



**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**AKUT MYLEOİD LÖSEMİ HASTALARINDA
PROGNOSTİK BELİRTEÇLERİN
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Melike ORDU

KAYSERİ – 2013



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

AKUT MYELOİD LÖSEMİ HASTALARINDA
PROGNOSTİK BELİRTEÇLERİN
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE
DEĞERLENDİRİLMESİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Melike ORDU

Danışman
Prof. Dr. Özlem CANÖZ

Bu Uzmanlık Tezi Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi
Tarafından TTU-2013-4386 No'lu Proje ile desteklenmiştir.

KAYSERİ – 2013

TEŞEKKÜR

Asistanlığım süresince bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, her zaman destek olduğunu hissettiren, zor olan asistanlık sürecimi kolaylaştıran saygıdeğer hocalarıma, başta Patoloji Ana Bilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Turhan OKTEN, tez danışmanım Prof. Dr. Özlem Canöz, değerli hocalarım Prof. Dr. Tahir Ercan PATIROĞLU, Prof. Dr. Süleyman Balkanlı, Prof. Dr Figen ÖZTÜRK, Prof. Dr. Olgun KONTAŞ, Prof.Dr. Işın SOYUER, Doç. Dr. Hülya AKGÜN ve Doç. Dr.Kemal DENİZ' e,

Asistanlık sürecini paylaştığım, dostluk ve arkadaşlıkları hep yanımda ve desteğim olan Sinan NAZLIM, Sıraç ERTEN, Serdal S. ÖZCAN, Leymune YILMAZ, Gülşah ÇUBUKÇU, Seçil KARABULUT'a, benden önce uzman olan değerli arkadaşlarım Ganime ÇOBAN, Ebru AKAY, Fatoş TEKELİOĞLU'na ve yıllardır birlikte çalıştığımız patoloji çalışanlarına,

Her zaman yanımda ve desteğim olan sevgili eşime, en değerli varlıklarım çocuklarıma, Ömür boyu benden desteğini esirgemeyen, beni yetiştiren ve her zaman yanımda olan annem, babam ve sevgili kardeşlerime teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
KISALTMALAR	V
TABLO LİSTESİ	VII
ŞEKİL LİSTESİ	VIII
RESİM LİSTESİ	IX
GRAFİK LİSTESİ	XII
ÖZET	XII
ABSTRACT	XVI
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. HEMAPOETİK HÜCRELERİN GELİŞİMİ	5
2.2. MİYELOİD NEOPLAZİ	7
2.2.1. Neoplazilerin Değerlendirilmesi	8
2.3. MİYELODİSPLASTİK SENDROM	12
2.3.1. Tanım-Tarihçe	12
2.3.2. Epidemiyoloji	12
2.3.3. Klinik Özellikler	13
2.3.4. Etyoloji	13
2.3.5. Morfoloji	13
2.3.6. MDS DSÖ 2008 Tanı Kriterleri	14
2.3.7. Prognoz ve Prediktif Faktörler	17
2.3.8. Tedavi	18
2.4. LÖSEMİ	18
2.4.1. Tanım	18

2.4.2. Tarihçe	19
2.5. AKUT MİYELOİD LÖSEMİ	22
2.5.1. Tanım	22
2.5.2. AML FAB Sınıflaması.....	22
2.5.3. AML DSÖ Sınıflaması	26
2.5.4. DSÖ 2008 Sınıflaması	26
2.5.5. Epidemiyoloji Etyoloji.....	29
2.5.6. Klinik	29
2.5.7. Laboratuar Bulguları.....	29
2.5.8. AML’de Kromozomal Translokasyonlar.....	30
2.5.9. AML’de Görülen Nokta Mutasyonları	33
2.6. NÜKLEOFOSMİN (NPM-1) GENİ VE PROTEİNİ.....	36
2.6.1. Nükleofosmin Gen ve Proteininin Yapısı	37
2.6.2. AML ve NPM-1 Mutasyonu.....	38
2.6.3. NPM-1 Mutasyonlarının Klinik Önemi	41
2.7. APOPTOZİS	41
2.7.1. Tanım	41
2.7.2. Patolojik Koşullarda Apoptozis	41
2.7.3. Apoptozisin Moleküler Mekanizmaları	42
2.8. SURVİVİN	43
2.8.1. Survivin ve Hücre Bölünmesi	44
2.8.2. Apoptozis İnhibe Edici Protein Ailesi (İAP) ve Kanser	45
2.9. CD123 ve AML	45
2.10. CD 25 ve AML	46
2.11. PROGNOZ	47
2.12. TEDAVİ	51

3. MATERYAL VE METOD	56
3.1. İMMÜNOHİSTOKİMYA.....	57
3.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRME	58
3.3. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM	67
4. BULGULAR	68
5. TARTIŞMA	82
6. SONUÇLAR	94
KAYNAKLAR	96
TEZ ONAY SAYFASI	104

KISALTMALAR

ALL	: Akut lenfoid lösemi
AML	: Akut miyeloid lösemi
ATRA	: All retinoik asit
CBF	: Core binding faktör
CBL	: Core binding lösemi
CEBPA	: CCAAT / enhancer binding proteina
CMML	: Kronik miyelomonositik lösemi
CN	: Normal karyotip
DİC	: Dissemine intravasküler koagülasyon
FAB	: French – American – British çalışma grubu
FLT3	: Fms benzeri tirozin kinaz 3
HOX	: Homeotik genler
IPSS	: Uluslararası Prognoz Skorlama Sistemi
IL3	: İnterlökin 3
İAP	: Apoptoz inhibe edici protein ailesi
İHK	: İmmunohistokimyasal
KHT	: Kök hücre transplantasyonu
KLL	: Kronik lenfoid lösemi
KML	: Kronik miyeloid lösemi
LDH	: Laktat dehidrogenaz
MDS	: Miyelodisplastik sendrom
MDS-U	: Sınıflandırılmayan miyelodisplastik sendrom
MLL	: Miks lineage lösemi
MPO	: Miyeloid peroksidaz
MRH	: Minimal rezidüel hastalık

NPM – 1	: Nükleofosmin -1
NPMc+	: Nükleofosmin nükleer ve sitoplazmik, boyanması
NPMc-	: Nükleofosmin nükleer, boyanması
NSE	: Nonspesifik esteraz
RT-PCR	: Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
Ph	: Phelidelphia kromozomu
PLZF	: Promiyelositik lösemi zinc finger
PML	: Promiyelositik lösemi
RA	: Refrakter anemi
RAEB	: Blast artışlı refrakter anemi
RARS	: Ring sideroblastlı refrakter anemi
RAR�	: Retinoik asit reseptör �
RCMD	: Refrakter sitopeni / Birden fazla seride displazi
RCUD	: Refrakter sitopeni / Tek seride displazi
R�	: Remisyon indüksiyon tedavisi
RN	: Refrakter nötropeni
RT	: Refrakter trombositopeni
SB	: Sudanblack - B
TNF	: Tümör nekroz faktör
WT - 1	: Wilms' tümör 1

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.	Miyeloid neoplaziler, Major alt grupları ve tanısal karakteristik özellikleri.....	7
Tablo 2.	Aspirasyon materyalinde hücresellik oranları yaş aralığına ve hücrelerin morfolojisine göre dağılımı.....	8
Tablo 3.	FAB MDS sınıflaması.....	15
Tablo 4.	DSÖ 2008 MDS sınıflaması.....	16
Tablo 5.	MDS, IPSS değişkenleri ve risk grupları	17
Tablo 6.	AML FAB sınıflamasında kullanılan sitolojik reaksiyonlar	22
Tablo 7.	FAB AML sınıflaması.....	23
Tablo 8.	DSÖ 2008 Sınıflaması Yenilikler	27
Tablo 9.	DSÖ 2008 AML ve ilişkili miyeloid neoplazilerin sınıflaması	29
Tablo 10.	AML’de sitogenetik ve genetik lezyonlara bağlı prognostik alt gruplar	49
Tablo 11.	Farklı çalışma gruplarına göre karyotip anomalilerinin prognostik risk sınıflaması	50
Tablo 12.	AML tedavi protokollerinin genel özeti.....	55
Tablo 13.	Kullanılan primer antikorlar ve dilüsyon oranları.....	58
Tablo 14.	NPM IHK’sal nükleer (NPMc-) ve kombine nükleer- sitoplazmik (NPMc+) olan grupların prognostik parametrelerle karşılaştırması.....	69
Tablo 15.	NPM-1 genetik olarak mutasyon varlığı durumu ve IHK’sal NPM boyanma durumu korelasyonu.....	73
Tablo 16.	MDS-AML ve MDS-RAEB2 vakalarında IHK’sal boyanmaların değerlendirilmesi.....	74
Tablo 17.	Tek değişkenli modelde yaş, cinsiyet, blast oranı, CD34 durumu, NPM1 genetik sonuçları, karyotip değerlendirilmesi, CD123, CD25, survivin, Nükleofosmin IHK’SAL boyama sonuçları, WBC sayısı, SGRISK grupları ve nüks oranlarının sağkalım ilişkisi.....	76
Tablo 18.	İmmünohistokimyasal boyanmaların ön görülen sağkalım oranları	77
Tablo 19.	Vakaların hastalıksız sağkalım oranları	79

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	Hematopoez basamaklarındaki hücrelerin görünümü.....	6
Şekil 2.	Normal miyeloid farklılaşmasında değişik evrelerde antijen ekspresyonları görülmetedir	11
Şekil 3.	FLT3 reseptör yapısı	34
Şekil 4.	NPM-1 normal lokalizasyonun gösterilmesi ve yapısı	38
Şekil 5.	AML gen mutasyonlarının yüzdeleri	39
Şekil 6.	AML NPMc+'lığının oluşum mekanizması.....	40
Şekil 7.	Apoptotik mekanizmalar ile apoptozis inhibe edici proteinler arasındaki ilişkiler aşağıda şematize edilmiştir	43

RESİM LİSTESİ

Resim 1.	Monoblastlar görülmektedir (x1000,Giems).....	9
Resim 2.	Promonosit görülmektedir (x1000, Giemsa).....	10
Resim 3.	AML t(8;21)	31
Resim 4.	AML inv (16)	31
Resim 5.	AML t(15;17)	32
Resim 6.	AML M2 vakasında kemik iliği mesafesini infiltre eden monoton, ekzantrik nükleuslu, eozinofilik sitoplazmalı blast morfolojisinde hücreler görülmektedir (x400, HE)	59
Resim 7.	AML-M4 vakasında kemik iliği mesafesini infiltre eden monoton, ekzantrik nükleuslu, eozinofilik sitoplazmalı blast morfolojisinde hücreler görülmektedir (x400, HE)	60
Resim 8.	AML-M2 vakasında NPMc+ekspresyonu görülmektedir (x400, immünperoksidaz).....	60
Resim 9.	AML-M4 vakasında aberran sitoplazmik ekspresyon (siyah ok) ve nükleer ekspresyon (yeşil ok) görülmektedir (x400, immünperoksidaz).....	61
Resim 10.	AML-M5 vakasında boyanma göstermeyen normal hemapoetik hücreler ve NPMc+ ekspresyonu görülmektedir (x400, immünperoksidaz)	61
Resim 11.	MDS-RAEB2 vakasında survivin antikoru ile zayıf yoğunlukta boyanma (x400, immünperoksidaz).....	62
Resim 12.	MDS-AML vakasında survivin antikoru ile orta yoğunlukta boyanma (x200, x400, immünperoksidaz).....	62
Resim 13.	AML vakasında survivin antikoru ile kuvvetli yoğunlukta boyanma (x200, x400, immünperoksidaz).....	63
Resim 14.	AML vakasında survivin antikoru ile zayıf yoğunlukta boyanma (x200, immünperoksidaz).....	63
Resim 15.	MDS-AML vakasında CD25 antikoru ile pozitif boyanma (x200, immünperoksidaz).....	64

Resim 16. AML vakasında CD25 antikoruna ile pozitif boyanma (x200, x400, immünperoksidaz).....	64
Resim 17. AML vakasında CD25 antikoruna ile pozitif boyanma (x200, x400, immünperoksidaz).....	65
Resim 18. MDS RAEB2 vakasında CD123 antikoruna ile pozitif boyanma (x200, x400, immünperoksidaz).....	65
Resim 19. MDS- AML vakasında CD123 antikoruna ile pozitif boyanma (x200, x400, immünperoksidaz).....	66
Resim 20. AML vakasında CD123 antikoruna ile pozitif boyanma (x200, x400, immünperoksidaz).....	66

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1.	NPM, IHK'sal NPMc+ ve NPMc- boyanmasının genetik olarak mutasyon varlığı durumu, CD34 ve karyotiple karşılaştırılması 71
Grafik 2.	Tüm hasta gruplarında, NPM IHK'sal boyanma sonuçlarının diğer IHK'sal boyanmalarla karşılaştırılması..... 71
Grafik 3.	IHK'sal NPMc+boyanma elde edilen grup çoğunlukla orta sitogenetik gruptadır..... 72
Grafik 4.	IHK'sal NPMc+ boyanma elde edilen grupta nüks oranı daha yüksektir 73
Grafik 5.	NPM-1 genetik olarak mutasyon varlığı durumu ve IHK'sal NPM boyanma durumu korelasyonu..... 74
Grafik 6, 7, 8, 9.	İmmünohistokimyasal boyanma sonuçlarının öngörülen sağkalım oranları 79
Grafik 10, 11, 12, 13.	Vakaların hastalıksız sağkalım oranları 81

AKUT MYELOİD LÖSEMİ HASTALARINDA PROGNOSTİK BELİRTEÇLERİN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖZET

Amaç: Akut Miyeloid Lösemi (AML) fenotipik olduğu kadar genotipik heterojenite gösteren kompleks bir hastalıktır. Tekrarlayan kromozom anomalilerinin AML’de tanımlanması ve bu değişimlerin prognoz üzerinde etkilerinin belirlenmesi ile hastalığın moleküler genetiği önem kazanmıştır. AML hastalarının %45’i en önemli prognostik belirteçlerden olan klonal kromozomal anomalilerden yoksundur ve normal karyotiptedir. Sekonder AML vakaları MDS RAEB-2 gibi hematolojik hastalıklara bağlı gelişebilir. AML sınıflamasında geçmişinde MDS olan AML’ler MDS-AML olarak sınıflandırılır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2008 sınıflamasında, AML’lere yeni antiteler eklenmiştir. Sınıflamaya iki geçici antite olarak Nükleofosmin-1 (NPM-1) ve CCAAT/enhancer binding protein α (CEBPA) mutasyonu gösteren AML’ler eklenmiştir. NPM-1 mutasyon varlığı immünohistokimyasal (IHK) olarak gösterilebilmektedir. Bu çalışmanın amacı normal karyotipli primer ve sekonder genetik olarak NPM-1 mutasyon varlığı bilinen AML vakalarında IHK’sal yöntemle elde edilen sonuçların uyumunu araştırmaktır. Aynı vakalarda MDS RAEB2 ve MDS geçmişine sahip olma durumunu, AML’ye progresyon sırasındaki moleküler değişiklikleri AML tanılı vakalarla karşılaştırarak değerlendirmektir. Ayrıca MDS RAEB, MDS AML, AML tanılı vakalarda CD25, CD123, Survivin ekspresyonunun prognoza etkisi araştırılmıştır.

Materyal ve Metod: 2007-2013 yılları arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi (EÜTF) Patoloji Anabilim Dalı’nda tanı alan 470 AML vakası retrospektif, sitogenetik ve morfolojik olarak değerlendirildi. Bunların arasından 70 vaka çalışmaya alındı. Vakaların aspirasyon yayma preparatları ve biyopsileri iki patolog tarafından tekrar değerlendirildi ve French/American/British (FAB) sınıflamasına göre alt tipleri belirlendi. Normal karyotipli vakalarda IHK’sal olarak NPM-1, CD25, CD123 ve Survivin antikorları değerlendirildi. Genetik incelemede NPM-1 mutasyonu olan vakalarla NPM-1 IHK’sal sonuçları korele edildi. Kullanılan antikor sonuçlarının lösemik hücrelerde boyanma özellikleri ve birbirleri ile olan ilişkilerinin değerlendirilmesi ki-kare, mann-whitney u, t testleri, sağ kalım analizlerinde kaplan-

meier (log-rank) ve cox regresyon analizi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık $p<0.05$ olarak kabul edildi.

Bulgular: Çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak AML-M3 vakalarında NPM-1 mutasyonuna ve IHK'sal olarak NPMc+ pozitifliğine rastlanmamıştır. AML-M2 ve M4 vakalarında genetik olarak NPM-1 mutasyon varlığı ve IHK'sal olarak NPMc+ pozitifliği diğer gruplara göre daha yüksek oranda tespit edilmiştir. Bu vakaların hepsi normal karyotipli ve genetik olarak FLT3/ITD mutasyonu negatifti. MDS-AML çalışma grubunda genetik mutasyonu çalışılmamış olmasına rağmen IHK'sal olarak NPMc+ boyanması elde edilmiştir. NPM-1 genetik olarak mutasyon olan vakalarda pozitiflik sonucu ile Nükleofosmin NPMc+ boyanması elde edilen grup sonucu arasında anlamlı ($p<0,05$ /Kappa:0,596) uyumluluk mevcuttu. IHK'sal olarak NPMc+ ve NPMc- olan gruplar arasında IHK'sal olarak CD123 ve CD25 pozitif boyanma oranında anlamlı ($p>0,05$) farklılık görülmedi. Survivin boyanma oranları ile NPMc+ ve NPMc- gruplar arasında farklılık saptanmadı. IHK'sal olarak NPMc+ ve NPMc- olan gruplar arasında blast oranı, WBC sayısı, biyokimyasal olarak LDH seviyelerinde farklılık görülmedi.

Tartışma: NPM-1 mutasyonu AML'lerin DSÖ 2008 sınıflamasında geçici antiteler içerisinde olup yakın bir dönemde sınıflandırmada ayrı bir yere sahip olması muhtemeldir. NPM-1 mutasyonlu ve mutasyonsuz vakaların klinik özellikleri, tedaviye yanıtı ve prognozu farklıdır. Diğer özgün mutasyonlarda olduğu gibi minimal reziduel hastalıkların (MRH) saptanmasında da önemlidir. NPM-1 mutasyonu normal karyotipli AML vakalarında iyi prognostik belirteçdir. Prognozu belirlemede NPM-1 mutasyon varlığı yanında, yaş, WBC sayısı, LDH seviyesi de önemlidir. Gelecekte hastalarda kişisel tedavi protokollerinin seçilmesinde ve kime daha agresif tedavilerin uygulanacağını değerlendirilmesinde mutasyon durumu önemli olacaktır. Şu anda mutasyonun varlığına yönelik hedef tedaviler oluşturulmaya çalışılmaktadır. NPM-1 mutasyon varlığı immünohistokimyasal (IHK) olarak gösterilebilmektedir. IHK'sal uygulama daha ucuz, kolaydır. Genetik verilerle karşılaştırıldığında mutasyonu belirlemede sensitivitesi, spesifitesi yüksektir

Miyeloid neoplazilerde CD25, CD123 ve Survivin lösemik kök hücreleri işaretler. Bu durum vakalarda MRH, nüks durumunun erken teşhisine yardımcıdır. Ayrıca bu antikorlara yönelik hedef tedaviler oluşturulmaya çalışılmaktadır.

Anahtar kelimeler: NPM-1, CD123, CD25, Survivin, Immünohistokimya, Akut Miyeloid Lösemi

EVALUATION OF PROGNOSTIC MARKERS BY IMMUNOHISTOCHEMICAL METHODS IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA

ABSTRACT

Objective: Acute myeloid leukemia (AML) is a complex disease which not only exhibits phenotypic but also genotypic heterogeneity. Molecular genetics of the disease gained importance by identification of repeated chromosome abnormalities in AML and detection of effects of these alterations on prognosis. Of the patients with AML, 45% lack clonal chromosome abnormality, which is one of the most important prognostic markers; thus, they have normal karyotype. Secondary AML cases may develop due to hematological diseases such as MDS RAEB-2. In the classification of AML, AML patients with previous history of MDS are classified as MDS-AML. In the 2008 classification of World Health Organization (WHO), new entities are added to AMLs. The AML cases carrying Nucleophosmin-1 (NPM1) and CCAAT-enhancer binding protein α (CEBPA) mutations are temporarily included to the WHO classification. Presence of NPM1 mutation can be demonstrated by immunohistochemical (IHC) manner. The aim of present study was to evaluate to fitness of results obtained by IHC methods in primary AML cases with normal karyotype and secondary AML cases known to have genetic NPM1 mutation. In these cases, it was also aimed to evaluate prognostic effects of IHC results regarding CD25, CD123 and Survivin antibodies and obtained results.

Material and Method: We retrospectively reviewed 470 AML cases in cytogenetic and morphological manner, which were diagnosed at Pathology Department of Erciyes University, Medicine School between 2007 and 2013. Of these, 70 cases were included to the study. Aspiration smears and biopsy materials of the cases were re-evaluated by two blinded-pathologist and subtypes were identified according to French/American/British classification. In cases with normal karyotype, NPM1, CD25, CD123 and survivin antibodies were assessed by IHC. In genetic evaluation, immunohistochemical results of NPM1 were correlated in cases with NPM1 mutation. Chi-square, Mann Whitney u, t tests were used to assess relationships between results of antibodies used and staining characteristics of leukemic cells and between each other,

while Kaplan-Meier analysis and Cox regression analysis were used for survival analysis. $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

Findings: In agreement with literature, it was failed to detect NPM1 mutation and immunohistochemical NPMc+ positivity in AML-M3 cases. In AML-M2 and M4 cases, presence of NPM1 mutation and NPMc+ positivity were found to be higher when compared to other groups. All these cases had normal karyotype and were negative for FLT3/ITD mutation. In MDS-AML group, NPMc+ staining was found by IHC, although genetic evaluation wasn't performed. There was a significant fit between positivity in cases with NPM1 mutation and those with positive Nucleophosmin NPMc+ staining ($p < 0.05$; Kappa: 0.596). No significant difference was detected in the rate of positive CD123 and CD25 staining between NPMc+ and NPMc- groups ($p > 0.05$). Also, there was no significant difference in the rate of Survivin staining between NPMc+ and NPMc- groups. No significant differences were detected in blast rate, WBC count and LDH levels between NPMc+ and NPMc- groups.

Conclusion: NPM1 mutation is among provisional entities in 2008 WHO classification for AMLs and it is likely that it would have a distinct place in a recent classification. Clinical characteristics, treatment response and prognosis are different between cases with or without NPM1 mutation. As in other specific mutations, it is important for detection of minimal residual diseases (MRDs). NPM1 mutation is predictive of good prognosis in AML cases with normal karyotype. In addition to presence of NPM1 mutation, age WBC count and LDH levels are also important to predict prognosis. In the future, mutation status will be important in the selection of individualized treatment protocols and identification of patients who should receive more aggressive treatments. Today, there are attempts to develop treatments targeting presence of mutation. CD25, CD123 and Survivin labels leukemic cells and targeted therapies aiming these antibodies are being investigated.

Keywords: NPM-1, CD123, CD25, Survivin, Immunohistochemistry, acute myeloid leukemia

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Miyeloid neoplazi Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflamasında neoplastik miyeloid serideki hücrelerin morfolojik, sitokimyasal, immünofenotipik özelliklerine, maturasyon derecesine ve selüler proliferasyonların sitolojik olarak normal, displastik, efektif ya da inefektif olmasına göre değerlendirilmektedir [1]. Miyeloid neoplazileri kategorize etmekte blast yüzdesi ve morfolojisi çok önemlidir. Blastik hücrelerin değerlendirilmesi periferik kan örneklerinde, kemik iliği aspirasyon, imprint, pıhtı ve biyopsi materyallerinde yapılmaktadır. Ayrıca sitogenetik ve moleküler genetik çalışmalar vakalarda tanı koymak ve progresyonun takibinde kişiye özel tedavi seçenekleri için gereklidir.

Miyelodisplastik sendromlar (MDS), kemik iliğinde anormal selüler proliferasyon, periferik kanda ise kemik iliğinde görülen selüler proliferasyonun inefektif olması (inefektif hematopoez) nedeniyle bir ya da daha fazla seride sitopeni ile karakterli olan primer ya da sekonder multipotent bir kök hücre hastalığıdır [2]. MDS ileri yaş hastalığıdır. Primer MDS hastalarının ortalama yaşı 70'dir. MDS vakalarının 50 yaş altında görülmesi nadirdir.

MDS vakalarında prognozu ve akut lösemi transformasyonunu belirlemek için çeşitli risk sınıflamaları yapılmıştır. Bu sınıflamalarda dikkate alınan parametreler, kemik iliği blast oranı, sitopenilerin derecesi, yaş, sitogenetik anomalilerin tipleridir. En sık Uluslararası Prognoz Skorlama Sistemi (IPSS) kullanılmaktadır. Bu sistem, MDS olgularını düşük, orta, yüksek riskli gruplara ayırmaktadır. MDS vakalarında prognozu belirleyen en önemli faktör blast oranıdır. Ayrıca vakalarda düşük ve yüksek riskli

grupların ve lösemik dönüşüm riskinin belirlenmesinde blast oranı önemli role sahiptir [3]. MDS RAEB2 vakaları yüksek sitogenetik risk grubunda olup AML'ye dönüşüm riski yüksektir.

Akut miyeloid lösemi, hemapoetik öncül hücrelerin heterojen klonal bir hastalığıdır ve sıklığı yaş ile artar. Klonal çoğalan öncül hücrelerin matür hücrelere farklılaşma yeteneği yoktur ve normal hematopoezi de baskırlar. Kemik iliğinde blast sayısının %20'den fazla olması tanıyı koydurur [4, 5]. AML, esas olarak primer ve sekonder olarak iki gruba ayrılmaktadır. Sekonder AML vakalarının geçmişinde hematolojik hastalık bulunmaktadır. Bu hastalarda primer AML vakalarına göre hastalıksız sağkalım oranı, nüks oranı daha fazladır. Sitogenetik testlerin sağladığı prognostik veriler kritik role sahiptir [6]. AML FAB sınıflaması hücre morfolojisi ve diferansiasyon oranına, biyokimyasal reaksiyonlara ve hücre yüzey antijenlerine bağlı olarak yapılmakta iken DSÖ sınıflamasında tanı algoritmasına genetik anomaliler, immünfenotipik ve moleküler özellikler de dahil edilmiştir [4]. FAB ve DSÖ sınıflaması arasındaki en önemli fark blast yüzde eşik değerinin %30'dan %20'ye düşürülmesidir [1, 4, 7]. DSÖ 2008 sınıflamasında, DSÖ 2001 sınıflamasına yeni antiteler eklenmiştir.

DSÖ 2008 sınıflamasında, AML'lere yeni antiteler eklenmiştir. Çalışmalarda RUNX1, CBFβ ya da RARA gibi transkripsiyon faktörü kodlayan genlerdeki yeniden düzenlenmelerin miyeloid farklılaşmayı bozduğu gösterilmiştir. Genetik anomaliler neoplastik klonun proliferasyonu ve yaşam devamlılığında önemlidir. Bunların prognostik değeri ve hedef tedavilere aday olması nedeniyle sınıflama değişebilmektedir [1]. Sınıflamaya iki geçici antite olarak Nükleofosmin-1 (NPM-1) ve CCAAT/enhancer binding protein α (CEBPA) mutasyonu gösteren AML'ler eklenmiştir [1, 2].

Nükleofosmin, multifonksiyonel bir proteindir ve çoklu biyokimyasal fonksiyonlarının gerektirdiği şekilde özelleşmiş bölgelere sahiptir. NPM-1 nükleositoplazmik mekik dokuyan, esas olarak nükleusta lokalize multipl fonksiyonlara sahip proteindir [3]. NPM-1 geninin 12. ekzonunda meydana gelen AML spesifik mutasyonlar lösemik blastlarda NPM'nin anormal sitoplazmik yerleşimi ile sonuçlanır. NPM-1 hematopoetik tümörlerde genetik değişimlere en sık maruz kalan genlerden biridir. Çeşitli hematolojik

malignitelerde NPM-1 lokusunun kaybı veya NPM'de fonksiyon kaybına neden olan translokasyonların varlığı bildirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda NPM1 geninin 12. ekzonunda meydana gelen 55 farklı tip mutasyon tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar, 956 - 971. pozisyonlar arasında meydana gelir. En sık rastlanan NPM-1 mutasyonu 956-959. pozisyonunda bulunan TCTG tetranukleotidin duplikasyonudur. Vakaların yaklaşık %75-80'inde görülür ve mutasyon A olarak adlandırılır. Mutasyon B ve D olarak adlandırılan mutasyonlar %10 ve %5 oranında görülürken diğer mutasyon tiplerine çok nadir rastlanır [8]. NPM-1 mutasyonu normal karyotipli AML vakalarında iyi prognostik belirteçdir.

Tüm yetişkin AML vakalarının yaklaşık %27-35'inde NPM1 gen mutasyonlarına rastlanırken, söz konusu mutasyonları taşıyan AML vakalarının %45-64'ü normal karyotipe sahiptir [4]. NPM-1 mutasyonu olan AML vakalarının %5-15'inde kromozomal aberrasyonlar (+8, del(9q) gibi) görülür [4]. NPM-1 mutasyonu olan AML vakalarının %40'ında FLT3-ITD mutasyonu da vardır. NPM-1 mutasyonlu, normal karyotipli AML vakalarında FLT3-ITD mutasyonu yoksa iyi prognostik belirteçdir [4, 5, 8]. Pek çok araştırmacı 60 yaş altı, normal sitogenetiğe sahip AML vakalarında NPM-1 ve FLT3 mutasyonunun çalışılması gerektiğini savunmaktadır [7]. NPM-1 mutasyon varlığı, AML prognostik risk sınıflamasında orta gruptadır. Bu hastalar indüksiyon tedavisine iyi yanıtı, daha uzun hastalıksız sağkalım sürelerine sahip ve sitogenetik olarak normal karyotiplidir. Gelecekte hastalarda kişisel tedavi protokollerinin seçilmesinde ve kime daha agresif tedavilerin uygulanacağını değerlendirilmesinde mutasyon durumu önemli olacaktır. Spesifik anti-mutant NPM antikollarının tespitinin MRH takibi açısından önemli rol oynayacağı düşünülmektedir [11]. Şu anda mutasyonun varlığına yönelik hedef tedaviler oluşturulmaya çalışılmaktadır.

NPM-1 mutasyon varlığı parafin bloklara uygulanan İHK'sal yöntemlerle tespit edilebilmektedir [9]. NPM-1'in İHK'sal olarak belirlenmesi, uygulanabilirliği kolay ve ucuz bir yöntemdir.

CD123 ve CD25 proteinleri interlökinlerle ilişkilidir. Bu proteinler, lösemik blast popülasyonunda yüksek oranda boyanır. Genetik mutasyonlar ve bu proteinin ekspresyonları arasında korelasyon kurulmaya çalışılmaktadır. Lösemik kök hücreleri

işaretleyen bu belirteçler hedef tedavi için adaydır. Ayrıca vakalarda erken nüks tespitinde de önemli olduğu öngörülmektedir.

Survivin bifonksiyonel bir proteindir. Anti-apoptotik etkilerine ek olarak hem normal hücrelerde hem de malign hücrelerde mitozu regüle eder [9]. Normal dokularda survivin ekspresyonu bulunmaz. AML ve MDS vakalarında survivin IHK'sal boyanma yoğunluğu heterojendir. Blastlarda para-perinükleer alanda ya da sitoplazmada diffüz boyanma paternine sahiptir. Survivin ekspresyonunun yüksek olması lösemik kök hücrelerle ve vakalarda sık relaps oranı ile ilişkilidir.

Bu çalışmanın amacı, AML tanısı alan vakalarda genetik verilerle IHK'sal boyama sonuçlarının korele edilebilirliğini araştırmaktır. NPM-1 mutasyon tespitinde IHK'sal yöntem daha ucuz, biyopsi ile eşzamanlı değerlendirilebilecek, daha kolay ulaşılabilir bir yöntemdir. NPM-1 mutasyonu normal karyotipli AML vakalarında iyi prognostik belirteçdir. Gelecekte hastalarda kişisel tedavi protokollerinin seçilmesinde ve kime daha agresif tedavilerin uygulanacağını değerlendirilmesinde önemli olacaktır. Spesifik anti-mutant NPM antikollarının tespitinin MRH takibi açısından önemli rol oynayacağı düşünülmektedir [11]. şu anda mutasyonun varlığına yönelik hedef tedaviler oluşturulmaya çalışılmaktadır.

AML lösemik kök hücreleri, CD25 ve CD123 antikolları ile IHK'sal yöntemle işaretlenerek vakalarda minimal rezidüel hastalık, erken nüks tespitinin klinik bulgulardan önce belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu proteinler hedef tedaviler için umut vermektedir.

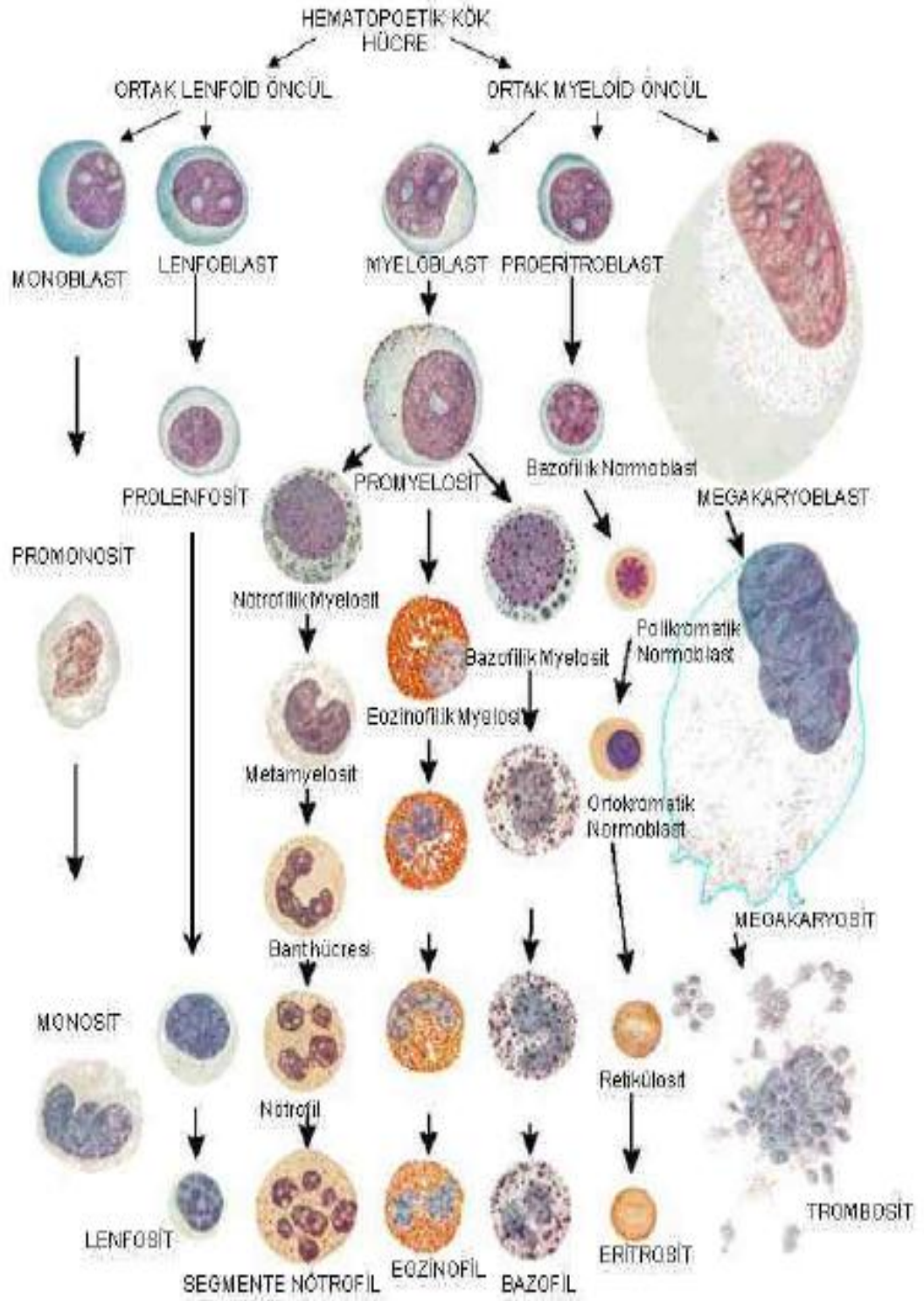
Çalışmamızda bu antikolların AML hasta yönetimindeki rolü, MDS RAEB2 ve MDS-AML vakalarındaki durumunun tespiti, bunların klinik verilerle korelasyonu amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. HEMAPOETİK HÜCRELERİN GELİŞİMİ

Hematopoez, kan hücrelerinin üretim, farklılaşma ve gelişim süreci olarak tanımlanabilir. Hemapoetik sistemin organları, kemik iliği, karaciğer, dalak, lenf nodları ve timusu içerir. Dolaşımdaki tüm kan hücreleri erişkinde kemik iliğinde bulunan hemapoetik kök hücreden gelişir [10]. Hemapoetik kök hücrenin kendini yenileme özelliği vardır ve bir çok farklı hücreye dönüşebilir (pluripotent). Bu kök hücreden gelişen öncül hücreler farklı serilerdeki kan hücrelerini oluşturmak üzere farklılaşır. Hücreler morfolojik olarak farklılaşıp olgunlaştıkça kendilerini yenileme özellikleri azalır. Öncelikle lenfoid-miyeloid serilerin ayrımı olur ve ortak lenfoid öncül ile ortak miyeloid öncül hücreden oluşur. Bundan sonra oluşan hücreler, kültüre konulduklarında oluşturacakları spesifik hücreye göre “koloni oluşturan ünite” (CFU-colony forming unit) adını alırlar. CFUE eritrosit, CFUGM granülosit ve monosit oluşturur [11]. Lökositlerin iki büyük grubu, lenfositik ve myelositik serilerden gelişir. Myelositik seri myeloblast ile başlar, bazofil, eozinofil ve nötrofili oluşturur. Miyeloid seriden ayrıca eritrosit ve trombositler gelişir. Bu hiyerarşi içinde kök hücreden gelişen öncül hücreler, ara hücreler ve dolaşıma katılan son formları şekilde gösterilmiştir (Şekil 2.1). Hücrelerin farklılaşma ve gelişim yönünü belirleyen mekanizma özel büyüme ve transkripsiyon faktörlerinin veya büyüme faktörü reseptörlerinin değişmiş ekspresyonu ya da bunların her ikisinin birlikte etkisi ile oluşur [10]. Kök hücre faktör (stem cell factor), granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GMCSF), interlökin-3 (IL-3) ve trombopoetin gibi proteinlerin bulunduğu büyüme faktörleri, kontrollü salınımları ile

kök hücrelerin kendini yenilemelerini, öncül hücrelerin farklılaşmasını ve dolaşımdaki hücrelere dönüşümlerini düzenler [10, 11].



