

**T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**



TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**Düşük ve İntermediate-1 Risk Grubu, Miyelodisplastik Sendrom Tanılı Hastalarda Yeni
Nesil Dizi Analizi Tabanlı Hedefe Yönelik Somatik Mutasyon Analizi**

DR. DUYGU ARICAN NOROOZI

**DANIŞMAN
PROF. DR. HALUK AKIN**

**İZMİR
2023**

ÖNSÖZ

Asistanlık hayatım boyunca ve tez çalışmamın tüm aşamalarında benimle birlikte bilgi ve tecrübelerini paylaşan, hem akademik hem günlük hayatımda desteğini hep yanımda hissettiğim ve uzmanlık eğitimime sınırsız katkıları olan değerli hocam, tez danışmanım ve aynı zamanda Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Haluk Akın'a

Tez çalışmamın başından sonuna kadar her kısımda benimle değerli fikirlerini ve tecrübelerini paylaşan, yol gösteren; ayrıca asistanlık hayatım boyunca güler yüzüyle, desteğiyle ve meslek hayatıma yönelik katkıları ile hatırlayacağım sevgili hocam Doç. Dr. Emin Karaca'ya

Uzmanlık eğitimim boyunca her birinden meslek hayatıma yönelik sayısız bilgi edindiğim ve ihtiyaç duyduğum her anda sorularıma cevap alabildiğim çok kıymetli hocalarım Dr. Asude Durmaz'a, Doç. Dr. Burak Durmaz'a, Doç. Dr. Ayça Aykut'a, Dr. Öğretim Üyesi Erhan Parıltay'a, Doç. Dr. Aslı Ece Solmaz'a

Tez çalışmam için birlikte çalışma fırsatı bulduğum değerli hocalarım Prof. Dr. Güray Saydam, Prof. Dr. Mine Hekimgil, Doç. Dr. Nazan Özsan, Doç. Dr. Timur Köse, Uzm. Dr. Fatma Keklik Karadağ ve Dr. Öğretim Üyesi Derya Demir'e

Eğitim sürecimi birlikte geçirme fırsatı bulduğum için kendimi şanslı hissettiren sevgili arkadaşlarım; Uzm. Dr. Hilmi Bolat'a, Uzm. Dr. Emine İpek Ceylan'a, Uzm. Dr. Tuba Sözen Türk'e, Uzm. Dr. Zehra Cengisiz'e, Uzm. Dr. Elif Uzay'a, Uzm. Dr. Semih Aşıkovalı'ya, Uzm. Dr. Gizem KÖK'e, Dr. Mert Pekerbaş'a, Dr. Burak Aşçıoğlu'na, Dr. Vedat Sivri'ye, Dr. Çağlar Arısoy'a, Dr. Bilgesu Ak'a, Dr. Özge Güngör'e, Dr. Ömer Alpay'a, Dr. Alper Baysal'a, Dr. Burcu Topçu'ya, Dr. Elif Kubar'a, Dr. Zeki Sakallı'ya, Dr. Burak Tokaç'a, Dr. Zeynep Nur Çakır'a, Dr. Sevde Can'a, Dr. Fatma Oğuzdoğan'a, Dr. Ekin Cemre Bayram'a, Dr. Levent Paralı'ya

Asistanlık hayatımda yardımlarıyla yanımda olan ve aile sıcaklığını hissettiren tüm teknisyen, sekreter, biyolog ve personel çalışma arkadaşlarıma,

Hayatımdaki yerini asla tarif edemeyeceğim ve bugünlere gelmem için tüm fedakarlıkları sergileyen canım Annem'e; en iyi arkadaşım olan ve onlarsız bir hayat düşünemediğim canım kardeşlerim Sinem ve Pınar'a

Her anımda elimden tutan ve sevgisini hep yanımda hissettiğim sevgili eşim Keyvan'a; tez sürecimin sonunda varlığını öğrendiğimiz ve hayatımıza şimdiden neşe katan minik Kızım'a

Son olarak çalışmamızı destekleyen Ege Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü'ne

En içten teşekkür, saygı ve sevgilerimi sunarım.

Dr. Duygu ARICAN NOROOZI

İzmir, 2023

İÇİNDEKİLER

ÖN SÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLOLAR LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
KISALTMALAR LİSTESİ	x
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Miyelodisplastik Sendrom Tanımı ve Epidemiyolojisi	4
2.2. Etiyoloji	4
2.3. Klinik Bulgular ve Değerlendirme	6
2.4. Tanı Kriterleri	8
2.5. Sınıflandırma	9
2.6. Ayırıcı tanı	12
2.6.1. Pre-MDS	13
2.6.2. Overlap sendromlar	16
2.7. Prognoz	17
2.7.1. Skorlama sistemleri	17
2.7.1.1. IPSS	18
2.7.1.2. WPSS	19
2.7.1.3. IPSS-R	19
2.7.1.4. IPSS-M	21
2.7.2. Ek belirteçler	23
2.8. Tedavi yaklaşımları	24
2.8.1. Düşük riskli MDS	25
2.8.1.1. Anemi tedavisi	25
2.8.1.2. Nötropeni ve trombositopeni tedavisi	26
2.8.2. Yüksek riskli MDS	26
2.8.2.1. Hipometile edici ajanlar (HMA)	27
2.8.2.2. AML benzeri kemoterapi	27
2.8.2.3. Allojenik kemik iliği nakli	27
2.8.3. Yeni tedaviler	28

2.8.3.1.	Luspatercept, Sotatercept	30
2.8.3.2.	<i>IDH1-2</i> inhibitörleri	30
2.8.3.3.	BCL2 inhibitörü (Venetoklaks)	31
2.8.3.4.	İmetelstat (Telomeraz inhibisyonu)	31
2.8.3.5.	Uçbirleştirme (Splicing) modülatörleri	32
2.8.3.6.	<i>TP53</i> modülatörü (APR-246) (Eprenetapopt)	32
2.8.3.7.	Roxadustat	32
2.8.3.8.	IRAK4 inhibitörü (Emavusertib) (CA-4948)	33
2.8.3.9.	Magrolimab (anti-CD47)	33
2.8.3.10.	Sabatolimab (anti-TIM3)	34
2.8.3.11.	Canakinumab	34
2.9.	Genetik inceleme	34
2.9.1.	Sitogenetik	35
2.9.2.	FISH	35
2.9.3.	Kromozomal Mikroarray Analizi (KMA)	35
2.9.4.	Moleküler	36
2.10.	Genetik bulguların rolü	37
2.10.1.	Sitogenetik bulgular	37
2.10.2.	Moleküler bulgular	39
2.10.2.1.	Somatik mutasyonlar	39
2.10.2.1.1.	RNA Uçbirleştirme (Splicing) Faktörleri (<i>SF3B1</i> , <i>SRSF2</i> , <i>U2AF1</i> , <i>ZRSR2</i>).....	43
2.10.2.1.2.	DNA metilasyonu (<i>DNMT3A</i> , <i>TET2</i> , <i>IDH1/2</i>)	45
2.10.2.1.3.	Histon Modifikasyonu (<i>ASXL1</i> , <i>EZH2</i> , <i>BCOR</i>).....	46
2.10.2.1.4.	DNA transkripsiyon faktörleri (<i>RUNX1</i> , <i>TP53</i> , <i>ETV6</i> , <i>NPM1</i> , <i>GATA2</i>)	47
2.10.2.1.5.	Sinyal iletimi (<i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> , <i>PTPN11</i> , <i>NF1</i> , <i>JAK2</i>)	49
2.10.2.1.6.	Kohezin kompleksi (<i>SMC3</i> , <i>SMC1A</i> , <i>RAD21</i> , <i>STAG2</i>)	49
2.10.2.2.	Germline mutasyonlar	49
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	51
3.1.	Örneklerin seçimi	51
3.2.	Genetik inceleme	52
3.2.1.	DNA izolasyon aşaması	53
3.2.2.	DNA konsantrasyon ölçümü	54

3.2.3. Yeni nesil dizileme (Kütüphane hazırlık aşaması ve dizileme işlemi)	54
3.3. Verilerin analizi	64
3.4. İstatistiksel analiz	65
4. BULGULAR	66
4.1. Çalışma Grubunun Verileri	66
4.2. Genetik analiz sonuçları	71
4.3. İstatistiksel analiz sonuçları	119
5. TARTIŞMA	124
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	135
7. KAYNAKÇA	136
8. EKLER	
8.1. Etik Kurul Onay Belgesi	
8.2. Gönüllü Olur Formu	
8.3. Veri Toplama Formu	
8.4. Tez Çalışması Orijinallik Raporu	

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Periferik kan ve kemik iliğinde görülen morfolojik değişiklikler

Tablo 2. WHO Sınıflaması 2016 ve 2022 Karşılaştırması

Tablo 3. Pre-MDS

Tablo 4. Pre-MDS ve MDS ayrımı

Tablo 5. IPSS

Tablo 6. IPSS-R

Tablo 7. IPSS-M modelindeki genler

Tablo 8. IPSS-M prognostik değişkenler

Tablo 9. MDS’de yeni tedaviler

Tablo 10. Panel içeriği

Tablo 11. Reaktifler ve gerekli volümler

Tablo 12. Dilüsyon için gerekli reaktifler ve volümler

Tablo 13. PCR döngüsü

Tablo 14. Gene özgü primer parçalama protokolü

Tablo 15. İndeks primer için gerekli reaktif ve volümleri

Tablo 16. Master miks için gerekli reaktif volümleri

Tablo 17. İndeks primerlere master miksin eklenmesi için gerekli volümler

Tablo 18. İndeksleme için gerekli reaktifler

Tablo 19. Kütüphane amplifikasyon PCR protokolü

Tablo 20. Filtreleme kriterleri

Tablo 21. Hasta popülasyon verileri

Tablo 22. Hasta popülasyonunun IPSS ve IPSS-M risk grupları

Tablo 23: Hasta popülasyonunun risk grubu değişimleri

Tablo 24. Hasta popülasyonunda saptanan VAF oranına göre saptanan mutasyon sayıları, blast oranları ve AML dönüşüm bilgisi

Tablo 25. VAF’a göre saptanan mutasyon verileri

Tablo 27. WHO-2022 MDS-bi*TP53* alt tipindeki hasta listesi

Tablo 28. AML dönüşümü gerçekleşen hastalarda saptanan mutasyonların gen dağılımı

Tablo 29. Blast oranı %5-10 arası olan hastalarda saptanan mutasyonların gen dağılımı

Tablo 30. Hasta 1-VAF: %2-5 Mutasyon Listesi

Tablo 31. Hasta 1-VAF $\geq$ %5 - <%10 Mutasyon Listesi

Tablo 32. Hasta 2-VAF $\geq$ %2 - <%5 Mutasyon Listesi

Tablo 33. Hasta 2-VAF $\geq$ %5 - <%10 Mutasyon Listesi

Tablo 34. Hasta 2-VAF ≥ 10 - < 20 Mutasyon Listesi

Tablo 35. Hasta 2-VAF ≥ 20 Ve Üstü Mutasyon Listesi

Tablo 36. Hasta 4-VAF ≥ 2 - < 5 Mutasyon Listesi

Tablo 37. Hasta 4-VAF ≥ 5 - < 10 Mutasyon Listesi

Tablo 38. Hasta 5-VAF ≥ 2 - < 5 Mutasyon Listesi

Tablo 39. Hasta 5-VAF ≥ 5 - < 10 Mutasyon Listesi

Tablo 40. Hasta 6-VAF ≥ 5 - < 10 Mutasyon Listesi

Tablo 41. Hasta 6-VAF ≥ 10 - < 20 Mutasyon Listesi

Tablo 42. Hasta 7-VAF ≥ 2 - < 5 Mutasyon Listesi

Tablo 43. Hasta 7-VAF ≥ 5 - < 10 Mutasyon Listesi

Tablo 44. Hasta 8-VAF ≥ 2 - < 5 Mutasyon Listesi

Tablo 45. Hasta 8-VAF ≥ 5 - < 10 Mutasyon Listesi

Tablo 46. Hasta 9-VAF ≥ 2 - < 5 Mutasyon Listesi

Tablo 47. Hasta 9-VAF ≥ 5 - < 10 Mutasyon Listesi

Tablo 48. Hasta 9-VAF ≥ 10 - < 20 Mutasyon Listesi

Tablo 49. Hasta 9-VAF ≥ 20 ve Üstü Mutasyon Listesi

Tablo 50. Hasta 10-AF ≥ 2 - < 5 Mutasyon Listesi

Tablo 51. Hasta 10-VAF ≥ 5 - < 10 Mutasyon Listesi

Tablo 52. Hasta 10-VAF ≥ 10 - < 20 Mutasyon Listesi

Tablo 53. Hasta 10-VAF ≥ 20 ve Üstü Mutasyon Listesi

Tablo 54. Hasta 11-VAF ≥ 2 - < 5 Mutasyon Listesi

Tablo 55. Hasta 11-VAF ≥ 5 - < 10 Mutasyon Listesi

Tablo 56. Hasta 11-VAF ≥ 20 ve Üstü Mutasyon Listesi

Tablo 57. Hasta 12-VAF ≥ 2 - < 5 Mutasyon Listesi

Tablo 58. Hasta 12-VAF ≥ 5 - < 10 Mutasyon Listesi

Tablo 59. Hasta 13-VAF ≥ 2 - < 5 Mutasyon Listesi

Tablo 60. Hasta 13-VAF ≥ 20 ve Üstü Mutasyon Listesi

Tablo 61. Hasta 14-VAF ≥ 2 - < 5 Mutasyon Listesi

Tablo 62. Hasta 14-VAF ≥ 10 - < 20 Mutasyon Listesi

Tablo 63. Hasta 15-VAF ≥ 2 - < 5 Mutasyon Listesi

Tablo 64. Hasta 15-VAF ≥ 5 - < 10 Mutasyon Listesi

Tablo 65. Hasta 15-VAF ≥ 10 - < 20 Mutasyon Listesi

Tablo 66. Hasta 15-VAF ≥ 20 ve Üstü Mutasyon Listesi

- Tablo 67.** Hasta 16-VAF ≥ 2 - < 5 Mutasyon Listesi
- Tablo 68.** Hasta 16-VAF ≥ 5 - < 10 Mutasyon Listesi
- Tablo 69.** Hasta 16-VAF ≥ 10 - < 20 Mutasyon Listesi
- Tablo 70.** Hasta 16-VAF ≥ 20 ve Üstü Mutasyon Listesi
- Tablo 71.** Hasta 17-VAF ≥ 2 - < 5 Mutasyon Listesi
- Tablo 72.** Hasta 17 -VAF ≥ 5 - < 10 Mutasyon Listesi
- Tablo 73.** Hasta 18-VAF ≥ 2 - < 5 Mutasyon Listesi
- Tablo 74.** Hasta 18-VAF ≥ 5 - < 10 Mutasyon Listesi
- Tablo 75.** Hasta 18-VAF ≥ 10 - < 20 Mutasyon Listesi
- Tablo 76.** Hasta 18-VAF ≥ 20 ve Üstü Mutasyon Listesi
- Tablo 77.** Hasta 19-VAF ≥ 2 - < 5 Mutasyon Listesi
- Tablo 78.** Hasta 19-VAF ≥ 5 - < 10 Mutasyon Listesi
- Tablo 79.** Hasta 19-VAF ≥ 20 ve Üstü Mutasyon Listesi
- Tablo 80.** Hasta 20-VAF ≥ 2 - < 5 Mutasyon Listesi
- Tablo 80.** Hasta 20-VAF ≥ 2 - < 5 Mutasyon Listesi
- Tablo 82.** Hasta 20-VAF ≥ 10 - < 20 Mutasyon Listesi
- Tablo 83.** Hasta 21-VAF ≥ 20 ve Üstü Mutasyon Listesi
- Tablo 84.** IPSS-M beklenen genel sağ kalım ve gerçek sağ kalım karşılaştırma tablosu
- Tablo 85.** Hastaların yeni belirlenen risk gruplarına göre beklenen genel sağ kalım ve gerçek sağ kalım karşılaştırılması
- Tablo 86.** Hastaların beklenen sağ kalım ve yaşam sürelerinin istatistiksel karşılaştırması
- Tablo 87.** Blast oranı ve belirli VAF aralıklarındaki mutasyon sayıları tablosu
- Tablo 88.** Blast oranı ile belirli VAF değerleri arasındaki istatistiksel test sonuçları

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. MDS patofizyolojisi genel bakış

Şekil 2. Mutant IDH proteinleri fonksiyonel mekanizması

Şekil 3. MDS sık mutasyona uğrayan genler

Şekil 4. Örneklem seçim basamakları

Şekil 5. Kütüphane hazırlık aşaması

Şekil 6. Panel iş akış şeması

Şekil 7. PCR materyalinin jel analizi

Şekil 8. Final kütüphane materyalinin jel görüntüsü

Şekil 9. Hasta 1-IPSS-M risk skoru

Şekil 10. Hasta 2-IPSS-M risk skoru

Şekil 11. Hasta 3-IPSS-M risk skoru

Şekil 12. Hasta 4-IPSS-M risk skoru

Şekil 13. Hasta 5-IPSS-M risk skoru

Şekil 14. Hasta 6-IPSS-M risk skoru

Şekil 15. Hasta 7-IPSS-M risk skoru

Şekil 16. Hasta 8-IPSS-M risk skoru

Şekil 17. Hasta 9-IPSS-M risk skoru

Şekil 18. Hasta 10-IPSS-M risk skoru

Şekil 19. Hasta 11-IPSS-M risk skoru

Şekil 20. Hasta 12-IPSS-M risk skoru

Şekil 21. Hasta 13 IPSS-M risk skoru

Şekil 22. Hasta 14-IPSS-M risk skoru

Şekil 23. Hasta 15-IPSS-M risk skoru

Şekil 24. Hasta 16-IPSS-M risk skoru

Şekil 25. Hasta 17-IPSS-M risk skoru

Şekil 26. Hasta 18-IPSS-M risk skoru

Şekil 27. Hasta 19-IPSS-M risk skoru

Şekil 28. Hasta 20-IPSS-M risk skoru

Şekil 29. Hasta 21-IPSS-M risk skoru

Şekil 30. IPSS-M beklenen genel sağ kalım ve yaşam süresi karşılaştırma grafiği

KISALTMALAR LİSTESİ

ACMG: Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Koleji (American College of Medical Genetics and Genomics)
aCML: Atipik Kronik Miyeloid Lösemi
AF: Allel frekansı (fraksiyonu)
AKİT: Allojenik kemik iliği nakli
AML: Akut Miyeloid Lösemi
ATG: Anti-timosit globülin
AMP: Moleküler Patoloji Derneği
ANC: Mutlak nötrofil sayısı
CCUS: Önemi belirlenmemiş klonal sitopeni
CDRs: Commonly deleted regions (sık delesyona uğrayan bölgeler)
CHIP: Potansiyeli belirlenmemiş klonal hematopoez
CMML-1: Kronik miyelomonositik lösemi 1
CMML-2: Kronik miyelomonositik lösemi 2
cnLoH: Kopya sayısı nötral heterozigosite kaybı
ÇY: Çok yüksek
dPCR: Dijital PCR
ECOG: Doğu Kooperatif Onkoloji Grubu (Eastern Cooperative Oncology Group)
ESAs: Eritrosit stimüle eden ajanlar
ESMO: European Society for Medical Oncology (Avrupa Tıbbi Onkoloji Derneği)
FDA: Food and Drug Administration
FISH: Floresan in situ hibridizasyon
G-CSF: Granülosit stimule edici faktör
Hb: Hemoglobin
HIF: Hipoksi ile İndüklenen Faktör
HMA: Hipometile edici ajan
ICC: The International Consensus Classification
ICUS: Önemi belirlenmemiş idiopatik sitopeni
IDUS: Önemi belirlenmemiş idiopatik displazi
MDS/MPN: Miyelodisplastik sendrom/Miyeloproliferatif neoplazm
IL-1 β : İnterlökin-1 β
IPSS: Uluslararası Prognostik Semptom Skoru
IPSS-M: IPSS-Moleküler (Molecular International Scoring System)
IRAK4: Interleukin-1 receptor-associated kinase 4

ITD: İnternal tandem duplikasyonu
JMML: Jüvenil miyelomonositik lösemi
Kİ: Kemik iliği
KMA: Kromozomal Mikroarray
KOAİ: Kronik Obstruktif Akciğer Hastalığı
LR-PSS: The Lower-Risk Prognostic Scoring System
MAF: Minör allel frekansı
MDS: Miyelodisplastik sendrom
MDS-bi*TP53*: Biallelik *TP53* inaktivasyonlu MDS
MDS-EB-I: Artmış blastlı MDS-I
MDS-EB-II: Artmış blastlı MDS-II
MDS-f: Fibrozisle birlikte giden MDS
MDS-h: Hipoplastik MDS
MDS-LB: Düşük blastlı MDS
MDS-MLD: Çoklu dizide displazili MDS
MDS- RS: Halka sideroblastlı MDS
MDS-*SF3B1*: *SF3B1* mutasyonlu MDS
MDS-SLD: Tekli seride displazili MDS
MDS-U: Sınıflanmamış MDS
MIPSS-R: Moleküler IPSS-R
NCCN: The National Comprehensive Cancer Network
NOS: MDS/MPN-Aksi belirtilmemiş
OY: Orta yüksek
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyon
PK: Periferik kan
PLT: Platelet
PTD: Parsiyel tandem duplikasyon
qPCR: Kantitatif PCR
RNA-seq: RNA dizileme
RPS14: Ribozomal protein S14
R-IPSS: Revize-Uluslararası Prognostik Semptom Skoru
RNA-seq: RNA dizileme
RPS14: Ribozomal protein S14
SNP: Tek Nükleotit Polimorfizm
t-MDS: Tedavi ilişkili MDS

TRA: Trombopoetin reseptör agonisti
TIM-3: T-cell immunoglobulin and murine domain 3
VAF: Varyant allel frekansı (fraksiyonu)
WBC: Beyaz küre sayısı (White Blood Count)
WES: Tüm Ekzom Dizileme
WGS: Tüm Genom Dizileme
WHO: Dünya Sağlık Örgütü
WPSS: WHO sınıflamasına dayalı prognostik skorelama sistemi
Y: Yüksek
2-HG: 2-hidroksiglutarat



ÖZET

Düşük ve İntermediate-1 Risk Grubu, Miyelodisplastik Sendrom Tanılı Hastalarda Yeni Nesil Dizi Analizi Tabanlı Hedefe Yönelik Somatik Mutasyon Analizi

Amaç: Miyelodisplastik sendromda klinik spektrum oldukça değişken olduğu için hastaların prognoz tahmini oldukça önemlidir. Prognoz tahmini ile yüksek riskli hastaları daha erken belirleyebilmek mümkündür. Bunun için kemik iliği blast yüzdesi, sitopeni varlığı ve sitogenetik bulgular kullanılarak çeşitli prognostik skorlama sistemleri geliştirilmiştir. Fakat bu skorlama sistemlerinde düşük riskli olarak belirlenen hastaların bile mortalite ve morbidite oranlarının yüksek olduğu görülmektedir. Bu nedenle son yıllarda moleküler parametreler mevcut prognostik skorlama sistemlerine ek olarak kullanılmaya başlanmıştır ve prognoz tahmininde oldukça etkili olduğu görülmüştür. Çalışmamızda düşük ve orta derece-1 (intermediate-1) MDS hastalarında sitogenetik testlere ek olarak somatik mutasyon analizi yapılarak; moleküler testlerin klinik pratikte düşük-yüksek risk ayırımına etkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamıza 21 adet kemik iliği aspirasyon örneği dahil edildi. Örnekler daha önce yapılan karyotip ve FISH sonuçları normal, düşük ve orta derece-1 MDS tanısı almış ve ölen hastalara aitti. Örneklerin somatik mutasyon analizinde, 58 geni kapsayan yeni nesil dizileme paneli kullanıldı. Elde edilen moleküler veriler ve hastaların klinik verileri IPSS-M risk skorlama programına girildi ve hastaların yeni risk grupları belirlendi.

Bulgular: Analiz sonucunda 21 hastadan 20 hastada (%95), 26 farklı gende toplam 222 Tier 1 veya Tier 2 mutasyon saptandı. Çalışmaya dahil edilen hastalardan IPSS'e göre 7 tanesi düşük risk ve 14 tanesi orta derece-1 (intermediate-1) risk grubundaydı. Moleküler analiz sonrasında elde edilen mutasyonlar IPSS-M risk skorlama programına girilerek yeni risk grupları oluşturuldu. Hastalar içerisinde toplamda 16 hasta (%76) daha yüksek risk gruplarına geçiş gösterdi. AML dönüşümü gösteren sadece iki hasta vardı ve hastaların bir tanesinde *IDH2* R140Q mutasyonu (AF: %43) saptanırken, diğerinde allel fraksiyonu %20'nin üstünde 4 farklı gende (*RUNX1*, *ETV6*, *U2AF1* ve *DNMT3A*) Tier 1 mutasyon saptandı.

Sonuç: Tüm hastaların kemik iliği aspirasyon örneklerinden elde edilen DNA konsantrasyonları çalışma için yeterli olmuştur. Moleküler analizler sonucunda düşük riskli hasta grubumuzun risk grupları %76 (16 hasta) oranında yükselmiştir. Çalışma düşük riskli MDS hastalarında moleküler testlerin rutin pratikte kullanılması gerekliliğinin önemini vurgulamaktadır. Ayrıca çalışmamızın ülkemizde sonraki çalışmaların önünü açması hedeflenmiştir.

Anahtar kelimeler: Miyelodisplastik Sendrom; Somatik Mutasyon Analizi; Yeni Nesil Dizi Analizi; IPSS-M

ABSTRACT

Next Generation Sequence-Based Targeted Somatic Mutation Analysis in Low and Intermediade-1 Risk Group Patients with Myelodysplastic Syndrome

Objective: Prognostic assessment is of significant importance in myelodysplastic syndrome (MDS) due to the high variability in its clinical spectrum. Accurate prognostic estimation allows for the early identification of high-risk patients. Various prognostic scoring systems have been developed using parameters such as bone marrow blast percentage, the presence of cytopenia, and cytogenetic findings. However, it has been observed that even patients categorized as low-risk in these scoring systems exhibit high mortality and morbidity rates. Consequently, in recent years, molecular parameters have been used in addition to existing prognostic scoring systems and have been seen to be highly effective in prognostic prediction. This study aims to investigate the impact of molecular testing on the discrimination of low and intermediate-1 MDS patients, in addition to cytogenetic tests, in clinical practice.

Materials and Methods: We included 21 bone marrow aspiration samples in our study. These samples belonged to patients whose low and intermediate-1 risk group with died patients with MDS. Also, these patients' karyotype and FISH analysis results were normal. Next generation sequencing panel covering 58 genes was used in the somatic mutation analysis of the samples. The molecular data obtained, along with the patients' clinical data, were input into the IPSS-M risk scoring program, and the patients' new risk groups were determined.

Results: The analysis detected a total of 222 mutations, which are Tier 1 or Tier 2, in 26 different genes in 20 out of 21 patients (95%). According to IPSS, seven of the included patients were classified as low risk, and 14 were categorized as intermediate-1 risk. Following molecular analysis, the detected mutations were input IPSS-M risk scoring program and new risk group was created. Amongst the examined patients, 16 patients (76%) have been reclassified to higher-risk groups. Only two patients exhibited transformation to acute myeloid leukemia (AML), with one patient being detected with the IDH2 R140Q mutation (AF: 43%) and the other having mutations in four different genes (RUNX1, ETV6, U2AF1 and DNMT3A) with allele fractions above 20%.

