

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**AKUT MYELOBLASTİK LÖSEMİ HASTALARINDA
NÜKLEOFOSMİN MUTASYONU MİNİMAL REZİDÜEL
HASTALIK TAKİBİNDE YOL GÖSTERİCİ MİDİR?**

Dr. Edip HAYZARAN

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Sinem CİVRİZ BOZDAĞ**

**ANKARA
2020**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**AKUT MYELOBLASTİK LÖSEMİ HASTALARINDA
NÜKLEOFOSMİN MUTASYONU MİNİMAL REZİDÜEL
HASTALIK TAKİBİNDE YOL GÖSTERİCİ MİDİR?**

Dr. Edip HAYZARAN

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Sinem CİVRİZ BOZDAĞ**

**ANKARA
2020**

KABUL VE ONAY

Düzenleme tarihi: 24/12/2014

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN	
Adı, Soyadı : Dr. Edip Hayzaran	Sınav tarihi: 17 /01 / 2020
Anabilim/Bilim Dalı : İç Hastalıkları A.B.D.	
Tez Danışmanı : Doç. Dr. Sinem Civriz Bozdağ	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER	
Tezin Başlığı: Akut Myeloblastik Lösemi Hastalarında Nükleofosmin Mutasyonu Minimal Rezidüel Hastalık Takibinde Yol Gösterici midir?	
Tezin Niteliği:	☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi ☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi
Kaçıncı tez sınavı olduğu:	☐ 1 ☒ 2 ☐ 3

III. KARAR	
Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak	
☒ Kabulüne	
☐ Reddine	
☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine	
☒ Oy birliği ☐ Oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

IV. AÇIKLAMALAR	
Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız	

Prof. Dr. Hamdi AKAN
Jüri Başkanı
Hematoloji Bilim Dalı

Doç. Dr. Selami Koçak TOPRAK
Jüri Üyesi
Hematoloji Bilim Dalı

Doç. Dr. Sinem CİVRİZ BOZDAĞ
Jüri Üyesi
Tez Danışmanı
Hematoloji Bilim Dalı

TEŞEKKÜR

Bu tezin yürütülmesi sürecinde benimle deneyimlerini paylaşan, yardım ve desteğini her zaman hissettiğim, bilgeliği ile daima yoluma ışık tutan saygıdeğer tez danışmanım Doç. Dr. Sinem CİVRİZ BOZDAĞ'a

Hematoloji laboratuvarındaki araştırma sürecinde yardımlarını esirgemeyen Biyolog A. Kübra EREN'e

Çağdaş bir ortam sunarak nitelikli bir uzmanlık eğitimi almamda büyük payı olan dekanımız Prof. Dr. Gülfem Elif ÇELİK, dekan yardımcılarımız Prof. Dr. Kenan ATEŞ ve Prof. Dr. Pelin ARIBAL AYRAL'a;

İç Hastalıkları uzmanlık eğitimim sürecinde üzerimdeki emeği yadsınamaz tüm hocalarıma;

Asistanlık sürecine birlikte başlayıp tamamladığımız, eş kıdemlilerim başta olmak üzere birlikte çalışma fırsatı bulduğum asistan arkadaşlarıma ve uzmanlarıma;

Anneme ve kardeşime içtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Edip HAYZARAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
TABLolar DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. AKUT MYELOİD LÖSEMİ	2
2.1.1. Epidemiyoloji	2
2.1.2. Klinik Prezantasyon	3
2.1.3. Morfoloji	3
2.1.4. Sınıflandırma	4
2.1.5. Prognostik Faktörler	5
2.2. NÜKLEOFOSMİN GENİ VE PROTEİNİ	6
2.2.1. AML’de NPM1 Mutasyonu’nun Keşfi	7
2.2.2. NPM1 Mutasyonları’nın Karakteristikleri	7
2.2.3. NPM1+ AML’nin Patolojik ve Klinik Özellikleri	8
2.3. AKUT MYELOİD LÖSEMİDE TEDAVİ	9
2.3.1. İndüksiyon	9
2.3.2. Konsolidasyon	9
2.3.3. Nüks Hastalıkta Tedavi	10
2.4. AML’DE ÖLÇÜLEBİLİR KALINTI HASTALIK.....	10
2.4.1. Ölçülebilir Kalıntı Hastalık Tespiti	11
2.4.1.1. Multiparametrik Akım Sitometri.....	11
2.4.1.2. Kantitatif PCR (qRT-PCR)	12
2.4.1.3. Yeni Nesil Dizileme (NGS)	13
2.4.4. MRH Tespitinde NPM1 Mutasyonlarının Yeri.....	13

3. GEREÇ	VE
YÖNTEM	15
3.1. İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER	16
4. BULGULAR.....	17
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	32
ÖZET.....	37
SUMMARY	38
KAYNAKLAR	39



KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AHKHN	: Allojenik hematopoetik kök hücre nakli
ALK	: Anaplastik Lenfoma Kinaz
AML	: Akut Myeloid Lösemi
AML-NK	: Normal Karyotipli Akut Myeloid Lösemi
CBF	: Core Binding Faktör
CEBPA	: CCAAT/enhancer-binding protein alfa
dd-PCR	: Dijital damlacık polimeraz zincir reaksiyonu
DfN	: Normalden farklı
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
ELN	: Avrupa Lösemi Ağı
FAB	: Fransız-Amerikan-İngiliz
FLT3	: FMS-Benzeri Tirozin Kinaz 3
G-CSF	: Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör
HCT-CI	: Hematopoetik Hücre Nakli Komorbidite İndeksi
HLA	: İnsan Lökosit Antijeni
IDH	: İzositrat dehidrogenaz
ITD	: İnternal tandem duplikasyonu
kDa	: Kilodalton
LDH	: Laktat dehidrogenaz
MDS	: Myelodisplastik sendrom
MFC	: Multiparametrik akım sitometri
MRH	: Ölçülebilir kalıntı hastalık
NGS	: Yeni nesil dizileme
NPM1	: Nükleofosmin geni
NPM1+	: Nükleofosmin geni izlenen
NPM	: Nükleofosmin proteini
NPMc-	: Nükleusa sınırlı nükleofosmin proteini
NPMc+	: Sitoplazmik nükleofosmin proteini
qRT-PCR	: Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

SEER	: Sürveyans Epidemiyoloji ve Sonuçlar
TdT	: Terminal deoksinükleotidiltransferaz
TY1	: İlk tam yanıt
TY	: Tam yanıt
TYMRH-	: Ölçülebilir kalıntı hastalık olmayan tam yanıt
TYMRH+	: Ölçülebilir kalıntı hastalık ile tam yanıt



TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 2.1. DSÖ 2016 AML Sınıflandırması	4
Tablo 2.2. 2017 ELN AML’de Genetik Risk Sınıflandırması	5
Tablo 4.1. Hastaların demoŞekil, klinik, genetik özellikleri	17
Tablo 4.2. Hastaların tedavi ilişkili özellikleri.....	18
Tablo 4.3. Tedavi modalitesinin tedavi aşamalarındaki tedaviye yanıt oranları	19
Tablo 4.4. Tüm hastaların çoklu değişkenlere göre genel sağkalım analizi	23
Tablo 4.5. Tüm hastaların çoklu değişkenlere göre progresyonsuz sağkalım analizi.....	24
Tablo 4.6. Kemoterapi rejimi ve akım sitometrik MRH durumuna göre tedavi aşamalarında NMP1 değerleri.....	25
Tablo 4.7. Kemoterapi rejimi ve akım sitometrik MRH durumuna göre tedavi aşamalarında NMP1 değişimleri.....	26

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No:
Şekil 4.1.	Hastaların progresyonsuz sağkalım eğrisi..... 20
Şekil 4.2.	Hastaların genel sağkalım eğrisi 20
Şekil 4.3.	Hastaların FLT3 ITD durumuna göre progresyonsuz sağkalım eğrisi..... 21
Şekil 4.4.	Hastaların FLT3 ITD durumuna göre genel sağkalım eğrisi 21
Şekil 4.5.	Hastaların tedavi grubuna göre genel sağkalım eğrisi 22
Şekil 4.6.	Hastaların yaşa göre genel sağkalım eğrisi 22
Şekil 4.7.	Hastaların tanı anı ile indüksiyon sonu NPM1 düzeyinin logaritmik değişimi 27
Şekil 4.8.	İntensif tedavi alan hastaların tanı anı ile indüksiyon tedavisi sonu NPM1 değeri farkının MRH varlığı ile ilişkisi..... 28
Şekil 4.9.	İntensif tedavi alan hastaların tanı anı ile 2. konsolidasyon tedavisi sonu NPM1 değeri farkının MRH varlığı ile ilişkisi 28
Şekil 4.10.	İntensif tedavi alan hastaların tanı anı ile 4. konsolidasyon tedavisi sonu NPM1 değeri farkının MRH varlığı ile ilişkisi 29
Şekil 4.11.	İntensif tedavi alan hastaların tanı anı ile indüksiyon sonu NPM1 değişiminin sağkalım eğrisi..... 30
Şekil 4.12.	İntensif tedavi alan hastaların tanı anı ile 2. konsolidasyon sonu NPM1 değişiminin sağkalım eğrisi..... 30
Şekil 4.13.	İntensif tedavi alan hastaların tanı anı ile 4. konsolidasyon sonu NPM1 değişiminin sağkalım eğrisi..... 31

1. GİRİŞ

Akut myeloid lösemi (AML), yetişkinlerde en sık görülen akut lösemi olup genetik olarak oldukça heterojen bir hastalıktır. Günümüze kadar yapılan birçok çalışmada hastaların sitogenetik profillerinin prognozlarını belirlediği ortaya konmuştur. Ancak bugün, sitogenetik anomalilere ek olarak çok sayıda moleküler genetik belirtecin tedavi ve prognoz için oldukça önemli olduğu görülmektedir.

Nükleofosmin (NPM1) geninin ekzon-12 bölgesinde meydana gelen mutasyonlar, AML vakalarının yaklaşık üçte birinde, normal karyotipli yetişkin AML vakalarının ise %60'ında izlenmektedir. Bu grupta indüksiyon tedavisine daha iyi yanıt gözlenmiştir ve NPM1 mutant olmayan normal karyotipli AML'den daha uzun süreli sağkalım gösterdiği görülmektedir.

Yapılan çalışmalarda NPM1 mutasyonu saptanmış AML hastalarında, mutasyona uğramış transkriptlerin sayısı dolayısıyla tanındaki tümör yükü ile indüksiyon tedavisine yanıt arasında yakından ilişki olduğu görülmüştür. Remisyon indüksiyon tedavisi sonrası remisyonda olduğu izlenen hastaların NPM1 kopya sayısında belirgin azalma görüldüğü bilinirken, tedaviye refrakter hastalarda ise kopya sayısında azalma olmadığı görülmüştür.

Akut myeloid lösemi hastalarında ölçülebilir kalıntı hastalığın takip ve tedavi sürecindeki yeri yapılan çalışmalar ile araştırılmaktadır. Akım sitometri ile mi yoksa moleküler belirteçlerin takibinin mi daha değerli olduğu ise tartışılan bir diğer konudur. AML hastalarında iyi prognostik bir belirteç olarak bilinen NPM1'in hangi dönemde, hangi yöntemle takip edilmesi gerektiği belirli bir eşik değerini mi alınmasının yoksa log değerlerinde azalmanın mı daha değerli olduğu ise tartışılan konular arasındadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. AKUT MYELOİD LÖSEMI

Akut myeloid lösemi (AML), kemik iliği ve periferik kandaki diferansiye olamayan myeloid öncüllerin klonal artışı ile karakterize heterojen bir hematolojik malignitedir. Bundan elli yıl önce tedavi başarısı çok düşük olan bu hastalığın artık 60 yaş ve altındaki erişkinlerin %35-40'ında ve 60 yaş üzeri hastaların % 5-15'inde uzun süreli sağkalım elde edilebildiğini görmekteyiz [1].

AML'nin sitogenetik çeşitliliği 30 yılı aşkın bir süredir bilinmekle birlikte, hastalığın muazzam moleküler çeşitliliği son 15-20 yılda giderek daha da belirginleşmiştir. Bu biyolojik heterojenitenin prognostik önemi iyi bilinmekte iken bu verilerin geliştirilen tedavilere yansımaları yakın geçmişte başlamıştır [2].

2.1.1. Epidemiyoloji

2016'da ABD'de SEER verilerine göre AML'nin yaşa göre düzeltilmiş insidansı 100.000'de 4,3 olarak saptanmıştır. Avrupa, Kanada ve Avusturalya incelemelerinde de benzer sıklık oranları bulunmuştur [3, 4].

AML öncelikle yaşlı yetişkinlerin hastalığıdır. 65 yaş ve üstü olanlar için yaşa göre düzeltilmiş insidans 100.000'de 20.1 iken, <65 yaş popülasyonda 100.000'de 2.0'dır. SEER 2011-2016 verilerine dayanarak yapılan analizde AML tanısında ortalama yaşın 68 olduğu görülmüştür. ABD ile birlikte Kanada, Avustralya ve İsveç'ten bildirilen ortalama yaş ise 63 ile 71 arasında değişmektedir [3, 4].

Cinsiyete göre değerlendirildiğinde ABD, İngiltere, Kanada, Danimarka, Avustralya ve Cezayir'deki popülasyona dayalı çalışmaların da kanıtladığı gibi, erkeklerde yaşam boyu AML gelişme olasılığı kadınlara kıyasla 1.2-1.6 kat daha fazladır [4].

2.1.2. Klinik Prezantasyon

AML'nin klinik belirti ve semptomları çeşitli ve nonspesifiktir, ancak bunlar genellikle kemik iliğinin lösemik infiltrasyonuna bağlı ortaya çıkan ve sonucunda görülen sitopenilere doğrudan atfedilir. Tipik olarak, hastalar sırasıyla, trombosit, eritrosit veya lökosit sayılarında düşme nedeniyle kanama, yorgunluk veya enfeksiyon belirti ve semptomları gösterirler. Solukluk, halsizlik ve eforla dispne sık görülür. Karaciğer (hepatomegali), dalak (splenomegali), lenf nodları (lenfadenopati), kemik (kemik ağrısı), cilt (lökemia kutis), diş eti ve santral sinir sistemi dahil olmak üzere çeşitli dokuların ve organların lösemik infiltrasyonu, farklı başka semptomlar ortaya çıkartabilir. İzole bir lösemik blast kütleli genellikle agranülositik sarkom olarak adlandırılır. Hiperlökositoz (>100.000 hücre/ m^3 lökosit), oküler ve serebrovasküler disfonksiyon veya kanama gibi lökostaz semptomlarına neden olabilir. Prezantasyonda nadiren bulunsa da, hiperürisemi ve hipokalsemi gibi metabolik anormallikler olabilir [5].