Şekil 1. Hematopoez basamaklarındaki hücrelerin görünümü

2.2. MİYELOİD NEOPLAZİ

Miyeloid neoplazi DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) sınıflamasında neoplastik miyeloid serideki hücrelerin morfolojik, sitokimyasal, immünofenotipik özelliklerine, maturasyon derecesine ve selüler proliferasyonların sitolojik olarak normal, displastik, efektif ya da inefektif olmasına göre değerlendirilmektedir [1]. Miyeloid neoplazileri kategorize etmekte blast yüzdesi ve morfolojisi çok önemlidir. Blastik hücrelerin değerlendirilmesi periferik kan örneklerinde, kemik iliği aspirasyon, imprint, pıhtı ve biyopsi materyallerinde yapılmaktadır. Ayrıca sitogenetik ve moleküler genetik çalışmalar vakalarda tanı koymak ve progresyonun takibinde kişiye özel tedavi seçenekleri için gereklidir. DSÖ 2008 miyeloid neoplazi sınıflaması (Tablo 1) özetlenmiştir [12].

Tablo 1. Miyeloid neoplaziler: Major alt grupları ve tanıda karakteristik özellikleri.

Hastalık	Ki Hücresellik	% Ki blast	Matürasyon	Morfoloji	Hematopoezis	Kan Sayısı
Miyeloid proliferatif neoplazi	Genellikle artmış, esansiyel trombositopenide normaldir.	Normal ya da hafifçe artmıştır, kronik fazda <10%	Var	Granülosit, eritroid prekürsörler kısmen artmıştır, anormal megakaryosit	Efektif	Bir ya da birkaç seride hafifçe artmış
PDGFRA, PDGFRB ya da FGFR1 anomalisi	Artmış	Normal ya da hafifçe artmış, kronik fazda <20%	Var	Kısmen normal	Efektif	Eozinofili $\geq 1.5 \times 10^9/L$
MDS	Artmış, bazen normoselüler ya da hiposelüler	Normal ya da artmış; <20%	Var	Bir ya da birkaç seride displazi	İnefektif	Sitogeni
MDS/MPN	Artmış	Normal ya da hafifçe artmış, <20%	Var	Sıklıkla bir ya da birkaç seride displazi; JMML'de minimal displazi		WBC sıklıkla artmış
AML	Sıklıkla artmış	>20% artmış, spesifik sitogenetik anomali olan vakalar hariç.	Sıklıkla minimal	Bir ya da birkaç seride displazi ile ilişkili olabilir.	İnefektif ya da efektif.	WBC değişken, sıklıkla anemi ve trombositopeni

2.2.1. Neoplazilerin Değerlendirilmesi

Periferik kan örnekleri May Grünwald Giemsa ya da Wright Giemsa ile boyanarak beyaz, kırmızı kan hücreleri ve trombosit anomalileri açısından değerlendirilmelidir. Miyeloid neoplazi şüphesinde nötrofil granülaritesini değerlendirme önemlidir. Bu örneklerde blast morfolojisini değerlendirmek daha kolaydır. Miyeloid neoplazi şüphesinde lökositik diferansiasyon gösteren 200 hücre sayılmalı ve değerlendirilmelidir [1, 12, 13].

Kemik iliği aspirasyon sitolojisi May Grünwald Giemsa ya da Wright Giemsa ile boyanarak hücresellik, hücrelerin sitoplazmalarındaki granüllerin morfolojisi, nükleer kromatin dağılımı değerlendirilir. Blast oranının değerlendirmesi 500 nükleuslu kemik iliği hücresinde, lenfosit, plazma hücreleri, megakaryositler, kemik iliği stroma hücreleri, osteoblastlar, osteoklastlar dahil edilmeden yapılmalıdır [1, 7, 13]. Ayrıca aspirasyonda lenfoid hücreler, mast hücreleri ya da hemapoetik olmayan durumlarda değerlendirilebilir. Ancak bu değerlendirmelerin yapılabilmesi için öncelikle yeterli partikül içeren materyal, iyi boyanmış preparat gerekmektedir. Aspirasyon materyalleri immünofenotipik ve moleküler çalışmalar için de kullanılabilir [12]. İyi bir aspirasyon ya da imprint materyalinde yapılan blast sayımı, kemik iliği ve akım sitometride blast yüzdesi ile koreledir ancak altın standart aspirasyondur [5].

Tablo 2. Aspirasyon materyalinde hücresellik oranları yaş aralığına ve hücrelerin morfolojisine göre dağılımı görülmektedir [12].

Kemik İliği Aspirasyonundaki Hücrelerin Yaşlara Göre Normal Oranları			
HÜCRE TİPİ	YETİŞKİN	ERKEN ÇOCUKLUK	YENİDOĞAN
Hücresellik %	40–60	60–80	80–100
MYELOİD %			
Myeloblast	<2	2–4	2–5
Promyelosit	1–4	2–5	2–4
Myelosit	6–8	4–6	4–6
Metamyelosit	8–10	6–8	6–8
Bant/nötrofil	15–20	20–25	25–30
Eozinofil	1–3	3	2
Bazofil	<1	<1	<1
Monosit %	1–3	2	1
Eritroid %			
Pronormoblast	0–1.5	0–2	0–2
O. normoblast	5–30	5–11	6–20
P. normoblast	5–10	0–8	0–5

Kemik iliği biyopsisi Değerlendirme için en az 1.5 cm uzunluğunda kortikal kemik alanı az olan biyopsi materyali gerekmektedir [4, 7]. Biyopsi materyali formalin solüsyonu ile iyi tespit edildikten sonra uygun solüsyonlarla dekalsifiye edilmelidir. Uygun kalınlıkta yapılmış hematoksilen-eozin (HE) kesitlerde hücresellik, hemapoetik hücrelerin matürasyonu ve dağılımı, infiltrasyon varsa lokalizasyonu, megakaryositlerin sayısı değerlendirilir. Gümüş histokimyasal boyaması ile özellikle myelofibrozis vakalarında retikülin liflerini değerlendirmek için önemlidir. PAS histokimyasal boyaması megakaryositleri değerlendirmede kullanılabilir. Ayrıca infiltrasyon natürünü belirlemek için IHK'sal belirteçler kullanılabilir [12].

DSÖ 2008 sınıflamasında kemik iliği biyopsilerine çok parametrelili yaklaşım önerilmektedir. Klinik, morfolojik, sitokimyasal, IHK'sal, genetik, moleküler veriler birlikte tanı ve hasta yönetiminde kullanılmalıdır [4, 12]. Biyopsi materyallerinde tedavi sonrası minimal rezidüel hastalık (MRH) tespiti için de önemlidir [4].

Blast, Miyeloid neoplazilerin tanısı ve sınıflaması için miyeloid blast morfolojisi ve yüzdesi önemlidir. Normal bir kemik iliğinde immatür granülositik prekürsörler paratrabeküler alanda izlenirken, immatür eritroid ve megakaryositik hücreler karakteristik olarak nonparatrabekülerdir. Aspirasyon materyalinde 500 nükleuslu hücre üzerinde yapılan blast sayımı ile biyopsi materyalindeki blast yüzdesi korele edilmelidir. Biyopsi materyaline CD34, MPO (Miyeloid peroksidaz), CD33, CD13 gibi IHK'sal boyamalar, Sudan Black-B (SB), Non-spesifik esteraz (NSE) gibi histokimyasal boyamalar blast natürünü belirlemek için uygulanabilir [12].

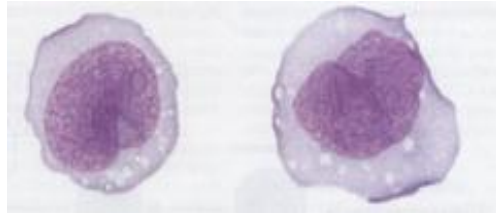
Myeloblast; matür lenfositten hafifçe büyük, koyu mavi gri sitoplazmalı, nükleusu oval, yuvarlak, ince granüler kromatinli, birkaç adet nükleollü hücrelerdir. Sitoplazmasında azurofil granül olabilir/olmayabilir [12].



Resim 1. Monoblastlar görülmektedir (x1000,Giems).

Monoblast; grikeyu mavi geniş sitoplazmalı, psödopod formasyonu gösterebilir, hücrelerin nükleusları yuvarlaktır, dantel gibi ince kromatini, birkaç adet geniş nükleollüdür (Resim 1). Bu hücreler NSE ile kuvvetli pozitif, MPO ile zayıf reaksiyon verir[12].

Promonosit, monoblast ile ayırımı zordur. Monoblast olarak sayılabilir. İnce granüler sitoplazmalı, sarılmış-katlanmış nükleuslu, ince dağılmış kromatinli, çok küçük nükleol ya da nükleolsüz hücrelerdir (Resim 2) [12].

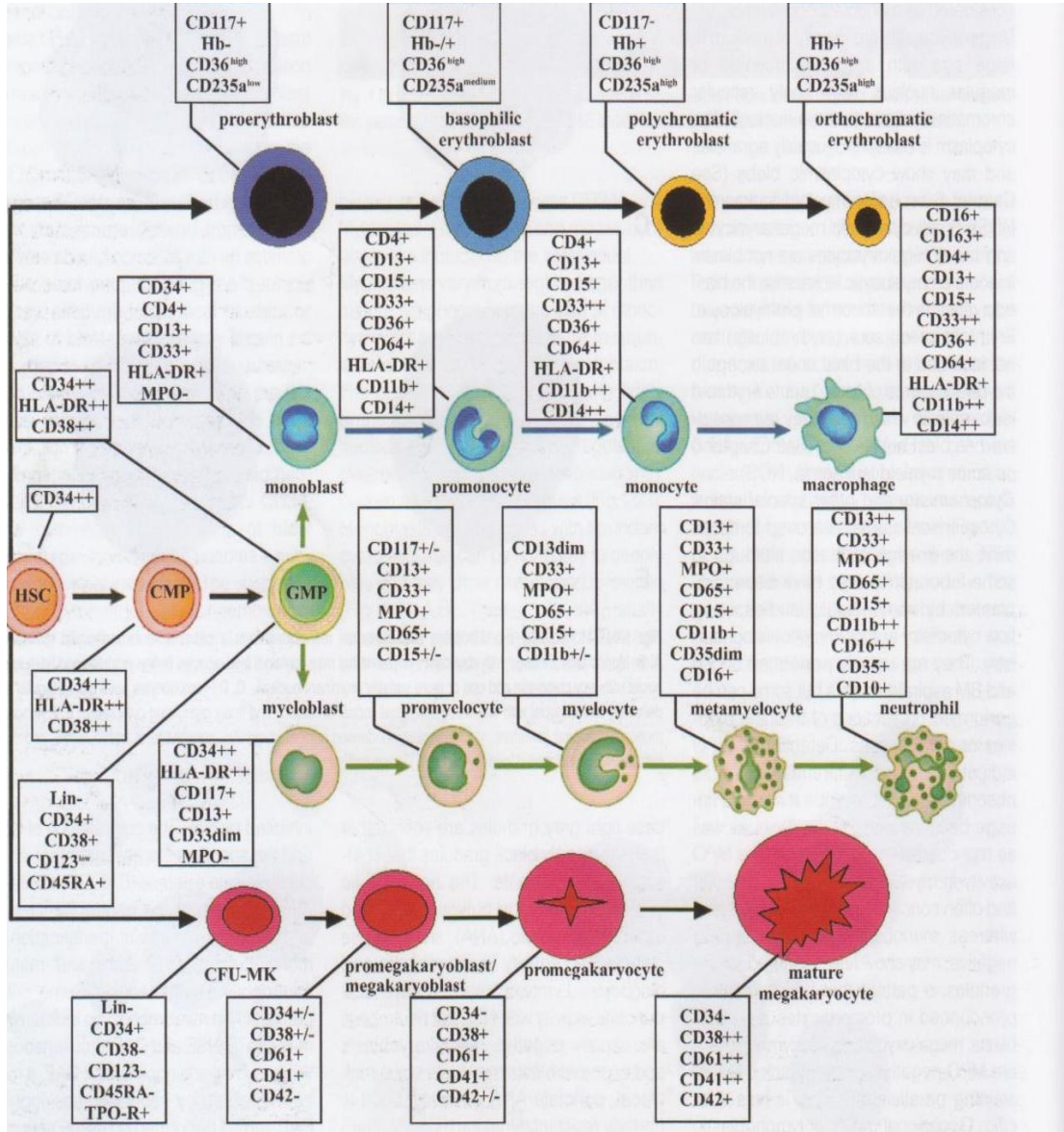


Resim 2. Promonosit görölmektedir (x1000, Giemsa)

Megakaryoblast; orta büyüklükte, bazofilik sitoplazmalı, sitoplazmasında genellikle granül bulunmayan, yuvarlak ya da düzensiz nükleuslu, ince retiküler kromatinli, bir ya da birkaç adet nükleölü olan hücrelerdir. Küçük displastik megakaryositler ve mikromegakaryositler blast değildir [13].

Eritroblast, pür eritroid lösemiler hariç genellikle blast sayısına dahil edilmez.

Miyeloid neoplazilerde, immüfenotipik analizin akım sitometrik ya da İHK'sal olarak yapılması karakterizasyonu belirlemek için gereklidir [12].



Şekil 2. Normal miyeloid farklılaşmasında değişik evrelerde antijen ekspresyonları görülmektedir [11, 12].

2.3. MİYELODİSPLASTİK SENDROM

2.3.1. Tanım-Tarihçe

Miyelodisplastik sendromlar (MDS), kemik iliğinde anormal selüler proliferasyon, periferik kanda ise kemik iliğinde görülen selüler proliferasyonun inefektif olması (inefektif hematopoez) nedeniyle bir ya da daha fazla seride sitopeni ile karakterli olan primer ya da sekonder multipotent bir kök hücre hastalığıdır [2].

Luzzatto 1907’de “psödaplastik anemi” adı altında ilk olguyu tarif etmiştir. 1941 yılında Bomford ve Rhodes tarafından 100 olguluk bir seri yayınlanmıştır. Folik asit eksikliğine bağlı gelişen anemilerde refrakter anemi grubu içerisine dahil edilmiştir. 1940’lı yıllarda folik asitin keşfi ile bu grup ayrılmıştır. AML’nin 1949 yılında subakut lösemik formu tanımlandıktan sonra 1953’te Block refrakter anemili bir hastada lösemik transformasyonu göstermiştir. 1956’da ring sideroblastlar ile karakterli refrakter anemi formu tanımlanmıştır. Rheingold ve arkadaşları kemik iliğinde %20-40 oranında blast görülen, periferik kanda zaman zaman blast görülen yavaş seyirli "smouldering" lösemi terimini kullanmışlardır. Yaşlılarda kemik iliği ve periferik kan tablosu ile myeloproliferatif hastalığı andıran primer myelodisplastik durum 1970 yılında tariflenmiştir. 1972’de Lewis ve Verwilghen refrakter aneminin morfolojik özelliklerini tanımlamak için “dishematopoez” terimini kullanmışlardır. French-American-British (FAB) çalışma grubu ilk kez 1976’da hematopoezin defektif oluşunu, periferik kan ve kemik iliğinde blast artışı ile karakterli MDS sınıflaması yapmışlardır. 1982’de FAB çalışma grubu MDS’un 5 alt tipini tarif etmişlerdir [14, 15].

2.3.2. Epidemiyoloji

MDS ileri yaş hastalığıdır. Primer MDS hastalarının ortalama yaşı 70’dir. MDS vakalarının 50 yaş altında görülmesi nadirdir. Pediatrik myelodisplazi olgularında monozomi 7 sendromu ailesel eğilimi olan bir antitedir. Bu nedenle yetişkinlerde MDS insidansı 50 yaş altında nadir olmasına rağmen, ailesel olgularda 50 yaş altında insidans yüksektir. 70 yaş üstünde yıllık yüz binde 20-30 olarak hesaplanmıştır. MDS vakaları erkek cinsiyette daha fazla oranda görülmektedir [3].

2.3.3. Klinik Özellikler

Hastalarda sitopeni ilişkili semptomlar gelişir. Pek çok hasta anemiktir ve tranfüzyon gerektirmektedir. Daha az sıklıkta nötropeni ve trombositopeni ile ilgili semptomlar görülür [3].

2.3.4. Etyoloji

Primer ya da de novo MDS vakalarında kemoterapi veya radyoterapi hikayesi bulunmamaktadır. Primer MDS vakalarında kimyasal mutajenik ajanlara (benzen gibi) maruziyet, sigara içimi, familyal hemapoetik neoplazm hikayesi, solvent maruziyeti gibi durumlarla ilişkilidir. Fankoni aplastik anemisi, Schwachman-Diamond sendromu, Diamon-Blackfan sendromu ile MDS gelişimi açısından artmış risk bulunmaktadır.

2.3.5. Morfoloji

MDS morfolojik sınıflandırması esas olarak kemik iliğinde ve periferik kanda blast yüzdesi, displazinin derecesi ve tipi, ringsideroblast varlığına göre yapılmaktadır. Bu değerlendirmelerin yapılabilmesi için iyi kalitede biyopsi materyali, periferik kan yaymaları ve aspirasyon materyali gerekmektedir. Periferik kan değerlendirmesinde 1-2 saatten fazla antikoagülana maruz kalmış kan uygun değildir. Kemik iliği aspirasyonunun displazi açısından değerlendirilmesinde incelenen hemapoetik dizinin en az %10'unda tanımlanan değişikliklerin bulunması gerekir.

Diseritropoez

Nükleusta tomurcuklanma, intranükleer köprüleşme, karyoreksiz, multinüklearite, nükleer hiperlobasyon, megaloblastik değişiklikler olur. Sitoplazma değişikliklerinde, çekirdek matürasyonu ile sitoplazma matürasyonu arasındaki uyumsuzluk sitoplazmada genişlemeye neden olur. Hemoglobin sentezindeki bozukluklar mitokondride hemosiderin birikimine yol açar. Bu demir histokimyasal boyama ile gösterilebilir. Bu granüller nükleusu çepeçevre kuşatıyorsa ringsideroblast olarak isimlendirilir. Eritroid öncülerin tüm evrelerinde 100 hücre sayılmalıdır [3].

Disgranülopoez

Miyeloid seride sitoplazmik granüllerin sayısında azalma (hipogranülasyon), nötrofillerde çekirdek segmentasyonunda azalma (hiposegmentasyon), iki loblu nötrofiller (psödo-Pelger-Hüet anomalisi) ve nötrofil çekirdeğine tutunan davul tokmağına benzer uzantılar ve Auer rod görülebilir. Nötrofillerdeki hipogranülasyon MPO aktivitesinde azalmaya yolaçabilir [3].

Dismegakaryopoez

Megakaryositlerde ki displazi en az 30 megakaryositte değerlendirilmelidir. %10'un üzerinde displazi varlığında kabul edilir. Megakaryosit şekil bozuklukları ve çekirdekte segmentasyon anomalileri görülür. Tek çekirdekli ve geniş sitoplazmalı megakaryositler 5q sendromuna özgüdür [3].

2.3.6. MDS DSÖ 2008 Tanı Kriterleri

Ön kriterler

*6 aydan uzun süreli sitopeni varlığı

Nötropeni $<1500 \text{ mm}^3$, Anemi $\text{Hb} < 11 \text{ g/dL}$, Trombopeni $\text{Plt} < 100.000 \text{ mm}^3$

*Sitopeni nedeni olabilecek klonal/klonal olmayan hastalıklar dışlanmalıdır

Kesin kriterler

*Morfolojik displazi %10 ve/veya üzerinde

*Blast oranı (%1-19)

*Tipik sitogenetik anomaliler

- Dengesiz (Unbalanced) - Dengeli (Balanced)

-7 veya $\text{del}(7q) \text{ t}(11;16)(q23;p13-3)$

- 5 veya $\text{del}(5q) \text{ t}(3;21)(q26.2;q22-1)$

$i(17q)$ veya $\text{t}(17p) \text{ t}(1;3)(p36.3;q21.2)$

-13q veya $\text{del}(13q) \text{ t}(1-22)(p21;q23)$

$\text{del}(11q) \text{ inv}(3)(q21;q26.2)$

del (12p) veya t(12p) t(6;9)(p23;q24)

del(9q)

FAB ve eski DSÖ sınıflamasında lösemi için eşik değer %30 blast oranı iken, DSÖ 2008 sınıflamasında bu değer %20 olarak belirlenmiştir. Tablo 3’de FAB MDS sınıflaması görülmektedir [3, 16].

DSÖ 2008 MDS sınıflamasında, periferik kan ve kemik iliği bulguları, blast oranları Tablo 4’de görülmektedir [3]. DSÖ 2008 sınıflamasında, MDS sınıflamasından kronik miyelomonositik lösemi (CMML) grubu çıkarılmış ve yeni sınıflamada miyeloproliferatif neoplaziler kategorisine alınmıştır.

DSÖ 2008 MDS sınıflamasına MDS-U, izole 5q sendromları, refrakter nötropeni ve trombositopeni grubu eklenmiştir. Geçici bir antite olarak çocukluk çağı MDS de bu sınıflamaya dahil edilmiştir [3].

Tablo 3. FAB MDS sınıflaması

Kategori	Periferal Monosit	Kan Blast	Kemik Ringsideroblast	İyiği Blast
Refrakter anemi(RA)	$\leq 1 \times 10^9 /L$	$\leq \%1$	$\leq \%15$	$< \%5$
Ringsideroblastlı refrakter anemi (RARS)	$\leq 1 \times 10^9 /L$	$\leq \%1 \geq$	$> \%15$	$< \%5$
Blast artışlı refrakter anemi (RAEB)	$\leq 1 \times 10^9 /L$	$< \%5$	Görülebilir	$\%5 - \%20$
Kronik myelomonositik lösemi(CMML)	$> 1 \times 10^9 /L$	$< \%5$	Görülebilir	$\%5 - \%20$
RAEB Transformasyonu (RAEB-t)	$\leq 1 \times 10^9 /L$	$\geq \%5$	Görülebilir	$\%21 - \%30$

Tablo 4. DSÖ 2008 MDS sınıflaması [3, 4, 17]

Hastalık	Periferik kan bulguları	Kemik iliği bulguları
Refraktersitopeni / Unilineage displazi (RCUD) -Refrakter anemi (RA) -Refrakter nötropeni (RN) -Refrakter trombositopeni (RT)	Tek seride sitopeni ya da bisitopeni Blast yok ya da <%1	Tek seride displazi (bir Miyeloid seride %10'dan fazla hücrede) <%5 blast, <%15 ringsideroblast
Ring sideroblastlı refrakter anemi (RARS)	Anemi, blast yok	>%15 ring sideroblast, Eritroidseride displazi, <%5 blast
Refraktersitopeni-Multilineage displazi(RCMD)	Sitopeni Yok ya da <%1 altında blast, Auer rod yok,	İki veya daha fazla seride >%10 displazi <%5 blast, Auer rod yok, ≥%15 ringsideroblast
Blast artışlı refrakter anemi (RAEB-1)	Sitopeni	Unilineage ya da multilineage displazi
	<%5 blast	%5-9 blast, Auer rod yok
	Auer rod yok	
Blast artışlı refrakter anemi (RAEB-2)	Sitopeni	Unilineage ya da multilineage displazi
	%5-19 blast	%10-19 blast
	Auer rod(<%5 altında myeloblast ve Auer rod)	Auer rod(<%10 blast ve Auer rod)
Sınıflandırılmayan MDS (MDS-U)	Sitopeni	Bir ya da daha fazla Miyeloid seri hücresinde %10dan daha az displazi,sitogenetik anomalilerin varlığı
	≤%1 blast	<%5 blast

2.3.7. Prognoz ve Prediktif Faktörler

MDS vakalarında alt tiplerin tanımlanmasında, düşük ve yüksek riskli grupların ve lösemik dönüşüm riskinin belirlemede blast oranı önemli role sahiptir [3].

MDS vakalarında prognozu ve akut lösemi transformasyonunu belirlemek için çeşitli risk sınıflamaları yapılmıştır. Bu sınıflamalarda dikkate alınan parametreler, kemik iliği blast oranı, sitopenilerin derecesi, yaş, sitogenetik anomalilerin tipleridir. En sık Uluslararası Prognoz Skorlama Sistemi (IPSS) kullanılmaktadır. Bu sistem, MDS olgularını düşük, orta ve yüksek riskli gruplara ayırmaktadır [3, 16].

Tablo 5. MDS, IPSS değişkenleri ve risk grupları [3, 4, 16]

Değişkenler	Puanlar				
	0	0,5	1	1,5	2
Kemik İliği Blast (%)	<5	(5-10)		(11-20)	(21-30)
Karyotip	iyi	orta	kötü		
Sitopeni	0 ya da 1	2 ya da 3			
IPSS Risk Grupları	Skor				
Düşük	0				
Orta1	(0.5-1.0)				
Orta2	(1.5-2.0)				
Yüksek	(2.5-3.5)				

İYİ: Normal, del(5q), del(20q), -Y

KÖTÜ: Kompleks anomali(>3), kromozom7 anomalisi

ORTA: Diğer anomaliler

Sitopeni: Hgb<10g/dL, nötrofil<1,8x10⁹/L, trombosit <100x10⁹/L

MDS vakaları morfolojik olarak 3 risk grubuna ayrılmıştır. RCUD ve RARS düşük risk grubunda, RCMD ve RAEB-1 orta risk grubunda, RAEB-2 vakaları yüksek risk grubundadır. Refrakter anemi vakaları 5 yılda %2, RAEB-2 vakaları %40 oranında AML'ye değişim görülmektedir [18]. Yüksek risk grubuna doğru ilerledikçe lösemik transformasyon artmaktadır.

2.3.8. Tedavi

Çocuk ve genç adultlarda kemik iliği transplantasyonu tercih edilen tedavi şeklidir. Diğer durumlarda sitopeninin düzeltilmesi, diferansiasyonun sağlanması, rezidüel normal hemapoetik hücrelerin proliferasyonunun uyarılması ve antilösemik tedaviye duyarlılığın artırılması için kemoterapi uygulanması tedavi seçenekleridir. Genel olarak MDS vakalarında ölümlerin temel nedeni enfeksiyon ve kanamaya yol açan kemik iliği yetmezliğidir. Yaş ilerledikçe kemik iliği yetmezliği nedeniyle ölüm oranı artmaktadır. Son zamanlarda lösemik transformasyon sonrası özellikle yaşlı hastalarda, yoğun kemoterapi yerine, daha hafif bir kemoterapi rejimi yanında, destekleyici tedavilerin uygulanması önerilmektedir [12, 19].

2.4. LÖSEMİ

2.4.1. Tanım

Lösemi, kemik iliğinin hemapoetik kök hücrelerinden kaynaklanan malign bir hastalıktır. Normal hematopoezde, hemapoetik kök hücreler periferik kan hücrelerine (matür lenfosit, granülosit, monosit, eritrositler ve megakaryositler/ trombositler) farklılaşır. Lösemide, çok sayıda lökosit kemik iliğindeki kök hücreden yapılır ancak olgunlaşıp, farklılaşamaz. Bu olgunlaşamayan hücreler kemik iliğinde çoğalır ve normal hemapoetik hücrelerin yerini alır. Bu mekanizma tam anlaşılamamış olmakla birlikte lösemide DNA hasarı olduğu düşünülmektedir. Kromozomlarda ki yeniden düzenlenmeler, translokasyonlar, delesyonlar, gen amplifikasyonları ve sitogenetik değişiklikler normal hücrenin farklılaşma ve proliferasyonun düzenlenmesini bozmaktadır [4].

Lösemiler, kemik iliğinden köken aldığı hücre tipine göre miyeloid veya lenfoid, etkilenen hücrelerin farklılaşma derecesine göre akut veya kronik olarak adlandırılır. Bu şekilde lösemiler dört temel gruba ayrılır.

1-Akut Miyeloid lösemi (AML)

2-Kronik Miyeloid lösemi (KML)

3-Akut lenfoid lösemi (ALL)

4-Kronik lenfoid lösemi (KLL)

Akut Miyeloid lösemi, anormal myeloblastlardan kaynaklanan heterojen, klonal bir hastalıktır. Yetişkinlerde en sık görülen lösemi tipidir.

Kronik Miyeloid lösemi, Pluripotent kök hücrelerin klonal hastalığıdır. Kemik iliğinde miyeloid hiperplazi ve beyaz küre sayımında yüksek lökosit seviyeleri ve splenomegali ile ilişkili hastalık grubudur. KML üç fazlı bir hastalıktır, kronik faz ile başlar, miyeloid hücrelerin artışı ile ilerler ve blastik kriz ile sona erer. Genellikle %90-95 oranında Phelidelphia (Ph) kromozomuna rastlanır.

Akut lenfoid lösemi, anormal lenfoblastik hücrelerden kaynaklanan, morfolojik, immünolojik, sitogenetik, biyokimyasal ve moleküler genetik açısından heterojen hastalık grubudur. Çocukluk çağıının en sık lösemi tipidir.

2.4.2. Tarihçe

Hematoloji deyiimi ilk kez Thomas Schwenke tarafından 1743’de kullandı ve halk arasında “kan kanseri” adı verilen löseminin tanımlanması ise ancak 19. yüzyılda gerçekleşebildi. Löseminin tanımlanmasının diğer kanser grubu hastalıkları içerisinde oldukça yeni olmasının nedeni, mikroskobun tıp alanında ancak 19. yüzyıl başlarında kullanılmaya başlanmasıdır [20].

John Hughes Bennett tarafından 1845’de Edinburg Medical and Surgical Journal’da yayınlanan “Case of Hypertrophy of the Spleen and Liver in which Death took place from Suppuration of the Blood” adlı makale bir dönüm noktası oldu. Bennett bu makalesinde kanda gözlemlediği değişikliğin iltihap ve enflamasyondan farklı olduğunu belirtti. Kandaki tüm hücrelerin etkilenmiş olduğunu, hücrelerin değişik boylarda olduğunu, asetik asit uygulandığında ise nükleusların ayrıştığını gösterdi. Bennett tarafından ilk kez lösemili bir hastanın kan hücrelerinin resmi yayınlanmıştır [20].

Lösemi ile ilgili ikinci olgu ise Virchow (1821-1902) tarafından rapor edildi. Yaşayan hastada löseminin mikroskobik tanısını ise, ilk kez Henry Fuller 1846’da gerçekleştirdi. Virchow, 1847’de benzer bir olgu yayınladı ve bu yeni hastalığı tanımlamada “leukemia” (beyaz kan) terimini kullandı. Bennett ise “leucocythaemia” terimini tercih etti [20].

Akut löseminin tanımı ise, 1857’de Nikolaus Friedreich tarafından yapıldı. Ernst Neumann, 1870’de kemik iliğinin kan hücrelerinin yapımında önemli bir yeri olduğunu söyledi ve löseminin kemik iliğindeki değişikliklerden kaynaklandığını gösterdi.

Paul Ehrlich’in, 1877’de kan hücreleri arasındaki farklılaşmayı gösteren boyama yöntemini bulması, tıpta yeni bir çağı başlattı.

Akut monositer löseminin tanımlanması ise 1913 yılında Dr. Hasan Reşat Sığındım ve Dr. Schilling tarafından yapıldı. “Akut monositer lösemi” 1913 yılında Münchener Medizinischer-Wochenschrift dergisinin 36. sayısında yayınlandı [20].

1976 yılında Fransız-Amerikalı ve İngiliz bir grup hematolog tarafından orjinal FAB sınıflaması oluşturulmuş ve aynı sınıflama 1985 yılında yeniden gözden geçirilmiştir. FAB sınıflamasında akut lösemiler, morfolojik ve sitokimyasal boyanma özelliklerine göre gruplandırılmaktadır, akut lenfoblastik ve akut myeloblastik lösemi olarak ikiye ayrılmaktadır (20).

FAB sınıflaması, immünofenotipleme, elektron mikroskobu, sitogenetik, moleküler biyolojik teknik yöntemlerini ve nadir lösemi tiplerini içermeyen bir sınıflamadır. Akut lösemide sitogenetik ve moleküler genetik anomalilerin bariz bir hale gelmesi ve bunların prognostik önem göstermelerinin belirlenmesiyle yeni bir sınıflandırma ihtiyacı olduğu gözlenmiş ve 2001 yılında DSÖ tarafından akut lösemiler de dahil olmak üzere hemapoetik ve lenfoid neoplazmaları içeren yeni bir sınıflama yapılmıştır. Akut lösemi DSÖ sınıflamasında, morfoloji, immünofenotipleme, sitogenetik ve moleküler biyolojik özellikler göz önüne alınmıştır. Akut lösemi tanısı için kemik iliğinde blastik hücre sayısı %30’dan %20’ye indirilmiş ve aynı zamanda nadir lösemi tipleri de dahil edilmiştir [7].

DSÖ sınıflamasında akut lösemiler, miyeloid, lenfoid ve serisi belirlenemeyen olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır.

Akut miyeloid lösemiler:

- a. Tekrarlayan sitogenetik anomalilerle seyreden AML
- b. Çoğul seri displazi ile seyreden AML
- c. Tedaviye ikincil AML ve MDS
- d. Tanımlanan gruplara girmeyen AML olmak üzere dört gruba ayrılarak değerlendirilmiştir.

Akut lenfoid lösemiler:

- a. Prekürsör B lenfoblastik lösemi/ lenfomalar
 - Rekürren sitogenetik anomalilerle birlikte olanlar
 - Sınıflandırılmayanlar
- b. Prekürsör T lenfoblastik lösemi / lenfomalar

Sınıflandırılmayan (Serisi belirsiz) Akut lösemi

- a. Bifenotipik (Mikst fenotipli) akut lösemi
- b. Farklılaşmamış akut lösemi

2.5. AKUT MİYELOİD LÖSEMİ

2.5.1. Tanım

Akut miyeloid lösemi, hemapoetik öncül hücrelerin heterojen klonal bir hastalığıdır ve sıklığı yaş ile artar. Klonal çoğalan öncül hücrelerin matür hücrelere farklılaşma yeteneği yoktur ve normal hematopoezi de baskırlar. Kemik iliğinde blast sayısının %20'den fazla olması tanıyı koydurur [4, 5].

AML vakalarında kritik ayırım primer (de novo) ile sekonder AML vakalarının ayırımıdır. Primer AML vakalarında daha önce bir hematolojik hastalık bulunmamaktadır, bu hastalar daha gençtir ve tedaviye yanıt-sağkalım oranları daha yüksektir.

Sekonder AML vakaları ise daha önceden MDS veya kronik myeloproliferatif hastalık gibi hematolojik hastalıkları olan vakalar ya da başka bir hastalık için kemoterapi almış vakalardır. Sekonder AML vakaları daha ileri yaşta görülür ve tedaviye yanıtı, prognozu kötüdür.

2.5.2. AML FAB Sınıflaması

AML'de ilk sınıflama 1976 yılında FAB grubu tarafından yapılmış ve 1985 yılında revize edilmiştir (Tablo 7). Bu sınıflama AML'nin standart sınıflamasıdır. Miyeloid hücrelerin matürasyonu ve diferansiasyon derecesine göre yapılmaktadır. FAB sınıflaması büyük ölçüde morfoloji ve basit sitokimyasal boyama sonuçlarına göre yapılmaktadır. FAB sınıflamasında AML tanısı için blast yüzdesi eşik değeri %30'dur.

Tablo 6. Akut miyeloid lösemi FAB sınıflamasında kullanılan sitolojik reaksiyonlar.

REAKSİYON	Yok veya zayıf reaksiyon	Orta derecede reaksiyon	Kuvvetli reaksiyon
Nonspesifik esteraz	M0, M1	M2, M3	M4, M5
Florid inhibitörlü nonspesifik esteraz	M0, M1, M5	M2, M3, M4	–
Miyeloperoksidaz veya Sudan Black	M0, M5, M7	M1, M4	M2, M3
Lizozim (muramidaz)	M0, M1, M2, M3	M4	M5
Period acid–Schiff	M0, M1, M2, M3	M4, M5	ALL

Tablo 7. FAB AML sınıflaması görülmektedir.