Conclusion: The DNA concentrations extracted from bone marrow aspiration samples of all patients were sufficient for the study. As a result of molecular analyzes, 76% (16 patients) of the patients, which are low-risk MDS, in our study were reclassified as a higher risk group. This study underscores the necessity of incorporating molecular tests into routine clinical practice for low-risk MDS patients. Furthermore, our study aims to pave the way for future studies in our country.

Keywords: Myelodysplastic Syndrome; Somatic Mutation Analysis; Next Generation Sequencing; IPSS-M



1. GİRİŞ

Miyelodisplastik sendrom (MDS) infektif hematopoez ile sonuçlanan klonal bir kemik iliği neoplazisidir. Çoğunlukla erkeklerde ve ileri yaşlarda ortaya çıkar. İnsidansı genel popülasyonda yıllık 4,5/100000 olmakla birlikte yaşla artmaktadır (1). MDS hastalarının yaklaşık 1/3'ünde akut miyeloid lösemiye (AML) dönüş riski mevcuttur (2). De novo AML'ye kıyasla MDS sekonder AML kötü gidiş ve kemoterapotiklere dirençle ilişkilidir. AML dönüşüm riski ve kötü prognoz riski olan hastaları önceden belirleyebilmek tedavi stratejisi açısından oldukça önemlidir.

MDS hastalarında klinik spektrum oldukça değişken olduğu için prognozun belirlenmesi ve tedavi seçimi açısından ek göstergelere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu ihtiyaca yönelik çeşitli prognostik skorum sistemleri (Uluslararası Prognostik Semptom Skoru (IPSS), Revize-Uluslararası Prognostik Semptom Skoru (R-IPSS), WHO sınıflamasına dayalı prognostik skorum sistemi (WPSS)) geliştirilmiştir. Skorum sistemlerinde genellikle kullanılan parametreler sitopeni varlığı, kemik iliği blast yüzdesi ve sitogenetik bulgulardır. Hastalar; kullanılan skorum sistemine bağlı olarak hesaplanan puanlamalar sonucunda kabaca düşük, orta ve yüksek risk şeklinde gruplara ayrılmaktadır.

Sitogenetik profillem skorum sistemleri için temel parametredir. Normal karyotip, izole Y kaybı, izole 5q ve izole 20q delesyonları iyi prognoz ile; kompleks karyotip (>3 anomali) varlığı ve 7. Kromozom anomalileri kötü prognozla ilişkilendirilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) MDS hastalarında öncelikle standart karyotip analizini önermektedir. Eğer karyotip sonuçları yeterli değilse Floresan in situ hibridizasyon (FISH) / Kromozomal Mikroarray (KMA) analizleri ile devam edilmesini belirtmektedir. MDS hastalarının yaklaşık yarısında sitogenetik anomali saptanmamaktadır ve hastalarda klinik heterojeniteyi açıklamak için sitogenetik çalışmalar yetersiz kalmaktadır (3). Özellikle sitogenetik anomali saptanmayan hasta gruplarında moleküler çalışmalar prognostik açıdan oldukça değerlidir.

International Working Group (Uluslararası Çalışma Grubu), MDS hastalarını R-IPSS skoru $\leq 3,5$ ise düşük risk ve $> 3,5$ ise yüksek risk olarak sınıflandırmaktadır. Düşük risk grubu için semptomatik tedavinin yeterli olabileceğini; yüksek risk grubu için ise agresif tedaviler ve allojenik kemik iliği naklinin gerekliliğini vurgulamaktadır (4). Çalışmalarda düşük risk grubundaki hastalarda bile morbidite ve mortalite oranlarının yüksek seyrettiği gösterilmiştir (5,6). Bu hasta gruplarında kötü prognozu belirleyebilmek ve erken tedaviye ulaştırabilmek için ek prognostik belirteçlere ihtiyaç vardır. Yaş, hastanın performans durumu, ferritin, LDH ve beta-2 mikroglobulin yanında çeşitli moleküler parametreler için araştırmalar devam etmektedir.

Miyelodisplastik sendromda moleküler analizler sonucunda değişikliğe uğradığı tespit edilen genlerin epigenetik regülasyon (*DNMT3A*, *TET2*), kromatin modifikasyonu (*ASXL1*, *EZH2*, *IDH1-2*), uçbirleştirme (spliceozomal) mekanizma (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2*), sinyal yolları (*KRAS*, *NRAS*, *PTPN11*) ve DNA transkripsiyonu (*RUNX1*, *TP53*) ile ilişkili birçok proteini kodladığı belirlenmiştir ve bu sayede hastalığın moleküler patogenezi de aydınlanmaya başlamıştır. Hastalığın patogenezi aydınlanmaya başladıkça hedefe yönelik tedavi seçenekleri de ortaya çıkmaktadır. MDS hastalarında da hedefe yönelik tedavilerde yenilikler meydana gelmektedir. *SF3B1*, *IDH1-2*, Uçbirleştirme (Splicezom) ve *TP53* mutasyon taşıyıcılarında yeni modülatörler ve terapötik ajanların çalışmaları yapılmaktadır (3).

Bu çalışmada daha önce karyotip ve FISH Analizi normal sonuçlanan IPSS risk skorlama sistemine göre düşük ve orta derece-1 risk grubunda olup tedaviye cevap vermeyip ölen MDS tanılı hasta grubundaki moleküler değişikliklerin araştırılması amaçlanmıştır. Bu sayede düşük ve orta riskli hastalarda saptanan somatik değişikliklerin, klinik gidişat ile ilişkili prognoz tahmini ve tedavi stratejileri açısından etkileri tartışılmıştır. Ayrıca somatik mutasyon varlığında; ilgili gen ve varyantın özellikleri dikkate alınarak hastanın tanı anındaki risk grubu elde edilen moleküler sonuç ışığında yeniden değerlendirilmiştir ve belirlenmiş olan tedavi stratejisi gözden geçirilmiştir. Örneklerdeki somatik değişiklikler, DNA temelli olarak 58 geni içeren hedefe yönelik bir panel ile taranmıştır. Böylece kromozomal değişiklik yokluğunda, moleküler belirteçlerin düşük-yüksek risk ayırımına katkı durumu, düşük risk grubundaki hastalar içerisinde kötü prognoz gidişli hastaları erken tespit ederek mortalite ve morbidite hakkındaki bilgi vericilik düzeyi değerlendirilmiştir.

Yapılan yeni çalışmalarda bazı moleküler belirteçlerin klinik fenotipi belirleme, prognostik sınıflama ve terapötik cevabı değerlendirmede kullanılabileceği gösterilmiştir (7,8). Mevcut prognostik puanlama sistemlerine moleküler belirteçlerin eklenmesi ile daha güçlü risk ayırımı yapabilen sistemler geliştirilmesine yönelik çalışmalar son dönemlerde oldukça hız kazanmıştır (9–11). Güncel kılavuzlar mevcut prognostik skorlama sistemleri ile belirli genlerdeki mutasyonların kombine analizini daha etkili risk sınıflaması için önermektedir (4,12) Yeni geliştirilen sınıflama “IPSS-Molecular (IPSS-M)” MDS ilişkili şu an için en güncel rehber olan “Ulusal Kapsamlı Kanseri Ağı (NCCN, The National Comprehensive Cancer Network), Versiyon 1.2023 MDS” kılavuzunda kendine yer bulmuştur ve prognostik sınıflama ile terapötik cevabı belirleme açısından umut vadetmektedir (4,11).

Düşük riskli MDS hastalarına yapılan moleküler testler sonucunda saptanan mutasyona göre hastaların risk grubu üst seviyeye geçebilir ve bu hastalara daha agresif başlangıçlı tedavi seçenekleri uygulanarak sağ kalım süreleri uzatılabilir. Bir çalışmada *TP53* ve *EZH2* mutasyon varlığının prognostik skorlama sistemleri ile birlikte değerlendirildiğinde daha kısa

sağ kalımla ilişkili olduğu gösterilmiştir (5). Güncel bir başka çalışmada moleküler verilerin IPSS-R ile entegre edilmesi ile yeni bir prognostik skorum sistemi (MIPSS-R) geliştirilmiştir. Bu çalışmadaki kohort grubunda MIPSS uygulandığında %29.63 hastanın risk grubu yükselmiştir. Aynı zamanda MIPSS'e göre risk seviyeleri değiştikten sonra hastaların %38.71'i erken tedavi stratejilerinden fayda görebileceği gösterilmiştir (7). Bu anlamda düşük riskli MDS hasta gruplarının moleküler profillemesine yönelik yapılan çalışmalar oldukça değerlidir.

Çalışmamızda; belirlenen hasta popülasyonunda sitogenetik testlere ek olarak yapılacak somatik mutasyon analizinin düşük-yüksek risk ayırımına etkisini araştırmak ve literatüre katkı sağlamak hedeflenmiştir. Çalışma, düşük-yüksek risk ayırımını belirleyecek bir moleküler test oluşturulmasına katkı sağlamaktadır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1 Miyelodisplastik Sendrom Tanımı ve Epidemiyolojisi

Miyelodisplastik sendrom (MDS), hematopoetik kök hücrelerinin klonal proliferasyonu sonucu ortaya çıkan inefektif hematopoez, kemik iliği displazisi ve akut miyeloid lösemiye dönüşüm riski ile karakterize klonal bir kemik iliği neoplazisidir. İnektif hematopoezle birlikte eritosit, lökosit ve trombosit serilerinin üretiminde ve fonksiyonunda kayıplar meydana gelebilir. Buna bağlı olarak her üç seride görülebilen sitopeniler ve displastik özellikler MDS’de klinik tablonun oluşmasında temel rol oynar. Miyelodisplastik sendrom zemininden gelişen akut miyeloid löseminin (AML) de novo AML’ye kıyasla standart kemoterapiye yanıtının daha düşük olduğu ve kısa sağ kalım ile ilişkilendirildiği bilinmektedir (4).

Miyelodiplastik sendrom ileri yaş hastalığıdır ve medyan tanı yaşı 70-75’tir. Genel popülasyonda insidansı 4,5/100.000’dir. İnsidans yaşla birlikte artar. Yıllık insidans; 40 yaş altında 0,1/100.000; 70-79 yaş aralığında 26,9/100.000 ve 80 yaş üstünde 55,4/100.000 olarak belirtilmektedir. Bu veriler ışığında bakıldığında mortalitede; sadece AML dönüşüm riskinin değil, ileri yaşa bağlı non-hematolojik komorbiditeler ve yoğun tedaviyi tolere edememelerinden kaynaklı sorunların da etkili olduğu söylenebilir. Miyelodisplastik sendrom genel olarak erkeklerde daha sık olarak görülmektedir fakat izole 5q delesyonlu MDS alt grubunda kadınların baskın olduğu dikkati çekmektedir (13).

Etnik köken açısından literatür verileri incelendiğinde MDS insidansında bilinen anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Fakat Asya popülasyonunda yapılan bir çalışmada MDS’nin daha erken yaşta ortaya çıkma eğiliminde olduğu, ciddi sitopenilerin daha fazla görüldüğü ve izole 5q delesyonu ile daha az sıklıkta karşılaşıldığı belirtilmiştir (14).

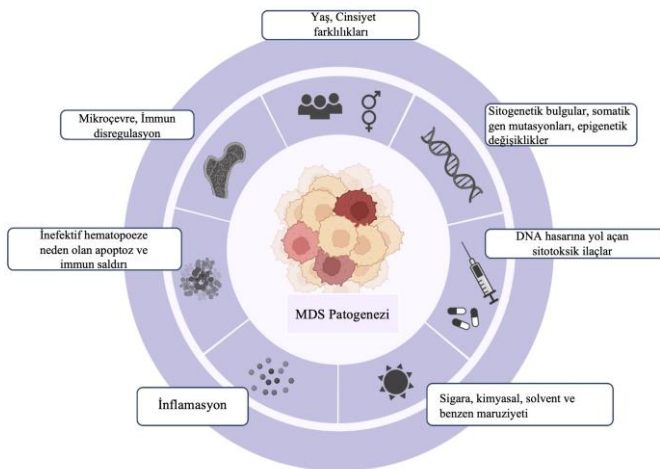
2.2 Etiyoloji

Miyelodisplastik sendromda hastalık etiyopatogenezinin sorumlu temel mekanizma klonal hematopoetik kök hücre proliferasyonunun bozulması ve apoptozdan kaçmasıdır. Bu mekanizmaların nasıl geliştiği halen tam olarak aydınlatılamamıştır. De novo gelişen MDS’de başlangıç lezyonunun genetik aberasyonlar (kromozomal veya moleküler) sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bir ya da daha fazla ortaya çıkan somatik mutasyonlar sonrasında da onkogenik süreçler gelişmeye başlamaktadır. Altta yatan bu moleküler yolların aydınlatılması ile hastalığın patofiziolojisi daha iyi anlaşılacaktır.

Sağlıklı popülasyonda yaşla birlikte genetik mutasyon yükünün arttığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda MDS ilişkili genlerde saptanan mutasyonların sağlıklı ileri yaş grubunda da görülebildiği gösterilmiştir. Aynı zamanda hafif sitopenisi olan ve MDS tanı kriterlerini tam olarak karşılayamayan kişilerde de MDS genlerinde mutasyonlar görülmüştür (15). Yaşla birlikte daha sık biriken sürücü mutasyonları; MDS'nin daha çok ileri yaş hastalığı olarak görülmesinde rol oynayan etmenlerden biri olarak yorumlanabilir.

Çevresel toksinlere (benzen, asbest, silika) maruziyet, sigara içimi, iyonize radyasyon, radyoterapi, belli kemoterapi ilaçları (özellikle alkilleyici ajanlar, topoizomeras inhibitörleri) MDS gelişiminden sorumlu çevresel ve iatrojenik etkenlerdendir. Kemoterapi veya radyoterapi sonrası gelişen MDS; tedavi ilişkili MDS (t-MDS) olarak tanımlanmaktadır ve hastalığın yaklaşık %20'sinden sorumlu olduğu bilinmektedir (16). t-MDS'de klinik kemoterapötiklere maruziyetten 5-7 yıl içerisinde ortaya çıkar ve de novo MDS'ye kıyasla kötü prognozla ilişkilidir. Ayrıca t-MDS; monozomi 5 ya da 7, kompleks karyotip ve *TP53* mutasyonları ile daha sık birliktelik göstermektedir (17).

Ailesel geçişli miyelodisplastik sendrom; yetişkin dönemde oldukça az görülür ve genellikle çocukluk çağı kalıtsal yatkınlık yaratan hastalıklarda ortaya çıkar. Kemik iliği yetmezliği sendromları (Diamond Blackfan Anemisi, Fanconi anemisi, Shwachman-Diamond sendromu), Konjenital Nötropeni, Down Sendromu özellikle pediatrik MDS ilişkilidir. Ailesel vakaların bir kısmında ise bazı genlerde germline mutasyonlar tespit edilmiştir. Primer MDS oluşuma eğilim yaratan bu kalıtsal germline mutasyonlar başlıca *DDX41*, *GATA2*, *RUNX1*, *ANKRD6*, *ETV6*, *TERT* ve *TERC* genlerinde oluşmaktadır. Bu genlerdeki mutasyonlar aynı zamanda diğer miyeloid malignitelerde de görülebilmektedir (18).



Şekil 1. MDS patofiziolojisi genel bakış (19)

2.3 Klinik Bulgular ve Değerlendirme

Miyelodisplastik sendromda klinik spektrum oldukça değişkendir. Genellikle yaşlı, asemptomatik hastada başka bir amaçla araştırılırken sitopeni varlığı ile farkedilir. Klinik bulgular kemik iliği yetmezliğine bağlı olarak ortaya çıkar. En sık anemi ve anemiye bağlı semptomlar (halsizlik, nefes darlığı, göğüs ağrısı) görülür. Bunun dışında trombositopeniye bağlı kanama veya peteşiler, nötropeniye bağlı enfeksiyonlar ortaya çıkabilir. MDS’de organomegali sıklıkla beklenmez. Organomegali varlığında overlap sendromlarla birliktelik düşünülebilir.

Otoimmün hastalıklar miyelodisplastik sendrom tanılı hastaların yaklaşık %20-30’unda görülür. En sık otoimmün hemolitik anemi ve vaskulitler olsa bile oldukça farklı klinik tablolar bildirilmiştir. Bunlar arasında romatoid artrit, psöriasis, Henoch Schönlein purpura, otoimmün hepatit, otoimmün pankreatit, Sjögren hastalığı, romatizmal kalp hastalığı sayılabilir. Otoimmün hastalıklarla ilişkili olan MDS’nin immunsupresif tedavilerden fayda gördüğü belirtilmiştir (20).

Miyelodisplastik sendromda klinik ile ilişkili en büyük problem akut miyeloid lösemi dönüşüm riskidir. Hastaların yaklaşık 1/3’ünün AML dönüşüm riski olduğu bilinmektedir (2). De novo AML’ye kıyasla MDS sekonder AML kötü gidiş ve kemoterapotiklere dirençle ilişkilidir. AML dönüşüm riski ve kötü prognoz riski olan hastaları önceden belirleyebilmek tedavi stratejisi açısından oldukça önemlidir.

Miyelodisplastik sendrom tanısı almış hastalarda kardiyovasküler hastalıklara bağlı komplikasyonlar artmıştır. Özellikle bu kardiyak komplikasyonlar transfüzyon alan hastalarda daha sık görülmektedir. Bu durum; MDS’de sık görülen sürücü mutasyonlarının (*TET2*, *DNMT3A*) ateroskleroza ve inflamatuvar fenotipi hızlandırması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (21). Düşük risk MDS’de hastalık ilişkisiz ölümlerin ana nedeni kardiyovasküler hastalık olarak belirtilmiştir (22). Bu nedenle her iki risk grubundaki MDS hastalarında kardiyovasküler olaylar açısından dikkatli olunması gerekmektedir.

Miyelodisplastik sendrom şüphesi olan hastalara yaklaşırken ilk değerlendirmede yapılacak sitopenilerin diğer olası tüm sebeplerinin dışlanmasıdır. Bununla birlikte hastalara tam kan sayımı, periferik yayma, kemik iliği aspirasyonu ve biyopsisi, akım sitometrisi ile immün fenotiplendirme, standart kromozom analizi ve gerekirse FISH yapılmalıdır.

Sitopeniler arasından anemi %52, trombositopeni %40 ve nötropeni %18 sıklıkla görülmektedir. MDS hastalarında anemi ile sıklıkla normositik veya makrositik olarak karşılaşılır. Nötropeni ve trombositopeni; anemi ile birlikte olabilir fakat çoğunlukla izoledir (23).

Periferik yaymada blastlar nadir olarak görülür. Eğer blast varsa AML'den şüphelenmek gerekir. Kemik iliği ve aspirasyon biyopsisinde dikkat edilmesi gerekenler selülarite, blast sayısı, megakaryositik seride displastik değişiklikler, ring sideroblast varlığı, fibrozisdir. Bunların dışında kemik iliği dışı metastazların dışlanması, Giemsa ve demir boyama yapılması gerekmektedir (4).

Miyelodisplastik sendromu klinik olarak tanımlayan tek bir bulgu bulunmamaktadır. Tanı genellikle periferik kan ve kemik iliği incelemeleri sonucunda belirli kriterler varlığında konur. Bu nedenle kemik iliği biyopsisi tanı için mutlaka gereklidir. Kemik iliği biyopsisi sonucunda MDS hastalarının kemik iliği örnekleri genellikle normoselüler veya hiperselülerdir. Tek veya daha fazla seride %10'dan fazla displastik değişikliklerin görülmesi gerekmektedir. Kemik iliği örneğinde miyeloblast oranı %20'yi geçerse tanı AML'ye döner (4).

Periferik kan ve kemik iliğinde eritroid, miyeloid ve megakaryositik seride görülebilen morfolojik değişimler aşağıdaki tabloda detaylıca gösterilmiştir.

Tablo 1. Periferik kan ve kemik iliğinde görülen morfolojik değişiklikler

HÜCRE SERİSİ	PERİFERİK KAN	KEMİK İLİĞİ
Eritroid	Anizositoz Poikilositoz Dismorfik eritrositler Polikromazi Megalosit Bazofilik noktalanma Çekirdekli eritroid prekürsorleri Ovalosit Fragmantosit Gözyaşı hücreleri	Megaloblastoid değişiklikler Multinükleasyon Nükleer tomurcuklama Nükleuslar arası köprüleşme Karyoreksis Atipik mitoz Sideroblastlar Ring sideroblastlar Periodik asit-Schiff pozitif eritrosit prekürsorleri
Miyeloid	Pseudo Pelger-Huet hücreleri Hipo/degranülasyon Sola kayma Anormal kromatin kümeleşmesi	Sola kayma Artmış medüller blast sayısı Auer rod veya cisimciği Hipo/degranulasyon Pseudo-Pelger hücreleri Nükleer anomaliler (hipersegmentasyon, anormal kromatin kümelenmesi) Monosit artışı ve anormal morfolojisi
Megakaryosit	Dev trombositler Anizometri	Mikromegakaryositler Mononükleer megakaryosit Hipersegmentasyon Çok sayıda ayrık nükleus

2.4 Tanı Kriterleri

Miyelodisplastik sendrom için oluşturulan Uluslararası Çalışma Grubu; kılavuzlarda kullanılması ve tanıda tutarlık amacıyla bir araya gelerek tanı kriterleri belirlemiştir (24).

MDS tanısını sağlamak için öncelikle ön koşul olarak belirlenen her iki kriteri karşılamak gerekmektedir. Ön koşul kriterleri şu şekildedir:

- En az 6 ay süren stabil sitopeni (spesifik karyotipik bulgu veya bilinear displazi varlığında en az iki ay)
- Displazi veya sitopeniye sebep olan etiyolojilerin dışlanması

Ön koşul kriterlerinde bahsi geçen sitopenilerin tanımı aşağıda belirtilmiştir.

- Anemi: Hemoglobin (Hb) <10g/dL
- Nötropeni: Mutlak nötrofil sayısı (ANC) <1.8 x10⁹/L
- Trombositopeni: Platelet (PLT) <100 x 10⁹/L

MDS tanısı için ön koşul kriterlerinin yanı sıra; MDS ile ilgili 3 belirleyici kriterden en az bir tanesinin karşılanması gerekmektedir.

- Displazi (3 ana kemik iliği serisi içerisinde 1 veya daha fazla seride $\geq$ %10 displazi)
- Blast sayısının %5-19 olması
- Spesifik MDS ilişkili karyotip (del(5q), del(20q), +8 veya -7/del(7q))

Dünya Sağlık Örgütü (WHO); sitopenik hastada displazi yokluğunda bile MDS spesifik karyotip varlığının MDS tanısı için yeterli olduğunu belirtmektedir.

2.5 Sınıflandırma

Miyelodisplastik sendrom klinik spektrumu oldukça geniş heterojen bir grup hastalıktır. Hastalıkta tedavi seçimi ve prognozu öngörebilmek için iyi bir sınıflama yapılması esastır. MDS’de ilk olarak 1982 yılında Fransız-Amerikan İngiliz (French- American - British- FAB) sınıflaması “prelösemi” başlığı altında yapılmıştır. 2001 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) FAB sınıflamasına klinik, morfolojik, sitokimyasal, immunfenotipik, genetik ve diğer biyolojik bilgileri entegre ederek MDS’ye alternatif bir sınıflama sistemi geliştirmiştir. 2008 ve 2016 yıllarında bu sınıflamaya revizyon gelmiştir. Günümüze kadar WHO-2016 sınıflaması esas olarak kullanılmıştır (25,26).

WHO-2016 sınıflamasının alt tipleri; tek dizide displazi ile seyreden refrakter sitopeniler (tekli seride displazili MDS (MDS-SLD), refrakter anemi-trombositopeni-

nötropeni), halka sideroblastlı MDS (MDS- RS), çoklu dizide displazili MDS (MDS-MLD), artmış blastlı MDS-I (MDS-EB-I), artmış blastlı MDS-II (MDS-EB-II), sınıflanmamış MDS (MDS-U), izole del 5q sendromu ve çocukluk çağı refrakter sitopenisi olarak tanımlanmıştır (27).

Dünya Sağlık Örgütü 2022 yılında miyeloid ve lenfoid neoplazm sınıflandırmasının 5. versiyonunu yayınlamıştır. Güncellenmiş bu versiyona göre miyelodisplastik sendrom, miyedisplastik neoplazm olarak yeniden isimlendirilmiştir. Alt tiplerin tanımlanmasında genomik özelliklerin özellikle moleküler parametrelerin daha çok rol oynadığı görülmüştür (28). WHO 2022 sınıflandırması aynı zamanda 2023 yılında yayınlanan en güncel kılavuz olan NCCN MDS rehberinde de yerini almıştır (4,29).

WHO 2022 sınıflandırmasının alt tipleri genetik ve morfolojik sınıflandırma olarak ikiye ayrılmaktadır. Genetik olarak tanımlanan alt tipler; düşük blast ve izole 5q delesyonlu MDS (MDS-5q), düşük blast ve *SF3B1* mutasyonlu MDS (MDS-*SF3B1*) ve biallelik *TP53* inaktivasyonlu MDS (MDS-bi*TP53*)’dir. Morfolojik alt tipler ise; düşük blastlı MDS (MDS-LB), hipoplastik MDS (MDS-h), artmış blastlı MDS (MDS-IB) ve AML olarak tanımlanır. MDS-IB ise kendi içerisinde MDS-IB1, MDS-IB2 ve MDS-f (Fibrozisle birlikte giden MDS) olarak ayrılır.

WHO 2022’de güncellenen MDS sınıflandırmasındaki alt tiplerinin detaylı tanımları sırayla aşağıda belirtilmiştir (29).

- MDS-5q
 - İzole del(5q) veya kromozom 7 anomalisi dışında 1 ek kromozomal anomali varlığı
- MDS-*SF3B1*
 - Mutasyonlu *SF3B1* allelin VAF (varyant allel frekansı) $\geq$ %10
 - $\geq$ %15 Ring sideroblast (MDS-LB-RS)
 - Normal karyotip veya del(5q), monozomi 7, inv(3) veya anormal 3q26, kompleks karyotip ($\geq$ 3 kromozomal anomali) dışında herhangi bir sitogenetik anomali
 - *TP53*, *EZH2*, *RUNX1* genlerinde somatik mutasyon

- MDS-bi*TP53* (30).
 - ≥ 2 *TP53* mutasyonu
 - 1 mutasyonla birlikte 17p *TP53* lokusunda kopya sayısı kaybı veya kopya sayısı nötral heterozigosite kaybı (cnLoH) (genellikle kompleks karyotiple birlikte)
 - VAF: $> \% 23$
- MDS-h
 - Kemik iliği selülaritesi $\leq \%25$
- MDS-IB1
 - Periferik kan blast oranı $\% 2-4$
 - Kemik iliği blast oranı $\% 5-9$
- MDS-IB2
 - Periferik kan blast oranı $\% 4-19$, Auer rod
 - Kemik iliği blast oranı $\%10-19$
 - MDS-IB2 terapötik yaklaşımda AML benzer olarak düşünülmelidir. “The International Consensus Classification (ICC)” sınıflamasında bu grup MDS/AML olarak tanımlanmıştır (31).
- AML
 - Kemik iliği blast oranı $\geq \%20$
 - ICC sınıflamasında ise ek olarak kemik iliği blast oranı $\geq \% 10$ ve sitogenetik veya moleküler lösemi ilişkili değişiklik varlığı (31).

