268	0.995±0.082	0.600
<b>Tagatose</b>	1.2±0.187	0.776±0.049	0.005
<b>Tartaric acid</b>	0.625±0.27	1.425±0.119	0.006
Tartronic acid	1.32±0.376	0.913±0.056	0.090
Threo-beta-hydroxyaspartic acid	1.728±0.806	0.767±0.122	0.065
Threonine	0.658±0.566	2.985±2.909	0.656
Threose	1.019±0.375	0.857±0.169	0.659
Trans-cyclohexane-1,2-diol	1.112±0.145	1.002±0.095	0.560
<b>Trehalose</b>	6.63±2.566	0.313±0.062	0.000
Tryptophan	0.989±0.201	0.684±0.063	0.067
Urea	1.11±0.298	1.279±0.179	0.640
<b>Xanthosine</b>	1.722±0.939	0.541±0.037	0.034

\*Grup 3: AML remisyon ile sağlıklı verici (n=5 vs n=15)



**Şekil 4.1.** Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 için yapılan karşılaştırmalı analizlerde grup spesifik ve gruplar arası paylaşılan ortak metabolitlerin gösterildiği Venn Diyagramı

Üç ana grup için Venn diyagramında (Şekil 4.1) gösterilen metabolitler içerisinde t-testi ile yapılan analizler sonrası tespit edilen grup spesifik metabolitler incelendiğinde Grup 1 için 37 metabolit, Grup 2 için 13 metabolit, Grup 3 için ise 22 metabolit (Tablo 4.4) bulunmuştur.



**Tablo 4.4.** Grup 1-2-3 spesifik metabolitler

Grup 1	Grup 2	Grup 3
FA 18:0	Cer 40:1;2O Cer 18:1;2O/22:0	FA 38:8
LPC 22:0/0:0	PC 35:1	MG 16:0
LPC 24:0/0:0	PC 36:2 PC 18:1 18:1	PC 40:6
NAE 20:0	PC 40:5	PC O-39:3 PC O-19:0 20:3
PC 36:4 PC 18:2 18:2	PE O-35:1 PE O-17:0 18:1	PC O-39:6 PC O-21:4 18:2
PC 40:8	SM 33:1;2O	PC O-50:8
PC O-34:0;2O PC O-17:0 17:0;2O	SM 33:2;2O SM 16:2;2O/17:0	SM 35:1;2O
PC O-37:1 PC O-19:1 18:0	TG 48:3 TG 12:0 18:1 18:2	SM 38:1;2O SM 25:1;2O/13:0
PC O-40:4	TG 50:2 TG 16:0 16:1 18:1	SM 41:2;2O
PC O-41:7 PC O-19:1 22:6	TG 52:4 TG 16:1 18:1 18:2	SM 43:2;2O SM 18:1;2O/25:1
PE O-37:1 PE O-19:0 18:1	Alanine	SMGDG O-35:1 SMGDG O-17:0 18:1
PE O-37:2 PE O-19:0 18:2	Lauric acid	TG 30:0 TG 10:0 10:0 10:0
PE O-37:3 PE O-19:1 18:2	Oleic acid	TG 52:5 TG 16:1 18:2 18:2
PE O-39:4 PE O-19:0 20:4		3-aminoisobutyric acid
SL 48:6;O		4-guanidinobutyric acid
SM 32:6;3O		Dioctyl phthalate
SM 34:2;2O SM 18:2;2O/16:0		Glucosaminic acid
SM 42:1;2O SM 18:1;2O/24:0		Inosine
SM 42:2;2O		Isopropyl beta-D-1-thiogalactopyranoside
SM 43:1;2O SM 18:1;2O/25:0		Pyrrole -2-carboxylic acid
TG 24:0 TG 8:0 8:0 8:0		Tagatose
TG 26:0 TG 8:0 8:0 10:0		Xanthosine
TG 27:0 TG 8:0 9:0 10:0		
TG 46:1 TG 14:0 16:0 16:1		
TG 51:1 TG 16:0 17:0 18:1		
TG 52:1 TG 16:0 18:0 18:1		
TG 54:5 TG 18:1 18:2 18:2		
3-Phosphoglyceric acid		

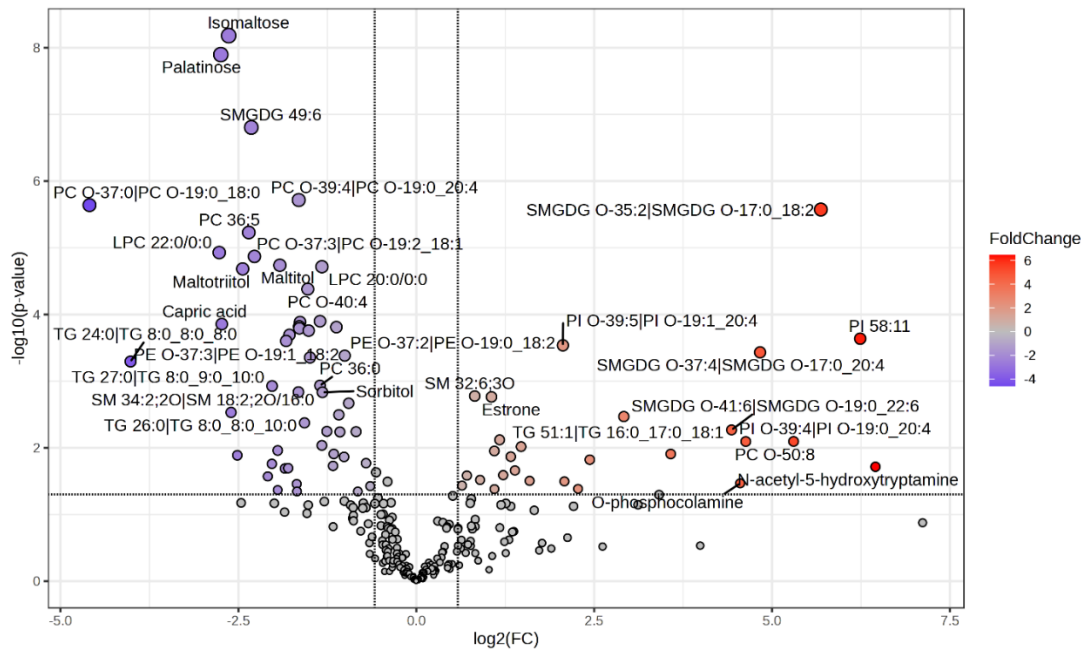
Beta-glutamic acid		
Glycerol 1-phosphate		
Lactobionic acid		
Melezitose		
N-acetyl-5-hydroxytryptamine		
O-phosphocolamine		
Sedoheptulose anhydride monohydrate		
Stearic acid		
Tryptophan		

\*Grup 1: AML hasta (tanı/relaps hastalık) ile sağlıklı verici, Grup 2: AML hasta (tanı/relaps hastalık) ile remisyon, Grup 3: AML remisyon ile sağlıklı verici

## 4.2. Kemik İliği Plazma Örneklerine Ait Bütünleşik Veride Tek Değişkenli Analiz Sonuçları

Bütünleşik omiks analiz verileri kapsamında elde edilen Volkan grafiği ile FC analizi ve t-testi sonuçlarını tek bir grafikte birleştirilir. Bu grafikler biyolojik önem, istatistiksel önem ya da her ikisine dayanarak bütünleşik veriden elde edilen önemli özellikleri görselleştirilmesini sağlamaktadır.

Sağlıklı verici kemik iliği plazma örneklerine kıyasla AML (yeni tanı ve relaps hastalık) kemik iliği plazma örneklerinde artan veya azalan metabolitler  $p < 0,05$  ve katlanma değişimi 1.5 olacak şekilde görselleştirilmiştir (Şekil 4.2).

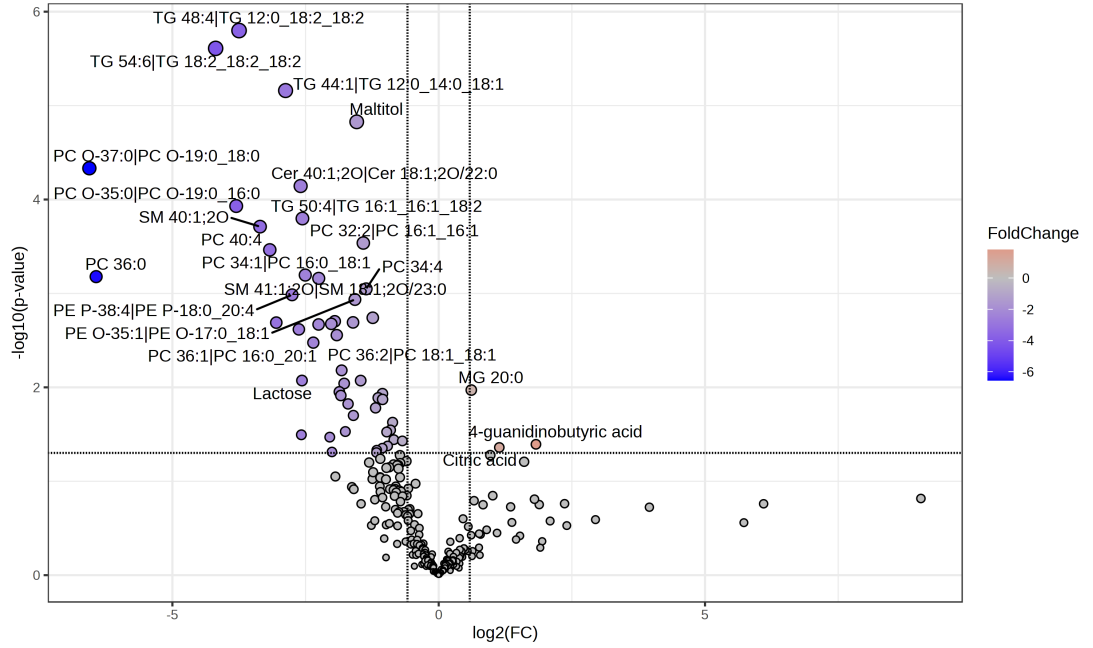


**Şekil 4.2.** Grup 1 için kemik iliği plazma örneklerinden elde edilen bütünleşik omiks verilerine ait Volkan grafiği.

**Renk kodları:** renk skalası, metabolitlerin kat değişim büyüklüğünü görsel olarak ifade eder. Kırmızı renk, metabolitin AML hastalarında önemli ölçüde yüksek olduğunu; mor, metabolitin sağlıklı vericilerde önemli ölçüde yüksek olduğunu; gri ise değişimin nispeten daha az anlamlı olduğunu belirtir. **X Eksenini ( $\log_2(FC)$ ):** Logaritmik oran ( $\log_2$ ) kat değişimi sağlıklı vericilerle karşılaştırıldığında AML hastalarında metabolitlerin göreceli yoğunluğundaki değişimi gösterir. Negatif değerler metabolitin sağlıklı donörlerde daha yüksek olduğunu, pozitif değerler ise AML hastalarında daha yüksek olduğunu gösterir. **Y Eksenini ( $-\log_{10}(p\text{-değeri})$ ):** P-değerinin negatif logaritmik değeri, gözlemlenen değişimin istatistiksel anlamlılığını ifade eder. Y eksenindeki

değer ne kadar yüksekse, o metabolit değişiminin istatistiksel olarak o kadar anlamlı olduğunu gösterir.

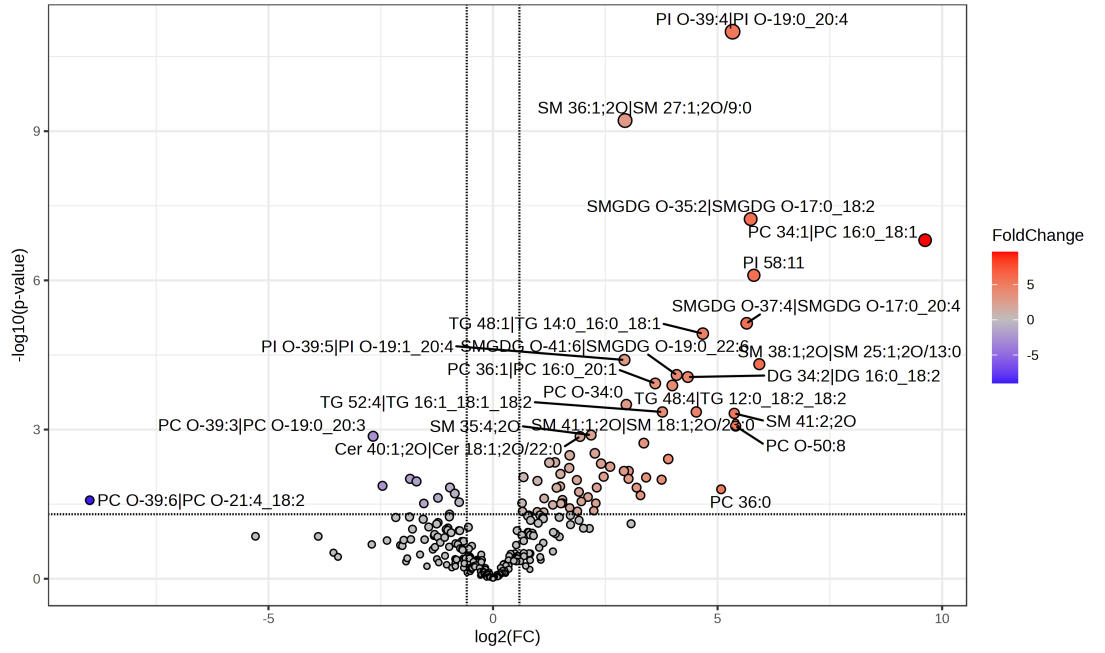
Tedavi sonrası remisyona girmiş AML hasta kemik iliği plazma örneklerine kıyasla henüz tedavi almamış AML (yeni tanı ve relaps hastalık) hasta kemik iliği plazma örneklerinde artan ve azalan metabolitler  $p < 0,05$  ve katlanma değişimi 1.5 olacak şekilde görselleştirilmiştir (Şekil 4.3).



**Şekil 4.3.** Grup 2 için kemik iliği plazma örneklerinden elde edilen bütünleşik omiks verilerine ait Volkan grafiği

**(Renk kodları:** Renk skalası, metabolitlerin kat değişim büyüklüğünü görsel olarak ifade eder. Mavi: Metabolitlerin hastalık durumunda remisyona göre daha düşük seviyelerde olduğunu belirtir. Renk tonunun koyuluğu, değişimin büyüklüğünü ifade eder. Daha koyu mavi, daha büyük bir düşüşü temsil eder. Gri: Değişim küçük veya istatistiksel olarak anlamlı olmayan durumları temsil eder. **X Eksenini ( $\log_2(FC)$ ):** Logaritmik kat değişim oranı. AML hastalarında hastalık ve remiyon durumları arasında metabolit seviyelerinin göreceli farkını gösterir. X eksenindeki değerler, metabolitlerin hastalık durumunda remisyona göre daha yüksek veya daha düşük olduğunu belirtir. **Y Eksenini ( $-\log_{10}(p\text{-değeri})$ ):** P-değerinin negatif logaritmik değeri, gözlemlenen metabolit seviye değişikliklerinin istatistiksel anlamlılığını ifade eder. Y eksenindeki değer ne kadar yüksekse, o metabolit değişiminin istatistiksel olarak o kadar güvenilir olduğu anlamına gelmektedir.)

Sağlıklı verici kemik iliği plazma örneklerine kıyasla AML remiyon kemik iliği plazma örneklerinde artan ve azalan metabolitler  $p < 0,05$  ve katlanma değişimi 1.5 olacak şekilde görselleştirilmiştir (Şekil 4.4).