2.1.3. Morfoloji

Kemik iliği aspirasyon ve biyopsisi yapılarak morfolojik, immunfenotiplendirme, immunhistokimyasal ve genetik çalışmalar bir araya getirilir; böylece tanı, sınıflandırma ve risk belirlenmesi gerçekleştirilir.

Tanı için morfolojik olarak kemik iliği veya periferik kanda $>20\%$ blast görülmelidir. Myeloblastlar lenfositlerden daha büyük olan, birkaç çekirdekçik içeren iri çekirdekli hücrelerdir. İmmunfenotipik olarak CD13, CD33 ve CD34 dahil, sağlıklı immatür myeloid hücrelerinde de bulunan antijenler eksprese edilir [6]. Diğer hücre belirteçleri, AML'nin morfolojik alt tipine -monositik (CD4, CD14, CD11b), eritroid (CD36, CD71) ve megakaryosit (CD41a ve CD61) belirteçlerinden- ve farklılaşma aşamasına bağlı olarak eksprese edilir. Ayrıca, bazen AML blastları, TdT, HLA-DR, CD7 ve CD19 da dahil olmak üzere T veya B hücre kökenlerine özgü antijenleri birlikte eksprese edebilir [7].

2.1.4. Sınıflandırma

Yıllar içerisinde AML için etiyoloji, morfoloji, immünofenotip ve genetiğe dayalı çeşitli sınıflandırma sistemleri olmuştur. 1970'lerde AML, sekiz ana AML alt tipini (FAB M0 ila M7) tanımlamak için çoğunlukla morfoloji ve immünofenotip / sitokimyasal kriterler kullanılarak Fransız-Amerikan-İngiliz sınıflandırma sistemine göre sınıflandırılmıştır [8]. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) AML sınıflandırması, eski Fransız-Amerikan-İngiliz sınıflandırma sisteminin günümüzde yerini almış ve bugün AML sınıflandırmasının temel yöntemi haline gelmiştir. DSÖ sınıflandırması 2016 yılında güncellenmiştir. Bu sınıflandırma Tablo 2.1'de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. DSÖ 2016 AML Sınıflandırması [9]

Tekrarlayan genetik anomalilerle ilişkili AML
- t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1 ile ilişkili AML
- inv(16)(p13.1;q22) veya t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11 ile ilişkili AML
- t(15;17)(q22;q12); PML-RARA ile ilişkili AML
- t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL ile ilişkili AML
- t(6;9)(p23;q34) DEK-NUP214 ile ilişkili AML
- inv(3)(q21;q26.2) veya t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1 ile ilişkili AML
- t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1 ile ilişkili AML (megakaryoblastik)
- NPM-1 mutasyonu ile ilişkili AML
- CEBPA mutasyonu ile ilişkili AML
Myelodisplazi ile ilişkili değişikliklerle giden AML
Terapi ile ilişkili AML
AML, sınıflandırılmayan grup
-Minimal diferansiyasyon ile AML
-Maturasyon olmaksızın AML
-Maturasyon ile birlikte AML
-Akut myelomonositik lösemi
-Akut monoblastik ve monositik lösemi
-Akut eritroid lösemi
-Akut megakaryoblastik lösemi
-Akut bazofilik lösemi
-Myelofibrosis ile giden akut panmyelozis
Myeloid Sarkom
Down sendromu ile ilişkili myeloid proliferasyon
-Geçici anormal myelopoezis
-Down Sendromu ile ilişkili myeloid lösemi

2.1.5. Prognostik Faktörler

Prognostik faktörler, hastaya bağlı ve hastalıkla ilgili olarak ayrılabilir. Hastaya bağlı faktörler (örneğin, artan yaş, eşlik eden hastalıklar ve düşük performans durumu) genellikle tedaviyle ilişkili erken ölümü öngörürken, hastalıkla ilgili faktörler (örneğin, lökosit sayısı, öncesinde MDS varlığı veya başka bir hastalık için sitotoksik ajan maruziyeti ve lösemik hücre genetik değişiklikleri) mevcut standart tedaviye direnci öngörebilir. Birçok yaşlı hastada destek tedavideki belirgin gelişmeler nedeniyle, tedaviye bağlı ölüm oranı son yıllarda anlamlı ölçüde azalmıştır [10].

AML, prognostik olarak önemli olan sitogenetik, moleküler ve klinik bulgulara göre kategorize edilir. ELN tarafından geliştirilen ve hastaları iyi, standart ve kötü risk gruplarına ayıran prognostik yaklaşım ve sınıflandırma sistemi güncel olarak tercih edilmektedir (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. 2017 ELN AML’de Genetik Risk Sınıflandırması [11]

İyi risk
t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1
inv(16)(p13.1;q22) or t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11
NPM1 mutasyonu (Düşük veya negatif FLT3-ITD ile)
Biallelik mutant CEBPA
Orta risk
NPM1 mutasyonu (Yüksek derecede FLT3-ITD ile)
Wild-type NPM1 (Düşük veya negatif FLT3-ITD ile)
t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A
Düşük ya da yüksek risk olarak sınıflandırılmamış genetik anomaliler
Kötü risk
t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214
t(v;11q23.3); KMT2A rearanjmanı ile
t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1
inv(3)(q21.3;q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM (EVI1)
Monozomi 5 ya da del(5q); monozomi 7; monozomi 17/abn(17p)
Kompleks karyotip, monozomal karyotip
Wild-type NPM1 (Yüksek derecede FLT3-ITD ile)
RUNX1 mutasyonu
ASXL1 mutasyonu
TP53 mutasyonu

2.2. NÜKLEOFOSMİN GENİ VE PROTEİNİ

Nükleofosmin geni, insan genomunda kromozom 5q35 'te bulunmakta olup, 12 ekzon barındırmaktadır [12]. Bu gen B23.1, B23.2 ve B23.3 olmak üzere 3 alternatif nükleofosmin izoformunu kodlar. B23.1 yaygın izoform olup, çok sayıda fonksiyonel alana sahip olan yaklaşık 37kDa'lık, 294 aminoasitten oluşan bir proteindir [13-15]. Ayrıca B23.1 çift taraflı nükleer lokalizasyon sinyali (NLS), lösinden zengin nükleer eksport sinyali (NES) motifleriyle birlikte sentrozomlar ve subnükleer kompartmanlarla ilişkisini düzenleyen birkaç fosforilasyon bölgesi içerir [14-18].

NPM, nükleolusun granüler bölgesinde yer almasına rağmen, sürekli olarak çekirdek ve sitoplazma arasında gidip gelir [19, 20]. NPM'nin bu nükleositoplazmik trafiği katı bir şekilde düzenlenir, çünkü ribozom bileşenlerinin sitoplazmaya taşınması ve sentrozom çoğalmasının kontrolü de dahil olmak üzere önemli NPM fonksiyonları, farklı subselüler bölmelere aktif olarak hareket etme kabiliyeti ile yakından ilişkilidir [17, 18].

NPM, matür ribozomlara doğrudan erişebildiği ve protein translasyonunu potansiyel olarak düzenleyebildiğinden, protein sentezi, hücre büyümesi ve çoğalmasını dengelemede merkezi bir rol oynadığı düşünülmektedir [18]. Ek olarak, NPM aşırı ekspresyonu, stres koşullarında hematopoetik kök hücrelerin hayatta kalmasını ve onarılmasını destekler [21]. Malign hücrelerdeki yüksek NPM düzeyleri, ribozomlar aracılığı ile anormal hücre büyümesini teşvik eder. Bunun tersine, NPM kaybı veya NPM mekiğinin inhibisyonu, protein translasyonunu bloke eder ve hücre döngüsünü durdurabilir [18]

Ayrıca NPM, mitoz sürecinde DNA onarımını ve sentrozom replikasyonunu kontrol ederek genomik stabiliteyi korur [22-25]. Dahası, NPM p53 ve p19Arf gibi onkösüpresör genlerle etkileşime girerek de hücre çoğalması ve apoptozu kontrol eder [26].

2.2.1. AML’de NPM1 Mutasyonu’nun Keşfi

Öncelikle anaplastik büyük hücreli lenfomalı hastalarda NPM-ALK füzyon proteini nedeniyle, bu lenfomanın normal dokularda olduğu gibi nükleolusun yerine sitoplazmada NPM ekspresyonu gerçekleştiği gösterilmiştir [27, 28]. Ardından anormal sitoplazmik NPM proteinine ilişkin çalışmalar lösemiler de dahil olmak üzere bir dizi insan tümörünü de kapsayacak şekilde genişletilmiş ve 1999’da sitoplazmik NPM’li ilk AML vakası saptanmış ve onlar nükleus sınırlı NPM ekspresyonunu gösteren NPMc- AML’den ayırt edilmesi için NPMc+ AML olarak adlandırılmıştır. Ek olarak NPMc+ saptananlarda majör kromozomal anormallikleri içermemesi, normal karyotip ile yakından ilişkili olduğu da gözlenmiştir [29].

2.2.2. NPM1 Mutasyonları’nın Karakteristikleri

NPM1 mutasyonları AML’ye spesifik olarak değerlendirilir, çünkü diğer insan neoplazmlarında sürekli nükleusa sınırlı NPM ekspresyonu izlenir [29]. Kronik myeloproliferatif hastalıklarda ise seyrek sıklıklarda saptanabilmekte ve bu vakalar hızla AML’ye ilerleyebilmektedir [30].

NPM1 mutasyonlarının AML’li çocuklarda görülme sıklığı %2,1-6,5 arasında değişmekte olup, tüm çocukluk dönemi normal karyotipli AML vakalarının %9-26,9’unu oluşturmaktadır. Erişkin dönemde ise NPM1 mutasyonlarının sıklığı %25-35 arasında değişmekte olduğu izlenmiş olup, erişkin normal karyotipli AML vakalarının %45,7-63,8’ini oluşturmuştur. Bu durum, normal karyotipli AML’nin moleküler patogenezinin çocuklarda ve erişkinlerde farklı olduğuna da işaret etmektedir [31].

NPM1 mutasyonları birkaç vaka dışında, ekzon 12 ile sınırlandırılmıştır. Mutasyon A adı verilen bu en yaygın NPM1 mutasyonu, referans dizisinin 956 ila 959 pozisyonunda bir TCTG tetranükleotidinin kopyasıdır ve vakaların %75-80’ini oluşturur. B ve D mutasyonları, NPMc + AML’nin yaklaşık %10 ve %5’inde gözlenir; diğer mutasyonlar çok nadirdir [29, 31].

NPM1 genindeki değişiklikler FLT3 geninden daha stabil görünür. Nükste NPM1 mutasyonlarının kaybı nadirdir, bu durum ancak ya farklı bir lösemik klonun ortaya çıkmasından veya kemik iliğindeki blast sayısının az sayıda olmasından kaynaklanabilir. Bazı durumlarda, NPM1 mutasyonlarının kaybı normal karyotipten anormal karyotipe değişiklik ile ilişkilendirilmiştir [32, 33].

2.2.3. NPM1+ AML'nin Patolojik ve Klinik Özellikleri

NPM1 + AML geniş bir morfolojik spektrum göstermektedir. NPM1 mutasyonları M4 ve M5 FAB kategorilerinde ve belirgin nükleer invajinasyon ("fincan benzeri" nukleuslar) gösteren AML'de daha sık görülür [29, 34-36]. NPM1 + AML'lerin %95'inden fazlası CD34+'tır [29]. Birkaç hücre soyuna özgü morfolojik özelliklerin bir arada görülebilmesi (miyeloid, monositik, eritroid ve megakaryositik fakat lenfoid olmayan), FLT3-ITD gibi ek genetik değişikliklerden bağımsız olarak NPM1 + AML'nin kendine özgü başka bir belirgin özelliğidir [37].

Blast sayısı, normal karyotipli AML'de NPM mutasyonu eşlik ettiğinde oldukça yüksek saptanır. Eşlik eden FLT3-ITD ve yüksek LDH serum seviyeleri ile bu durum daha da artar. NPM1 mutasyonları, olasılıkla gingival hiperplazi ve lenfadenopati gibi ekstramedüller tutulumla koreledir. Yine trombosit sayıları, normal karyotipli AML vakalarında AML-NK'de NPM ile mutasyona uğramışlarda NPM mutasyonu olmayanlardan daha yüksek bulunur. Özellikle AML-M4 vakalarında NPM mutasyonu saptandığında, kemik iliğindeki displastik özelliklerin belirgin olduğu gözlenir [35-38].

NPM1 mutasyonları kadınlarda daha sık görülür. FLT3 mutasyonlarının aksine NPM1 mutasyonlarının kadınlarda daha sık gözlenmesi, bu hastalarda AML gelişim mekanizmasında cinsiyet farklılığı olabileceğini düşündürmektedir [38].

2.3. AKUT MYELOİD LÖSEMİDE TEDAVİ

2.3.1. İndüksiyon

İndüksiyon kemoterapisinin amacı, morfolojik tam yanıt (kemik iliği aspiratı örneğinde >200 çekirdekli hücre sayıldığında $<5\%$ blast olması, mutlak nötrofil sayısı $>1000 / L$ olması ve trombosit sayısı $>100,000 / L$ olması) elde edilmesidir [39]. 1970'ten beri indüksiyon kemoterapisinin omurgası değişmeden kalmıştır. 60 yaş altı erişkinler ve performans durumu uygun yaşlı hastalara “7+3 rejimi” olarak bilinen yoğun antrasiklin ve sitarabin tedavisi standart olarak uygulanmaktadır. Tipik doz ve program, yedi günlük devamlı $100\text{mg}/\text{m}^2/\text{gün}$ sitarabin infüzyonuyla birlikte 3 günlük antrasiklin (daunorubisin $60-90 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{gün}$ veya idarubisin $10-12 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{gün}$) uygulamasını içerir. Genç, de novo, AML hastalarında “7 + 3” standart indüksiyonu ile $65-73\%$ oranında tam yanıt elde edilirken, 60 yaş üstü AML hastaların sadece $38-62\%$ ’sinde tam yanıt elde edildiği görülmüştür [40-42].

Standart “7 + 3” kemoterapisine alternatif bir rejim oluşturulamamış olmakla birlikte son yıllarda öne çıkan hedefe yönelik tedaviler çalışılmıştır. Kötü prognozlu bir belirteç olan FLT3 mutasyonu saptananlarda, FLT3 inhibitörlerinin “7 + 3” kemoterapisine ve konsolidasyon tedavisine eklenmesi sağkalımı uzatmıştır [43].

Geriatrik popülasyonda, özellikle NPM1 mutasyonu olmadan kompleks karyotip içerenlerde, yoğun indüksiyon tedavisine hastanın performansının uygun olmadığı düşünüldüğünde, desitabin ve azasitidin içeren hipometile edici ajanlarının kullanılmasının yararlı olduğu gösterilmiştir [44-46].