2016 ve 2022 yılları güncellenmiş olan WHO sınıflama sistemleri aşağıdaki tabloda karşılaştırmalı olarak verilmiştir (4):

Tablo 2. WHO Sınıflaması 2016 ve 2022 Karşılaştırması (4)

WHO sınıflaması 2016-2022 karşılaştırması (NCCN MDS 1.2023 kılavuzu)		
WHO 2016	WHO 2022	BLAST
	MDS Genetik tanımlama	
MDS-del(5q)	MDS-5q (düşük blast)	Kemik iliği (Kİ): < %5 Periferik kan (PK): < %2
MDS-RS	MDS- <i>SF3B1</i> (düşük blast)	Kİ: < %5
-	MDS-bi <i>TP53</i>	Kİ, PK: < %20
	MDS Morfolojik tanımlama	
MDS-SLD, MDS-MLD	MDS-LB	Kİ: < %5 PK: %2-4
-	MDS-h	Kİ: < %5
• MDS-EB1 • MDS-EB2 • -	MDS-IB • MDS-IB1 • MDS-IB2 MDS-f	Kİ: % 5-9 veya PK: % 2-4 Kİ: %10-19 veya PK: %5-19, auer rod Kİ: %5-19 PK: %2-19
AML	AML	Kİ: $\geq$ %20

2.6 Ayırıcı tanı

Sitopeni veya kemik iliğinde displaziye neden olabilen ve MDS ayırıcı tanısında dikkate alınabilecek hastalıklar ve durumlardan bahsedilecektir.

Nutrisyonel eksiklikler (çinko ve bakır eksiklikleri), toksik madde maruziyetleri (ağır metaller, yoğun alkol kullanımı), bazı ilaçlar ve biyolojik ajanlar, enfeksiyonlar (HIV, Parvovirus B19), konjenital hastalıklar, sideoblastik anemi (*XLSA* mutasyonu), otoimmün hastalıklar (Romatoid artrit, Sistemik lupus eritematozus), aplastik anemi MDS'nin ayırıcı tanısında yer almaktadır.

Yukarıda sayılan hastalıkların dışında ayırıcı tanıda önemli bir kısmı oluşturan diğer hastalıklar; Pre-MDS ve Overlap sendromlar olarak iki alt başlık halinde incelenecektir.

2.6.1 Pre-MDS

Miyelodisplastik sendrom kriterlerini karşılamayan, bazen MDS'nin öncüsü olabilecek klinik durumlar pre-MDS olarak tanımlanmıştır. Pre-MDS başlık altında önemi belirlenmemiş idiopatik sitopeni (ICUS), önemi belirlenmemiş idiopatik displazi (IDUS), potansiyeli belirlenmemiş klonal hematopoez (CHIP) ve önemi belirlenmemiş klonal sitopeni (CCUS) toplanmıştır. Bu tanımlar sadece MDS değil, diğer hematolojik malignitelere de öncü lezyonlar olabilir. Aynı zamanda bu klinik tablolar literatürde “indolent miyeloid hematopoetik hastalıklar spektrumu” olarak geçmektedir. Güncel kılavuzlar bu grup hastaların en az 3-6 ayda bir kontrol edilmesini önermektedir.

Pre-MDS olarak tanımlanan dört ayrı antite zaman içerisinde stabil kalabileceği gibi, MDS veya AML'ye progrese olabilir. Ayrıca pre-MDS'nin non-hematolojik hastalıklara (otoimmün veya inflamatuvar) dönüşebildiği görülebilmektedir (32) MDS'ye progresyon riskini değerlendiren çalışmalara bakıldığında ise en yüksek riskin CCUS alt grubunda olduğu söylenmektedir (33). CCUS hastalarında *JAK2*, *ZRSR2*, *RUNX1*, *SRSF2* ve *U2AF1* mutasyon varlığında MDS progresyon riskinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (34).

Pre-MDS hastalıklarının detaylı klinik tanımlaması aşağıdaki tabloda verilmiştir (12).

Tablo 3. Pre-MDS

Önemi belirlenmemiş idiopatik sitopeni (ICUS)	• En az 4 aydır devam eden hafif sitopeni (Hb <11.0 g/dl, nötropeni <1500/μl ve/veya trombositopeni <100.000/μl) • Displazi yokluğu veya sadece hafif (<%10) displazi • Kemik iliği blast oranı <%5 • Klonal sitogenetik veya moleküler belirteç yokluğu • Diğer hastalıkların dışlanması
Önemi belirlenmemiş idiopatik displazi (IDUS)	• Anlamlı sitopeni yokluğu (Hb $\geq$ 11.0 g/dl, nötropeni $\geq$ 1500/μl ve/veya trombositopeni $\geq$ 100.000/μl) • Nötrofilik ve/veya eritroid ve/veya megakaryositik seride >%10 displazi • Kemik iliği blast oranı <%5 • Klonal sitogenetik veya moleküler belirteç yokluğu
Potansiyeli belirlenmemiş klonal hematopoez (CHIP)	• Anlamlı sitopeni yokluğu • Displazi yokluğu veya sadece hafif (<%10) displazi • Kemik iliği blast oranı <%5 • 1 veya daha fazla MDS ilişkili mutasyon varlığı • Klonalite tanımı: Miyeloid hastalık ilişkili genlerdeki (özellikle <i>DNMT3A</i>, <i>TET2</i>, <i>JAK2</i> ve <i>TP53</i>) mutasyonların varyant allel frekansının %2 ve %30 arasında olması
Önemi belirlenmemiş klonal sitopeni (CCUS)	• En az 4 aydır devam eden hafif sitopeni (Hb <11.0 g/dl, nötropeni

	<1500/μl ve/veya trombositopeni <100.000/μl) • Displazi yokluğu veya sadece hafif (<%10) displazi • Kemik iliği blast oranı <%5 • 1 veya daha fazla MDS ilişkili mutasyon varlığı • Klonalite tanımı: Miyeloid hastalık ilişkili genlerdeki (özellikle <i>DNMT3A</i>, <i>TET2</i>, <i>JAK2</i> ve <i>TP53</i>) mutasyonların varyant allel frekansının %2 ve %30 arasında olması
--	--

Güncel kılavuz; klonal moleküler belirteç varlığını araştırmak için MDS ilişkili genlerden en az 21 geni içeren (kılavuzun MDS-C kısmında belirtilmiştir ve çalışmanın ileriki bölümlerinde detaylı olarak anlatılmıştır) paneller ile somatik mutasyon analizi yapılmasını önerir.

Miyelodisplastik sendromda kemik iliği displazisi ve sitopenilere ek olarak, klonal karyotipik anormallik veya somatik mutasyonlar görülebilmektedir. Klonal karyotipik anomali varlığı; en az 2 veya daha fazla metafaz plağında ilgili sitogenetik anomalinin görülmesi şeklinde tanımlanır. Somatik mutasyon için de kriter varyant allel frekansının %2'nin üzerinde olmasıdır. Bu kriterler baz alınarak Pre-MDS ile ayırıcı tanıda yardımcı olabilecek özellikler aşağıdaki tabloda detaylı olarak belirtilmiştir (4).

Tablo 4. Pre-MDS ve MDS ayrımı

Özellik	ICUS	IDUS	CHIP	CCUS	MDS
Somatik mutasyon	-	-	+/-	+/-	+/-
Klonal karyotipik anomali	-	-	+/-	+/-	+/-
Kİ displazisi	-	+	-	-	+
Sitopeni	+	-	-	+	+

2.6.2 Overlap sendromlar

MDS'nin ayırıcı tanısında diğer önemli bir grup olan Miyelodisplastik sendrom/Miyeloproliferatif neoplazm (MDS/MPN) sendromlarıdır. Bu grupta displazi özelliklerinin yanısıra splenomegali, trombositoz veya lökositoz görülebilir. WHO 2022 yılında MDS/MPN için güncel bir sınıflandırma oluşturmuştur. Bu sınıflandırma; Kronik miyelomonositik lösemi 1 (CMML-1), Kronik miyelomonositik lösemi 2 (CMML-2), Juvenil miyelomonositik lösemi (JMML), MDS/MPN-Aksi belirtilmemiş (NOS) (Overlap sendrom), *SF3B1* mutasyonlu ve trombositozlu MDS/MPN, nötrofili ile giden MDS/MPN şeklindedir (29).

Kronik miyelomonositik lösemide monosit sayısının $\geq 0.5 \times 10^9/L$ olması gerekmektedir. Hastalarda lökositoz, splenomegali ve konstitüsyonel semptomlar hakimdir. Displazi bulguları MDS'ye göre daha sılıktır. Periferik kandaki veya kemik iliğindeki blast oranına göre alt tipler (CMML-1: PK: $< \%5$, Kİ: $< \%10$ / CMLL-2: PK: $\%5-19$, Kİ: $\%10-19$) belirlenir. Ayrıca kronik miyelomonositik lösemi; miyelodisplastik (MD-CMML) (White Blood Count (WBC): $< 13 \times 10^9/L$) ve miyeloproliferatif (MP-CMML) (WBC: $\geq 13 \times 10^9/L$) olarak ikiye ayrılmaktadır. MP-CMML sıklıkla RAS yolağındaki mutasyonlarla ilişkilidir ve kötü klinik gidişlidir.

Juvenil miyelomonositik lösemi genellikle bebeklik ve çocukluk dönemlerinde, organomegali ve lenfadenopatilerle karakterize nadir bir hastalıktır. Dikkat çeken özelliklerden bir tanesi de artmış hemoglobin F miktarıdır. JMML hastalarının yaklaşık $\%90$ 'ında *PTPN11*, *NRAS*, *KRAS*, *NF1* ve *CBL* genlerinden birinde moleküler değişiklik mevcuttur (35). Bazı hastalarda görülen mutasyonlar da germline olabilir. Bu durumlarda konjenital sendromlara (Noonan sendromu, Nörofibromatozis-1 gibi) sekonder olarak da JMML görülebilir. Tedavi seçeneği olarak allojenik kemik iliği nakli ilk sırada düşünülmelidir.

MDS/MPN-Aksi belirtilmemiş (NOS) grubunda displazi ve miyeloproliferatif özellikler biraradadır. *TET2*, *NRAS*, *RUNX1*, *CBL*, *SETBP1* ve *ASXL1* genlerinde mutasyon görülebilir.

SF3B1 mutasyonlu ve trombositozlu MDS/MPN' de trombosit sayısı $\geq 450 \times 10^9/L$ ve ring sideroblast oranı $\geq \%15$ olmalıdır. Bu grupta sıklıkla *SF3B1*, *JAK2*, *MPL* ve *CALR* mutasyonları görülür.

Nötrofili ile giden MDS/MPN' de WBC $> 13 \times 10^9/L$ ve nötrofil $\geq \%10$ 'dur. Ayrıca kemik iliği diğer antitelerden farklı olarak hiperselülerdir, blast oranı $\%20$ 'nin altındadır. Bu grup ICC 2022 sınıflamasında hala atipik Kronik Miyeloid Lösemi (aCML) olarak geçmektedir. *SETBP1* ve *ETNK1* mutasyonları sık olarak görülmektedir ve *BCR-ABL* negatiftir.

2.7 Prognoz

Miyelodisplastik sendromda klinik tablo oldukça değişkendir. Bu nedenle MDS hastalarında klinik gidişi belirlemek ve tedavi stratejilerini geliştirmek için risk sınıflandırması yapılması önerilir. Risk sınıflandırmasıyla hastaların prognozları hakkında bilgi edinilebilir ve tedavi seçimi riske göre belirlenebilir. Bu amaçla çeşitli prognostik skrlama sistemleri geliştirilmiştir.

2.7.1 Skrlama sistemleri

Skrlama sistemlerinde genellikle kullanılan parametreler sitopeni varlıęı, kemik ilięi blast yüzdesi ve sitogenetik bulgulardır. Hastalar kullanılan skrlama sistemine baęlı olarak hesaplanan puanlamalar sonucunda kabaca dūřuk, orta ve yūřsek risk řeklinde gruplara ayrılmaktadır. Dūřuk risk grubunda olan hastalarda semptomatik tedavi yeterli olurken, yūřsek risk veya kōtū prognoza sahip hastalarda agresif tedavi seęenekleri ve allojenik kemik ilięi transferi gündeme gelmektedir.

Çeřitli prognostik skrlama sistemleri mevcuttur. İlk olarak 1997 yılında Uluslararası Prognostik Skrlama Sistemi (IPSS) yayınlanmıřtır ve gūnūmūzde de sık kullanılan skrlama sistemidir. 2008 yılında ise WHO sınıflaması esas alınarak WPSS geliřtirilmiřtir fakat bu sistem gūnūmūzde sık olarak tercih edilmemektedir. IPSS 2012 yılında yeni belirteçlerin eklenmesiyle gūncellenmiřtir ve IPSS-R olarak kullanıma devam etmektedir.

MDS hastalarının yaklaşık yarısında sitogenetik anomali saptanmamaktadır ve hastalarda klinik heterojeniteyi açıklamak için sitogenetik çalışmalar yetersiz kalmaktadır (3). Ayrıca dūřuk risk hasta grubunda morbidite ve mortalite oranlarının yūřsek olduğu hastalar da mevcuttur. Bu nedenlerle mevcut skrlama sistemlerinden bağımsız ek prognostik belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Molekūler analizler sonucunda elde edilen verilerin bazı vakalarda saę kalıma etkisi gōsterilmiřtir (5,7,36). Son zamanlarda MDS hastalarında molekūler profillemeye ön plana çıkmaktadır ve molekūler analizlerin mevcut skrlama sistemlerine entegre edilmesiyle yeni prognostik sınıflama sistemleri oluřturulmaktadır (9–11). Kemik ilięi aspirasyon örneęinde saptanan somatik mutasyonlar; klinik fenotip (sitopeni derinlięi, blast oranı, saę kalım), prognoz ve terapotik cevap ile ilgili bilgi saęlamaktadır (8). Gūncel kılavuzlarda sitogenetik analize ek olarak mutlaka molekūler deęiřikliklerin deęerlendirilmesi önerilmektedir (4,12). 2022 yılında yayınlanan bir çalıřmada toplamda 3710 hasta ile yař, cinsiyet, sitogenetik özellikler, 31 genlik panel ve IPSS-R verilerinin entegrasyonu ile yeni bir prognostik sınıflama

(IPSS-M) geliştirilmiştir (11). Yeni geliştirilmiş bu skorlama sistemi, uluslararası kılavuzda moleküler parametrelerin ilk defa kullanıldığı skorlama sistemi olarak yerini almıştır (4).

Aşağıda kronolojik sırayla mevcut prognostik skorlama sistemleri hakkında detaylı bilgiler verilecektir.

2.7.1.1 IPSS

IPSS’de kullanılan temel parametreler; kemik iliği blast yüzdesi, sitopeni varlığı ve karyotip bulgularıdır. Yapılan skorlama sonrası hastalar; düşük (0), orta derece-1 (0.5-1.0), intermediate-2 (1.5-2.0) ve yüksek risk (≥ 2.5) olmak üzere dört gruba ayrılır. Risk kategorisi yükseldikçe tedavisiz sağ kalım azalır ve AML dönüşüm riski arttığı gösterilmiştir (37).

Sitopenileri tanımlamak için kullanılan kriterler şu şekildedir: Nötrofil $<1,800/\text{mcL}$, Platelet $<100,000/\text{mcL}$, Hb $<10 \text{ g/dL}$.

Karyotip bulguları ise kendi arasında üç ana gruba ayrılır:

- **İyi:** Normal karyotip, izole Y kaybı, izole del(5q), izole del(20q)
- **Kötü:** Kompleks karyotip (≥ 3 anomali), Kromozom 7 anomalileri
- **Orta:** Diğer anomaliler

Blast yüzdesinden bağımsız olarak karyotipte t(8;21), inv(16) ve t(15;17) varlığı AML tanısı koydurur.

IPSS aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

Tablo 5. IPSS

	SKOR DEĞERİ				
PROGNOSTİK ÖZELLİK	0	0.5	1.0	1.5	2.0
Kemik iliği blast yüzdesi	< 5	5-10	-	11-20	21-30
Karyotip	İyi	Orta	Kötü	-	-
Sitopeni	0/1	2/3	-	-	-

2.7.1.2 WPSS

Miyelodisplastik sendromlu hastaların WHO sınıflamasına bağlı kategorisi, IPSS’de belirtilen karyotip bulguları ve anemi derinliğinin biraraya gelmesi ile oluşturulan bir skorelama sistemidir (38). Skorelama sonucunda çok düşük, düşük, orta, yüksek ve çok yüksek risk olarak beş gruba ayrılır.

WHO sınıflaması 2008 yılındaki güncellemeye göre yapılmıştır: Tek dizide displazinin olduğu refrakter sitopeni (Refrakter anemi, Refrakter nötropeni, Refrakter trombositopeni) , Halka (ring) sideroblastlı refrakter anemi, MDS ile ilişkili izole 5q delesyonu, Çoklu dizide displazili refrakter sitopeni, Artmış blast sayılı refrakter anemi-I, Artmış blast sayılı refrakter anemi-II.

Anemi derinliği erkeklerde Hb <9 g/dL, kadınlarda <8 g/dL olarak değerlendirilmektedir.

WPSS yaygın klinik kullanıma girmemiştir.

2.7.1.3 IPSS-R

2012 yılında IPSS kriterlerinin yenilenmesiyle oluşturulmuş prognostik skorelama sistemidir. Temel parametreleri; Hb değeri, trombosit sayısı, mutlak nötrofil sayısı (ANC), blast yüzdesi ve sitogenetik bulgulardır. Skorelama sonrası hastalar çok düşük (≤ 1.5), düşük ($>1.5 - \leq 3.0$), orta ($> 3.0 - \leq 4.5$), yüksek ($> 4.5 - \leq 6.0$) ve çok yüksek (>6) risk grubu olarak sınıflandırılır (39).

Sitogenetik bulgular IPSS’den farklı olarak yeniden kategorileştirilmiştir:

- **Çok iyi:** Y kaybı, del(11q)
- **İyi:** Normal karyotip, del(5q), del(12p), del(20q)
- **Orta:** del(7q), +8, +19, i(17q)
- **Kötü:** -7, inv(3)/t(3q)/del(3q), kompleks karyotip (3 anomali)
- **Çok kötü:** Kompleks karyotip (> 3 anomali)

Blast yüzdesinden bağımsız olarak karyotipte t(8;21), inv(16) ve t(15;17) varlığı AML tanısı koydurur.

IPSS-R aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

Tablo 6. IPSS-R

	SKOR DEĞERİ						
PROGNOSTİK ÖZELLİK	0	0.5	1	1.5	2	3	4
Sitogenetik	Çok iyi	-	İyi	-	Orta	Kötü	Çok kötü
Kemik iliği blast yüzdesi	≤ 2	-	2-5	-	5-10	>10	-
Hemogloblin (g/dL)	≥ 10	-	8-10	< 8	-	-	-
Trombosit	≥ 100	50-100	< 50	-	-	-	-
ANC	≥ 0.8	< 0.8	-	-	-	-	-

IPSS-R risk grubu yükseldikçe tedavisiz sağ kalım oranları kısalmakta ve AML dönüşüm riski artmaktadır. IPPS-R için; yaşam boyu sağ kalım, progresyonsuz sağ kalım ve AML dönüşüm riski açısından prediktif değeri daha yüksek bulunmuştur (40).

Uluslararası Çalışma Grubu (IWG); MDS hastalarını daha kolay sınıflayabilmek adına IPSS-R risk skoruna göre düşük risk ($\leq 3,5$) ve yüksek risk ($> 3,5$) şeklinde gruplandırmıştır. Düşük risk grubundaki hastalarda takip ve semptomatik tedavi yeterli olurken; yüksek risk grubundaki hastalarda agresif tedaviler ve allojenik KIT (kemik iliği transplantasyonu) gereklidir. Düşük risk grubuna yönelik tedaviye cevap vermeyen orta risk grubu; yüksek risk tedavisi için değerlendirilebilir.

Düşük risk grubundaki hastalar arasında bile morbidite ve mortalitenin yüksek olduğu bilinmektedir (5,6). Bu hasta gruplarında kötü prognozu belirleyebilmek ve erken tedaviye ulaştırabilmek için ek prognostik belirteçlere ihtiyaç vardır. Yaş, hastanın performans durumu, ferritin, Laktat dehidrogenaz (LDH) ve beta-2 mikroglobulin yanında çeşitli moleküler parametreler için araştırmalar devam etmektedir. Yapılan bir çalışmada IPSS-R intermediate risk grubundaki hastalar retrospektif olarak incelenmiş ve LDH değeri ≥ 320 U/L olan hastaların daha kısa sağ kalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (41).

2.7.1.4 IPSS-M

Moleküler parametrelerin mevcut skorlama sistemlerine entegre edilmesiyle oluşturulan ve valide edilen yeni bir prognostik sınıflama “Molecular International Scoring System- IPSS-M” olarak en güncel MDS kılavuzunda yerini almıştır (11). Böylece ilk kez moleküler parametrelerle entegre bir prognostik skorlama sisteminin güncel kılavuzda kullanımı önerilmektedir.

IPSS-M geliştirilirken; modellemede 2956 hasta, validasyonda 754 hasta olmak üzere toplamda 3710 hastaya 152 geni içeren panel uygulanmıştır. Klinik gidiş 3 ana kriter (lösemisiz sağ kalım, lösemi dönüşüm riski ve genel sağ kalım) üzerinden değerlendirilmiştir. Klinik ve moleküler parametrelerin; lösemisiz sağ kalım, lösemi dönüşüm riski ve genel sağ kalım ile ilişkisi incelenmiştir. Sonuçta yaş, cinsiyet, sitogenetik bulgular, 31 geni içeren somatik mutasyonlar ve IPSS-R kriterleri kullanılarak her hastaya özgü bir risk skoru oluşturulmuştur. Oluşan risk skoruna göre hastalar 6 risk grubuna (çok düşük: ≤ -1.5 , düşük: $> -1.5-0.5$, orta-düşük: $>0.5-0$, orta-yüksek: $>0-0.5$, yüksek: $>0.5-1.5$ ve çok yüksek: >1.5) ayrılmaktadır. IPSS-M’nin klinik kullanımının kolaylaştırılması için çevrimiçi bir internet hesaplayıcısı oluşturulmuştur. (<https://mds-risk-model.com>) Bu sayfada hastaya ait hematolojik, sitogenetik ve moleküler veriler girildikten sonra, hastaya özgü IPSS-M risk skoru verilir. Verilen risk skoruna göre risk kategorisi hesaplanır ve lösemisiz sağ kalım, genel sağ kalım ve AML dönüşümü için zaman tahminleri oluşturulur.

IPSS-M’de kullanılan hematolojik parametreler; hemoglobin seviyesi, trombosit sayısı ve kemik iliği blast yüzdesidir. IPSS-R’dan farklı olarak nötrofil sayısı; IPSS-M modelinde bağımsız prognostik belirteç olarak bulunmadığı için çıkarılmıştır.

Sitogenetik bulgular için IPSS-R’da belirtilen sitogenetik kategoriler esas alınmıştır.

Yapılan çok değişkenli analizler ve istatistiksel çalışmalar sonucunda prognostik açıdan 31 genin anlamlı olduğu görülmüştür ve modelleme oluşturulurken bu genler kullanılmıştır. IPSS-M modelinde belirlenen genler; ana etkili genler (17 değişken, 16 gen) ve rezidüel genler (15 gen) olarak iki gruba ayrılmıştır. (Tablo 7’de genler listelenmiştir (42).) İstatistiksel veriler sonucunda bu modelde varyant allel frekansının prognostik olmadığı bulunmuştur. Bu nedenle yukarıda belirtilen genlerdeki mutasyonlar var/yok şeklinde modele dahil edilmiştir.

Tablo 7. IPSS-M modelindeki genler

Ana etkili genler (17 değişken, 16 gen)	Rezidüel genler (15 gen)
<i>TP53^{multi}</i>	<i>BCOR</i>
<i>MLL^{PTD}</i>	<i>BCORL1</i>
<i>FLT3</i>	<i>CEBPA</i>
<i>SF3B1^{5q*}</i>	<i>ETNK1</i>
<i>NPM1</i>	<i>GATA2</i>
<i>RUNX1</i>	<i>GNB1</i>
<i>NRAS</i>	<i>IDH1</i>
<i>ETV6</i>	<i>NF1</i>
<i>IDH2</i>	<i>PHF6</i>
<i>CBL</i>	<i>PPM1D</i>
<i>EZH2</i>	<i>PRPF8</i>
<i>U2AF1</i>	<i>PTPN11</i>
<i>SRSF2</i>	<i>SETBP1</i>
<i>DNMT3A</i>	<i>STAG2</i>
<i>ASXL1</i>	<i>WT1</i>
<i>KRAS</i>	
<i>SF3B1^{α**}</i>	

**SF3B1^{5q}*: *SF3B1* mutasyonu ile birlikte izole 5q delesyonu veya -7/del(7q) hariç ek bir kromozomal anomali

***SF3B1^α*: del(5q) veya *BCOR*, *BCORL1*, *RUNX1*, *NRAS*, *STAG2*, *SRSF2* komutasyonları olmadan *SF3B1* mutasyonu

IPSS-M çalışmasında *TP53^{multi}* (monoallelık *TP53* mutasyonları hariç), *FLT3* mutasyonları ve *MLL* (*KMT2A*) parsiyel tandem duplikasyonu (*MLL^{PTD}*) kötü klinik gidişle ilişkili en önemli prediktörler olarak bulunmuştur. MDS hastaları arasında yapılan bir çalışmada; monoallelık *TP53* taşıyıcılarında, wild-type *TP53*'e kıyasla klinik gidişatta ve tedaviye cevapta farklılık olmadığı gösterilmiştir (30). *MLL^{PTD}* miyeloid maligniteler için rutin olarak kullanılan panel testlerin içinde yer almaz. Fakat IPSS-M modelinde hastaların %2,5'unda tespit edilmiştir ve aşırı blast birikimi, yüksek AML dönüşüm riski ve kötü sağ kalımla ilişkili bulunmuştur. Tüm bu veriler ışığında doğru risk hesaplaması için mutlaka *TP53* allelik durumunun ve *MLL^{PTD}* varlığının belirlenmesi gerekmektedir.

IPSS-M'nin; günümüzde en sık kullanılan prognostik skorum sistemi olan IPSS-R'dan en önemli farklarından biri hem primer MDS hem de sekonder/tedavi ilişkili MDS'de

uygulanabilir olmasıdır. Ayrıca IPSS-R kıyasla tüm klinik gidiş parametrelerinde prognostik ayrımı iyileştirmiştir. IPSS-R ile karşılaştırıldığında hastaların %46'sı yeniden sınıflandırılmıştır. (%74'ü bir üst risk basamağına, %36'sı ise bir alt risk basamağına geçmiştir.) Modellemedeki hastalar içerisinde IPSS-R intermediate risk grubunda olan hastaların %21'i IPSS-M ile birlikte çok yüksek risk grubuna geçmiştir (11). Yeni prognostik skorlama sisteminde risk grubu değişen hastalarda doğal olarak prognoz tahmini ve tedavi yaklaşımı da değişecektir.

IPSS-M' de kullanılan prognostik değişkenler Tablo 8'de özet olarak gösterilmiştir.

Tablo 8. IPSS-M prognostik değişkenler

KATEGORİ	DEĞİŞKENLER
Klinik	Kemik iliği blast yüzdesi, Hemoglobın seviyesi, Trombosit sayısı
Sitogenetik	IPSS-R sitogenetik kategorisi (çok iyi, iyi, orta, kötü, çok kötü)
Ana etkili genler	<i>ASXL1, CBL, DNMT3A, ETV6, EZH2, FLT3, IDH2, KRAS, MLL^{PTD}, NPM1, NRAS, RUNX1, SF3B1^{5q}, SF3B1^a, SRSF2, TP53^{mutihit}, U2AF1</i>
Rezidüel genler	<i>BCOR, BCORL1, CEBPA, ETNK1, GATA2, GNB1, IDH1, NF1, PHF6, PPM1D, PRPF8, PTPN11, SETBP1, STAG2, WT1</i>

2.7.2 Ek belirteçler

Düşük risk hasta grubunda kötü prognozu belirlemek ve erken tedavi seçeneklerinden faydalanmak için ek prognostik belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır ve bununla ilgili çalışmalar günümüzde de devam etmektedir. Yaş, hastanın performans durumu, serum ferritin düzeyi, LDH ve beta-2 mikroglobulin başlıca kullanılan ek prognostik göstergelerdir. Bu parametreler genel sağ kalım ile ilişkili olup; AML dönüşüm riski için anlamlı değildir.