Alt tip	Morfoloji	Erişkinlerde insidans (%)	Hücre boyutu	Sitoplazmanın nükleusa oranı	Nükleol	Sitoplazmik granül	Auer Çubukları	Yorum
M0	Matürasyonsuz Miyeloblastik lösemi	<5	Küçük veya orta	Eşit veya azalmış	Genellikle ayırt edilir.	Yok	Yok	ALL ile karışır, doğrulanması için CD13 ve CD33 immün belirteçleri gerekir.
M1	Minimal matürasyonlu miyeloblastik lösemi	15	Küçük veya büyük	Yaklaşık eşit	Ayırt edilir	Çok az	Ara sıra	Özel inceleme yapılmazsa M7 ve M2 ile karışır: inv (3) trombositozla beraberdir.
M2	Matürasyonlu miyeloblastik lösemi	25	Büyük	Yaklaşık eşit	Ayırt edilir	Var	Ara sıra	Ön plandaki hücreler blast veya erken promiyelositlerdir. Ekstramedüller tutulum eya splenomegali olabilir.
M3	Promiyelositik lösemi	10	Büyük	Artmış	Ayırt edilir	Büyük bol ve atipik	Sık	Yüksek YDP sıklığı. Retinoik asit ile tedavi. Varyant M3 granül içermeyen ve M4 zannedilebilir.
M4*	Miyelomonositik lösemi	25	Monositik özellikler gösteren büyük	Artmış	Ayırt edilir	Var	Ara sıra	Hem monositik hem granülositik differansiasyon. Ekstramedüller tutulum olabilir.
M5	Monositik lösemi az differansiye (M5a) veya iyi differansiye (m5b)	10	Büyük monositik dizge	Yaklaşık eşit	Büyük	Var	Nadir	Ekstra medüller tutulum sık (dişeti, cilt, SSS)
M6	Eritrolösemi	<5	–	–	–	–	–	Miyeloblastlar ile garip şekilli çok nüveli eritroblastlar ve aşırı eritroid hiperplazisi
M7	Megalokaryoblastik lösemi	<5	Küçük veya büyük	Heterojen	Ayırt edilir	Çok az	–	Elektron mikroskopisinde trombosit peroksidaz reaksiyonu veya trombosit glikoproteinine yönelmiş monoklonal antikorlar ve belirgin kemik iliği fibrozisi

*M4Eo: M4'ün bir alt tipidir ve kemik iliğinde anormal eozinofillerle karakterizedir. Bu eozinofiller büyük bazofilik granüllere, tek loblu çekirdeklere veya pozitif periodic acid- Schiff (PAS) ve chloraacetate (normal eozinofiller negatiftir) boyanmasına sahiptir. Ekstramedüller tutulum sık olarak ortaya çıkar ve bu alt tip genellikle daha iyi prognoza sahiptir.

AML-M0

AML vakalarının %5-10'dur. Blastların <%3'ü MPO veya SB ile pozitifdir. Ancak akım sitometrik miyeloid antijen ekspresyonu vardır. ALL ile karışır. Auer body ve lenfoid antijen ekspresyonu olmamalıdır. Vakaların çoğunda CD34 ve HLA DR pozitifdir. Kötü prognostik gruptadır ve ortalama yaşam süresi 10 aydır [21].

AML M1

AML vakalarının %10-20'sini oluşturur. Miyeloid hücrelerin >%90'ı blastik hücrelerden oluşur. Blastların >%3'ü MPO ve SB ile boyanır. İmmünohistokimide CD13, CD33, CD34 ve HLA DR pozitifdir [21].

AML M2

AML vakalarının %30-45'idir. Miyeloid hücrelerin >%10'u promyelosit düzeyi ya da daha geç evrede matürasyon göstermektedir. Myeloblast oranı %30-%90 arasındadır. İmmünohistokimide CD13, CD33, CD34 ve HLA DR pozitifdir. FAB M2 vakaları, tüm yaş gruplarında görülmekle beraber en sık 25 yaş altında ve 60 yaş üstünde görülür. Hastalarda çoğunlukla anemi ve nötropeni vardır. t(8;21) olguların %25'inde görülür [21].

AML M3

AML vakalarının %5-10'unu oluşturur. Hipergranüler ve mikrogranüler varyant olarak ikiye ayrılır. Hipergranüler (%75), büyük sitoplazmik granüller, promyelositler baskındır. Mikrogranüler (%25), küçük granülleri ve katlanmış nükleusları olan promyelositler baskındır. MPO ve SB ile pozitifdir, yaygın Auer body görülür. İmmünohistokimide CD13, CD33, CD15 pozitif ve HLA DR, CD34 negatifdir. Vakaların %90'ında t(15;17) (q22;q22) mevcuttur. PML/RARA füzyon proteinini oluşturur. Vakalarda DIC gelişim insidansı artmıştır (20).

AML M4

AML vakalarının %15-25'lik kısmını oluşturur. Kemik iliği hücrelerinin >%20'si monositik hücrelerden oluşmaktadır. Periferik kanda monosit oranı yaklaşık $5 \times 10^9/L$ ve üzerindedir. Çocuklarda ve genç erişkinlerde nadir görülür. Genellikle 50 yaş üstü erişkinlerde görülür. MPO ve SB ile negatifdir, Auer body nadir görülür. İmmünohistokimide CD13, CD33, CD14 ve HLA DR pozitifdir. Vakaların çoğunda

inv (16) görülür, bu durum özellikle kemik iliğinde anormal eozinofillerin var olduğu M4Eo varyantında belirgindir [21].

AML M5

Kemik iliğinde blast oranı %30'un üzerindedir. FAB M5a ve M5b olmak üzere iki tipi vardır. M5a genç erişkinlerde daha sık olarak görülür, ortalama yaş 16'dır, kemik iliği hücrelerinin %80'i monoblastlardan oluşmuştur. M5b 'de promonositler ön plandadır, tedaviye daha dirençlidir. M5 tipi lösemide kanama bozuklukları, ekstremiteler tutulum ve santral sinir sistemi tutulumu görülür. Lösemik hücreler MPO negatif, NSE ve Lizozim pozitifdir. M5a tipinde M4'ten farklı olarak 11q23 anomalisi görülür, kötü prognostik değere sahiptir [21].

AML M6

Kemik iliği hücrelerinin %50'si eritroid öncül hücrelerden ve eritroid olmayan hücrelerin >%30'u myeloblastlardan oluşur. FAB M6a ve M6b olarak ikiye ayrılır. Daha ileri yaşlarda görülür ve tüm AML vakalarının %5-6'sını oluşturur. Lösemik hücreler MPO, SB, PAS pozitifdir. İmmünohistokimide CD13, CD33, CD117 ve glikoforin pozitifdir. 5. ve 7. kromozomda delesyon sık görülür ve kötü prognostik değere sahiptir (20).

AML M7

Kemik iliğinde megakaryoblastlar %30'un üzerindedir. Lösemik hücrelerden MPO negatif, PAS ve NSE pozitifdir. İmmünohistokimide CD13, CD33 pozitifdir. Yetişkinlerde akut megakaryoblastik lösemi ilişkili bilinen translokasyon yoktur, çocukluk döneminde t(1;22) (p13;q13) ile ilişkili olabilir ve kötü prognozla ilişkilidir. Ayrıca trizomi 21'li çocuklarda görülme insidansı yüksektir [21].

Akut lösemide, hücre yüzey antijenlerinin ve sitogenetiğin öneminin fark edilmesi ve FAB sınıflamasının yeterli olmadığının gözlenmesi ile akut lösemilerin bir çok özelliğini bir arada bulunduran sınıflamalar (MIC ve EGIL sınıflamaları) gündeme gelmiştir. MIC sınıflamasında akut lösemiler, hücre morfolojisi, immünohistokimik ve sitogenetik özelliklere göre sınıflandırılmaya çalışılmıştır. European Group for the Immunological Classification of Leukemias (EGIL) sınıflamasında ise, AML'ler 2 veya daha fazla miyeloid hücre yüzey antijeni (MPO, CD13, CD33, CDw65, CD117) varlığı ile tanımlanmıştır [4].

2.5.3. AML DSÖ Sınıflaması

Yeni tekniklerin geliştirilmesi ve bu teknikler sayesinde saptanabilen sitogenetik ve moleküler anomaliler ve bunların prognostik öneminin anlaşılması ile 2001 yılında DSÖ tarafından AML sınıflaması düzenlenmiştir [4]. FAB sınıflaması, hücre morfolojisi ve diferansiasyon oranına göre, biyokimyasal reaksiyonlara ve hücre yüzey antijenlerine bağlı olarak yapılmakta iken DSÖ sınıflamasında tanı algoritmasına genetik anomaliler, immünofenotipik ve moleküler özellikler de dahil edilmiştir [4]. FAB ve DSÖ sınıflaması arasındaki en önemli fark blast yüzde eşik değerinin %30'dan %20'ye düşürülmesidir [1, 4, 7].

AML vakalarında 100'den fazla sitogenetik anomaliler vardır. Bunlardan en sık saptananları, t(8;21), t(15;17), inv(16), t(16;16) 'dır. Bu kromozomal bozukluklar ve varyantları AML vakalarının yaklaşık %40'lık kısmını oluşturmaktadır. Geriye kalan %40-%45'lik bölümde bu kromozomal anomaliler bulunmamaktadır ve normal karyotipe sahiptir, bu gruptaki hastalar orta risk grubunda sınıflandırılır. Ancak normal karyotipli vakalarda aynı risk grubuna dahil edilmelerine rağmen moleküler seviyede heterojenite göstermektedir. Bu farklılıkların tespiti için de moleküler belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır [7].

2.5.4. DSÖ 2008 Sınıflaması

DSÖ 2008 sınıflamasında, DSÖ 2001 sınıflamasına yeni antiteler eklenmiştir. Sınıflama moleküler, sitogenetik ve geçmişinde var olan hematolojik hastalığa göre yapılmaktadır. RUNX1, CBFB, RARA gibi transkripsiyon faktörü kodlayan genlerdeki yeniden düzenlenmelerin miyeloid farklılaşmayı bozduğu gösterilmiştir. Genetik anomaliler neoplastik klonun proliferasyonu ve yaşam devamlılığında önemlidir. Bunların prognostik değeri ve hedef tedavilere aday olması nedeniyle sınıflama değişebilmektedir ve yeni antiteler eklenmiştir [4].

Genetik mutasyonlarda ek anormalliklerin varlığında (örneğin, Fms benzeri tirozin kinaz 3 (FLT3) ya da KIT mutasyonlarında kodladıkları proteinle aktive sinyal üreten yolakta proliferasyon ve yaşam devamlılığını yönetirler) bu durum prognoz ile ilişkilidir. Ayrıca Nükleofosmin (NPM-1) ve CCAAT/enhancer binding proteinα (CEBPA) mutasyonlarının varlığında prognoza etkilidir [7].

Tablo 8. DSÖ 2008 Sınıflaması Yenilikler [7]

1-AML rekürren sitogenetik anomali gösterenlerde değişiklikler,
*AML 11q23(MLL) anomalisi AML t(9;11)(p22;23); MLLT3-MLL olarak tekrar tanımlanmıştır.
* Ayrıca üç yeni sitogenetik anomali tariflenmiştir,
AML t(6;9)(p23;q23); DEK-NUP214
AML inv(3)(q21;q26.2) ya da t(3;3)(q21q26.2); RPN1-EVI1
AML (megakaryoblastik) t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1
*İki geçici antite eklenmiştir
AML NPM1 mutasyonu gösterenler
AML CEBPA mutasyonu gösterenler
2- AML Myelodisplazi ilişkili değişiklikler
*AML birden fazla seride displazi ile seyredenler ismi, AML myelodisplazi ilişkili değişiklikler olarak değiştirilmiştir [6, 8].
Bu kategorideki vakalarda,
Dahaönceden var olan MDS hikayesi olmalı (AML başlamadan en az 6 ay süre geçmiş olmalı)
Myelodisplazi ilişkili sitogenetik anomalileri içermeli ya da
İki ya da daha fazla miyeloid seride %50'den fazla hücrede displastik değişiklikler olmalıdır [5, 8].
3-Tedavi ilişkili miyeloid neoplazi
Daha önce Alkilleyici ajan ya da Topoizomeraz II inhibitörleri ile ilişkili olarak ayrılmaktaydı, bu ayırım kaldırılmıştır. Bu ajanların kullanımı üzerinden en az 4 ila 7 yıl geçmiş olması gerekmektedir [5, 8].
4-AML,NOS
<u>Down Sendromu ilişkili AML vakaları, akut eritroid lösemiler, akut megakaryoblastik lösemiler bu gruptan çıkarılmıştır. Tüm AML vakalarının yaklaşık %25-30 'unu oluşturmaktadır [8].</u>
5-Down Sendromu ilişkili Miyeloid proliferasyonlar
Yeni bir kategori olarak Down Sendromlu vakalarda anormal myelopoezis, miyeloid lösemi tanımlaması eklenmiştir.

Tablo 9. DSÖ 2008 Akut miyeloid lösemi ve ilişkili miyeloid neoplazilerin sınıflaması [4, 7]

Akut miyeloid lösemi rekürren genetik anomalileri olan

AML t(8;21)(q22;q22);RUNX1-RUNX1T1

AML inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11

APL t(15;17)(q22;q12); PML-RARA

AML inv(3)(q21q26.2) veya t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1

AML (megakaryoblastik) t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1

Geçici antite: AML NPM1 mutasyonu

Geçici antite: AML CEBPA mutasyonu

Akut miyeloid lösemi myelodisplazi ilişkili değişiklikleri olan

Akut miyeloid lösemi tedavi ilişkili olan

Akut miyeloid lösemi, NOS

AML minimal diferansiasyonlu

AML matürasyonsuz

AML matürasyonlu

Akut myelomonositik lösemi

Akut monoblastik / monositik lösemi

Akut eritroid lösemi

Pür eritroid lösemi

Eritrolösemi, eritroid/miyeloid

Akut megakaryoblastik lösemi

Akut bazofilik lösemi

Akut panmiyelozis myelofibrozisli

Miyeloid sarkoma

Down sendromu ilişkili miyeloid proliferasyon

Blastik plazmasitoid dendritik hücreli neoplazm

2.5.5. Epidemiyoloji, Etyoloji

AML patogenezinde çevresel, mesleksi ve genetik faktörlerin rol oynadığı ortaya konulmuştur [5]. İnsidans oranları gelişmiş ülkeler ve endüstrileşmiş şehirlerde daha fazladır. AML en sık görülen lösemidir ve olasılığı 40 yaşından itibaren yaşla artar, ortalama 67 yaşta hastalığa yakalanma insidansı vardır. Prevalansı 100 bin kişide 3,8'den, yaş ile 100 binde 17,9'a artar, erkeklerde bayanlara göre daha sıktır.

Genetik faktörler de AML patogenezinde yer almaktadır. Bu faktörler konjenital defektler (Down sendromu, Bloom sendromu, Monosomy 7 sendromu, Klinefelter sendromu, Turner sendromu, Nörofibromatozis, konjenital dismorfik sendrom) ve kemik iliği yetmezlik sendromları (Fanconi anemisi, dyskeratozis congenita, Shwachman-Diamond sendromu, amegakaryocytic thrombositopeni, Blackfan-Diamond sendromu, Kostmann agranülositozisi, familial aplastik anemi) olarak ayrılabilir.

Çevresel faktörlerde AML patogenezinde yer almaktadır. Solventler, sigara içimi, iyonize radyasyon, kemoterapi, kloromfenikol gibi ilaçlar başlıca çevresel faktörlerdir [7].

2.5.6. Klinik

AML hastalarında semptomlar aniden başlar. Anemi ve ilişkili semptomlar ön plandadır. En yaygın şikayet nonspesifik yorgunluk, halsizlik ve keyifsizlik halidir. Ateş vakaların bir kısmında bulunur. Peteşi, özellikle dişetlerinde kanama ve vücutta morarmalar dikkat çekici bulgulardır. Vakaların klinik seyrinde cilt infiltrasyonları olabilir. FAB M4Eo, inv(16) vakalarında intrakranial kitle varlığı tariflenmiştir (7).

Miyeloid sarkom AML'li vakaların %2 ile %14'ünde meydana gelen ekstramedüller bir tümördür. Tümörler genellikle lokalizedir, sık sık kemik, periosteom, yumuşak dokular, lenf nodları ve cildi tutar [7].

2.5.7. Laboratuvar Bulguları

Hastaların pek çoğunda lökosit sayısı yüzbinin üzerindedir. Az bir hasta popülasyonunda lökosit sayısı normal olabilir. Sitopeni görülmesi blast popülasyonunun kemik iliğini baskılaması ile ilişkilidir [22].

AML vakalarında anemi çoğunlukla normositer normokromiktir.

Trombositopeni sıklıkla DIK (Dissemine intravasküler koagülasyon) tablosuna neden olabilir, bu durum en çok AML-M3 vakalarında görülür [23].

AML vakalarında kanda laktat dehidrogenaz (LDH) seviyeleri yüksektir bu durum özellikle monositik lösemilerde (AML M4-M5) belirgindir. Vakalarda kalsiyum seviyeleri yüksek ya da düşük olabilir.

Pulmoner bulgular, dispne, taşipne, intertisyel infiltrasyon, solunum yetmezliğidir. Kötü bir prognoz ile ilişkilidir.

Santral sinir sistemi tutulumunda başağrısı ve bulanık görme olur. Ölümcül intraserebral hemoraji meydana gelebilir.

Priapizm, büyümüş böbrekler, hiperürisemi ve renal yetmezlik genitoüriner tutulum özellikleri olarak görülmektedir [24].

Hiperlökositoz 100.000'den fazla kan beyaz küre sayısıdır ve AML-M0 vakalarında daha yaygındır. Hiperlökositoz, santral sinir sistemi hemorajisi, solunum yetmezliği, SSS tutulumu ve daha yüksek relaps oranından dolayı kötü prognoz ile ilişkilidir. Hiperlökositozlu hastalarda lökositozun riskini azaltacak tedavi seçenekleri; lökoferez, yüksek dozda hidroksiüre verme ve acilen indüksiyon kemoterapisinin verilmesidir [25].

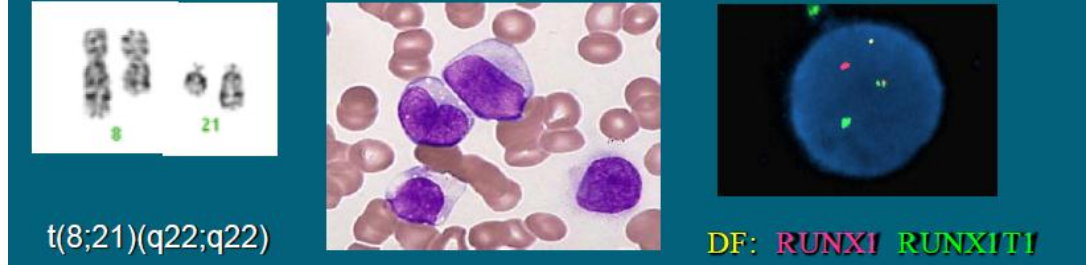
2.5.8. AML'de Kromozomal Translokasyonlar

AML'de görülen translokasyonların çoğu kimerik füzyon gen ürünü oluşturur.

1. Core Binding Faktör (CBF)

CBF genini 20'ye yakın translokasyon hedef alır. CBF grubundaki genler birçok dokunun farklılaşmasında rol oynayan çeşitli hedef genlerle heterodimer kompleksi oluşturarak işlev görür. DNA'ya bağlanarak işlev gören alfa ve DNA'ya bağlanmadan transkripsiyonel aktiviteyi arttıran beta alt üniteleri vardır. Öncelikle t(8;21), AML1-ETO translokasyonu tespit edilmiş olup, buradaki AML1 geni CBF'nin DNA'ya bağlanarak transkripsiyonu başlatma özelliğine sahip alfa1 alt grubu üyesidir.

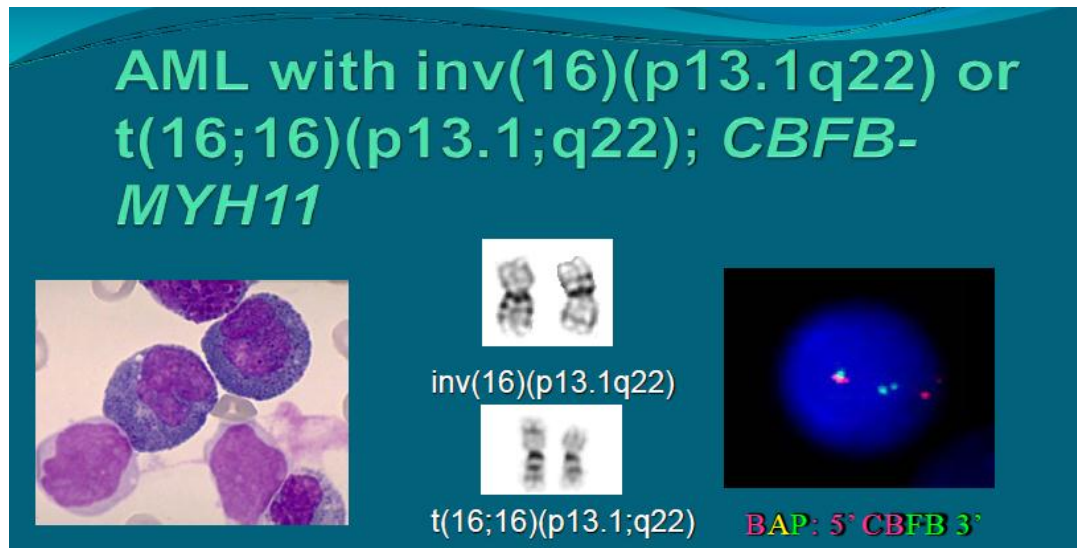
AML with t(8;21)(q22;q22); *RUNX1-RUNX1T1*



Resim 3. AML t(8;21)

16. kromozomun inversiyonu- inv(16) sonucu fonksiyonu değişen CBF betadır.

Burada CBF β -MYH11 füzyonu söz konusudur. Her iki translokasyon da hematopoezisi bozsalar da tek başlarına AML başlatmada yeterli değillerdir.



Resim 4. AML inv16

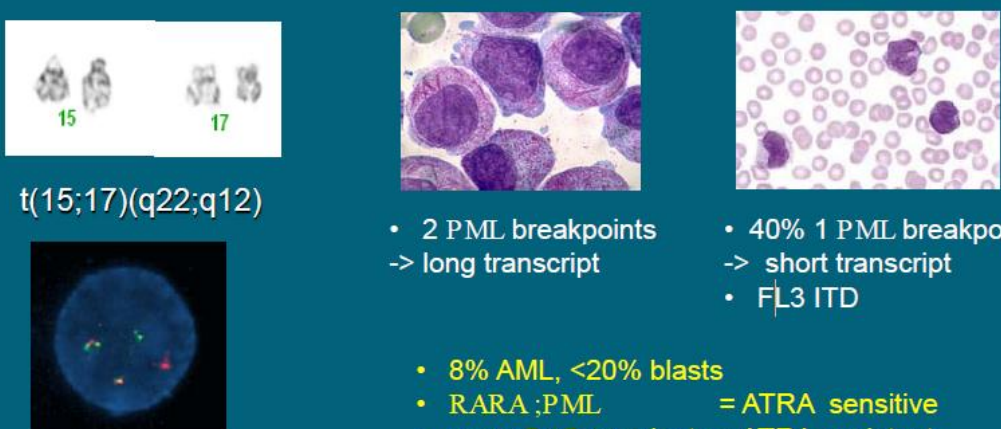
AML1-ETO ve CBF β -MYH11 translokasyonları AML’li olguların yaklaşık olarak sırasıyla %2-12 ve %1-5 kadarında görülür ve her ikisi de iyi prognozla birliktelik gösterir. Bu nedenle hastalık tanısı ve takibinde kullanılan belirteçlerdir.

2. Retinoik asit reseptör alfa (RAR α)

17. kromozomda bulunan RAR α ile 15. kromozomda lokalize PML (Promyelositik lösemi) geni ya da 11. kromozomda lokalize promyelositik lösemi zinc finger (PLZF) geni füzyonu oluşur. Bu durum fenotipik olarak gelişimin promyelosit safhasında durmasına neden olur.

PML-RAR α füzyon proteini DNA’ya bağlanma ve dimerizasyon kapasitesini yitirmemesine rağmen retinoik aside bağlanabilirliği değişmektedir ve hedef genlerin transkripsiyonu bozulmaktadır. t(11;17) (q23;q21) translokasyonunda ise RAR α geni, 11.kromozomdaki PLZF geni ile birleşmektedir. Ortaya çıkan füzyon proteini RAR α ya benzer şekilde RAR α ’nın DNA’ya bağlanma kapasitesini değiştirmektedir. Ancak yine CBF mutasyonları gibi, RAR α mutasyonlarının da lösemi gelişimi için başka mutasyonların katkısına ihtiyaçları vardır.

Acute promyelocytic leukemia with t(15;17)(q22;q12); PML-RARA



t(15;17)(q22;q12)

- 2 PML breakpoints
-> long transcript
- 40% 1 PML breakpoint
-> short transcript
- FL3 ITD
- 8% AML, <20% blasts
- RARA ;PML = ATRA sensitive
- some RARA;variants = ATRA resistant

DF: PML RARA

Resim 5. AML t(15;17)

3. Mixed Lineage Leukemia (MLL) geni translokasyonları

11q23 bölgesini içeren translokasyonlar AML yanında ALL’de görülür. 30’dan fazla partner gen bu bölgede bulunan MLL geni ile translokasyon yapar. Bu durum 1 yaş altı infant lösemilerinde en sık görülen genetik değişikliktir. Ayrıca yine tedaviye bağlı sekonder lösemilerde de 11q23 aberasyonlarına sıklıkla rastlanır . AML ‘li hastaların yaklaşık %15’i 11q23 kromozomu içeren duplikasyon, delesyon, translokasyon gibi sitogenetik anormalliklere sahiptir .

4. Homeotik genler-HOX

HOX gen ailesine ait genler omurga gelişimi ve ayrıca normal hematopoez de önemli rol oynarlar. AML’de HOX genleri, çeşitli tipleriyle MLL geni ile translokasyon yapmaktadır. Burada HOX genlerindeki sorun, normal hematopoezisi regüle edici fonksiyonunu kaybetmeleri tarzında olmaktadır. HOX genlerini hedefleyen kromozomal translokasyonlar arasında t(7;11) NUP98-HOXA9 ve t(2;11) NUP98-HOXD13 sayılabilir.

2.5.9. AML’de Görülen Nokta Mutasyonları

1. RAS gen ailesi mutasyonları

Onkogenik RAS mutasyonları AML ve MDS’de görülür. Tipik olarak N- ve K- RAS genlerinin 12, 13 ya da 61. kodonlarında olur. Bu mutasyonların sıklığı farklı çalışmalarda değişmekle beraber %25-44 arasındadır. Yapılan çalışmalarda aktive edici mutasyon varlığının kötü prognozla birlikte olduğu gösterilmiştir.

2. Reseptör tirozin kinazı aktive edici mutasyonlar

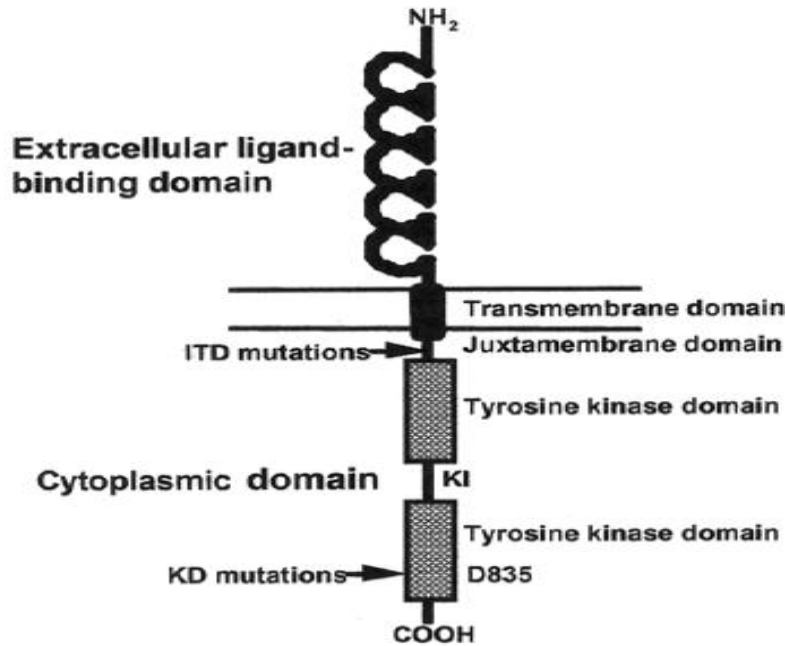
1-Fms benzeri tirozin kinaz 3 (FLT3)

FLT3, tip3 tirozin kinaz ailesinin bir üyesidir, hematopoezde kök hücrelerin gelişiminde, farklılaşmasında önemli role sahiptir [8, 26-28]. FLT3, kromozom 13q12 bölgesinde 24 ekzonlu bir gendir [29]. Ürünü 993 aminoasitlik bir protein olan FLT3 hemapoetik kök hücrelerde ve lösemide eksprese edilmektedir [30, 31]. Bu reseptörün sürekli aktivasyonu ile oluşan mutasyonlar AML ve ALL’ye neden olur. FLT3 genindeki mutasyonlar AML’li hastaların yaklaşık olarak %40’ında bulunur, en sık AML

t(6;9)(p23;q34), akut promyelositik lösemi ve normal karyotipli AML vakalarında görülür [30]. İki primer tip FLT3 mutasyonu vardır. FLT3/ITD olguların yaklaşık %75-80'inde genin internal tandem duplikasyonunda, %20-35'unda ise genin D835. ya da D836.pozisyon (aktif edici loop) tirozin kinaz domain bölgesinde oluşan nokta mutasyondur. FLT3 anomalisi olan hastalar daha yüksek nüks ve sağ kalım oranına sahiptir [4, 8, 30, 31].

Son zamanlarda, AML hastalarında en sık rastlanan mutasyonlardan olan FLT3 aktivasyonuna yol açan gen mutasyonları (% 30-35) hem patogenezdaki rolü ve tedavi yöntemlerinde kullanılabilirlik açısından hem de hastalığın klinik seyrinde, tedavi sonrası MRH takibi açısından bir çok merkezde araştırılmaktadır. FLT3/ITD mutasyonu, PCR testleri ile tespit edilmektedir [8]. FLT3'ün malign kök hücre patogenezindeki rolü henüz tam olarak bilinmese de FLT3 inhibisyonunun lösemik kök hücrelerin, hücrel ölümüne hassasiyetini artırdığı düşünülmektedir.

Olgularda, FLT3/ITD mutasyonunun değerlendirilmesi normal karyotipli AML vakalarında NPM1 mutasyonu ile ilişkilendirilmesi prognoz açısından önemlidir. Normal karyotipli AML vakalarında, %30 oranında FLT3/ITD mutasyonu vardır [4, 8].



Şekil 3. FLT3 reseptör yapısı

FLT3 ligandı (FL) ile dimerizasyonu sonucunda FLT3 reseptörü aktive olduğu pluripotent kök hücrelerinin, erken öncü hücrelerin ve immatür lenfositlerin proliferasyonunu kontrol eden sinyalleşmeleri başlatır.

2- c-KİT

Tip 3 tirozin kinaz ailesinin bir üyesidir, 145 kD'luk transmembran glikoproteinini kodlar. En sık ekzon 8 ve 17'de mutasyon bildirilmiştir. AML olgularının yaklaşık %5'inde c-KİT geninin D816 pozisyonu mutasyonları bildirilmektedir. Bu mutasyon da genin aktive edici loop bölgesinde olup genin kinaz aktivitesini arttırmaktadır. AML vakalarında t(8;21) (q22;q22), inv(16) (p13.1q22), t(16;16) (p13.1;q22) vakalarında kötü prognozla ilişkilidir.

3- WT-1, MLL

WT-1 (Wilms' tümör 1), normal karyotipli AML vakalarında kötü prognostik etkiye sahiptir, yaklaşık %10 vakada tespit edilmiştir [31]. Daha genç hastalarda, yüksek beyaz küre sayısı ve blast sayısı ile ilişkilidir [31].

MLL, normal karyotipli AML vakalarında %5-10 oranında görülür, kötü prognostik etkiye sahiptir. Özellikle otolog kök hücre nakli olgularının ilk remisyonunda kötü prognostik belirteçdir.

4- CEBP α (CEBPA) mutasyonu

CEBP alfa geni (CEBPA), CCAAT/enhancer binding protein α , normal miyeloid öncü hücrelerin diferansiasyonu ve proliferasyonunu kontrol eden transkripsiyon faktörünü kodlar [8]. AML vakalarında bialelik mutasyon olarak görülür. N-terminal ve C-terminal bölgelerinde mutasyon görülür [8]. CEBPA yeni AML vakalarının %5-9'unda özellikle FAB M1 ve M2 morfolojik alt tiplerinde görülür [8]. Normal karyotipli AML vakalarının yaklaşık %15'inde görülür. CEBPA mutasyonu, normal karyotipli AML vakalarında FLT3/ITD mutasyonu olmadığında iyi prognostik özelliktedir. Bu mutasyon vakaların düşük relaps oranı ve daha uzun genel sağkalım ile ilişkilidir [8, 31].

Moleküler hedef tedavi seçenekleri kişiye özeldir ve mutasyonların tespiti ile hangi vakalarda bu tedavi seçeneklerinin kullanılacağını belirlemek önemlidir [8].

2.6. NÜKLEOFOSMİN (NPM-1) GENİ VE PROTEİNİ

Nükleofosmin (NPM), B23, NO38 ve numatrin olarak da bilinen, nükleolar bir fosfoproteindir ve nükleolusun granüler bölgesinde yüksek oranda ifade edilir. Nükleer şaperonların nükleoplazmin/nükleofosmin ailesine dahil olan protein yüksek oranda korunmuştur. Nükleofosmin fonksiyonları ve interaksiyonları üzerine yapılmış olan çok sayıda çalışma proteinin proliferatif ve büyüme baskılayıcı rolüne işaret etmektedir.

Kolon tümörleri, karaciğer tümörleri, mide tümörleri, over tümörleri ve prostat tümörlerini de kapsayan çok sayıda solid tümörde NPM'nin yüksek ekspresyonu söz konusudur. Ayrıca NPM-1 hematopoetik tümörlerde genetik değişimlere en sık maruz kalan genlerden biridir. Çeşitli hematolojik malignitelerde NPM-1 lokusunun kaybı veya NPM'de fonksiyon kaybına neden olan translokasyonların varlığı bildirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda NPM1 geninin 12. ekzonunda meydana gelen 55 farklı tip mutasyon tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar 956. - 971. pozisyonlar arasında meydana gelir. En sık rastlanan NPM-1 mutasyonu 956-959. pozisyonda bulunan TCTG tetranukleotidin duplikasyonudur. Vakaların yaklaşık %75-80'inde görülür ve mutasyon A olarak adlandırılır. Mutasyon B ve D olarak adlandırılan mutasyonlar %10 ve %5 oranında görülürken diğer mutasyon tiplerine çok nadir rastlanır [8].

Kromozomal translokasyonlar onkogenik füzyon proteinlerinin oluşumu ile sonuçlanır. t(2;5) translokasyonu sonucu anaplastik büyük hücreli lenfoma (ALCL) da görülen NPM-anaplastik lenfoma kinaz (ALK) ürünü, t(15;17) translokasyonu sonucu akut promiyelositik lösemi (APL) de görülen NPM-RAR α , t(3;5) translokasyonu sonucu AML'de ve myelodisplastik sendrom (MDS) da görülen NPM-MFL1 ürünü oluşur. Ayrıca de novo MDS hastalarında ve bazı solid tümörlerde NPM1'in lokalize olduğu kromozom bölgesinin delesyonu söz konusuysa, tedaviye bağlı MDS (sitotoksik kemoterapi ve/veya radyoterapi sonrasında tedaviye bağlı olarak gelişen MDS tipi) hastalarında kromozom 5'in kaybı görülür.

AML hastalarında (sitotoksik kemoterapi ve/veya radyoterapi sonrasında tedaviye bağlı olarak gelişen MDS tipi) hastalarında kromozom 5'in kaybı görülür. NPM-1 geninin 12. ekzonunda meydana gelen AML spesifik mutasyonlar lösemik blastlarda NPM'nin anormal nükleer ve sitoplazmik yerleşimi (NPMc+) ile sonuçlanır. Tüm yetişkin AML vakalarının yaklaşık %27-35'inde NPM-1 gen mutasyonlarına rastlanırken, söz konusu

mutasyonları taşıyan AML vakalarının %45-64'ü normal karyotipe sahiptir [32]. NPM-1 mutasyonu olan AML vakalarının %5-15 'inde kromozomal aberrasyonlar (+8, del(9q) gibi) görülür [32]. NPM-1 mutasyonu olan AML vakalarının %40'ında FLT3-ITD mutasyonu da vardır.

2.6.1. Nükleofosmin Gen ve Proteininin Yapısı

İnsanda kanser gelişimi ile direkt olarak ilişkilendirilen NPM proteini, NPM-1 geni tarafından kodlanır. 12 ekzon içerir ve insanlarda 5q35 bölgesinde lokalize olur. NPM proteini 2 alternatif izoforma sahiptir. Birincisi tüm dokularda en sık rastlanan izoform olan, B23.1, 294 aminoasit içerir. B23.1 temel olarak nükleolusda lokalize olurken, proteinin çok az bir kısmı sentrozomlarda bulunur. Yalnızca B23.1 de bulunan C-terminal bölgesi nükleolar lokalizasyon için esastır.

İkincisi, B23.2 kesimlenmiş bir proteindir ve B23.1 izoformunun C terminalinde bulunan son 35 aminoasiti içermez. Çok düşük seviyelerde ifade edilir.

Nükleofosmin, multifonksiyonel bir proteindir ve çoklu biyokimyasal fonksiyonlarının gerektirdiği şekilde özelleşmiş bölgelere sahiptir. Proteinin korunmuş olan N-terminal kısmı, molekülün oligomerizasyon ve şaperon aktivitesini düzenleyen hidrofobik bir bölgeye sahiptir [33].