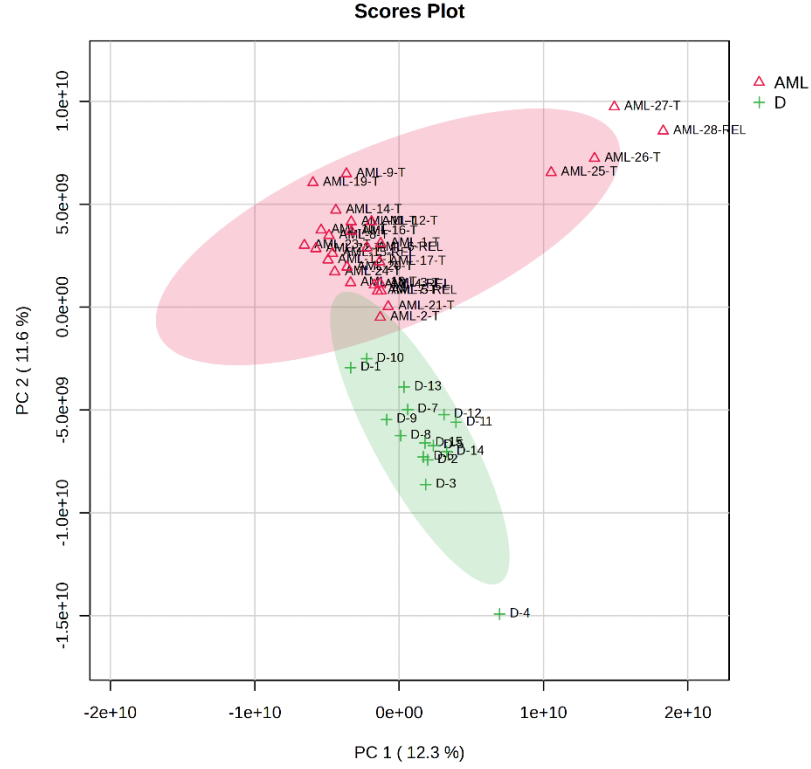
**Şekil 4.4.** Grup 3 için kemik iliği plazma örneklerinden bütünlük omiks verilerine ait Volkan grafiği

**(Renk Kodları):** Renk skalası metabolitlerin kat değişim büyüklüğünü ifade eder. Kırmızı: büyük pozitif değişimleri (remisyonundaki AML hastalarında sağlıklı vericilere göre artış). Mor: Büyük negatif değişimleri (remisyonundaki AML hastalarında sağlıklı vericilere göre azalış). Sarıdan kırmızıya geçiş: değişim miktarının arttığını gösteren bir gradyan. Gri: istatistiksel olarak anlamlı olmayan değişimler. **X Eksen ( $\log_2(FC)$ ):** Bu eksen, AML remisyonundaki hastalar ile sağlıklı vericiler arasında metabolitlerin kat değişim oranını ( $\log_2$  Fold Change- FC) gösterir. Eğer bir değer pozitifse, bu metabolitin AML remisyonundaki hastalarda sağlıklı vericilere göre daha yüksek olduğunu; eğer negatifse, daha düşük olduğunu belirtir. **Y Eksen ( $-\log_{10}(p\text{-değeri})$ ):** Bu eksen, metabolitlerin kat değişimlerinin istatistiksel anlamlılığını ( $-\log_{10}$  p-değeri) gösterir. Y eksenindeki değerler ne kadar yüksekse, o metabolitin değişiminin istatistiksel olarak o kadar anlamlı olduğu anlamına gelmektedir)

### 4.3. Kemik İliği Plazma Örneklerine Ait Bütünlük Veride Çok Değişkenli Analiz Sonuçları

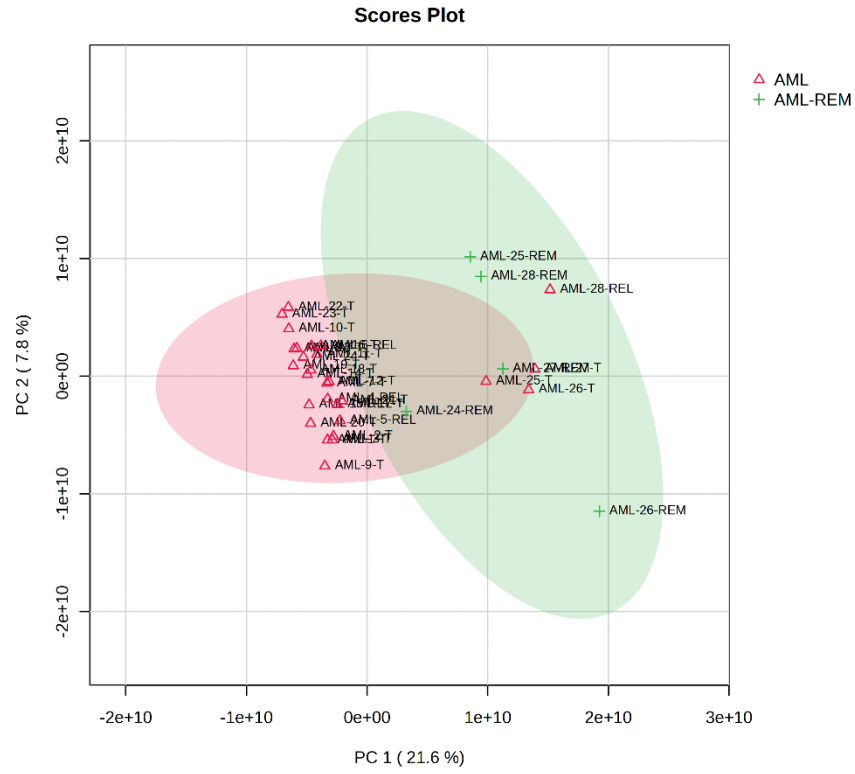
Elde edilen bütünlük omiks verisi, çok değişkenli veri analiz yöntemleri ile değerlendirilmiştir. İlk olarak PCA grafikleri oluşturularak veri setinde herhangi bir aykırı değer ve sistemik hata olup olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7). Daha sonra gruplar arasındaki farklılaşmalar PLS-DA grafiği ile incelenmiştir. PLS-DA grafiklerinde grupların ayrılmasında etkili olan metabolitler ve lipitler VIP grafikleri ile de gösterilmiştir.

PLS-DA modellerinin güvenilirliği sırasıyla model uyumu ve tahminini sağlayan  $R^2$  ve  $Q^2$  değerleri ile ifade edilmiştir (Şekil 4.8, 4.9, 4.10).



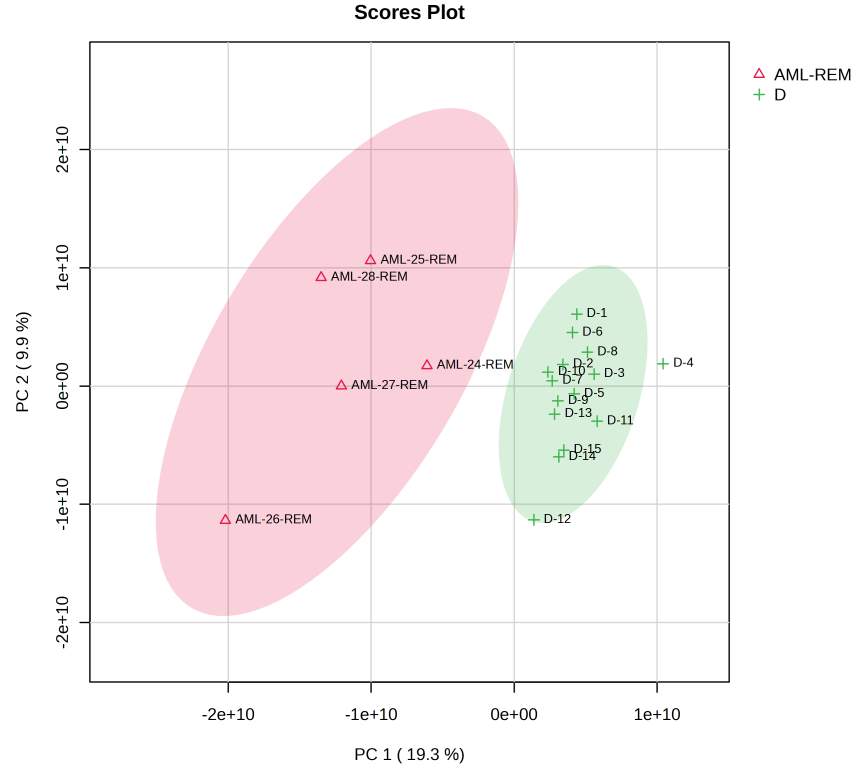
**Şekil 4.5.** Grup 1 için kemik iliği plazmalardan elde edilen bütünleşik omiks verilerine ait PCA skor grafiği

(Pembe renk; AML hastalarını (yeni tanı-relaps hastalık), yeşil renk; sağlıklı vericileri ifade etmektedir. **Eksenler (PC1 ve PC2):** PC1 %12,3 ve PC2 %11,6 oranında varyansı temsil etmektedir. Bu da iki bileşenin toplamda yaklaşık %23,9'luk bir varyansı açıklayabildiğini göstermektedir. **Elipsler:** AML hastalarını ve sağlıklı verici durumundaki hastaların genel dağılımını göstermektedir.



**Şekil 4.6.** Grup 2 için kemik iliği plazma örneklerinden elde edilen bütünleşik omiks verilerine ait PCA skor grafiği

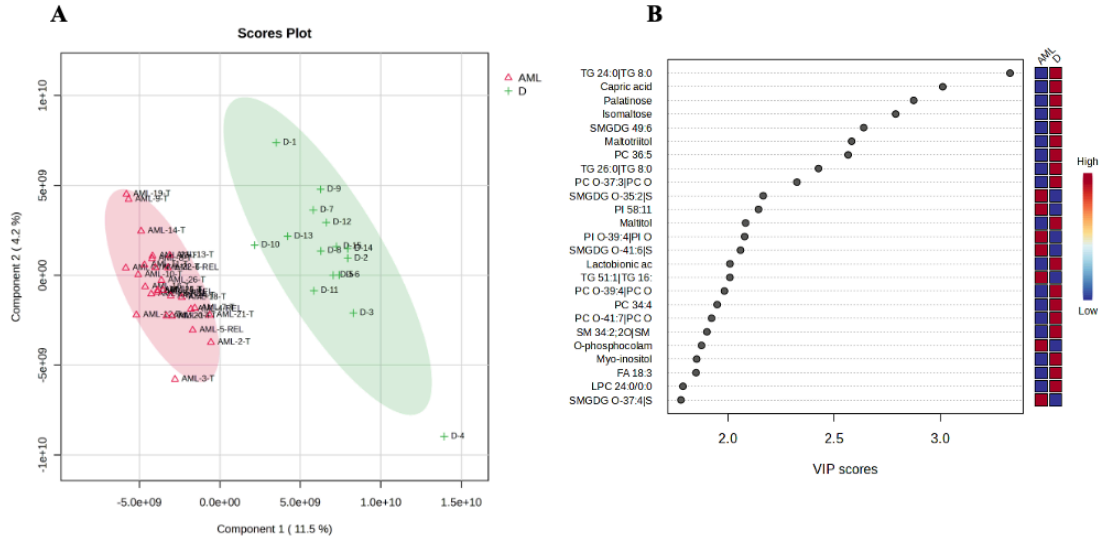
(Pembe renk; AML hastalarını (yeni tanı-relaps hastalık), yeşil renk; tedavi sonrası remisyona giren AML hastalarını ifade etmektedir. Eksenler (PC1 ve PC2): PC1 %21,6 ve PC2 %7,8 oranında varyansı temsil etmektedir. Bu da iki bileşenin toplamda yaklaşık %29,4'lük bir varyansı açıklayabildiğini göstermektedir. Elipsler: AML hastalık ve remiyon durumundaki hastaların genel dağılımını göstermektedir.



**Şekil 4.7.** Grup 3 için kemik iliği plazmalarından elde edilen bütünleşik omiks verilerine ait PCA skor grafiği

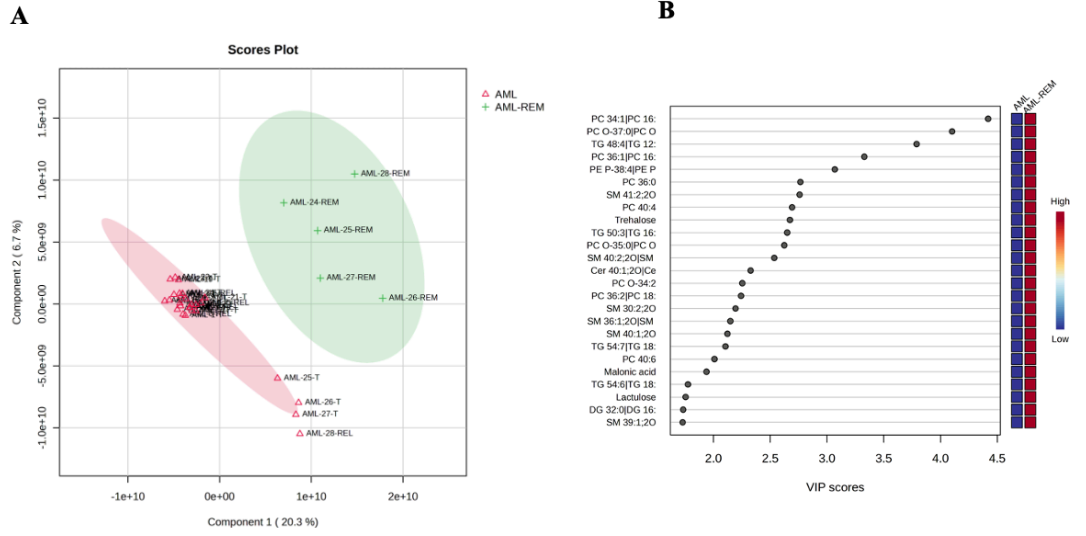
(Pembe renk; remisyona giren AML hastalarını, yeşil renk; sağlıklı vericileri ifade etmektedir. Eksenler (PC1 ve PC2): PC1%19,3 ve PC2 %9,9 oranında varyansı temsil etmektedir. Bu da iki bileşenin toplamda yaklaşık %29,2'lik bir varyansı açıklayabildiğini göstermektedir. Elipsler: AML remisyon örneklerinin ve sağlıklı verici örneklerinin genel dağılımını göstermektedir.





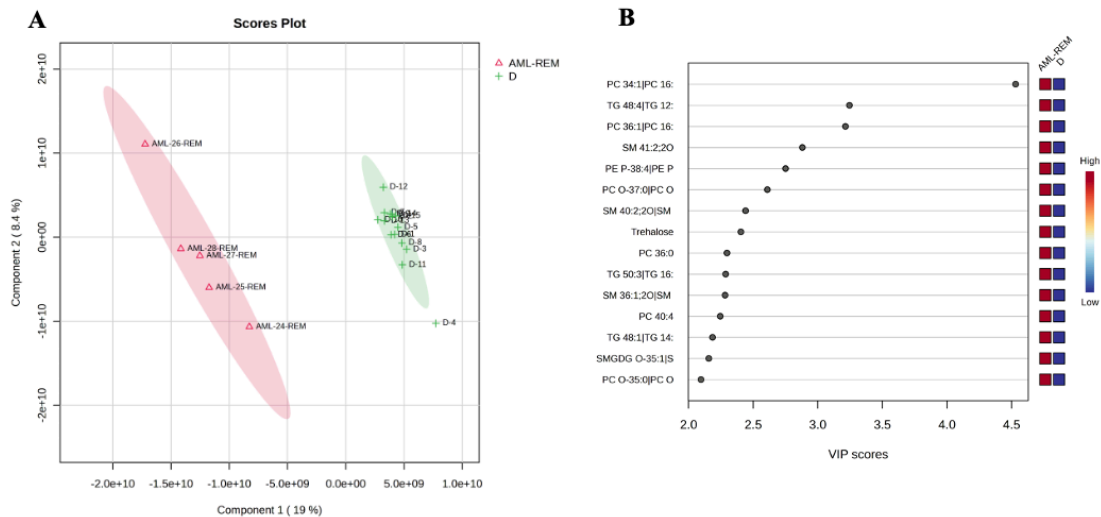
**Şekil 4.8.** Grup1 için kemik iliği plazma örneklerinden elde edilen bütünlük omiks verilerine ait A.PLS-DA skor grafiği,  $R^2$  0.92,  $Q^2$  0.743 ve B. VIP grafiği.