2.3.2. Konsolidasyon

Konsolidasyon tedavisi, hastada remisyon elde edildikten sonra mevcut durumun devam ettirilebilmesi için verilen tedavilere denir. Konsolidasyon hastanın tanı anındaki risk sınıflamasına göre ya sadece 3-4 kür kemoterapi verilerek ya da 1-2 kür kemoterapi ardından hematopoietik kök hücre nakli yapılarak verilebilir. İyi risk grubundaki hastalar sadece kemoterapi ile tedavi edilirken, orta ve kötü risk

sınıflamasına giren hastalarda hematopoietik kök hücre nakli yapılması gereklidir. Altmış yaş altı erişkin hastalarda standart konsolidasyon tedavisi “1,3,5 rejimi” olarak adlandırılır. 1-3-5. günlerde sitarabin $3\text{g}/\text{m}^2$, günde 2 kez olarak verilir [40, 47].

İyi risk grubundaki hastalarda dirençli hastalık veya nüks durumunda allojenik hematopoietik kök hücre nakli(AHKHN) gereklidir. Orta ve kötü riskli AML hastalarında ilk remisyona elde edildiğinde hastanın HLA uyumlu vericisinden AHKHN gerekir. Nakil öncesi verici uygunluğu durumunda hastanın Hematopoietik Hücre Nakli Komorbidite İndeksi’dir (HCT-CI) skorunun da kök hücre nakli için uygun olması gerekir [40, 48].

2.3.3. Nüks Hastalıkta Tedavi

Nüks eden hastaların sadece küçük bir kısmı, kurtarma kemoterapisi ve ardından küratif amaçlı AHKHN ile başarılı bir ikinci remisyona elde edebilirler [40]. Erken relaps (TY1'den sonraki ilk altı ay içinde meydana gelen) genel olarak kötü bir sağkalıma işaret eder. Kurtarma rejimleri arasında orta doz sitarabin, MEC (mitoksantron, etoposid, sitarabin) veya son olarak, FLAG-IDA (fludarabin, sitarabin, idarubisin,- 6.günden başlayarak beyaz hücreye sayımı $> 1 \text{ g} / \text{L}$ olana kadar- G-CSF) [49]. İkinci bir TY’a ulaşma ihtimali, genç yaşta hastalarda, ilk remisyona süresi uzun olan hastalarda ve iyi sitogenetiği olanlarda daha fazladır [50].

2.4. AML’DE ÖLÇÜLEBİLİR KALINTI HASTALIK

AML’de nüksün tedaviye rağmen hayatta kalan ve konvansiyonel morfolojik değerlendirmelerle tespit edilmeyen kalıntı hücrelerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Yeni ve daha hassas yöntemler, ölçülebilir kalıntı hastalık (MRH) olarak adlandırılan bu hücre popülasyonlarının saptanmasına izin verir [2]. İyi bir MRH testi, nükse yol açabilecek en düşük miktarda lösemik blastları saptarken, bunları sağlıklı kök hücrelerden veya nüksü başlatamayacak lösemik hücrelerden de ayırtedebilmelidir [51]. Günümüzde, duyarlılıkları ve özgüllükleri iyileştirmek,

laboratuvarlar arasında standardizasyonu optimize etmek ve hastaların çoğunluğu için uygulanabilir teknikler sağlamak için yeni analizlerin geliştirilmesi konusunda çok çaba harcanmaktadır [52, 53]. Bununla birlikte, AML'de biyolojik heterojenite, klonal evrim ve evrensel bir immünofenotipin olmaması, bugüne kadar AML'de standardize MRH testlerinin oluşturulmasını zorlaştırmaktadır. Remisyonadaki MRH durumunun artan bir klinik önemi olduğunu kabul eden ELN, AML hastaları için en uygun yanıt kategorisini “ölçülebilir kalıntı hastalık olmayan tam yanıt (TYMRH-)” olarak tanımlamıştır [54].

2.4.1. Ölçülebilir Kalıntı Hastalık Tespiti

AML tedavisi sonrası yanıt değerlendirmede sitomorfolojik olarak %5'in altında blast gösterilmesi önemlidir ancak yeterli değildir. Bu yöntemin duyarlılığı 1:20'dir. Floresan in situ hibridizasyon (FISH), aberran sitogenetiği olan hastalarda lösemik hücrelerin 1:100 duyarlılığa kadar tespit edilmesini sağlamıştır ve bu yaklaşım risk sınıflandırılmasıyla birlikte günümüzde kullanılan MRH değerlendirme yöntemlerinin önünü açmıştır [55-57]. Güncel olarak AML'de MRH tespiti için en yaygın kullanılan yöntemler MFC (multiparametrik akım sitometri) ve qRT-PCR'dir (kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu). Çok daha yeni olarak başarıları gösterilen ancak rutin kullanıma henüz giremeyen yöntemler ise; NGS (yeni nesil dizileme) ve dd-PCR(dijital damlacık PCR) yöntemleridir [51].

2.4.1.1. Multiparametrik Akım Sitometri

Bu yöntemde lösemik hücrelerde eksprese edilen hücre yüzey antijenlerini işaretlemek için floresan etiketli antikolar kullanılır. Akım sitometri akut lösemi tanısı konulurken immünofenotiplendirme için kullanılır. Bu yöntem, aynı zamanda lösemi ilişkili immünofenotip (LAIP) tanımlanmasına izin verir. Tanımlanan LAIP tanıdaki her bir AML için benzersizdir ve farklı antijen ekspresyon paternleri içermesi sayesinde takip örneklerinde MRH izlenebilir. MFC tabanlı MRH tespiti için kullanılan diğer bir strateji “normalden farklı” (DfN) yaklaşımıdır. Burada, AML

remisyon örneklerinde aberran immünojenotipik olgunlaşma paternleri aranır. DfN için tedavi sonrası takip yapabilmek için tanıdaki materyale bir ihtiyaç duyulmaz, ayrıca klonal evrim nedeniyle, yeni veya değişen immünojenotipik anomalileri tanımlamak için de faydalıdır. Günümüzde ELN, her iki yaklaşımın bir kombinasyonunu önermektedir [58]. MFC'nin belirgin bir avantajı, AML hastalarının çoğunda uygulanabilir olmasıdır. Ancak duyarlılığı diğer yöntemlerin çoğundan daha düşüktür ve lösemik fenotipin normal antijen ekspresyon paterniyle arasındaki farkın derecesine büyük oranda bağlıdır [59]. Ek olarak, hastalık seyri sırasındaki klonal evrim, AML hastalarının yaklaşık %30'unda ilk klondan farklı bir immünojenotip ile nüks ettiği için teknik bir zorluk olarak kalmaktadır [60]. Bu nedenle, MFC analizleri yüksek oranda deneyim gerektirir ve test kalitesi önemli ölçüde operatöre bağlıdır ve son ELN rehberi, MFC analizini, teknikler standardize edilinceye kadar, sadece deneyimli laboratuvarlarda yapılmasını önermektedir [54].

2.4.1.2. Kantitatif PCR (qRT-PCR)

qRT-PCR, görece kullanıcıdan bağımsız, aynı zamanda yüksek duyarlılık sunan ve bir ölçüde standardize olan yerleşmiş bir MRH ölçme yöntemidir [53, 61]. Bu yöntemin en büyük kısıtlılığı ise CBF-AML füzyon genleri, inv(16)(p13;p22), t(8;21)(q22;q22), NPM1 mutasyonları gibi spesifik aberrasyonların gösterilebildiği hastalarla sınırlı kalmasıdır. Buna bağlı olarak ELN bu tür değişikliklerden herhangi birine sahip olan hastaların, qRT-PCR'ye dayalı olarak MRH için test edilmesini talep eder. Bu genetik anomalilerin görülme sıklığı yaşla birlikte azaldığından, AML hastalarının çoğunluğunu temsil eden 60 yaşın üzerindeki hastaların %30'undan azında bu yöntem uygulanabilir [62]. Daha nadir görülen anomaliler için hasta spesifik primer/prob çiftleri tasarlanabilir, ancak bu durum daha yüksek bir maliyet gerektirir ve testin özgüllüğü, duyarlılığı konusunda veri yetersizliği ile de karşılaşılabilir [63]. qRT-PCR kullanımındaki duyarlılık hedef gene bağlı olarak değişebilmekle birlikte bireysel farklılıklar da bildirilmiştir. qRT-PCR'dan daha hassas bir MRH saptamasına izin veren, dd-PCR gibi referans standart eğrilerine gerek duymayan, modern yöntemlerle aşılabilecek kontrol hedefli seri dilüsyonlara olan ihtiyaç duyması, qRT-PCR'ın bir başka sınırlılığıdır. [64-67]. Ayrıca PCR verimliliğindeki varyasyonlara

karşı dayanıklı oldukları kanıtladıklarından, dd-PCR çalışmaları gelecekte MRH takibi için umut verici bir metodolojidir [68].

2.4.1.3. Yeni Nesil Dizileme (NGS)

Milyonlarca küçük DNA fragmanının paralel ve tekrarlı olarak sıralanmasına izin veren yeni nesil DNA sıralama teknolojileri, birkaç gen veya bir bütün genomu değerlendirmek için kullanılabilir [69]. NGS'nin çok sayıda mutasyona uğramış genleri tahlil edebilmesi yeteneği, qRT-PCR ile yapılamayan malign klonların evrimini izlemeye yardımcı olabilir [70]. Çalışmalar, NGS'nin FLT3-ITD ve IDH1/ 2 gibi hedefli tedavilerin mevcut olduğu mutasyonları ve AML'li hastalarda CEBPA ve NPM1 gibi prognostik önemi olan mutasyonları izlemenin uygulanabilirliğini göstermiştir [71-73]. MRH takibinde NGS kullanımını zorlaştıran bir faktör tanıda ve hastalık seyrinde izlenen genetik klonal heterojenitedir. Tanıda baskın olan lösemik klon, klinik nüks ve mortaliteye neden olan klon olmayabilir [74]. Dahası, belirli bir örnekteki klonalitenin belirlenmesi, dizilemenin derinliğini ve mutasyonları tanımlamak için kullanılan algoritmayı etkileyebilir [75]. Ek olarak NGS teknolojisinin hesabı zahmetli, zaman alıcı ve pahalıdır ki bu klinik uygulamada kullanımını zorlaştırmaktadır. ELN MRH Çalışma Grubu, MRH tespiti için NGS tekniklerini şu aşamada klinik çalışmalar için uygun olarak önermektedir [76].

2.4.4. MRH Tespitinde NPM1 Mutasyonlarının Yeri

NPM1 mutasyonları, uygulanan tetkiklerdeki heterojenite, kullanılan doku ve değerlendirme zamanındaki sınırlı karşılaştırılabilirliğe karşın, AML'deki en çok değerlendirilen MRH belirteçleri arasında yer almaktadır, NPM1 mutasyonlarının hemen hemen tüm NPM1-pozitif hastalarda ilk tanıda olduğu gibi relapsta da mevcut olduğu gözlenmiştir, bu da, bu mutasyonun güvenilir bir MRH belirteci olabileceğini düşündürmüştür [77, 78].

İndüksiyon tedavisi sonrası aplazi döneminde yapılan NPM1 MRH analizi sadece sınırlı prognostik bilgi sağlıyor gibi görünmektedir [79]. Buna karşın diğer zaman noktaları için klinik olarak anlamlı risk sınıflandırmaları gösterilebilir. İndüksiyon veya konsolidasyon kemoterapisinden sonra, NPM1 transkriptlerinde $<3/4$ log azalma olmamasının yüksek nüks riski ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür [79, 80]. Bununla birlikte kemoterapi sonrası hala saptanabilir NPM1 transkript düzeyleri $>0,01$ (ABL1'e normalize edilmiş) veya $> 0,1$ (NPM1-WT kopyalara normalize edilmiş) olmasının daha yüksek nüks oranları ve daha kısa genel sağkalım ve hastalıksız sağkalım için öngörücü olduğu düşünülmektedir [80, 81].

Biz de bu çalışmada 2010 - 2018 yılları arasında hastanemiz Hematoloji kliniğinde tanıda NPM1 mutasyonu saptanmış AML hastalarını retrospektif olarak inceleyerek MRH takibinde NPM1'in rolünü ortaya koymayı amaçladık.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma öncesinde Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulunun onayı alınmıştır. Veriler hastanemizde kullanılmakta olan Avicenna programı kayıtları ve Hematoloji laboratuvarı arşivi geriye yönelik incelenerek toplandı. Bu çalışmaya, 2010-2018 yılları arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi (AÜTF) Hematoloji Bilim Dalı Kliniğinde akut myeloid lösemi tanısı almış olup, tanıda NPM1 geni pozitif saptanmış, tedavi alan ve 18 yaşından büyük olan 83 hasta dahil edildi.

NPM1 geni pozitif saptanmış hastalar tanıdaki özelliklerine göre gruplandırıldı. Hastalar prognostik farklılığın ortaya konabilmesi için eşlik eden FLT-ITD gen durumuna göre iki ayrı grupta ele alındı. Karyotip analizine göre hastalar normal karyotipli olanlar, sitogenetik risk grubuna göre orta risk ve kötü risk taşıyanlar olmak üzere üç gruba ayrıldı. Planlanacak tedavi yöntemini etkilediğinden yaşa göre 60 yaş ve üstü ile 59 yaş ve altı olarak hastalar iki gruba ayrıldı. Aldıkları tedavi şekline göre intensif tedavi alanlar ve hipometile edici ajan alanlar olmak üzere iki gruba ayrılırken; performans ve yaş durumu nedeniyle en iyi destek tedavi ile izlem kararı verilen hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Gruplar arası genel sağkalım ve progresyonsuz sağkalım analizleri yapıldı.

NPM1 normalize kopya sayıları AÜTF Hematoloji Laboratuvarında kemik iliğinden elde edilen örnekler ile kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla EDTA'lı tüpe alınan 4 ml kan örneğinden ipsogen® NPM1 mut A MutaQuant®Kit (Qiagen, ABD) kullanılarak elde edilen total RNA'nın revers transkripsiyonu ile cDNA elde edilir ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifikasyona hazır hale getirilir. Rotor Gene Q 5Plex HRM (Qiagen, ABD) cihazında rt-PCR yöntemi ile amplifikasyon uygulanıp, analizler gerçekleştirilerek normalize kopya sayıları belirlenmektedir.