Proteinin C terminal kısmı nükleik asit bağlanma aktivitesinden sorumludur. C terminalinde bulunan nükleik asit bağlanma segmentinin her iki ucunda yer alan aromatik ve bazik bölgeler söz konusu aktivite için önemlidir. Ayrıca proteinin C terminal kısmı, kısa bir bölge içerir. Bu bölge 288. ve 290. pozisyonda iki adet triptofan bulundurur. Bu bölge, proteinin büyük çoğunluğunun, nükleolusda lokalize olması açısından önemlidir ve bu nedenle nükleolar lokalizasyon sinyali (NoLS) olarak adlandırılır. B23.1 çift taraflı nükleer lokalizasyon sinyali ve lösin zengini nükleer eksport sinyal NES motifleri ve çeşitli fosforilasyon kısımları içerir.

NPM'nin nükleolusa ve diğer çekirdek içi kompartmanlara bağlanmasını düzenleyen fosforilasyon kısımları mevcuttur. Fosforilasyon, NPM'nin nükleolus ve nükleus-sitoplazma arasında taşınmasını (ribozom biyogeneze katılan nükleolar komponentlerin ortak özelliği) indüklerken, gerekli olan bazı durumlarda, diğer nükleolar komponentlere karşı olan ilgisini indirger.

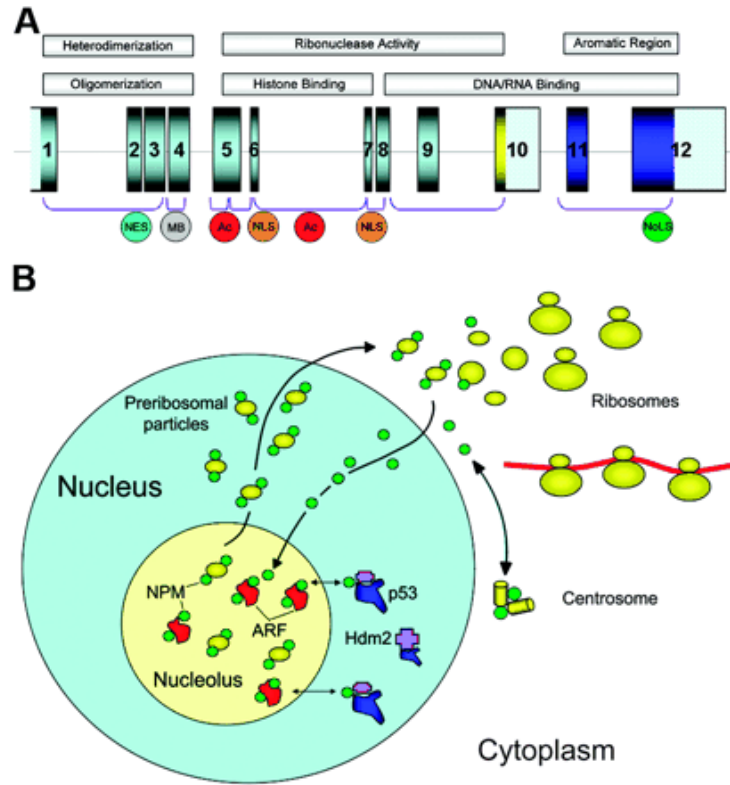
NPM nükleositoloplazmik mekik dokuyan esas olarak nükleusta lokalize multipl fonksiyonlara sahip proteindir;

*p53 ile etkileşerek hücre apoptoz ve proliferasyonunu düzenler.

*DNA onarımını ve mitoz sırasında sentrozom dublikasyonunun kontrolünü stabilize eder.

*ribozom biyogenezinde anahtar role sahiptir [31, 34].

NPM-1 mutasyonu diğer rekürren sitogenetik anomalilerle, sekonder kromozomal anomaliler örneğin; +8, +4, del(9q) ile ve ek genetik mutasyonlarla bunlardan da en sık FLT3 ve IDH1 ile ilişkilidir [35].



Şekil 4. NPM-1 normal lokalizasyonun gösterilmesi ve yapısı [36, 37]

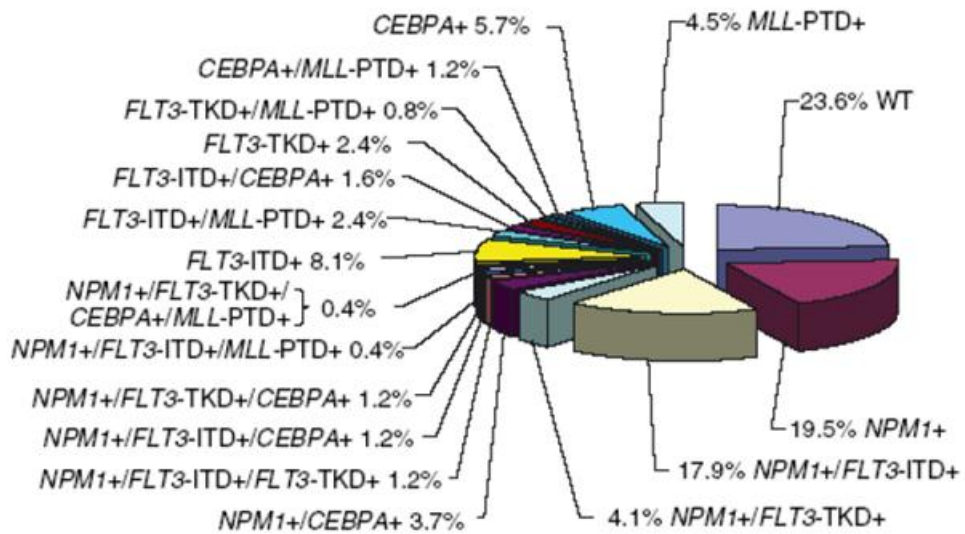
2.6.2. AML ve NPM-1 Mutasyonu

NPM-1 mutasyonu olan AML vakaları genellikle MDS ya da MPN geçmişine sahip değildir. Hastalarda anemi ve trombositopeni bulguları bulunur. Diğer AML tiplerine

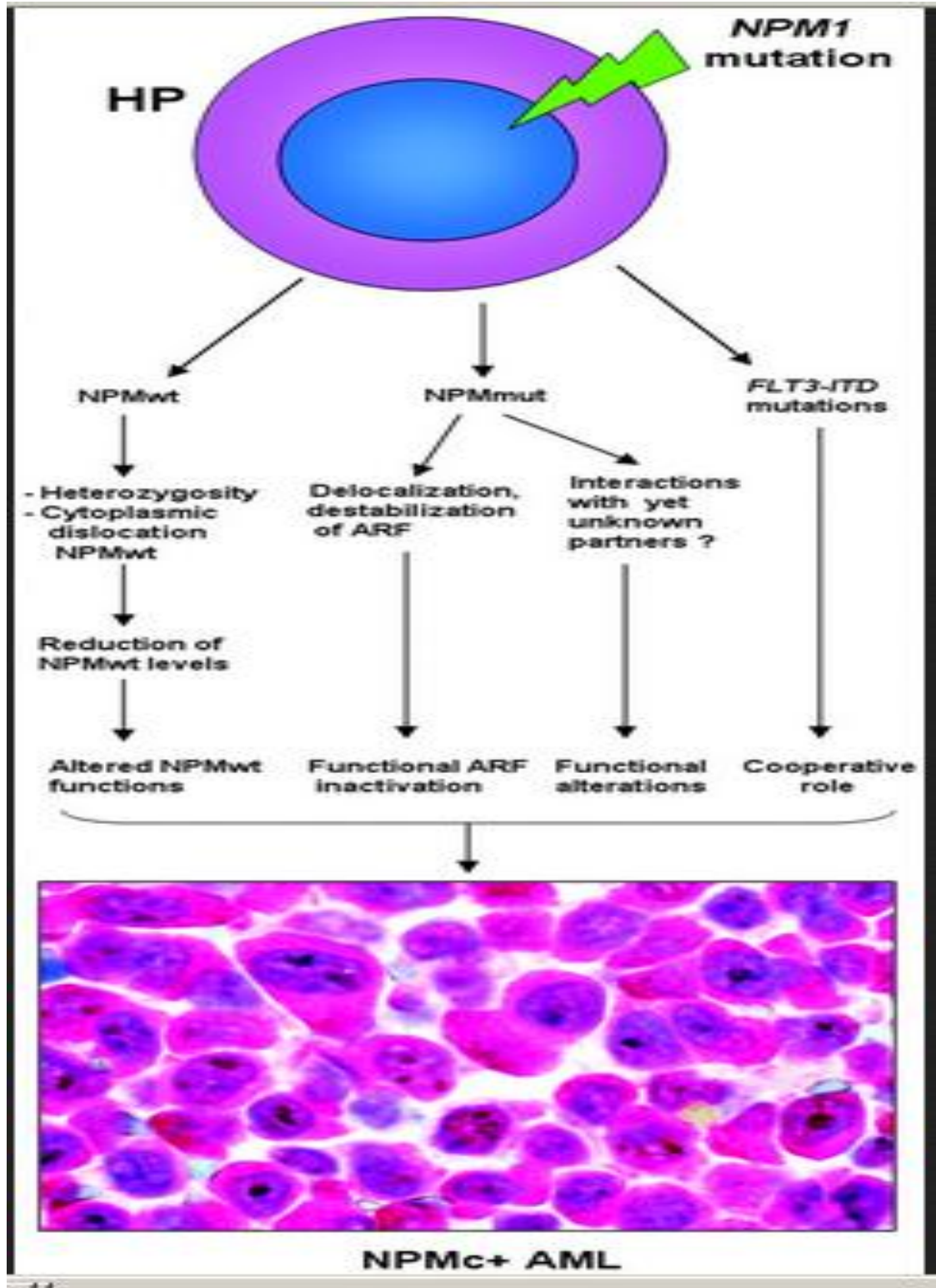
göre daha yüksek beyaz küre ve trombosit sayısına sahiptirler. Hastalarda gingiva, lenf nodu ya da deri tutulumları sıktır [32].

AML vakalarının özellikle myelomonositik ve monositik alt tipleri ile NPM-1 mutasyonu arasında ilişki bulunmaktadır. Akut monositik lösemi vakalarının %80-90'ında NPM-1 mutasyonu bulunmaktadır [32]. Bu vakalar genellikle normal karyotipte ve blast popülasyonu CD34 negatiftir. NPM-1 geninin 12. ekzonunda meydana gelen AML spesifik mutasyonlar, lösemik blastlarda NPM'nin anormal NPMc+ yerleşimi ile sonuçlanır. Tüm yetişkin AML vakalarının yaklaşık %27-35'inde NPM-1 gen mutasyonlarına rastlanırken, söz konusu mutasyonları taşıyan AML vakalarının %45-64 'ünde normal karyotipe sahiptir [32, 34]. NPM-1 mutasyonu olan AML vakalarının %5-15 'inde kromozomal aberrasyonlar (+8, del(9q) gibi) görülür [32]. %40 NPM-1 mutasyonu olan AML vakasında FLT3-ITD mutasyonu da vardır.

Sitoplazmik NPM-1 mutasyonu HOX genleri aracılığıyla MLL rearanjmanına sahip diğer AML tiplerinden farklı bir gen ekspresyon profiline sahiptir [32]. NPM-1 mutasyonlu AML vakaları, indüksiyon tedavisine iyi cevap verir. NPM-1 mutasyonlu, normal karyotipli AML vakalarında FLT3-ITD mutasyonu yoksa iyi prognostik belirteçdir [1, 32].



Şekil 5. AML gen mutasyonlarının yüzdeleri [32]



Şekil 6. AML NPMc+'lığının oluşum mekanizması [37]

2.6.3. NPM-1 Mutasyonlarının Klinik Önemi

NPM-1 mutasyonu taşıyan AML hastaları ile NPM-1 mutasyonunu taşımayan AML hastalarından klinik özellikler, tedaviye yanıt verme ve prognoz açısından farklıdırlar. Sonuç olarak NPM-1 ile yapılan çalışmalar tanısal sınıflandırma, MRH saptanması, prognoz ve tedavi açısından önemlidir.

MRH takibi AML hastalarında güçlü bir prognostik öneme sahiptir, çünkü pozitif çıkan MRH durumu, artan relaps riskiyle ilişkilendirilir. Ayrıca AML hastalarında allojenik kök hücre transplantasyonundan (KHT) sonra takip sırasında MRH'nin izlenmesi tedaviye verilen yanıtın saptanması ve terapötik kararlar için oldukça önemlidir. Bu nedenle MRH takibi için güvenilir belirteçlere ihtiyaç duyulur. NPM-1 mutasyonlarının stabilite ve yüksek görülme sıklıklarından dolayı MRH'lerin takibinde belirteç olarak kullanılabilecekleri düşünülmektedir.

2.7. APOPTOZİS

2.7.1. Tanım

Yaşam, ölümle iç içe olan diyalektik bir süreçtir. Programlanmış hücre ölümü olarak da adlandırılan apoptozis bu duruma iyi bir örnektir. Eski Yunanca'da "yaprak dökümü" anlamına gelen apoptozis, ilk olarak İskoçyalı araştırmacılar Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında "canlılarda hücre azalmasının özgün bir tipi" olarak tanımlanmıştır [38]. Apoptozis, biyolojik ömrünü tamamlamış veya genetik yapısı bozulmuş hücrelerin komşu hücrelere zarar vermeden yok edilmesinde kullanılan, sıkı bir şekilde genetik ve biyokimyasal olarak kontrol edilen programlı bir ölüm şeklidir. Aynı zamanda embriyonik dönemde de bazı dokuların diferansiyasyonunda bazı dokuların ise involüsyona gitmesinde önemli rol oynar. Apoptotik sinyali alan hücrede genetik olarak kodlanmış olan apoptotik program çalışmaya başlar ve bir seri kontrollü biyokimyasal reaksiyonlarla hücre ölümü gerçekleşir. Apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik durumlarda ortaya çıkar.

2.7.2. Patolojik Koşullarda Apoptozis

Dokularda apoptozis ile mitoz arasındaki dengenin bozulması doku homeostazisini bozarak pek çok patolojiye neden olur. Apoptozisin artması birçok dejeneratif hastalığa

eşlik ederken, bazı enfeksiyonlarda, otoimmün hastalıklarda ve malignitelerde apoptozis defekti vardır. Zamanı geldiğinde ölmesi gerektiği halde apoptotik kontrol mekanizmalarındaki bozukluklar nedeniyle ölmeyen hücreler, genomlarında biriktirdikleri mutasyonlarla malign transformasyona aday hücrelerdir. Apoptozisin azalması malign hastalıkların gelişiminde olduğu kadar tedavi direncinde de önemlidir [39, 40].

AML 'de kromozomlardaki translokasyon (8;22), translokasyon (15;17), inversiyon 16 gibi yapısal bozuklukların sonucunda oluşan AML1/ETO, PML/RAR α gibi füzyon genler apoptozisi inhibe eder [33].

2.7.3. Apoptozisin Moleküler Mekanizmaları

Apoptotik sinyaller kaynaklandığı yere ve yapısına göre hücre içinde farklı yolları aktive ederler. Apoptotik süreçte 3 majör yolak vardır.

1- TNF (Tümör Nekroz Faktör) (grubu reseptörlerle olan hücre dışı aktivasyon)

2- Perforin-Granzim sistemi.

3- Mitokondri aracılı hücre içi yolak.

2.7.4. Apoptozis İnhibe Edici Protein Ailesi (İAP)

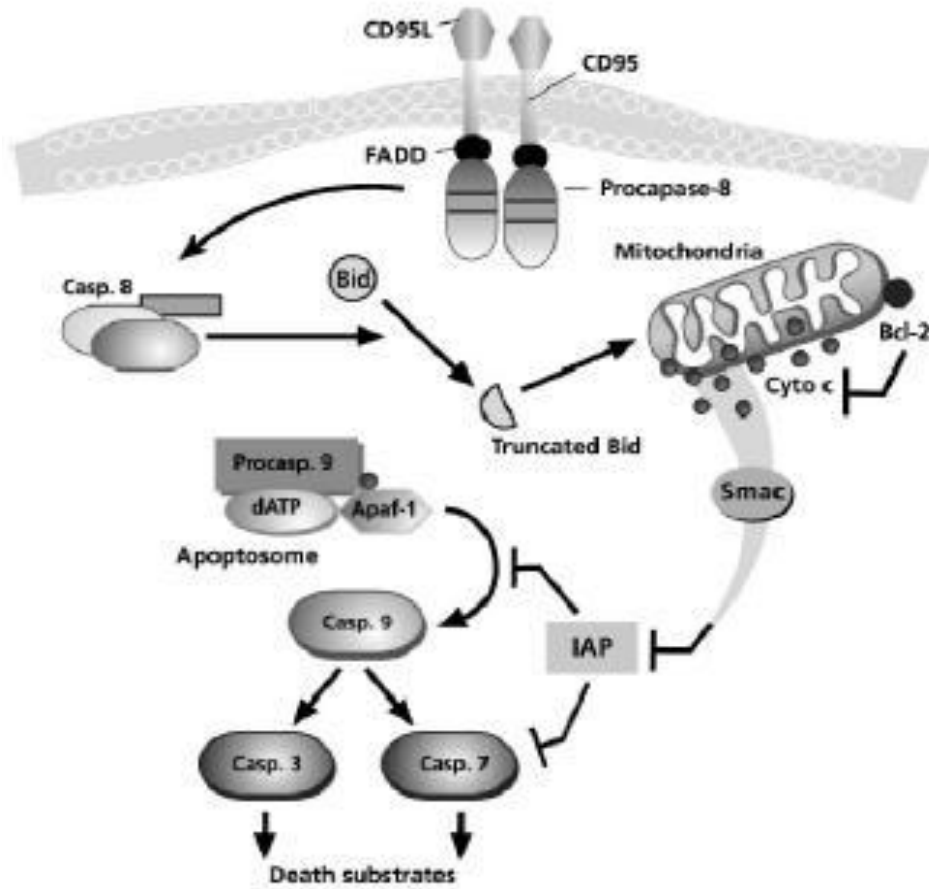
Mitokondriler apoptotik uyarı yollarının kesiştiği kavşak noktasıdır. Hücre içi pH değişiklikleri, DNA hasarları, hücre siklus bozuklukları mitokondriden apoptotik uyarıların çıkmasını sağlar. Sonuç olarak mitokondriyal geçirgenlik artar ve sitokrom c (sit-c) sitozole geçer. Sitokrom c salınımı birçok mekanizma tarafından kontrol edilir. Bcl-2 protein ailesi, p53, İAP gibi apoptozisi inhibe eden proteinler en güncel olanlardır.

Bcl-2 ve İAP apoptozisin regülasyonunda sorumlu başlıca iki gen ailesidir. İAP'ler ilk olarak Baculovirüs genomunda gösterilmiştir. Virüsle enfekte hücrenin konakçı immün sistemi tarafından indüklenen apoptozisini inhibe ederek virüsü korur.

Bugüne kadar 8 farklı İAP üyesi tanımlanmıştır. NAIP, XIAP, c-İAP1, c-İAP2, Ts-XIAP, ML-İAP, Apollon ve survivin. Bu proteinlerin ortak moleküler yapıları vardır.

Amino-terminallerinde 70 aminoasitten oluşan Baculovirus IAP repeat (BIR) adı verilen dizilerden 1 ile 3 adet bulunur. BIR domainleri anti-apoptotik etki için gereklidir [41]. Bazılarının karboksi terminallerinde çinko bağlayabilen RING domainleri vardır.

Anti-apoptotik etki mekanizmaları değişkendir. Major mekanizma ekstrinsik (ölüm reseptörleri) ve intrinsik (mitokondriyal) apoptotik yolların ortak yolu olan efektör kaspazların (Kaspaz 3-7) inhibisyonudur.



Şekil 7. Apoptotik mekanizmalar ile apoptozis inhibe edici proteinler arasındaki ilişkiler yukarıda şematize edilmiştir.

2.8. SURVİVİN

Survivin fonksiyonel ve ultrastrüktürel olarak diğer IAP üyelerinden farklıdır. Diğerlerine göre daha küçüktür. 142 amino asitten oluşur ve 16.5 kDA ağırlığındadır [42]. Amino terminalinde yalnızca bir BIR domaini vardır ve farklı olarak karboksi

terminalinde çinko bağlayabilen RING domaini yoktur. Onkogenez ile ilişkisi gösterilmiş olan tek IAP'dir. Survivin gen lokusu 17. kromozomda 17q25'de lokalizedir, 4 eksondan ve 3 introndan oluşur [42]. Son dönemde birbirinden farklı fonksiyonları olan 2 farklı varyantı tanımlanmıştır. Survivin-ΔEx-3 ve Survivin-2B olarak adlandırılan bu varyantlardan survivin-2B'nin anti-apoptotik etkisi yoktur [43-45] [44].

Survivin onko-fetal proteinlerdendir. Embriyonik yaşamda ve birçok tümörde yüksek düzeyde eksprese olmasına rağmen maturasyonunu tamamlamış dokularda eksprese olmaz [42].

Ancak son zamanlarda timus, CD34 (+) hemopoetik kök hücrelerde, endotelial hücrelerde, kolonik mukozada, uterin serviksin epitelyal hücrelerinde Survivin ekspresyonu olduğu gösterilmiştir.

Survivin bifonksiyonel bir proteindir. Anti-apoptotik etkilerine ek olarak hem normal hücrelerde hem de malign hücrelerde mitozu regüle eder [9].

Bu proteinin immunohistokimyasal olarak yüksek oranda tespiti; tümör progresyonu, rekürrens, tedaviye direnç, kısa sağkalım oranı ve kötü prognozla ilişkilidir [42, 46]. Normal dokularda survivin ekspresyonu bulunmaz. AML ve MDS vakalarında survivin IHK'sal boyanma yoğunluğu heterojendir. Blastlarda para-perinükleer alanda ya da sitoplazmada diffüz boyanma paternine sahiptir. Survivin ekspresyonun yüksek olması lösemik kök hücrelerle ve relaps oranı ile ilişkilidir.

MDS vakalarında apoptozun kemik iliğindeki inefektif hematopoezden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda düşük riskli MDS tiplerinde, yüksek riskli MDS tiplerine ve AML 'ye göre daha fazla apoptozun görüldüğü saptanmıştır. Survivin bu özellikleri ile hedef tedavi için önemli bir potansiyele sahiptir [47].

2.8.1. Survivin ve Hücre Bölünmesi

Survivin hücre siklusunun G1 fazında eksprese olmaz. Ancak G2/M fazında ekspresyonu yaklaşık 10 kat artar [42, 48]. Survivin hücre bölünmesi için kritik öneme sahiptir. Mitoz esnasında ağ iplikçiklerine tutunur. Genetik olarak survivini defektli hücrelerde anormal sayıda sentrozomlar, multipolar mitotik ağ iplikçikleri, sitokineziste

yetersizlik ve multinükleer dev hücre formasyonları görülür. Survivin asıl etkin olduğu dönem metafazdır. Bu dönemde temel olarak mitotik mikrotübüllerde ve sentrozomlarda lokalizedir. Ancak, anafazda ağ iplikçiklerinde, mitozun geç evrelerinde mitotik midbody'lerde de bulunur.

Anti-Survivin antikorlarının mikroenjeksiyonu, ağ iplikçiği formasyonunda kritik defektlere, kardeş kromatinlerin erken ayrışmasına yani anormal metafaz progresyonuna yol açar. Sentrozomlar ve mitotik midbody'lerdeki survivine yönelik antikor mikroenjeksiyonları metafaz arresti ve sıklıkla apoptozisle sonlanır [49].

2.8.2. Apoptozis İnhibe Edici Protein Ailesi (İAP) ve Kanser

Kanser hücrelerinin karakteristik özelliklerinden birisi apoptozise dirençli olmalarıdır. Ayrıca apoptotik yolaklardaki kritik defektler tedavi direncinden de sorumlu tutulmaktadır. Çünkü belli başlı tedavi yöntemleri olan kemoterapi ve radyoterapide direk sitotoksite dışında malign hücre klonlarında apoptozisin indüklemesi de kritik öneme sahiptir.

İAP'lerin keşfinden sonra birçok çalışmada bu protein ailesi ile kanser arasındaki ilişkiler ayrıntılı olarak araştırılmıştır [50].

2.9. CD123 ve AML

İnterlökin3 (IL3) regulatuar glikoproteindir. Sağkalım, proliferasyon ve öncü hücrelerden değişik hemapoetik seri gelişimini destekler. Normal hematopoezde IL3 sadece hemapoetik öncü hücrelerin proliferasyonunu uyarmakta değil aynı zamanda apoptozu baskılayarak hücre yaşamının devamlılığını sağlar. Bu sitokinlerin ürettiği regulatuar sinyaller, spesifik protein kinaz kaskad ve transkripsiyon faktörlerini hedef alır. IL3 tirozin fosforilasyonunu indükler. Bu da JAK proteininin aktivasyonu ile sonuçlanır. JAK aktivasyonu farklı STAT'ları aktive etme ve kuvvetlendirme etkisine sahiptir. Aktive STAT molekülleri nükleusa hareket eder transkripsiyon düzenleyici genleri aktive eder. Bu genlerin bazıları proliferasyonu uyaran STAT'ları indüklerken bazıları Jak/STAT sinyal transdüksiyon yolağını inhibe eder. IL3 proapoptotik proteinlerde fosforilasyon yaparak anti apoptotik yolağı indükler [51, 52].

IL3R alpha ve beta alt tiplerinden oluşmaktadır. Her iki alt grupta IL3 sitokinin sinyal üretimi için gereklidir [53]. CD123 (IL3R α), hemapoetin reseptör ailesinin ve Ig gen süperfamily üyesidir. Sinyal pass1a zincir glikopeptididir. Ekstraselüler bölgesinde 288 aminoasit, N terminal bölgesinde 100 aminoasit, 200 aminoasit fibronektin tip3 domain WSXWS motifi bulunur. Bunlar IL3 glikolizasyon alanı için gereklidir. 1.ünite Klas1 reseptör motifi ekstraselüler alandadır, sitoplazmik alanda intrinsik enzim aktivitesi yoktur.

IL3R, CD123(α) ve CD131(β) komponentlerinden oluşmaktadır. GM CSF ve IL-5 için reseptördür [54].

CD123 kemik iliğinde multipotent kök/öncü hücrelerde özellikle miyeloid seri hücrelerde nötrofil seri hariç eozinofil ve bazofillerde eksprese edilir. Monosit, granülosit, makrofaj, mast hücresi, megakoryosit öncüleri ve eritroid seride de eksprese edilir. Küçük bir grup B lenfositlerde eksprese edilirken , periferel T lenfositlerde ve naturel killer hücrelerde eksprese edilmez [54].

Akım sitometrik çalışmalar, AML vakalarında (CD123)'ün CD34+/CD38- vakalarda yüksek oranda eksprese edildiğini göstermiştir [52, 55]. Normal kemik iliğinde elde edilen CD34+/CD38- hücrelerde CD123 ekspresyonu tespit edilememiştir [52, 54, 56]. Bu bilgiler ışığı altında özellikle AML vakalarında CD123 belirtecinin primitif lösemik kök hücreleri belirlemede destek olduğu belirlenmiştir [54, 57, 58]. Bu bilgi hastalarda lösemik öncü hücrelerde CD123 'ü hedef alan tedavi belirlemede ileriye yönelik araştırmaları desteklemektedir [54]. Yapılan son çalışmalarda CD34+/CD38- CD123+ vakalarda hastalıksız sağkalım ve genel survival oranının düştüğü bildirilmiştir [56].

2.10. CD 25 ve AML

İnterlökin2 (IL-2) reseptörü üç alt üiteden (α , β , γ) oluşmaktadır. IL2, reseptörüne bağlanarak T hücrelerinde proliferasyon ve diferansiasyonu indükler [59]. CD25, IL-2 reseptörünün α zinciridir. Aktive T ve B hücrelerinin, bazı timositlerin, miyeloid öncülerin, oligodendrositlerin tip transmembran proteinidir [60, 61].

CD4+/CD25+ T regulatuar hücreler immün cevapta önemli role sahiptir. AML ve yüksek dereceli MDS hastalarında T regulatuar hücre popülasyonu kontrol grubuna ve otoimmün hastalık grubu ile karşılaştırıldığında fazla bulunmuştur [60-63]. Periferik kanda ve kemik iliğinde T regulatuar hücreler CD25 ile tespit edilir, ancak CD25 sadece T regulatuar hücrelerde değil efektör T hücrelerinde de pozitifdir. Periferik kanda, kemik iliğinde klonal hematolojik hastalıklarda T regulatuar hücreler artmıştır [60, 61].

2.11. PROGNOZ

AML komplike heterojen bir hastalıktır, prognostik faktörler tedavi yaklaşımında önemlidir. Sitogenetik testlerin sağladığı prognostik veriler kritik role sahiptir [6]. Sitogenetik alt gruplar mutasyon durumuna ve gen ekspresyon analizlerine göre yapılmaktadır. Sitogenetik, yaş ve performans durumu prognozu ve tedaviye yanıtı belirlemede önemlidir [64]. AML patofizyolojisinde en az iki genetik durum vardır, biri diferansiasyona zarar verme, diğeri ise proliferasyonun artmasıdır.

Hastalarda yaş ve tanı anındaki sitogenetik durum esas iki prognostik faktördür [4, 7, 64]. Diğer önemli veriler hastanın performans durumu, tedavi ilişkili AML vakası olup olmadığı, ilk tedaviye komplet remisyon oranı, tanı anındaki beyaz küre sayısı ve LDH seviyeleridir [64].

Yaşlılık kötü prognostik etkiye sahiptir. 60 yaş üstü vakalar daha düşük komplet remisyon oranına ve daha yüksek ölüm oranına sahiptir. Bu hasta grubunda genel sağkalım ve hastalıksız sağkalım süresi daha kısadır [64].

Auer rodları içeren M1-M4 ve M2-M4Eo olumlu morfolojik özellik içerirken, eritrolösemi, akut megakaryositik lösemi, MDS'den gelişen AML olumsuz özellikler içerir [21].

Mikroarray teknolojileri ile prognoz ilişkili gen ekspresyon sinyalleri belirlenebilir. Benzer şekilde microRNA ekspresyonu, tek nükleotid polimorfizm array, DNA metilasyon işaretlerinin tespiti AML vakalarında yeni prognostik alt gruplar oluşturulmaktadır ve AML hastalığının biyolojisini anlamaya yardımcıdır [6, 31, 35]. Klinik ve genetik prognostik belirteçler AML hastalarının değerlendirilmesinde merkezi ve kritik bir role sahiptir.

AML’de pek çok karyotip anomalisi vardır, buda AML’nin heterojen bir hastalık grubu olmasını desteklemektedir. AML vakalarında değişen sıklık oranlarında mutasyonlar görülmektedir. En sık mutasyonlar NPM-1 ve FLT3-ITD’dur [6]. Bazı hastalarda farklı mutasyonlar birlikte olabilir, örneğin bir hastada NPM-1 ve FLT3-ITD mutasyonu ya da NPM1 ve NRAS mutasyonu birlikte olabilir [64].

Sitogenetik olarak normal olan vakalar, heterojen olan orta sitogenetik risk grubunda sınıflandırılmaktadır [6, 65]. Normal sitogenetiğe sahip AML vakaları geniş bir gruptur ve heterojen sağ kalım oranlarına sahiptir [31]. Normal karyotipli vakalarda 5 yıllık genel sağkalım oranı %45’dir [64]. NPM-1 mutasyonu CN-AML vakalarının %50-60’lık kısmında görülmektedir. Özellikle M4 blast hücre morfolojisi, kadınlarda üstünlük, blast popülasyonunda CD34 negatifliği ile ilişkilidir [31]. Normal karyotipli AML vakalarında NPM-1 ile eş zamanlı FLT3/ITD mutasyon varlığı prognozda önemlidir [32]. NPM-1 mutasyonu olan vaka ancak FLT3/ITD mutasyonu olmadığında iyi prognostik değere ve indüksiyon tedavisine iyi cevaba sahiptir [32]. NPM-1 mutasyonlu vakalarda FLT3/ITD mutasyonu da olduğunda indüksiyon tedavisine kötü cevaba ve kötü prognoza sahiptir [32]. Pek çok araştırmacı 60 yaş altı, normal sitogenetiğe sahip AML vakalarında NPM-1 ve FLT3 mutasyonunun çalışılması gerektiğini savunmaktadır [64].

FLT-3 gen mutasyonuna sahip AML vakaları, daha yüksek periferik blast oranına ve normal sitogenetiğe sahiptir, t(15;17) ve AML M5 alt tipinde olma oranı yüksektir [6, 32].

Normal karyotipli AML vakalarında, CEBPA mutasyon varlığı iyi prognozla ilişkilidir ve bu durum inv(16) (p13.1q22), t(8;21)(q22;q22) ile benzer özellik göstermektedir [32].

AML inv(16)(p13.q22) ve t(8;21)(q22;q22)’nu genel olarak ‘core-binding factor (CBL)’ lösemi olarak isimlendirilir, çok iyi prognoza sahiptir, uzun dönem sağ kalım oranı yaklaşık %60’dır [31].

KIT mutasyonu inv(16) ile ilişkili olduğunda yüksek oranda relaps oranına ve belirgin olarak kısa sağkalım oranına sahiptir [31].

Prognozda yüzey belirteçlerinin etkisi değişkendir ve diğer faktörler ile birbirlerine bağlıdır. Antijen ekspresyonu relapsda sıklıkla değişir. Sitogenetik alt gruplar prognozu diğer herhangi bir faktörden daha iyi tanımlarlar. t(8;21), inv(16), t(15;17) varlığı iyi prognoz ile ilişkilidir [32]. Kötü prognostik gruplar, kromozom 5, 7, 3q26 ve kompleks karyotip anomaliler ile MDS ve kemoterapi öyküsü olan hastaları içerir [32].

Tablo 10. AML’de sitogenetik ve genetik lezyonlara bağlı prognostik alt gruplar görülmektedir [6, 31].

RİSK DURUMU	SİTOGENETİK	MOLEKÜLER ANORMALLİKLER
İyi	*t(8;21)(q22;q22) *inv(16)(p13.q22) *t(16;16)(p13.q22) *t(15;17)	*Normal sitogenetik, NPM1 ya da CEBPA mutasyonu ve FLT3/ITD
Orta	*Normal sitogenetik *+8 *t(3;5) ⁴ *t(9;11)(p22;q23) *Diğer tanımlanmayan	*NPM1 ya da CEBPA mutasyonu ve FLT3/ITD *c-KIT mutasyonlu: t(8;21)(q22;q22), veya inv(16)(p13.q22),t(16;16)(p13.q22)
Kötü	*Kompleks karyotip (>3) anormallik *MK+ *-5,5q *-7,7q- *Diğer 11q23 anormalliği t(9;11) hariç *inv(3)(q21q26.2),t(3;3)(q21q26.2) *t(6;9),t(9;22) *17p anormalliği	*Yüksek EVI1 ekspresyonu (3q26 sitogenetik lezyonlu veya lezyonsuz) *Normal sitogenetik FLT3/ITD mutasyonlu NPM-1mutasyonsuz

Tablo 11. Farklı çalışma gruplarına göre karyotip anomalilerinin prognostik risk sınıflaması [64]

Risk Category	MRC [3]	SWOG/ECOG [39]	CALGB [40] and [41]
Favorable “good risk”	t(8;21) inv(16)/t(16;16) t(15;17)	t(8;21) without del(9q) or complex karyotype inv(16) t(16;16)/del(16q) t(15;17)	t(8;21) inv(16/t(16;16) del(9q)
Intermediate	Normal karyotype del(7q) el (9q) Trisomy 8 abn(11q23) +21; +22 All other aberrations	Normal karyotype Trisomy 8 del (12p) Trisomy 6-Y	Normal karyotype –Y del(5q) del(7q) t(9;11) + 11, +13, +21 del(11q)
Unfavorable “poor risk”	Abn(3q) -5/del(5q) -7 $\geq$ 5 aberrations	Abn(3q) -5/del(5q) t(6;9) - 7/del(7q) t(9;22) abn(9q), abn(11q), abn (17p), abn(20q), abn(21q)	Inv(3)/t(3;3),t(6;9) t(6;11) -7 + 8 or one additional aberration t(11;19) $\geq$ 3 aberrations

Abbreviations. CALGB, Cancer and Leukemia Group b; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; MRC, Medical Research Council; SWOG, Southwest Oncology Group.

*MK; Monozomal karyotip, Otozomal monozomiye sahip

MK+ vakalarda uzun dönem sağ kalım $\leq$ %5’dir.

Orta gruptaki vakalar en geniş ve heterojen grubu oluşturmaktadır. Bu grup içerisinde kimin yüksek risk grubuna dahil olacağı ve allojenik kemik iliği için aday olacağının belirlenmesi önemlidir [31]. Değişik çalışma gruplarında uzun dönemli takiplerde bu değerlendirmeler yapılmıştır. Alman çalışma grubunun sonuçları isole t(9;11)11q23’te özellikle t(6;11) ile karşılaştırıldığında daha kötü prognoza sahiptir ve bu vakalarda allojenik kemik iliği transplantasyonundan fayda beklenmez [31].

MDS veya miyeloproliferatif sendrom gibi kemik iliği hastalıklarını daha önce geçiren hastalar veya kemoterapi hikayesi olanlar, de novo AML’lilere kıyasla daha az sağkalım oranına sahiptir [66].

Azalmış apoptozis ve artmış angiogenesis, AML’de leukemogenesis ve kötü prognoza yardımcı olabilir. Survivin bifonksiyonel bir proteindir, anti-apoptotik etkilerine ek

olarak hem normal hücrelerde hem de malign hücrelerde mitozu regüle eder [9]. Bu proteinin immunohistokimyasal olarak yüksek oranda tespiti; tümör progresyonu, rekürrens, tedaviye direnç, kısa sağkalım oranı ve kötü prognozla ilişkilidir [42, 46].