(Pembe renk; AML (yeni tanı-relaps hastalık) hastalarını, yeşil renk; sağlıklı vericileri ifade etmektedir. **A. Eksenler:** Component 1 (X Eksen): %11,5 varyansı açıklamaktadır. Component 2 (Y Eksen): %4.2 varyansı açıklamaktadır. Bu analizde kullanılan bu iki ana bileşen, veri setindeki toplam varyansın yaklaşık %15,7'sini temsil etmektedir. **B. VIP Grafiği:** değerleri 1'den büyük olan metabolitler, model için özellikle önemli olarak kabul edilir. Grafikte yüksek VIP skorlarına sahip metabolitler, AML hastaları ile sağlıklı donörler arasındaki farkı en iyi açıklayan metabolitlerdir.



**Şekil 4.9.** Grup 2 için kemik iliği plazma örneklerinden bütünleşik omiks verilerine ait grafikler. A. PLS-DA skor grafiği,  $R^2$  0.999,  $Q^2$  0.370, B. VIP grafiği.

(Pembe renk; AML (yeni tanı-relaps hastalık) hastalarını, yeşil renk; AML (remisyon) ifade etmektedir. **A. Eksenler:** Component 1 (X Eksen): %20,3 varyansı açıklamaktadır. Component 2 (Y Eksen): %6,7 varyansı açıklamaktadır. Bu analizde kullanılan bu iki ana bileşen, veri setindeki toplam varyansın yaklaşık %27'sini temsil etmektedir. **B. VIP Grafiği:** değerleri 1'den büyük olan metabolitler, model için özellikle önemli olarak kabul edilir. Grafikte yüksek VIP skorlarına sahip metabolitler, tedavi almamış AML hastaları ile tedavi sonrası remisyona girmiş olan AML hastaları arasındaki farkı en iyi açıklayan metabolitlerdir.

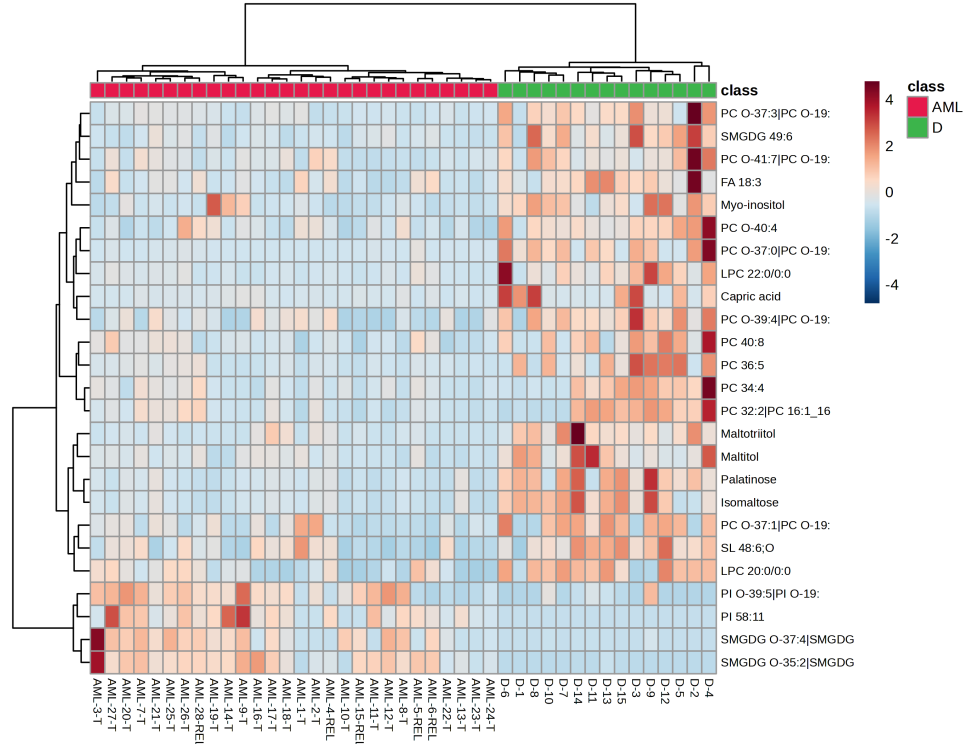


**Şekil4.10.** Grup 3 için plazma örneklerinden bütünleşik omiks verilerine ait grafikler. A. PLS-DA skor grafiği,  $R^2$  0.999,  $Q^2$  0.820, B. VIP grafiği.

(Pembe renk; Remisyonadaki AML hastalarını, yeşil renk; sağlıklı vericileri ifade etmektedir. **A. Eksenler:** Component 1 (X Eksen): %19 varyansı açıklamaktadır. Component 2 (Y Eksen): %8,4 varyansı açıklamaktadır. Bu analizde kullanılan bu iki ana bileşen, veri setindeki toplam varyansın yaklaşık %27,4'ünü temsil etmektedir. **B. VIP Grafiği:** değerleri 1'den büyük olan metabolitler, model için özellikle önemli olarak kabul edilir. Grafikte yüksek VIP skorlarına sahip metabolitler, tedavi sonrası remisyon giren AML hastaları ile sağlıklı vericiler arasındaki farkı en iyi açıklayan metabolitlerdir.

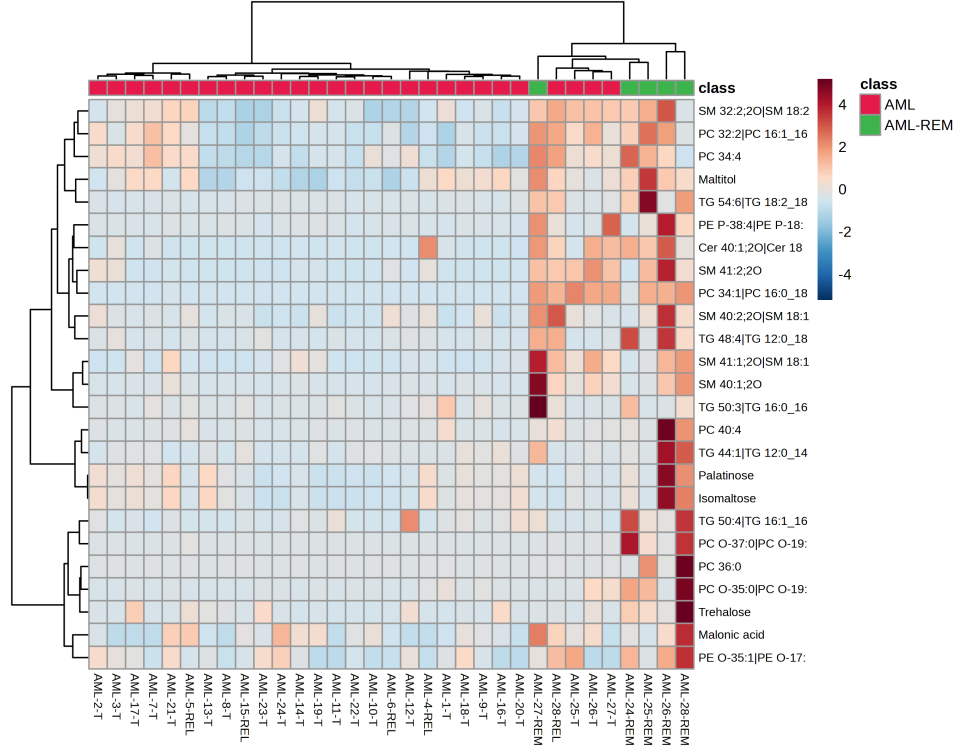
#### 4.4. Hiyerarşik Kümeleme Analizleri

Bütünleşik omiks veri analizleri kapsamında 25 metabolit için üç ana grubu içeren ısı haritası analizi ile görselleştirilmiştir (Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13). Isı haritasında, satırlar (*rows*) farklı deney gruplarını veya örnekleri temsil etmektedir, her biri özgün metabolit profillerini yansıtmaktadır. Sütunlar (*columns*) ise çeşitli metabolitleri göstermektedir; her sütun, tüm örnekler veya gruplar boyunca bir metabolitin ifadesini sergilemektedir. Renk skalası, metabolit konsantrasyonunun göreceli miktarını belirtmektedir: düşük değerler mavi ile yüksek değerler kırmızı ile gösterilmektedir. Bu renk gradyanı, metabolitlerin örneklerdeki bolluğunu veya aktivitesini görsel olarak ifade etmektedir.



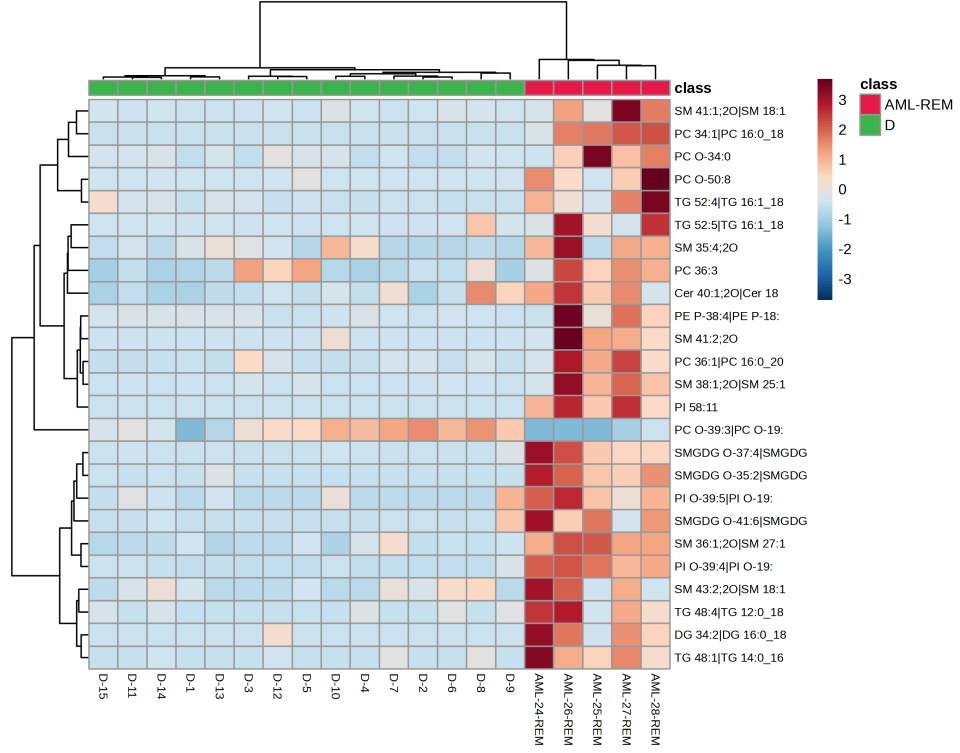
**Şekil 4.11.** Grup 1 için plazma örneklerinden bütünleşik omiks verilerine ait ısı haritası analizi

(Kırmızı üst başlık "AML" ile işaretlenmiş bireyler AML tanı-relaps hastalarını, yeşil üst başlık "D" ile işaretlenmiş bireyler ise sağlıklı vericileri temsil eder. Kırmızı: Yüksek konsantrasyon (Pozitif değişim). Mavi: Düşük konsantrasyon (Negatif değişim).



**Şekil 4.12.** Grup 2 için plazma örneklerinden bütünleşik omiks verilerine ait Isı haritası analizi

(Kırmızı üst başlık "AML" ile işaretlenmiş bireyler AML tanı-relaps hastalarını, yeşil üst başlık "AML-REM" ile işaretlenmiş bireyler ise AML remisyona girenleri temsil etmektedir. Kırmızı: yüksek konsantrasyon (pozitif değişim). Mavi: düşük konsantrasyon (negatif değişim).



**Şekil 4.13.** Grup 3 için plazma örneklerinden bütünleşik omiks verilerine ait Isı haritası analizi

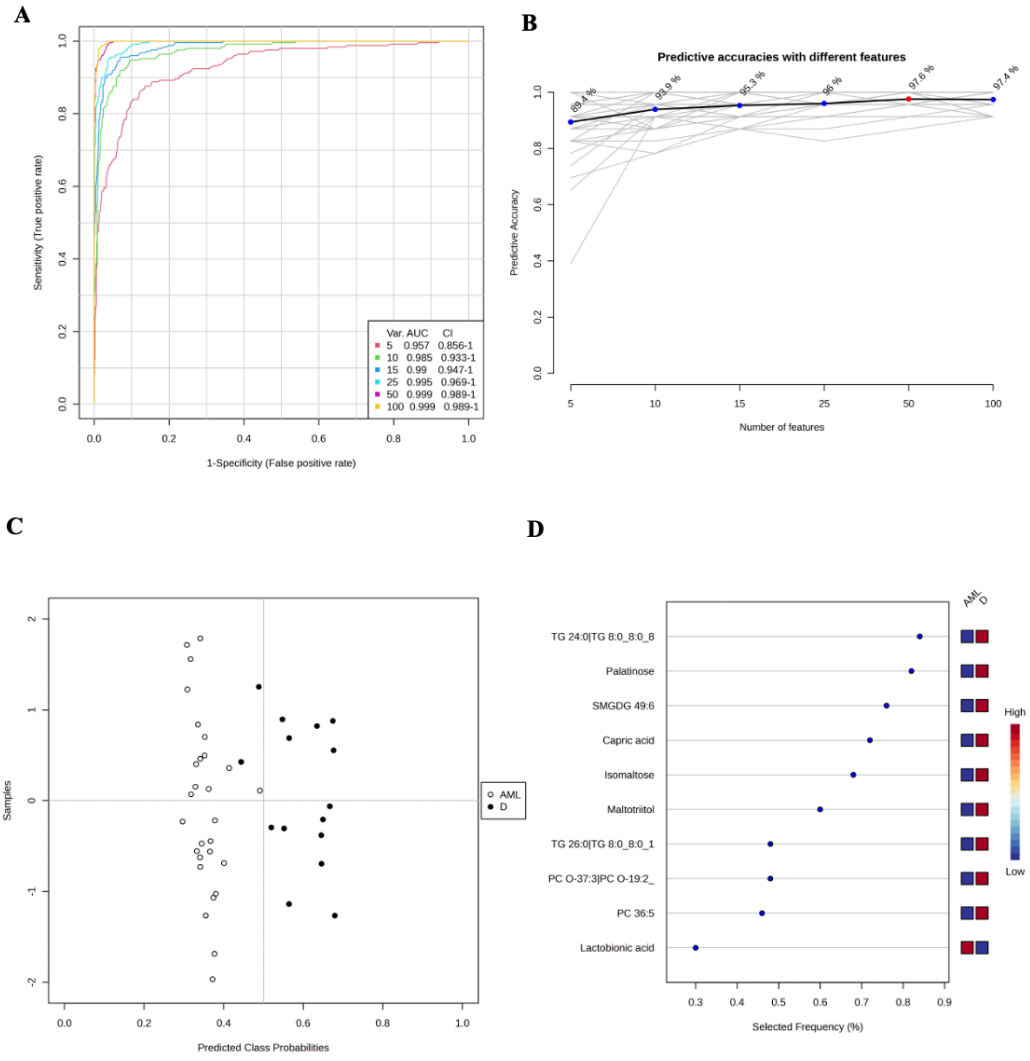
(Kırmızı üst başlık "AML-REM " ile işaretlenmiş bireyler AML remisyon yeşil üst başlık "D" ile işaretlenmiş bireyler ise sağlıklı vericileri temsil eder. Kırmızı: yüksek konsantrasyon (pozitif değişim). Mavi: düşük konsantrasyon (negatif değişim).