MD Anderson Cancer Center bu amaçla yola çıkarak prognostik model çalışması gerçekleştirmiştir. IPSS' göre düşük riskte 250 ve orta derece-1 riskte 606 hastanın klinik ve laboratuvar parametrelerini çeşitli istatistik analizler ile değerlendirerek "The Lower-Risk Prognostic Scoring System (LR-PSS)" adında bir prognostik model geliştirmiştir. Bu modele göre bağımsız prediktörler; ileri yaş (≥ 60), kötü sitogenetik, azalmış hemoglobın seviyesi (< 10 g/dL), azalmış trombosit sayısı ($< 200 \times 10^9/L$) ve artmış kemik iliği blast yüzdesidir ($\geq 4\%$) (6).

IPSS-R'da intermediate risk grubunu kendi içerisinde daha iyi değerlendirmek ve kötü prognoz gidişini daha kolay öngörebilmek adına belirli parametreler kullanılmaktadır. Bu ek

belirteçler; Li ve ark. tarafından yapılan derlemede özetlenmiştir. Bu derlemeye göre IPSS-R intermediate risk grubundaki hastalarda kötü prognoz göstergeleri şunlardır (18):

- İleri yaş (>60)
- Wild-type *SF3B1*
- ≥ 3 sürücü mutasyon
- *TP53* mutasyon yokluğu ve ≥ 5 karyotipik anomali
- Çoklu *TP53* mutasyonları
- Doğu Kooperatif Onkoloji Grubu (Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG) performans skoru ≥ 2
- Serum ferritin ≥ 520 ng/ml

Literatür verileri ışığında *TP53* mutasyonu ve heterozigosite kaybının, tedavi ilişkili MDS'nin, grade 2-3 kemik iliği fibrozisinin ve *EZH2*, *RUNX1*, *NRAS*, *ASXL1*, *DNMT3A*, *IDH2*, *SRSF2*, *FLT3*, *EZH2*, *ETV6*, *BCOR* gen mutasyonlarının kötü prognozla; *SF3B1* mutasyonunun da iyi prognozla ilişkili olduğu söylenebilir (3,43). Yukarıda tarif edilen prognostik puanlama sistemlerinde yer alan değişkenler dışında birçok faktörün hastalık prognozu üzerinde etkili olabileceği düşünülmektedir.

2.8 Tedavi yaklaşımları

Miyelodisplastik sendromun tedavisi risk grubuna göre yapılmaktadır. Tedavi yaklaşımları; destek tedavisi, düşük ve yüksek yoğunluklu tedavi başlıkları altında incelenebilir. Amaç semptomları kontrol altında tutmak ve yaşam kalitesini arttırmaktır. Düşük risk grubundaki hastalarda daha çok destek tedavileri ön plandayken, yüksek risk grubunda daha agresif tedaviler tercih edilir. MDS'de tek küratif tedavi seçeneği allojenik kemik iliği naklidir (AKİT). Fakat MDS'nin ileri yaş hastalığı olmasından kaynaklı eşlik eden komorbiditeler nedeni ile AKİT uygulanamadığı zamanlar da bulunmaktadır.

Güncel kılavuzlar ışığında MDS'deki tedavi yaklaşımları aşağıda özetlenerek anlatılmıştır (4,12).

2.8.1 Düşük riskli MDS

Düşük riskli MDS’de amaç sitopenilerin düzeltilmesi ve sitopeni ilişkili komplikasyonların ortadan kaldırılmasıdır. IPSS-R’da düşük risk grubundaki hastalar tedaviye cevapsız olabilir. Bu durumda hastalarda yüksek risk tedavisine geçilmesi gerekmektedir.

2.8.1.1 Anemi tedavisi

Eritrosit transfüzyonları aneminin tek etkili tedavisidir. Bu grupta eritrosit stimüle eden ajanlar (ESAs) dışında çok az ilaç onay almıştır. Kronik eritrosit transfüzyonlarına bağlı olarak aşırı demir birikimi en önemli komplikasyondur. Biriken demir çeşitli organlara birikerek zarar vermektedir ve aşırı demirin ortamdaki uzaklaştırılması için şelasyon tedavileri uygulanmalıdır.

Anemi tedavisi birinci basamak ve ikinci basamak tedaviler olarak ikiye ayrılır. Her iki tedavi grubunda da izole 5q delesyonu varlığı veya yokluğu yaklaşımı değiştirir.

Birinci basamak tedavide 5q delesyonu olmayan hastalarda ilk seçenek ESA’lardır. Rekombinant erritpoetin alfa veya darbopoetin kullanılır. Yanıt tedavi sonrası 8-12 hafta içerisinde ortaya çıkar. Endojen eritropoetin seviyeleri <500 U/L olduğunda tedaviye yanıtın daha iyi olduğu gösterilmiştir (44). 5q delesyon varlığında; ESA’ya cevap oranının daha düşük ve yanıt süresinin kısa olduğu görülmüştür (45). Bu grup transfüzyon bağımlı anemi hastalarında ilk tercih edilecek ajan lenalidomiddir. Düşük riskli 5q delesyonuna sahip MDS hastalarının yaklaşık %20’sinde *TP53* mutasyonu görülmektedir. *TP53* mutasyonun eşlik ettiği bu grup hastalarda lenalidomid tedavisine direnç ve AML progresyon riskinde artış görülür. Lenalidomid tedavisinin ilk haftasında çoğu hastada en sık yan etki olarak grade3-4 nötropeni veya trombositopeni görülür. Bu durumda ilacının dozunun azaltılması veya granülosit stimule edici faktör (G-CSF) eklenmesi önerilir (12).

İkinci basamak tedavide 5q delesyonu olmayan, ESA yanıtı olmayan hastalarda lenalidomid, hipometile edici ajanlar (HMA) veya anti-timosit globülin (ATG) seçenekleri düşünülebilir. Eğer 5q delesyonlu olgularda lenalidomide direnç söz konusu ise yüksek risk MDS gibi tedavi edilmeli ve gerekirse allojenik kemik iliği nakli yapılmalıdır (12).

Luspatercept; geç evre eritropoezi arttırarak eritoid maturasyonunu ve Hb seviyelerini yükselten bir ajandır. Luspatercept ile ilişkili yapılan uluslararası çok merkezli, çift-kör, plasebo kontrollü randomize çalışmada (MEDALIST) IPSS-R’ göre çok düşük, düşük ve orta risk grubuna sahip 229 ring sideroblastlı MDS hastasında luspatercept ve plasebo etkinliği karşılaştırılmıştır. Transfüzyon bağımlılığı ve hematolojik iyileşme açısından luspatercept alan hastalarda oran daha yüksek bulunmuştur (46). Eritropoezi uyarıcı ilaçlarda başarısız olan ve 8

haftadan uzun süre boyunca >2 transfüzyon desteği olan çok düşük-düşük-orta risk MDS-RS hastalarında luspatercept kullanımına “Food and Drug Administration (FDA)” 2020 yılında onay vermiştir. Güncel kılavuzlarda da MDS-RS alt tipinde *SF3B1* mutasyon taşıyıcılarında kullanımı önerilir.

2.8.1.2 Nötropeni ve trombositopeni tedavisi

Nötrofil sayısının <1,800/mcL olması durumu nötropeni olarak tanımlanır. MDS hastalarında diğer sitopenilere kıyasla daha nadir görülür. Nötropeniye bağlı ciddi enfeksiyon varlığında G-CSF kullanımı önerilir. Nötropeni vakalarında profilaksi olarak antibiyotik ve G-CSF kullanımı ise önerilmez.

Semptomatik trombositopeni varlığında yüksek doz androjen kullanımı trombositopeniyi geçici olarak düzeltebilir. Ağır trombositopeni varlığında trombopoetin reseptör agonistlerinin (TRA) (romiplastim, eltrombopag) kullanımının ciddi kanamaları ve trombosit transfüzyon ihtiyacını azalttığı gösterilmiştir. Fakat hastaların %15’inde kemik iliği blast yüzdesini geçici olarak arttırdığı tespit edilmiştir (47). Bu nedenle kemik iliği blast yüzdesi %5’in altında olan hastalarda sınırlı kullanımı önerilmektedir. Trombopoetin reseptör agonistlerinin kullanımında yüksek riskli MDS hastalarında tedaviye yanıt oranının daha düşük olduğu; fakat düşük riskli grupta tedaviyi yanıt oranını azaltmadığı görülmüştür ve bu nedenle düşük riskli grupta kullanılması önerilir (21).

Sitopenilerin tedavisinde immunsupresiflerin yani ATG ve/veya siklosporin birlikte kullanımının eritroid ve trombosit cevabını arttırdığı gösterilmiştir. Bu nedenle bu grupta henüz onay almasa da sınırlı kullanımı mevcuttur. Yapılan bir çalışmada MDS hastalarında immunsupresif tedaviye daha iyi yanıt verebilecek hasta grubunun özellikleri şu şekilde tanımlanmıştır: tek seride displazi, ring sideroblast alt tipinin olmaması, hipoplastik/hiposelüler kemik iliği, HLA-DR15 pozitifliği, <60 yaş, kadın cinsiyet, trizomi 8 varlığı, transfüzyon ihtiyacının kısa süreli olması (48).

2.8.2 Yüksek riskli MDS

Yüksek riskli MDS hasta grubunda en büyük problem AML dönüşüm riskidir. Ayrıca bu risk grubunda daha kısa sağ kalım öngörülmektedir. Bu nedenlerle tedavide daha agresif tedaviler tercih edilir. Allojenik kemik iliği nakli, hipometile edici ajanlar, bazı kemoterapi ajanları (yoğun antrasiklin ve siterabin kombinasyonları) seçenekler arasındadır. Ayrıca moleküler tabanlı hedefli tedaviler ile ilgili çalışmalar yüksek risk MDS tedavisinde umut

vadetmektedir. Moleküler analizlerin gelişmesiyle spesifik mutasyona özgü geliştirilen ajanların kullanımına ilişkin çalışmalar günümüzde oldukça hız kazanmıştır. Yukarıda bahsedilen tedavi seçeneklerinden kısaca alt başlıklarda bahsedilecektir.

2.8.2.1 Hipometile edici ajanlar (HMA)

Yüksek riskli MDS'de çoğunlukla ilk basamak tedavisinde hipometile edici ajanlar kullanılır. Bu grup ilaçlara azasitidin ve desitabin örnek verilebilir. Özellikle azasitidin kullanımı tercih edilir. Hemen allojenik kemik iliği nakli olamayan, majör komorbiditesi olmayan yüksek risk MDS hastalarında kullanımı önerilir. AKİT öncesi kemik iliği blast oranını azaltmak için de kullanılabilir (12).

2.8.2.2 AML benzeri kemoterapi

Yüksek risk MDS'de sınırlı endikasyonu vardır. Hasta eğer 70 yaşın altında ve kötü sitogenetik bulguları yoksa kullanımı uygundur. Blast oranı $\geq$ %10 olan grupta allojenik kemik iliği naklinden önce uygulanarak köprü tedavisi görevini görür. Sitarabin ve idarubisin kombinasyonu önerilir (12).

2.8.2.3 Allojenik kemik iliği nakli

Allojenik kemik iliği nakli yüksek risk MDS hastalarında tek küratif tedavi seçeneğidir. 70 yaşın altındaki her yüksek risk MDS hastası mutlaka AKİT için değerlendirilmelidir ve majör komorbiditesi yoksa AKİT yapılmalıdır.

Yüksek riskli MDS hastalarında tedavisiz beklenen sağ kalım bir yılın altındadır. Genç, fit, Kİ blast oranı $<$ %10 ve uygun donörü mevcutsa vakit kaybetmeden tek küratif tedavi seçeneği olan allojenik kemik iliği nakli uygulanmalıdır. Eğer Kİ blast yüzdesi $>$ %10 ise sitoredüktif tedavilerle blast oranı düşürüldükten sonra AKİT yapılmalıdır (12).

AKİT sadece yüksek riskli MDS grubunda değil, bazı özelliklere sahip sitopenili ve kötü karyotip bulguları olan IPSS orta-1 risk grubunda da uygulanabilir. Bu özellikler; ilk basamak tedavilere cevapsız, derin trombositopeni, eritrosit süspansiyon transfüzyon bağımlılığı, yaşamı tehdit eden enfeksiyon varlığı, ileri derece kemik iliği fibrozisi, kötü prognoz ile ilişkilendirilmiş somatik mutasyon varlığı ve sekonder/t-MDS'dir (49). Buna benzer kötü

prognoz özelliği gösteren hastalarda vakit kaybetmemek için AKİT ilk seçenek olarak düşünülmelidir.

2.8.3 Yeni tedaviler

MDS hastalığının ileri yaşta daha sık görülmesine bağlı; eşlik eden komorbiditeler veya tedavi komplikasyonlar açısından tek küratif tedavi seçeneği olan allojenik kemik iliği nakli çoğu hastada uygun seçenek değildir. Yine aynı sebeplerden dolayı yoğun kemoterapiler de hastalarda uygulanamayabilir. Hipometile edici ajanlara karşı da MDS hücre klonuna özgü intrinsik faktörler ve immün mikroçevreden dolayı direnç gelişebilir. Bu durumda yeni tedavi arayışları gündeme gelmektedir. Özellikle moleküler teknolojilerin gelişmesi ile kişiselleştirilmiş tedavi için çok önemli bir alan yaratılmıştır. MDS patogenezinin temel mekanizması olan epigenetik disregülasyonla ilişkili genlerdeki tekrarlayan genetik değişiklikler yeni tedavi yaklaşımlarına moleküler hedef oluşturmaktadır. Aşağıda MDS standart MDS tedavisine alternatif oluşturabilecek yeni hedeflenmiş tedaviler detaylıca anlatılmıştır ve tabloda kısaca özetlenmiştir.

Tablo 9. MDS’de yeni tedaviler

İlaç adı	Etki mekanizması	Hedef hasta popülasyonu	Gen ilişkisi
Luspatercept Sotatercept	SMAD2-SMAD3 sinyal inhibitörü	Düşük risk MDS-RS	<i>SF3B1</i> mutasyon varlığında etkili
İvosidenib Olutasidenib	IDH1 inhibitörü	Yüksek risk MDS, AML	<i>IDH1</i> mutasyon varlığında etkili
Enasidenib	IDH2 inhibitörü	Yüksek risk MDS, AML	<i>IDH2</i> mutasyon varlığında etkili
Venetoklaks	BCL-2 inhibitörü	Yüksek risk MDS	<i>TP53</i> mutant MDS’de daha iyi yanıt
İmetelstat	Telomeraz inhibisyonu	Düşük risk MDS-ESA yanıtsız anemi	<i>SF3B1</i> mutant allel VAF’ta azalma
H3B-8800	SF3b modülatörü	MDS	Splicezom mutasyonlarında etkili
APR-246 (Eprenetapopt)	Mutant p53 reaktivatörü - TP53 modülatörü	Yüksek risk MDS	<i>TP53</i> mutasyon varlığında etkili
Roxadustat	HIF-PH inhibitörü	Düşük risk MDS-anemi	-
Emavusertib (CA-4948)	IRAK4 inhibitörü	Yüksek risk MDS, AML	<i>U2AF1</i> , <i>SF3B1</i> ve <i>FLT3</i> mutasyon varlığında etkili
Magrolimab	Anti-CD47 antikoru	Yüksek risk MDS	<i>TP53</i> mutant MDS’de daha iyi yanıt
Evorpacept	SIRP-a füzyon proteini CD47 blokajı	Yüksek risk MDS	-
Sabatolimab	TIM-3 antikoru	Yüksek risk MDS	<i>TP53</i> mutant MDS’de daha iyi yanıt
Canakinumab	IL-1 β antikoru	Düşük risk MDS	-

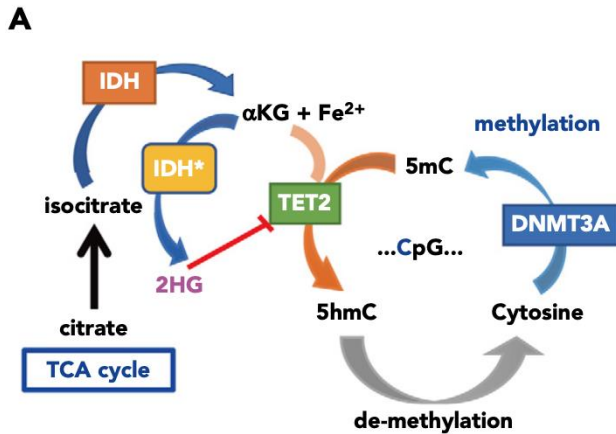
2.8.3.1 Luspatercept, Sotatercept

MDS hastalarında TGF-beta, SMAD2-SMAD3 yolağı aşırı aktiftir ve aneminin gelişiminde katkısı vardır. Preklinik MDS modellerinde bu yolağın inhibisyonunun hematopoezi ve eritroid maturasyonunu iyileştirdiği gösterilmiştir. Her iki ajanda TGF-beta yolağında etkilidir (21). Yapılan faz 3 çalışmasında (MEDALIST) luspatercept plaseboya göre; ring sideroblastlı veya *SF3B1* mutasyonlu MDS'de transfüzyon bağımsızlığını sağladığı ve hematolojik iyileşme sağladığı gösterilmiştir (46).

Luspatercept; eritropoezi uyarıcı ilaçlarda başarısız olan ve 8 haftadan uzun süre boyunca >2 transfüzyon desteği olan çok düşük-düşük-orta risk RS MDS hastalarında FDA tarafından onay almıştır. Hedefli tedaviler arasında ilk ve tek onay alan ilaçtır.

2.8.3.2 IDH1-2 inhibitörleri

IDH1 ve IDH2 inhibitörleri; AML tedavisinde devrim niteliğinde etkinlik göstermiş ve FDA tarafından onaylanmıştır. Fakat MDS'de *IDH1-2*'nin mutasyon sıklığı %10 civarındadır ve AML'ye göre daha nadir görülür (50). Mutasyonlar sonucunda epigenetik değişikliğe neden olan 2-hidroksiglutarat (c) onkometaboliti ortaya çıkar ve patogenezi başlatan olay olarak düşünülür. 2-HG'nin anormal intraselüler birikimi; dioksigenaz inhibisyonuna neden olur ve epigenetik disregülasyon ortaya çıkar. İnhibe edilen enzimler arasında *TET2*'nin kodladığı enzim (5-metilsitozin hidroksilaz) de vardır. Tüm bunların sonucunda hematopoetik hücre diferansiasyonunda hatalar meydana gelir ve bu süreçler Şekil 2'de özetlenmiştir (51).



Şekil 2. Mutant IDH proteinleri fonksiyonel mekanizması

IDH-1 inhibitörü ivosidenib ve IDH-2 inhibitörü enasidenib ile yapılan klinik çalışmalarda; bu ajanların *IDH1-2* mutant MDS hastalarında da etkinliği gösterilmiştir. Bu yeni keşfedilen moleküler ajanların 2-HG birikimini azaltarak etkinlik gösterdiği düşünülmektedir. Ivosidenibin tek başına etkinliği yeterli iken, enasidemibin azasitidin ile kombinasyonunda tedaviye daha iyi yanıtın ortaya çıktığı belirtilmiştir. Olutasidenib ise AML tedavisinde yeni onay alan IDH-1 inhibitörüdür ve MDS ile ilgili çalışmalar devam etmektedir (19).

Ciddi nötropeni (ANC < 0.8 × 10⁹/L) olan MDS hastalarında *IDH1-2* mutasyonu mutasyonunu %10-15 sıklığında bulunduğu tespit edilmiştir. Bu durum nötropenili hasta grubunda hedefli tedavi yaklaşımını akla getirmiştir ve yapılan bir çalışmada *IDH1* mutasyonlu düşük riskte 2 MDS hastasının ivosidenib tedavisiyle nötropeni açısından komplet cevap alındığı gösterilmiştir (22,52).

2.8.3.3 BCL2 inhibitörü (Venetoklaks)

Yüksek riskli veya yüksek blast oranına sahip MDS hastalarındaki kanser hücrelerinin “B-cell lymphoma-2” (BCL-2) proteinlerinden yararlanarak apoptoza direnç kazandığı düşünülmektedir. AML tedavisinde onay alan venetoklaks (anti-apoptotik BCL-2 protein inhibitörü) isimli ajanın hipometile edici ajanlarla kombinasyon olacak şekilde MDS tedavisinde etkinliği gösterilmiştir. Özellikle allojenik kemik iliği nakli öncesi blast yüzdesini hızlı azaltma açısından kullanımı tercih edilebilir. Bu kombinasyon tedavisinin gelecekte yüksek risk MDS hastalarında standart tedavi olabileceği beklenmektedir (53). Ayrıca *TP53* mutant MDS hastalarının bu kombinasyon tedavisine daha yüksek yanıt verdiği söylenmektedir (19).

2.8.3.4 İmetelstat (Telomeraz inhibisyonu)

MDS hastalarında kısa telomer ve yüksek telomeraz aktivitesinin kısa sağ kalım ilişkili olduğu gösterilmiştir (54). Kısa telomer uzunluğuna sahip hiper telomeraz aktivitesi bulunan hücrelerde telomeraz inhibitörü kullanımında normal hematopoezin sürdürülmesini sağlanabilir. İmetelstat ilk kompetitif telomeraz inhibisyonudur. Yapılan birçok klinik çalışmada; ESA'lara yanıtız veya dirençli MDS hastalarında eritroid hematolojik iyileşme ve tranfüzyon bağımsızlığını sağladığı gösterilmiştir (55,56). Bu çalışmalardan faz 2 aşamasında olan çalışmada hastaların %65'inde eritroid hematolojik iyileşmenin yanı sıra; kemik iliği cevabı, sitogenetik cevap, *SF3B1* mutasyonu varyant allel frekansında düşüş ve ring sideroblast kaybı da imetelstat tedavisiyle birlikte görülmüştür (56). Ayrıca imetelstat tedavisinin yakın zamanda

düşük risk MDS hastalarında görülen ESA yanıtı anemilerde onay alacağı beklenmektedir(22).

2.8.3.5 Uçbirleştirme (Splicing) modülatörleri

MDS hastalarında en sık görülen mutasyonlar uçbirleştirme (spliceozom) kompleks genlerindedir (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2*). Bu genlerdeki mutasyonlar sonunda alternatif uçbirleştirme (splicing) bozularak miyeloid progenitör hücrelerin proliferasyonu ve diferansiasyonunu sağlayan proteinlerin regülasyonunu etkiler (57). H3B-8800; selektif ve oral kullanılan SF3b modülatörüdür. Ksenograft modellerinde yapılan çalışmalarda öncelikle uçbirleştirme (spliceozom) mutasyonlu hematolojik tümörlerde apoptozu indüklediği gösterilmiştir (58). MDS ve diğer miyeloid malignitelerde faz 1 çalışmaları (NCT02841540) devam etmektedir. Bu çalışmalarda H3B-8800 için bildirilen yan etkiler gastrointestinal sistem semptomları ve uzun QT aralığıdır (21).

2.8.3.6 TP53 modülatörü (APR-246) (Eprenetapopt)

TP53 mutasyon varlığı; MDS’de AML progresyonun yüksek olması ve kemoteröpatik ajanlara dirençli olması nedeniyle kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. İzole 5q delesyonuna eşlik eden *TP53* mutasyonu varlığında lenalidomide direnç görülür ve bu aşamada bir sonraki tedavi seçeneklerine geçilmesi gerekir. Mutant *TP53*’ün etkinliğini önleyebilmek aslında MDS hastalığının kötü gidişatını engelleyebilmek açısından çok önemli bir basamaktır.

Günümüzde teknolojilerin gelişmesiyle oluşturulan *TP53* modülatörü APR-246 (Eprenetapopt); intravenöz kullanılan moleküler bir ajandır. Düşük doz APR-246 tek veya azasitidin ile kullanımının *TP53* mutant MDS ve AML hücre serilerinde p53’ü aktive ettiği ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (59). APR-246 ile ilgili klinik çalışmalar yüksek risk MDS hastalarında devam etmektedir.

2.8.3.7 Roxadustat

Roxadustat; Hipoksi ile İndüklenen Faktör (HIF) yolağı üzerinden etki göstermektedir. Amerika Birleşik Devletleri’nde kronik böbrek hastalığına bağlı anemi tedavisinde kullanım onayı almıştır. HIF-prolil hidroksilaz inhibitörü olarak görev yapar ve HIF-alfa’yı arttırarak eritropoetin üretimini ve demir mobilizasyonunu arttırır. ESA’lara göre avantajı oral kullanımıdır (21). Düşük risk MDS’de anemi tedavisi için faz 3 klinik çalışma mevcuttur. Bu

çalışmanın sonuçlarına göre roxadustatin; transfüzyon ihtiyacını azaltarak transfüzyon bağımsızlığını sağladığı gösterilmiştir (60).

2.8.3.8 IRAK4 inhibitörü (Emavusertib) (CA-4948)

“Interleukin-1 receptor-associated kinase 4”; özellikle *U2AF1* ve *SF3B1* mutasyonu olan MDS/AML hücrelerinde alternatif uçbirleştirmeye (splice) uğrar ve uzun izoformu (IRAK4-L) oluşur. Oluşan bu form; NF-KB sinyal yolağı üzerinden lökomogenezi indükler (21). Uçbirleştirme (spliceozom) ve *FLT3* mutasyonu varlığında IRAK4’ün anormal onkogenik formu upregüle olur.

Emavusertib; IRAK4 inhibisyonu yapan küçük bir moleküler ajandır. Yüksek risk MDS ve AML vakalarında faz 1 çalışması gerçekleştirilmektedir. Bu çalışmanın ilk sonuçlarına göre emavusertibin kemik iliği blast oranını %89 azalttığı görülmüştür (61). Ayrıca bu ilacın yüksek risk MDS ve AML grubunda azasitidin veya venetoklaks ile birlikte veya tek başına etkinliğinin araştırıldığı çalışmalar (NCT04278768) devam etmektedir (18).

2.8.3.9 Magrolimab (anti-CD47)

Yüksek risk MDS tedavisinde antikor tabanlı immün terapide hedeflenen yeni moleküller; CD47, TIM-3 ve CD70’tir. CD47; çeşitli hücre yüzeylerinden eksprese olur ve makrofaj yüzeyindeki sinyal regülatör protein-alfaya bağlanarak fagositozun inhibisyonuna neden olur. CD47’nin miyeloid malignitelerde ekspresyon seviyeleri yüksek bulunmuştur. Lösemik hücrelerde CD47’nin upregulasyonu; miyeloid malignitelerde kötü prognozlu ilişkili bulunmuştur. MDS hastalarında özellikle yüksek riskli grupta AML dönüşüm riskini gösteren biomarker olarak düşünülebilir. CD47 blokajı yapan monoklonal antikorların; tümör hücrelerinin fagositozunu indüklediği gösterilmiştir (19).

anti-CD47 antikoru olan magrolimab ile birlikte azasitidin kombinasyonunun tedaviye daha iyi yanıt verdiği klinik çalışmalar mevcuttur. Tedavi yanıtlarına bakıldığında en yüksek yanıtın *TP53* mutant hastalarda olduğu görülmüştür (57).