CD123, hemapoetin reseptör ailesinin bir üyesidir. Sağkalım, proliferasyon ve öncü hücrelerden değişik hemapoetik seri gelişimini destekler. Normal hematopoezde IL3 sadece hemapoetik öncü hücrelerin proliferasyonunu uyarmakta değil aynı zamanda apoptozu baskılayarak hücre yaşamının devamlılığını sağlamaktadır. IL3 pro-apoptotik proteinlerde fosforilizasyon yaparak anti apoptotik yolağı indükler [51, 52]. CD123 ekspresyonu DSÖ 2008 sınıflamasına göre orta risk grubunda değerlendirilen %40 AML vakasında tespit edilmiştir. CD123 ekspresyonunun AML 'de tanı anında yüksek blast oranı ile korele bulunmuştur. Bu durum kötü prognostik etki ile ilişkilidir [67]. CD123 pozitifliğinin NPM-1 ve FLT3/ITD mutasyonları ile korelasyonu bulunamamıştır [67].

CD25, IL-2 reseptörünün α zinciridir. Bir çalışmada 60 yaş altı, akım sitometrik olarak CD25 pozitif AML vakaları değerlendirilmiştir. CD25 oranı >%10'un üzerinde olduğu vakalar daha kısa sağ kalım oranı vardır. CD25 pozitifliği FLT3-ITD mutasyonu ile kombine olduğu durumlarda kısa sağkalım oranı ile ilişkilidir [59, 68].

2.12. TEDAVİ

AML, MDS ve Miyeloproliferatif hastalıklar DSÖ sınıflamasında pek çok rekürren sitogenetik anomaliler içermektedir, hastalığın seyrine karar vermek için bunların tespiti hızlı yapılmalıdır [13].

AML tedavisi 2 kısma ayrılabilir. İlk kısım remisyona sokma (remisyon indüksiyon), ikinci kısım ise remisyon sonrası tedavidir. AML tedavisindeki ilk amaç, hastayı tam remisyona sokmaktır. Tam remisyon; absolü nötrofil sayısının 1000/mm³, trombosit sayısının 100.000/mm³ üzerine çıkması, kemik iliğindeki blast sayısının %5 'in altına inmesi olarak tanımlanır. Hastalarda öncelikle anemi ve enfeksiyon tedavisi yapılmalı, lökostat, tümör lizis sendromu bulguları varsa bu sorunlar acil olarak tedavi edilmeli ve hasta remisyona sokma tedavisine hazır hale getirilmelidir.

Remisyon indüksiyon tedavisi (Rİ): Standart tedavi 7+3 denilen Ara-C 100- 200 mg/m²/gün devamlı i.v infüzyon 1-7 gün ve daunorubicin 45 mg/m² veya 60 mg/m² i.v 1-3 gün kemoterapi rejimi olup hastalarda %65-75 oranında tam remisyon sağlanır. Kemoterapi rejiminde daunorubicin yerine idarubicin, mitoxantron gibi diğer antrasiklinleri kullanmanın, rejime etoposide, fludarabin, topotecan veya multidrug rezistan inhibitörü eklemenin standart 7+3 rejimine üstünlüğü gösterilememiştir [69]. Remisyona sokma tedavisinin 10-15'ci gün yapılan kemik iliği aspirasyonunda blastlar mevcut ise remisyon sokma tedavisinin ikincisine aynı ilaçlarla başlamak birçok grup tarafından önerilmektedir. 10-15'ci gün yapılan kemik iliği aspirasyonunda hipoplazi mevcutsa 10-14 gün sonra kemik iliği aspirasyonu tekrarlanır ve bazen aspirasyonda rejenere olmakta olan kemik iliği bulgusu olarak %30-40 blast görülebilir, böyle bir durumda 1-2 hafta daha bekleyip kemik iliği aspirasyonu tekrarlanarak durum tekrar değerlendirilir.

Remisyon sonrası tedavi: Remisyona giren hastalarda remisyon sonrası tedaviler olarak, konsolidasyon kemoterapisi, otolog ya da allojenik kök hücre nakli tedavileri yapılabilir. Remisyon sonrası tedavi planı prognostik faktörlere bakılarak yapılır, en önemli prognostik faktör hastanın karyotipidir [65, 70].

İyi prognoz karyotipi olan (t(8;21) ve inv(16)) ve standart tedavi ile remisyon sokma hastalarda 4 siklus cytarabine 3g/m² her 12 saatte bir vermek standart doz veya orta doz cytarabine vermekten daha faydalıdır.

Yüksek doz cytarabine tedavisi; CBL, t(8;21) ve inversiyon 16 mevcut hastalarda, standart remisyon sonrası tedavidir, 3 veya 4 siklus cytarabine verilmelidir. CBL'lerde otolog periferik kan veya allogeneik kök hücre transplantasyonunun yararı yoktur [65]. Ancak CBL olup da FLT3 ya da CD56 pozitif hastalarda yüksek doz cytarabine tedavisi yetersiz kalmaktadır ve bu hastalarda allogeneik kök hücre nakli düşünülmelidir [65].

Orta riskli hastalarda, konsolidasyon kemoterapisini takiben otolog veya allogeneik kök hücre nakli önerilmektedir.

İyi risk grubunda değerlendirilen akut promyelositik lösemi t(15;17) hastalarının trans retinoic acid (ATRA) isimli özel tedavi ajanı bulunmaktadır [6]. t(8;21) ve inv(16) 'da

bu risk grubunda bulunmaktadır ve aynı ajanlarla (cytarabine, doxyrubicin gibi) tedavi edilmektedir [8] .

AML vakalarında genetik faktörlere bağlı tedavi algoritması tartışmalıdır. Orta risk grubunda, t(9;11), y kromozom kaybı bulunmaktadır [8]. AML vakalarının %40'ı normal sitogenetik yapıdadır, bunların risk sınıflandırması heterojen olduğundan zordur, orta risk grubunda değerlendirilmiştir [8].

NPM-1, FLT3/ITD ve CEBPA mutasyonları normal karyotipli AML vakalarında iyi tanımlanmış prognostik belirteçlerdir, hasta yönetiminde bu mutasyona sahip vakalar düşük doz kemoterapi ya da destek tedavisi almaktadır [65].

FLT/TKD, WT-1, NRAS, MLL için klinikopatolojik önemi net değildir ve şuan ki tedavilerde potansiyel hedef tedavisi bulunmamaktadır [65].

FLT3/ITD mutasyonuna göre vakaların tedavi seçenekleri tirozin kinaz inhibitörleri ve /veya allojenik kemik iliği transplantasyonudur [6].

FLT3/ITD mutasyon negatifliği olan vakalarda çalışmalarda,

*NPM1 mutasyonu olan vakalarda yüksek doz ARA-C ya da otolog kemik iliği transplantasyonu uygulanmaktadır.

*NPM-1 mutasyonu olmayan vakalarda MLL-PTD ve CEBPA mutasyon durumuna göre ayrılmaktadır [71].

FLT3/ITD mutasyonu olmayan, NPM-1 mutasyonu olan vakalarda konvansiyonel antrasiklin ve sitarabin indüksiyon tedavisi logistik regresyon analizinde komplet remisyon ile ilişkilidir [65]. Yapılan çalışmada FLT3/ITD mutasyonu olan, wild tip NPM-1 mutasyonlu ya da FLT3/ITD(-), CEBPA mutasyonlu vakaların ilk komplet remisyonunda allojenik kemik iliği transplantasyonundan fayda sağladığı görülmüştür [65]. FLT3/ITD(-) NPM-1 mutasyonlu vakalar konvansiyonel antrasiklin ve sitarabin tedavisi sonrası allojenik kemik iliği transplantasyonundan fayda görmezler [6, 65]. Bu çalışma grubu all-retinoik asiti (ATRA) konvansiyonel kemoterapiye eklemişler ve fayda sağladığı görülmüştür [35]. Kemoterapi rejimine ATRA eklenmesi özellikle NPM-1 mutasyonlu FLT3/ITD(-) yaşlı hastalarda önerilmektedir [6]. FLT3/ITD(-)

NPM-1 mutasyonlu, genç hastalar standart indüksiyon tedavisini takiben tekrarlayan sikluslarda HİDAC tedavisinden fayda görürler [35].

FLT3/ITD(-) NPM-1 vakalarında, CBF-AML’lerde olduğu gibi standart yaklaşım üç ya da dört siklus yüksek doz sitarabin tedavisidir [35, 65, 72].

Kötü sitogenetik risk grubunda olan FLT3/ITD ya da EV11 yüksek oranda ekspresyonunda allojenik kök hücre nakli uygulanmayabilir. FLT3 mutasyonu tirozin kinaz inhibitörlerinin hedefidir [71].

Kötü riskli AML’li hastalarda, HLA uyumlu kardeşten, akraba dışı donörden allogeneik kök hücre nakli önerilen tedavidir [73]. Miyelodisplazi ya da hematolojik hastalık sonrası gelişen, 5q-, 7q-, tr:8, t(6;9), t(9;22) gibi kötü prognostik sitogenetik bulgusu olan AML’li hastalarda allogeneik kök hücre nakli standart tedavi olarak kabul edilmektedir. Donörü olmayanlarda otolog kök hücre nakli ya da yüksek doz Ara-C ile konsolidasyon önerilir. Allogeneik transplantasyon planlanan hastalara ise remisyona girme sonrası transplantasyon önerilir ve konsolidasyon tedavisi vermenin avantajı gösterilememiştir [74]. Donörü olmayan ve otolog transplantasyon planlanan hastalarda ise Rİ tedavisi sonrası konsolidasyon tedavisi verilmesi ve takiben otolog kök hücre nakli yapılması önerilir [75].

Relaps AML tedavisi, hastaların %50’sinden fazlası relaps olur ve ortalama relaps süreleri 3 aydan 12 aya kadar değişir [76]. Reindüksiyon kemoterapisine en iyi cevap göstergeleri yaş, karyotip, ilk remisyon süresidir [77]. Relaps yapan hastalardaki cevap oranları kötü sitogenetik özelliklere sahip hastalarda %40’ın altında iken iyi karyotipik özelliklere sahip hastalarda %90’ın üzerindedir [78]. İlk remisyon süresi 6 ayın üzerinde ise cevap oranı belirgin olarak daha yüksek olma eğilimindedir [79]. Relapslı hastalarda hastalık, en iyi kurtarma tedavisini belirlemek için sitogenetikler, yaş ve birinci tam remisyonun süresine göre sınıflandırılabilir [71].

Ayrıca tedavide hedefe yönelik; anti-CD33 antikor, Sinyal iletim yollarını hedefleyen tedaviler (FLT3 inhibitörleri, KIT tirozin kinaz inhibitörleri), Prenilasyon inhibitörleri (Farnesyl transferaz inhibitörleri, Geranyl transferaz inhibitörleri) kullanılabilir.

Tablo 12. AML tedavi protokollerinin genel özeti [71]

Prognostik grup	Alt tipi	İndüksiyon	Post remisyon
İYİ	inv(16) ya da dat(16;16),t(8;21)	3+7	Ara-C 1g/m2BID günlük x6(52)
	NK NPM-1(+) FLT3/ITD(-)		Dasatinib;inv(16)ya da t(8;21) ve CKIT (+)
	NK CEBPA(+)		
Intermediate-1	NK NPM-1 W/O ya da FLT3/ITD(+)	3+7	Kemik iliği nakli(MSD)
	İyi ya da kötü grubunda olmayan diğer sitogenetik anomaliler		Ara-C
Intermediate-2	FLT3/ITD(+)	3+7	Kemik iliği nakli MSD ya da başka donörden quizatinib eklenerek
		Deneme aşamasında olan FLT3 inhibitörleri; quizartinib	Nakil sonrası Ara-C
Intermediate-3	Monozomal karyotip hariç diğer kötü sitogenetik gruplar	Klinik denemeler	Kemik iliği nakli MSD ya da başka donörden
			Kemik iliği nakli yapılamıyorsa klinik tedavi
Kötü	Monozomal karyotip	Klinik denemeler	

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma TTU-2013-4386 no'lu proje olarak Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir.

2007-2013 yılları arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi (EÜTF) Patoloji Anabilim Dalı'nda tanı alan 470 AML, MDS vakası retrospektif, sitogenetik ve morfolojik olarak değerlendirilmiştir. Bunların arasından 70 vaka çalışmaya alınmıştır. Bu hastaların klinik özellik ve takipleri EÜTF Hematoloji Bilim Dalı'ndan, genetik verileri Genetik Anabilim Dalı'ndan elde edilmiştir. Materyal ile ilgili bilgiler Patoloji arşiv raporlarından elde edilmiştir. Sitogenetik çalışmaları yapılmış, normal karyotipe sahip, ilave çalışma için parafin bloğunda yeterli doku bulunan vakalar çalışmaya dahil edilmiştir.

Vakaların 10' MDS RAEB2, 10'u MDS AML, 1'i AML-M0, 5'i AML-M1, 16'sı AML-M2, 11'i AML-M3, 5'i AML-M4, 8'i AML-M5, 4'ü tedavi ilişkili AML(t-AML)'den oluşmaktadır.

Vakaların MayGrünwald Giemsa boyalı aspirasyon yayma preparatları ve formik asit ile dekalsiye edilmiş, %10 'luk formalin solüsyonunda tespit edilmiş, rutin doku takip işlemlerinden sonra parafin bloklardan yapılmış 5-6 mikron kalınlıktaki preparatları Hematoksilen -Eozin (HE) ile boyanarak ışık mikroskopunda iki patolog tarafından tekrar değerlendirilmiştir. Vakaların FAB sınıflamasına göre alt tipleri belirlenmiştir. Vakaların sınıflanmasında geçmişinde var olan MDS veya diğer hematolojik hastalıklar göz önünde bulundurulmuştur.

Vakaların HE kesitlerinde hücrelerin morfolojisi, infiltrasyon paterni tekrar değerlendirilmiştir.

Vakalar cinsiyet, yaş, genetik karyotip, blast popülasyon oranı, akım sitometrik ve IHK'sal CD34 pozitiflik-negatiflik durumuna, periferik kan beyaz küre sayısı ve biyokimyasal olarak LDH seviyelerine göre gruplandırılmıştır.

Genetik verilerin değerlendirilmesinde FLT3/ITD mutasyonu negatif, NPM-1 mutasyonu tespit edilen ve genetik translokasyonları çalışılmış vakalar tercih edilmiştir.

Vakaların Hematoloji Bilim Dalı'ndan elde edilen akım sitometri sonuçları patoloji rapor tanıları ile korele edilmiştir. Akım sitometri sonuçlarında CD34 için eşik değer %1 kabul edilmiştir. Buna göre, akım sitometrik olarak $\leq$ %1 vakalar negatif kabul edilmiş, IHK'sal olarak elde edilen zayıf ya da negatif sonuçlar aynı grupta '**negatif**' olarak değerlendirilmiştir. Akım sitometrik olarak $\geq$ %1 olan vakalar ve IHK'sal pozitif vakalar aynı grupta '**pozitif**' olarak sınıflandırılmıştır.

3.1. İMMÜNOHİSTOKİMYA

Formik asit ile dekalsifiye edilmiş kemik iliği biyosi materyalerinin parafin bloklarından Poly-L-Lisine kaplı lamlara 5 mikronluk kesitler alınmıştır. Kesitler 60 derecelik etüvde 1 saat bekletildikten sonra 15 dakika ksilol ile deparafinize edilmiştir. Derecesi giderek azalan alkollerden dilüsyon geçirilerek hidrate edilip distile suda yıkanmıştır. Primer antikorlar Nükleofosmin (DAKO, Klon 376, 1/700 dilüsyon oranında, 2 saat CC1), CD25 (CELL MARQUE, Klon4C9, 1/25, 2 saat CC1), CD123 (BioSB, Katolog no:BSB5327, 1/20 dilüsyon oranında, 2 saat CC1) ve Survivin (DAKO, Klon 12C4, 1/25dilüsyon oranında, 2 saat CC1) uygulandı. Ventana BenchMark XT marka makinede boyama gerçekleştirildi. Derecesi gittikçe artan alkollerden geçirildikten sonra 15 dakika ksilolde bekletildi. Kapatma solusyonu ile kapatıldı.

Tablo 13. Kullanılan primer antikorlar ve dilüsyon oranları

ANTİKOR	KLON/KATOLOG NO	MARKA	DİLUSYON	İNKÜBASYON SÜRESİ
Nükleofosmin	376/monoklonal	DAKO	1/700	90 DK
CD25	4C9/monoklonal	CELL MARQUE	1/25	90 DK
CD123	Katalog no:BSB5327/monoklonal	BiO SB	1/20	90 DK
SURVİVİN	12C4/monoklonal	DAKO	1/25	90 DK

Pozitif kontrol olarak Survivin, Nükleofosmin, CD123, CD25 için tonsil dokusu kullanılmıştır. İHK'sal boyamalar, ayrıca infiltrasyon içermeyen, normoselüler kemik iliği biyopsilerine de uygulanarak kontrol edilmiştir.

3.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRME

Biyopside, blast popülasyon oranının fazla olduğu alanlar HE kesitlerde işaretlenmiştir. İHK'sal boyamaların değerlendirilmesi, aynı alanlar işaretlenerek bu bölgelerde gerçekleştirilmiştir.

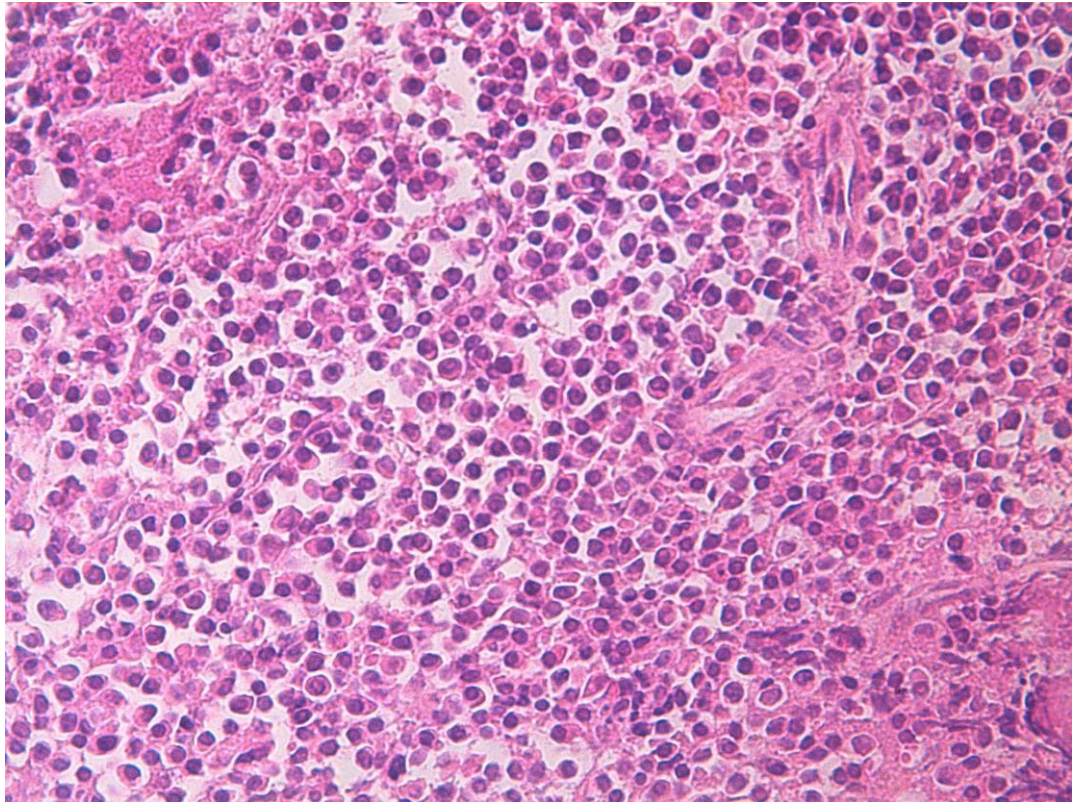
Çalışmamızda Olympus marka mikroskop kullanılarak x400 ve x1000 büyütmede sonuçlar iki patolog tarafından değerlendirildi.

Nükleofosmin için normoselüler kemik iliği biyopsisinde mononükleer hücrelerde, makrofajlarda ve NPM-WT mutasyonu olan vakada lösemik hücrelerde nükleer (NPMc-) boyanma elde edilmiştir. NPM-1 kombine nükleer ve aberran sitoplazmik (NPMc+) boyanma birlikteliği NPM-1 mutasyonu açısından pozitif kabul edilmiştir [80].

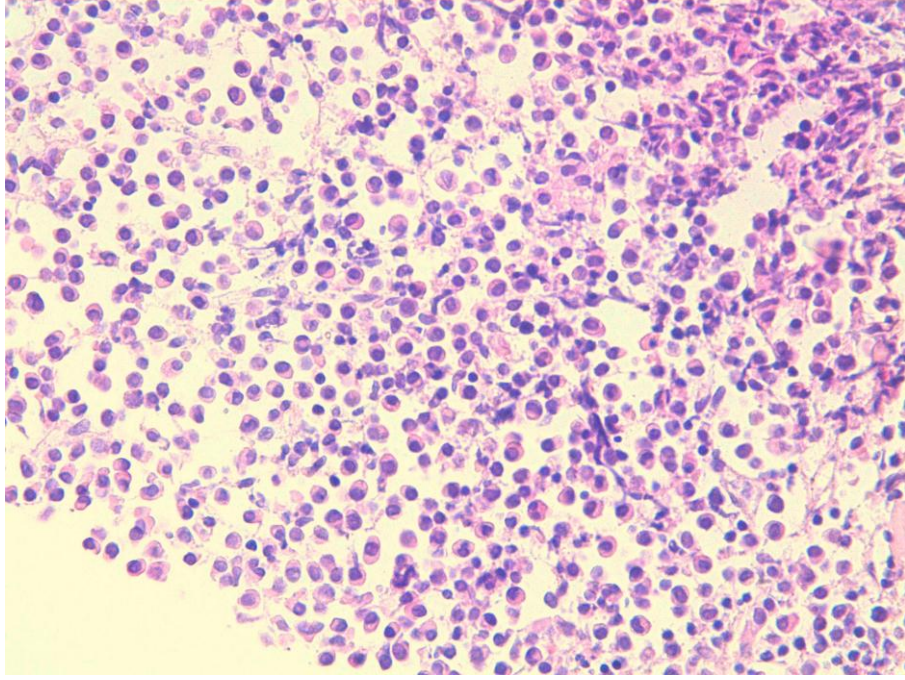
CD 25 için blast popülasyonunda sitoplazmik boyanma $\leq 1\%$ 'da **negatif**, $> 1\%$ 'de **pozitif** kabul edilerek değerlendirilmiştir.

CD123 için blast popülasyonunda membranöz boyanma $\leq 20\%$ 'da pozitiflik '**zayıf (negatif)**', $> 20\%$ 'de pozitiflik '**kuvvetli (pozitif)**' kabul edilerek değerlendirilmiştir [67].

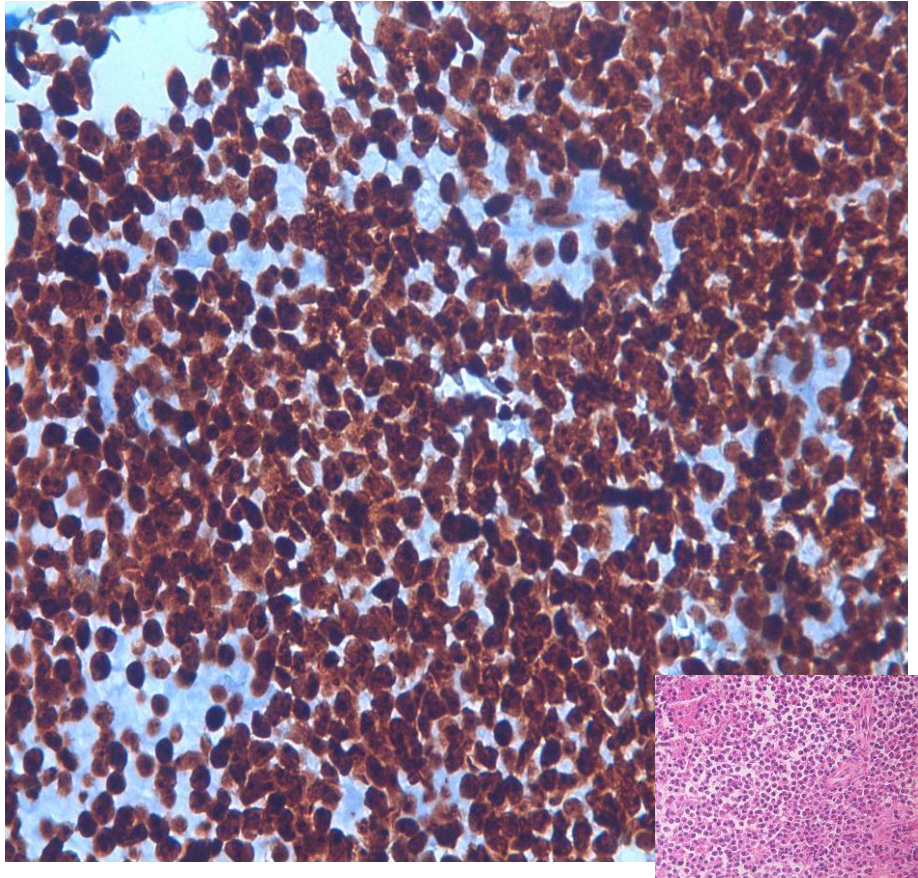
Survivin için blast popülasyonunda peri/paranükleer pozitif boyanma kabul edilerek boyanma şiddetine göre zayıf, orta ve kuvvetli olarak değerlendirilmiştir.



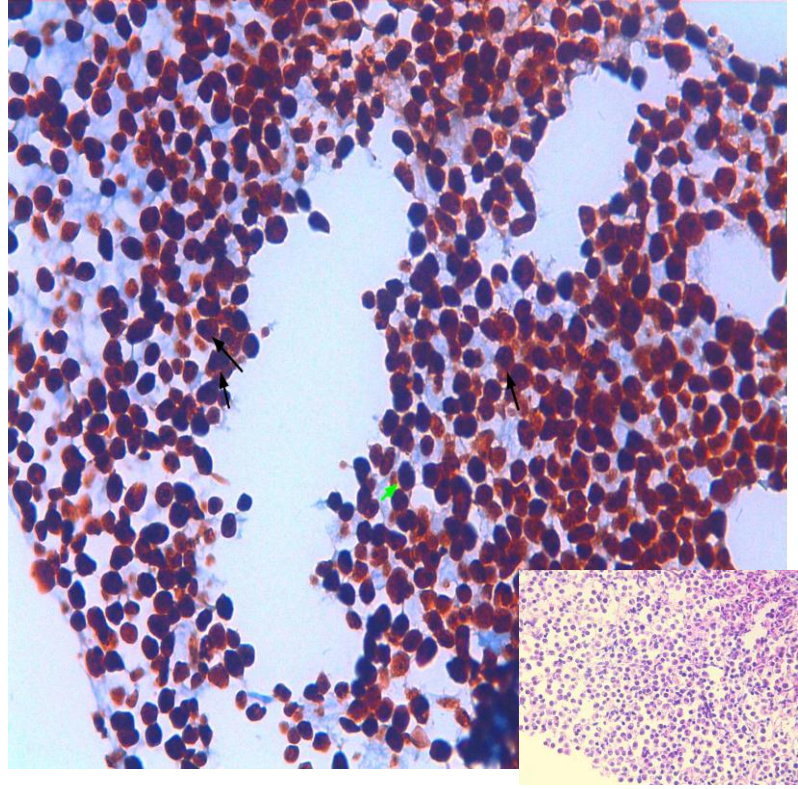
Resim 6. AML M2 vakasında, kemik iliği mesafesini infiltre eden, monoton, ekzantrik nükleuslu, eozinofilik sitoplazmalı blast morfolojisinde hücreler görülmektedir (x400, HE)



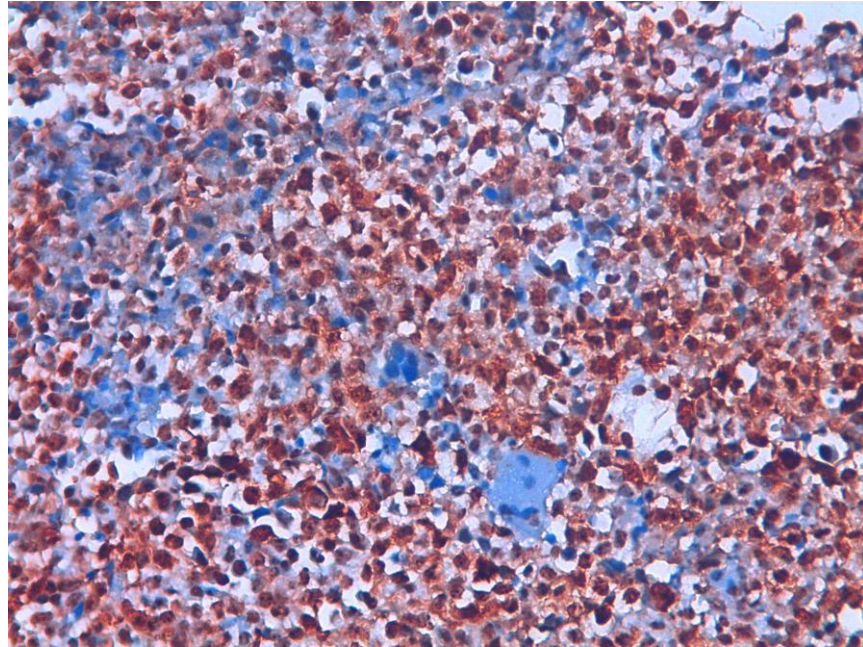
Resim 7. AML-M4 vakasında, kemik iliği mesafesini infiltre eden, monoton, ekzantrik nükleuslu, eozinofilik sitoplazmalı blast morfolojisinde hücreler görülmektedir (x400, HE)



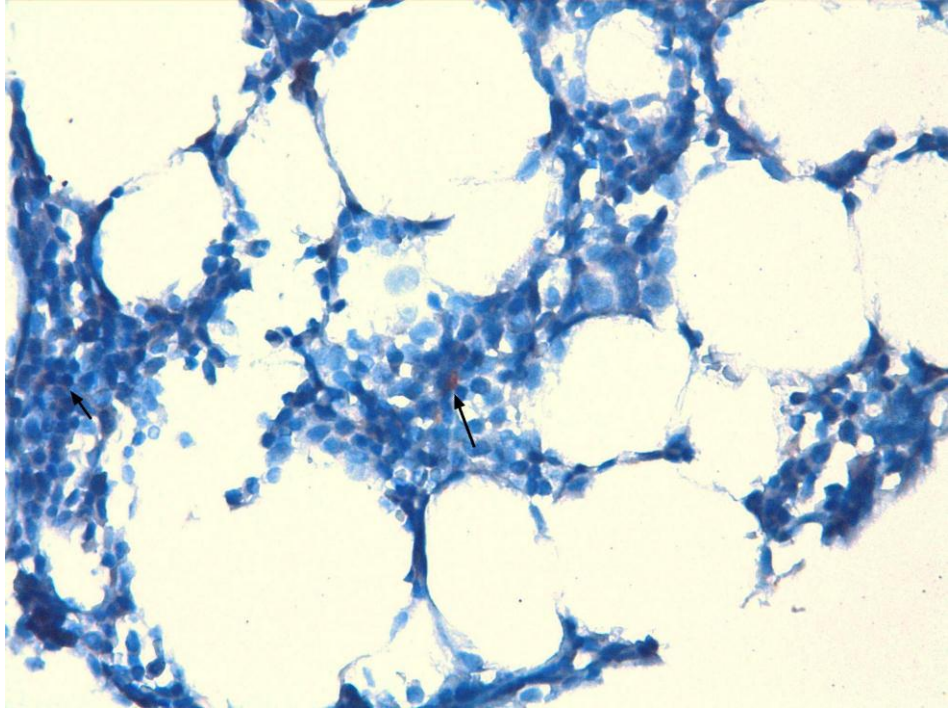
Resim 8. AML-M2 vakasında, NPMc+ekspresyonu görülmektedir (x400, immünperoksidaz)



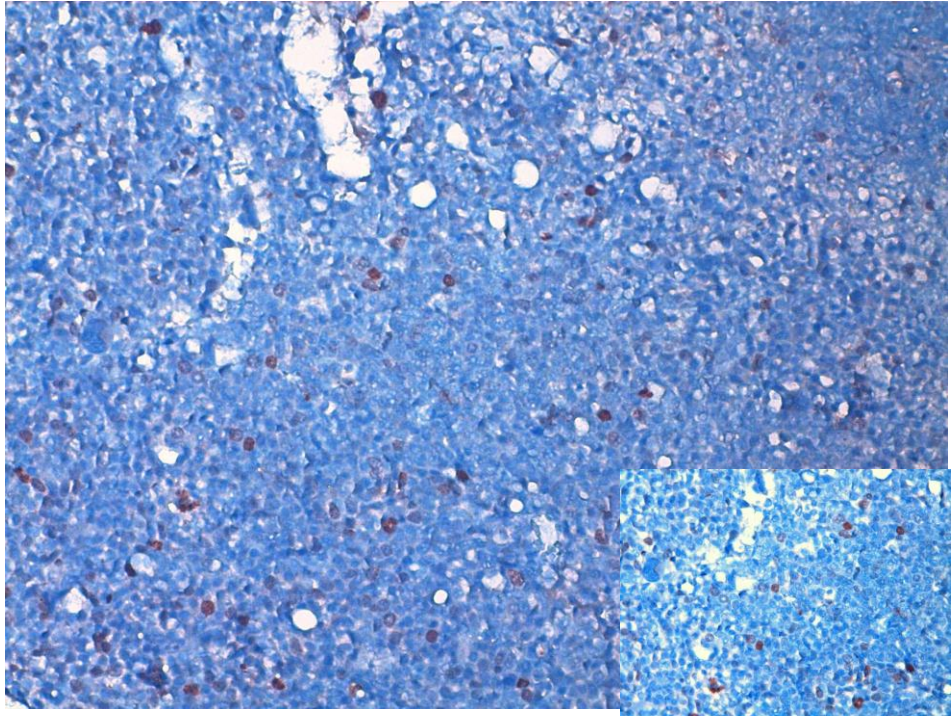
Resim 9. AML-M4 vakasında, aberran sitoplazmik ekspresyon (siyah ok) ve nükleer ekspresyon (yeşil ok) görülmektedir (x400, immünperoksidaz)



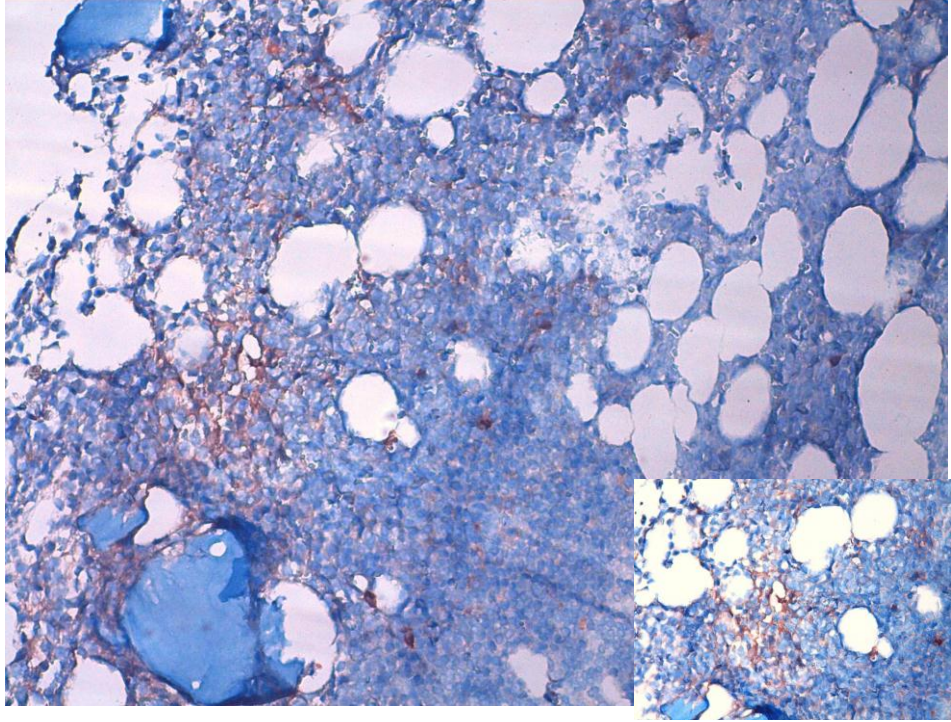
Resim 10. AML-M5 vakasında, boyanma göstermeyen normal hemapoetik hücreler ve NPMc+ ekspresyonu görülmektedir (x400, immünperoksidaz)