#### 4.5. Plazma Örneklerine ait Biyobelirteç Analizi

Bütünleşik omiks verileri kapsamında yapılan ROC analizi, hangi metabolitlerin biyolojik olarak anlamlı olduğunun belirlenmesinin zor olduğu karmaşık omiks verilerinden en önemli biyobelirteçleri seçmek ve potansiyel hastalık göstergeleri olarak kullanılacak güçlü adayları belirlemek amacıyla yapılmaktadır. **A.** Renk kodları ve AUC (*Area Under Curve*) değerleri: her renkli eğri, belirli bir değişken sayısı için modelin performansını temsil etmektedir ve AUC değerleri, modelin bu değişkenlerle ne kadar iyi ayırt edebildiğini göstermektedir. **B.** Grafik: farklı özellik sayıları kullanılarak elde edilen tahmin doğruluklarını göstermektedir. **Eksenler:** X eksen: özellik sayısı Y eksen: tahmini doğruluğa işaret etmektedir. **Noktalar:** her nokta, belirli bir özellik sayısı için elde edilen model doğruluğunu temsil etmektedir. **C.** Tahmin edilen sınıf olasılıkları: dağılım grafiği: model tarafından tahmin edilen olasılıklara göre sınıflarının dağılımını gösterir.

**D. Özellik seçim sıklığı bar grafik:** belirli metabolitlerin modelde ne sıklıkta seçildiğini göstermektedir. Eksenler: X eksen: seçilme sıklığı (%) Y eksen: metabolitler Renkler: her metabolitin seçilme sıklığını ve önemini belirtmek için kullanılmaktadır. Kemik iliği plazma örneklerine ait potansiyel biyobelirteçlerin sağlıklı verici grubuna karşı AML (yeni tanı-relaps hastalık) hastalarında (Şekil 4.14), tedavi sonrası remisyona giren AML hastalarına karşı henüz tedavi almamış olan AML (yeni tanı-relaps hastalık) hastalarında (Şekil 4.15) ve sağlıklı verici grubuna karşı remisyona giren AML hastalarında (Şekil 4.16) için ayırt edici gücü çok değişkenli ROC eğrisi analizleri ile doğrulanmıştır.

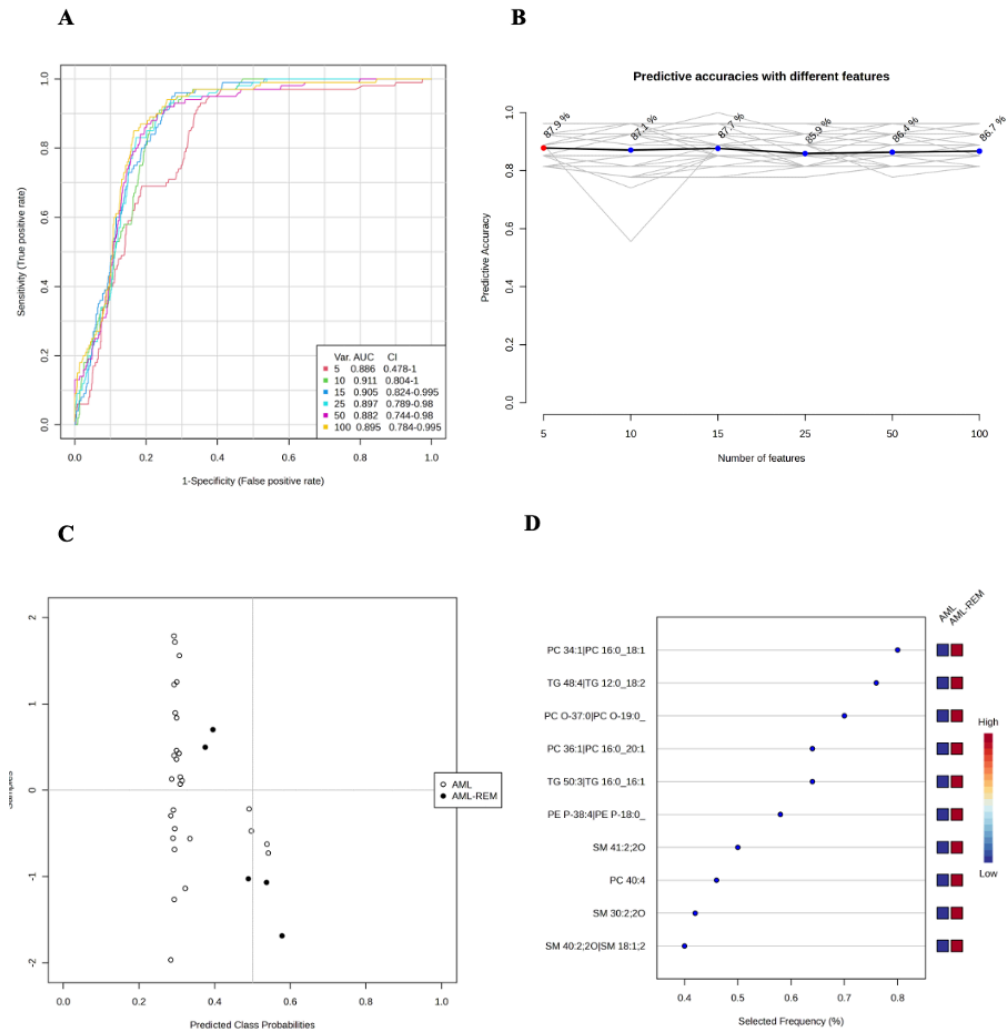
Buna göre AML (yeni tanı-relaps hastalık) hastaları ile sağlıklı vericilerin kemik iliği plazma örneklerinin ROC analizi yapıldığında tespit edilen ve potansiyel biyobelirteç olarak tanımlayabileceğimiz en önemli 10 metabolit: TG 24:0|TG 8:0\_8:0\_8:0, Palatinose, SMGDG 49:6, Capric acid, Isomaltose, Maltotriitol, TG 26:0|TG 8:0\_8:0\_10:0, PC O-37:3|PC O-19:2\_18:1, PC 36:5, Lactobionic acid, (Şekil 4.14).



**Şekil 4.14.** Grup 1 için kemik iliği plazma örneklerine ait çok değişkenli ROC eğrisi tabanlı keşif analizi eğrileri. **A.** ROC eğrileri grafiği, **B.** Örneklerin tahmini sınıf olasılıkları, **C.** Artan sayıda moleküler tür ile biyobelirteç modellerinin tahmin doğruluğu, **D.** Biyobelirteç modeline ait en önemli 10 metabolit

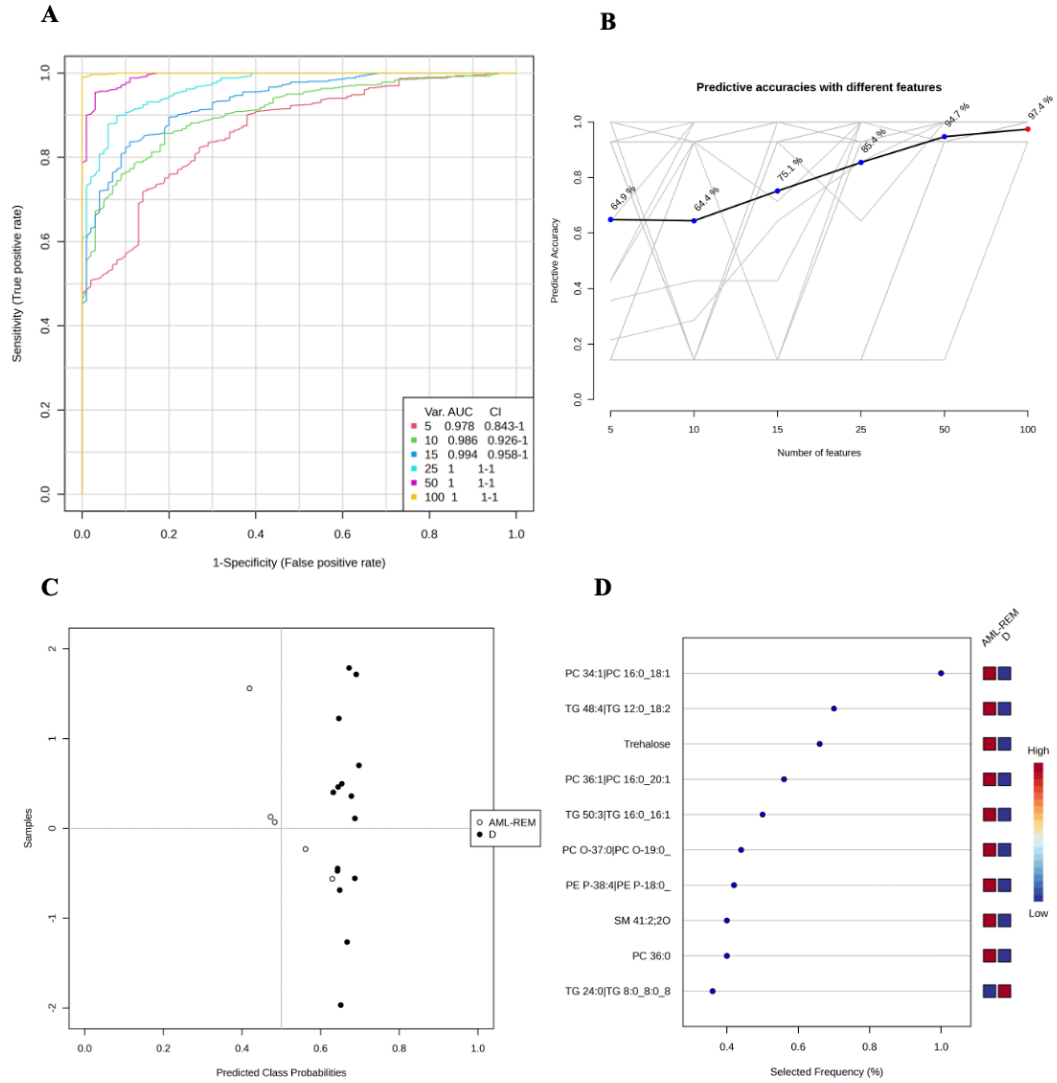


AML (yeni tanı-relaps hastalık) hastaları ile tedavi sonrası remisyona giren AML hastalarının kemik iliği plazma örneklerinin ROC analizi yapıldığında tespit edilen ve potansiyel biyobelirteç olarak tanımlayabileceğimiz en önemli 10 metabolit: Şekli 4.15) PC 34:1|PC 16:0\_18:1, TG 48:4|TG 12:0\_18:2\_18:2, PC O-37:0|PC O-19:0\_18:0, PC 36:1|PC 16:0\_20:1, TG 50:3|TG 16:0\_16:1\_18:2, SM 41:2;2O, PC 40:4, SM 30:2;2O, SM 40:2;2O|SM 18:1;2O/22:1 (Şekil 4.15).



**Şekil 4.15.** Grup 2 için kemik iliği plazma örneklerine ait çok değişkenli ROC eğrisi tabanlı keşif analizi eğrileri. **A.** ROC eğrileri grafiği, **B.** Örneklerin tahmini sınıf olasılıkları, **C.** Artan sayıda moleküler tür ile biyobelirteç modellerinin tahmin doğruluğu, **D.** Biyobelirteç modeline ait en önemli 10 metabolit.

Tedavi sonrası remisyona giren AML hasta ve sağlıklı vericilerin kemik iliği plazma örneklerinin ROC analizi yapıldığında tespit edilen ve potansiyel biyobelirteç olarak tanımlayabileceğimiz en önemli 10 metabolit: PC 34:1|PC 16:0\_18:1, TG 48:4|TG 12:0\_18:2\_18:2, Trehalose, PC 36:1|PC 16:0\_20:1, TG 50:3|TG 16:0\_16:1\_18:2, PC O-37:0|PC O-19:0\_18:0, PE P-38:4|PE P-18:0\_20:4, SM 41:2;2O, PC 36:0, TG 24:0|TG 8:0\_8:0\_8:0 (Şekil 4.16)

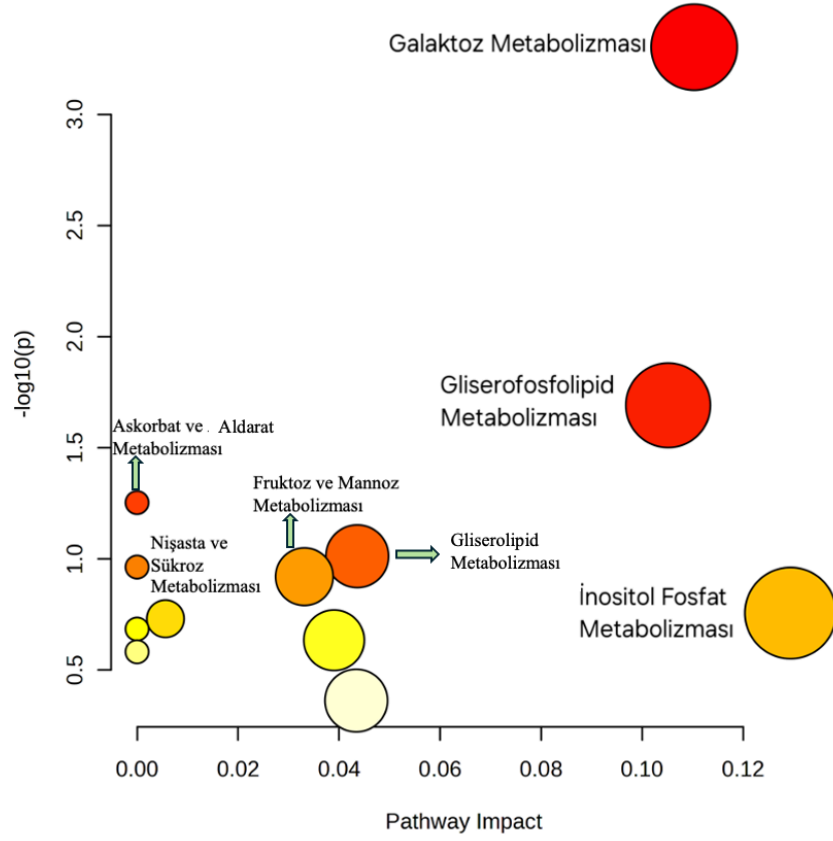


**Şekil 4.16.** Grup 3 için kemik iliği plazma örneklerine ait çok değişkenli ROC eğrisi tabanlı keşif analizi eğrileri. **A.** ROC eğrileri grafiği, **B.** Örneklerin tahmini sınıf olasılıkları, **C.** Artan sayıda moleküler tür ile biyobelirteç modellerinin tahmin doğruluğu, **D.** Biyobelirteç modeline ait en önemli 10 metabolit.

#### 4.6. Plazma Örneklerine Ait Yolak Analizi

Sadece GC-MS temelli metabolik analizler ile elde edilen metabolom verileri kullanılarak yolak analizleri yapılmıştır. Çeşitli biyolojik veya metabolik yolakların AML hastalık süreçlerinde karşılaştırmalı incelenmesi ile etki düzeylerini (hastalıkla ilişkisini) ve istatistiksel önemlerini gösteren grafikler üç ana grup için görselleştirilmiştir (Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19). Yolak analizinde düğüm rengi, istatistiksel anlamlılığı temsil etmektedir. Genellikle araştırılmakta olan biyolojik durum veya hastalıkla ilişkili bulunup istatistiksel anlamlı taşıyan düşük p-değerlerine ( $p < 0.05$ ) sahip olan yolaklara ait düğümler daha koyu bir renk ile ifade edilmektedir. Düğüm yarıçapı (radius) ise araştırılan hastalık durumunda yolakların "pathway impact" değerlerine bağlı olarak belirlenmektedir. Yarıçap ne kadar büyükse, ilgili metabolik yolun etkilenme derecesi o kadar büyüktür. Bu durum, analiz edilen koşul altında yolun ne kadar önemli olduğunu göstermektedir ve genellikle yoldaki metabolitlerin sayısı ve bu metabolitlerin yol içindeki bağlantı ağırlıkları dikkate alınarak hesaplanmaktadır.