Evorpacept; SIRP-a füzyon proteinidir ve CD47’yi yüksek afiniteyle bloklar. Magrolimab da olduğu gibi evorpaceptin de azasitidin ile veya venetoklaks ile kombinasyonunun yeni tanı AML tedavisinde faz 1 çalışmaları yapılmaktadır (19).

2.8.3.10 Sabatolimab (anti-TIM3)

TIM-3; “T-cell immunoglobulin and murine domain 3” olarak adlandırılan bir hücre yüzeyi proteindir. MDS ve AML hastalarında aşırı eksprese olmaktadır ve lösemik dönüşüme katkısının olduğu şeklinde yorumlanmaktadır. Sabatolimab, TIM-3’ü hedefleyen yeni bir immünoterapi ajandır. Bağışıklık sistemini yeniden aktive ederek ve potansiyel olarak lösemik kök hücrelerin ve blastların öldürülmesini sağlar. Yüksek risk MDS’de hipometile edici ajanlarla kombinasyonun etkili olduğunu gösteren klinik çalışmalar mevcuttur. Ayrıca *TP53* mutant yüksek risk MDS’de cevap oranlarının yüksek olduğu bildirilmiştir (21).

2.8.3.11 Canakinumab

Anormal inflamasyon yolak aktivasyonu MDS patofizyolojisinde önemli bir olaydır. IL-1yolak sinyali ile proinflamatuvar kemik iliği mikroçevresi ve lösemik blastların proliferasyonu gerçekleşir. Bu yolağı hedefleyen Canakinumab; İnterlökin-1 β (IL-1 β) monoklonal antikorudur. Düşük risk MDS tedavisinde tek başına ve ESA veya sabatolimab ile kombinasyonunu içeren klinik çalışmalar devam etmektedir (21).

2.9 Genetik inceleme

Miyeloid maligniteler için genomik profillemenin önemi gün geçtikçe daha çok ortaya çıkmıştır ve genetik inceleme yapılması kaçınılmaz noktaya gelmiştir. Gerek hastalık tanısında veya ayırıcı tanı sırasında, gerek morfolojik alt tip belirlenmesinde genetik parametreler kullanılmaktadır. Ayrıca hastaya yönelik klinik gidişi ön görebilmek, prognozu tahmin ederek tedavi algoritmasını şekillendirmek ve kişiselleştirilmiş tedavi için seçenekleri belirlemek amaçlı genetik testler günümüzde oldukça kritik bir role sahiptir.

Miyelodisplastik sendrom için de genetik incelemeler tanı ve tedavi sırasında olmazsa olmaz basamaklardan biri haline gelmiştir. MDS tanı kriterleri içerisinde, MDS’ye özgü oluşturulan prognostik skorlama sistemlerinde ve tedaviye yanıtı değerlendirmede; başta kromozomal analizler (sitogenetik ve FISH) rol oynamaktadır. Günümüzde yeni nesil dizileme teknolojilerinin gelişmesi ve kullanımının yaygınlaşmasıyla moleküler analizler; MDS algoritmasında yeni yerini almıştır. MDS’de kullanılan ve kılavuzlar tarafından önerilen genetik testler alt başlık olarak tek tek değerlendirilmiştir.

2.9.1 Sitogenetik

Güncel kılavuzlar MDS şüphesi varlığında yapılan kemik iliği aspirasyon biyopsisinden morfolojik değerlendirmeye birlikte mutlaka standart karyotipleme önermektedir (4,12). Standart bir karyotip analizinde; sayısal ve yapısal kromozomal anomaliler (delesyon, translokasyon gibi) değerlendirilir. Karyotip analizinde en düşük değerlendirilebilecek rezolüsyon 5-10 Mb büyüklüğündeki değişikliklerdir. Daha küçük değişikliklerin tespiti için farklı genetik testlere ihtiyaç duyulmaktadır. Standart bir karyotip analizinde en az 20 adet metafaz plağının değerlendirilmesi gerekmektedir. Eğer bu durum mümkün değilse NCCN MDS kılavuzu; kromozomal mikroarray analizini veya MDS için oluşturulmuş FISH panellerinin yapılmasını önermektedir (4). “European Society for Medical Oncology” (ESMO, Avrupa Tıbbi Onkoloji Derneği) MDS kılavuzunda ise; metafaz sayısının yetersiz olmasına ek olarak, incelenen 20-25 metafaz plağı sonucunda karyotip normal olarak değerlendirildiğinde de sonraki basamak olarak FISH analizine geçilmesini belirtmektedir (12).

2.9.2 FISH

FISH analizi konvansiyonel sitogenetik analizin yetersiz kaldığı durumlarda kullanılan bir yöntemdir. Metafaz incelemesi yapılabildiği gibi, karyotip incelemesinden farklı olarak interfaz hücreleri de analiz edilebilir. Karyotip analizinden bir diğer farkı ve avantajı da daha küçük boyutta olabilen kromozomal yapısal anomalileri saptayabilmesidir. Çünkü FISH’in saptayabileceği en küçük değişiklik 100-200 kb’dır. FISH analizinde spesifik hedef bölgelere özgü tasarlanan probler kullanıldığı için; sadece belirli kromozomal anomalileri tespit edebilmesi dezavantaj olarak değerlendirilebilir.

2.9.3 Kromozomal Mikroarray Analizi (KMA)

Kromozomal mikroarray analizi; karyotip ve FISH testlerinden daha küçük boyuttaki (20 kb) kromozomal anomalilerin ve kopya sayısı değişikliklerinin genom boyunca tespitinde kullanılan bir yöntemdir. Dengeli kromozomal anomalileri (translokasyonlar) gösterememesi önemli bir dezavantajdır. Ayrıca Tek Nükleotit Polimorfizm (SNP) tabanlı array analizi; heterozigosite kaybının gösterilmesinde değerli bir tanı testidir.

2.9.4 Moleküler

Moleküler analizler bakıldığında oldukça geniş kapsamlı testlerdir. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) yöntemlerinin geliştirilmesiyle çok çeşitli yöntemler mevcuttur. Real-time analiz (kantitatif PCR-qPCR), dijital PCR (dPCR), sanger dizileme ve hedeflenmiş gen panelleri) sıklıkla tercih edilen ilk basamak testlerdir. Genomdaki bütün kodlayan bölgeleri dizileyen yöntem olan “Tüm Ekzom Dizileme (WES)” ve bütün genomik bölgeleri okuyabilen “Tüm Genom Dizileme (WGS)” hedeflenmiş gen panellerine kıyasla oldukça pahalıdır ve analizi daha karmaşık ve zordur. Miyeloid neoplazmlarda rutin pratik kullanımda henüz bu iki testin yeri yoktur. WGS; WES’ten farklı olarak kopya sayısı değişikliklerini ve kromozomal yeniden düzenlemeleri tespit edebilmektedir. Bu nedenle konvensiyonel sitogenetik yöntemlerin başarısız olduğu durumlarda WGS’nin yakın gelecekte klinik kullanıma girebileceği düşünülmektedir. İleri fonksiyonel araştırmalar için “Tüm Transkriptom Dizileme (WTS) ve RNA dizileme (RNA-seq) teknolojileri kullanılmaya başlamıştır.

Miyelodisplastik sendromda moleküler testler; germline yatkınlığı tespit etmekte, tedavi hedefinde, yeni geliştirilen prognostik skorlama sistemi olan IPSS-M’i kullanarak hasta risk profilini oluşturmada, spesifik alt tipleri belirlemede ve minimal rezidüel hastalık tespitinde kullanılmaktadır (62).

MDS’de moleküler analizler için çoğunlukla önerilen yöntem hedeflenmiş gen panelleridir. WES’e göre maliyeti daha ucuzdur ve hastalığa özgü genetik değişikliği saptama hassasiyeti daha yüksektir. Fakat bu panellerin “*FLT3* internal tandem duplikasyonu (ITD)” ve *MLL* parsiyel tandem duplikasyon (PTD) varlığını kapsayıp kapsamadığına dikkat edilmelidir (62).

Uluslararası kılavuzlar somatik mutasyon tespiti için periferik kan veya kemik iliği örneğinden MDS ilişkili genleri kapsayan panellerin kullanımını rutin olarak önermektedir. Ayrıca Kalıtsal Hematolojik Malignite Yatkınlıkları’nın tespiti için de ek moleküler ve genetik testlerin yapılması gerekliliğini belirtmektedir (4,12). Somatik mutasyonların tespiti; morfolojik olarak tanı konamamış hastalarda klonal hematopoez varlığını göstermektedir ve böylece sitopenin benign nedenlerinden uzaklaşmış olunur (4).

2.10 Genetik bulguların rolü

2.10.1 Sitogenetik bulgular

Kazanılmış klonal kromozomal anomali tespiti; MDS tanısında ve prognosik sınıflamasında çok önemli yer tutmaktadır. Klonal kromozomal anomali varlığından bahsedebilmek için o anomalinin en az 2 veya daha fazla metafaz plağında görülmesi gereklidir (4). MDS hastalarının yaklaşık %50-60'ında kromozomal anomaliler bulunmaktadır ve anöplidler (en sık 5q delesyonu, trizomi 8, monozomi 7 veya 7q delesyonu) translokasyonlara oranla daha sık görülmektedir (63). Normal karyotip varlığı MDS tanısını dışlamaz. Kompleks karyotip (3 veya daha fazla sitogenetik anomali varlığı); tedavi ilişkili MDS veya *TP53* mutasyon varlığı ile daha çok ilişkilendirilmiştir (3). Özellikle IPSS ve IPSS-R için sitogenetik bulgular önemli bir sınıflama kriteridir ve yukarıda detaylı olarak tanımlanmıştır.

MDS'de en sık görülen kromozomal değişiklik %10-15 oranında 5. Kromozomun uzun kol kaybıdır (del(5q)). İzole del(5q) ve diğer alt tipler olarak iki grupta incelenebilir. Literatürde izole 5q delesyonu iyi klinik gidişle ve prognozla ilişkilendirilmiştir. Lenalidomide daha iyi yanıt vermekle birlikte; AML dönüşüm riski oldukça düşüktür (63). Diğer del(5q) alt tipleri ise 17p kaybı, *TP53* mutasyonu ve kompleks karyotip olarak tanımlanabilir. Bu grup izole del(5q) aksine kötü prognozludur.

del(5q)'nın patofizyolojisine ve mekanizmasına daha detaylı bakılırsa; sık delesyona uğrayan bölgeler (Commonly deleted regions (CDRs)) olarak tanımlanan bu bölgelerin kritik öneme sahip olduğu görülür. Bu bölgelerden 5q31.1 agresif MDS ve AML ile ilişkiliyken; 5q32-33.2 bölgesi izole 5q sendromu ile ilişkilidir. 5q sendromu için hücre gen ekspresyon seviyeleri incelendiğinde en çok ribozom biyogenezi genlerinde değişiklik olduğu gösterilmiştir ve ribozomal protein S14 (RPS14) başta olmak üzere toplam 44 adet haployetersizlik saptanmıştır. Bu haployetersizliklerin eritropoez ve hücre döngüsü ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (3). MDS'deki diseritropoez gelişiminden 5q31.2 bölgesindeki RPS14'ün haployetersizliğinin sorumlu olduğu düşünülmektedir (64). Yapılan bir çalışmada; normal hematopoetik progenitör hücrelerde oluşturulan RPS14 fonksiyon kaybında MDS hastalığına benzer bulguların ortaya çıktığı ve dahası MDS hastalarından elde edilen kemik iliği hücrelerinde RPS14 ekspresyonu sağlandığında hastalık bulgularının düzeldiği gösterilmiştir (65).

RPS14 haployetersizliğinde ribozomal biyosentez bozulduğu için ortamda serbest ribozomal protein birikimi olur. Bu serbest dolaşan ribozomal proteinler "Murine double minute 2" (MDM2)'ye bağlanırlar ve böylece MDM2; p53'bağlanması gerekirken bağlanamaz.

Sonuç olarak eritroid progenitör hücrelerde p53 birikimi gerçekleşir ve ardından apoptoz artışı ve yetersiz eritropoez ortaya çıkar. Ribozomal protein genlerinin kalıtsal mutasyonu sonucu ortaya çıkan hastalıkların (Diamond Blackfan anemi ve hipoplastik anemi) fenotipi de altta yatan bu mekanizmalar nedeni ile 5q delesyonuna benzemektedir. 5q delesyon varlığında ilk sırada tercih edilen lenalidomid; MDM2 hiperfosforilasyonu aracılığı ile p53 degradasyonunu sağlayarak efektif eritropoez oluşturur. (66).

5q delesyonu saptanan bazı hastalarda ise lenalidomide dirençle karşılaşmıştır ve lenalidomide direncini ön görebilmek için çalışmalar devam etmektedir. Dirençle ilişkisi en açık şekilde ortaya konan prediktif değer bugüne kadar *TP53* mutasyonu olmuştur. *TP53* mutasyonu varlığı, 5q delesyon hastalarının %15-20'sinde görülmektedir ve lenalidomide dirençle ilişkili bulunmuştur. Bu nedenle 5q delesyon varlığında *TP53* mutasyon varlığının araştırılması oldukça önem arz etmektedir (4,64).

Monozomi 7 veya 7.kromozomun uzun kol kaybı (del(7q)) sık karşılaşılan diğer bir sitogenetik anomalidir. Prognostik skorlama sistemlerinde bu değişikliklerin varlıkları kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca WHO morfolojik sınıflamasında MDS-5q terimi için; izole del(5q) veya del(5q) eşlik eden 7.kromozom hariç ek bir sitogenetik anomali varlığı tanımlaması yapılmaktadır. CDR bölgeleri; 7p35-36, 7q22 ve 7q32-33 tanımlanmıştır. MDS patogenezinde rol oynayan, somatik ve germline mutasyonların saptandığı tümör süpresör genleri (*CUX1*, *MLL3*, *EZH2*, *SAMD9*, *SAMD9L*) içerir. Tedavi ilişkili MDS'de (%50) primer MDS'ye (%10) oranla daha sık olarak görülmektedir (3).

20. kromozom uzun kol kaybı (del(20q)); MDS ile spesifik olarak ilişkilendirilen ve iyi prognoz gösteren sitogenetik anomalidir. Bu hastalarda trombositopeni daha sık görülmektedir.

Trizomi 8 varlığı prognostik skorlama sistemlerinde orta risk grubunda yer almaktadır. Hastaların yaklaşık %10'unda görülmektedir ve geç evrede ortaya çıkmaktadır (3). Ayrıca immun supresif ajanlara karşı yanıtta trizomi 8 varlığı daha iyi yanıtla ilişkilendirilen faktörler arasında bildirilmiştir (67).

Y kaybı; ileri yaşta erkeklerde sık olarak görülmektedir ve MDS'de çok iyi prognoz sınıfında yer alır.

17. kromozom anomalileri primer MDS hastalarının yaklaşık %2'sinde gözükmemektedir ve IPSS risk sınıflamasında orta risk grubundaki sitogenetik değişiklikler arasındadır. 17.kromozom anomalisine sahip hastaların, 17.kromozom anomali içermeyen hastalara kıyasla daha çok sayıda kromozomal değişikliğe sahip olduğu gösterilmiştir ve kompleks karyotipe monozomi 17'nin eşlik etmesinin en kötü gidişle ilişkili olduğu söylenmektedir (68). Genellikle i(17q) veya del(17p) şeklinde karşılaşılır. *TP53* geni de 17. Kromozom kısa kolu üzerinde yer

aldığından dolayı 17p kaybı da hastalığın gidişatının kötü olduğunu göstermede önemli parametredir.

Kompleks karyotip; hastalarda 3 veya daha fazla sitogenetik değişikliğin bulunması şeklinde tanımlanır. IPPS’de kötü prognoz; IPSS-R’da 3 anomali varlığı kötü, 3’ten fazla anomali varlığı ise çok kötü prognoz olarak tanımlanır. Kompleks karyotip varlığı genellikle kemoterapiye direnç ve AML dönüşümü ile ilişkili bulunmaktadır. Kompleks karyotipli hastaların yarısında *TP53* geninde mutasyon vardır (4).

Translokasyonlar; anöploidilere kıyasla nadir görülür fakat MDS’de görülebilen karşılaşılan tranlokasyonlar; $t(2;11)(p21;q23.3)$, $t(11;16)(q23;p13.3)$, $t(1;3)(p36.3;q21.3)$, $t(3;21)(q26.2;q22.1)$, $t(6;9)(p23.3;q34.1)$ ve $inv(3)(q213q26.2)$ ’dür.

2.10.2 Moleküler bulgular

Moleküler bulgular somatik ve germline alt başlıkları halinde detaylı incelenmiştir. Germline mutasyon; eşey hücrelerinde meydana gelen ve sonraki kuşağa iletilebilen genetik değişiklik olarak tanımlanabilir. Germline mutasyonun aktarıldığı kişi bu değişikliği doğduğu andan itibaren tüm hücrelerinde homozigot (VAF:%100) veya heterozigot (VAF:%50) olarak taşır. Somatik mutasyonlar; kişinin bir vücut hücresinde çevresel faktörler sonucunda sonradan ortaya çıkan genetik değişikliklerdir. Eşey hücrelerinde meydana gelmediği için sonraki nesile aktarılamaz. Somatik mutasyonların sıklığı ilerleyen yaşla birlikte artmaktadır ve biriken mutasyon yükü bazı kanserlerin ortaya çıkmasında etkili olmaktadır. Saptanan somatik değişikliğin allelik fraksiyonu klonalite ve tümör yüküne bağlı çok farklı oranlarda bulunabilmektedir.

2.10.2.1 Somatik mutasyonlar

Sitogenetik anomaliler MDS’nin klinik heterojenitesini açıklamakta yetersiz kalmaktadır. Hastalarda klonal hematopoez varlığını kanıtlamak ve non-diagnostik morfolojileri benign sitopenilerden ayırabilmek için moleküler belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır. Litetürde bazı somatik mutasyonların varlığının belirli kliniklerle birlikteliği dikkat çekmektedir. Örnek olarak *TP53* genindeki mutasyonlarının veya heterozigot kaybının AML dönüşüm eğiliminde artışa ve kısa sağ kalıma sebep olduğu verilebilir. Ayrıca *TP53* mutasyonlarının 5q delesyonu saptanan vakalarda lenalidomide dirençten sorumlu olduğu bildirilmiştir. MDS hastalarında *SF3B1* mutasyonlarının iyi prognozla; *EZH2*, *RUNX1*, *NRAS*, *ASXL1*, *DNMT3A*, *IDH2*, *SRSF2*, *FLT3*, *EZH2*, *ETV6*, *BCOR* gen mutasyonlarının kötü

prognozla ilişkili olabileceği gösterilmiştir. *TET2* ve *DNMT3A* gen mutasyonlarının da hipometile edici ajanlara iyi yanıtla ilişkili olduğu bilinmektedir (3,43). Bu kapsamda MDS’de yapılan somatik mutasyon analizlerinin; klinik gidiş, prognoz ve tedavi yanıtı açısından oldukça önemli olduğu düşünülmektedir.

2022 yılında yayınlanan uluslararası MDS kılavuzunda moleküler parametreleri kapsayan yeni prognostik sınıflama sistemi IPSS-M’e yer verilmemiş iken; 2023 yılında güncellenen NCCN MDS rehberinde bu prognostik sınıflama yerini almıştır. 2022 yılına ait kılavuzda literatürdeki moleküler çalışmalar değerlendirilerek 5 gen (*TP53*, *EZH2*, *ETV6*, *RUNX1* ve *ASXL1*) üzerinde durulmuştur. Farklı kohort gruplarında bu 5 genden herhangi birinde saptanan mutasyon varlığında IPSS ve IPSS-R’da genel sağ kalımın azaldığı gösterilmiştir (36,69). Ayrıca IPSS risk gruplarında sağ kalım oranı; 5 gendeki herhangi bir mutasyon varlığında bir sonraki yüksek risk grubunun sağ kalım oranına benzer bulunmuştur. Bu nedenle 2022 kılavuzu bu 5 gen analizi ile IPSS ve IPSS-R’ın kombine analizinin daha iyi bir risk sınıflaması yapabileceğini ön görmektedir ve bu 5 geni bağımsız kötü prognoz kriterleri olarak belirtmiştir (70) .

Somatik mutasyon analizi; mevcut risk skorlama sistemlerine ek olarak risk sınıflamasına ve tanıya katkı sağlaması açısından umut vadetmektedir. Literatür taraması yapıldığında moleküler belirteçlerin mevcut risk skorlama sistemlerine entegrasyonu ve sağ kalım ilişkisi ile ilgili çalışmaların son yıllarda hız kazandığı ve arttığı görülmektedir (71). Yeni nesil dizileme teknolojilerin gelişmesi ve daha yaygın kullanılmasıyla moleküler belirteçlerin MDS hastalarında yeni prognostik model geliştirme ve modellere ait validasyon çalışmaları hızla artmaktadır. 2023 yılındaki rehberde de yeni geliştirilen “IPSS-Molecular” (IPSS-M) modeline yer verilmektedir. Güncel kılavuzlar artık MDS ile ilişkili bulunmuş genleri kapsayan NGS panellerinin periferik kan veya kemik iliği örneklerinde kullanımını rutin olarak önermektedir (4). Periferik kandan yapılan somatik mutasyon testlerini kemik iliğinde tekrarlamak gerekli değildir fakat periferik kanda saptanan mutasyon yüksek risk paterni taşıyorsa (birden fazla sürücü mutasyon varlığı ve yüksek VAF MDS tanısı için kemik iliği biyopsisi yapılması gereklidir (62).

ESMO rehberinde somatik mutasyonların bağımsız prognostik etkisi belirsiz olduğu için bazı özel durumlar haricinde tedavi kararında rutin pratikte önerilmemektedir (2B). Düşük riskli MDS’de *SF3B1* gen mutasyonu varlığında luspatercept tedavisi, izole del(5q) eşlik ettiği düşük risk MDS’de lenalidomid tedavisi ve kompleks karyotip görülen tüm MDS hastalarında *TP53* gen mutasyonunda tedavi direnci ve tüm MDS hastalarında *IDH1-2* mutasyon varlığında hedefli tedavi seçeneğinden dolayı kılavuz tedavi kararında somatik analizin faydalı olabileceğini düşündüğü bu gruplarda moleküler profillemeyi önermektedir (1A) (12).

Somatik mutasyon analizi ayrıca MDS taklit eden durumların ayırıcı tanısında da etkin rol oynamaktadır. Güncel NCCN MDS kılavuzunda; *CALR* mutasyon varlığında primer miyelofibrozisi, *STAT3* mutasyon varlığında büyük granüler lenfositik lösemi, *CSF3R* mutasyon varlığında kronik nötrofilik lösemi veya atipik kronik miyeloid lösemi ön planda düşünülmesi gerektiğini belirtmektedir (4).

Somatik mutasyon analizi güncel kılavuzlarda MDS hastalarında önerilmiş olmasına rağmen; henüz bu moleküler profillemenin hangi testle, hangi genler ile, mutasyonun hangi karakteristik özellikleri ile yapılacağını belirten bir rehber bulunmamaktadır. Hastalığın progresyon takibi için seri moleküler testlerin nasıl ve ne zaman uygulanması gerektiği ile ilgili net bir çalışma yoktur. Bu nedenlerle MDS’de moleküler araştırmalar ve testler konusunda daha detaylı ve kapsamlı verilere ihtiyaç duyulmaktadır.

Klinik onkologlar, genetikçiler ve patologların biraraya gelerek “Association for Molecular Pathology” derneği tarafından oluşturulan uzlaşma raporunda somatik mutasyonların 4 farklı kategoride değerlendirilmesi önerilmiştir. Bu rapora göre; benign ve olası benign değişiklikler Tier-4 varyant, klinik önemi bilinmeyen değişiklikler Tier-3 varyant, potansiyel klinik önem taşıyan değişiklikler Tier-2 ve klinik önemi güçlü bulunan değişiklikler Tier-1 varyant olarak tanımlanmıştır (72).

Somatik mutasyon analizi sürecinde bir sonraki aşama tespit edilen mutasyonların; popülasyon veritabanlarında (ExAC, 1000 Genomes Project vb) veya çeşitli kanser spesifik varyant veri tabanlarında (Catalog of Somatic Mutations in Cancer-COSMIC, My Cancer Genome, cBioPortal) sıklığı, onkojenitesi, daha önce hangi kanserlerde bildirildiği ve hastadaki kanser tipi ile ilişkisi araştırılmalıdır. Ayrıca yeni geliştirilen bir veri tabanı “ONCO-KB”; onkolojik tümörlerde tespit edilen spesifik mutasyonların klinik ilişkisini daha kolay yorumlayabilmek için genleri kategorize etmiştir ve bu kategorileri kanıta göre seviyelere ayırmıştır. Kanser ile ilişkili genler; terapötik (L1, L2, L3, L4, LR1, LR2), diagnostik (Dx1, Dx2, Dx3) ve prognostik (Px1, Px2, Px3) olarak değerlendirilmektedir (73).

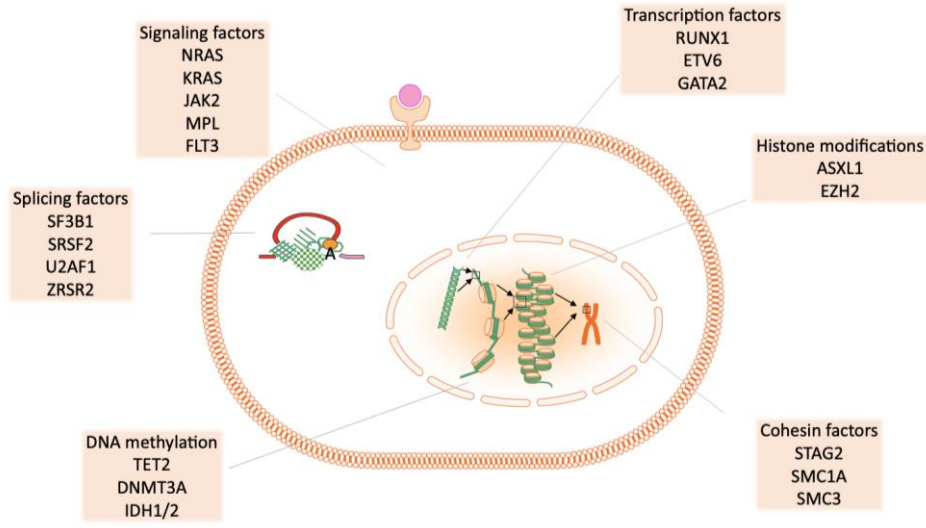
ONCO-KB veritabanında MDS özelinde bakıldığında tanımlanan genler L4, Dx2 ve Px1 gruplarındadır. L4 kategorisi ilaca verilen yanıtı ön görebilen belirtecin ikna edici biyolojik kanıtlara ihtiyacı olduğunu gösterir ve bu grupta MDS’de 5 gen (*H3B-880* için *SF3B1-SRSF2-U2AF1-ZRSR2* genleri, tazemetostat için *SMARCB1* geni) bulunmaktadır. Dx2 grubu; FDA veya profesyonel kılavuzlar tarafından tanıyı destekleyen biyobelirteç anlamındadır ve MDS kapsamında 19 gen (*ASXL1, BCOR, CBL, DNMT3A, ETV6, EZH2, IDH1-R132, KRAS, NRAS, PHF6, PPM1D, RUNX1, SETBP1-D868-E858-G870-I865-S869-T864, SF3B1-S869-T864, SRSF2-P95, STAG2, TET2, U2AF1, ZRSR2*) içerir. Px1; kılavuzda tanımlanmış güçlü verileri

olan belirteç anlamındadır ve MDS için 8 geni (*ASXL1*, *CBL*, *EZH2*, *NRAS*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *TP53*) içerir.