Çalışmamızda NPM1 geninin hastalık izlemindeki rolünü ortaya koyabilmek amacıyla hastaların tanıda, indüksiyon kemoterapisi sonrasında, konsolidasyon sürecinde, tedavi sonunda, nükste, kök hücre naklinin 28. gününde yapılan kemik iliği aspirasyon ve biyopsi örneklerinden tetkik edilmiş olan NPM1 normalize kopya

sayıları kaydedildi. Eş zamanlı alınan örneklerden çalışılan akım sitometri incelemeleri ile karşılaştırılarak farklı zamanlarda alınan NPM1 kopyalarının değişimi analiz edildi.

3.1. İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER

Örneklem büyüklüğü için G-power programı kullanılmış olup, %50 bilinmezlik prevalansı ve en az %80 power'a ulaşılması hedeflenerek en az 70 kişiye ulaşılması hedeflenmiş ve 83 kişiye ulaşılmıştır. İstatistiksel değerlendirme Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Windows 18.0 programı kullanılarak yapıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu görsel (histogram ve olasılık Şekilleri) ve analitik yöntemler (Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk Testleri) kullanılarak incelendi. Verilerin tamamının non-parametrik olarak dağıldığı değerlendirildi. Tanımlayıcı analizler yüzde olarak ve normal dağılmayan değişkenler için, ortanca ve maksimum-minimum değerleri (ortanca $\pm$ min-maks) kullanılarak verildi. Hastaların genel sağkalım ve progresyonsuz sağkalım Şekilleri ve tek değişkenin sürelere etkisini ölçen analizler Kaplan-Meier Testi ile değerlendirildi. NPM-1 değeri değişiminin remisyonla ilişkisini ölçmek ve bir eşik değeri (cut-off) hesaplayabilmek için ROC analizi uygulanmış olup, analizde değerlendirilen NPM-1 farkı, NPM-1 değerlerinin (Log10(öncesi)/Log10(sonrası)) formülü hesaplanması sonucu analize alınmıştır. Çoklu değişkenlerin genel sağkalım ve progresyonsuz sağkalım üzerine etkileri Cox Regresyon analizi ile değerlendirildi ve analizin sonuçları Hazard Ratio (Tehlike oranı/Risk oranı) olarak sunuldu. Hastaların yıllara göre sağkalım yüzdeleri Life Table analizi ile hesaplandı. Sonuçlar %95 güven aralığında, istatistiksel anlamlılık $p<0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya alınan 83 hastanın ortalama tanı yaşı 56 (23-89) olup, %44,6'sı kadın, %55,4'ü erkektir. Kadın hastaların ortalama tanı yaşı 58 (25-89), erkek hastaların ortalama tanı yaşı ise 56 (23-84)'tür. Hastaların %32,5'inde FLT3 ITD+ iken, %67,5'inde FLT3 ITD- bulunmuştur. Konvensiyonel sitogenetik çalışmada normal karyotip izlenmeyen 20 (%24,1) hasta vardır. Bu hastaların içerisinde yedi (%35,0) hastada kompleks karyotip, sekiz hastada (%40,0) hipodiploidi, beş hastada (%25,0) spesifik mutasyon saptanmıştır. Bu beş spesifik mutasyondan biri kötü sitogenetik özellik içeren karyotipe sahiptir. Saptanan bu spesifik mutasyonlar ise; iki hastada trizomi 8, bir hastada delesyon 13, bir hastada delesyon 7 + trizomi 21, bir hastada t(9:17)'dir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Hastaların demografik, klinik, genetik özellikleri

		Sayı	(%)*	Toplam
Yaş				
	Ortanca (min - maks)	56 (23-89)		83
Cinsiyet				
	Kadın	37	44,6	83
	Erkek	46	55,4	
Tanıda WBC (10 ⁶ /l)				
	Ortanca (min - maks)	32.700 (800-191.700)		83
FLT 3				
	FLT3 ITD -	56	67,5	83
	FLT3 ITD +	27	32,5	
Risk grubuna göre eşlik eden sitogenetik değişiklik				
	Normal karyotip	48	57,8	83
	Orta risk	4	4,8	
	Kötü risk	16	19,3	
	Yetersiz metafaz	15	18,1	
*Sütun Yüzdesi				

Hastaların beşi; gelişen komplikasyonlar nedeniyle indüksiyon tedavisini tamamlayamadan kaybedilmiş olduğundan bu tedaviler sonrasında değerlendirmeleri yapılamamıştır. Hematolojik remisyon elde edilen 53 hastanın 10’unda akım sitometrik MRH saptanmıştır.

Hastaların 23’ünde (%27,7) nüks gelişmiş olup, ortalama nüks gelişme süresi ortalama 7 (1-71) aydır. Nüks eden hastaların 13’ü (%56,5) kök hücre nakline ilerleyebilmiştir.

AHKHN gerçekleşen tüm hastaların 12(%57,1)’si tam uyumlu kardeş vericiden, 3(%14,1)’ü tam uyumlu akraba dışı vericiden, biri(%4,8) 9/10 uyumlu kardeş vericiden biri(%4,8) 9/10 akraba dışı vericiden nakil yapılmışken, 4(%19,1)’ünde ise haplo identik AHKHN yapılmıştır.

Tablo 4.2. Hastaların tedavi ilişkili özellikleri

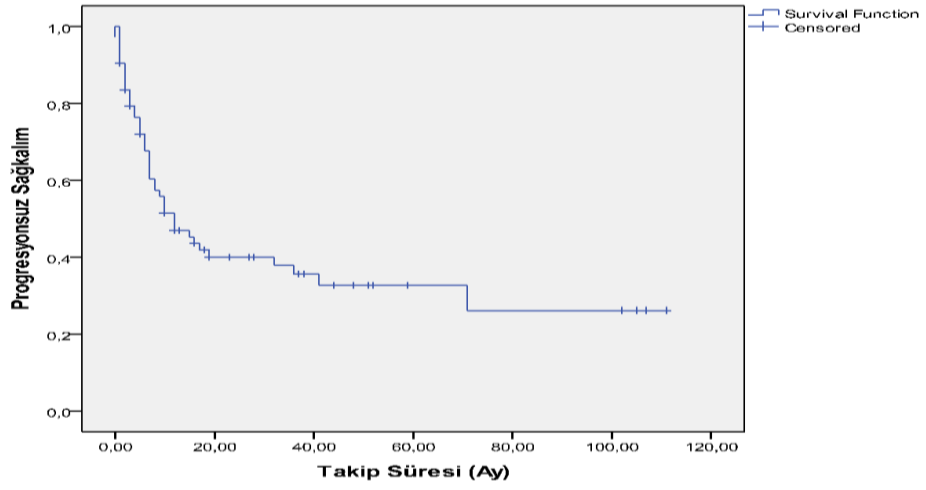
	Sayı	(%)*
İndüksiyon Rejimi (n:78)		
İntensif tedavi	57	73,1
Hipometile edici ajan	21	26,9
İndüksiyon Kemoterapisi sonrası kemik iliği biyopsisi (n:65)		
Hematolojik remisyon var	53	81,5
Hematolojik remisyon yok	12	18,5
İndüksiyon sonrası akım sitometri (n:64)		
MRH yok	43	67,2
MRH var	21	32,8
Nüks (n:83)		
Var	23	27,7
Yok	60	72,3
Kök Hücre Nakli (n:83)		
Var	22	26,5
Yok	61	73,5
*Sütun Yüzdesi		

İndüksiyon rejimi olarak hastaların %73,1'ine intensif tedavi (7+3 kemoterapisi), %26,9'una hipometile edici ajan olarak azasitidin ya da desitabin verilmiştir. İntensif tedavi alanların farklı tedavi basamaklarındaki yanıt oranları Tablo 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4.3. İntensif tedavi alanların tedavi basamaklarındaki tedaviye yanıt oranları

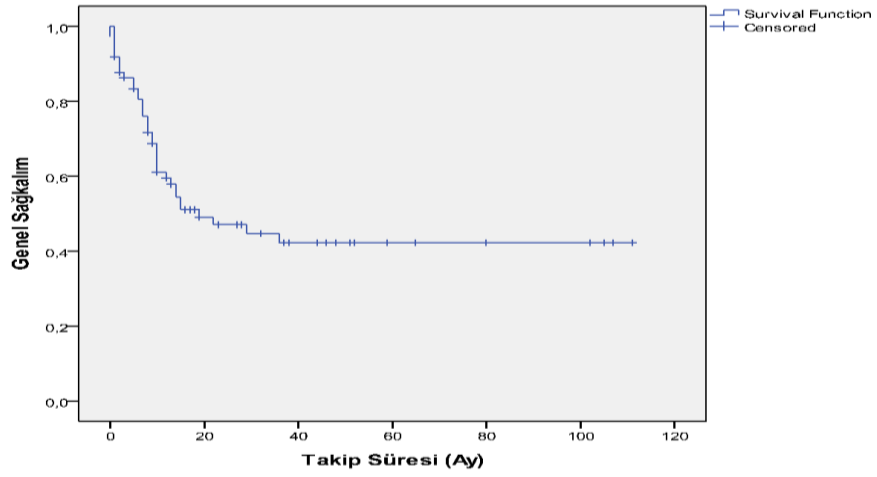
		İntensif Tedavi Sayı (%) *
İndüksiyon sonrası akım sitometri		
	TYMRH-	38 (71,7)
	TYMRH+	15 (28,3)
	Toplam	53
2.konsolidasyon sonrası akım sitometri		
	TYMRH-	24 (82,8)
	TYMRH+	5 (17,2)
	Toplam	29
4.konsolidasyon sonrası akım sitometri		
	TYMRH-	22 (73,3)
	TYMRH+	8 (26,7)
	Toplam	30
Nakil sonrası akım sitometri		
	TYMRH-	12 (80,0)
	TYMRH+	3 (20,0)
	Toplam	15
*Sütun yüzdesi verilmiştir.		

Tüm hastaların ortalama progresyonsuz sağkalım süresi 40,3 (GA: 28,2-52,4) aydır (n=74). Tüm hastaların progresyonsuz sağkalım oranları 6ay, 12 ay, 36 ay ve 60 ay olmak üzere sırasıyla %72, %47, %36 ve %26'dır(Şekil4.1).



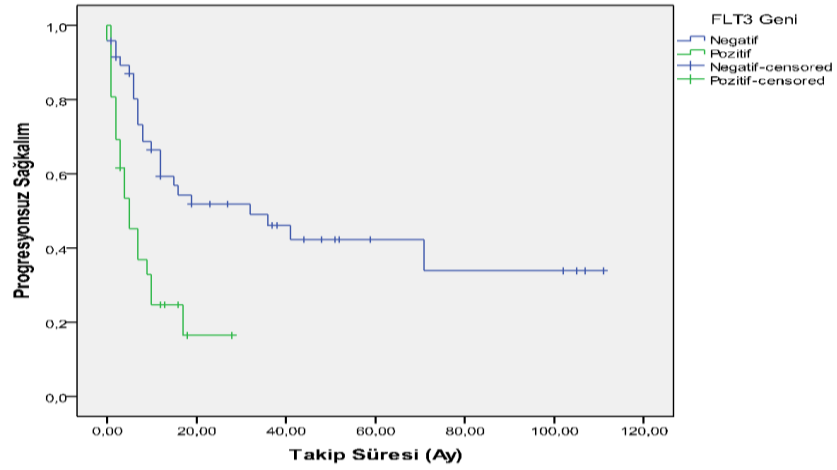
Şekil 4.1. Hastaların progresyonsuz sağkalım eğrisi

Tüm hastaların (n=74) ortalama genel sağkalım süresi 52,8 (GA: 40,2-65,5) aydır. Tüm hastaların genel sağkalım oranları 6 ay, 12 ay, 36 ay ve 60 ay olmak üzere sırasıyla %81, %60, %42 ve %42'dir. 5 yıllık genel sağkalım süreleri Şekil 4.2'de sunulmuştur.



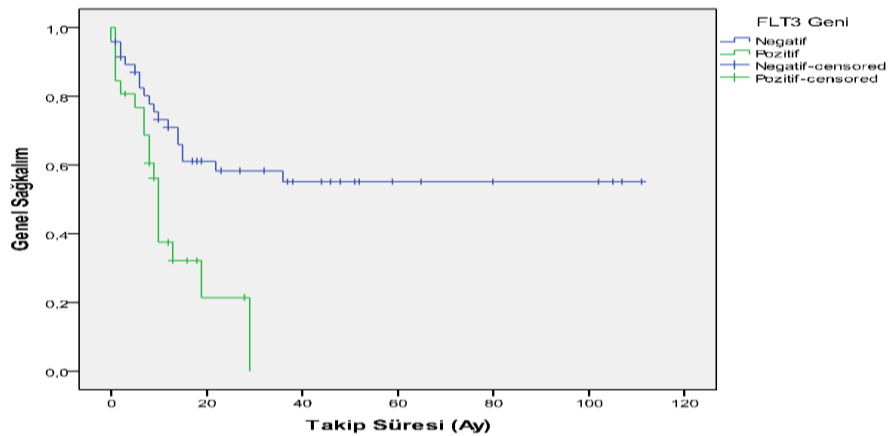
Şekil 4.2. Hastaların genel sağkalım eğrisi

FLT3 ITD negatifliği olan hastaların progresyonsuz ortalama sağkalım süresi 50,9 (GA:35,7-66,2) ay iken FLT3 ITD pozitifliği olan hastaların progresyonsuz ortalama sağkalım süresi 9,1 (GA:5,3-12,9) aydır ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır (n=74, Log Rank Testi p=0,001)(Şekil4.3).



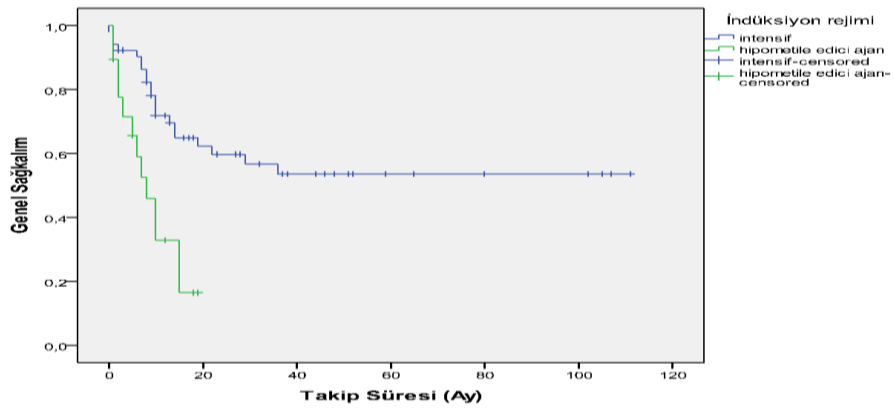
Şekil 4.3. Hastaların FLT3 ITD durumuna göre progresyonsuz sağkalım eğrisi

FLT3 ITD negatifliği olan hastaların ortalama sağkalım süresi 65,9 (GA:50,7-81,2) ay iken FLT3 ITD pozitifliği olan hastaların ortalama sağkalım süresi 12,8 (GA:8,5-17,1) aydır ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır (n=74, Log Rank Testi p=0,002).