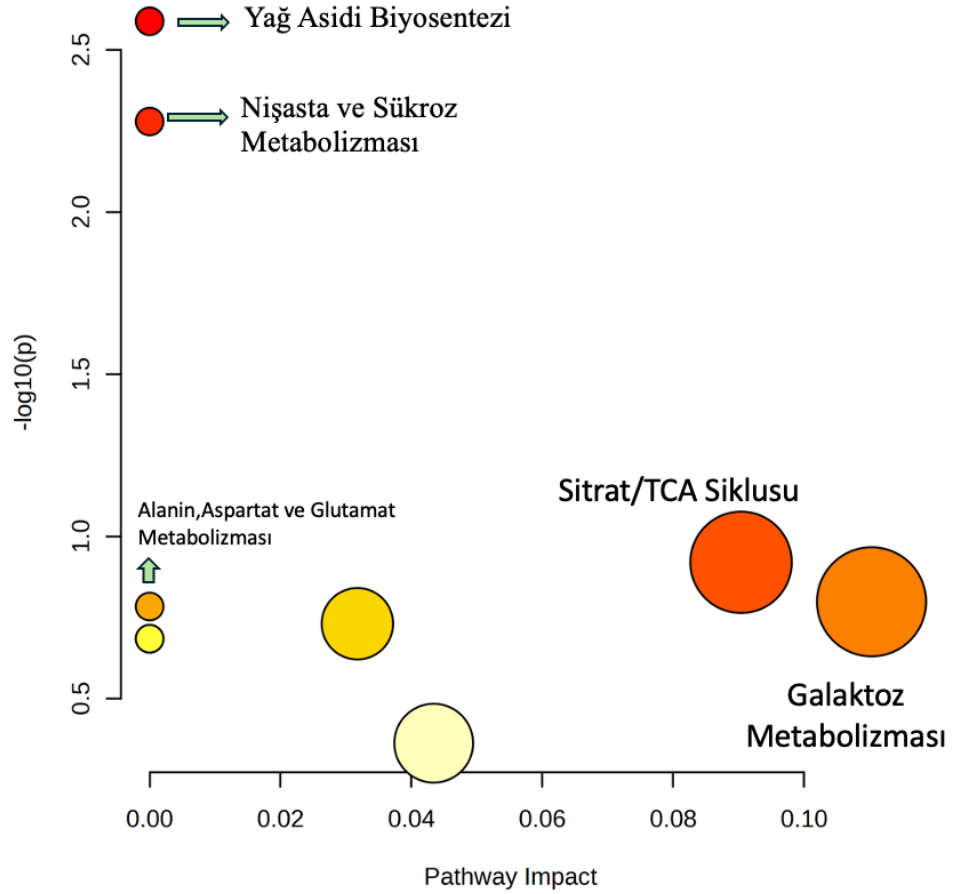
AML hastalarında sağlıklı vericiler ile karşılaştırıldığında (Grup 1) en çok etkilenen metabolik yolaklar; galaktoz, gliserofosfolipid ve askorbat/aldarat metabolizmalarıdır. Galaktoz metabolizmasında yer alan 27 metabolitten 3'ü, gliserofosfolipit metabolizmasında yer alan 36 metabolitten 2'si askorbat ve aldarat metabolizmasında yer alan 9 metabolitten 1'i gruplar arasında farklılaşan metabolitleridir ( $p < 0.05$ ) (Şekil 4.17).



Yolak	Eşleşme	p	Etki	Eşleşen Metabolitler
Galaktoz metabolizması	3/27	0,000	0,110	3/27 (Sorbitol myo-Inositol Alpha-Lactose)
Gliserofosfolipid metabolizması	2/36	0,020	0,105	2/36 (O- Phosphoethanolamine Glycerol 3- phosphate)
Askorbat ve Aldarat Metabolizması	1/9	0,056	0	1/9 myo-Inositol

**Şekil 4.17.** Grup 1: sağlıklı verici grubuna karşı AML (yeni tanı-relaps) hastalarına ait yolak analizi etki grafiği.

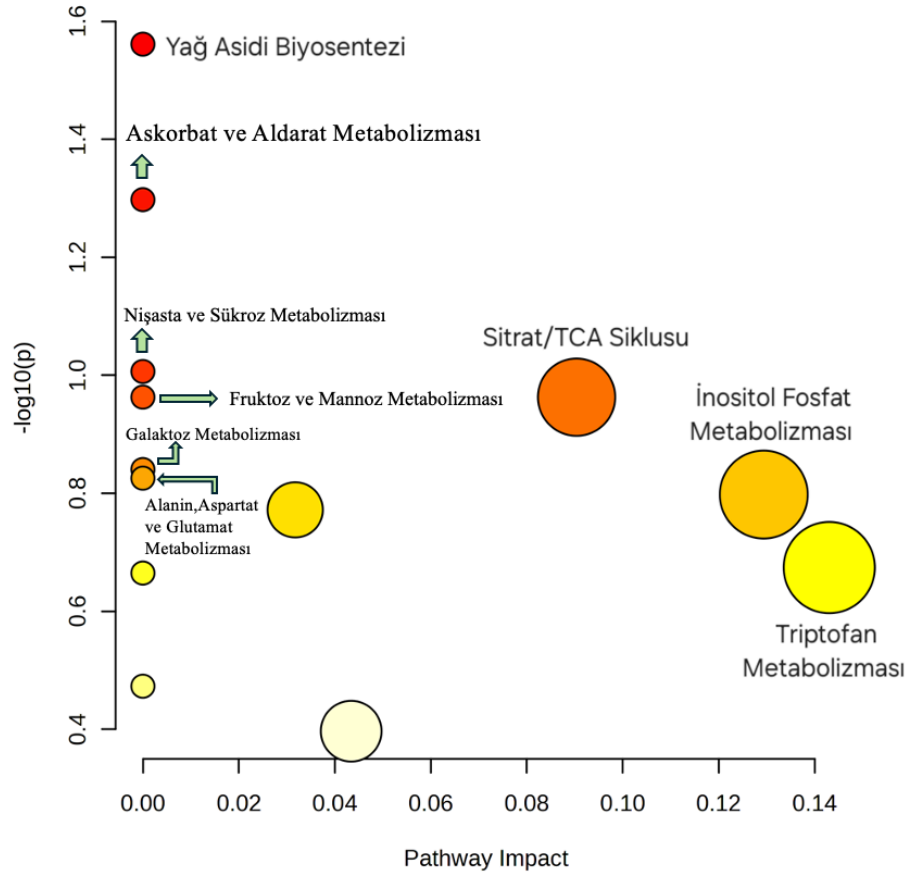
Henüz tedavi almamış olan AML hastalarında tedavi sonrası remisyona giren AML hastaları ile karşılaştırıldığında (Grup 2) en çok etkilenen metabolik yollar yağ asidi biosentezi ve nişasta/sükroz metabolizmasıdır. Yağ asidi biosentezinde yer alan 47 metabolitten 3'ü, nişasta ve sükroz metabolizmasında yer alan 18 metabolitten 2'si, gruplar arasında farklılaşan metabolitleridir ( $p < 0.05$ ) (Şekil 4.18).



Yolak	Eşleşme	p	Etki	Eşleşen Metabolitler
Yağ asidi biosentezi	3/47	0,003	0	3/47 Kaprik asit Dodekanoik asit Malonik asit
Nişasta ve sükroz metabolizması	2/18	0,005	0	2/18 Trehaloz izomaltoz

**Şekil 4.18.** Grup 2: tedavi sonrası remisyona giren AML hastalarına karşı henüz tedavi almamış olan AML (yeni tanı-relaps) hastalarına ait yolak analizi etki grafiği

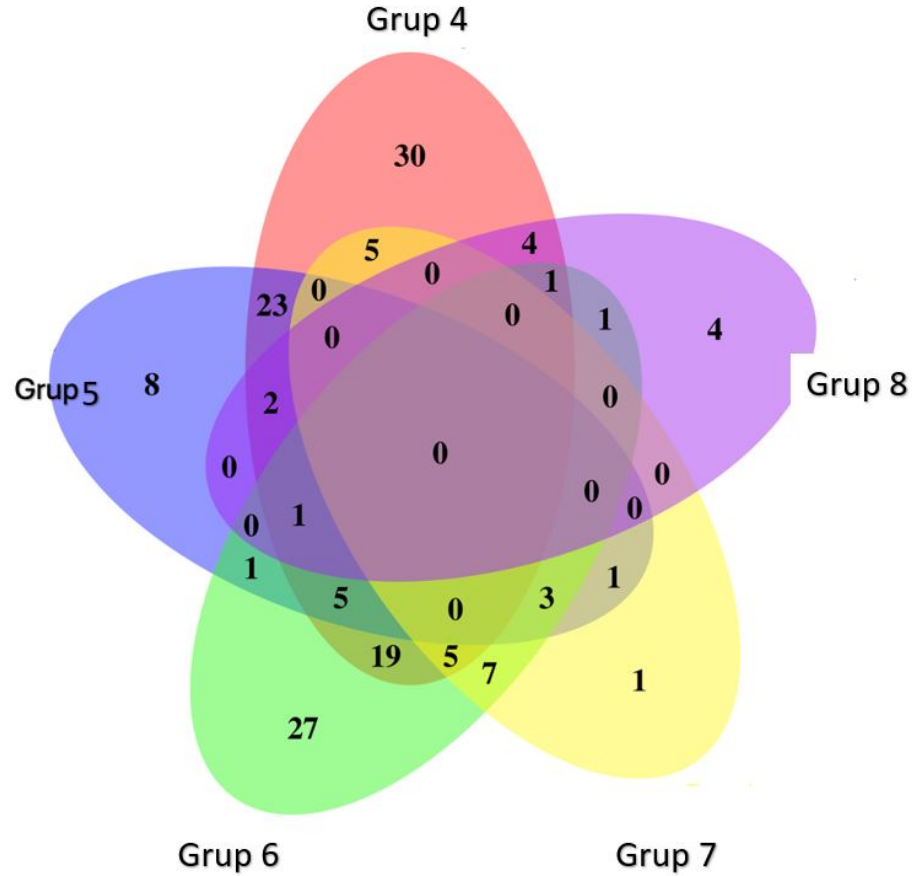
Tedavi sonrası remisyona giren AML hastaları sağlıklı vericiler ile karşılaştırıldığında (Grup 3) en çok etkilenen yollar; yağ asidi biyosentezi ve askorbat/alderat metabolizmasıdır. Yağ asidi biyosentezinde yer alan 47 metabolitten 2'si, askorbat ve alderat metabolizmasında yer alan 9 metabolitten 1'i gruplar arasında farklılaşan metabolitlerdir ( $p < 0.05$ ) (Şekil 4.19).



Yolak	Eşleşme	p	Etki	Eşleşen Metabolitler
Yağ asidi biyosentezi	2/47	0,027	0	2/47 Dodekanoik asit Malonik asit
Askorbat ve Aldarat Metabolizması	1/9	0.050	0	1/9 myo-Inositol

**Şekil 4.19.** Grup 3: sağlıklı verici grubuna karşı tedavi sonrası remisyona giren AML hastalarına ait yolak analizi etki grafiği

#### 4.7. Diğer Alt Gruplar Arasında Yapılan Karşılaştırmalı Bütünleşik Omiks Veri Analizleri



**Şekil 4.20.** Diğer alt gruplarda metabolom sonuçlarının Venn Diyagramı ile karşılaştırılması. Grup 4 (AML tanı vs. sağlıklı verici), Grup 5 (AML relaps vs. sağlıklı verici), Grup 6 (AML tanı vs. AML remisyon), Grup 7 (AML tanı - AML relaps), Grup 8 (AML tanı/relaps vs. AML remisyon).

Beş grup için t-test sonuçlarına göre spesifik metabolitler; Grup 4 için 30 metabolit, Grup 5 için 8 metabolit, Grup 6 için ise 27 metabolit, Grup 7 için 1 metabolit, Grup 8 için 4 metabolit (Tablo 4.6) bulunmuştur.

**Tablo 4.5.**Diğer alt gruplarda bütünleşik omiks verisinin Venn Diyagramı ile karşılaştırılmasından elde edilen grup spesifik metabolitleri

Grup 4*	Grup 5*	Grup 6*	Grup 7*	Grup 8*
FA 18:0	CL 69:1 CL 16:0_18:0_18:0_17:1 PC O-50:8	Cer 40:1;2O Cer 18:1;2O/22:0	LPC16 :0/0:0	Hex2Cer 34:1;2O Hex2Cer 18:1;2O/16:0
FA 38:8	PE O-37:4 PE O-17:0_20:4	DG 32:0 DG 16:0_16:0		Hex3Cer 34:1;2O Hex3Cer 18:1;2O/16:0
PC 33:4	SM 41:2;2O	LPC 14:0/0:0		PE O-39:5 PE O-21:4 18:1
PC 36:4 PC 18:2 18:2	Glycine	LPC 16:1/0:0		Lactic acid
PC 40:8	Heptadecanoic acid	PC 34:1 PC 16:0 18:1		
PC O-37:3 PC O-19:2 18:1	Inosine	PC 36:1 PC 16:0 20:1		
PE O-37:1 PE O-19:0 18:1	Methylmalonic acid	PC 36:2 PC 18:1 18:1		
PE O-37:2 PE O-19:0 18:2		PC 36:3		
PE O-39:3 PE O-19:0 20:3		PC 40:4		
SM 32:6;3O		PC O-34:0		
SM 34:2;2O SM 18:2;2O/16:0		PC O-34:2		
SM 43:1;2O SM 18:1;2O/25:0		PC O-35:0 PC O-19:0 16:0		
SMGDG 38:4		PE O-35:1 PE O-17:0 18:1		
TG 24:0 TG8:0 8:0 8:0		PE P-38:4 PE P-18:0 20:4		
TG 26:0 TG 8:0 8:0 10:0		PI O-37:3 PI O-19:1 18:2		
TG 27:0 TG 8:0 9:0 10:0		PI O-39:6 PI O-17:0 22:6		
TG 46:1 TG 14:0 16:0 16:1		SM 30:2;2O		
TG 52:1 TG 16:0 18:0 18:1		SM 33:1;2O		
TG 54:5 TG 18:1 18:2 18:2		SM 34:1;2O		
6-phosphogluconic acid		SM 36:1;2O SM 27:1;2O/9:0		
Beta-glutamic acid		SM 39:1;2O		
Capric acid		ST 27:1;O		
Glycerol 1-phosphate		TG 50:2 TG 16:0 16:1 18:1		
Lactobionic acid		TG 50:4 TG 16:1 16:1 18:2		
N-acetyl-5-hydroxytryptamine		Alanine		
N-ethylglycine		Lauric acid		

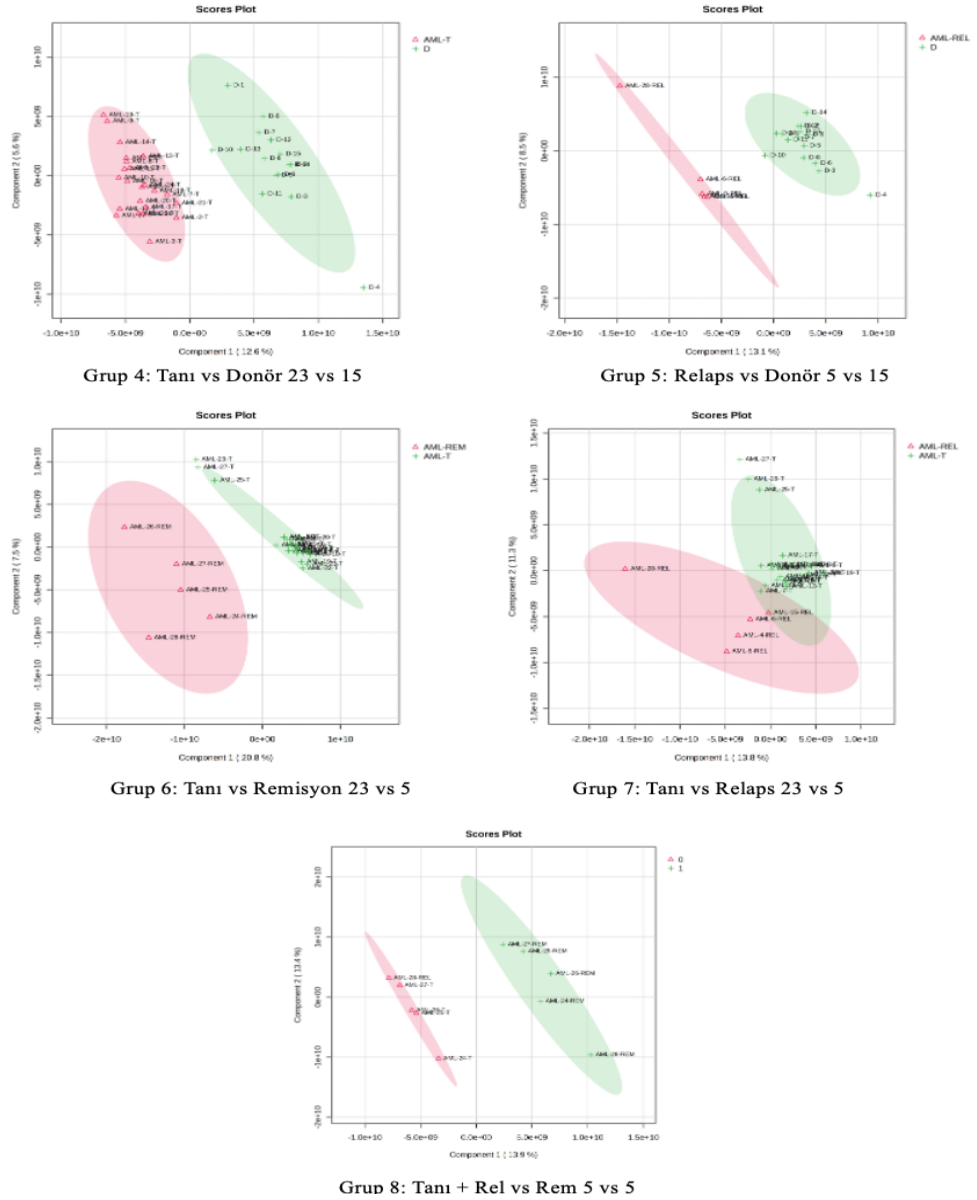


Phosphoric acid		Malonic acid		
Sedoheptulose anhydride monohydrate				
Tagatose				
Tryptophan				