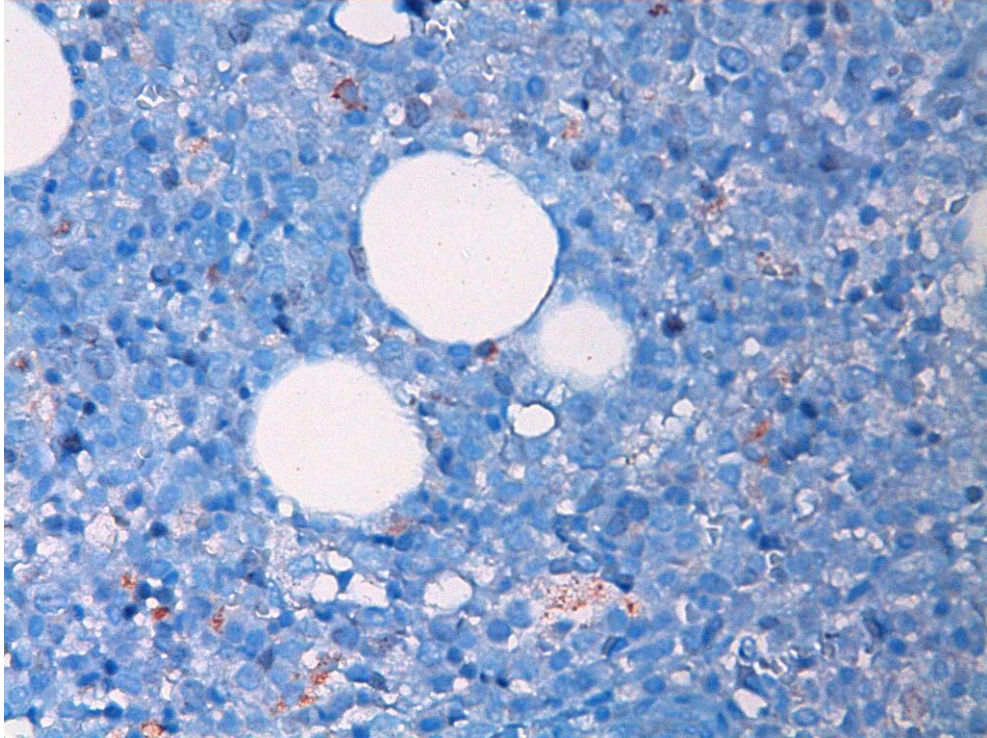
Resim 11. MDS-RAEB2 vakasında, survivin antikoru ile zayıf yoğunlukta boyanma (x400, immünperoksidaz)



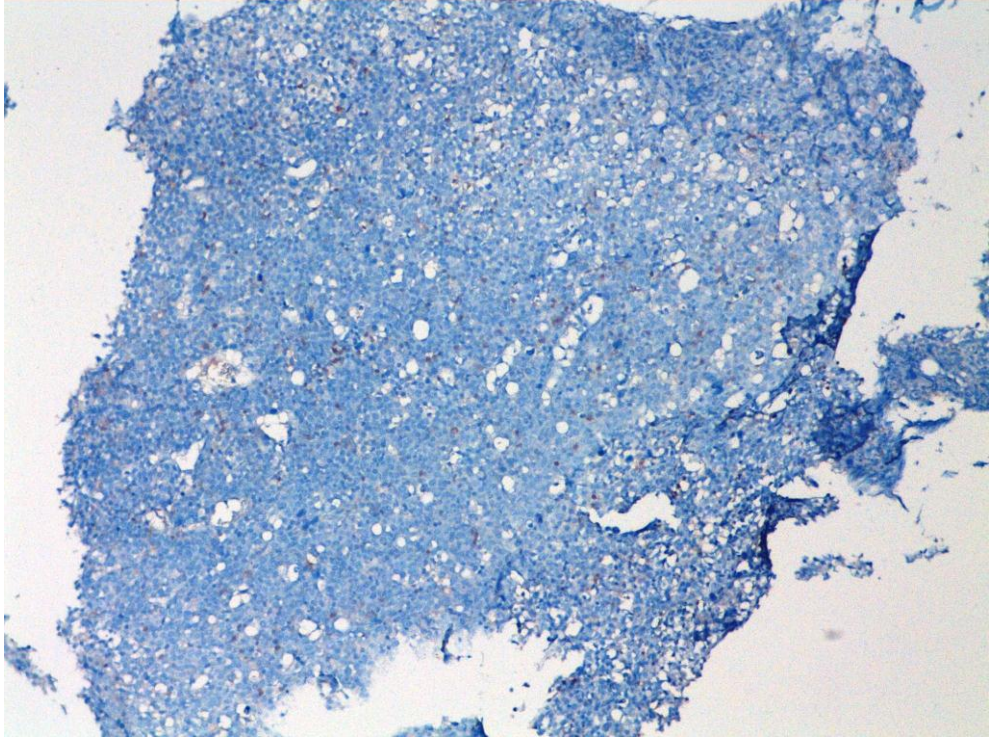
Resim 12. MDS-AML vakasında, survivin antikoru ile orta yoğunlukta boyanma (x200, x400, immünperoksidaz)



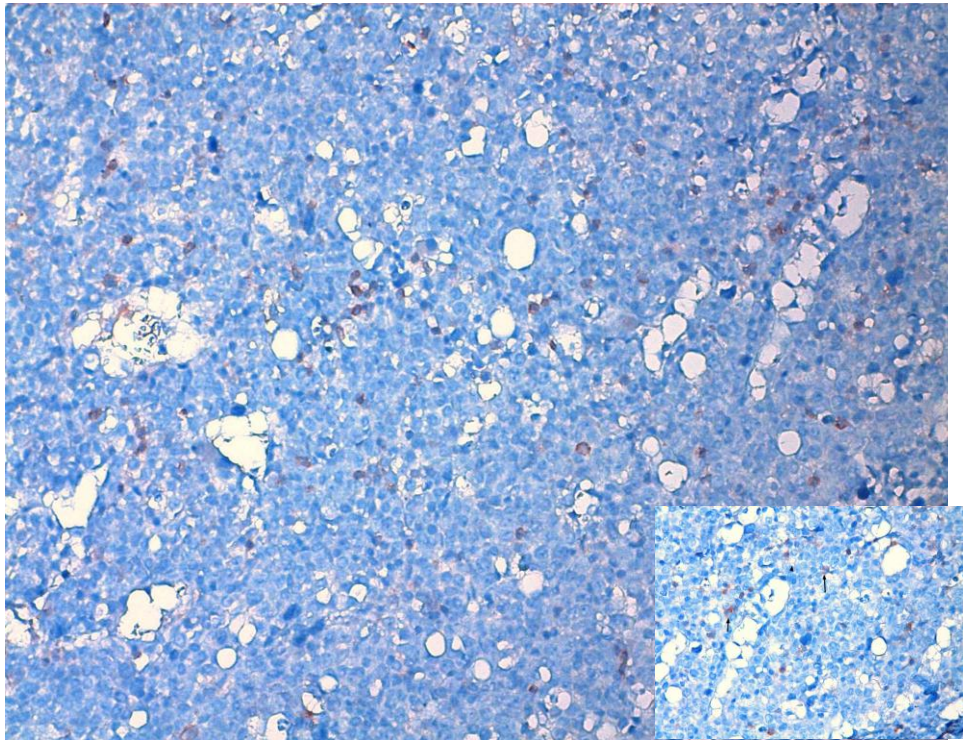
Resim 13. AML vakasında, survivin antikoru ile kuvvetli yoğunlukta boyanma (x200, x400, immunperoksidaz)



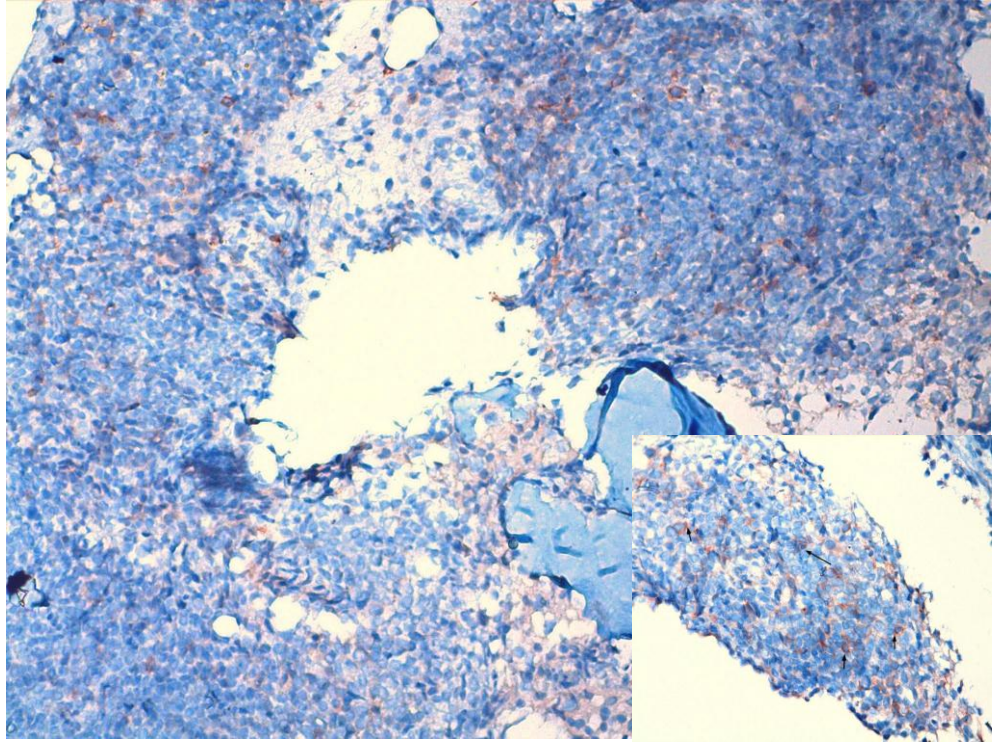
Resim 14. AML vakasında, survivin antikoru ile zayıf yoğunlukta boyanma (x200, immünperoksidaz)



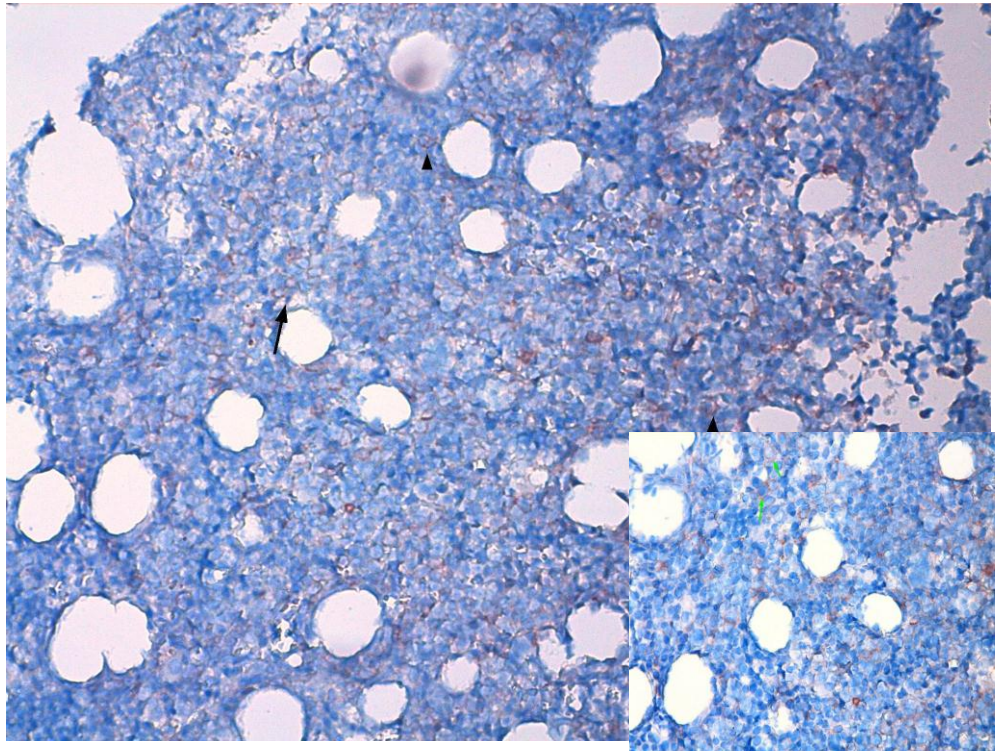
Resim 15. MDS-AML vakasında, CD25 antikoru ile pozitif boyanma (x200, immünperoksidaz)



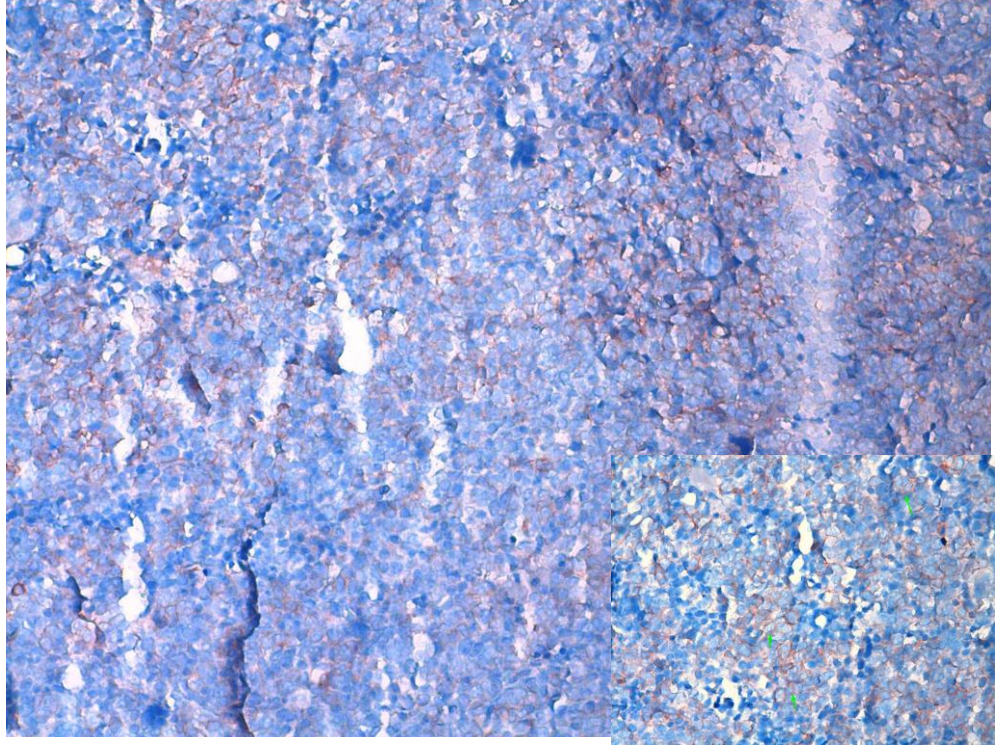
Resim 16. AML vakasında, CD25 antikoru ile pozitif boyanma (x200, x400, immünperoksidaz)



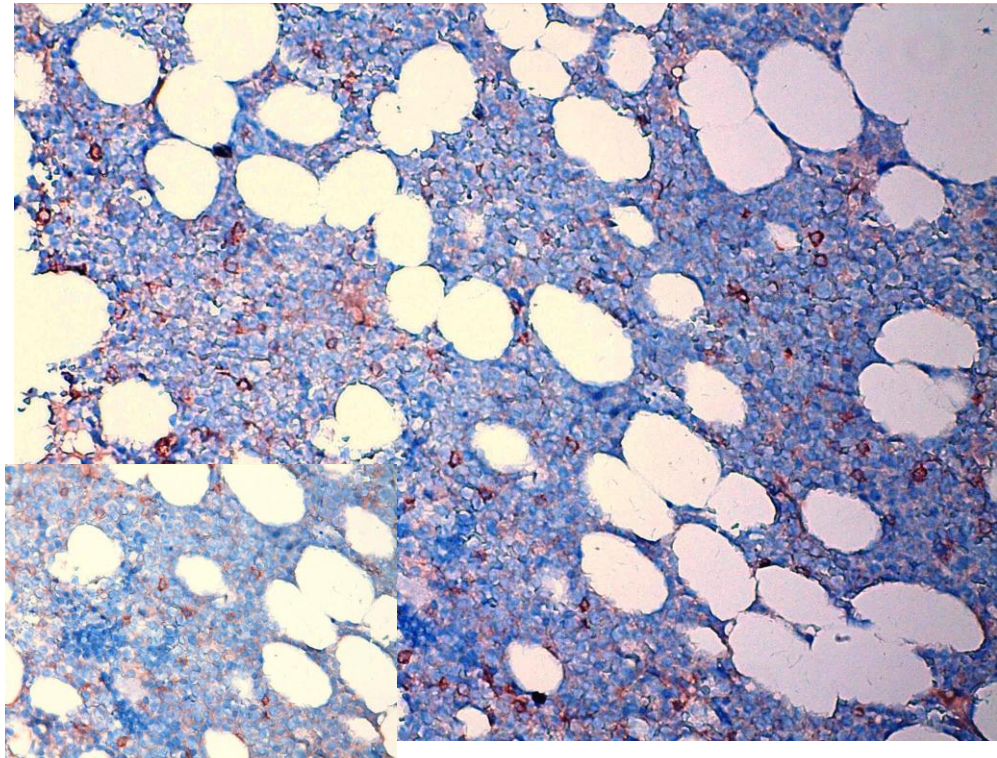
Resim 17. AML vakasında, CD25 antikoru ile pozitif boyanma (x200, x400, immünperoksidaz)



Resim 18. MDS RAEB2 vakasında, CD123 antikoru ile pozitif boyanma (x200, x400, immünperoksidaz)



Resim 19. MDS- AML vakasında CD123 antikoru ile pozitif boyanma (x200, x400, immünperoksidaz)



Resim 20. AML vakasında CD123 antikoru ile pozitif boyanma (x200, x400, immünperoksidaz)

3.3. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

Kullanılan antikorların sonuçları, birbirleri ile olan ilişkileri, Nükleofosmin IHK sonuçları ile genetik sonuç korelasyonu değerlendirilmesinde; verilerin tanımlayıcı istatistiklerinde, ortalama, standart sapma, medyan, min-mak., oran ve frekans değerleri kullanılmıştır. Değişkenlerin dağılımı kolmogorov simirnov testi ile kontrol edildi. Niteliksel verilerin analizinde bağımsız örneklem t test ve mann-whitney u test kullanıldı. Niteliksel verilerin analizinde ki-kare test kullanıldı. Sağkalım analizinde kaplan-meier (log-rank) ve cox regresyon analizi kullanıldı. Analizlerde SPSS 21.0 programı kullanılmıştır. Yapılan analizlerde $p < 0,05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı ilişki/fark bulunduğu kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmaya 2007-2013 yılları arasında EÜTF Patoloji Anabilim Dalı'nda tanı alan 70 MDS ve AML vakası alınmıştır.

Olguların 53 'ü (%76) erkek, 17'si (%24) kadındı. Çalışmaya alınan en genç hasta 21, en yaşlı hasta 76 yaşında idi, ortalama yaş 54 'dü.

Bu çalışmada, NPM mutasyonu açısından genetik verilerle IHK'sal boyama sonuçlarının korele edilebilirliği araştırılmıştır. IHK'sal NPM-1 kombine nükleer ve aberran sitoplazmik (NPMc+) boyanma birlikteliği NPM-1 mutasyonu açısından pozitif kabul edilmiştir. Vakalar IHK'sal olarak NPMc+ ve nükleer (NPMc-) boyanma durumuna göre CD123, CD25, Survivin ve diğer parametrelerle karşılaştırılmıştır.

AML vakaları sitogenetik bulgularına göre risk sınıflamasına alınmıştır. MDS-AML ve tAML vakaları kötü prognostik özellikleri olan gruptadır. Çalışmadaki MDS-RAEB2 vakaları MDS sınıflamasına göre kötü risk grubunda değerlendirilmiştir.

AML-FAB sınıflaması yapılmış olmasına rağmen, parametreler değerlendirilirken FAB gruplarındaki vaka sayısı yeterli olmadığından tek tek diğer parametrelerle karşılaştırılamamıştır. Ancak çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak AML-M3 vakalarında NPM-1 mutasyonuna ve IHK'sal olarak NPMc+ boyanmasına rastlanmamıştır [9]. Literatürde IHK'sal olarak en sık AML-M2 ve M4 grubunda IHK'sal NPMc+ boyanma elde edilmiştir [9]. Çalışmamızda AML-M2 ve M4 vakalarında genetik olarak NPM-1 mutasyon varlığı ve IHK'sal NPMc+

boyanması diğer gruplara göre daha yüksek oranda tespit edilmiştir. Bu vakaların hepsi normal karyotipli ve genetik olarak FLT3/ITD mutasyonu negatifti.

Tablo 14. NPM İHK'sal nükleer (NPMc-) ve kombine nükleer- sitoplazmik (NPMc+) olan grupların prognostik parametrelerle karşılaştırması

		NPM-1 İHK						p
		Nükleer			Sitoplazmik			
		Ort.±s.s./n-%	Med(Min-		Ort.±s.s./n-%	Med(Min-		
Yaş		50,9 ± 18,9	50	21 - 77	48,3 ± 14,5	50	21 - 73	0,512
Cinsiyet	Erkek	23	69,7%		30	81,1%		0,268
	Kadın	10	30,3%		7	18,9%		
NPM-1	Negatif	29	100%		12	40,0%		0,000
	Pozitif	0	0,0%		18	60,0%		
Karyotip	Translokasyon(+)	16	55,2%		1	3,3%		0,000
	Translokasyon(-)	13	44,8%		29	96,7%		
CD123	Negatif	14	42,4%		18	48,6%		0,602
	Pozitif	19	57,6%		19	51,4%		
CD25	Negatif	22	66,7%		24	64,9%		0,874
	Pozitif	11	33,3%		13	35,1%		
FLT3	Negatif	29	100%		30	100%		-
	Pozitif	0	0,0%		0	0,0%		
Survivin	Zayıf	13	39,4%		13	35,1%		0,289
	Orta	16	48,5%		14	37,8%		
	Kuvvetli	4	12,1%		10	27,0%		
Tanı	AML	19	57,6%		27	73,0%		0,175
	Diğer	14	42,4%		10	27,0%		
Blastorani		0,4 ± 0,3	0	0 - 1	0,5 ± 0,3	1	0 - 1	0,229
WBC (x10 ³)		8,0 ± 10,8	5	0 - 55	16,2 ± 25,7	6	0 - 135	0,341
LDH		448 ± 722	242	148 - 4308	579 ± 686	357	124 - 3200	0,353
SGRISKG	İyi	12	63,2%		0	0,0%		0,000
	Orta	7	36,8%		24	88,9%		
	Kötü	0	0,0%		3	11,1%		
Nüks	Yok	11	33,3%		5	13,5%		0,049
	Var	22	66,7%		32	86,5%		
Sonuç	Ölmüş	14	42,4%		21	56,8%		0,231
	Yaşıyor	19	57,6%		16	43,2%		

Bağımsız örneklem t test / Mann-whitney u test/ Ki-kare test

NPM-1 İHK'sal olarak NPMc- ve NPMc+ boyanma olan gruplarda hastaların yaşı, cinsiyet dağılımı anlamlı (p> 0,05) farklılık göstermemiştir. İHK'sal olarak NPMc+

olan grupta NPM1 genetik mutasyonunun tespit oranı , İHK'sal NPMc- boyanma olan gruptan anlamlı ($p<0,05$) olarak daha yüksekti.

İHK'sal NPMc+ olan grup, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde normal karyotiplidir. ($p<0,05$)

NPM-1, İHK'sal NPMc+ boyanma olan grupta CD123, CD25 pozitif tespit edilme oranı anlamlı ($p> 0,05$) farklılık göstermemiştir.

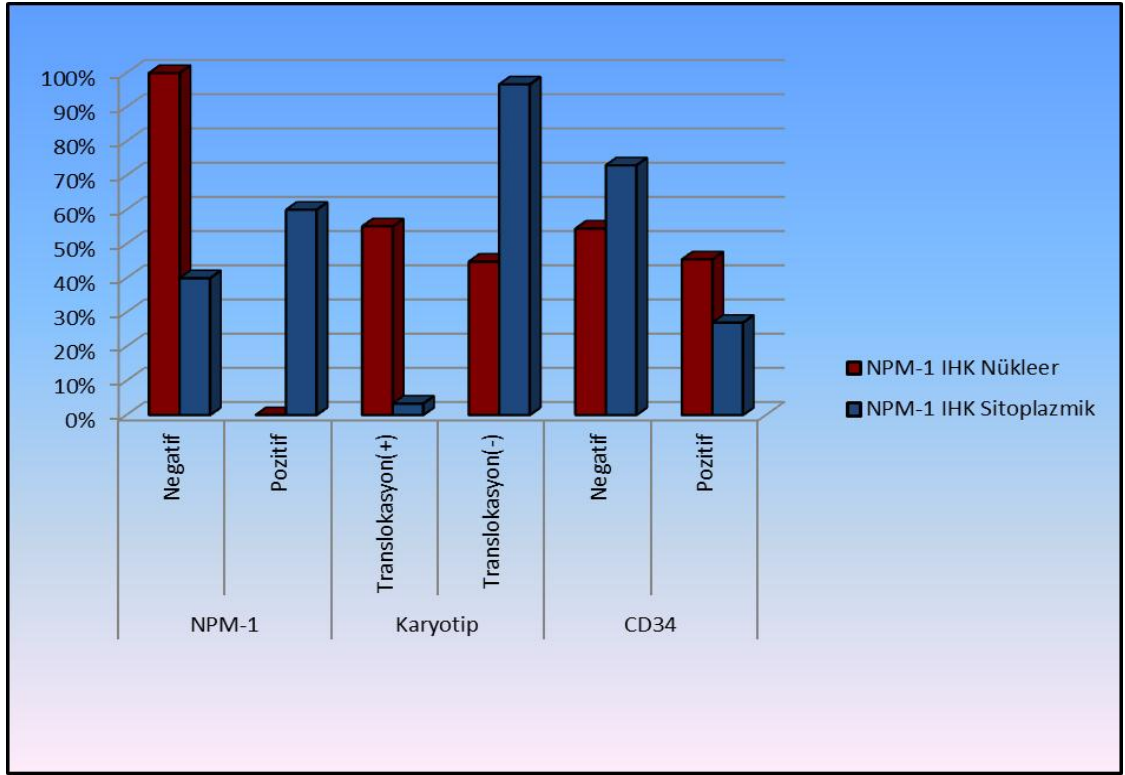
NPM-1, İHK'sal NPMc+ boyanma olan gruplar arasında survivin orta ve kuvvetli yoğunlukta boyanma oranı dağılımı anlamlı ($p> 0,05$) farklılık göstermemiştir.

NPMc+ boyanma olan gruplar arasında blast oranı, WBC, LDH değeri anlamlı ($p> 0,05$) farklılık göstermemiştir.

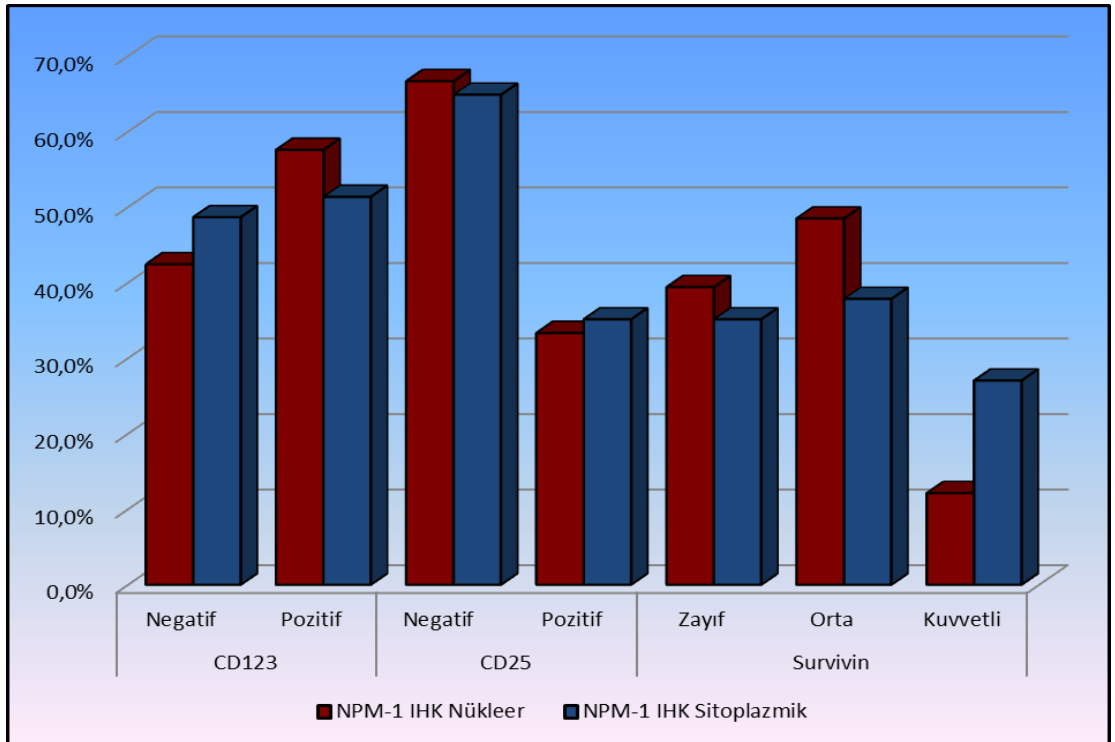
İHK'sal olarak NPMc+ boyanma olan grupta sitogenetik risk sınıflamasında (SGRISK) orta sitogenetik grupta ki oran, İHK'sal NPMc- boyanma olan gruptan anlamlı ($p<0,05$) olarak daha yüksekti.

İHK'sal NPMc+ boyanma olan grupta nüks oranı, İHK'sal nükleer boyanma olan gruptan anlamlı ($p<0,05$) olarak daha yüksekti.

İHK'sal olarak NPMc+ boyanma olan gruplarda ölen ve yaşayan hasta oranı anlamlı ($p> 0,05$) farklılık göstermemiştir (Tablo 14).



Grafik 1. NPM, IHK'sal NPMc+ ve NPMc- boyanmasının genetik olarak mutasyon varlığı durumu, CD34 ve karyotiple karşılaştırılması

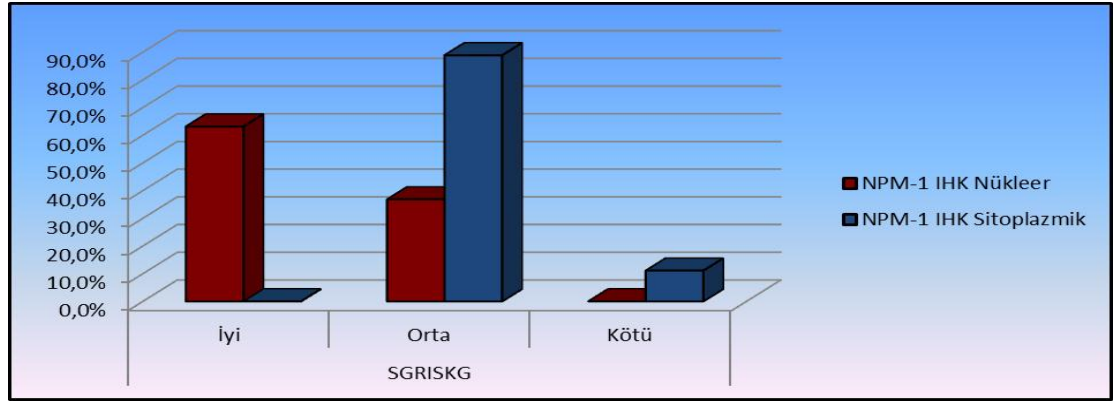


Grafik 2. Tüm hasta gruplarında, NPM IHK'sal boyanma sonuçlarının diğer IHK'sal boyanmalarla karşılaştırılması

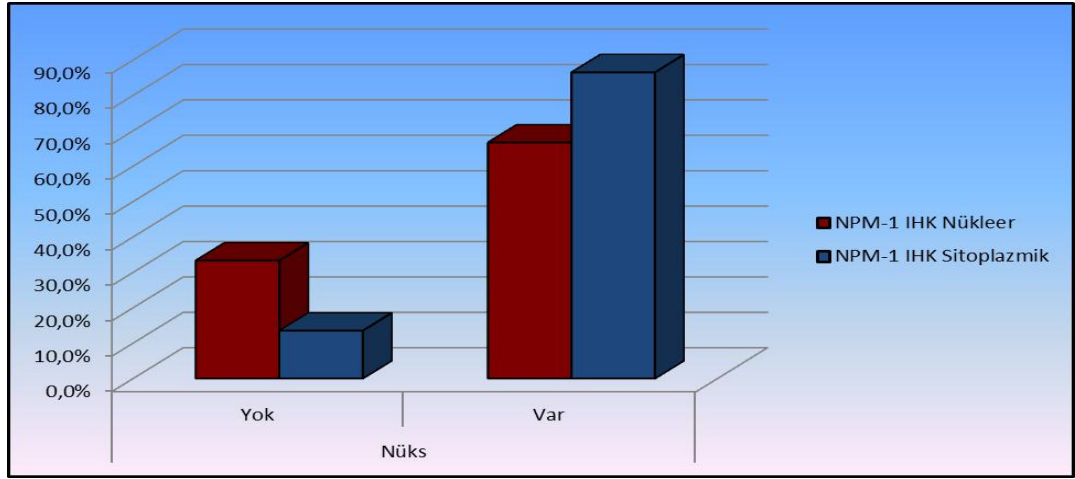
IHK'sal NPMc+ ve NPMc- boyanma elde edilen gruplarda CD25 negatifti.

IHK'sal NPMc+ boyanma elde edilen grupta CD123 pozitiflik oranı , NPMc- boyanma elde edilen gruptan düşüktür (p 0.602).

IHK'sal NPMc+ boyanma elde edilen grupta Survivin ile orta yoğunlukta boyanma daha fazladır. NPMc- boyanma elde edilen grupta da benzer sonuç elde edilmiştir (Tablo 14).



Grafik 3. IHK'sal NPMc+boyanma elde edilen grup çoğunlukla orta sitogenetik gruptadır



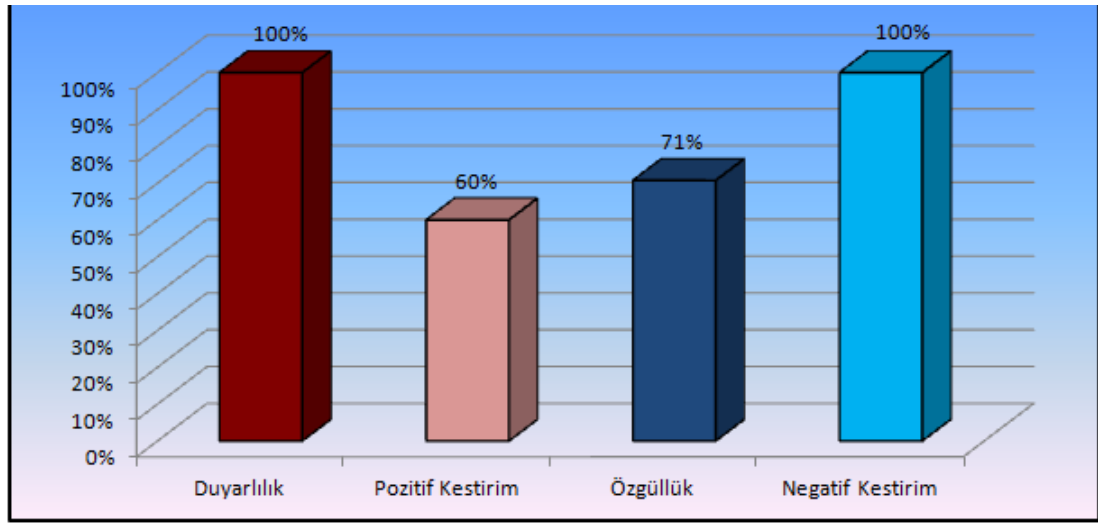
Grafik 4. IHK'sal NPMc+ boyanma elde edilen grupta nüks oranı daha yüksektir

NPM-1, genetik olarak mutasyon pozitif vakalardan oluşan grup ile IHK'sal NPMc+ boyanma elde edilen grup arasında anlamlı ($p < 0,05$ / Kappa: 0,596) uyumluluk mevcuttu. Duyarlılık %100, özgüllük %70, pozitif kestirim değeri %60, negatif kestirim değeri %100'dü (Tablo 15).

Tablo 15. NPM-1 genetik olarak mutasyon varlığı durumu ve IHK'sal NPM boyanma durumu korelasyonu

		NPM-1GEN		Kappa	p
		Negatif	Pozitif		
NPM-1 IHK	n	29	0	0,596	0,000
	Nukleer				
	NPM-1 IHK % içinde	100,0%	0,0%		
	NPM1GEN % içinde	70,7%	0,0%		
	n	12	18		
	Sitoplazmik				
	NPM-1 IHK % içinde	40,0%	60,0%		
	NPM1GEN % içinde	29,3%	100,0%		

Kappa Uyum Analizi



Grafik 5. NPM-1 genetik olarak mutasyon varlığı durumu ve IHK'sal NPM boyanma durumu korelasyonu

Tablo 16. MDS-AML ve MDS-RAEB2 vakalarının karşılaştırılması

		MDS AML		p	MDSRAEB2		p
		n	%		n	%	
CD34	Negatif	4	8,9%	0,083	5	11,1%	0,309
	Pozitif	6	24,0%		5	20,0%	
NPM-1	Negatif	3	7,3%	0,357	6	14,6%	0,164
	Pozitif	3	16,7%		0	0,0%	
Karyotip	Translokasyon(+)	0	0,0%	0,168	3	17,6%	0,341
	Translokasyon(-)	6	14,3%		3	7,1%	
CD123	Zayıf	9	28,1%	0,002	6	18,8%	0,327
	Kuvvetli	1	2,6%		4	10,5%	
CD25	Zayıf	8	17,4%	0,304	5	10,9%	0,258
	Kuvvetli	2	8,3%		5	20,8%	
Survivin	Zayıf	3	11,5%	0,861	8	30,8%	0,009
	Orta	5	16,7%		2	6,7%	
	Kuvvetli	2	14,3%		0	0,0%	
NPM-1 IHK	Nukleer	1	3,0%	0,011	9	27,3%	0,003
	Sitoplazmik	9	24,3%		1	2,7%	

Ki-kare test (Fischer test)

CD34 negatif ve pozitif olan vakaların MDS AML oranı anlamlı ($p > 0,05$) farklılık göstermemiştir.