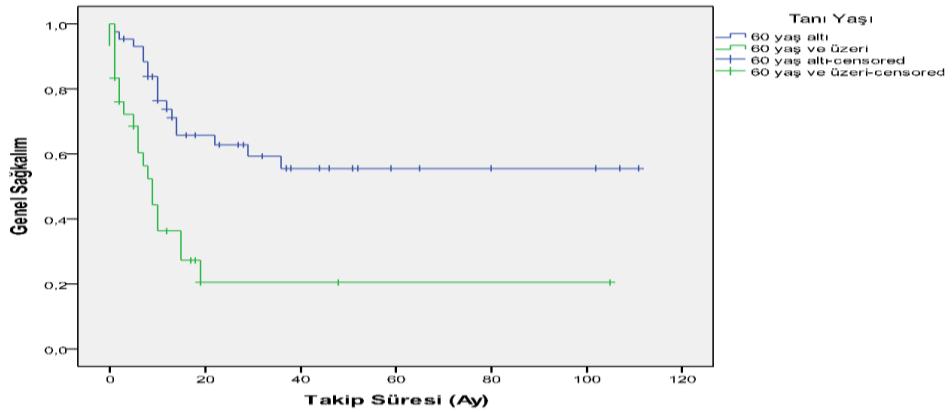
Şekil 4.4. Hastaların FLT3 ITD durumuna göre genel sağkalım eğrisi

İntensif tedavi altındaki hastaların ortalama yaşam süresi 65,3 (GA:50,6-80,1) ay iken, hipometile edici tedavi altındaki hastaların ortalama yaşam süresi 9,1 (GA: 6,1-12,1)'dir. İntensif tedavi alan hastaların genel sağkalım süreleri 6 ay, 12 ay, 36 ay ve 60 ay olmak üzere sırasıyla %90, %72, %54 ve %54 iken, hipometile edici ajan ile takip edilen hastaların 6ay, 12 ay ve 18 aydaki sağkalım süreleri sırasıyla %59, %33 ve %16'dır. Hipometile edici ajan alan hastalarda daha sonraki ayların sağkalım verilerine ulaşılammıştır.



Şekil 4.5. Hastaların tedavi grubuna göre genel sağkalım eğrisi

Tanı yaşı 60 yaş altındaki hastaların genel sağkalım süresi 67,7 (GA: 52,0-83,5) ay iken, 60 yaş ve üstü hastaların genel sağkalım süresi 27,2 (GA:10,4-44,1) aydır ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (n=74, Log Rank Testi p=0,001).



Şekil 4.6. Hastaların yaşa göre genel sağkalım eğrisi

Çoklu değişkenlerin genel sağkalıma olan etkisi tüm hastalar dahil edilerek araştırıldığında FLT3 ITD pozitifliği ve 60 yaş üstü hasta grubu istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek ölüm riski ile ilişkili bulunmuştur. Diğer değişkenlerin genel sağkalım süresi ile analizi Tablo 4.6’da sunulmuştur.

Tablo 4.4. Tüm hastaların çoklu değişkenlere göre genel sağkalım analizi

	HR*** (GA) ****	p**
Cinsiyet		
Erkek	1*	0,523
Kadın	1,37 (0,52-3,59)	
İndüksiyon rejimi		
İntensif tedavi	1*	0,319
Hipometile edici ajan	0,54 (0,16-1,82)	
FLT3 ITD		
Negatif	1*	0,005
Pozitif	4,39 (1,58-12,21)	
Tanı yaşı		
59 yaş ve altı	1*	0,002
60 yaş ve üstü	7,54 (2,13-26,69)	
Sitogenetik		
Normal karyotip	1*	-
Orta risk	7,86 (1,79-34,36)	0,006
Kötü risk	1,78 (0,49-6,45)	0,377
*Referans kategori **Cox regresyon testi uygulanmıştır ***Hazard Ratio ****Güven aralığı *****Modelin Omnibus Testi Overall (score) p değeri =0,001		

Çoklu değişkenlerin, progresyonsuz sağkalıma etkisi tüm hastalar dahil edilerek araştırıldığında FLT3 ITD pozitifliği ve 60 yaş üstü hasta grubu anlamlı derecede yüksek nüks etme riski ile ilişkili bulunmuştur. FLT3 ITD pozitifliği olan hastalarda nüks gelişme riski, FLT3 ITD geni saptanmayan hastalara göre 4,26 (1,73-

10,50) kat daha fazladır. Diğer değişkenlerin progresyonsuz sağkalım süresi ile analizi Tablo 4.5'te sunulmuştur.

Tablo 4.5. Tüm hastaların çoklu değişkenlere göre progresyonsuz sağkalım analizi

	HR***(GA)****	p**
Cinsiyet		
Erkek	1*	0,285
Kadın	1,57 (0,68-3,62)	
İndüksiyon rejimi		
İntensif tedavi	1*	0,200
Hipometile edici ajan	0,47 (0,15-1,48)	
FLT3geni		
FLT3 negatif	1*	0,002
FLT3 pozitif	4,26 (1,73-10,50)	
Tanı yaşı		
59 yaş ve altı	1*	0,017
60 yaş ve üstü	3,65 (1,26-10,60)	
Sitogenetik		
Normal karyotip	1*	-
Orta risk	4,99 (1,24-20,05)	0,024
Kötü risk	1,23 (0,43-3,48)	0,687
*Referans kategori **Cox regresyon testi uygulanmıştır ***Hazard Ratio ****Güven aralığı *****Modelin Omnibus Testi Overall (score) p değeri =0,002		

İntensif tedavi alan hastaların tanı anındaki ortalama NMP1 değeri 5,88000 NCN iken, hipometile edici ajan tedavisi alanlarda ise 5,80000 NCN'dir. Hipometile edici tedavi alan hastaların yanıt değerlendirmesi 4. kür tedavinin ardından yapılmıştır. İndüksiyon sonrası değerlendirme olarak gösterilmiştir. Hipometile edici tedavi alıp kök hücre nakline ilerleyen hastaların nakil öncesi yapılan son değerlendirmesi ise dördüncü konsolidasyon sonu olarak gösterilmiştir. Tüm hastaların, intensif tedavi, hipometile edici tedavi ve akım sitometri ile değerlendirilen ölçülebilir kalıntı hastalık

durumlarına göre, hastaların indüksiyon sonrası, konsolidasyon sonrası ve takibindeki NPM1 değerleri Tablo 4.6’da sunulmuştur.

Tablo 4.6. Kemoterapi rejimi ve akım sitometrik MRH durumuna göre tedavi aşamalarında NMP1 değerleri

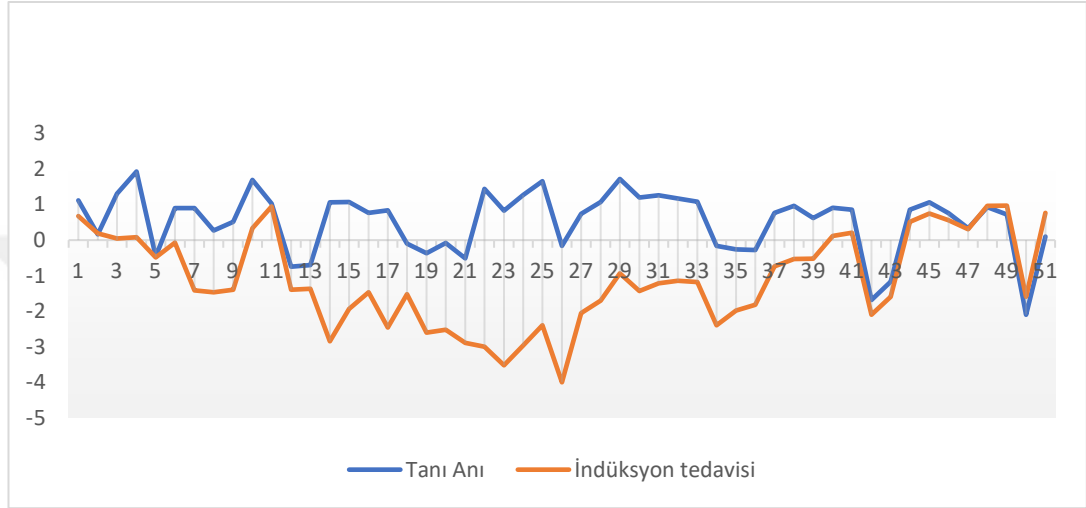
		Tüm Hastalar	İntensif kemoterapi	Hipometile edici tedavi	MRH - Hastalar	MRH+ Hastalar
Tanı yaşı						
	Ortanca (min -maks)	56 (23-89)	51 (23-73)	70 (60-89)		
	N	83	57	21		
Tanı anındaki NPM1 değeri						
	Ortanca (min - maks)	5,87000 (0,00006 - 84,45000)	5,88000 (0,00100 - 84,45000)	5,80000 (0,00006 - 17,01000)		
	N	83	57	21		
İndüksiyon sonrası NPM1 değeri						
	Ortanca (min -maks)	0,39500 (<0,00001 - 9,25000)	0,03800 (<0,00001 - 8,89000)	0,96200 (0,00030 - 9,25000)	0,02000 (<0,00001 - 4,77000)	1,63000 (0,00140 - 9,25000)
	N	54	46	8	37	17
2.Konsolidasyon sonrası NPM1 değeri						
	Ortanca (min - maks)	0,00155 (<0,00001 - 4,59000)	0,00155 (<0,00001 - 4,59000)	-	0,00090 (<0,00001 - 0,68000)	0,85600 (0,00160 - 4,59000)
	N	28	28	-	22	5
4.konsolidasyon sonrası NPM1 değeri						
	Ortanca (min - maks)	0,00012 (<0,00001 - 10,44940)	0,00002 (<0,00001 - 10,44940)	0,16000 (<0,00070 - 1,0500)	<0,00001 (<0,00001 - 0,16000)	1,14000 (0,00080 - 10,44940)
	N	33	30	3	24	9
Relaps sonrası NPM1 değeri						
	Ortanca (min - maks)	12,95500 (0,76350 - 41,77000)	14,81000 (0,76350 - 41,77000)	18,26000	-	12,95500 (0,76350 - 41,77000)
	N	18	17	1	-	18
Nakil sonu NPM1 değeri						
	Ortanca (min -maks)	0,00010 (<0,00001 - 3,41000)	0,00010 (<0,00001 - 3,41000)	-	0,00005 (<0,00001 - 0,02700)	1,07280 (0,00440 - 3,41000)
	N	15	15	-	10	3
NPM1:Nukleofosmin, (NPM1 değerleri Normalize Kopya Sayısı olarak ölçülmüştür.)						

Tanı anında ve indüksiyon tedavisi sonrası NPM1 düzeyinin logaritmik değişimi, intensif tedavi alanlarda azalma 1,84 iken, hipometile edici tedavi alan hastalarda azalma 0,30'dur. Tüm hastaların, intensif tedavi, hipometile edici tedavi ve akım sitometrik MRH durumlarına göre, tanı anı ile diğer tedaviler sonrası NPM1 değişimlerinin logaritmik değerleri Tablo 4.7'te sunulmuştur.

Tablo 4.7. Kemoterapi rejimi ve akım sitometrik MRH durumuna göre tedavi aşamalarında NPM1 değişimleri

		Tüm Hastalar	İntensif tedavi	Hipometile edici tedavi	MRH - Hastalar	MRH+ Hastalar
Tanı anı ile indüksiyon tedavisi arasındaki NPM1 değişimi						
	Ortanca log10 (min-maks)	1,73 (-0,67-6,18)	1,73 (-0,67-6,18)	0,30 (-0,51-4,35)	2,23 (0,02-6,18)	0,35 (0,67-3,91)
	N	54	46	8	37	17
Tanı anı ile 2.konsolidasyon tedavisi arasındaki NPM1 değişimi						
	Ortanca log10 (min-maks)	3,11 (0,07-6,66)	3,11 (0,07-6,66)	-	3,28 (0,07-6,66)	1,37 (0,08-3,85)
	N	28	28	0	22	5
Tanı anı ile 4.konsolidasyon tedavisi arasındaki NPM1 değişimi						
	Ortanca log10 (min-maks)	4,11 (-0,92-6,69)	4,17 (-0,92-6,69)	1,05 (0,70-1,65)	4,37 (1,06-6,69)	0,70 (-0,92-4,15)
	N	33	30	3	24	9
Tanı anı ile nakil sonu arasındaki NPM1 değişimi						
	Ortanca log10 (min-maks)	0,76 (-3,00-1,72)	0,76 (-3,00-1,72)	-	0,83 (-3,0-1,72)	-0,56 (-2,57-1,03)
	N	15	15	0	10	3
NPM1: Nükleofosmin						

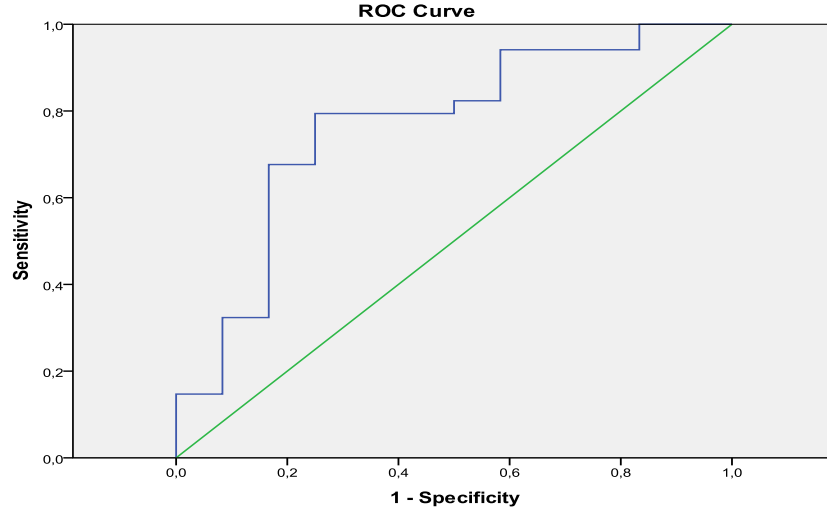
Hastaların tanı anındaki nükleofosmin düzeyleri oldukça heterojenlik göstermektedir. Benzer olarak bu heterojenlik tedavinin ilerleyen basamaklarında da dikkat çekmiştir. Hastaların tanı anın ve indüksiyon tedavisi sonu nükleofosmin düzeylerinin logaritmik olarak değişimi Şekil 4.7’de sunulmuştur.