\* Grup 4 (AML tanı vs. sağlıklı verici), Grup 5 (AML relaps vs. sağlıklı verici), Grup 6 (AML tanı vs.AML remisyon), Grup 7 (AML tanı -AML relaps), Grup 8 (AML tanı/relaps vs. AML remisyon)

#### 4.8. Diğer Alt Gruplar Arasında Yapılan Karşılaştırmalı Bütünleşik Omiks Verilerinin Çok Değişkenli Analizi

Her bir alt grup için bütünleşik omiks verisinden PLS-DA grafikleri oluşturularak veri setinde herhangi bir aykırı değer ve sistemik hata olup olmadığı belirlenmiş ve karşılaştırma kolaylığı açısından görseller yan yana sunulmuştur (Şekil 4.21).



**Şekil 4.21.** Diğer alt gruplar için PLS-DA skor grafikleri. Grup 4: AML (yeni tanı) vs. sağlıklı verici (n=23 vs. n=15), Grup 5: Relaps AML vs. sağlıklı verici (N=5 vs. n=15), Grup 6: AML (yeni tanı) vs remisyon (n= 23 vs. n=5) Grup 7 AML (yeni tanı) vs relaps AML (n= 23 vs. n=5), Grup 8 AML hasta (yeni tanı ve relaps hastalık) vs. remisyon (n=5 vs. n=5)

(Grup 4: Pembe renk; AML yeni tanı hastalarını, yeşil renk; sağlıklı vericileri ifade etmektedir. Eksenler: Component 1 (X Eksen): %12,6 varyansı açıklamaktadır. Component 2 (Y Eksen): %5,6 varyansı açıklamaktadır. Bu analizde kullanılan bu iki ana bileşen, veri setindeki toplam varyansın yaklaşık %18,2'sini temsil etmektedir. Grup 5: Pembe renk Relaps AML, yeşil renk; sağlıklı vericileri ifade etmektedir. Eksenler: Component 1 (X Eksen): %13,1 varyansı açıklamaktadır. Component 2 (Y Eksen): %8,5 varyansı açıklamaktadır. Bu analizde kullanılan bu iki ana bileşen, veri setindeki toplam varyansın yaklaşık %21,6'sını temsil etmektedir. Grup 6: Pembe renk remisyon, yeşil renk AML tanı hastalarını ifade etmektedir. Eksenler: Component 1 (X Eksen): %20,8 varyansı açıklamaktadır. Component 2 (Y Eksen): %7,5 varyansı açıklamaktadır. Bu analizde kullanılan bu iki ana bileşen, veri setindeki toplam varyansın yaklaşık %28,3'ünü temsil etmektedir. Grup 7: Pembe renk AML relaps, yeşil renk AML tanı hastalarını ifade etmektedir. Eksenler: Component 1 (X Eksen): %13,8 varyansı açıklamaktadır. Component 2 (Y Eksen): %11,3 varyansı açıklamaktadır. Bu analizde kullanılan bu iki ana bileşen, veri setindeki toplam varyansın yaklaşık %25,1 temsil etmektedir. Grup 8: Pembe renk AML tanı anını, yeşil renk remisyonu ifade etmektedir. Component 1 (X Eksen): %13,9 varyansı açıklamaktadır. Component 2 (Y Eksen): %13,4 varyansı açıklamaktadır. Bu analizde kullanılan bu iki ana bileşen, veri setindeki toplam varyansın yaklaşık %27,3'ünü temsil etmektedir.

## 5. TARTIŞMA

Akut myeloid lösemi hastalarında yoğun kemoterapi protokolleri uygulanmasına rağmen yüksek hastalık nüks oranları nedeni ile hem erişkin hem de çocuk hastalarda uzun süreli yaşam oranları oldukça düşüktür. İntratümöral heterojenite ve tedavi süreçlerini takiben gelişen klonal evalüsyon lösemik hücre kaderini ve davranışını etkilemekte ve lösemik blastların veya lösemik kök hücrelerin hedeflenmesini güçleştirmektedir. Gerçek anlamda hedefe yönelik, kişileştirilmiş tedavilerin geliştirilebilmesi için lösemi gelişimine neden olan hücresel ve moleküle mekanizmaların çok iyi anlaşılması gerekmektedir. Metabolizma hücrenin ihtiyaçlarına göre enerji üretimini sağlayan dinamik süreçler toplamı olarak tanımlanabilir. Dolayısı ile proliferasyon, farklılaşma veya dormant faza geçiş gibi süreçler hücre metabolizmasını şekillendiren temel unsurlardır. Sağlıklı hematopoietik kök hücreler devamlılıklarını sağlamak ve multipotent öncül hücre üretimi sağlayabilmek için kemik iliği nişinde “düşük enerji ihtiyacını” ifade eden bir metabolik profil sergilerler. Aksine lösemik blastlar yüksek hücre döngüsü nedeni ile çoğalmak ve varlıklarını idame ettirebilmek için ek enerji kaynaklarına ihtiyaç duymaktadırlar. Lösemik sürecin devamı için ihtiyaç duyulan makromoleküllerin (amino asitler, nükleotidler, yağ asitleri, **elektron** taşıyıcı moleküller) sağlanması için blastlarda glikoliz ve pentoz-fosfat yolağı **aktivesi** artmıştır. Ayrıca hem hematopoietik hücreler hem de lösemik hücreler arasında genomik ve metabolik farklılıklar gösteren hücre alt grupları mevcuttur ve hastalık prognozu ve/veya tedavi direnci ile ilişkili olabilecek bu hücre alt gruplarının tanımlanabilmesi için güncel immünofenotipleme yeterli olmamaktadır. Bu nedenle metabolitler veya metabolik yollara ilişkilendirilebilecek yeni moleküler belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalar genellikle lösemik blastlarda aktif olan disregüle metabolik yolları hedefleyebilmek amacı ile lösemik hücre veya lösemik kök hücre metabolik profili üzerine yoğunlaşmıştır. Lösemik hücrenin metabolik adaptasyon kabiliyeti ve lösemik kök hücre plastisitesi lökomogenezin iki temel kavramıdır ve lösemi başlangıcı/gelişimi ve tedavi yanıtı için kritik öneme sahiptirler. AML’de regülasyonu bozulan ve lökomogenezini veya ilaç direnç gelişimini destekleyen dört temel metabolik yolak; glikoliz, mitokondriyal metabolizma, amino asit metabolizması ve lipid metabolizmasıdır.

Tümör mikroçevresinin tümör gelişimi, yayılımı ve tedavi yanıtı üzerindeki kanıtlanmış etkinliği, tümör mikroçevresini önemli bir terapötik hedef haline getirmiştir. Ancak güncel araştırmaların çoğu tümör mikroçevresinin protein bileşenleri üzerinde yoğunlaşmaktadır. Tümör mikroçevresinin metabolik dinamikleri ile ilgili veriler oldukça azdır. Oysa tümör mikroçevresinin metabolik profilinin çıkarılması, hastalık ve tedavi süreçleri boyunca değişim gösteren tümör metabolizmasının izlenebilir hale gelmesini sağlayacak güçlü bir analitik yöntemdir. Bu dinamik profillemeye ayrıca kişiselleştirilmiş tedavilerin geliştirilmesi için gerekli olan biyobelirteçlerin tanımlanmasını da sağlayacaktır. Tanısal ve prognostik öneme sahip olan tümör metabolik profili ile ilgili çalışmalarda genellikle metabolit analizleri için periferik kan örnekleri kullanılmaktadır. Bu örneklerdeki değişimler tüm vücudun hastalık veya tedaviye yanıtı ifade etmektedir. Spesifik tümör nişinden alınan biyolojik sıvıların metabolik analizi tümör ve tümör nişindeki metabolik değişimleri daha iyi gösterecek ve tümörün tedavi yanıtını/prognozunu belirleyecek farmakodinamik biyobelirteçlerin tanımlanmasını sağlayacaktır. Bu proje kapsamında *in vivo* lösemik nişteki metabolik ortamı en iyi yansıttığı kabul edilen, kemik iliği plazma örnekleri kullanılarak karşılaştırmalı metabolom analizleri yapılmıştır. Bu şekilde lösemik mikroçevrede meydana gelen, lösemi gelişimi/ilerlemesi veya tedavi direnci ile ilişkili olabilecek metabolik değişimlerin genel profilinin çıkarılmıştır. Farklı hastalık evrelerinde (tanı, remisyon ve relaps) yapılan metabolik niş profillemesi ile mevcut konvansiyonel veya hedefe yönelik yenilikçi tedavilerin (örn: immünoterapötik yaklaşımlar) etkinliğini artırıcı yeni metabolik hedeflerin tespit edilebileceği öngörülmüştür.

Çalışmamız kapsamında metabolik analizleri yapılan tüm AML hasta kemik iliği plazmaları ve kontrol olarak kullanılan sağlıklı verici kemik iliği plazmalarının incelenmesi ile lösemi hastalarında anlamlı olarak değişen metabolitlerin önemli bir kısmının lipid ve yağ asit metabolizması ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bütünleşik omiks verisinin çok değişkenli analizi ile elde edilen sonuçlarda öne çıkan metabolitler/lipidler; anlamlı artış gösteren lipid metabolizması ile ilişkili olan, triacylglycerol, sfingolipidler / metabolitleri, fosfolipidler (fosfotidilkolin, fosfoditil ethanolamin, fosfokolin) ve yağ asitleridir. Yine artmış glikoliz ile ilişkili olarak fosfoglisirik asit, isomaltoz, laktobionik asit, sitrik asitte anlamlı artma tespit

edilmiştir. Glikolizde, lipid / yağ asit metabolizmalarında gözlenen bu artış yüksek blast yükü ile gelen AML hastalarında lösemik blastların artmış enerji ihtiyaçlarının karşılanmasına yönelik metabolik adaptasyon süreci ile uyumlu bir metabolik profildir ve AML hastalarında yapılan ve AML'de görülen temel metabolik değişimleri (artmış glikoliz, yağ asit oksidasyonu, artmış TCA aktivitesi) gösteren diğer araştırmaların sonuçları ile uyumludur (63). Ayrıca Stefanko A, ve ark.'nın yaptıkları AML hastalarının lipidomik yaklaşım ile prognostik sınıflandırılmasına yönelik araştırmada lipid metabolizması ile ilgili önemli değişiklikler tespit etmişler ve bu değişimleri artmış lipid/yağ asit metabolizması dışında hücre membranının yapısal akışkanlığında etkileyerek lösemik hücre büyümesini destekleyen doymuş ve doymamış yağ asit oranlarının önemi vurgulamışlardır (105). Diğer yandan lösemi hastalarında esansiyel bir amino asit olan triptofan, tropomyosin reseptör kinaz B (TrkB) agonisti olan ve aynı zamanda ROS düzeylerinin regülasyonu ile antioksidan etkide gösterebilen N-asetil-5-hidroksi triptamin ve glutamate öncülü olan  $\beta$ -glutamik asit düzeylerinde artış tespit edilmiştir ve bu durum artmış oksidatif strese karşı lösemik hücreleri korumak için antioksidan mekanizmaların aktifleştiğinin ve Redox homeostazının bir göstergesi olabilir. Kİ plazmasında yapılan metabolik analizler hem AML blastlarının hemde lösemik mikroçevrenin etkilerini yansıttığı için bu metabolik profilin lösemik hücreleri bioenerji ihtiyaçlarını destekleyen ve antioksidan koruma sağlayan kemik iliği MKH leri (GSH ve GSH peroksidazlar yolu ile) ile ilişkili olabilir.

Tedavi sonrası remisyona giren AML hastalarının Kİ plazma örnekleri henüz tedavi alamamış AML örnekleri ile karşılaştırılarak incelendiğinde ise tedavi sonrası hastalarda temizlenen lösemik hücre yükünün bir göstergesi olarak düşük olan lipid/yağ asit düzeylerinin anlamlı olarak arttığı, glikolitik aktivitenin düştüğünü gösteren glikoz ilişkili metabolitlerindeki artışın sağlıklı vericilerdeki düzeylere gerilediği gözlenmiştir. Ayrıca özellikle sfingomyelin metaboliti olan seramidlerdeki artış seramidlerin tümör baskılayıcı etkisi nedeni ile AML hastalarında iyi prognoz faktörü olarak değerlendirilebilir. Hücre-içi ve hücre dışı nükleotid metabolizmasını etkileyerek tümör baskılayıcı etki gösterebilen aynı zamanda otofajiyi indükleyici ve antiinflamatuvar etkileride olan Trehalose (106) düzeylerinde gözlenen artış ise yine bir iyi prognostik faktör olarak değerlendirilebilir. Ayrıca AML hastalarında izlenen artmış glutamat, triptofan ve 5-HT düzeylerinin normale dönmesi tedaviye yanıt

alınması ile oksidatif stres riskinde ortadan kalktığını göstermektedir. İyileşme süreci ile hastalarda Alanin, TP53 bağımlı- otofajiyi indükleyebilen malonik asit ve maliyn hücre proliferasyonun PTEN/AKT/mTOR yolağı üzerinden inhibe eden oleik asit düzeylerinde anlamlı artış gözlenmiştir. Bu metabolitlerin AML hastalarındaki prognostik değerlerinin anlaşılabilmesi için daha kapsamlı araştırmalarda sonuçlarımızın konfirme edilmesi gerekmektedir. Remisyona giren AML hastalarının Kİ plazma örnekleri sağlıklı vericiler ile karşılaştırılarak incelendiğinde ise, lösemik blast yükünün temizlenmesiyle normalleşen lipid/yağ asit metabolizması ile uyumlu olarak artan lipid/yağ asit düzeylerinde önemli oranda normalleşme izlenmiştir. Glukuronik asit metabolizması ile ilişkili bir metabolit olan glucoheptonic asitte, inozin, sitrik asit, izopropil beta-D-1-thiogalaktopironozid (IPTG) düzeylerinde azalma; iyi prognostik belirteç olma potansiyeli olan ancak ileri analizleri gereken malonik asit ve trehalose düzeyleri anlamlı artış izlenmiştir. Ayrıca pürin metabolizması ilişkili bir metabolit olan ksantozinde artış gözlenmiştir.