MDS AML grubunda NPM -1 genetik olarak negatif ve pozitif olan vakaların arasında anlamlı ($p>0,05$) farklılık göstermemiştir.

MDS AML grubunda karyotip değerlendirmesinde translokasyon negatif ve pozitif olan vakalar arasında anlamlı ($p>0,05$) farklılık göstermemiştir.

MDS AML vakalarında CD123 ekspresyonu zayıftı ($p<0,05$).

Survivin ekspresyon derecesine göre, vakalarda MDS AML tanı oranı anlamlı ($p>0,05$) farklılık göstermemiştir.

MDS AML NPMc+ ekspresyon oranı anlamlı ($p<0,05$) olarak daha yüksekti (Tablo 16).

MDS-RAEB2 grubunda blastlarda CD34 ekspresyonu açısından anlamlı farklılık ($p>0,05$) gösterülmedi.

MDS-RAEB2 tanılı grupta NPM-1 genetik olarak negatif ve pozitif olan vakalar arasında anlamlı ($p>0,05$) farklılık göstermemiştir.

MDS-RAEB2 tanılı grupta karyotip değerlendirmesinde translokasyon negatif ve pozitif olma oranında anlamlı ($p>0,05$) farklılık göstermemiştir.

MDS-RAEB2 tanılı grupta CD123 zayıf ve kuvvetli boyanma elde edilme oranı arasında anlamlı ($p>0,05$) farklılık göstermemiştir.

MDS-RAEB2 tanılı grupta Survivin ekspresyonu zayıftı.

NPM IHK'sal olarak NPMc+ boyanma elde edilen vakalarda MDS-RAEB2 tanısı oranı, NPM IHK'sal NPMc- boyanma elde edilen gruptan anlamlı ($p<0,05$) olarak daha düşüktü (Tablo 16).

Tablo 17. Tek değişkenli modelde yaşı, cinsiyet, blast oranı, CD34 durumu, NPM-1 genetik sonuçları, karyotip değerlendirilmesi, CD123, CD25, survivin, Nükleofosmin IHK'sal boyama sonuçları, WBC sayısı, SGRISK grupları ve nüks oranlarının sağkalım süresi üzerine anlamlı etkisi ($p>0,05$) görülmemiştir. LDH seviyesi ve AML tanısının sağkalım süresi üzerine anlamlı ($p<0,05$) etkisi görülmüştür (Tablo 17).

	HR	% 95 Güven Aralığı		p
		En Düşük	En Yüksek	
<i>Tek Değişkenli Sağkalım Analizi</i>				
Yaş	1,02	1,00	1,04	0,052
Cinsiyet	1,07	0,51	2,25	0,853
Blastorani	0,41	0,12	1,34	0,140
CD34	0,78	0,37	1,69	0,534
NPM-1	1,03	0,46	2,31	0,934
Karyotip	0,91	0,39	2,11	0,826
CD123	0,76	0,39	1,50	0,427
CD25	1,49	0,74	3,00	0,268
Survivin	0,98	0,61	1,55	0,915
NPM-1 IHK	1,25	0,62	2,51	0,532
WBC	0,99	0,97	1,01	0,299
LDH	1,00	1,00	1,00	0,039
AML	2,73	1,38	5,42	0,004
SGRISKG	1,85	0,63	5,46	0,265
Nüks	0,53	0,23	1,20	0,126
<i>Çok Değişkenli Sağkalım Analizi</i>				
AML	3,27	1,42	7,53	0,005
LDH	1,00	1,00	1,00	0,002
Cox-Regresyon				

Çok değişkenli modelde LDH ve AML nin etkisi bağımsız olarak ($p<0,05$) devam etmemiştir (Tablo 17).

Tablo 18. İmmünohistokimyasal boyanmaların ön görülen sağkalım oranları

		Ortalama Sağkalım			Medyan Sağkalım			p
		Öngörülen	% 95 G.A.		Öngörülen	% 95 G.A.		
			E.D.	E.Y.		E.D.	E.Y.	
CD123	Zayıf	22,7	15,9	29,6	17,0	9,0	25,0	0,419
	Kuvvetli	23,8	18,7	28,9	23,0	10,0	36,0	
CD25	Zayıf	26,6	20,6	32,6	21,0	14,0	28,0	0,258
	Kuvvetli	18,1	13,0	23,2	19,0	8,8	29,2	
Survivin	Zayıf	25,1	18,1	32,0	21,0	12,7	29,3	0,931
	Orta	19,9	14,9	24,8	20,0	16,2	23,8	
	Kuvvetli	24,8	15,2	34,5				
NPM-1 IHK	Nukleer	25,2	17,8	32,7	21,0	10,5	31,5	0,525
	Sitoplazmik	21,3	16,4	26,2	19,0	12,8	25,2	
Toplam		24,9	20,0	29,8	21,0	17,0	25,0	

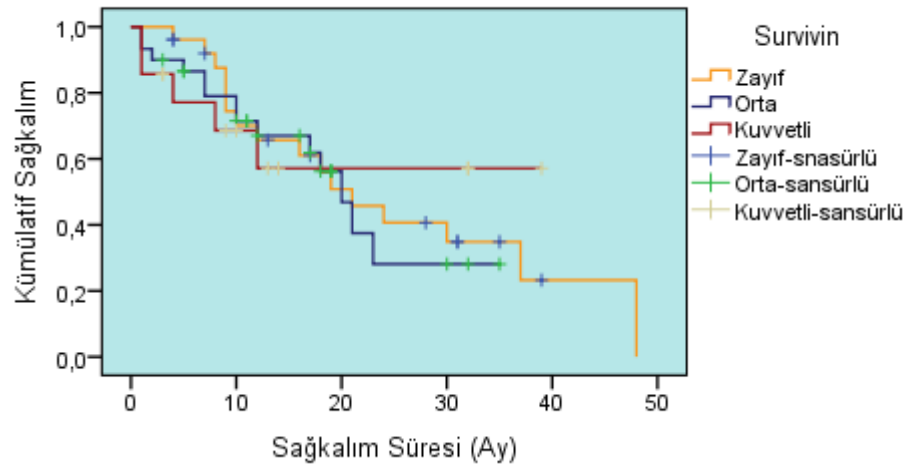
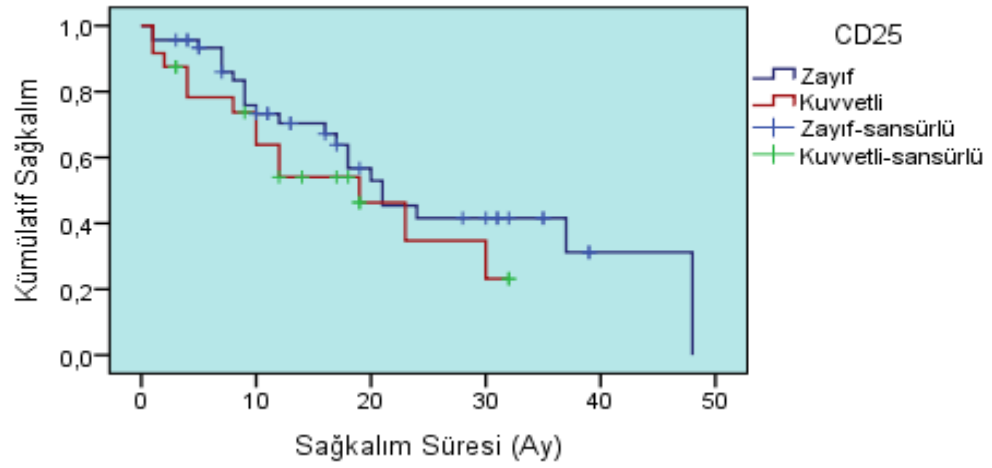
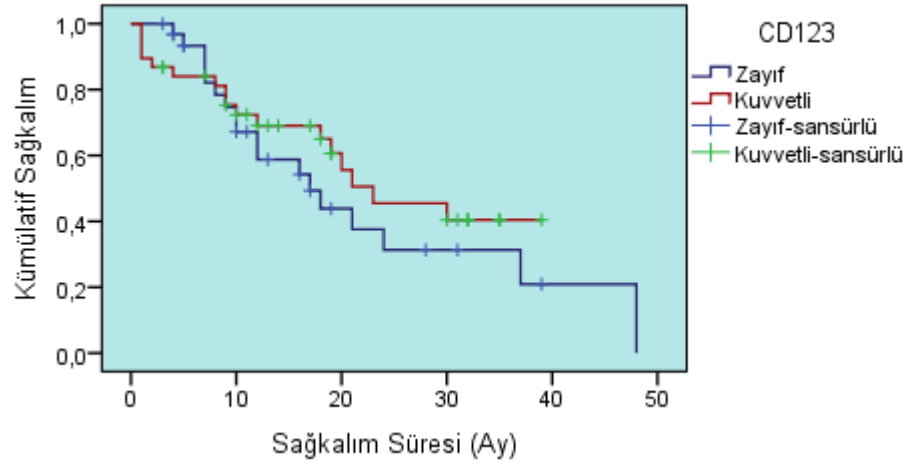
Kaplan Meier (Log-Rank)

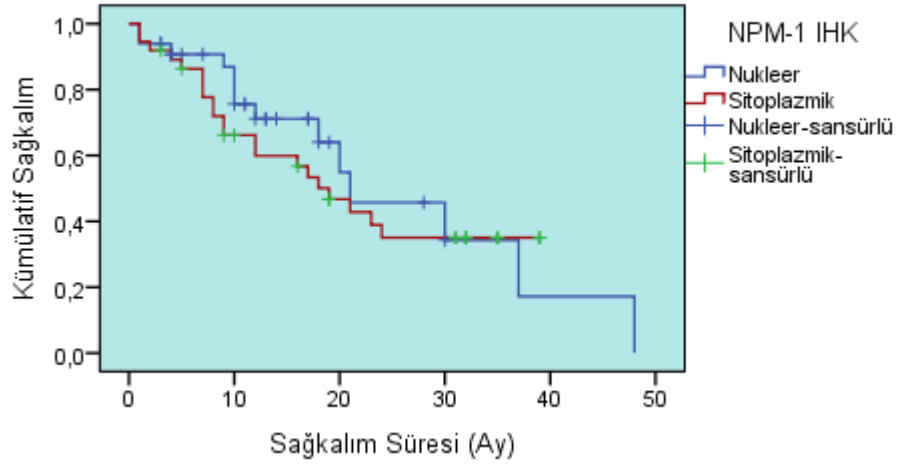
CD123 zayıf boyanma elde edilen [22,7 (15,9-29,6)] ve kuvvetli boyanma elde edilen [23,8 (18,7-28,9)] olan vakalarda öngörülen sağkalım süreleri anlamlı ($p>0,05$) farklılık göstermemiştir.

CD25 zayıf boyanma elde edilen [26,6 (20,6-32,6)] ve kuvvetli boyanma elde edilen [18,1 (13,0-23,2)] vakalarda öngörülen sağkalım süreleri anlamlı ($p>0,05$) farklılık göstermemiştir.

Survivin zayıf boyanma elde edilen [25,1 (18,1-32,0)], orta yoğunlukta boyanma elde edilen [19,9 (14,9-24,8)] ve kuvvetli boyanma elde edilen [24,8 (15,2-34,5)] vakalarda öngörülen sağkalım süreleri anlamlı ($p>0,05$) farklılık göstermemiştir.

NPM IHK'sal olarak NPMc- boyanma elde edilen [25,2 (17,8-32,7)] ve NPMc+ boyanma elde edilen [21,3 (16,4-26,2)] vakalarda öngörülen sağkalım süreleri anlamlı ($p>0,05$) farklılık göstermemiştir (Tablo 18).





Grafik 6, 7, 8, 9. İmmünohistokimyasal boyanma sonuçlarının öngörülen sağkalım oranları

Tablo 19. Vakaların hastalıksız sağkalım oranları

		Ortalama Hastalıksız Sağkalım			Medyan Hastalıksız Sağkalım			p
		Öngörülen	% 95 G.A.		Öngörülen	% 95 G.A.		
CD123			E.D.	E.Y.		E.D.	E.Y.	
CD123	Zayıf	10,7	6,2	15,2	7,0	4,0	10,0	0,578
	Kuvvetli	8,2	6,1	10,2	8,0	5,3	10,7	
CD25	Zayıf	10,2	6,6	13,8	7,0	3,9	10,1	0,573
	Kuvvetli	8,0	5,7	10,3	8,0	5,1	10,9	
Survivin	Zayıf	10,2	5,4	15,1	6,0	1,2	10,8	0,677
	Orta	8,6	6,6	10,7	9,0	6,4	11,6	
	Kuvvetli	7,3	3,8	10,8	8,0	4,2	11,8	
NPM-1 IHK	Nukleer	14,2	8,3	20,0	9,0	7,4	10,6	0,020
	Sitoplazmik	6,8	4,8	8,8	4,0	1,2	6,8	
Toplam		9,6	6,9	12,3	7,0	5,1	8,9	
Kaplan Meier (Log-Rank)								

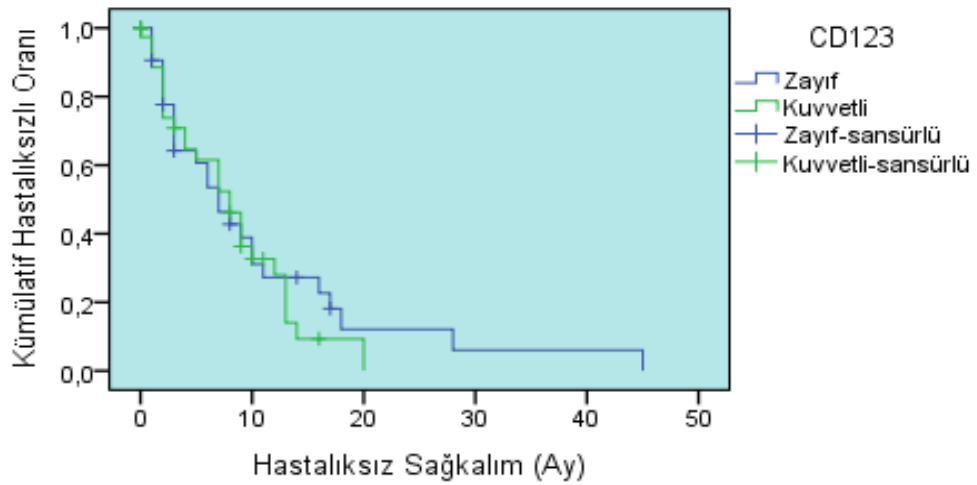
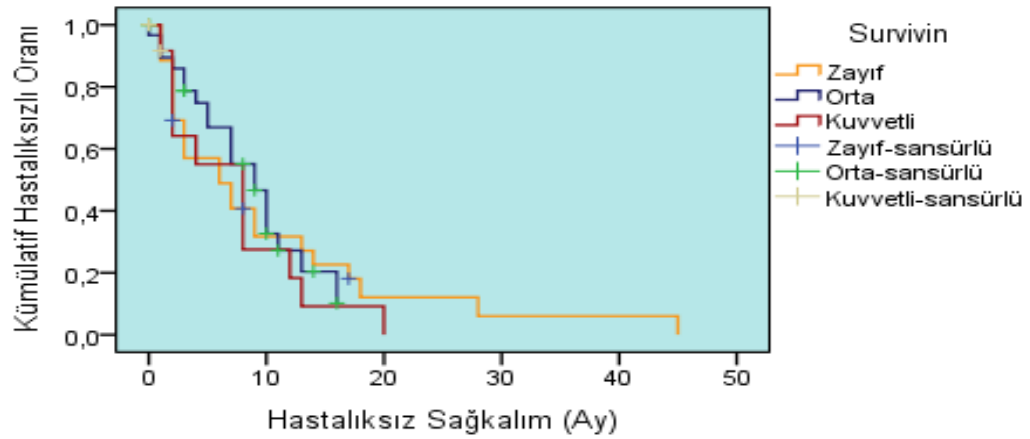
Kaplan Meier (Log-Rank)

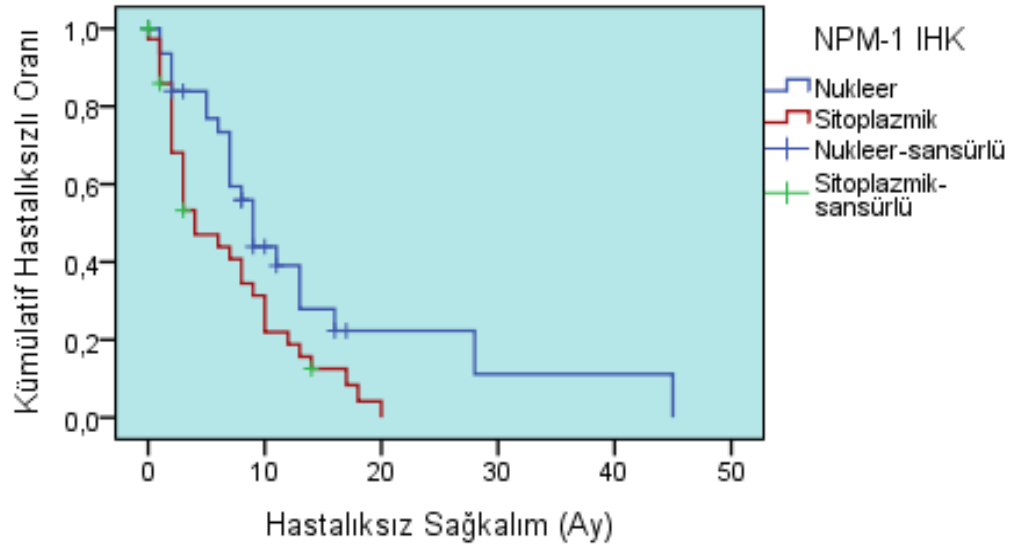
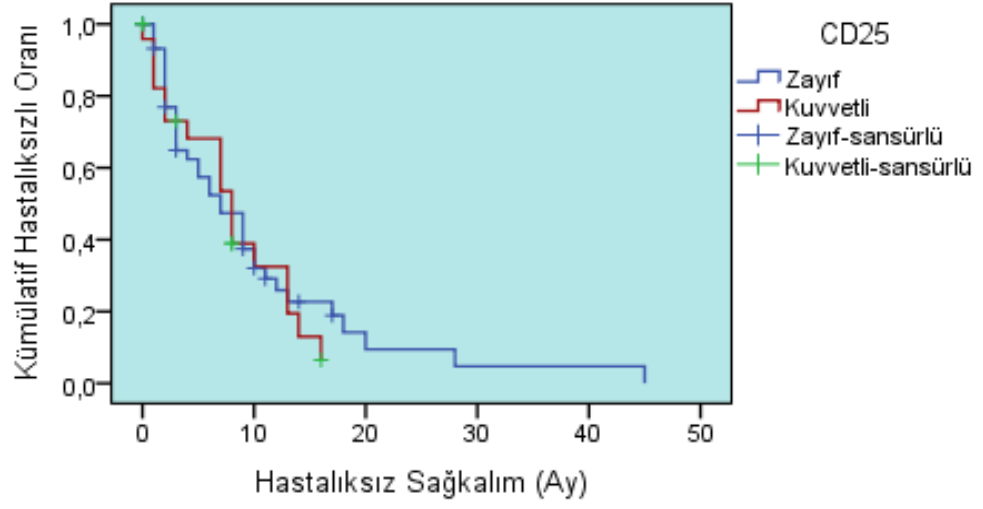
CD123 zayıf boyanma elde edilen [10,7 (6,2-15,2)] ve kuvvetli boyanma elde edilen [8,2 (6,1-10,2)] vakalarda öngörülen hastalıksız sağkalım süreleri anlamlı ($p>0,05$) farklılık göstermemiştir.

CD25 zayıf boyanma elde edilen [10,2 (6,6-13,8)] ve kuvvetli boyanma elde edilen [8,0 (5,7-10,3)] vakalarda öngörülen hastalıksız süreleri anlamlı ($p>0,05$) farklılık göstermemiştir.

Survivin zayıf boyanma elde edilen [10,2 (5,4-15,1)], orta yoğunlukta zayıf boyanma elde edilen [8,6 (6,6-10,7)] ve kuvvetli [7,3 (3,8-10,8)] olan hastalarda öngörülen hastalıksız sağkalım süreleri anlamlı ($p>0,05$) farklılık göstermemiştir.

NPM IHK'sal olarak NPMc- boyanma elde edilen [14,2 (8,320,0)] vakalarda öngörülen hastalıksız sağkalım süreleri, NPMc+ boyanma elde edilen [6,8 (4,8-8,8)] gruptan anlamlı ($p<0,05$) olarak daha yüksekti (Tablo 19).





Grafik 10, 11, 12, 13. Vakaların hastaliksız sağkalım oranları

5. TARTIŞMA

Kan hücreleri az sayıda pluripotent hemapoetik kök hücrelerin kendini yenileme kapasitesinden, hemapoetik progenitör hücrelere diferansiasyonundan ve sürekli devamlılık gösteren maturasyon yollarından oluşmaktadır [81]. Hemapoetik progenitör hücrelerde yaşam, büyüme, diferansiasyon hemapoetik büyüme faktör ağı ya da koloni uyarıcı faktör olarak isimlendirilen büyüme faktörleri ya da interlökinler (IL) aracılığıyla düzenlenir [81]. Akut lösemilerde hücre matürasyonu durur ve kemik iliği mesafesi, periferik kan indifferansiye hücrelerle infiltre olur (81).

AML yetişkinlerde görülen en sık akut lösemidir. Heterojen bir grup hastalıktır, vakaların %30'u tedavi edilebilir özelliktedir [34]. Tüm yetişkin AML vakalarının yaklaşık %27-35'inde NPM-1 gen mutasyonlarına rastlanırken, söz konusu mutasyonları taşıyan AML vakalarının %45-64'ü normal karyotipe sahiptir [32, 34].

NPM, ARF-p53 tümör süpresör yolağı ile düzenlenen nükleositol plazmik mekik dokuyan esas olarak nükleusta lokalize multipl fonksiyonlara sahip proteindir. NPM geninde meydana gelen translokasyonlar nedeniyle NPM proteini sitoplazmaya çıkarak yer değiştirir [32, 34]. NPM exon 12 mutasyonu, NPM proteinin sitoplazmaya yer değiştirmesine neden olur. NPM proteinin C terminal bölgesinde 286 ve 288'inci triptofan bölgesindeki değişiklikler ile NPM mutasyonu oluşur ve NPM proteini sitoplazmaya yer değiştirir [34]. NPM exon 12 mutasyonu adult, normal karyotipli AML vakalarının %50-%60'ında görülür [82]. Normal karyotipli AML vakalarında en sık karşılaşılan mutasyondur [34, 82].

Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) mutasyon analizi ya da gen ekspresyon profili genellikle prognostik/tanı için önemi olan spesifik gen aşırı ekspresyonu tespitinde kullanılır. Bununla birlikte gelişmiş basit, ucuz, spesifik immünolojik testler moleküler çalışmalarda gereklidir. Moleküler çalışmalar için her zaman yeterli materyal elde edilememektedir. Formalin ile tespit olmuş materyalden DNA izolasyonu çok kaliteli olmamaktadır. Bu durum altında formalin ile tespit edilmiş materyalden moleküler anomaliler ile ilişki kurulabilecek IHK'sal belirteçlerin kullanımını zorunlu kılmıştır [67]. IHK'sal değerlendirme moleküler çalışmalar için yeterli ekipman ve yetişmiş eleman olmayan yerlerde, taze dokunun sitogenetik/moleküler çalışmalar için elde edilemediği durumlarda yüksek spesifikliği nedeniyle kullanılabilecek kolay, ucuz bir testtir [82]. NPM IHK'sal olarak tespit edilebilen bir mutasyondur. Bütün AML vakalarında NPM mutasyonu heterozigottur ve wild tip alele sahiptir [82]. Ekzon 12 mutasyonları esas olarak A'dan F'ye kadar sıralanmıştır, son yayınlarda sekiz adet yeni mutasyon tespit edilmiştir [82]. Yaklaşık %80.5 vakada A mutasyonu tespit edilir. IHK'sal olarak NPMc+ olanlar mutasyon açısından anlamlıdır. IHK'sal olarak genetik mutasyon olan vakalarda NPMc+'lığı elde edilememesinin diğer nadir mutasyon alt tipleri ile alakalı olabileceği öngörülmüştür [82]. Çalışmalarda IHK'sal NPMc+'lığının blastik hücrelerde boyanma yoğunluğuna göre derecelendirme yapılmaya çalışılmıştır ancak anlamlı sonuç alınamamıştır [82]. Bizim çalışmamızda da IHK'sal NPMc+ olan vakalar mutasyon açısından pozitif kabul edilmiştir ve boyanma yoğunluğuna göre derecelendirme yapılmamıştır.

Bir çalışma gurubunda NPM mutasyonun IHK'sal olarak kemik iliği aspirasyonlarında tespiti çok güvenilir değildir ancak kemik iliğinden hazırlanan hücre bloğu, yeterli biyopsi yapılamayan durumlarda faydalı olabilir [82].

NPM-1 mutasyonun IHK'sal yöntemle tespiti, 1835 parafine gömülü kemik iliği biyopsi materyalinde çalışılmıştır [34]. Primer AML olan 591 vakanın kemik iliği biyopsilerinde NPMc+ varlığı ve bu durumun klinik, biyolojik özellikleri değerlendirilmiştir [34]. Bu çalışmada primer AML vakalarının 208'inde IHK'sal NPMc+ olarak tespit edilmiştir. Sekonder AML 135 vakada ve 908 diğer hematopoetik hastalık ya da hematopoetik hastalık dışı vakada NPMc+ varlığı tespit edilmemiştir [34]. IHK'sal NPMc+'lığı primer AML vakaları ile yüksek oranda ilişkili bulunmuştur [34].

Bizim çalışmamızda primer AML vakalarında İHK'sal NPMc+'liğı yüksektir. Ancak sekonder AML gurubundaki MDS AML vakalarında diğer sekonder AML gruplarına göre yüksek oranda İHK'sal NPMc+'liğı elde edilmiştir. Ancak çalışmamızdaki MDS AML grubunda genetik olarak NPM mutasyon durumu çalışılmamış olduğundan, İHK'sal NPMc+ boyanması ve genetik olarak mutasyon pozitifliğinin ilişkisi kurulamamıştır. Bu durum sekonder AML vakalarında da MRH takibinde NPMc+/NPMc-'liğinin belirlenmesinin önemli olabileceğini göstermiştir, ancak daha geniş hasta popülasyonlarında çalışmaya ihtiyaç vardır.

Bir başka çalışmada 450 AML vakasında NPMc+'liğı parafin bloklardan yapılan İHK'sal yöntemle değerlendirilmiştir [82]. NPM mutasyonu olan 200 vakada İHK'sal NPMc+'liğı tespit edilmiştir [82]. Ancak 250 vakada NPM mutasyonu olmasına rağmen İHK'sal olarak NPMc- sonuç elde edilmiştir. Diğer bir çalışmada NPM'nin parafin bloklardan elde edilen kesitlerde kuvvetli boyanma gösteren monoklonal antikor klon 322 ve 376 kullanılarak, vakalar FAB alt tipleri, sitogenetik özellikleri ya da moleküler bulguları bilinmeden İHK'sal NPMc+ ve NPMc- olarak sınıflandırılmıştır [34]. Vakaların 161'inde genetik olarak NPM mutasyon varlığı araştırılmıştır, 52 vakada NPM mutasyonu tespit edilmiş, 56 vakada NPM mutasyonu tespit edilememiştir [34]. Genetik olarak NPM mutasyonu tespit edilen bütün vakalarda İHK'sal olarak NPMc+ boyanma elde edilmiştir [34]. Genetik olarak NPM mutasyonu olmayan birkaç vakada İHK'sal NPMc+ boyanması mitozaya giden lösemik hücrelerde tespit edilmiştir [34]. Başka bir çalışma grubu da 119 AML vakasında İHK'sal olarak mutasyon varlığını araştırılmıştır [83]. Bu çalışmada İHK'sal NPMc+'liğı ile genetik mutasyon varlığı yüksek sensitivite ve spesifitede bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da İHK'sal NPM değerlendirmesi için monoklonal antikor klon 376 kullanılmıştır. Çalışmamızda genetik olarak NPM mutasyonu tespit edilen bütün vakalarda İHK'sal NPMc+'liğı elde edilmiştir. NPM-1 mutasyon varlığı ve İHK'sal NPMc+'liğı arasında bizim sonuçlarımızda da yüksek sensitivite ve spesifite görülmüştür.

İHK'sal boyama sonuçlarının değerlendirmesinde farklılıklar olabileceği akılda bulundurulmalıdır. NPM-1 antikor ekspresyonu sonuçlarındaki farklılıklar biyopsi materyallerinin tespiti ile alakalı olabilir [84]. Literatürde B-5 fiksasyon/EDTA dekalsifikasyon ve formalin fiksasyon/formik asit dekalsifikasyon yöntemi kullanılan kemik iliğı biyopsi materyallerinin İHK'sal NPM antikor uygulama sonuçları

karşılaştırıldığında formalin/formik asit kullanılan yöntemle tespit edilen NPMc+ boyanmasının diğer grup kadar yoğun ve güvenilir olmadığı bildirilmiştir [80, 82, 85]. Çalışmamızda formalin fiksasyon/formik asit dekalsifikasyon yöntemi uygulanmıştır ve genetik olarak mutasyon tespit edilen vakaların hepsinde NPMc+ boyanma elde edilmiştir.

Literatürde genel olarak FAB AML alt tiplerinden M3, M4eo, M7'de IHK'sal NPMc+'liği görülmemiştir [34]. En fazla AML M5b, M6, M1, M4'te IHK'sal olarak NPMc+'liği görülmüştür [34]. Ayrıca bir çalışmada literatür ile uyumlu olarak AML FAB alt tiplerinde en sık M5b ve ikinci sırada M5a, M4'te IHK'sal olarak NPMc+'liği elde edilmiştir [36]. Çalışmamızda literatür ile benzer şekilde AML-M3 vakalarında NPM-1 mutasyonuna ve IHK'sal olarak NPMc+ boyanmasına rastlanmamıştır. AML-M2 ve M4 vakalarında genetik olarak NPM-1 mutasyon varlığı ve IHK'sal NPMc+ boyanması diğer gruplara göre daha yüksek oranda tespit edilmiştir [34].

Literatürdeki çalışmada hemapoetik kök hücrelerde görülen CD34 ve CD133 varlığı, bunların IHK'sal NPMc+ boyanma olan vakalarda ki durumu değerlendirilmiştir [34]. IHK'sal NPMc+ boyanma olan vakaların %80'inde CD34 negatif olarak tespit edilmiştir. CD34 negatif vakalarda CD133'de negatiftir [34, 36]. Bizim çalışmamızda IHK'sal NPMc+ boyanma olan vakalarda blast popülasyonunda CD34 çoğunlukla negatifti.

Literatürdeki çalışmalarda genel olarak IHK'sal NPMc+ ve NPMc- boyanma olan vaka grupları arasında cinsiyet ve beyaz küre sayısında belirgin farklılık görülmemiştir [34]. Bazı çalışmalarda ise NPM mutasyonu olan AML vakalarının kadınlarda daha sık olduğu belirtilmektedir [36, 85]. Bizim çalışmamızda IHK'sal NPMc+ boyanma olan grubun erkek cinsiyette olma oranı, IHK'sal NPMc- boyanma olan gruptan daha yüksektir. Genel olarak AML vakaları erkek cinsiyette, kadınlara göre daha fazla oranda görülmektedir [31].

Çalışmamızda IHK'sal NPMc+ ve NPMc- boyanma olan vaka grupları arasında blast popülasyon oranı ve beyaz küre sayısında belirgin farklılık görülmemiştir. NPM mutasyonu olan vakalarda trombosit sayısının özellikle AML M4 alt tipinde yüksek olduğu belirten çalışmalar vardır [37]. NPMc+ AML vakalarında artmış sayıda displastik megakaryosit görülür. Bu durum NPM-1 mutasyonu olan megakaryositlerin

trombositte farklılaşma kapasitesine sahip olduğunu gösterir [37]. Bizim çalışma sonuçlarımızda böyle bir ilişki görülmemiştir.

NPMc+ vakalarda FLT3/ITD mutasyon varlığı, NPMc- vakalardan iki kat fazladır [34]. Bu da NPM ve FLT3 mutasyonu arasında ilişkiyi desteklemektedir [34]. Bizim çalışmamızda IHK'sal NPMc+ boyanma elde edilen vakaların hepsinde FLT3 mutasyonu negatifti. Ancak 470 vakalık seride yaptığımız taramada sadece 3 vakada FLT3/ITD mutasyonu tespit edilmiştir. Bundan dolayı NPM1 mutasyon pozitifliği ile arasında ilişki kurulamamış olabilir.

NPM-1 mutasyon tespitinde IHK'sal yöntem daha ucuz, basit, sensitif, spesifik, biyopsi ile eşzamanlı değerlendirilebilecek, daha kolay ulaşılabilir bir yöntemdir [34]. IHK'sal NPMc+'liği indüksiyon tedavisi ile ilişkisinde FLT3/ITD mutasyon negatifliği önemlidir [34]. Bizim çalışma gruplarımızda FLT3/ITD mutasyon negatif hastalarda IHK'sal olarak NPMc+'liği ve NPMc-'liği ile tedaviye cevap oranları ve hastalıksız sağkalım oranları arasında fark bulunmamıştır. Bu durum çalışma grubumuzda genetik olarak NPM mutasyonu pozitif hasta grubunun, NPM mutasyonu negatif hasta grubundan az sayıda olması ile alakalı olabilir. Literatürde NPM mutasyonu olan, FLT3/ITD negatif vakalarda hastalıksız sağkalım oranı yüksek bulunmaktadır [37, 80].

NPM-1 mutasyonu relaps durumlarında da stabil kalmaktadır. Bu durum riskli AML vakalarında erken nüks tespitinde önemlidir [86].

t-AML vakalarında %10 oranında NPM-1 mutasyonu tespit edilir [86]. Bunu açıklayacak mekanizmalar net değildir. Bizim çalışma grubumuzda az sayıda t-AML vakası bulunmaktadır. Bunların hepsinde NPM-1 mutasyonu genetik ve IHK'sal olarak negatiftir.

AML vakalarında NPM mutasyon varlığı ekstramedüller tutulum ile koreledir [37]. Bu durum NPM-1 mutasyonunun sık görüldüğü AML M4 ve M5'te ekstramedüller tutulumunda sık olması ilgili olabilir [37].

Çalışmalarda NPM mutasyonu, anormal ve normal karyotipli vaka grupları oluşturarak değerlendirilmiştir [86]. Normal karyotipin primer olarak NPM mutasyonu olan, FLT3/ITD(-) vakalarda iyi prognoz üzerine etkisi görülmemiştir. Ancak anormal

karyotipli vakalarda hastaliksız ve genel sağkalım oranı diğer gruba göre önemli derecede düşüktür. Bizim  alışma grubumuzda anormal karyotipli vakalarda hastaliksız ve genel sağkalım oranları diğer gruba göre düşüktür.

NPM-1 mutasyonu normal karyotipli AML vakalarında iyi prognostik belirteçdir. Gelecekte hastalarda kişisel tedavi protokollerinin seçilmesinde ve kime daha agresif tedavilerin uygulanacağının değerlendirilmesinde önemli olacaktır. Spesifik anti-mutant NPM antikörlerinin tespitinin MRH takibi açısından önemli rol oynayacağı düşünülmektedir [37]. şu anda mutasyonun varlığına yönelik hedef tedaviler oluşturulmaya çalışılmaktadır.

Lösemik kök hücre popülasyonu bütün AML alt tiplerinde görülmektedir [54]. Taussing ve arkadaşlarının çalışmaları göstermiştir ki lösemik kök hücrelerin fenotipi tahmin edilenden daha heterojendir [56]. Bu hücreler 1997 yılında Bonnet ve Dick tarafından fenotipik olarak CD34+/CD38- veya CD34+/HLADR- olarak tanımlanmıştır. Bu hücrelerin normal kök hücre popülasyonundan farklılığının, hemapoetik büyüme faktörlerine verdikleri cevapla ilişkili olduğu öne sürülmüştür [52]. Pek çok çalışmada lösemik kök hücrelerin sitokinlere (IL-3, G-CSF, GM-CSF, SCF, FLgibi) verdiği cevaplar araştırılmıştır.

IL 3, regülatuar glikoproteindir. Sağ kalım oranını proliferasyon durumunu ve  nc  hücrelerden değişik hemapoetik seri gelişimini destekler. Normal hematopoezde IL3 sadece hemapoetik öncü hücrelerin proliferasyonunu uyarmaz aynı zamanda apoptozu baskılayarak hücre yaşamının devamlılığını sağlar. CD123 kemik iliğinde multipotansiyel kök/öncü hücrelerde özellikle miyeloid seri hücrelerde nötrofil seri hariç eozinofil ve bazofillerde ekprese edilir. Literatürde yapılan çalışmalarda CD123 ekspresyonu akut lösemi örneklerinde %95 oranında, miyeloid ve B-lenfoid seride %100 oranında tespit edilmiştir. Bu durum l komogenesizde IL3 reseptörünün rolünün olabileceğini desteklemektedir [52].  alışmalar l komogenesiz için iki olayın gerekli olduğunu desteklemektedir. Bunlar, uygunsuz gen ekspresyonu aracılığıyla miyeloid diferansiasyonda duraklama ve IL-3 aracılığıyla progenitor proliferasyonunda artıştır. Bu bilgiler ışığında CD123' n lösemi gelişiminde önemli role sahip olabileceği öngörülmüştür [52]. CD123 AML vakalarında lösemik blastik hücelere proliferasyon aktivitesi kazandırmaktadır [87]. Başka bir çalışmada da MAPK, Akt, STAT5 den

başka kompleks JaK/STAT yolağında fosforilasyon ilişkili moleküllerin CD123 aracılığıyla aktive olduğu gösterilmiştir [52]. Son yapılan araştırmalarda FLT3 mutasyonunun STAT 5 yolağını aktive ettiği bulunmuştur [58].