Şekil 4.7. Hastaların tanı anı ile indüksiyon sonu NPM1 düzeyinin logaritmik değişimi

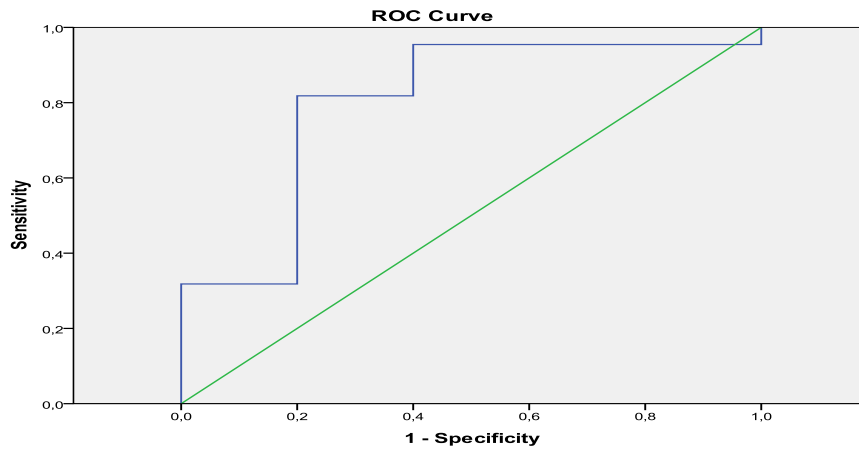
NPM1 düzeyine ilişkin yaptığımız analizlerde; hipometile edici ajanlarla izlenen hastaların azlığı, takipte kalma sürelerinin kısalığı ve takipte kalmış olan hastaların NPM1 takip aralığını işaret eden bir standardizasyonun olmamasından dolayı düzenli takip yapılamamasından doğan verilerin yetersiz olması durumu nedeniyle sadece intensif tedavi alan hasta grubu analizlere dahil edilmiştir.

İntensif tedavi grubunda, tanı anındaki ile indüksiyon tedavisi sonu $\log(10)$ NPM1 değeri değişiminin ölçülebilir kalıntı hastalık varlığı ile ilişkisi yapılan ROC analizinde ($n=46$. Eğri altında kalan alan = %76,5) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,007$). Youden indeksine göre tespit edilen $\log(10)$ NPM1 farkının kestirim noktası 1,39 olarak tespit edilmiştir. Bu noktanın ölçülebilir kalıntı hastalık durumu değişimi tespitindeki duyarlılığı %79,4 özgüllüğü %75,0 olarak tespit edilmiştir.



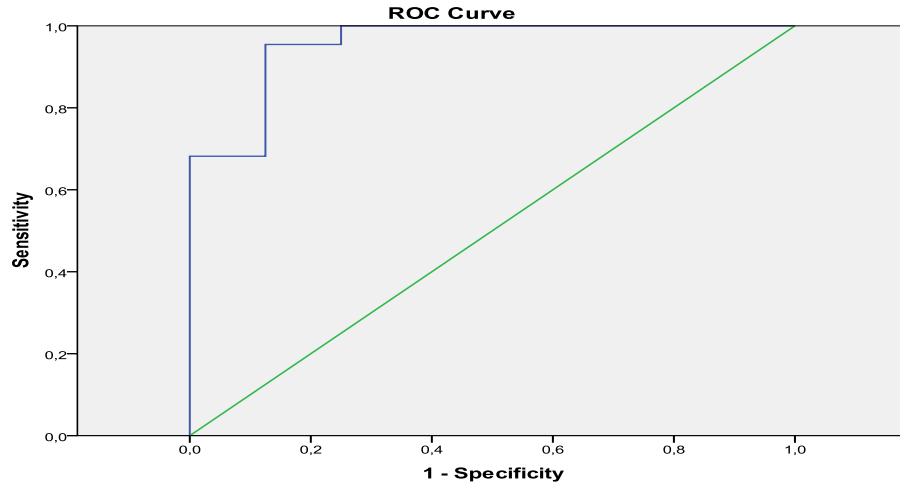
Şekil 4.8. İntensif tedavi alan hastaların tanı anı ile indüksiyon tedavisi sonu NPM1 değeri farkının MRH varlığı ile ilişkisi

İntensif tedavi grubunda, tanı anındaki ile 2. konsolidasyon tedavisi sonu log(10) NPM1 değeri değişiminin ölçülebilir kalıntı hastalık varlığı ile ilişkisi yapılan ROC analizinde (n=27. Eğri altında kalan alan = %80) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,039). Youden indeksine göre tespit edilen log(10) NPM1 farkının kestirim noktası 2,08 olarak tespit edilmiştir. Bu noktanın ölçülebilir kalıntı hastalık durumu değişimi tespitindeki duyarlılığı %81,8 özgüllüğü %80,0 olarak tespit edilmiştir.



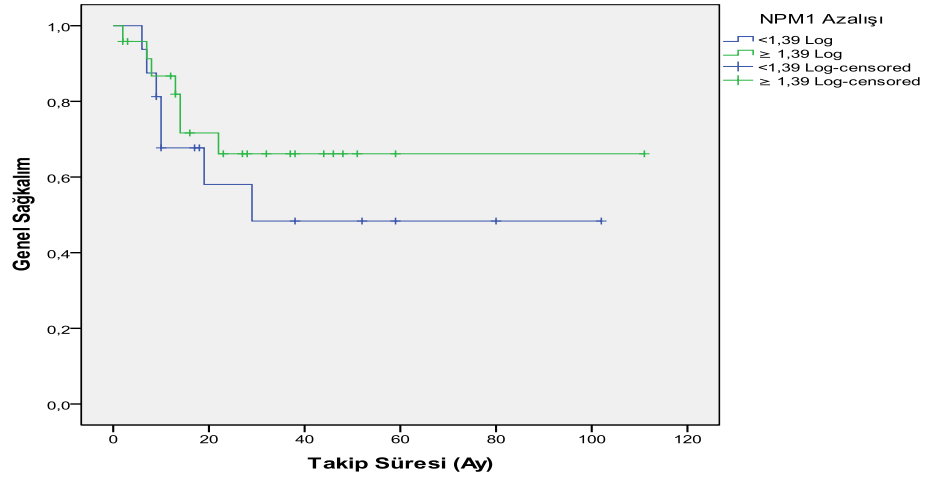
Şekil 4.9. İntensif tedavi alan hastaların tanı anı ile 2. konsolidasyon tedavisi sonu NPM1 değeri farkının MRH varlığı ile ilişkisi

İntensif tedavi grubunda, tanı anı ile 4. konsolidasyon sonu log(10) NPM1 değeri değişiminin MRH varlığı ile ilişkisi yapılan ROC analizinde (n=30. Eğri altında kalan alan=%95,5) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,001). Youden indeksine göre tespit edilen log(10) NPM1 farkının kestirim noktası 3,202 olarak tespit edilmiştir. Bu noktanın ölçülebilir kalıntı hastalık durumu değişimi tespitindeki duyarlılığı %95,5 özgüllüğü %87,5 olarak tespit edilmiştir.



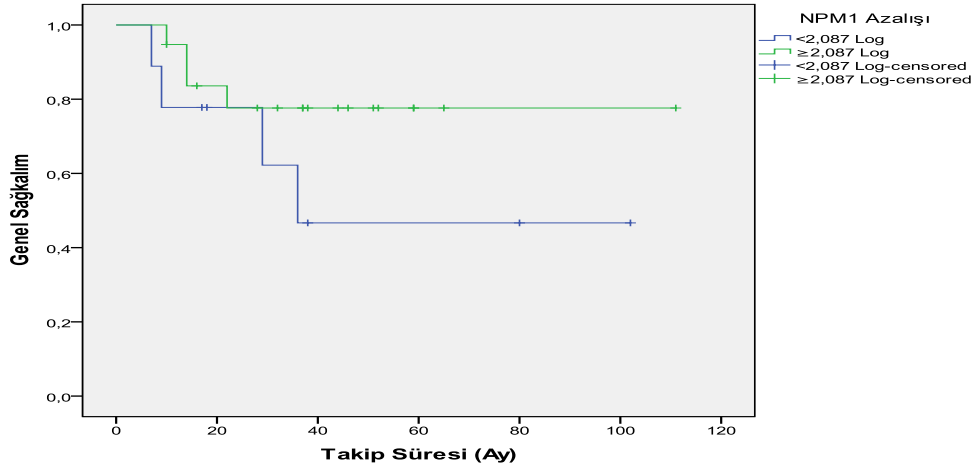
Şekil 4.10. İntensif tedavi alan hastaların tanı anı ile 4. konsolidasyon tedavisi sonu NPM1 değeri farkının MRH varlığı ile ilişkisi

İntensif tedavi alan hasta grubunda, tanı ile indüksiyon tedavisi arasında <1,39 Log NPM1 değeri azalışı olan hastaların ortalama sağkalım süresi 56,7 (GA: 32,3-81,0) ay iken, $\geq 1,39$ Log NPM1 değeri azalışı olan hastaların ortalama sağkalım süresi 76,9 (GA:57,6-96,2) aydır ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (n=43, Log Rank Testi p=0,318).



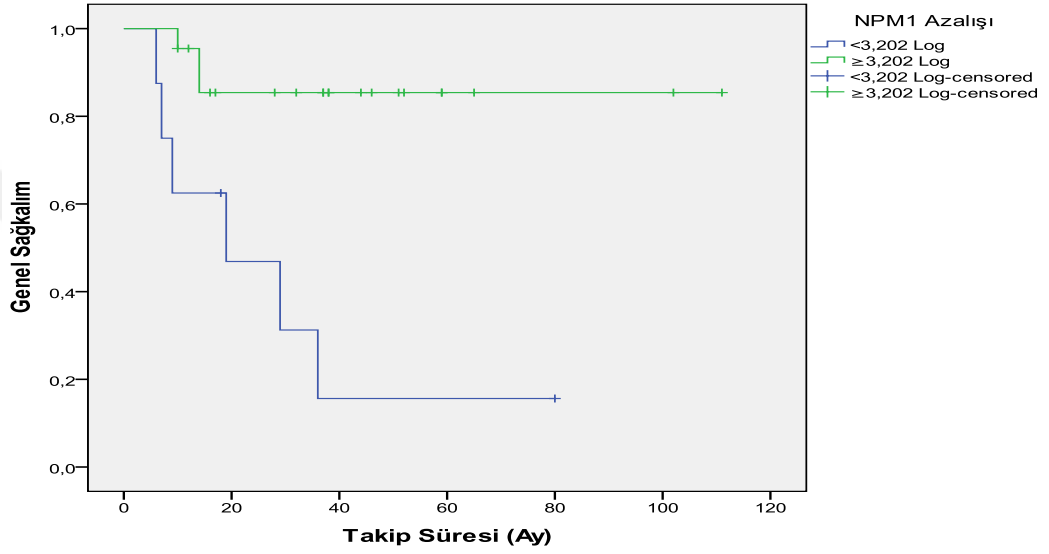
Şekil 4.11. İntensif tedavi alan hastaların tanı anı ile indüksiyon sonu NPM1 değişiminin sağkalım eğrisi

İntensif tedavi alan hasta grubunda, tanı ile 2. konsolidasyon tedavisi arasında $<2,087$ Log NPM1 değeri azalışı olan hastaların ortalama sağkalım süresi 59,4 (GA: 30,1-88,8) ay iken, $\geq 2,087$ Log NPM1 değeri azalışı olan hastaların ortalama sağkalım süresi 89,5 (GA:70,9-108,1) aydır ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($n=28$, Log Rank Testi $p=0,180$).



Şekil 4.12. İntensif tedavi alan hastaların tanı anı ile 2. konsolidasyon sonu NPM1 değişiminin sağkalım eğrisi

İntensif tedavi alan hasta grubunda, tanı ile 4. konsolidasyon tedavisi arasında $<3,202$ Log NPM1 değeri azalışı olan hastaların ortalama sağkalım süresi 28,3 (GA: 10,1-46,5) ay iken $\geq 3,202$ Log NPM1 değeri azalışı olan hastaların ortalama sağkalım süresi 96,6 (GA:81,6-111,6) aydır ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır (n=30, Log Rank Testi p=0,001).



Şekil 4.13. İntensif tedavi alan hastaların tanı anı ile 4. konsolidasyon sonu NPM1 değişiminin sağkalım eğrisi

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

NPM1 mutasyonunun AML'deki en yaygın mutasyonlardan biri olduğu, ilk olarak Falini ve arkadaşları tarafından gösterilmiş ve daha sonra diğer araştırmacılar tarafından desteklenmiştir [29, 32, 36, 38]. Bu mutasyonun hastalık evrimi sırasındaki stabilitesi ve hastalık durumu ile yakın ilişkisi, NPM1'in MRH takibinde rol oynayabileceğine işaret etmektedir [32]. Çalışmamızda 2010 – 2018 yılları arasında tanıda NPM1 mutasyonu saptanan hastaları incelediğimizde, hastaların tedavi sürecinde NPM1 kopya sayılarında azalma olduğunu nüks durumunda ise NPM1 kopya sayılarında artış olduğunu gördük (Tablo 4.6). Ek olarak akım sitometrik olarak MRH+ olarak izlenen hastalarda bu kopya sayılarındaki değişimin MRH- olarak izlenen hastalara göre daha az olduğu dikkatimizi çekti (Tablo 4.7). Bu saptamalar ışığında akım sitometrik MRH değerlendirmelerimizi temel alarak NPM1'in tedavi sürecindeki değişimlerinin MRH varlığına işaret edecek eşik değerlerini saptamayı hedefledik.

Retrospektif olarak tanımlanmış olan çalışmamızda 83 hastanın verilerine ulaştık. Tüm hastaların %73,1'i indüksiyon tedavisini standart “7 + 3” kemoterapisi olarak alırken %26,9'u yaş ve komorbiditeler nedeniyle hipometile edici tedaviler almıştır.

Çalışmamızdaki tüm hastaları değerlendirdiğimizde genel ve progresyonsuz sağkalım sonuçları literatürle benzer olmakla birlikte dahil edilen hasta popülasyonuna ilişkin farklılıklar da içermektedir. Verhaak ve arkadaşlarının çalışmasında NPM1 mutasyonu izlenen hastaların 5 yıllık olaysız ve genel sağkalım oranları sırasıyla %20 ve %27'dir [82]. Bizim çalışmamızda ise 5 yıllık progresyonsuz sağkalım ve genel sağkalım oranları sırasıyla %26 ve %42 olarak bulunmuştur. Bu farklılık 60 yaş üstü popülasyonun ve FLT-ITD pozitifliğinin Verhaak ve arkadaşlarının çalışmasında belirgin olarak daha yüksek oranda bulunması ile açıklanabilir. Döhner ve ark. yaptığı sağkalım analizlerinde ise 3 yıllık relapssız ve genel sağkalım verileri sırasıyla %35 ve %39 olarak bulunmuş olup çalışmamız verileri ile tutarlılık göstermektedir [35].