Bu çalışma kapsamında AML hastalarında farklı hastalık süreçlerinde yapılan bütünlük omiks veri analizleri; AML'de tanısal veya prognostik belirteçler tespit edebilmek için, immünofenotipleme ve moleküler/sitogenetik özelliklere ek olarak, lösemi mikroçevresinin dinamik metabolik değişimini yansıttığı için AML'de kişiye özel metabolik profillemeye yapılmasının risk sınıflaması için önemli bir araç olabileceğini göstermiştir. Özellikle değişen lösemik hücre metabolizmasının kritik basamaklarından biri olan ve bizim verilerimizde de teyit edilen lipid /yağ asit metabolizmasının etkilerini keşfedebilmek için hedeflenmiş lipidom analizleri yapılması önem arz etmektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- AML hasta kemik iliği plazma örneklerinin metabolik analizinden elde edilen bütünleşik omiks verileri kullanılarak lösemik mikroçevrede meydana gelen, lösemi gelişimi / ilerlemesi veya tedavi direnci ile ilişkili olabilecek metabolik değişimlerin genel profili çıkarılmıştır.
- AML'de farklı hastalık süreçlerinin (tedavi, remisyon, relaps hastalık) kemik iliği mikroçevresinde neden olduğu metabolik değişimleri anlamak için tek ve çok değişkenli analizler yapılmış ve tespit edilen farklılıklar potansiyel biyobelirteçlerin belirlenmesi için veya tedavi hedefleri olarak değerlendirmek için ileri hedefli lipidom analizlerinin yapılması gerekliliğini ortaya koymuştur.
- Venn diyagramları sayesinde sadece hastalığa, iyileşme sürecine ve sağlıklı duruma ait metabolitler ve lipitler çıkarılmıştır.
- PCA analizlerinde, AML hastaları ile sağlıklı vericiler, tedavi almamış AML hastaları ile tedavi sonrası remisyona giren AML hastaları ve sağlıklı vericiler ile remisyondaki AML hastaları arasındaki metabolik profil farklılıkları açık bir şekilde gösterilmiştir.
- VIP skorları, PLS-DA analiz modelinde her değişkenin ne kadar önemli olduğunu belirleyen bir ölçüt olmasından dolayı analiz sonuçlarında elde edilen bu skorlar, modelin sınıflandırma performansına katkıda bulunan metabolitlerin hangileri olduğunu gösterir.
- PLS-DA analiz modelindeki VIP skorları kullanılarak karşılaştırılan hastalık süreçleri veya sağlıklı kemik iliği ayırımını en iyi açıklayan metabolitler belirlenmiştir.
- Isı haritası, metabolitlerin mevcut hastalık sürecine göre nasıl değiştiğini ve hangi metabolitlerin hastalığın ayırt edici özelliklerine katkıda bulunduğunu göstermiştir. Bazı metabolitler AML hastalarında yüksekken, bazıları sağlıklı donörlerde daha yüksek konsantrasyonlardadır. Bu tür bilgiler, hastalık tanısında, prognozunun belirlenmesinde veya tedavi yanıtının izlenmesinde kullanılabilir.



- Bu analizler farklı AML hastalık ve iyileşme süreçlerindeki kemik iliği nişi ve sağlıklı kemik iliği nişi arasındaki metabolik farklılıkları değerlendirilmesi için önemli bir araçtır.
- Yolak analizleri hangi metabolik yolların hastalığın varlığı veya gelişimi ile en çok ilişkili olduğunu anlamak için kullanılmıştır. Bu bilgiler, hastalığın daha iyi anlaşılması ve yeni birleşik tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde önemli olabilir.
- "*Pathway Impact*" değerleri ile bir metabolik yolun, analiz edilen durum veya koşul (örneğin hastalık vs. sağlıklı durum) altında ne kadar etkilendiğini gösteren bir ölçüttür. Değer ne kadar yüksekse, o metabolik yol o koşulda o kadar fazla etkilenmiş demektir. Bu ölçüt, bir yola dahil olan ve değişiklik gösteren metabolitlerin sayısını ve bu metabolitlerin yolak üzerindeki topolojik (ağdaki konumları) önemini temel alır. Yüksek etki değerine sahip olan yolakların hastalığın mekanizmasında önemli rolleri olma olasılığı yüksektir. Bu kapsamda AML hastalarında sağlıklı vericileri ile karşılaştırıldığında en çok etkilenen yolaklar galaktoz, gliserofosfolipid ve askorbat/aldarat metabolizmalarıdır. Tedavi almamış AML hastalarında tedavi alanlara kıyasla en çok etkilenen yolaklar yağ asidi biosentezi ve nişasta/sukroz metabolizmasıdır ve bu yolakların etkinliğinin tedavi sonrası remisyona giren hastalarda da devam ettiği görülmüştür. Bu yolaklar potansiyel yeni terapötik hedeflerin geliştirilmesinde kullanılabilir.
- Yapılan tüm bu analizler ışığında, metabolitlerin hastalık durumu ile dinamik ilişkisini anlamak, hastalığın biyolojik mekanizmalarının keşfedilmesini, hastalık prognozu ile ilişkili metabolik profil modellerinin çıkarılmasını mümkün kılacaktır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 2015;373(12):1136-52.
2. Bolouri H, Farrar JE, Triche T, Jr., Ries RE, Lim EL, Alonzo TA, et al. The molecular landscape of pediatric acute myeloid leukemia reveals recurrent structural alterations and age-specific mutational interactions. *Nat Med.* 2018;24(1):103-12.
3. Hourigan CS, Gale RP, Gormley NJ, Ossenkoppele GJ, Walter RB. Measurable residual disease testing in acute myeloid leukaemia. *Leukemia.* 2017;31(7):1482-90.
4. DeWolf S, Tallman MS. How I treat relapsed or refractory AML. *Blood.* 2020;136(9):1023-32.
5. Thomas D, Majeti R. Biology and relevance of human acute myeloid leukemia stem cells. *Blood.* 2017;129(12):1577-85.
6. Isidori A, Cerchione C, Daver N, DiNardo C, Garcia-Manero G, Konopleva M, et al. Immunotherapy in Acute Myeloid Leukemia: Where We Stand. *Front Oncol.* 2021;11:656218.
7. Kumar B, Garcia M, Weng L, Jung X, Murakami JL, Hu X, et al. Acute myeloid leukemia transforms the bone marrow niche into a leukemia-permissive microenvironment through exosome secretion. *Leukemia.* 2018;32(3):575-87.
8. Mougiakakos D. The Induction of a Permissive Environment to Promote T Cell Immune Evasion in Acute Myeloid Leukemia: The Metabolic Perspective. *Front Oncol.* 2019;9:1166.
9. Santamaría C, Muntión S, Rosón B, Blanco B, López-Villar O, Carrancio S, et al. Impaired expression of DICER, DROSHA, SBDS and some microRNAs in mesenchymal stromal cells from myelodysplastic syndrome patients. *Haematologica.* 2012;97(8):1218-24.
10. Kode A, Manavalan JS, Mosialou I, Bhagat G, Rathinam CV, Luo N, et al. Leukaemogenesis induced by an activating  $\beta$ -catenin mutation in osteoblasts. *Nature.* 2014;506(7487):240-4.
11. Uçkan-Çetinkaya D, Muratoğlu B. Response of the Bone Marrow Stem Cells and the Microenvironment to Stress. In: Haider KH, editor. *Handbook of Stem Cell Therapy.* Singapore: Springer Nature Singapore; 2022. p. 1179-228.
12. Ozdogan H, Gur Dedeoglu B, Oztemur Islakoglu Y, Aydos A, Kose S, Atalay A, et al. DICER1 gene and miRNA dysregulation in mesenchymal stem

cells of patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloblastic leukemia. *Leuk Res.* 2017;63:62-71.

13. Méndez-Ferrer S, Bonnet D, Steensma DP, Hasserjian RP, Ghobrial IM, Gribben JG, et al. Bone marrow niches in haematological malignancies. *Nat Rev Cancer.* 2020;20(5):285-98.

14. Forte D, García-Fernández M, Sánchez-Aguilera A, Stavropoulou V, Fielding C, Martín-Pérez D, et al. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Support Acute Myeloid Leukemia Bioenergetics and Enhance Antioxidant Defense and Escape from Chemotherapy. *Cell Metab.* 2020;32(5):829-43.e9.

15. Roy DG, Kaymak I, Williams KS, Ma EH, Jones RG. Immunometabolism in the Tumor Microenvironment. *Annual Review of Cancer Biology.* 2021;5(Volume 5, 2021):137-59.

16. Farge T, Saland E, de Toni F, Aroua N, Hosseini M, Perry R, et al. Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism. *Cancer Discov.* 2017;7(7):716-35.

17. Baccelli I, Gareau Y, Lehnertz B, Gingras S, Spinella JF, Corneau S, et al. Mubritinib Targets the Electron Transport Chain Complex I and Reveals the Landscape of OXPHOS Dependency in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell.* 2019;36(1):84-99.e8.

18. Lo Presti C, Fauvelle F, Jacob MC, Mondet J, Mossuz P. The metabolic reprogramming in acute myeloid leukemia patients depends on their genotype and is a prognostic marker. *Blood Adv.* 2021;5(1):156-66.

19. Pollyea DA, Stevens BM, Jones CL, Winters A, Pei S, Minhajuddin M, et al. Venetoclax with azacitidine disrupts energy metabolism and targets leukemia stem cells in patients with acute myeloid leukemia. *Nat Med.* 2018;24(12):1859-66.

20. Trino S, Laurenzana I, Lamorte D, Calice G, De Stradis A, Santodirocco M, et al. Acute Myeloid Leukemia Cells Functionally Compromise Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Inhibiting Normal Hematopoiesis Through the Release of Extracellular Vesicles. *Front Oncol.* 2022;12:824562.

21. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016;127(20):2391-405.

22. Huret JL, Ahmad M, Arsaban M, Bernheim A, Cigna J, Desangles F, et al. Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology in 2013. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Database issue):D920-4.

23. Tarlock K, Meshinchi S. Pediatric acute myeloid leukemia: biology and therapeutic implications of genomic variants. *Pediatr Clin North Am.* 2015;62(1):75-93.
24. Song K, Li M, Xu X, Xuan LI, Huang G, Liu Q. Resistance to chemotherapy is associated with altered glucose metabolism in acute myeloid leukemia. *Oncol Lett.* 2016;12(1):334-42.
25. Niewerth D, Creutzig U, Bierings MB, Kaspers GJ. A review on allogeneic stem cell transplantation for newly diagnosed pediatric acute myeloid leukemia. *Blood.* 2010;116(13):2205-14.
26. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* 1994;367(6464):645-8.
27. Aplenc R, Alonzo TA, Gerbing RB, Smith FO, Meshinchi S, Ross JA, et al. Ethnicity and survival in childhood acute myeloid leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Blood.* 2006;108(1):74-80.
28. Gams AS, Alonzo TA, Meshinchi S, Sung L, Gerbing RB, Raimondi SC, et al. Gemtuzumab ozogamicin in children and adolescents with de novo acute myeloid leukemia improves event-free survival by reducing relapse risk: results from the randomized phase III Children's Oncology Group trial AAML0531. *J Clin Oncol.* 2014;32(27):3021-32.
29. Elgarten CW, Aplenc R. Pediatric acute myeloid leukemia: updates on biology, risk stratification, and therapy. *Curr Opin Pediatr.* 2020;32(1):57-66.
30. Goulard M, Dosquet C, Bonnet D. Role of the microenvironment in myeloid malignancies. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(8):1377-91.
31. Pinho S, Frenette PS. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(5):303-20.
32. Wei Q, Frenette PS. Niches for Hematopoietic Stem Cells and Their Progeny. *Immunity.* 2018;48(4):632-48.
33. May M, Slaughter A, Lucas D. Dynamic regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow niches. *Curr Stem Cell Rep.* 2018;4(3):201-8.
34. Asada N, Takeishi S, Frenette PS. Complexity of bone marrow hematopoietic stem cell niche. *Int J Hematol.* 2017;106(1):45-54.
35. Fridenshtein A, Petrakova KV, Kuralesova AI, Frolova GI. [Precursor cells for osteogenic and hemopoietic tissues. Analysis of heterotopic transplants of bone marrow]. *Tsitologiya.* 1968;10(5):557-67.
36. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal

cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.

37. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010;466(7308):829-34.

38. Isern J, García-García A, Martín AM, Arranz L, Martín-Pérez D, Torroja C, et al. The neural crest is a source of mesenchymal stem cells with specialized hematopoietic stem cell niche function. *Elife*. 2014;3:e03696.

39. Butler JM, Nolan DJ, Vertes EL, Varnum-Finney B, Kobayashi H, Hooper AT, et al. Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010;6(3):251-64.

40. Winkler IG, Barbier V, Nowlan B, Jacobsen RN, Forristal CE, Patton JT, et al. Vascular niche E-selectin regulates hematopoietic stem cell dormancy, self renewal and chemoresistance. *Nat Med*. 2012;18(11):1651-7.

41. Katayama Y, Battista M, Kao WM, Hidalgo A, Peired AJ, Thomas SA, et al. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell*. 2006;124(2):407-21.

42. Zambetti NA, Ping Z, Chen S, Kenswil KJG, Mylona MA, Sanders MA, et al. Mesenchymal Inflammation Drives Genotoxic Stress in Hematopoietic Stem Cells and Predicts Disease Evolution in Human Pre-leukemia. *Cell Stem Cell*. 2016;19(5):613-27.

43. Hussong JW, Rodgers GM, Shami PJ. Evidence of increased angiogenesis in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2000;95(1):309-13.

44. Campioni D, Moretti S, Ferrari L, Punturieri M, Castoldi GL, Lanza F. Immunophenotypic heterogeneity of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from patients with hematologic disorders: correlation with bone marrow microenvironment. *Haematologica*. 2006;91(3):364-8.

45. Pruneri G, Bertolini F, Soligo D, Carboni N, Cortelezzi A, Ferrucci PF, et al. Angiogenesis in myelodysplastic syndromes. *Br J Cancer*. 1999;81(8):1398-401.

46. Passaro D, Di Tullio A, Abarategi A, Rouault-Pierre K, Foster K, Ariza-McNaughton L, et al. Increased Vascular Permeability in the Bone Marrow Microenvironment Contributes to Disease Progression and Drug Response in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell*. 2017;32(3):324-41.e6.

47. Krause DS, Fulzele K, Catic A, Sun CC, Dombkowski D, Hurley MP, et al. Differential regulation of myeloid leukemias by the bone marrow microenvironment. *Nat Med*. 2013;19(11):1513-7.

48. Arranz L, Sánchez-Aguilera A, Martín-Pérez D, Isern J, Langa X, Tzankov A, et al. Neuropathy of haematopoietic stem cell niche is essential for myeloproliferative neoplasms. *Nature*. 2014;512(7512):78-81.
49. Blau O, Hofmann WK, Baldus CD, Thiel G, Serbent V, Schümann E, et al. Chromosomal aberrations in bone marrow mesenchymal stroma cells from patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloblastic leukemia. *Exp Hematol*. 2007;35(2):221-9.
50. von der Heide EK, Neumann M, Vosberg S, James AR, Schroeder MP, Ortiz-Tanchez J, et al. Molecular alterations in bone marrow mesenchymal stromal cells derived from acute myeloid leukemia patients. *Leukemia*. 2017;31(5):1069-78.
51. Geyh S, Rodríguez-Paredes M, Jäger P, Khandanpour C, Cadeddu RP, Gutekunst J, et al. Functional inhibition of mesenchymal stromal cells in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2016;30(3):683-91.
52. Chandran P, Le Y, Li Y, Sabloff M, Mehic J, Rosu-Myles M, et al. Mesenchymal stromal cells from patients with acute myeloid leukemia have altered capacity to expand differentiated hematopoietic progenitors. *Leuk Res*. 2015;39(4):486-93.
53. Zhao ZG, Liang Y, Li K, Li WM, Li QB, Chen ZC, et al. Phenotypic and functional comparison of mesenchymal stem cells derived from the bone marrow of normal adults and patients with hematologic malignant diseases. *Stem Cells Dev*. 2007;16(4):637-48.
54. Abdul-Aziz AM, Shafat MS, Mehta TK, Di Palma F, Lawes MJ, Rushworth SA, et al. MIF-Induced Stromal PKC $\beta$ /IL8 Is Essential in Human Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Res*. 2017;77(2):303-11.
55. Kim JA, Shim JS, Lee GY, Yim HW, Kim TM, Kim M, et al. Microenvironmental remodeling as a parameter and prognostic factor of heterogeneous leukemogenesis in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res*. 2015;75(11):2222-31.
56. Diaz de la Guardia R, Lopez-Millan B, Lavoie JR, Bueno C, Castaño J, Gómez-Casares M, et al. Detailed Characterization of Mesenchymal Stem/Stromal Cells from a Large Cohort of AML Patients Demonstrates a Definitive Link to Treatment Outcomes. *Stem Cell Reports*. 2017;8(6):1573-86.
57. Battula VL, Le PM, Sun JC, Nguyen K, Yuan B, Zhou X, et al. AML-induced osteogenic differentiation in mesenchymal stromal cells supports leukemia growth. *JCI Insight*. 2017;2(13).
58. Boyd AL, Reid JC, Salci KR, Aslostovar L, Benoit YD, Shapovalova Z, et al. Acute myeloid leukaemia disrupts endogenous myelo-erythropoiesis

by compromising the adipocyte bone marrow niche. *Nat Cell Biol.* 2017;19(11):1336-47.