Moleküler analizler sonucunda saptanan somatik mutasyonlar; varyant allel frekansı (VAF), okuma derinliği, mutasyonun tipi ve lokasyonu açısından da değerlendirilmelidir. Genel olarak VAF'ın %5'ten küçük olması mutasyonun klinik öneminin olmadığını göstermektedir (43). Miyeloid malignitelerde progresyon göstergesi olarak VAF >%10 olarak alınabilir. Eğer yapılan testte VAF %30-60 aralığında saptandıysa mutlaka uygun örnek (bukkanal, fibroblast) kullanılarak germline mutasyon varlığının araştırılması önerilmektedir. (62).

MDS hastalarının %90'ından fazlasında en az bir tümör baskılayıcı gen veya onkogende mutasyon saptandığı bildirilmektedir fakat %10'unda birkaç gende aynı anda mutasyon görülür ve çoğunda da 2-4 gende mutasyon bulunduğu belirtilmektedir (15). >3'ten fazla sürücü mutasyon varlığı MDS hasta popülasyonu ile yapılan çalışmalarda kısa sağ kalım ve yüksek lösemi dönüşüm riski ile ilişkilendirilmiştir. Özellikle düşük riskli popülasyonda tespit edilen birden çok somatik mutasyon varlığı hastanın prognoz grubunu değiştirerek tedavi seçimini etkileyebilmektedir (8). Normal karyotipli MDS hastalarının yaklaşık %70'inde genetik mutasyon saptanmıştır (74).

Literatürde yapılan araştırmalar sonucunda MDS hastalarında saptanan patojenik mutasyonların çoğu 40-50 gende kümelenmiştir (74). MDS'de sık mutasyona uğrayan genellikle fonksiyonlarına göre gruplandırılarak incelenir. En sık uçbirleştirme (splice) faktör (%60) ve DNA metilasyon (%30-40) ilişkili genlerde mutasyon görülmektedir. Bu iki grup mutasyonların hastalığın erken evresinde olduğu söylenmektedir. Ayrıca transkripsiyon faktörleri, histon modifikasyonu, hücre sinyal yolağı ve kohezin kompleksi ile ilişkili genlerde de mutasyonlar sık görülmektedir. Histon modifikasyonu ve sinyal yolağı ilişkili mutasyonlar hastalığın geç evresiyle ilişkilidir (71). MDS'de sık mutasyona uğrayan genler fonksiyonlarına göre Şekil 3'te gösterilmektedir (75).



Şekil 3. MDS sık mutasyona uğrayan genler (75)

Mutasyona uğrayan genler farklı kaynaklarda Tip 1 ve Tip 2 genler olarak iki grupta incelenmektedir. Tip 1 olan grupta *IDH1-2*, *FLT3*, *NRAS*, *NPM1*, *WT1*, *PTPN11* genleri bulunmaktadır ve bu genlerin ortak özellikleri AML’de daha sık olarak görülmeleridir. Tip1 genlerinde mutasyon varlığında daha hızlı lösemik dönüşüm gerçekleşir. Tip 2 grup ise *TP53*, *RUNX1*, *ASXL1*, *ZRSR2*, *GATA2* ve *STAG2* genleridir. Tip 2 genler; düşük riskli MDS’ye kıyasla yüksek riskli MDS’de daha sık görülmektedir (51).

MDS hastalarında moleküler profillemeler sonucunda belirlenen sık mutasyona uğrayan genler fonksiyonlarına göre gruplandırılarak alt başlıklar halinde değerlendirilmiştir.

2.10.2.1.1 RNA Uçbirleştirme (Splice) Faktörleri (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2*)

Splicezomlar; translasyon öncesi mRNA’dan kodlanmayan bölgelerin çıkarılmasını sağlayan küçük nükleer ribonükleoproteinlerdir. Eğer uçbirleştirme (splicezom) proteinlerini kodlayan genlerde mutasyon gerçekleşirse pre-mRNA uçbirleştirme bozulur ve tümör gelişimi tetiklenir (15). MDS hastalarında en sık mutasyona uğrayan grup uçbirleştirme (splice) faktör genleridir (3). Uçbirleştirme (splice) faktörleri genlerinden *SF3B1*, *U2AF1* ve *SRSF2* genleri IPSS-M’de tanımlanan ana etkili genler arasında yer almaktadır. *ZRSR2* geni ise IPSS-M’de ana etkili ve residüel genler arasında bulunmamaktadır.

“Splicing Factor 3b, Subunit 1”- (*SF3B1*) geni 2q33.1’de lokalize 25 ekzonlu bir gendir. Mutasyonlar gen boyunca 12. ve 15. ekzonlar arasında kümelenmiştir ve en sık görülen mutasyon K700E mutasyonudur (3). NCCN MDS kılavuzda %20-30 sıklığında görüldüğü

belirtilmiştir (4). Mutasyonlar genellikle heterozigot olarak görülmektedir ve diğer hot-spot noktası R625 bölgesidir. MDS-RS hastalarının %80'inde *SF3B1* geninde mutasyon bulunmaktadır ve diğer alt tiplerde bu gendeki mutasyonlar nadirdir (15). *SF3B1* geninde görülen K666N mutasyonu farklı bir RNA uçbirleştirme profili göstermektedir ve yüksek risk MDS ve AML ile ilişkili bulunmuştur (76). Yapılan çalışmalarda *SF3B1* geni için fenotip genotip korelasyonun güçlü olduğu söylenmektedir ve bu fenotipik özellikler kadın cinsiyet, kemik iliği düşük blast oranı, yüksek WBC ve trombosit, iyi klinik gidiş olarak tanımlanmıştır. MDS-RS hastalarında ve *SF3B1* mutasyon varlığında etkili tedavi seçeneği luspatercepttir (8). *SF3B1* iyi prognozla ilişkilendirilmiş olmasına rağmen; ek bir moleküler anomali varlığı (özellikle *RUNX1* mutasyonu) veya del(5q) birlikteliğinde kötü prognostik özellik taşıyabileceği belirtilmiştir (15). MDS hastalarında iyi prognozla ilişkilendirilen tek gen *SF3B1* genidir. IPSS-M'de ana etkili genler sınıfında iki koşul altında (*SF3B1*^{5q} ve *SF3B1*^a) bahsedilmektedir.

“Splicing Factor, Serine/Arginine-Rich, 2” – (*SRSF2*) geni 17q25 bölgesinde lokalizedir. Kodon P95'i kapsayan missense ya da inframe delesyon mutasyonları görülür (3). NCCN'de Kronik Miyelomonositik Lösemide (KMML) daha sık, MDS hastalarında ise %10-15 oranında görüldüğü bildirilmiştir (4). Yapılan çalışmalarda *SRSF2* geninde mutasyon taşıyan hastalarda granülopoez ve megakaryopoez sırasında displazi ortaya çıktığı gösterilmiştir (15). Ayrıca *SRSF2* geni de dahil olmak üzere *TET2* ve *ASXL1* gen mutasyonlarında miyelomonositik farklılaşma görülmektedir (71). *SRSF2* gen mutasyonları artmış yaş, yüksek HB ve normal sitogenetik ile ilişkili bulunmuştur (3). Genel olarak *SRSF2* gen mutasyonlarının kötü prognostik özellikler gösterdiği söylenir.

“U2 Small Nuclear Rna Auxiliary Factor 1” – (*U2AF1*) geni 21q22.3 lokalizasyonunda bulunmaktadır. MDS hastalarında %8-12 sıklığında görülmekle birlikte kısa sağ kalım ile ilişkilendirilmiştir. Sık görülen mutasyonları S34 ve Q157 kodonlarındaki missense mutasyonlardır (4). IPSS-M'de ana etkili genler sınıfındadır. Bir çalışmada *U2AF1* mutasyonunda VAF> %40 olması durumu MDS hastalarında bağımsız kısa sağ kalım faktörü olarak ile bulunmuştur ve ayrıca Q157P mutasyonun daha kötü klinik gidiş gösterdiği belirtilmiştir (77).

“Zinc Finger-, Cech Domain-, And Rna-Binding Motif-Containing Serine/Arginine-Rich Protein 2” – (*ZRSR2*) geni Xp22.2 noktasındadır. %5-10 sıklıkta MDS hastalarında karşılaşıp. Genellikle nonsense ve frameshift mutasyonları sık görülür (4). Bir derleme lösemik dönüşüm tespiti için VAF oranının önemli gösterge olduğu söylenmektedir ve o genlerden bir tanesi *ZRSR2* genidir (53). Diğer genler ise DNA metilasyon genlerinden *TET2*, *DNMT3A* ve DNA transkripsiyon faktörlerinden *RUNX1*, *TP53* olarak belirtilmiştir.

2.10.2.1.2 DNA metilasyonu (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1/2*)

Epigenetik değişiklikler; gen ekspresyon seviyesini genomdaki DNA dizisini bozmadan DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve posttranslasyonel modifikasyon gibi mekanizmalar aracılığı ile etkilerler. MDS’de de epigenetik düzenleyici genlerle ilgili mutasyonlara sık rastlanmaktadır. MDS’de epigenetik mekanizmalarla ilişkili en sık mutasyona uğrayan grup DNA metilasyon genleridir. *DNMT3A*, *TET2* ve *IDH2* genleri IPSS-M’de ana etkili genler grubunda iken; *IDH1* residüel genler arasında geçmektedir.

MDS tedavisinde kullanılan hipometile edici ajanlara %40-50 oranında yanıt alınmaktadır. Hastaların kalan yarısında ise bu ilaçlara direnç geliştiğinden; tedavi cevabı ilişkili belirteç çalışmaları yapılmaktadır. Farklı çalışmalar da özellikle DNA metilasyonu ile ilişkili olan genlerde (*TET2*, *DNMT3A* ve *IDH1-2*) mutasyonu olan hastaların HMA’ya daha yüksek oranda cevap verdiği gösterilmiştir (78).

DNA metilasyonu; DNA metiltransferaz enzimleri tarafından gerçekleştirilir. *DNMT3A* geni 2p23.3’te lokalize olup, bir DNA metiltransferaz-3a enzim kompleksini kodlar. MDS hastalarında %12-18 sıklığında görülmektedir ve kısa sağ kalım, HMA iyi yanıt ile ilişkilidir. (4). CHIP ve AML hastalarında daha çok mutasyona uğramaktadır. En sık mutasyonlar R882 bölgesinde görülmektedir (63). R882 mutasyonlarının daha çok AML hastalarında görüldüğü ve bu mutasyonu taşıyan hem AML hem MDS hastalarında *DNMT3A* geninde diğer mutasyon taşıyıcılarına göre daha kötü prognozla ilişkili olduğu söylenmektedir (15).

“Tet Methylcytosine Dioxygenase 2”- (*TET2*) geni 4q24 lokusunda yer almaktadır. 5-metilsitozinin hidroksilasyonunu sağlayarak epigenetik düzenlemede önemli bir rol üstlenir. MDS hastalarında %20-25 sıklığında görülmektedir ve nonsense, frameshift, splice bölge ve kodon 1134–1444 ile 1842–1921 bölgeleri arasındaki missense mutasyonları tespit edilebilir (4). Literatürdeki sağ kalım çalışmalarına bakıldığında etkisinin belirsiz olduğu söylenebilir. Yapılan bir çalışmada *TET2* mutasyonu olan ve olmayan hastalarda 3 yıllık lösemisiz sağ kalım karşılaştırıldığında *TET2* mutasyonu olanlarda olmayanlara göre daha yüksek bulunmuştur (79). Son yıllarda yapılan derlemelerde ise *TET2* mutasyonu lösemi dönüşüm riski ve kısa sağ kalım ile ilişkilendirilen genlerden biri olarak değerlendirilmektedir (53). C vitamini *TET2* fonksiyonu için kofaktör rolündedir ve *TET2* mutasyonu olan hastalarda tedavide C vitamini kullanılmasına ilişkin yapılan klinik çalışmalarda hematopoezin düzenlendiği kanıtlanmıştır (19). *TET2* mutasyonu ayrıca normal karyotip ile ilişkilendirilmektedir (53). Ayrıca hipometile edici ajanlara daha iyi cevap verdiği söylenmektedir (3). *TET2* mutasyonlarının *SRSF2* veya *ZRSR2* gen mutasyonları ile birlikteliğinin KMML işareti olduğu bildirilmiştir (74). *TET2* geni diğer genlerle birlikte sık mutasyona uğrayan bir gendir (71).

“Isocitrate Dehydrogenase 1”- (*IDH1*) geni 2q34’te lokalizedir. MDS hastalarında sıklığı %5’in altındadır ve en sık R132 bölgesinin missense mutasyonları görülür. Kısa sağ kalım, HMA iyi yanıt ve hızlı AML progresyonu ile ilişkili bulunmuştur (80). IDH-1 inhibitörleri (İvosidenib, Olutasidenib) mutant *IDH1* AML vakalarında FDA’dan onay almıştır ve MDS için klinik çalışmalar devam etmektedir.

“Isocitrate Dehydrogenase 2”- (*IDH2*) geni 15q26 bandında bulunur ve MDS hastalarında sıklığı %5’in altındadır. En sık mutasyonları R140Q ve R172’dir. Mutant IDH2 proteini 2-HG birikime sebep olur. Biriken 2-HG alfa ketoglutaratı inhibe eder ve bunun sonucunda histon demetilaz inhibe olur. Selüler diferansiasyon arrest olur. *IDH2* mutasyon varlığında kullanılan IDH2 inhibitörü enasidenib; 2-HG düşürerek diferansiasyon bloğunu kaldırır (51). Sıklıkla *SF3B1* ve *IDH2* geni birlikte komutasyona uğrar (71).

2.10.2.1.3 Histon Modifikasyonu (*ASXL1*, *EZH2*, *BCOR*)

“Asxl Transcriptional Regulator 1” – (*ASXL1*); 20q11.21’de lokalize tümör supresor genidir. 13 ekzonlu bir gen olmasına rağmen tüm mutasyonlar 12. ekzonda görülmektedir. Mutasyonların çoğu fonksiyon kazanımı şeklindedir ve genellikle p.E635fs ve p.G646fs bölgelerini kapsayacak nonsense ya da frameshift olarak görülür (3,63). Ayrıca MDS hastalarında %15-25 sıklığında görülür ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (4). Histon modifikasyonu ilişkili genlerde en sık mutasyona uğrayan genidir ve *SF3B1* ile *DNMT3A* hariç diğer gen mutasyonlarıyla birlikteliği sıktır (15). Düşük riskli MDS hastaları arasında yapılan bir çalışmada ise literatürden farklı olarak *ASXL1* ve *DNMT3A* mutasyonlarının lösemik dönüşümde etkisi olmadığı gösterilmiştir (81). IPSS-M ana etkili genler grubunda yer alır.

“Enhancer of Zeste Homolog 2”-(*EZH2*) geni 7q35-36’da lokalize histon metiltransferaz olarak işlev göstermektedir. Monozomi 7 veya del(7q) durumlarında da *EZH2* geninde fonksiyon kaybı gözlenir. Hem 7. kromozom anomalileri hem de *EZH2* gen mutasyonları MDS ve AML’de kötü prognoz ile ilişkilidir. *EZH2* geni bazı kanserlerde (melanom, lenfoma) overeksprese olarak onkogen aktivitesi gösterirken; miyeloid malignitelerde fonksiyon kaybı mutasyonları sonucunda tümör supresör aktive de gösterebilir (82). MDS hastalarında %5-10 sıklıkta görülmektedir. Mutasyonların çoğu SET bölgesindeki R690’dadır (3). MDS hastalarında daha çok *RUNX1* mutasyonu ile birliktelik gösterir (53). Ayrıca *TET2* ve *ASXL1* mutasyonları ile beraberliği de sıktır. *ASXL1* ve *EZH2* gen mutasyonları AML dönüşümünde bağımsız kötü prognostik faktör olarak tanımlanmaktadır (15). IPSS-M ana etkili genleri arasındadır.

Histon modifikasyonu ile ilişkili bir diğer gen “BCL6 Corepressor”-(*BCOR*) genidir. *BCOR* Xp11.4 lokusunda yer almaktadır. MDS hastalarında %5’in altında görülmekle birlikte, daha sık KMML’de mutasyonları saptanır. Kötü gidişle ilişkilidir. *RUNX1* ve *DNMT3A* mutasyonları ile birlikteliği sıktır (15). *BCOR* geni IPSS-M’de residüel genler grubunda yer almaktadır.

2.10.2.1.4 DNA transkripsiyon faktörleri (*RUNX1*, *TP53*, *ETV6*, *NPM1*, *GATA2*)

DNA transkripsiyon faktörleri hematopoetik kök hücrelerin yapımında ve diferansiasyonunda görevlidir ve DNA transkripsiyon genlerinde gerçekleşen mutasyonlar sonucunda hematopoez diferansiasyonunda yetersizlik meydana gelmektedir. Bu genlerdeki germline mutasyonlar; familial MDS/AML gelişiminden sorumludur (15). Transkripsiyon faktörü genlerinden *RUNX1*, *TP53*, *ETV6*, *NPM1* genleri IPPS-M sınıflandırmasında ana etkili genler listesinde, *GATA2* ise residüel genler listesinde.

“Runt-Related Transcription Factor 1”- (*RUNX1*) geni 21q.22.12 lokusunda yer almaktadır. Hematopoezde kritik rol oynar. MDS hastalarında en sık mutasyona uğrayan 3. gen olarak geçmektedir ve %10-15 sıklığında karşılaşılmaktadır. Nonsense ve frameshift mutasyonlar görülür. Yüksek riskli alt tiplerde ve t-MDS’de daha sık görülmektedir. Gendeki fonksiyon kaybı mutasyonlarının hastalık progresyonu ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (3). *RUNX1* gen mutasyonlarında kısa sağ kalım ve kötü klinik gidiş görülür. Son yapılan bir çalışmada düşük riskli MDS hastalarında SF3B1, *RUNX1* ve *TP53* mutasyonlarının etkisi değerlendirilmiş ve *RUNX1* ve *TP53* mutasyonları; lösemik progresyon ve düşük genel sağ kalım göstergesi olarak bulunmuştur. Ayrıca aynı çalışmada *RUNX1* gen mutasyonları düşük ANC ve trombosit, yüksek kemik iliği blast oranı ile daha sık birliktelik göstermiştir (81). IPSS-M’de ana etkili genler grubundadır ve uluslararası kılavuz tarafından bağımsız kötü prognostik gösterge olarak değerlendirilmektedir.

“Ets Variant Transcription Factor 6” -(*ETV6*) geni 12p13 lokusunda bulunur. ETV6 proteini hematopoetik regülasyonda görevlidir. Genellikle hematolojik malignitelere 30’dan fazla genle füzyon proteini oluşturur (15). MDS hastalarında sıklığı %5’in altındadır. Nonsense ve frameshift mutasyonları görülür. Bağımsız kötü prognostik belirteçtir.

“Tumor Protein P53” -(*TP53*); 17p13.1’de lokalize, 10 ekzonlu bir tümör supresör genidir. Nonsense, frameshift, splice bölge mutasyonları ve P47S ve P72R dışındaki herhangi bir kodonda missense mutasyonları görülmektedir. MDS hastalarında sıklığı %8-12 olarak bildirilmektedir (4). MDS alt tipleri olarak bakıldığında; primer MDS’de %10, t-MDS’de %25 ve MDS-5q’da %20 sıklıkta gözlemlendiği belirtilmiştir (15). Eğer del(5q) varlığında *TP53* gen

mutasyonu saptanırsa lenalidomide direnç beklenir ve bu nedenle izole 5q delesyonu saptanan vakalarda *TP53* mutasyonu mutlaka değerlendirilmez (64). *TP53* gen mutasyonlarına sıklıkla %50 oranında kompleks karyotip eşlik etmektedir(3). *TP53* geni; MDS’de bağımsız prognostik belirteç olarak değerlendirilmektedir. *TP53* mutasyonu 17p delesyonu ile fenokopi gösterir. Her iki durum varlığı da MDS’de; t-MDS, kötü prognoz yüksek blast oranı, kompleks karyotip ve trombositopeni ile ilişkili bulunmuştur (74).

Literatür verilerine bakıldığında *TP53* mutasyonunun MDS’de oldukça önemli rol oynadığı görülmektedir. *TP53* mutasyon varlığı; sadece prognostik bilgi vermekle kalmayıp, morfolojik sınıflandırmada da değerli bir kriter olmuştur. WHO 2022 morfolojik sınıflamasında MDS-bi*TP53* (biallelik *TP53* mutasyonu) alt tip olarak tanımlanmıştır (29). Biallelik mutasyon tanımı; *TP53* geninde iki mutasyonun varlığı veya *TP53*’te tek mutasyon ile eşlik eden 17p lokusunda kopya sayısı değişikliği veya heterozigosite kaybının varlığıdır. Geniş bir MDS hasta popülasyonu ile yapılan çalışmada VAF $\leq$ %22 olan monoallelik *TP53* mutasyonlu hastaların sağ kalımı ve tedavi cevabı mutasyon taşımayan hastalarla benzer bulunmuştur (30). Ayrıca yine aynı çalışmada monoallelik hastalar içerisinde R175 ve R248 kodonlarında mutasyon taşıyan hastalarda diğer mutasyon taşıyıcılarına kıyasla ölüm riski daha yüksek saptanmıştır (30).

TP53 mutasyonları değerlendirilirken mutasyonun özellikleri de dikkatlice incelenmelidir. VAF ve mutasyonun tipinin prognostik önemine katkısını araştıran çok sayıda çalışmalar mevcuttur. Genel olarak VAF’ın yüksek olması ve truncating mutasyon varlığı daha kısa sağ kalım ile ilişkilendirilmiştir (83). *TP53* mutasyonlarında komutasyon sıklıkla beklenmemektedir fakat monoallelik *TP53* mutasyonuna ek bir mutasyon varlığının prognozu kötüleştirebileceği söylenmektedir (71). Ayrıca kısa sağ kalım ve yüksek lösemik dönüşüm riski için *TP53*, *NPM1*, *DNMT3A* ve *TET2* gen mutasyonlarında VAF oranının oldukça önemli olduğu vurgulanmaktadır (53).

Allojenik kemik iliği nakli yapılan MDS hastalarında kötü gidişi ve relaps gösteren parametrelerin en güçlüsü *TP53* mutasyon varlığıdır. Diğer parametreler ise *NRAS*, *U2AF1*, *IDH2* mutasyonları ve kompleks karyotiptir (8) Kemoterapi (KT) ve radyoterapi (RT) alan hastalarda *TP53*, *PPM1D* ve *CHEK2* genlerinde patojenik mutasyon saptanması; tedavi ilişkili miyelod kanser gelişimi için yüksek risk göstergesidir ve bu hastaların daha yakından takip edilmesi gerekmektedir (62).

2.10.2.1.5 Sinyal iletimi (*KRAS, NRAS, PTPN11, NF1, JAK2*)

RAS yolları hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında görev almaktadır. MDS’de RAS yolağı genleri (*NRAS, KRAS, BRAF*) içerisinde en sık mutasyona uğrayan “Nras Protooncogene, GTPase”-(*NRAS*) genidir. *NRAS* 1p13 lokalizedir. MDS hastalarında %5-10 sıklığında karşılaşılr ve en çok görülen mutasyonları G12, G13, Q61 kodonlarındaki missense değişimlerdir (4). *NRAS, TP53* ve *RUNX1* gen mutasyonları yüksek blast oranı ile ilişkili bulunmuştur (3). Yapılan çalışmalarda hücre sinyal yolağı ilişkili mutasyon varlığında düşük risk MDS’de lösemi dönüşüm riskinin yüksek olduğu vurgulanmıştır (53). Bir başka derlemede *RAS* mutasyonlarının relaps nedeni ile; *JAK2* mutasyonlarının relaps dışı kısa sağ kalım ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (12). *NRAS* ve *KRAS*; IPSS-M’de ana etkili genler grubunda sınıflandırılmaktadır.

PTPN11, JAK2, NF1 gibi sinyal iletimi ilişkili diğer genlerdeki mutasyonlarının MDS’de sağ kalıma etkisi henüz belirsizdir ve daha çok veriye ihtiyaç duyulmaktadır (15). *PTPN11* ve *NF1* genleri IPSS-M’de rezidüel genler grubundadır.

2.10.2.1.6 Kohezin kompleksi (*SMC3, SMC1A, RAD21, STAG2*)

Kohezin kompleksi hücre bölünmesi, transkripsiyon düzenlenmesi ve DNA tamirinde görev almaktadır. MDS hastalarında kohezin kompleksi ile ilişkili genlerde %10 sıklığında görülmektedir. Bu genler arasından ise en çok *STAG2* mutasyonu saptanmaktadır. *STAG2* mutasyonu ile MDS hastalarının %5-10’unda karşılaşılmaktadır (15). *STAG2* geninde nonsense, frameshift ve splice bölge mutasyonları sıklıkla görülmektedir. Kötü gidişle ilişkilendirilmektedir. IPSS-M sınıflamasında rezidüel genler arasında yer almaktadır.

2.10.2.2 Germline mutasyonlar

Germline mutasyonlar doğuştan meydana gelen ve sonraki kuşaklara aktarılabilen genetik değişikliklerdir. Miyeloid malignitelerde hematopoetik kök hücrelerinde meydana gelen somatik mutasyonlar periferik kan ve kemik iliğine çıkmaktadır ve periferik kandan yapılan germline testler bu durumlarda yanıltıcı olabilmektedir. Miyeloid neoplazm şüphesi veya tanısı olan hastalarda germline incelemeler için bukkal veya fibroblast kültür çalışması tercih edilmelidir.

Germline mutasyonlar familial MDS veya MDS’ye yatkınlık yaratan sendromlar olarak düşünülebilir. Familial MDS’de germline durumlar; NGS çalışmalarının yaygınlaşması ve

gelişmesi ile yeni keşfedilmeye başlamıştır. Germline yatkınlık sendromlarına *DDX41*, *GATA2*, *SAMD9*, *RUNX1* ve *SAMD9L* genlerinde ortaya çıkan patojenik veya olası patojenik varyantlar sebep olur. Klinik tablo etkilenen gene hatta varyanta göre şekillenir. *DDX41* genindeki mutasyonlar yetişkin hasta grubunda ve nonfamiliyal olarak görülmekte iken; *GATA2*, *SAMD9* ve *SAMD9L* genindeki mutasyonlar sonucunda hastalık çocukluk veya genç yetişkinlik döneminde beklenmektedir (19).

Yetişkinlik döneminde daha sık karşılaşılan familiyal MDS hastalığı *DDX41* germline mutasyonu sonucu ortaya çıkar. İlerleyen yaşla birlikte germline *DDX41* mutasyonuna eşlik eden normal allele kazanılan mutasyon veya miyeloid kanser ilişkili diğer genlerde meydana gelen mutasyon sonucunda MDS patogenezi oluşur ve 70 yaş civarında klinik tablo görülür (28). *DDX41* geninin hem germline hem somatik mutasyonları MDS’de görülebilir. *RUNX1* ailesel trombosit hastalığı ile ilişkili miyeloid neoplazi, *GATA2* kemik iliği yetmezliği ve immun yetmezlikle ilişkili ve *ETV6* trombositopeni ilişkili klinik göstererek MDS’ye ailesel yatkınlık sendromu oluşturur. Bu durumların dışında kemik iliği yetmezliği sendromlarında (Fanconi anemisi, Diamond-Blackfan anemisi, konjenital nötropeni, Shwachman-Diamond Sendromu) ve bazı solid tümör kanserlerinde (Hereditör meme-over kanseri, Li-Fraumeni sendromu, DNA tamir bozuklukları ve Rasopatiler) MDS’ye genetik yatkınlık görülebilir.