Akım sitometrik çalışmalar AML vakalarında CD123'ün, CD34+/CD38- vakalarda yüksek oranda eksprese edildiğini göstermiştir [52, 55]. Normal kemik iliğinde elde edilen CD34+/CD38- vakalarda CD123 ekspresyonu tespit edilememiştir [52, 54, 56]. Bu bilgiler ışığı altında özellikle AML vakalarında CD123 belirtecinin primitif lösemik kök hücreleri belirlemekte destek olduğu belirlenmiştir [54, 57, 58]. Bu bilgi hastalarda lösemik öncü hücrelerde CD123'ü hedef alan tedavi belirlemede ileriye yönelik araştırmalara ışık tutmaktadır. Başka bir çalışmada IL3 α R bütün AML alt tiplerinde boyanma göstermiştir. Blast hücre popülasyonunda homojen bir dağılım göstermiştir. Bu çalışmada blastik hücrelerdeki CD123 ekspresyonunun, CD34 pozitifliği /negatifliği arasında farklılık bulunamamıştır. Ayrıca vakalarda PML/RAR α , MLL rearanjmanı, CBF β /MYH11 molekülleri varlığı ile CD123 ekspresyonu arasında farklılık bulunamamıştır [52]. Rollins ve arkadaşlarının çalışmasında DSÖ 2008 sınıflamasına göre AML alt tiplerinin arasında CD123 ekspresyonu ile spesifik korelasyon bulunamamıştır [67].

Bizim çalışma grubumuzda CD123 boyanması görülen gruplarda blast popülasyonunda CD34 pozitifliği ve negatifliği arasında ilişki görülmemiştir. Ayrıca AML alt tipleri ve CD123 ekspresyonu arasında ilişki bulunmamıştır. Bu durum literatür ile uyumludur. CD123 ekspresyonu blast yüzdesi yüksekliği ile önemli oranda koreledir [67, 81, 87]. Çalışmamızda da benzer bulgular elde edilmiştir.

Literatürde CD123 ile normal hemapoetik hücrelerde çok az oranda pozitiflik görülmüştür. Normal hemapoetik prekürsör küçük bir grup sayılmazsa, CD123 miyeloid ve B hücreli lösemik hücrelerde büyük oranda eksprese edilmektedir. Bu durum vakalarda minimal rezidüel hastalık tespiti açısından faydalı olabilir.

AML vakalarında CD123 ekspresyonu normal hemapoetik kök hücrelerle karşılaştırıldığında yüksektir. Bu durum ileride teröpatik tedavi için iyi bir hedef olabileceğini işaret eder [52]. Yapılan son çalışmalar CD34+/CD38- CD123+ vakalarda hastalıksız sağkalım ve genel sağkalım oranının düştüğünü göstermiştir [56]. Bizim çalışmamızda sağkalım oranları ile CD123 arasında ilişki bulunmamıştır.

CD123, AML vakalarında literatürde genellikle akım sitometrik olarak değerlendirilmiştir. IHK'sal boyama sonuçları ile değerlendirme ve AML vakalarında altta yatan FLT3/ITD veya NPM-1 mutasyonları ile korelasyon çalışmaları çok az sayıdadır. Bir çalışmada 157 AML kemik iliği biyopsi materyalleri CD123 ekspresyonu, morfolojik ve immunfenotipik bulguları ile altta yatan FLT3/ITD, NPM1 mutasyonlarının varlığı ya da yokluğu korele edilmeye çalışılmıştır. CD123 ekspresyonu DSÖ 2008 sınıflamasına göre orta risk grubunda değerlendirilen %40 AML vakasında tespit edilmiştir. IHK'sal olarak CD123 pozitif ve negatif gruplar oluşturularak bu gruplar monositik diferansiasyon, blast yüzdesi, CD34 negatifliğine göre karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada %30 AML vakasında IHK'sal olarak tespit edilen CD123 pozitifliği bulunmuştur.

Akım sitometrik olarak yapılan çalışmalarda CD123 ekspresyonunun AML 'de tanı anında yüksek blast oranı ile korele bulunmuştur. Bu durum kötü prognostik etki ile ilişkilidir [67]. CD123 pozitifliğinin NPM-1 ve FLT3/ITD mutasyonları ile korelasyonu bulunamamıştır [67].

Riccioni ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 125 AML vakasında CD123 ekspresyonu araştırılmıştır. 115 AML vakasını normal CD34 pozitif boyanan hücrelerle karşılaştırarak yüksek, orta, düşük olarak üç gruba ayırmışlar. CD34 pozitifliğinin yüksek olduğu (>%95) grupta CD123 seviyesi yüksek bulunmuştur. Bu durum literatürdeki diğer çalışmalarla uyumludur. Ayrıca literatürle uyumlu olarak bu çalışmada da CD123 pozitifliği kötü prognoz ve tedaviye dirençle ilişkilidir [87].

Bizim çalışmamızda CD123 ile genetik mutasyonların ilişkisi çalışılmıştır. CD123 pozitiflik oranı IHK'sal NPMc- vaka grubunda yüksektir. Ancak bu durum çalışma grubumuzun çoğunlukla NPM mutasyonu olmayan vakalardan oluşması ile alakalı olabilir. Ayrıca literatürün aksine CD123 olan vakalarda çalışma grubumuzda CD34 negatifliğinin yüksek olması, çalışma grubunda az sayıda CD34 vaka olması ile alakalı olabilir.

Monositik diferansiasyon oranı CD123 pozitif vakalarda negatif vakalara göre önemli derecede yüksek bulunmuştur. FLT3 mutasyonu olan vakalara göre NPM1 mutasyonu olan vakalarda monositik diferansiasyon oranı yüksektir [67]. Bizim çalışma grubumuzda monositik diferansiasyon olan vakalar diğer AML alt tiplerine göre sayıca

fazladır, ancak CD123 ile elde edilen IHK'sal sonuçlarda AML alt tipleri arasında önemli farklılık bulunmamıştır.

Literatürde yapılan çalışmada blast popülasyonunda CD123 ekspresyonu %20'nin üzerinde olduğunda pozitif kabul edilmiştir. Vakalarda sitoplazmik ve/veya membranöz boyanma paterni pozitif olarak değerlendirilmiştir. En güçlü ekspresyon MDS ilişkili AML vakalarında tespit edilmiştir [67]. Bizim çalışmamızda da CD123 pozitifliği aynı şekilde değerlendirilmiştir. Literatür ile uyumlu olarak CD123 pozitifliği MDS-AML grubunda yüksektir.

Guzman ve arkadaşları, in vitro şartlarda CD34+/CD38-/CD123+ blastik hücre popülasyonunu sahip vakaların tedaviye yüksek oranda direnç gösterdiklerini bildirmişlerdir. Ishikawa ve arkadaşlarının fareler üzerinde yaptığı benzer bir çalışmada da bu hücrelerin apoptozdan korunup, kemorezistan hal aldığını gösterilmiştir. Bu durum hastalarda tedaviye direnç gelişimini öngörerek remisyonların erken tespitinde önemli olabilir [56].

Lan-zhu arkadaşlarının çalışmasında, flöresan aktive hücrelerin sayımı yöntemi kullanılarak MDS vakalarında CD123 pozitifliği, CD34+/CD38- hücrelerde değerlendirilmiştir [57]. MDS vakalarında hastaların kesin tanı alma süresi malign klonu erken teşhis etmek zor olduğundan uzun zaman almaktadır. MDS vakalarında hemapoetik büyüme faktörleri reseptörlerinde anormallikler vardır. MDS prelösemik bir durum olarak tariflenmektedir. AML'de ki lösemik kök hücrelere benzer özellikte MDS hastalarında malign karakterli kök hücrelerin varlığından şüphelenilmektedir. Bu malign kök hücrelerinin AML'ye ilerlemede rol aldığı tahmin edilmektedir. Bu hipotez doğrultusunda bu çalışmada kemik iliğinde CD34+CD38- hücre oranları normal kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. MDS vakalarında bu popülasyon yüksek oranda bulunmuştur. Eşzamanlı bu vakalarda CD123 pozitifliği ile korelasyon yapılmıştır, aynı AML vakalarında olduğu gibi CD123 pozitifliği CD34+CD38- hücre popülasyonunda normal örneklerle karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu bilgiler doğrultusunda MDS'de ki malign kök hücrelerinin lösemik kök hücreler ile benzer olduğu gösterilmiştir. Bu durum MDS hastalarında da CD123'ü hedef alan tedavi seçenekleri için önemlidir. Ayrıca MDS hastalarında erken teşhis içinde kullanılabilir bir bulgudur. Ayrıca MDS vakalarının alt tipleri arasında CD123 ekspresyonu açısından

anlamli bir fark bulunamamıştır [57]. Bizim çalışma grubumuzda MDS RAEB2 vakaları bulunmaktadır. Bu vakalarda CD123 pozitifliği açısından AML grubuna göre önemli derecede farklılık bulunmamıştır.

CD25, IL-2 reseptörünün α zinciridir. CD4 ve CD25 pozitif T regülatuar hücreler immün cevapta önemli role sahiptir. AML ve yüksek dereceli MDS hastalarında T regülatuar hücre popülasyonu kontrol grubuna ve otoimmün hastalık grubu ile karşılaştırıldığında önemli derecede yüksektir [60-63]. CD25 ve CD34 pozitifliği lösemik kök hücrelerde görülmektedir [88].

Literatürde 60 yaş altı, akım sitometrik olarak CD25 pozitif AML vakaları değerlendirilmiştir. CD25 oranı $>10\%$ 'nin üzerinde olduğu vakalarda daha kısa sağkalım oranı vardır. CD25 pozitifliği, FLT3/ITD mutasyonu ile kombine olduğu durumlarda kısa sağkalım oranı ile ilişkilidir [59, 68]. CD25 pozitif hücreler minimal rezidüel hastalık ile ilişkilidir. Bu çalışmada, 60 yaş altı AML vakalarında CD25 pozitifliği bağımsız kötü prognostik veridir [59]. AML FAB alt tipleri ile CD25 pozitiflik yüzdesi arasında ilişki bulunamamıştır [59]. Başka bir çalışmada 657 denovo AML vakasında, CD25 pozitifliği ile somatik mutasyonları olan vakaların 94.7% 'sinde, FLT3/ITD mutasyonu olan vakaların 76% 'sında, NPM1 mutasyonu olan vakaların 46% 'sında korelasyon olduğu gösterilmiştir [68]. CD25 pozitif, FLT3/ITD pozitif grupta eşzamanlı 27% 'lik NPM1 mutasyonu tespit edilmiştir [68]. FLT3 ve CD25 arasındaki ilişki nedeniyle, FLT3/ITD mutasyon analizine göre İHK'sal olarak CD25'in değerlendirilmesi daha kolay elde edilebilir veri olduğundan FLT3 kinaz inhibitörü tedavisi uygulanabilecek hastaları seçmede yardımcı olabilir [68]. Bizim çalışmamızda CD25 pozitif boyanan grupta İHK'sal olarak NPMc+'lığı, NPMc-'lığıne göre yüksektir. Çalışma grubundaki bütün vakalar FLT3/ITD mutasyonu negatifti. Çalışmamızda CD25 boyanması ile prognostik diğer parametreler arasında önemli farklılık görülmemiştir. CD25 pozitifliği sağkalım oranları üzerinde önemli farklılığı yoktur.

Çalışma sonucunda literatürle uyumlu olarak CD25 pozitifliği olan miyeloblastlar, 92% oranında sitogenetik olarak orta risk grubunda ve çoğunlukla normal karyotiptedir. Bu veriler literatürle uyumludur [68].

CD25, lösemik kök hücrelerde boyanması ile CD123 arasında pozitif korelasyon bulunmaktadır [68]. Bizim çalışmamızda da CD25 ile pozitif sonuç elde edilen vakalar ile CD123 pozitif boyanan grup arasında korelasyon bulunmaktadır. Çalışmamızda literatürün aksine AML M3 alt tipinde CD25 ve CD123 ile pozitif boyanma görülmüştür.

Kanser hücrelerinin karakteristik özelliklerinde birisi apoptoza dirençli olmalarıdır. Ayrıca apoptotik yollarındaki kritik defektler tedavi direncinden de sorumlu tutulmaktadır. Survivin bifonksiyonel bir proteindir. Bu proteinin immunohistokimyasal olarak yüksek oranda tespiti; tümör progresyonu, rekürrens, tedaviye direnç, kısa sağkalım oranı ve kötü prognozla ilişkilidir [42, 46]. Normal dokularda survivin ekspresyonu bulunmaz. AML ve MDS vakalarında survivin IHK'sal boyanma yoğunluğu heterojendir.

Literatürde 511 yeni tanı almış AML vakasında periferik kan ve kemik iliği materyallerinde yapılan çalışmada CD34+/CD38- AML kök/öncü hücrelerinde survivin ekspresyon oranı yüksek bulunmuştur. Kemik iliği örneklerinde, periferik kan örneklerine göre daha yüksek oranda survivin ekspresyonu tespit edilmiştir. Yüksek survivin ekspresyonu kısa sağkalım oranları ile ilişkili bulunmuştur. Literatürde FLT3/ITD mutasyonu ile survivinin ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ancak bu çalışmada ilişkili bulunmamıştır [47]. Survivin ekspresyonun yüksek olması lösemik kök hücrelerle ve relaps oranı ile ilişkilidir. Survivin bu özellikleri ile hedef tedavi için önemli bir potansiyele sahiptir [47]. Literatürdeki başka bir çalışmada 142 de novo AML vakasında immünfloresan ve IHK'sal yöntemle survivin ekspresyonunu değerlendirmiştir. Bu çalışmaya AML M3 vakaları dahil edilmemiştir. Survivin pozitif ve negatif gruplar arasında yaş dağılımı arasında fark bulunmamıştır. Survivin ekspresyon oranı AML M2 hasta grubunda, AML MO-M1 vakaları ile karşılaştırıldığında, AML M2 hasta grubunda daha yüksek orandadır. Bu durum survivin ekspresyonunun granülosit maturasyonu ile uyumlu olabileceği ile ilişkilendirilmiştir [48].

Bir başka çalışmada 36 AML, 98 MDS vakasında survivin ekspresyonu IHK'sal olarak değerlendirilmiştir. AML ve MDS vakalarında survivin IHK boyanma yoğunluğu heterojendir. Blastlarda para-perinükleer alanda ya da sitoplazmada diffüz boyanma

paternine sahiptir. Blast popölasyonunda %5'lik boyanma pozitif olarak değerlendirilmiştir. MDS vakalarında yüksek riskli grupta boyanma, düşük riskli gruba göre yüksektir. Bu çalışmada yaş, lökosit sayısı ve karyotip arasında survivin ekspresyonu açısından MDS ve AML vakaları arasında belirgin bir farklılık bulunamamıştır [89]. Bizim alışma grubumuzda survivin ekspresyonu ile blast popölasyonunda CD34 pozitifliği, yaş, WBC sayısı, LDH seviyesi arasında karşılaştırma yapılmıştır. LDH seviyesinin yüksekliği ile survivinin yüksek oranda ekspresyonu arasında anlamlı ilişki bulunmuştur, diğer parametrelerle anlamlı ilişki bulunamamıştır. AML ve MDS RAEB 2 vakaları karşılaştırıldığında, MDS RAEB 2 vakalarında literatürle uyumlu olarak zayıf boyanma oranı yüksektir. Survivin ekspresyonu ile sağkalım oranları arasında anlamlı farklılık görölmemiştir. Çalışma grubumuzda IHK'sal NPMc+'liği, NPMc-'liği olan vakalar ile survivin ekspresyonları arasında ilişki bulunmamıştır. Çalışmamızda ki bütün vakalar FLT3/ITD mutasyonu açısından negatif olduğundan karşılaştırma yapılamamıştır. Çalışma grubumuzda survivin ekspresyonu literatürle uyumlu olarak AML M2 alt tipinde kuvvetlidir.

6. SONUÇLAR

Bu çalışmada 2007-2013 yılları arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi (EÜTF) Patoloji Anabilim Dalı'nda tanı alan 470 AML, MDS vakası retrospektif, sitogenetik ve morfolojik olarak değerlendirilmiştir. Bunların arasından 70 vaka çalışmaya alınmıştır. Bu hastaların klinik özellik ve takipleri EÜTF Hematoloji Bilim Dalı'ndan, genetik verileri Genetik Anabilim Dalı'ndan elde edilmiştir. Materyal ile ilgili bilgiler Patoloji arşiv raporlarından elde edilmiştir. Sitogenetik çalışmaları yapılmış, normal karyotipe sahip, ilave çalışma için parafin bloğunda yeterli doku bulunan vakalar çalışmaya dahil edilmiştir. Bu çalışmada yaş, WBC sayısı, LDH seviyeleri, karyotip analizi, mutasyon varlığı, genetik verilerle IHK'sal boyama sonuçlarının korele edilebilirliği araştırılmıştır. NPM-1 mutasyon tespitinde IHK'sal yöntem daha ucuz, biyopsi ile eşzamanlı değerlendirilebilecek, daha kolay ulaşılabilir bir yöntemdir. Ek olarak aynı vakalarda CD25, CD123 ve survivin antikorları ile IHK'sal boyanma yapılmıştır.

Sonuç olarak,

AML vakaları, en sık erkek cinsiyette görülmüştür.

Daha çok 5.ve 6. dekatta, ortalama olarak 54 yaşta görülmüştür.

Vakaların büyük bölümü normal karyotiplidir.

Vakaların tamamında FLT3/ITD mutasyonu negatifti.

Vakaların %7 'si genetik olarak NPM-1 mutasyonu pozitif.

Vakaların NPM mutasyonu olmayanlara göre %63'ü iyi sitogenetik risk grubunda, %36.8'i orta sitogenetik risk grubundadır.

Vakaların NPM mutasyonu olanlara göre %88.9'u orta sitogenetik grupta, %11.1'i kötü sitogenetik alt gruptadır.

NPM mutasyonu olan vakalarda nüks oranı daha fazladır.

Normal karyotipli, NPM mutasyonu olan ve olmayan vakalar arasında sağ kalım açısından farklılık bulunmamıştır.

IHK'sal olarak NPMc+'liği olan bütün vakalarda genetik olarak NPM-1 mutasyonu tespit edilmiştir.

MDS AML grubunda IHK'sal olarak NPMc+'liği elde edilmiştir.

Lösemik blast popülasyonu vakaların büyük kısmında CD34 ile negatiftir.

CD34 negatif blast popülasyonu olan bütün vakalar IHK'sal olarak NPMc-'dir.

Lösemik blast popülasyonun yüksek olduğu vakalarda CD25, CD123 ile kuvvetli boyanma elde edilmiştir.

LDH seviyesinin yüksek olduğu vakalarda survivin ile kuvvetli boyanma elde edilmiştir.

Sağkalım açısından IHK'sal olarak NPMc+, NPMc-, CD123, CD25 ve survivin arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır.

Vaka gruplarında IHK'sal olarak survivin ile MDS RAEB2 vakalarında zayıf boyanma, diğer gruplarda orta ve kuvvetli yoğunlukta boyanma elde edilmiştir.

Vaka gruplarında IHK'sal olarak CD123 ile MDS-AML grubunda diğer gruplara göre yüksek pozitiflik görülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Brayn I., J.L.H., *What are we anyway? The role of pathologists in the 21st century.* Arch Pathol Lab Med, 2010. **134**(10): p. 1424-6.
2. Zhou, J., A. Orazi, and M.B. Czader, *Myelodysplastic syndromes.* Semin Diagn Pathol, 2011. **28**(4): p. 258-72.
3. Brunning, R.D., *myelodysplastic syndromes,* in *world health organization classification of tumors of haemopoetic and lymphoid tissues,* s.H.S.a. all, Editor. 2008, IARC: Lyon. p. 88-107.
4. Vardiman, J.W., et al., *The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes.* Blood, 2009. **114**(5): p. 937-51.
5. Hasserjian, R.P., *Acute myeloid leukemia: advances in diagnosis and classification.* Int J Lab Hematol, 2013. **35**(3): p. 358-66.
6. Gulley, M.L., T.C. Shea, and Y. Fedoriw, *Genetic tests to evaluate prognosis and predict therapeutic response in acute myeloid leukemia.* J Mol Diagn, 2010. **12**(1): p. 3-16.
7. J.W.Vardiman, R.D.B., D.A.Arber,M.M.Le Beau, *Introduction and overview of the classification of the myeloid neoplasm,* in *WHO Classification of Tumors of Hemapoetic and Lymphoid Tissues,* E.C. Steven H.Swerdlow, Nancy Lee Harris,Elaine S.Jaffe,Stefano A.Pileri, Editor. 2008, International Agency for Research on cancer (IARC): Lyon. p. 18-30.
8. Hess, J.L., *What are we anyway? The role of pathologists in the 21st century.* Arch Pathol Lab Med, 2010. **134**(10): p. 1424-6.
9. Hou, Y., et al., *[Expression of survivin and its location in bone marrow cells of childhood acute leukemia: relationship to therapeutic efficacy].* Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi, 2006. **8**(2): p. 101-4.
10. Rosmarin, A.G., Z. Yang, and K.K. Resendes, *Transcriptional regulation in myelopoiesis: Hematopoietic fate choice, myeloid differentiation, and leukemogenesis.* Exp Hematol, 2005. **33**(2): p. 131-43.

11. junqueira, L.C., *Hematopoez*, in *Temel Histoloji*, P.D.Y. Aytekin, Editor. 1995, Barış Kitapevi: İSTANBUL. p. 235-248.
12. all, R.D.B.a., *Myelodysplastic syndromes*, in *WHO Clasification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, S. H.S., Editor. 2008, IARC: Lyon. p. 88-107
13. Vardiman, J.W., *The new World Health Organization classification of myeloid neoplasms: Q&A with James W. Vardiman, MD*. Clin Adv Hematol Oncol, 2003. **1**(1): p. 18, 21.
14. Bennett, J.M., et al., *Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group*. Br J Haematol, 1976. **33**(4): p. 451-8.
15. Bennett, J.M., et al., *Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes*. Br J Haematol, 1982. **51**(2): p. 189-99.
16. Cazzola, M., et al., *Classification and prognostic evaluation of myelodysplastic syndromes*. Semin Oncol, 2011. **38**(5): p. 627-34.
17. R.D.Brunning , A.O., U.Germing, *Myelodysplastic syndromes/neoplasms*, in *WHO Classification of Tumors of Hemapoetic and Lymphoid Tissues*, E.C. Steven H.Swerdlow, Nancy Lee Harris, Elaine S.Jaffe, Stefano A.Pileri, Editor. 2008, iarc: LYIN. p. 88-93.
18. Dicker, F., et al., *Mutation analysis for RUNX1, MLL-PTD, FLT3-ITD, NPM1 and NRAS in 269 patients with MDS or secondary AML*. Leukemia, 2010. **24**(8): p. 1528-32.
19. Czader, M. and A. Orazi, *World Health Organization classification of myelodysplastic syndromes*. Curr Pharm Des, 2012. **18**(22): p. 3149-62.
20. Piller, G., *Leukaemia - a brief historical review from ancient times to 1950*. Br J Haematol, 2001. **112**(2): p. 282-92.
21. D.A.Arber, R.D.B., A.Orazi, A.Porwit, *Acute myeloid leukaemia ,not otherwise specified*, in *WHO Classification of Tumors of Hemapoetic and Lymphoid Tissues*, E.C. Steven H.Swerdlow, Nancy Lee Harris, Elaine S.Jaffe, Stefano A.Pileri, Editor. 2008, IARC: Lyon. p. 130-139.

22. Thiebaut, A., et al., *Impact of pre-induction therapy leukapheresis on treatment outcome in adult acute myelogenous leukemia presenting with hyperleukocytosis*. Ann Hematol, 2000. **79**(9): p. 501-6.
23. Gralnick, H.R., S. Marchesi, and H. Givelber, *Intravascular coagulation in acute leukemia: clinical and subclinical abnormalities*. Blood, 1972. **40**(5): p. 709-18.
24. O'Regan, S., et al., *Electrolyte and acid-base disturbances in the management of leukemia*. Blood, 1977. **49**(3): p. 345-53.
25. Buchner, T., et al., *Age-related risk profile and chemotherapy dose response in acute myeloid leukemia: a study by the German Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group*. J Clin Oncol, 2009. **27**(1): p. 61-9.
26. Rosnet, O. and D. Birnbaum, *Hematopoietic receptors of class III receptor-type tyrosine kinases*. Crit Rev Oncog, 1993. **4**(6): p. 595-613.
27. Agnes, F., et al., *Genomic structure of the downstream part of the human FLT3 gene: exon/intron structure conservation among genes encoding receptor tyrosine kinases (RTK) of subclass III*. Gene, 1994. **145**(2): p. 283-8.
28. Rasko, J.E., et al., *The flt3/flk-2 ligand: receptor distribution and action on murine haemopoietic cell survival and proliferation*. Leukemia, 1995. **9**(12): p. 2058-66.
29. Naoe, T. and H. Kiyoi, *Normal and oncogenic FLT3*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(23): p. 2932-8.
30. Gilliland, D.G. and J.D. Griffin, *Role of FLT3 in leukemia*. Curr Opin Hematol, 2002. **9**(4): p. 274-81.
31. Foran, J.M., *New prognostic markers in acute myeloid leukemia: perspective from the clinic*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2010. **2010**: p. 47-55.
32. D.A.Arber, R.D.B., M.M.Le Beau,B.Fallini, *Acute myeloid leukaemia with recurrent genetic abnormalities*, in *WHO Classification of Tumors of Hemapoeticand Lymphoid Tissues*, E.C. Steven H.Swerdlow, Nancy Lee Harris,Elaine S.Jaffe,Stefano A.Pileri, Editor. 2008, IARC Lyon. p. 110-123.
33. Falini, B., et al., *Cytoplasmic mutated nucleophosmin is stable in primary leukemic cells and in a xenotransplant model of NPMc+ acute myeloid leukemia in SCID mice*. Haematologica, 2008. **93**(5): p. 775-9.

34. Falini, B., et al., *Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype*. N Engl J Med, 2005. **352**(3): p. 254-66.
35. Marcucci, G., T. Haferlach, and H. Dohner, *Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications*. J Clin Oncol, 2011. **29**(5): p. 475-86.
36. Chen, W., G.Z. Rassidakis, and L.J. Medeiros, *Nucleophosmin gene mutations in acute myeloid leukemia*. Arch Pathol Lab Med, 2006. **130**(11): p. 1687-92.
37. Falini, B., et al., *Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features*. Blood, 2007. **109**(3): p. 874-85.
38. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
39. Fisher, D.E., *Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold*. Cell, 1994. **78**(4): p. 539-42.
40. Hannun, Y.A., *Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy*. Blood, 1997. **89**(6): p. 1845-53.
41. Roy, N., et al., *The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases*. EMBO J, 1997. **16**(23): p. 6914-25.
42. Vassallo, J., et al., *Immunoexpression of Survivin in non-neoplastic lymphoid tissues and malignant lymphomas using a new monoclonal antibody reactive on paraffin sections*. J Hematop, 2010. **3**(1): p. 3-9.
43. Altieri, D.C., *The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy*. Trends Mol Med, 2001. **7**(12): p. 542-7.
44. Mahotka, C., et al., *Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties*. Cancer Res, 1999. **59**(24): p. 6097-102.
45. Yamamoto, T. and N. Tanigawa, *The role of survivin as a new target of diagnosis and treatment in human cancer*. Med Electron Microsc, 2001. **34**(4): p. 207-12.
46. Li, F., *Survivin study: what is the next wave?* J Cell Physiol, 2003. **197**(1): p. 8-29.

47. Carter, B.Z., et al., *Survivin is highly expressed in CD34(+)38(-) leukemic stem/progenitor cells and predicts poor clinical outcomes in AML*. *Blood*, 2012. **120**(1): p. 173-80.
48. Adida, C., et al., *Expression and prognostic significance of survivin in de novo acute myeloid leukaemia*. *Br J Haematol*, 2000. **111**(1): p. 196-203.
49. Altieri, D.C., *Xa receptor EPR-1*. *FASEB J*, 1995. **9**(10): p. 860-5.
50. Ibrahim, A.M., et al., *Study of survivin and X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) genes in acute myeloid leukemia (AML)*. *Lab Hematol*, 2012. **18**(1): p. 1-10.
51. Blalock, W.L., et al., *Signal transduction, cell cycle regulatory, and anti-apoptotic pathways regulated by IL-3 in hematopoietic cells: possible sites for intervention with anti-neoplastic drugs*. *Leukemia*, 1999. **13**(8): p. 1109-66.
52. Jordan, C.T., et al., *The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells*. *Leukemia*, 2000. **14**(10): p. 1777-84.
53. Jin, L., et al., *Monoclonal antibody-mediated targeting of CD123, IL-3 receptor alpha chain, eliminates human acute myeloid leukemic stem cells*. *Cell Stem Cell*, 2009. **5**(1): p. 31-42.
54. Stein, C., et al., *Novel conjugates of single-chain Fv antibody fragments specific for stem cell antigen CD123 mediate potent death of acute myeloid leukaemia cells*. *Br J Haematol*, 2010. **148**(6): p. 879-89.
55. Zhi, L., et al., *Enrichment of N-Cadherin and Tie2-bearing CD34+/CD38-/CD123+ leukemic stem cells by chemotherapy-resistance*. *Cancer Lett*, 2010. **296**(1): p. 65-73.
56. Vergez, F., et al., *High levels of CD34+CD38low/-CD123+ blasts are predictive of an adverse outcome in acute myeloid leukemia: a Groupe Ouest-Est des Leucemies Aigues et Maladies du Sang (GOELAMS) study*. *Haematologica*, 2011. **96**(12): p. 1792-8.
57. Yue, L.Z., et al., *Expression of CD123 and CD114 on the bone marrow cells of patients with myelodysplastic syndrome*. *Chin Med J (Engl)*, 2010. **123**(15): p. 2034-7.
58. Testa, U., et al., *Interleukin-3 receptor in acute leukemia*. *Leukemia*, 2004. **18**(2): p. 219-26.

59. Terwijn, M., et al., *Interleukin-2 receptor alpha-chain (CD25) expression on leukaemic blasts is predictive for outcome and level of residual disease in AML*. Eur J Cancer, 2009. **45**(9): p. 1692-9.
60. Moon, H.W., et al., *CD4+CD25highFoxP3+ regulatory T-cells in hematologic diseases*. Korean J Lab Med, 2011. **31**(4): p. 231-7.
61. Kordasti, S.Y., et al., *CD4+CD25high Foxp3+ regulatory T cells in myelodysplastic syndrome (MDS)*. Blood, 2007. **110**(3): p. 847-50.
62. Wang, X., et al., *Increased population of CD4(+)CD25(high), regulatory T cells with their higher apoptotic and proliferating status in peripheral blood of acute myeloid leukemia patients*. Eur J Haematol, 2005. **75**(6): p. 468-76.
63. Shenghui, Z., et al., *Elevated frequencies of CD4(+) CD25(+) CD127lo regulatory T cells is associated to poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia*. Int J Cancer, 2011. **129**(6): p. 1373-81.
64. Stone, R.M., *Prognostic factors in AML in relation to (ab)normal karyotype*. Best Pract Res Clin Haematol, 2009. **22**(4): p. 523-8.
65. Schlenk, R.F., et al., *Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2008. **358**(18): p. 1909-18.
66. D.A.Arber, R.D.B., A.Orazi,B.J.Bain, *Acute myeloid leukaemia with myelodysplasia- related changes*, in *WHO Classification of Tumors of Hemapoetic and Lymghoid Tissues*, E.C. Steven H.Swerdlow, Nancy Lee Harris,Elaine S.Jaffe,Stefano A.Pileri, Editor. 2008, IARC: Lyon. p. 124-126.
67. Rollins-Raval, M., et al., *CD123 immunohistochemical expression in acute myeloid leukemia is associated with underlying FLT3-ITD and NPM1 mutations*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2013. **21**(3): p. 212-7.
68. Gonen, M., et al., *CD25 expression status improves prognostic risk classification in AML independent of established biomarkers: ECOG phase 3 trial, E1900*. Blood, 2012. **120**(11): p. 2297-306.
69. Fey, M.F., R. Greil, and L.M. Jost, *ESMO Minimum Clinical Recommendations for the diagnosis, treatment and follow-up of acute myeloblastic leukemia (AML) in adult patients*. Ann Oncol, 2005. **16 Suppl 1**: p. i48-9.

70. Creutzig, U. and G.J. Kaspers, *Revised recommendations of the International Working Group for diagnosis, standardization of response criteria, treatment outcomes, and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia*. J Clin Oncol, 2004. **22**(16): p. 3432-3.
71. Estey, E.H., *Acute myeloid leukemia: 2013 update on risk-stratification and management*. Am J Hematol, 2013. **88**(4): p. 318-27.
72. Falini, B., P. Sportoletti, and M.P. Martelli, *Acute myeloid leukemia with mutated NPM1: diagnosis, prognosis and therapeutic perspectives*. Curr Opin Oncol, 2009. **21**(6): p. 573-81.
73. Messner, H.A., *How good is allogeneic transplantation for high-risk patients with AML?* Best Pract Res Clin Haematol, 2006. **19**(2): p. 329-32.
74. Rowe, J.M., *Is there a role for consolidation therapy pre-transplantation?* Best Pract Res Clin Haematol, 2006. **19**(2): p. 301-10.
75. Laggner, H., K. Phillipp, and H. Goldenberg, *Free zinc inhibits transport of vitamin C in differentiated HL-60 cells during respiratory burst*. Free Radic Biol Med, 2006. **40**(3): p. 436-43.
76. Leopold, L.H. and R. Willemze, *The treatment of acute myeloid leukemia in first relapse: a comprehensive review of the literature*. Leuk Lymphoma, 2002. **43**(9): p. 1715-27.
77. Breems, D.A., et al., *Prognostic index for adult patients with acute myeloid leukemia in first relapse*. J Clin Oncol, 2005. **23**(9): p. 1969-78.
78. Weltermann, A., et al., *Impact of cytogenetics on the prognosis of adults with de novo AML in first relapse*. Leukemia, 2004. **18**(2): p. 293-302.
79. Kern, W., et al., *Multivariate analysis of prognostic factors in patients with refractory and relapsed acute myeloid leukemia undergoing sequential high-dose cytosine arabinoside and mitoxantrone (S-HAM) salvage therapy: relevance of cytogenetic abnormalities*. Leukemia, 2000. **14**(2): p. 226-31.
80. Luo, J., et al., *Cytoplasmic expression of nucleophosmin accurately predicts mutation in the nucleophosmin gene in patients with acute myeloid leukemia and normal karyotype*. Am J Clin Pathol, 2010. **133**(1): p. 34-40.

81. Testa, U., et al., *Elevated expression of IL-3Ralpha in acute myelogenous leukemia is associated with enhanced blast proliferation, increased cellularity, and poor prognosis*. Blood, 2002. **100**(8): p. 2980-8.
82. Falini, B., et al., *Immunohistochemistry predicts nucleophosmin (NPM) mutations in acute myeloid leukemia*. Blood, 2006. **108**(6): p. 1999-2005.
83. Woolthuis, C.M., et al., *Nucleophosmin analysis in acute myeloid leukemia from a single center: value of combining immunohistochemistry with molecular mutation analysis*. Haematologica, 2013.
84. Dai, Q. and Y. Ren, *Cytoplasmic expression of nucleophosmin 1 as a marker for diagnosing residual disease of acute myeloid leukemia*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2013. **21**(3): p. 205-11.
85. Mattsson, G., et al., *Can cytoplasmic nucleophosmin be detected by immunocytochemical staining of cell smears in acute myeloid leukemia?* Haematologica, 2010. **95**(4): p. 670-3.
86. Falini, B., et al., *Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): is it a distinct entity?* Blood, 2011. **117**(4): p. 1109-20.
87. Riccioni, R., et al., *Immunophenotypic features of acute myeloid leukemias overexpressing the interleukin 3 receptor alpha chain*. Leuk Lymphoma, 2004. **45**(8): p. 1511-7.
88. Cerny, J., et al., *Expression of CD25 independently predicts early treatment failure of acute myeloid leukaemia (AML)*. Br J Haematol, 2013. **160**(2): p. 262-6.
89. Invernizzi, R., et al., *Survivin expression in acute leukemias and myelodysplastic syndromes*. Leuk Lymphoma, 2004. **45**(11): p. 2229-37.

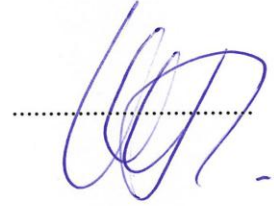
T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr. Melike ORDU'ya ait “Akut Myleoid Lösemi Hastalarında Prognostik Belirteçlerin İmmünohistokimyasal Yöntemlerle Değerlendirilmesi” adlı çalışma, jürimiz tarafından Patoloji Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih : 27/11/2013

İmza

Başkan : Prof. Dr. Turhan OKTEN



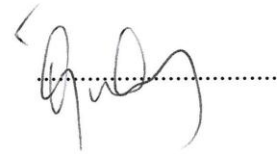
Üye : Prof. Dr. Süleyman BALKANLI



Üye : Prof. Dr. Figen ÖZTÜRK



Üye : Prof. Dr. Özlem CANÖZ



Üye : Doç. Dr. Kemal DENİZ