59. Abarrategi A, Foster K, Hamilton A, Mian SA, Passaro D, Gribben J, et al. Versatile humanized niche model enables study of normal and malignant human hematopoiesis. *J Clin Invest.* 2017;127(2):543-8.

60. Antonelli A, Noort WA, Jaques J, de Boer B, de Jong-Korlaar R, Brouwers-Vos AZ, et al. Establishing human leukemia xenograft mouse models by implanting human bone marrow-like scaffold-based niches. *Blood.* 2016;128(25):2949-59.

61. Herrmann H, Sadovnik I, Eisenwort G, Rüllicke T, Blatt K, Herndlhofer S, et al. Delineation of target expression profiles in CD34+/CD38- and CD34+/CD38+ stem and progenitor cells in AML and CML. *Blood Adv.* 2020;4(20):5118-32.

62. Chopra M, Bohlander SK. The cell of origin and the leukemia stem cell in acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 2019;58(12):850-8.

63. Mesbahi Y, Trahair TN, Lock RB, Connerty P. Exploring the Metabolic Landscape of AML: From Haematopoietic Stem Cells to Myeloblasts and Leukaemic Stem Cells. *Front Oncol.* 2022;12:807266.

64. Zhou J, Chng WJ. Identification and targeting leukemia stem cells: The path to the cure for acute myeloid leukemia. *World J Stem Cells.* 2014;6(4):473-84.

65. Wang YH, Israelsen WJ, Lee D, Yu VWC, Jeanson NT, Clish CB, et al. Cell-state-specific metabolic dependency in hematopoiesis and leukemogenesis. *Cell.* 2014;158(6):1309-23.

66. Daver N, Schlenk RF, Russell NH, Levis MJ. Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. *Leukemia.* 2019;33(2):299-312.

67. Poulain L, Sujobert P, Zylbersztein F, Barreau S, Stuani L, Lambert M, et al. High mTORC1 activity drives glycolysis addiction and sensitivity to G6PD inhibition in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia.* 2017;31(11):2326-35.

68. Oliveira GL, Coelho AR, Marques R, Oliveira PJ. Cancer cell metabolism: Rewiring the mitochondrial hub. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2021;1867(2):166016.

69. Spinelli JB, Haigis MC. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nat Cell Biol.* 2018;20(7):745-54.

70. Anderson NM, Mucka P, Kern JG, Feng H. The emerging role and targetability of the TCA cycle in cancer metabolism. *Protein Cell*. 2018;9(2):216-37.
71. Willems L, Jacque N, Jacquelin A, Neveux N, Maciel TT, Lambert M, et al. Inhibiting glutamine uptake represents an attractive new strategy for treating acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013;122(20):3521-32.
72. Jones CL, Stevens BM, D'Alessandro A, Reisz JA, Culp-Hill R, Nemkov T, et al. Inhibition of Amino Acid Metabolism Selectively Targets Human Leukemia Stem Cells. *Cancer Cell*. 2018;34(5):724-40.e4.
73. Cluntun AA, Lukey MJ, Cerione RA, Locasale JW. Glutamine Metabolism in Cancer: Understanding the Heterogeneity. *Trends Cancer*. 2017;3(3):169-80.
74. Lin KH, Xie A, Rutter JC, Ahn YR, Lloyd-Cowden JM, Nichols AG, et al. Systematic Dissection of the Metabolic-Apoptotic Interface in AML Reveals Heme Biosynthesis to Be a Regulator of Drug Sensitivity. *Cell Metab*. 2019;29(5):1217-31.e7.
75. Yang C, Ko B, Hensley CT, Jiang L, Wasti AT, Kim J, et al. Glutamine oxidation maintains the TCA cycle and cell survival during impaired mitochondrial pyruvate transport. *Mol Cell*. 2014;56(3):414-24.
76. Takubo K, Nagamatsu G, Kobayashi CI, Nakamura-Ishizu A, Kobayashi H, Ikeda E, et al. Regulation of glycolysis by Pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2013;12(1):49-61.
77. Ashton TM, McKenna WG, Kunz-Schughart LA, Higgins GS. Oxidative Phosphorylation as an Emerging Target in Cancer Therapy. *Clin Cancer Res*. 2018;24(11):2482-90.
78. Skrtić M, Sriskanthadevan S, Jhas B, Gebbia M, Wang X, Wang Z, et al. Inhibition of mitochondrial translation as a therapeutic strategy for human acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2011;20(5):674-88.
79. Sriskanthadevan S, Jeyaraju DV, Chung TE, Prabha S, Xu W, Skrtic M, et al. AML cells have low spare reserve capacity in their respiratory chain that renders them susceptible to oxidative metabolic stress. *Blood*. 2015;125(13):2120-30.
80. Jones CL, Inguva A, Jordan CT. Targeting Energy Metabolism in Cancer Stem Cells: Progress and Challenges in Leukemia and Solid Tumors. *Cell Stem Cell*. 2021;28(3):378-93.
81. Cole A, Wang Z, Coyaud E, Voisin V, Gronda M, Jitkova Y, et al. Inhibition of the Mitochondrial Protease ClpP as a Therapeutic Strategy for Human Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell*. 2015;27(6):864-76.



82. Lieu EL, Nguyen T, Rhyne S, Kim J. Amino acids in cancer. *Exp Mol Med*. 2020;52(1):15-30.
83. Gallipoli P, Giotopoulos G, Tzelepis K, Costa ASH, Vohra S, Medina-Perez P, et al. Glutaminolysis is a metabolic dependency in FLT3(ITD) acute myeloid leukemia unmasked by FLT3 tyrosine kinase inhibition. *Blood*. 2018;131(15):1639-53.
84. Miraki-Moud F, Ghazaly E, Ariza-McNaughton L, Hodby KA, Clear A, Anjos-Afonso F, et al. Arginine deprivation using pegylated arginine deiminase has activity against primary acute myeloid leukemia cells in vivo. *Blood*. 2015;125(26):4060-8.
85. Mussai F, Wheat R, Sarrou E, Booth S, Stavrou V, Fultang L, et al. Targeting the arginine metabolic brake enhances immunotherapy for leukaemia. *Int J Cancer*. 2019;145(8):2201-8.
86. Snaebjornsson MT, Janaki-Raman S, Schulze A. Greasing the Wheels of the Cancer Machine: The Role of Lipid Metabolism in Cancer. *Cell Metab*. 2020;31(1):62-76.
87. Pabst T, Kortz L, Fiedler GM, Ceglarek U, Idle JR, Beyoğlu D. The plasma lipidome in acute myeloid leukemia at diagnosis in relation to clinical disease features. *BBA Clin*. 2017;7:105-14.
88. Samudio I, Konopleva M. Targeting leukemia's "fatty tooth". *Blood*. 2015;126(16):1874-5.
89. Humbert M, Seiler K, Mosimann S, Rentsch V, Sharma K, Pandey AV, et al. Reducing FASN expression sensitizes acute myeloid leukemia cells to differentiation therapy. *Cell Death Differ*. 2021;28(8):2465-81.
90. Loeffler D, Schroeder T. Symmetric and asymmetric activation of hematopoietic stem cells. *Curr Opin Hematol*. 2021;28(4):262-8.
91. Ito K, Carracedo A, Weiss D, Arai F, Ala U, Avigan DE, et al. A PML–PPAR- $\delta$  pathway for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Med*. 2012;18(9):1350-8.
92. Vailati Riboni M, Palombo V, Loor J. What Are Omics Sciences? 2017. p. 1-7.
93. Cho W. An Omics Perspective on Cancer Research 2010. 1-269 p.
94. Schmidt DR, Patel R, Kirsch DG, Lewis CA, Vander Heiden MG, Locasale JW. Metabolomics in cancer research and emerging applications in clinical oncology. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(4):333-58.
95. González-Reymúndez A, de Los Campos G, Gutiérrez L, Lunt SY, Vazquez AI. Prediction of years of life after diagnosis of breast cancer using

omics and omic-by-treatment interactions. *Eur J Hum Genet.* 2017;25(5):538-44.

96. Ahsan MM, Luna SA, Siddique Z. Machine-Learning-Based Disease Diagnosis: A Comprehensive Review. *Healthcare (Basel).* 2022;10(3).

97. Horgan R, Kenny L. 'Omic' technologies: Genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. *The Obstetrician & Gynaecologist.* 2011;13.

98. Dong Z, Chen Y. Transcriptomics: advances and approaches. *Sci China Life Sci.* 2013;56(10):960-7.

99. Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, Zelena E, Francis-McIntyre S, Anderson N, et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat Protoc.* 2011;6(7):1060-83.

100. Yang K, Han X. Lipidomics: Techniques, Applications, and Outcomes Related to Biomedical Sciences. *Trends Biochem Sci.* 2016;41(11):954-69.

101. Kang J, David L, Li Y, Cang J, Chen S. Three-in-One Simultaneous Extraction of Proteins, Metabolites and Lipids for Multi-Omics. *Front Genet.* 2021;12:635971.

102. Nakayasu ES, Nicora CD, Sims AC, Burnum-Johnson KE, Kim YM, Kyle JE, et al. MPLEx: a Robust and Universal Protocol for Single-Sample Integrative Proteomic, Metabolomic, and Lipidomic Analyses. *mSystems.* 2016;1(3).

103. Han X, Gross RW. Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics. *J Lipid Res.* 2003;44(6):1071-9.

104. Created with BioRender.com.

105. Stefanko A, Thiede C, Ehninger G, Simons K, Grzybek M. Lipidomic approach for stratification of acute myeloid leukemia patients. *PLoS One.* 2017;12(2):e0168781.

106. Opielka M, Sobocki B, Mierzejewska P, Smolenski RT. The effect of trehalose on intracellular and extracellular nucleotide metabolism. A pilot study. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2020;39(10-12):1400-9.

## 8. EKLER

## 8.1. EK-1 Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri

Tarih: 13/03/2023 13:39  
 Sayı: E-16969557-050.01.04-  
 00002709569  
  
 00002709569



**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**

**KURUL KARARI**

<b>OTURUM TARİHİ</b>	<b>OTURUM SAYISI</b>	<b>KARAR SAYISI</b>
21.02.2023	2023/03	2023/03-17
<b>Araştırma Numarası : GO 22/981</b>		<b>Değerlendirme Tarihi : 18.10.2022</b>

Üniversitemiz Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi öğretim üyelerinden Doç. Dr. Fatma Visal OKUR'un sorumlu araştırmacı olduğu, Prof. Dr. Fahriye Duygu ÇETİNKAYA, Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU, Bio. Kemal KAYAŞLI ile birlikte çalışacakları ve Asude Bahar ŞAHİN'in yüksek lisans tezi olan, GO 22/981 kayıt numaralı "*Myeloid Kanserlerde Kemik İliği Mikroçevresinin Metabolik Profülünün İncelenmesi*" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, 22 Şubat 2023 – 22 Şubat 2025 tarihleri arasında geçerli olmak üzere etik açıdan **uygun bulunmuştur**.

Çalışma tamamlandığında sonuçlarını içeren bir rapor örneğinin Etik Kurulumuza gönderilmesi gerekmektedir.

Prof. Dr. Nüket  
PAKSOY ERBAYDAR  
Kurul Başkanı

Prof. Dr. Güzide Burça  
AYDIN  
Kurul Üyesi

Prof. Dr. Mehmet Özgür  
UYANIK  
Kurul Üyesi

Prof. Dr. Ayşe KİN  
İŞLER  
Kurul Üyesi

Prof. Dr. Sibel  
PEHLİVAN  
Kurul Üyesi

Prof. Dr. Burcu Balam  
DOĞU  
Kurul Üyesi

Prof. Dr. Tolga  
YILDIRIM  
Kurul Üyesi

Prof. Dr. Hande GÜNEY  
DENİZ  
Kurul Üyesi

Doç. Dr. Betül ÇELEBİ  
SALTIK  
Kurul Üyesi

Doç. Dr. Merve BATUK  
Kurul Üyesi

Doç. Dr. Gülten IŞIK  
KOÇ  
Kurul Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Müge  
DEMİR  
Kurul Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Burcu  
Ersöz ALAN  
Kurul Üyesi

**İZİNLİ**  
Av. Buket ÇINAR  
Kurul Üyesi

## 8.2. EK-2 Orijinallik Raporu

### MYELOİD KANSERLERDE KEMİK İLİĞİ MİKROÇEVRESİNİN METABOLİK PROFİLİNİN İNCELENMESİ

#### ORJİNALLİK RAPORU

% <b>4</b>	% <b>3</b>	% <b>1</b>	% <b>1</b>
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

#### BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<a href="https://openaccess.hacettepe.edu.tr:8080">openaccess.hacettepe.edu.tr:8080</a> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>2</b>	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	% <b>1</b>
<b>3</b>	<a href="http://www.biorxiv.org">www.biorxiv.org</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>4</b>	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>5</b>	<a href="http://acikbilim.yok.gov.tr">acikbilim.yok.gov.tr</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>6</b>	<a href="http://pdffox.com">pdffox.com</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>7</b>	Submitted to Ankara University Öğrenci Ödevi	<% <b>1</b>
<b>8</b>	Submitted to Eskisehir Osmangazi University Öğrenci Ödevi	<% <b>1</b>
<b>9</b>	<a href="http://acikerisim.uludag.edu.tr">acikerisim.uludag.edu.tr</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>

### 8.3. EK-3 Dijital Makbuz

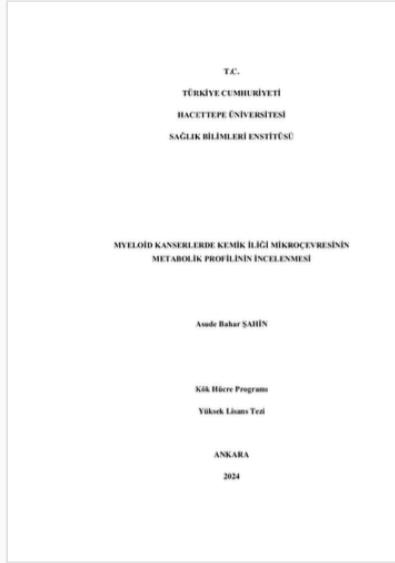


## Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Asude Bahar Şahin  
Ödev başlığı: Asude Bahar Şahin - Yüksek Lisans Tezi  
Gönderi Başlığı: Turnitim.docx  
Dosya adı: Turnitim.docx  
Dosya boyutu: 7.78M  
Sayfa sayısı: 99  
Kelime sayısı: 14,538  
Karakter sayısı: 106,080  
Gönderim Tarihi: 27-Haz-2024 10:33ÖÖ (UTC+0300)  
Gönderim Numarası: 2409327578



## 9. ÖZGEÇMİŞ