Germline yatkınlık sendromları genellikle DNA hasar tamiri veya telomer ilişkili genlerdeki mutasyonlar kaynaklıdır. Uluslararası MDS kılavuzları germline yatkınlık testini aşağıdaki durumlarda önermektedir (4):

- <50 yaş
- Aile öyküsü
- >2 birinci derece akrabada hastalık
- Genetik yatkınlık sendromlarını düşündüren klinik şüphe varlığı
- Aynı hastada çoklu kanser varlığı
- Monozomi 7
- Somatik mutasyon analizinde VAF’ın %30-50 oranında görülmesi (Germline mutasyonu düşündüren moleküler kriter)
- Hiposelüler MDS
- Yeni tanı aplastik anemi

3.GEREÇ VE YÖNTEM

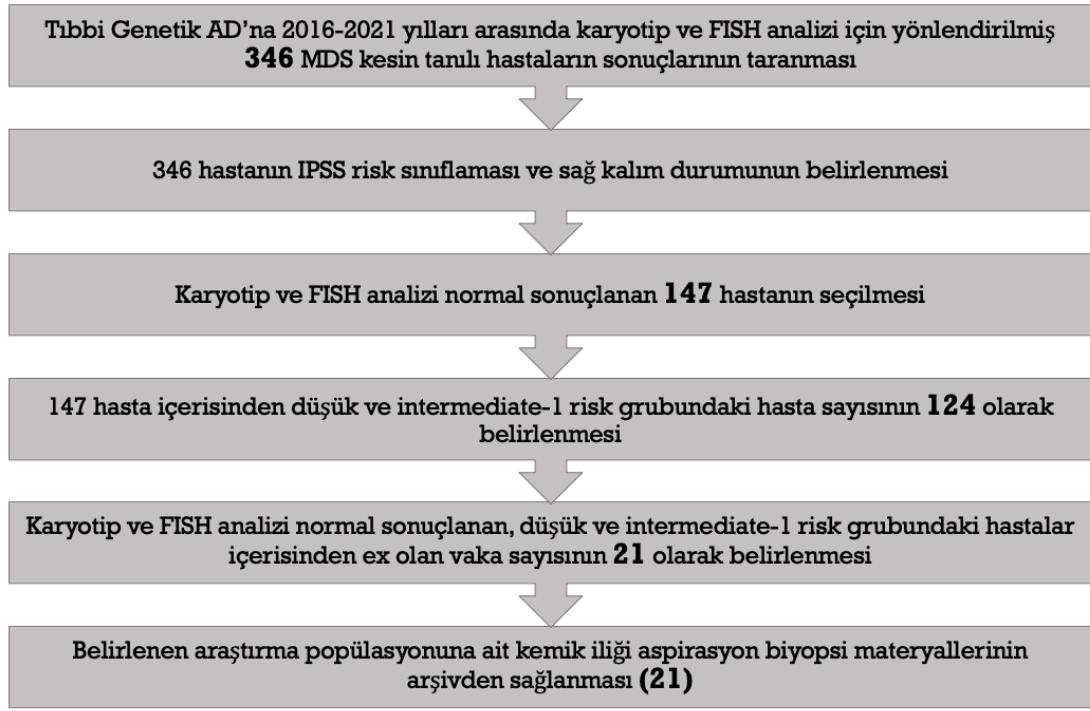
3.1 Örneklerin seçimi

Çalışmaya dahil edilen hastaların (Örneklem seçimi Şekil 4'teki basamaklara uygun olarak yapılmıştır. Kemik iliği aspirasyon biyopsi örnekleri, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinden elde edilmiştir.

Çalışma için Ege Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır. (Onay kararı: 22-6.1T/67, ektedir.) Çalışmamız; Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Genel Müdürlüğü tarafından TS-GAP-2022-24188 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

Çalışmaya dahil edilecek hastaların seçim basamakları aşağıda özetlenmiştir:

- 1) Tıbbi Genetik Anabilim Dalına 2016-2021 yılları arasında kemik iliği örneğinden karyotip ve FISH analizi için yönlendirilen patolojik olarak miyelodisplastik sendrom tanısı doğrulanmış 346 hastanın sonuçları ile retrospektif taranması
- 2) Tüm hastaların IPSS risk sınıflaması yapılması ve hastaların güncel sağ kalım durumlarının öğrenilmesi
- 3) Karyotip ve FISH analizi sonuçları normal saptanan 147 hasta içerisinde düşük risk ve orta derece-1 risk grubundaki hasta sayısının (124) belirlenmesi
- 4) Düşük risk ve orta derece-1 risk grubundaki hastalar içerisinde ex olan hastaların (21) belirlenmesi
- 5) Ex olan hastalara ait kemik iliği aspirasyon örneklerinden elde edilen lam yaymalarının patolog tarafından değerlendirilerek yeterli hücre sayısına sahip olan (21) örneklerin seçilmesi



Şekil 4. Örneklem seçim basamakları

3.2 Genetik inceleme

Örnek sayısı 21 olarak belirlendikten sonra genetik inceleme için seçilen örnekler, lamdan kazanmıştır ve DNA izolasyonu yapılmıştır. Çalışmanın daha önce uygulanan kemik iliği aspirasyon örneklerinden seçilerek yapılması ve örneklerin uzun süredir arşivde beklemesi nedeniyle, RNA bazlı çalışma planlanamamıştır. Bu nedenle çalışmada ekspresyon seviyeleri veya gen füzyonları değerlendirilememiştir.

Çalışma kapsamında kullanılan ONCO/Reveal Myeloid panel içeriği, 58 gendeki (18 gen-tüm kodlayan bölgeler ve 40 gen- mutasyon hotspot bölgeleri) toplam 766 bölgeyi hedeflemektedir. Tek nükleotit varyasyonları (SNV) ve küçük insersiyon-delesyon (indel) analizlerinin dışında Internal tandem duplikasyonlarını (ITD) da tespit edilebilecektir. Panel içeriği Tablo 10'da detaylı olarak verilmiştir.

Tablo 10. Panel içeriği

<i>ABL1</i>	<i>ANKRD6</i>	<i>ASXL1</i>	<i>ATRX</i>	<i>BCOR*</i>	<i>BCORL1*</i>	<i>BRAF</i>	<i>CALR</i>	<i>CBL</i>	<i>CBLB</i>
<i>CBLC</i>	<i>CDKN2A*</i>	<i>CEBPA</i>	<i>CSF3R</i>	<i>CUX1</i>	<i>DDX41</i>	<i>DNMT3A*</i>	<i>ETNK1</i>	<i>ETV6*</i>	<i>EZH2*</i>
<i>FLT3</i>	<i>GATA1</i>	<i>GATA2*</i>	<i>GNAS</i>	<i>HRAS</i>	<i>IDH1</i>	<i>IDH2</i>	<i>IKZF1*</i>	<i>JAK2</i>	<i>JAK3</i>
<i>KDM6A*</i>	<i>KIT</i>	<i>KMT2A</i>	<i>KRAS</i>	<i>MPL</i>	<i>NF1</i>	<i>NPM1</i>	<i>NRAS</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>PHF6*</i>
<i>PIGA*</i>	<i>PPM1D</i>	<i>PTEN</i>	<i>PTPN11</i>	<i>RAD21*</i>	<i>RUNX1*</i>	<i>SETBP1</i>	<i>SF3B1</i>	<i>SMC1A</i>	<i>SMC3</i>
<i>SRSF2</i>	<i>STAG1</i>	<i>STAG2*</i>	<i>TET2*</i>	<i>TP53*</i>	<i>U2AF1</i>	<i>WT1</i>	<i>ZRSR2*</i>		
Panel; * İşaretli genlerin tüm kodlayıcı dizilerini kapsamaktadır.									

3.2.1 DNA izolasyon aşaması

Kemik iliği aspirasyon biyopsi örneklerinden çalışılan hücre bloklarından 10 µm kalınlığında 4 kesit alınmış şekliyle tarafımıza teslim edildi. Örnekler 24-48 saat ksilende bekletildikten sonra lameller ayrılarak, lamlarda bulunan materyal kazındı ve uygun tüpe alındı.

DNA izolasyonu için Qiagen DNeasy Blood Tissue Kit ile çalışıldı. Bu çalışmada “hayvan dokularından total DNA purifikasyonu” (Protocol: Purification of Total DNA from Animal Tissues) protokolü kullanılmıştır. Protokol aşamaları aşağıda anlatılmıştır.

1. DNA kaynağı olan lamlar kazınarak 1.5 ml mikrosantrifüj tüplerine alındı
2. Uygun şekilde etiketleme yapıldı.
3. 1200 µl ksilen ilave edilerek yüksek hızda vortekslendi
4. Oda sıcaklığında en yüksek ayarda 5 dakika boyunca santrifüj edildi
5. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı
6. Pellet üzerine 1200 µl etanol eklenerek tekrar nazıkçe vortekslendi
7. Tekrar oda sıcaklığında en yüksek ayarda 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı
8. Adım 5-7 yeniden uygulandı
9. Tüpün kapağı açıldı ve etanolün buharlaşması için 37 °C’da 10-15 dakika inkübe edildi
10. Üzerine 180 µl ATL Buffer eklendi
11. 20 µl Proteinaz K ilave edilerek vorteksleme işlemi yapıldı
12. Lizisi optimal hale getirmek için 56 derecede doku tamamen lizise uğrayıncaya dek termomikserde inkübe edildi (ortalama 1-3 saat)
13. 15 sn vortekslendi
14. 200 µl Buffer AL eklenerek hızlıca vortekslendi
15. 200 µl %90-100 etanol eklendi ve tekrar hızlıca vorteksleme yapıldı

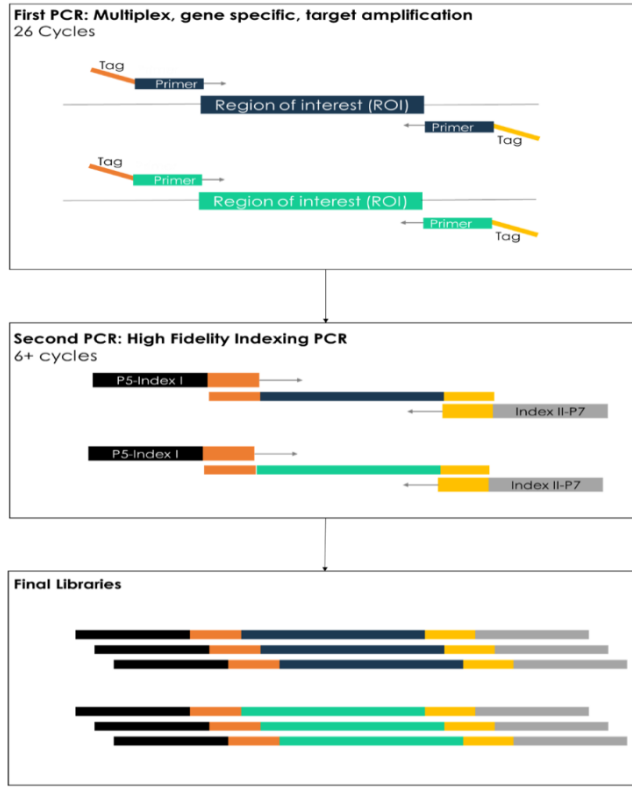
16. Elde edilen karışımdan pipetajla 2 ml toplama tüpünün içine konulan DNeasy Mini spin column içerisine alındı
17. Bir dakika santrifüj edildi ($\geq 6000 \times g$ (8000 rpm))
18. DNeasy Mini spin column yeni bir 2 ml toplama tüpüne alındı
19. 500 μ l Buffer AW1 ilave edildi ve bir dakika santrifüj edildi ($\geq 6000 \times g$ (8000 rpm))
20. DNeasy Mini spin column yeni bir 2 ml toplama tüpüne alındı
21. 500 μ l Buffer AW2 eklendi ve tekrar üç dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildi (20,000 $\times g$ (14,000 rpm))
22. DNeasy Mini spin column yeni bir 1.5-2 ml kadarlık mikrosantrifüj tüpüne alındıktan sonra 200 μ l Buffer AE eklendi ve 1 dakika inkübe edildi
23. $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) hızında 1 dakika santrifüj edildi
24. Elde edilen DNA örneği konsantrasyon ölçme işlemi yapıldıktan sonra -20°C 'de saklandı

3.2.2 DNA konsantrasyon ölçümü

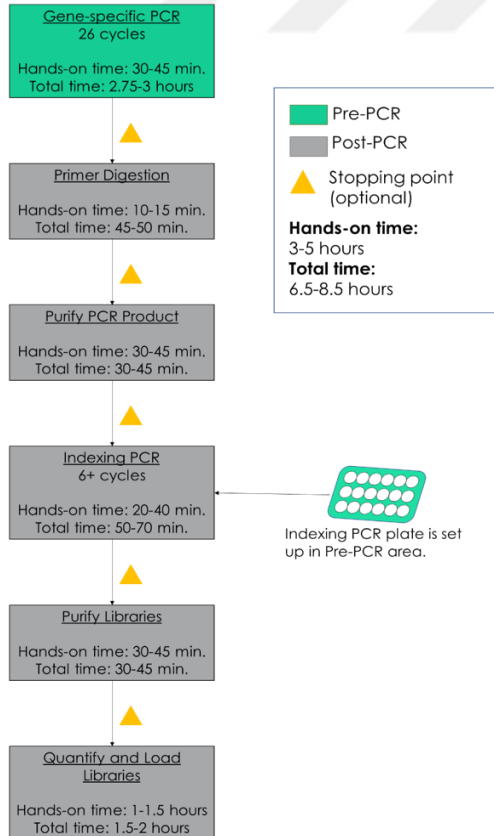
Elde edilen izolasyon örneğinden 1 μ l alınarak nanodrop spektrofotometre (Thermo Scientific) ile ölçüm yapılmıştır.

3.2.3 Yeni nesil dizileme (Kütüphane hazırlık aşaması ve dizileme işlemi)

Çalışmada kullanılan kitin (ONCO/Reveal Myeloid panel kiti) protokolüne bağlı kalınarak kütüphane hazırlık aşaması ve dizileme işlemi basamakları gerçekleştirilmiştir. Kütüphane hazırlık aşaması (Şekil 5) ve panel iş akış şeması (Şekil 6) şekil olarak gösterilmiştir. Ayrıca yeni nesil dizileme basamakları aşağıda detaylı şekilde anlatılmıştır.



Şekil 5. Kütüphane hazırlık aşaması



Şekil 6. Panel iş akış şeması

Basamak 1: Gene özgü PCR – Hedeflenmiş genomik DNA’ların amplifiye edilmesi

1. PCR master miksi Tablo 11’e göre hazırlandı. Kullanmadan önce her malzeme vortekslendi.

Tablo 11. Reaktifler ve gerekli volümler

<i>Malzeme</i>	<i>Volüm (µL)</i>
Gen spesifik PCR master miksi	12.5
Myeloid oligo havuzu	7.00
GC Rescue G	1.25
Toplam	20.75

2. Hazırlanan 20.75 µL master miksi PCR tüplerine transfer edildi.
3. İnpıt DNA’nın dilüe edilmesi: Genomik DNA’nın final volümü 4.25 µL olacak şekilde nükleaz-free su ile dilüe edildi. Önerilen input DNA aralığı 20-60 ng’dır. Dilüe edilmiş DNA her bir örnek için hazırlanmış PCR master miksine eklendi.

Tablo 12. Dilüsyon için gerekli reaktifler ve volümler

<i>Malzeme</i>	<i>Volüm (µL)</i>
PCR master miksi	20.75
Dilüe DNA	4.25
Toplam	25

4. 10-15 sn vorteksleme işlemi yapıldı.
5. PCR tüpü alt üst edildi ve hava kabarcığı kalmaması sağlandı.
6. Tablo 13’e göre PCR işlemi uygulandı.

Tablo 13. PCR döngüsü

<i>Basamak</i>	<i>Sıcaklık (°C)</i>	<i>Zaman</i>	<i>Döngü</i>
1	95	15 dk	1
2	98 72	1 dk 1 dk	3
3	98 58 60 64 72	1 dk 2 dk 4 dk 1 dk 1 dk	5
4	95 66	30 sn 3 dk	18
5	8	Bekleme	1

Basamak 2: Gene özgü primer parçalama

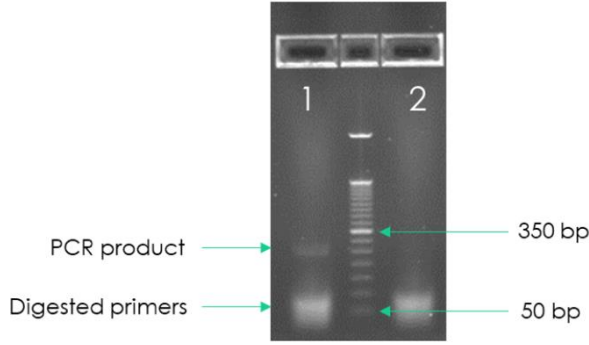
1. Her örnek için 5 µL dilüe edilmiş ekzonükleaz kullanıldı.
 - a. Exonuclease 1 ile 10x Exonuclease 1 buffer ile pipetaj ile karıştırılarak dilüe ekzonükleaz elde edildi ve buzun üstüne yerleştirildi.
2. Diüle edilmiş nükleaz 5 µL her bir örneğe ilave edildi ve miks karıştırıldı.
3. Orta derecede 5-10 saniye vortekslendi.
4. Gene özgü primer parçalama için Tablo 14'te belirtilen protokol izlendi.

Tablo 14. Gene özgü primer parçalama protokolü

<i>Basamak</i>	<i>Sıcaklık (°C)</i>	<i>Zaman</i>	<i>Döngü</i>
1	37	20 dk	1
2	80	10 dk	1
3	8	Bekleme	1

Basamak 3: Gene özgü PCR ve primer parçalama işleminden sonra jel görüntüleme

Gene özgü PCR ve primer parçalama işleminden sonra genomik DNA örnekleri %2 agaroz jelde yürütüldü.



Şekil 7. PCR materyalinin jel analizi. (Hat 1 genomik DNA örnekleri ve gen spesifik PCR ve ekzo digesyon sonrası ürünleri-Hat 2 kontrol ürünleri)

Basamak 4: Gene özgü PCR ürünlerinin pürifikasyonu

1. AMPure XP beads iyice vortekslenerek süspansiyon haline getirildi.
2. Örnekler 20 μ L veya final volüm 50 μ L'ye tamamlanacak şekilde nükleaz free su eklendi.
3. Her örnek için 60 μ L (reaksiyon 50 μ L değil ise 1.2x beads) AMPure XP eklendi ve homojenize etmek için iyice vortekslendi.
4. Oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi.
5. Tüp kısa süre alt üst edildi.
6. Tüpler magnet üzerine yerleştirilip 5 dk beklendi veya solüsyon berrak hale gelene kadar beklendi.
7. Süpernatant dikkatli bir şekilde kaldırıldı.

8. Magnet üzerindeki tüpler alındı. %70'lik etanol ile 50 mL solüsyon (35 mL etanol ve 15 mL su) taze olarak hazırlandı. Tüpler yeni hazırlanan etanol solüsyonu ile iki kez yıkandı, her iki yıkamada 150 µL etanol kullanıldı ve oda sıcaklığında 30 sn beklenerek süpernatant atıldı.
9. Etanolün uzaklaştırılması için örnekler santrifüjde 10-15 sn döndürüldükten sonra tekrar magnete alındı. Ardından kalan solüsyon pipet yardımıyla uzaklaştırıldı ve kapak açık kalacak şekilde oda sıcaklığında 2-5 dk kurumaya bırakıldı.
10. Örnekler magnet üzerinden kaldırıldı ve her bir örneğe 32 µL nükleaz free su eklenerek süspansiyon haline getirildi.
11. Örnekler oda sıcaklığında 5 dk bekletilerek veya solüsyon berrak hale gelene kadar magnet üzerine yerleştirildi.

Basamak 5: Kütüphane amplifikasyonu ve PCR indeksleme

1. İndeks primer hazırlanımı Tablo 15'e göre yapıldı. Her bir indeks reaksiyonu için her birinden 4 µL olmak üzere forward ve reverse primerler eklendi.

Tablo 15. İndeks primer için gerekli reaktif ve volümleri

<i>Malzeme</i>	<i>Volüm (µL)</i>
Pi700 Pillar Index	4.0
Pi500 Pillar Index	4.0
Toplam	8.0

2. Master miks hazırlanımı: Kullanmadan önce PCR master miksi vortekslenip alt üst edildi. PCR master miksin hazırlanması için gerekli olan malzemeler Tablo 16'da belirtilmiştir. Her bir örnek için 36 µL master miks PCR tüpüne yerleştirilmiştir.

Tablo 16. Master miks için gerekli reaktif volümleri

<i>Malzeme</i>	<i>Volüm (µL)</i>
Indexing PCR Master Mix (2x)	25.0
GC Rescue D	5.0
Nuclease-free water	6.0
Toplam	8.0

3. Hazırlanan master miks 1. Maddede hazırlanan indeks primere eklendi.

Tablo 17. İndeks primerlere master miksın eklenmesi için gerekli volümler

<i>Malzeme</i>	<i>Volüm (µL)</i>
Pi500 and Pi700 Indices	8.0
Master Mix	36.0
Toplam	44.0

4. Ortaya çıkan karışıma pürifiye edilmiş gene özgü PCR ürünü eklendi.

Tablo 18. İndeksleme için gerekli reaktifler

<i>Malzeme</i>	<i>Volüm (µL)</i>
İndeksler ve PCR Master Miks	44.0
Gene özgü PCR ürünü	6.0
Toplam	50.0

5. Reaksiyon ürünleri orta ayarda 5-10 sn vortekslendi. Tüp alt üst edilerek solüsyon içerisinde hava kabarcığı kalmaması sağlandı.
6. Tablo 19’da belirtilen derece ve sürelerle uygun olacak şekilde PCR işlemi uygulandı.

Tablo 19. Kütüphane amplifikasyon PCR protokolü

<i>Basamak</i>	<i>Sıcaklık (°C)</i>	<i>Zaman</i>	<i>Döngü</i>
1	95	2 dk	1
2	95 66 72	30 sn 30 sn 60 sn	6
3	72	5 dk	1
4	8	Beklem e	1

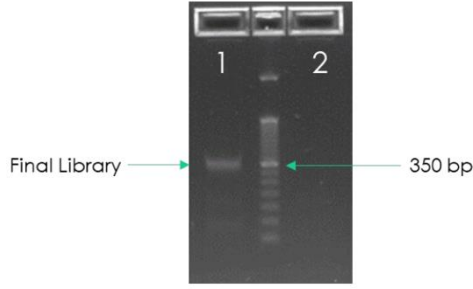
Basamak 6: Kütüphane pürifikasyonu

1. AMPure XP beads iyice vortekslenerek süspansiyon haline getirildi.
2. Her örnek için 50 µL (reaksiyon 50 µL değil ise 1.0x beads) AMPure XP eklendi. Homojenize etmek için iyice vortekslendi.
3. Oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi ve tüp kısa süre alt üst edildi.
4. Tüpler magnet üzerine yerleştirilerek 5 dk beklendi ve pelletin tamamen çökmesi beklendi
5. Alttaki pellet kaldırılmadan süpernatant pipet ile atıldı.
6. Magnet üzerindeki tüpler %70'lik etanol ile iki kez yıkandı, her yıkamada 150 µL etanol kullanıldı ve oda sıcaklığında 30 sn beklenecek süpernatant atıldı.
7. Kalan etanolü uzaklaştırmak için örnekler santrifüjde 10-15 sn döndürüldü ve kalan solüsyon pipet yardımıyla uzaklaştırıldı.
8. Örnekler 2-5 dk kurumaya bırakıldıktan sonra magnet üzerinden kaldırıldı ve her bir örneğe 32 µL nükleaz free su eklenerek süspansiyon haline getirildi.
9. Örnekler oda sıcaklığında 5 dk veya solüsyon berrak hale gelene kadar bekletildi.

10. Örnekler magnetten alındı ve şeffaflaşan solüsyondan 30 µL yeni PCR tüpüne alınarak final kütüphanesi oluşturuldu.

Basamak 7: Final kütüphane görüntüsü

Pürifikasyon sonrası final kütüphanesi örneği %2 agaroz jelde yürütüldü.



Şekil 8. Final kütüphane materyalinin jel görüntüsü. (Hat 1 genomik DNA örneklerinin indekisleme ve temizleme sonrası ürünleri-Hat 2 kontrol ürünleri)

Basamak 8: Pürifiye edilmiş kütüphanenin Qubit kantifikasyonu

1. Qubit dsDNA HS reaktifi 1/200 oranında Qubit dsDNA HS buffer ile dilüe edildi ve vortekslendi. Qubit çalışma solüsyonu hazırlanmış oldu. (21 hasta örneği ve 2 standart için 4600 µL solüsyon; 23 µL Qubit dsDNA HS reaktifi, 4577 dsDNA HS buffer kullanıldı)
2. Standartlar ve örnekler için 0.5 mL Qubit tüpleri ayarlanarak etiketleme yapıldı.
3. Standart 1 ve Standart 2 olmak üzere her iki tüpün içine 190 µL Qubit çalışma solüsyonu transfer edildi ve ardından ilgili tüpe her bir standart için 10 µL eklendi.
4. Örnekler için hazırlanan tüplere; tüp başına 198 µL Qubit çalışma solüsyonu ve ardından 2 µL örnek eklendi. (1/100 oranında dilüsyon yapıldı)
5. Tüpler vortekslendi ve alt üst edildi.
6. Oda sıcaklığında 2 dakika tüpler bekletildi.
7. Konsantrasyon ölçümü Qubit 2.0 Fluorometer ile Qubit kullanıcı kılavuzuna göre yapıldı.

Basamak 9: Normalizasyon, pool oluşturma ve sekanslama

1. 5 nM olacak şekilde kütüphane normalizasyonu yapılmıştır.
2. Eşmolar konsantrasyona sahip olan poolar oluşturulmasına dikkat edilmiştir.
3. Sekanslama için NextSeq cihazı kullanılmıştır. Kütüphane örnekleri 5 nM'e göre dilüe edildi. Dizileme için kütüphanenin final konsantrasyonu 1.8 pM olacak şekilde ayarlandı. Yükleme protokolü aşağıda anlatılmıştır.
 - a. 0.2 N NaOH hazırlamak için yeni bir 1.5 mL mikrotüp etiketlendi. 800 µL nükleaz free su ile 200 µL 1 N NaOH birleştirildi. Solüsyonun karışması için vorteksleme yapıldı.
 - b. Kütüphane miksinin denatürasyonu: Denatüre 25 pM kütüphane karışımı için yeni mikrotüp etiketlendi.
 - i. 5 µL kütüphane karışımı ve 5 µL taze hazırlanmış 0,2 N NaOH birleştirilerek kütüphane karışımı denatüre edildi.
 - ii. 10 sn boyunca solüsyon vortekslendi ve ardından 1 dk santrifüj edildi.
 - iii. Solüsyon oda sıcaklığında 5 dk bekletildi.
 - iv. 5 µL 200mM Tris-HCL pH7.0 eklendi.
 - v. Hemen vortekslendi ve 1 dk santrifüj edildi.
 - vi. Denatüre edilmiş kütüphane miksine 985 µL Illumina's HT1 solüsyonu eklendi.
 - vii. Hemen vortekslendi ve 1 dk santrifüj edildi.
 - c. 25 pM kütüphane karışımı 1.8 pM olacak şekilde dilüe edildi.
 - d. Kütüphane karışımı ve PhiX kontrolü kombine edildi.
 - i. 1287 µL 1.8 pM kütüphane miksi ile 13 µL 1.8 pM PhiX kütüphane kontrolü birleştildi. Ardından hemen vortekslenip alt üst edilerek buz üstüne yerleştirildi.
 - e. Ortaya çıkan 1300 µL kütüphane miksi ve PhiX'i NextSeq kartuşuna yerleştirildi.