Çalışmamızda NPM1 mutasyonuna eşik eden FLT3 ITD pozitifliğinin daha olumsuz bir genel ve progresyonsuz sağkalıma işaret ettiğini bulduk. FLT3 ITD negatif grupta genel sağkalım ve progresyonsuz sağkalım oranları hem tek değişkenli analizde hem de çoklu değişkenli analizde FLT3 ITD pozitifliğinde anlamlı olarak daha kötü prognozu işaret etmekteydi. Thiede ve arkadaşları yaptığı çalışmada NPM1 mutasyonuna eşlik eden FLT3 ITD negatif olmasının daha iyi prognozu gösterdiğini bulmuştur [38]. Schnittger ve ark. da çalışmalarında FLT3 ITD negatif hasta grubunda genel sağkalım ortalama 1183 gün, pozitif hasta grubunda ortalama 321gün (p: 0,014) iken FLT3 ITD negatif grupta olaysız sağkalımın ortalama 773gün, pozitif grupta ortalama 234 gün (p:<0,01) olarak bulmuştur ki bu süreler bulgularımıza benzerlik göstermektedir [36].

60 yaş ve üstü grupta hem tek değişkenli hem de çok değişkenli analizlerde sağkalım verileri bu grupta kötü prognoza işaret etmekte olup literatürle de tutarlıdır. Bu durum söz konusu grubun gerek performans durumu gerek aldığı kemoterapi rejimleri gerekse eşlik edebilecek ek hastalıkların yükü nedeniyle ve muhtemel MDS'ye ikincil olabilme şanslarının yüksekliğinden beklenen bir sonuç olup kendi içerisinde yanlılık içermektedir.

Hipometile edici ajan alan hastaların sağkalım verileri tek değişkenli analizde anlamlı olarak intensif kemoterapi ile izlenenlere göre daha düşük bulunmuştur. Bu beklenen bir sonuç olup, altında tedavi hedeflerinin de farklılığından kaynaklanan yanlılığın da yattığı da göz önünde bulundurulmalıdır. Çok değişkenli sağkalım analizlerinde ise hipometile edici ajan alan grup ile intensif kemoterapi verilen grup arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır. Bu durum muhtemelen hipometile edici ajan alan hastaların takip verilerinin daha yetersiz olması ile açıklanabilir.

Çalışmamızda, tanı anı ile indüksiyon tedavisi sonu NPM1 değişiminin MRH varlığı ile ilişkisini intensif hasta grubunda incelediğimizde 1,39 log NPM1 değişimi eşik değerinin altında kalması %79,4 duyarlılık, %75 özgüllük ile MRH varlığını işaret ettiğini gösterdik (Şekil 4.8). Tanı anı ile 2. konsolidasyon tedavisi sonu NPM1 değişiminin MRH varlığı ile ilişkisini intensif hasta grubunda incelediğimizde 2,08 log NPM1 değişimi eşik değerinin altında kalması %81,8 duyarlılık, %80 özgüllük ile MRH varlığını işaret ettiğini gösterdik. (Şekil 4.9) Tanı anı ile 4. konsolidasyon

tedavisi sonu NPM1 değişiminin MRH varlığı ile ilişkisini intensif hasta grubunda incelediğimizde 3,202 log NPM1 değişimi eşik değerinin altında kalması %95,5 duyarlılık, %87,5 özgüllük ile MRH varlığını gösterdiğini bulduk. (Şekil 4.10) Bulduğumuz eşik değerleri hastaların kemik iliği NPM1 kopyaları ile eş zamanlı örneklerden çalışılan kemik iliği multiparametrik akım sitometri sonuçları ile karşılaştırılarak hesaplandığından güvenilirdir. Bulgularımız diğer çalışmalardan üstün olarak takip sürecindeki NPM1 kopya sayılarının oranlamasına dayanan eşik değerini gösterdiğinden her kit ve NPM1 ölçüm yöntemine uyarlanabilme özelliğini taşımaktadır. Tedavi yanıtının doğal seyri olarak NPM1 düşüşünün tedavi ilerledikçe daha farklı logaritmik eşik değeri vermesi beklenen ve istenen bir sonuçtur.

Hem tanı - indüksiyon sonrası hem de tanı - 2. konsolidasyon sonrası NPM1 değişimlerine göre elde ettiğimiz log eşik değerlerine göre yaptığımız sağkalım analizlerinde eşik değerden büyük log değişimi izlenen hastaların sağkalımı eşik değerin altında bir log değişimi izlenen hastalara göre daha uzun olsa da bu fark istatistiki anlamlılığa ulaşmadı. 4. konsolidasyon sonrası NPM1 düzeyinde $\geq 3,202$ log azalma olan hastaların ortalama sağkalım süresinin de bu azalmanın izlenmediği hastalara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha uzun olduğunu bulduk. Ancak retrospektif olarak yapılan çalışmamızda nüks giden hasta kaydının az olması nedeniyle bulduğumuz bu eşik değerlerinin nüksü öngördüğünü gösteremedik.

Hubmann ve arkadaşlarının 2014'te yaptığı 81 hastanın dahil edildiği analizde intensif tedavi sonrası %50 duyarlılık, %81 özgüllükle NPM1 kopyalarında 3log azalma olmamasının yüksek nüks riskine işaret ettiğini öne sürmüştür [79]. Bizim çalışmamızda bulduğumuz eşik değerlere göre MRH'nin nüksü göstermesine yönelik anlamlı bir bulgu elde edilemedi. Bunun sebebi hasta sayısındaki farklılık olabileceği gibi, yine bununla ilişkili olarak nüks kaydı olan hasta sayısının yetersizliği bu durumu açıklayabilir. Bir diğer teknik fark ise; Hubmann ve ark.'nın kullandığı NPM1 kitinin NPM1 A mutasyonunun yanı sıra B ve D mutasyonlarını da analiz etmesinin burada az da olsa rolü olabilir [79].

Balsat ve arkadaşlarının 2017'de periferik kan örnekleme ile yaptığı analizde indüksiyon sonrası 4 log NPM1 kopya düşüşü sağlanmadığında MRH'yi gösterdiğini

ve buna göre periferik kandan saptanan ölçülebilir kalıntı hastalığın izlendiği grupta daha düşük sağkalım oranlarının izlendiği rapor edilmiştir [83]. Çalışma bulgularımıza paralellik gösterse de örnekleme yönteminden kaynaklanan fark bu sonuç farklılığını açıklamaktadır.

Konsolidasyon tedavilerinin sonlanmasının ardından yapılan incelemelerde Chou ve arkadaşları NPM1 kopya sayısında ≥ 2 log düşüşün anlamlı olarak sağkalımı uzattığını göstermiştir [81]. Bu sonuç bizim çalışmamızın sonucunu bir anlamda desteklerken, çalışmamızda bulunan yüksek duyarlılık ve seçicilik ile 3,202 log eşik değeri daha hassas ve güvenilir sonuç sunmaktadır.

Krönke ve ark.'nın çalışmasında hastalara çift indüksiyon kemoterapisi ve ardından konsolidasyon kemoterapilerinden sonra yapılan NPM1mut/ 10^4 ABL birimiyle yapılan analizlerine göre daha yüksek nükleofosmin kopyalarına sahip olan hastalarda ölüm ve nüks riskinin daha yüksek olduğu bulmuştur [84]. Bu sonuç çalışmalarımızla paralellik göstermektedir.

Ivey ve arkadaşlarının yaklaşık iki yüz hasta ile çift indüksiyon kemoterapisi sonrası NGS yöntemi ile çevre kanı örneklemesinden yaptığı çalışmada NPM1 transkript seviyelerinin MRH açısından oldukça bilgilendirici olduğu ve NPM1 transkriptleri aracılığı ile yaptığı genel sağkalım analizinde MRH+ saptananlarda anlamlı olarak daha düşük sağkalım izlenmesi de bulgularımızla uyumludur [78].

Çalışmamızın güçlü yanları; hesaplanan logaritmik eşik değerlerinin oransal özelliği ile her kit ve birim ile değerlendirilmeye uygun olması ve multiparametrik akım sitometri ile ilişkilendirilen güvenilir eşik değerlerinin bulunmuş olması ve bu log eşik değerlerinin duyarlılığı ve özgüllüğünün yüksek oranda olması gösterilebilir.

Çalışmamızın başlıca sınırlılıkları ise; retrospektif olarak tasarlanmış olması, hasta sayısının az olması, temel olarak NPM1 için standardize edilmiş takip aralıklarının net ve oturmuş olmamasından kaynaklanan her hastanın her kontrol zaman noktasına ait verilerinin bulunmaması, daha çok hipometile edici ajan ile izlenen hastaların ölçülebilir kalıntı hastalık takibine alınmamış olması, bulduğumuz logaritmik eşik değerlerinin nüks ile ilişkisinin gösterilememesi sayılabilir.

Sonuç olarak çalışmamızda NPM1 mutasyonu olan AML hastalarında ölçülebilir kalıntı hastalık takibinde NPM1 transkriptlerinin log değişimlerini kullanarak izlemin yapılabileceği gösterilmiştir. Ölçülebilir kalıntı hastalık takibinde NPM1'in kullanımının standardize edilmesinin ve yaygınlaşmasının faydalı olabileceği düşünülmektedir. Bunun sağlanabilmesi için daha fazla sayıda hasta ile daha kapsamlı prospektif çalışmalar tasarlanması gerekmektedir.



ÖZET

Akut Myeloblastik Lösemi Hastalarında Nükleofosmin Mutasyonu Minimal Rezidüel Hastalık Takibinde Yol Gösterici Midir?

Giriş ve Amaç: Akut myeloid lösemi (AML) genetik olarak oldukça heterojen bir hastalık olup, AML vakalarının yaklaşık üçte birinde Nükleofosmin (NPM1) geninin ekzon-12 bölgesinde meydana gelen mutasyonlar izlenmektedir. NPM1 transkriptlerin sayısı ile tedaviye yanıt arasında yakından ilişki olduğu görülmüştür. Çalışmalar NPM1 mutasyonu bulunan AML hastalarında moleküler ölçülebilir kalıntı hastalık (MRH) izleminin bağımsız prognostik önemini desteklemektedir. Bu çalışmada tanıda NPM1 mutasyonu saptanmış AML hastaları incelenerek MRH takibinde NPM1'in rolünü ortaya konması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: 2010-2018 yılları arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi (AÜTF) Hematoloji Bilim Dalı Kliniğinde AML tanısı almış olup, tanıda NPM1 geni pozitif saptanmış, kemoterapi alan ve 18 yaşından büyük olan 83 hasta dahil edildi. Hastaların tedavi sürecindeki farklı zaman noktalarında yapılan kemik iliği aspirasyon ve biyopsi örnekleri kullanılarak MRH açısından tetkik edilmiş olan akım sitometri incelemeleri ile eş zamanlı NPM1 kopyalarının değişimi analiz edildi.

Bulgular: Tanı anı ile indüksiyon tedavisi sonu NPM1 değişiminin MRH varlığı ile ilişkisinin incelenmesinde, 1,39 log NPM1 azalmasının olmaması 9,4 duyarlılık, %75 özgüllük ile MRH varlığını işaret etmektedir. Tanı anı ile 2. konsolidasyon tedavisi sonu NPM1 değişiminin MRH varlığı ile incelenmesinde, 2,08 log NPM1 azalmasının olmaması %81,8 duyarlılık, %80 özgüllük ile MRH varlığını işaret etmektedir. Tanı anı ile 4. konsolidasyon tedavisi sonu NPM1 değişiminin MRH varlığı ile ilişkisinin incelenmesinde, 3,202 log NPM1 azalmasının olmaması %95,5 duyarlılık, %87,5 özgüllük ile MRH varlığını göstermektedir. Tanı - 4. konsolidasyon sonrası $\geq 3,202$ log NPM1 düzeyinde azalma olan hastaların ortalama genel sağkalımının, azalma izlenmeyen hastalara kıyasla daha uzun olduğu gösterildi. Ek olarak hastaların 5 yıllık progresyonsuz ve genel sağkalım oranları sırası ile %26 ve %42 idi ve FLT-ITD pozitifliğinin prognozu anlamlı olarak olumsuz etkilediği saptandı.

Sonuç: NPM1 mutasyonu olan AML hastalarında ölçülebilir kalıntı hastalık takibinde NPM1 transkriptlerinin log değişimlerini kullanarak izlemin yapılabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Sözcükler: akut myeloid lösemi, lösemi, nükleofosmin, ölçülebilir kalıntı hastalık, AML, MRH, NPM1

SUMMARY

Is Nucleophosmin Mutation Guiding Measurable Residual Disease in Acute Myeloblastic Leukemia Patients?

Introduction and Objective: Acute myeloid leukemia (AML) is a genetically heterogeneous disease and approximately one third of AML cases have mutations in the exon-12 region of the nucleophosmin (NPM1) gene. There was a close relationship between the number of NPM1 transcripts and treatment response. Studies support the independent prognostic significance of molecular measurable residual disease (MRD) monitoring in AML patients with NPM1 mutation. The aim of this study was to investigate the role of NPM1 in MRM follow-up by examining AML patients with NPM1 mutations in diagnosis.

Materials and Methods: Between 2010 and 2018, 83 patients who were diagnosed as AML in the Department of Hematology of Ankara University School of Medicine, were found to have positive NPM1 gene, and who were over 18 years of age who had chemotherapy. Bone marrow aspiration and biopsy samples performed at different time points during the treatment period of the patients were analyzed by flow cytometric studies examined for MRD as well as the simultaneous exchange of NPM1 copies.

Results: In the examination of NPM1 change with MRD presence at the time of diagnosis and at the end of the 2nd consolidation treatment, the absence of 1,39 log NPM1 decrease indicates the presence of MRD with 79,4% sensitivity and 75% specificity. In the examination of NPM1 change with MRD presence at the time of diagnosis and at the end of the 2nd consolidation treatment, the absence of 2.08 log NPM1 decrease indicates the presence of MRD with 81.8% sensitivity and 87,5% specificity. In the examination of NPM1 change with MRD presence at the time of diagnosis and at the end of the 2nd consolidation treatment, the absence of 3,202 log NPM1 decrease indicates the presence of MRD with 95,5% sensitivity and 80% specificity. The average overall survival of patients with a decrease in $\geq 3,202$ log NPM1 after the 4th consolidation was shown to be longer than that of patients without reduction. In addition, the 5-year progression-free and overall survival rates were 26% and 42%, respectively, and FLT-ITD positivity had a significant negative impact on prognosis.

Conclusion: It was shown that NPM1 transcripts can be monitored by log changes in measurable residual disease follow-up in AML patients with NPM1 mutation.

Keywords: acute myeloid leukemia, leukemia, nucleophosmin, measurable residual disease. AML, MRD, NPM1

KAYNAKLAR

1. Döhner, H., et al., *Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet*. Blood, 2010. **115**(3): p. 453-474.
2. Döhner, H., D.J. Weisdorf, and C.D. Bloomfield, *Acute myeloid leukemia*. New England Journal of Medicine, 2015. **373**(12): p. 1136-1152.
3. Ries, L.A., et al., *SEER cancer statistics review, 1975-2003*. 2006.
4. Shallis, R.M., et al., *Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges*. Blood reviews, 2019.
5. Lowenberg, B., J.R. Downing, and A. Burnett, *Acute myeloid leukemia*. New England Journal of Medicine, 1999. **341**(14): p. 1051-1062.
6. Campos, L., et al., *Surface marker expression in adult acute myeloid leukaemia: correlations with initial characteristics, morphology and response to therapy*. British journal of haematology, 1989. **72**(2): p. 161-166.
7. Wolach, O. and R.M. Stone, *How I treat mixed-phenotype acute leukemia*. Blood, 2015. **125**(16): p. 2477-2485.
8. Bennett, J.M., et al., *Proposals for the classification of the acute leukaemias French-American-British (FAB) co-operative group*. British journal of haematology, 1976. **33**(4): p. 451-458.
9. Arber, D.A., et al., *The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia*. Blood, 2016. **127**(20): p. 2391-2405.
10. Othus, M., et al., *Declining rates of treatment-related mortality in patients with newly diagnosed AML given 'intense' induction regimens: a report from SWOG and MD Anderson*. Leukemia, 2014. **28**(2): p. 289.

11. Döhner, H., et al., *Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel*. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 2017. **129**(4): p. 424-447.
12. Chang, J. and M. Olson, *Structure of the gene for rat nucleolar protein B23*. Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(30): p. 18227-18233.
13. Wang, D., H. Umekawa, and M. Olson, *Expression and subcellular locations of two forms of nucleolar protein B23 in rat tissues and cells*. Cellular & molecular biology research, 1993. **39**(1): p. 33-42.
14. Hingorani, K., A. Szebeni, and M.O. Olson, *Mapping the functional domains of nucleolar protein B23*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(32): p. 24451-24457.
15. Namboodiri, V.H., et al., *The structure and function of Xenopus NO38-core, a histone chaperone in the nucleolus*. Structure, 2004. **12**(12): p. 2149-2160.
16. Tokuyama, Y., et al., *Specific phosphorylation of nucleophosmin on Thr199 by cyclin-dependent kinase 2-cyclin E and its role in centrosome duplication*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(24): p. 21529-21537.
17. Wang, W., et al., *Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran–Crm1 complex in centrosome duplication*. Nature cell biology, 2005. **7**(8): p. 823.
18. Yu, Y., et al., *Nucleophosmin is essential for ribosomal protein L5 nuclear export*. Molecular and cellular biology, 2006. **26**(10): p. 3798-3809.
19. Lam, Y.W., L. Trinkle-Mulcahy, and A.I. Lamond, *The nucleolus*. Journal of Cell Science, 2005. **118**(7): p. 1335-1337.
20. Yun, J.P., et al., *Nucleophosmin/B23 is a proliferate shuttle protein associated with nuclear matrix*. Journal of cellular biochemistry, 2003. **90**(6): p. 1140-1148.
21. Li, J., et al., *Nucleophosmin regulates cell cycle progression and stress response in hematopoietic stem/progenitor cells*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(24): p. 16536-16545.

22. Colombo, E., et al., *Nucleophosmin is required for DNA integrity and p19Arf protein stability*. Molecular and cellular biology, 2005. **25**(20): p. 8874-8886.
23. Grisendi, S., et al., *Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis*. Nature, 2005. **437**(7055): p. 147.
24. Lee, S.Y., et al., *A proteomics approach for the identification of nucleophosmin and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 as chromatin-binding proteins in response to DNA double-strand breaks*. Biochemical Journal, 2005. **388**(1): p. 7-15.
25. Okuda, M., *The role of nucleophosmin in centrosome duplication*. Oncogene, 2002. **21**(40): p. 6170.
26. Ye, K., *Nucleophosmin/B23, a multifunctional protein that can regulate apoptosis*. Cancer biology & therapy, 2005. **4**(9): p. 918-923.
27. Cordell, J.L., et al., *Detection of normal and chimeric nucleophosmin in human cells*. Blood, 1999. **93**(2): p. 632-642.
28. Falini, B., et al., *Lymphomas expressing ALK fusion protein (s) other than NPM-ALK*. Blood, 1999. **94**(10): p. 3509-3515.
29. Falini, B., et al., *Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype*. New England Journal of Medicine, 2005. **352**(3): p. 254-266.
30. Caudill, J.S., et al., *C-terminal nucleophosmin mutations are uncommon in chronic myeloid disorders*. British journal of haematology, 2006. **133**(6): p. 638-641.
31. Falini, B., et al., *Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features*. Blood, 2006. **109**(3): p. 874-885.
32. Chou, W.-C., et al., *Nucleophosmin mutations in de novo acute myeloid leukemia: the age-dependent incidences and the stability during disease evolution*. Cancer research, 2006. **66**(6): p. 3310-3316.

33. Suzuki, T., et al., *Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia*. Blood, 2005. **106**(8): p. 2854-2861.
34. Chen, W., et al., *High frequency of NPM1 gene mutations in acute myeloid leukemia with prominent nuclear invaginations ("cuplike" nuclei)*. Blood, 2006. **108**(5): p. 1783-1784.
35. Döhner, K., et al., *Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations*. Blood, 2005. **106**(12): p. 3740-3746.
36. Schnittger, S., et al., *Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype*. Blood, 2005. **106**(12): p. 3733-3739.
37. Pasqualucci, L., et al., *Mutated nucleophosmin detects clonal multilineage involvement in acute myeloid leukemia: Impact on WHO classification*. Blood, 2006. **108**(13): p. 4146-4155.
38. Thiede, C., et al., *Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML)*. Blood, 2006. **107**(10): p. 4011-4020.
39. Cheson, B.D., et al., *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*. Journal of clinical oncology, 2003. **21**(24): p. 4642-4649.
40. Estey, E. and H. Döhner, *Acute myeloid leukaemia*. The Lancet, 2006. **368**(9550): p. 1894-1907.
41. Fernandez, H.F., et al., *Anthracycline Dose Intensification in Acute Myeloid Leukemia*. New England Journal of Medicine, 2009. **361**(13): p. 1249-1259.
42. Löwenberg, B., et al., *High-dose daunorubicin in older patients with acute myeloid leukemia*. New England Journal of Medicine, 2009. **361**(13): p. 1235-1248.

43. Fernandez, H.F., *Beyond the first glance: anthracyclines in AML*. Blood, 2015. **125**(25): p. 3828-3829.
44. Blum, W., et al., *Clinical response and *miR-29b* predictive significance in older AML patients treated with a 10-day schedule of decitabine*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. **107**(16): p. 7473-7478.
45. Klepin, H.D., *Geriatric perspective: how to assess fitness for chemotherapy in acute myeloid leukemia*. Hematology, 2014. **2014**(1): p. 8-13.
46. Quintás-Cardama, A., et al., *Epigenetic therapy is associated with similar survival compared with intensive chemotherapy in older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia*. Blood, 2012. **120**(24): p. 4840-4845.
47. Byrd, J.C., et al., *Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461)*. Blood, 2002. **100**(13): p. 4325-36.
48. Sorror, M.L., et al., *Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT*. Blood, 2005. **106**(8): p. 2912-2919.
49. Dohner, H., D.J. Weisdorf, and C.D. Bloomfield, *Acute Myeloid Leukemia*. N Engl J Med, 2015. **373**(12): p. 1136-52.
50. Breems, D.A., et al., *Prognostic Index for Adult Patients With Acute Myeloid Leukemia in First Relapse*. Journal of Clinical Oncology, 2005. **23**(9): p. 1969-1978.
51. Jentzsch, M., et al., *Clinical Challenges and Consequences of Measurable Residual Disease in Non-APL Acute Myeloid Leukemia*. Cancers, 2019. **11**(11): p. 1625.
52. Beillard, E., et al., *Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative*

reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) – a Europe against cancer program. Leukemia, 2003. **17**(12): p. 2474-2486.

53. Gabert, J., et al., *Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – A Europe Against Cancer Program.* Leukemia, 2003. **17**(12): p. 2318-2357.
54. Döhner, H., et al., *Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel.* Blood, 2017. **129**(4): p. 424-447.
55. Cuneo, A., et al., *Detection and monitoring of trisomy 8 by fluorescence in situ hybridization in acute myeloid leukemia: a multicentric study.* Haematologica, 1998. **83**(1): p. 21-26.
56. Marcucci, G., et al., *Abnormal Cytogenetics at Date of Morphologic Complete Remission Predicts Short Overall and Disease-Free Survival, and Higher Relapse Rate in Adult Acute Myeloid Leukemia: Results From Cancer and Leukemia Group B Study 8461.* Journal of Clinical Oncology, 2004. **22**(12): p. 2410-2418.
57. Schmidt, H., et al., *inv (3)(q21q26) in AML/MDS: Monitoring of the malignant clone with interphase FISH.* Haematologica, 2003. **88**(12): p. ECR38-ECR38.
58. Schuurhuis, G.J., et al., *Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party.* Blood, 2018. **131**(12): p. 1275-1291.
59. Kern, W., et al., *Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia.* Critical reviews in oncology/hematology, 2005. **56**(2): p. 283-309.
60. Voskova, D., et al., *Stability of leukemia-associated aberrant immunophenotypes in patients with acute myeloid leukemia between diagnosis and relapse: Comparison with cytomorphologic, cytogenetic, and molecular genetic findings.* Cytometry Part B: Clinical Cytometry, 2004. **62B**(1): p. 25-38.

61. Cilloni, D., et al., *Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Detection of Minimal Residual Disease by Standardized WT1 Assay to Enhance Risk Stratification in Acute Myeloid Leukemia: A European LeukemiaNet Study*. Journal of Clinical Oncology, 2009. **27**(31): p. 5195-5201.
62. Grimwade, D. and S.D. Freeman, *Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for "prime time"?* Blood, 2014. **124**(23): p. 3345-3355.
63. Takatsuki, H., et al., *Monitoring Minimal Residual Disease in patients With MLL-AF6 Fusion Transcript—Positive Acute Myeloid Leukemia Following Allogeneic Bone Marrow Transplantation*. International journal of hematology, 2002. **75**(3): p. 298-301.
64. Bill, M., et al., *Digital droplet PCR-based absolute quantification of pre-transplant NPM1 mutation burden predicts relapse in acute myeloid leukemia patients*. Ann Hematol, 2018. **97**(10): p. 1757-1765.
65. Jentzsch, M., et al., *Prognostic Impact of Blood MN1 Copy Numbers Before Allogeneic Stem Cell Transplantation in Patients With Acute Myeloid Leukemia*. Hemasphere, 2019. **3**(1): p. e167.
66. Jentzsch, M., et al., *High BAALC copy numbers in peripheral blood prior to allogeneic transplantation predict early relapse in acute myeloid leukemia patients*. Oncotarget, 2017. **8**(50): p. 87944.
67. Mencia-Trinchant, N., et al., *Minimal residual disease monitoring of acute myeloid leukemia by massively multiplex digital PCR in patients with NPM1 mutations*. The Journal of Molecular Diagnostics, 2017. **19**(4): p. 537-548.
68. Hindson, C.M., et al., *Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR*. Nature Methods, 2013. **10**: p. 1003.
69. Behjati, S. and P.S. Tarpey, *What is next generation sequencing?* Archives of Disease in Childhood-Education and Practice, 2013. **98**(6): p. 236-238.

70. Tomlinson, B. and H.M. Lazarus, *Enhancing acute myeloid leukemia therapy-monitoring response using residual disease testing as a guide to therapeutic decision-making*. Expert review of hematology, 2017. **10**(6): p. 563-574.
71. Bibault, J.-E., et al., *Next-generation sequencing of FLT3 internal tandem duplications for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia*. Oncotarget, 2015. **6**(26): p. 22812.
72. Debarri, H., et al., *IDH1/2 but not DNMT3A mutations are suitable targets for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia patients: a study by the Acute Leukemia French Association*. Oncotarget, 2015. **6**(39): p. 42345.
73. Döhner, H., et al., *Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel*. Blood, 2017. **129**(4): p. 424-447.
74. Ramos, N.R., et al., *Current approaches in the treatment of relapsed and refractory acute myeloid leukemia*. Journal of clinical medicine, 2015. **4**(4): p. 665-695.
75. Hourigan, C., et al., *Measurable residual disease testing in acute myeloid leukaemia*. Leukemia, 2017. **31**(7): p. 1482.
76. Schuurhuis, G.J., et al., *Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party*. Blood, 2018. **131**(12): p. 1275-1291.
77. Falini, B., et al., *Cytoplasmic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype*. New England Journal of Medicine, 2005. **352**(3): p. 254-266.
78. Ivey, A., et al., *Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML*. New England Journal of Medicine, 2016. **374**(5): p. 422-433.
79. Hubmann, M., et al., *Molecular response assessment by quantitative real-time polymerase chain reaction after induction therapy in NPM1-mutated patients identifies those at high risk of relapse*. Haematologica, 2014. **99**(8): p. 1317-1325.

80. Schnittger, S., et al., *Minimal residual disease levels assessed by NPM1 mutation-specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML*. Blood, 2009. **114**(11): p. 2220-2231.
81. Chou, W.C., et al., *Clinical implications of minimal residual disease monitoring by quantitative polymerase chain reaction in acute myeloid leukemia patients bearing nucleophosmin (NPM1) mutations*. Leukemia, 2007. **21**(5): p. 998-1004.
82. Verhaak, R.G.W., et al., *Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance*. Blood, 2005. **106**(12): p. 3747-3754.
83. Balsat, M., et al., *Postinduction Minimal Residual Disease Predicts Outcome and Benefit From Allogeneic Stem Cell Transplantation in Acute Myeloid Leukemia With NPM1 Mutation: A Study by the Acute Leukemia French Association Group*. Journal of Clinical Oncology, 2017. **35**(2): p. 185-193.
84. Krönke, J., et al., *Monitoring of Minimal Residual Disease in NPM1-Mutated Acute Myeloid Leukemia: A Study From the German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group*. Journal of Clinical Oncology, 2011. **29**(19): p. 2709-2716.