Basamak 10: Datanın analizi

Elde edilen datadan, önce demultipleksing işlemi yapıldıktan sonra FASTQ dosyası oluşturulmuştur. FASTQ dosyaları PiVAT data analysis programı ile işlenerek veriler filtreleme basamaklarına ve varyant çağırmaya hazır duruma gelmiştir.

3.3 Verilerin analizi

Analiz aşamasında belirlenen filtreleme kriterleri kullanılarak varyant çağırma yapılmıştır. Filtreleme kriterleri; varyant allel frekansı (VAF), minör allel frekansı (MAF), total allelin okuma sayısı, mutant allelin okuma sayısı ve varyant etkisine bağlı sonuç değişkenleri olarak belirlenmiştir. Belirlenen kriterler Tablo 20’de özetlenmiştir. Filtreleme basamağından sonra kalan varyantlar Moleküler Patoloji Derneği (Association for Molecular Pathology, AMP) ve Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Koleji (American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG) önerilerine göre Tier, I-II-III-IV olarak sınıflandırılmış ve Tier 1 ve Tier 2 varyantlar değerlendirmeye alınmıştır. Ayrıca varyantların değerlendirilmesinde OncoKB, Cosmic ve Franklin veritabanları kullanılmıştır. Saptanan mutasyonlarla ilgili değerlendirme ve yorum yaparken VAF oranlarına göre gruplara ayrılmış şekilde incelenmiştir. Hastalardaki varyant listesi %2-5 arası, %5-%10 arası, %10-20 arası ve %20 üstü olarak gruplandırılmıştır. Çıkan varyasyonlar ve hasta başına düşen mutasyon sayıları ayrı ayrı değerlendirilerek, hastalar için düşük-yüksek risk ayırımındaki rolü aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Sonuçlar; hastaların klinik verileri ile IPSS-M risk skorlama programına girilerek yeni risk grupları belirlenmiştir. Yeni risk gruplarına göre beklenen sağ kalımları ile hastaların yaşam süreleri istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Blast oranı ve belirli VAF oranlarındaki mutasyon sayıları arasındaki ilişki istatistiki anlamda incelenmiştir.

Tablo 20. Filtreleme kriterleri

Değişken	Değer
Varyant Allel Fraksiyonu (VAF)	≥ 0.02
Minör Allel Frekansı (MAF)	≤ 0.01
Mutant Allel Okuma sayısı	≥ 5
Total Allel Okuma Sayısı	≥ 20
Sonuç	Kodlayıcı bölge varyantı Uzatici/ Sonlandırıcı Çerçeve kaydırıcı İnframe del-dup Prematür terminal kodon Missense varyant Splice alıcı/verici varyantlar Başlama kaybı (Start loss) Sonlanma kaybı (Stop loss) Sonlanma kazancı (Stop gain)

3.4 İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler için IBM SPSS V25 programı kullanılmıştır. Hastaların yeni belirlenen IPSS-M risk gruplarının literatürde verilen beklenen sağ kalım oranları ile gerçek sağ kalımları arasında Wilcoxon işaretli sıralar testi kullanılarak karşılaştırma yapılmıştır. Blast oranı (%0-2, %2-5, %5-10) ile belirlenen VAF oranları arasındaki mutasyon sayısının ilişkisini değerlendirmek için Kruskal-Wallis Testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Çalışma Grubunun Verileri

Hasta popülasyonunun yaş ortalaması 73,57 (55-96) olarak hesaplanmıştır. Varyantlar değerlendirilirken filtreleme parametreleri kapsamında VAF için farklı alt sınır değerleri kullanılarak gruplama yapılmıştır. VAF için sınır değerler %2, %5, %10 ve %20 üstü olarak hesaplanmıştır. Bu değerlendirmeye göre VAF %2 ve %5 üstünde her iki grup için 21 hasta içerisinde 20 hastada (%95), VAF %10 ve üstünde 13 hastada (%62), VAF %20 ve üstünde ise 10 hastada (%48) anlamlı varyant bulunmuştur. Hasta grubunun cinsiyet dağılımı 12 erkek (%57) ve 9 kadın (%43) şeklindedir. Hastalara ait kemik iliği aspirasyon örneklerinden elde edilen DNA konsantrasyonu minimum 25 ng/uL ve maximum 52 ng/uL'dir. Ortalama konsantrasyon değeri ise 42 ng/uL olarak hesaplanmıştır. Hastaların tanı gruplarına bakıldığında; 9 hasta MDS multilineage displazi, 5 hasta MDS refrakter anemi, 3 hasta MDS artmış blastlı 1, 2 hasta MDS/MPN, 1 hasta MDS artmış blastlı birikimi tip 2 ve 1 hasta MDS ring sideroblast alt tipindedir. Hastalara ait veriler Tablo 21'de özetlenmiştir.

Hastalara ait IPSS risk grubu, tanı sonrası yaşam süresi, IPSS-M yeni risk grubu ve IPSS-M risk grubuna göre beklenen genel sağ kalım süreleri Tablo 22'de özetlenmiştir. Hastaların analiz sonrası gerçekleşen risk grubu değişikliklerinden Tablo 23'te bahsedilmiştir. Ayrıca hastalarda VAF'a göre saptanan mutasyon sayıları, hastaların tanı anındaki blast yüzdeleri ve AML dönüşümünün gerçekleşip gerçekleşmediği bilgileri de Tablo 24'te sunulmuştur.

Tablo 21. Hasta popülasyon verileri

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	MDS Tanı Sınıflandırması	Elde edilen DNA miktarı (ng/μL)
1	E	67	MDS Refrakter Anemi	42
2	E	63	MDS Multilineage Displazi	47
3	K	87	MDS Multilineage Displazi	40
4	K	55	MDS Multilineage Displazi	45
5	K	81	MDS Multilineage Displazi	48
6	K	57	MDS Multilineage Displazi	45
7	E	77	MDS Multilineage Displazi	38
8	K	78	MDS Multilineage Displazi	43
9	E	61	MDS Artmış Blastlı -1	34
10	E	83	MDS Ring Sideroblast	38
11	E	78	MDS Artmış Blastlı -2	38
12	K	78	MDS Artmış Blastlı -1	47
13	E	60	MDS Artmış Blastlı -1	48
14	K	77	MDS / Myeloproliferatif displazi	35
15	E	61	MDS Multilineage Displazi	47
16	E	66	MDS Refrakter Anemi	44
17	K	96	MDS Refrakter Anemi	43
18	E	77	MDS Multilineage Displazi	43
19	E	83	MDS / Myeloproliferatif displazi	52
20	K	83	MDS Refrakter Anemi	42
21	E	77	MDS Refrakter Anemi	25

Tablo 22. Hasta popülasyonunun IPSS ve IPSS-M risk grupları

HASTA NO	IPSS RİSK GRUBU	TANI SONRASI YAŞAM SÜRESİ	IPSS-M RİSK GRUBU (YENİ)	IPSS-M RİSK GRUBUNA GÖRE BEKLENEN GENEL SAĞ KALIM
1	Düşük Risk	8 Ay	Yüksek	1.7 Yıl (20.4 Ay)
2	İntermediate-1	13 Ay	Çok Yüksek	1 Yıl (12 Ay)
3	İntermediate-1	4 Ay	Çok Düşük	10.6 Yıl (127.2 Ay)
4	Düşük Risk	21 Ay	Yüksek	1.7 Yıl
5	İntermediate-1	29 Ay	Çok Yüksek	1 Yıl
6	Düşük Risk	5 Ay	Düşük	6 Yıl (72 Ay)
7	İntermediate-1	4 Ay	Çok Yüksek	1 Yıl
8	İntermediate-1	14 Ay	Orta-Yüksek	2.8 Yıl (33.6 Ay)
9	İntermediate-1	6 Ay	Çok Yüksek	1 Yıl
10	İntermediate-1	56 Ay	Orta-Düşük	4.6 Yıl (55.2)
11	İntermediate-1	6 Ay	Çok Yüksek	1 Yıl
12	İntermediate-1	4 Ay	Çok Yüksek	1 Yıl
13	İntermediate-1	15 Ay	Çok Yüksek	1 Yıl
14	İntermediate-1	9 Ay	Düşük	6 Yıl
15	İntermediate-1	10 Ay	Yüksek	1.7 Yıl
16	Düşük Risk	30 Ay	Orta-Yüksek	2.8 Yıl
17	Düşük Risk	17 Ay	Çok Yüksek	1 Yıl
18	İntermediate-1	1 Ay	Yüksek	1.7 Yıl
19	İntermediate-1	20 Ay	Orta-Düşük	4.6 Yıl
20	Düşük Risk	31 Ay	Çok Yüksek	1 Yıl
21	Düşük Risk	12 Ay	Yüksek	1.7 Yıl

Tablo 23: Hasta popülasyonun risk grubu değişimleri

IPSS-M YENİ RİSK GRUBU	IPSS RİSK GRUBU		
	DÜŞÜK	İNTERMEDİATE-1	TOTAL
ÇOK DÜŞÜK	0	1	1
DÜŞÜK	1	1	2
ORTA DÜŞÜK	0	2	2
ORTA YÜKSEK	1	1	2
YÜKSEK	3	2	5
ÇOK YÜKSEK	2	7	9
TOTAL	7	14	21

Tablo 24. Hasta popülasyonunda saptanan VAF oranına göre saptanan mutasyon sayıları, blast oranları ve AML dönüşüm bilgisi

HASTA NO	VAF $\geq$ %2 - < %5 Mutasyon sayısı	VAF $\geq$ %5 - < %10 Mutasyon sayısı	VAF $\geq$ %10 - < %20 Mutasyon sayısı	VAF $\geq$ %20 Mutasyon sayısı	BLAST ORANI	AML DÖNÜŞÜM
1	9	2	-	-	%1	Hayır
2	8	4	1	2	%3	Evet
3	-	-	-	-	%2	Hayır
4	10	3	-	-	%3	Hayır
5	14	3	-	-	%0	Hayır
6	-	1	1	-	%2	Hayır
7	12	2	-	-	<%1	Hayır
8	8	3	-	-	%0	Hayır
9	4	9	2	2	%6	Hayır
10	5	1	2	2	%1	Hayır
11	12	2	-	1	%10	Hayır
12	11	3	-	-	%7	Hayır
13	1	-	-	4	%5	Evet
14	2	-	1	-	%1	Hayır
15	6	3	1	3	%2	Hayır
16	5	5	1	2	%3	Hayır
17	10	1	-	-	%2	Hayır
18	4	2	1	2	%2	Hayır
19	2	1	-	2	<%1	Hayır
20	15	4	1	-	%2	Hayır
21	-	-	-	4	%2	Hayır

4.2 Genetik analiz sonuçları

Hasta popülasyonundaki genetik analiz sonrası belirlenen mutasyonlar VAF'a göre gruplandırılarak incelenmiştir. VAF %2 ve üstünde 21 hasta içerisinde 20 hastada (%95) toplam 222 mutasyon saptanmıştır. Mutasyonların hasta başına dağılımına bakıldığında 2 ile 20 arasında değişmektedir. VAF $\geq$ %5 kabul edildiğinde 21 hastadan 20 hastada saptanan toplam varyant sayısı 84 olarak bulunmuştur. Hasta başına düşen mutasyon sayısı 1-13 arasında değişmektedir. VAF %10 ve üstünde 13 hastada (%62) saptanan mutasyon sayısı 35'tir ve hasta başına mutasyon sayısı 1-4 arasındadır. VAF %20 ve üstünde ise 10 hastada (%48) toplam 24 adet anlamlı varyant bulunmuştur ve hasta başı dağılımları 1 ile 4 arasında hesaplanmıştır. Veriler Tablo 25'te özetlenmiştir. Hastaların klinik özelliklerinden bahsedilirken her hastada saptanan mutasyonlar; %2-5 arası, %5-%10 arası, %10-20 arası ve %20 üstü olacak şekilde listelenmiştir. En sık mutasyona uğrayan genler; VAF yüzdelere göre hasta sayısı ve mutasyon sayısı olarak Tablo 26'da belirtilmiştir. Ayrıca hastalar içerisinde WHO 2022 MDS sınıflandırmasında tanımlanan alt tip olan MDS-bi*TP53* kriterlerini taşıyan hastaların özellikleri Tablo 27'de detaylı olarak gösterilmiştir.

Çalışma hastalarının ortalama hedef bölge kapsayıcılığı 10x okumada %98,94'tür.

Tablo 25. VAF'a göre saptanan mutasyon verileri

VAF yüzdesi	Saptanan toplam mutasyon sayısı	Mutasyon saptanan hasta sayısı	Hasta başına düşen mutasyon dağılımı
$\geq$ %2	222	20 (%95)	2-20
$\geq$ %5	84	20 (%95)	1-13
$\geq$ %10	35	13 (%62)	1-4
$\geq$ %20	24	10 (%48)	1-4

Tablo 26. VAF oranlarına göre en sık mutasyona uğrayan genler

VAF $\geq$ %2			VAF $\geq$ %5			VAF $\geq$ %10			VAF $\geq$ %20		
Gen	Mutasyon sayısı	Hasta sayısı	Gen	Mutasyon sayısı	Hasta sayısı	Gen	Mutasyon sayısı	Hasta sayısı	Gen	Mutasyon sayısı	Hasta sayısı
<i>DNMT3A</i>	32	16	<i>DNMT3A</i>	10	9	<i>TET2</i>	6	5	<i>TET2</i>	4	3
<i>BCOR</i>	20	14	<i>TET2</i>	12	8	<i>STAG2</i>	4	4	<i>ASXL1</i>	2	2
<i>TET2</i>	37	14	<i>BCOR</i>	7	6	<i>ASXL1</i>	3	3	<i>BCOR</i>	2	2

Tablo 27. WHO-2022 MDS-bi*TP53* alt tipindeki hasta listesi

Hasta No	<i>TP53</i> mutasyon sayısı	<i>TP53</i> mutasyon VAF değerleri	Mevcut IPSS risk grubu	IPSS-M yeni risk grubu
5	3	%3-3-2	İntermediate-1	Çok yüksek
7	3	%2-4-2	İntermediate-1	Çok yüksek
9	4	%6-3-10-3	İntermediate-1	Çok yüksek
11	2	%3-2	İntermediate-1	Çok yüksek
20	6	%6-8-2-5-2-2	Düşük	Çok yüksek
21	2	%38-35	Düşük	Yüksek

Çalışma grubundaki hastalar içerisinde AML dönüşümü olan iki hastanın genetik bulguları aşağıdaki tabloda özetlemiştir. Daha sonraki kısımlarda bu hastalara genetik bulgular tartışılmıştır.

Tablo 28. AML dönüşümü gerçekleşen hastalarda saptanan mutasyonların gen dağılımı

VAF aralığı	Hasta 2	Hasta 13
%2-5	<i>TET2, EZH2, ASXL1, ZRSR2, DNMT3A, BCOR</i>	<i>SRSF2</i>
%5-10	<i>PPM1D, SRSF2, RUNX1, TET2</i>	-
%10-20	<i>TET2</i>	-
>%20	<i>IDH2</i> (%43)	<i>RUNX1</i> (%23) <i>ETV6</i> (%27) <i>U2AF1</i> (%34) <i>DNMT3A</i> (%37)

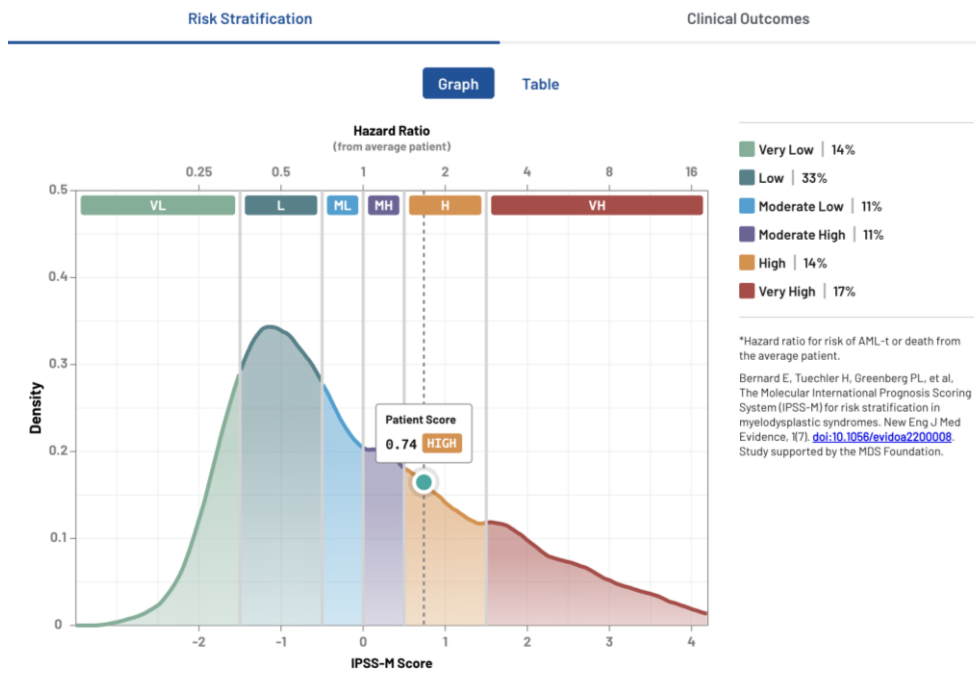
Çalışma grubumuzda; blast oranı yüksek (%5-10) olan hastalardan saptanan mutasyonların VAF değerlerine göre gen dağılımları aşağıdaki tabloda (Tablo 29) özetlenmiştir. Bu hastalara ait moleküler bulgular tartışma kısmında yorumlanmıştır.

Tablo 29. Blast oranı %5-10 arası olan hastalarda saptanan mutasyonların gen dağılımı

VAF aralığı	Hasta 9	Hasta 11	Hasta 12	Hasta 13
%2-5	<i>DNMT3A, TET2</i>	<i>RUNX1, DNMT3A, TP53, BCOR, PPM1D</i>	<i>SRSF2, RUNX1, TP53, DNMT3A, TET2, WT1, EZH2, ZRSR2, CEBPA</i>	<i>SRSF2</i>
%5-10	<i>DNMT3A, TP53, TET2, BCOR, KRAS, RUNX1, ASXL1, ZRSR2</i>	<i>PTPN11, EZH2</i>	<i>DNMT3, STAG2</i>	-
%10-20	<i>TP53, ASXL1</i>	-	-	-
>%20	<i>BCOR, STAG2</i>	<i>U2AF1</i>	-	<i>RUNX1, ETV6, U2AF1, DNMT3A</i>

HASTA 1: 67 yaşında, MDS tanısından 16 yıl önce kardiyomiyopati nedeni ile kalp transplantasyon öyküsü olan erkek hasta; eşlik eden pansitopeni nedeniyle araştırılmıştı. Hastanın hemogramında Hb:9,30 g/dL (11.7 – 16), WBC: $4.13 \times 10^3/\mu\text{L}$ (4.5 – 11), Trombosit: $137 \times 10^3/\mu\text{L}$ (150 – 400), Nötrofil: $2.73 \times 10^3/\mu\text{L}$ (2.02 - 7.46) olarak bulunmuştur. Periferik kan yaymasında trombosit ve lökosit normal iken; eritrositlerde hipokromi, poikilositoz, mikrositer ve anizositoz formasyonu görülmüştür. Hastanın kemik iliği aspirasyon biyopsisi sonucunda ise kemik iliği selülaritesi %15 olarak hesaplanmıştır ve hiposelüler olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca tüm serilere ve maturasyon aşamalarına ait hücreler azalmış, hemosiderin yüklü makrofajlarda artış dikkati çekmiştir. Aspirasyon yayma ve imprint preparatta granülositer seri elemanlarının bir kısmında hipersegmentasyon görülmüş, %10 lenfosit, %4-5 plazma hücresi, %1 blastik hücre izlenmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda hasta MDS refrakter anemi şeklinde sınıflandırılmıştır ve IPSS risk grubu düşük risk olarak sınıflandırılmıştır. Hastada yapılan genetik analizler sonucunda karyotip ve FISH sonuçları normal bulunmuştur. Hastaya eritropoetin tedavisi verilmiştir. Hastalığın seyri boyunca AML dönüşümü olmamıştır. Tanıdan yaklaşık 8 ay sonra hasta vefat etmiştir.

Hastanın tanı anında (2020 yılında) yapılan kemik iliği aspirasyon biyopsi örneği çalışmaya dahil edildi ve 42 ng/uL DNA edildi. Çalışmaya alınan örnek hedeflenen kalite skorlarına ulaştı. Yapılan filtrelemeler sonucunda hastada toplam 11 adet anlamlı varyant saptandı ve varyantların allel fraksiyonu %2 ve %5 arasında bulundu. Hastada bulunan mutasyonlar Tablo 30 ve 31’de listelenmiştir. Hastanın mevcut verileri ile elde edilen moleküler bulguların birleştirilmesi sonucu yapılan IPSS-M risk hesaplamasında hasta yüksek risk grubunda (IPSS-M skor: 0.74) değerlendirilmektedir (Şekil 9). Hasta bu risk grubunda değerlendirilseydi lösemisiz sağ kalım ortalama 1.5 yıl, genel sağ kalım ortalama 1.7 yıl ve 1 yılda AML dönüşüm riski %14.3 olarak beklenenecekti.



Şekil 9. Hasta 1-IPSS-M risk skoru

Tablo 30. Hasta 1- VAF: %2-5 Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>DNMT3A</i>	c.1258A>T p.K420*	525	%2	Tier 1
<i>TET2</i>	c.2862G>A p.W954*	368	%2	Tier 1
<i>STAG2</i>	c.775C>T p.R259*	307	%2	Tier 1
<i>DNMT3A</i>	c.2322+1G>A	393	%3	Tier 1
<i>DNMT3A</i>	c.709C>T p.Q237*	423	%3	Tier 1
<i>STAG2</i>	c.816del p.Glu273SerfsTer9	248	%3	Tier 1
<i>BCOR</i>	c.4173+1G>A	557	%3	Tier 1
<i>CBL</i>	c.1151G>A p.C384Y	229	%3	Tier 1
<i>CBL</i>	c.1142G>A p.C381Y	201	%3	Tier 1

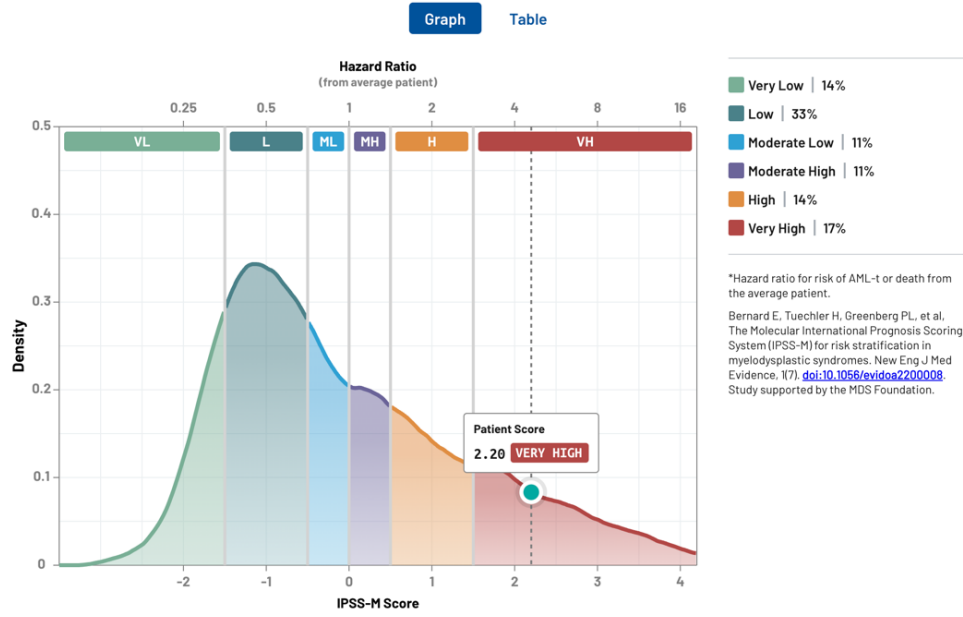
Tablo 31. Hasta 1- VAF ≥%5 - <%10 Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>EZH2</i>	c.1957C>T p.Q653*	127	%5	Tier 1
<i>ZRSR2</i>	c.316A>T p.K106*	120	%5	Tier 1

HASTA 2: 63 yaşında erkek hasta; 2016 yılında halsizlik ve ciltte yaygın solgunluk nedeni ile başvurusu sırasında yapılan tetkiklerde pansitopeni saptanması nedeni ile araştırılmış ve MDS tanısı almıştır. Yapılan tetkiklerinde hemogram sonuçları şu şekildedir: Hb:10,10 g/dL (11.7 – 16), WBC: 2.03 x10³/μL (4.5 – 11), Trombosit: 114 x10³/μL (150 – 400), Nötrofil: 0.86 x10³/μL (2.02-7.46). Kemik iliği aspirasyonunda ise her 3 seride displazi bulguları izlenmiştir. (Dismegakaryopoez: Mikromegakaryosit, Multipl sepere nukleus; Diseritropoez:

Nükleer düzensizlik, Anormal nükleer şekiller; Disgranülopoez:Hipo-agranülopoez) izlenmiştir. Ayrıca kemik iliği biyopsi ve hücre bloğu kesitinde selülerite %90 dolayında olup, %2-3 blastik hücre görülmüştür. Hastanın karyotip ve FISH sonuçları normal bulunmuştur. Hasta mevcut bulguları ile değerlendirildiğinde MDS multilineage displazi olarak sınıflandırılmıştır ve eritropoetin ile kortikosteroid tedavileri almıştır. IPSS risk grubu ise orta derece-1 olarak değerlendirilmiştir. Hastanın izlemi sırasında 1 yıl sonrasında halsizliğinin derinleşmesi ve transfüzyon ihtiyacının artması nedeni ile yapılan periferik yaymasında blast artışı (%25-30 blastik hücre) ve monositoz görülmüştür. Tekrar yapılan kemik iliği aspirasyon biyopsi akut myeloid lösemi ile uyumlu bulunmuş ve hastaya ARA-C+İda (7+3) tedavisi başlanarak allojenik KIT için hazırlık planlanmıştır. Hastanın eşlik eden Merkel hücreli karsinom tanısı da mevcuttur ve bu nedenle 2017 yılında sisplatin ve etoposid tedavisi almıştır. Hastanın 2018 yılında yapılan tüm vücut tomografisinde plevra ve akciğer, sol sürrenal, omental, bilateral inguinal ve karın duvarında yaygın metastazlar görülmüştür. Hastanın aynı dönemde 1 haftadır olan nefes darlığı, öksürük ve karın ağrısı nedeni ile onkolojiye başvurusu görülmektedir. Bu başvurusu sırasında hastanın genel durum kötülüğü mevcut metastazlara ve blast infiltrasyonlarına bağlanmıştır. Hasta yoğun bakım izlemi sırasında exitus olmuştur.

Hastanın MDS tanısı aldığı yıl olan 2016'da yapılan kemik iliği aspirasyon örneği çalışmaya dahil edildi ve DNA konsantrasyonu 42 ng/uL olarak tespit edildi. Çalışma kalite skorlarını geçtiği için belirlenen filtrelemeler yapıldı. Filtreleme sonucunda hastada toplam 15 anlamlı varyant tespit edildi. Hastada VAF %5 ve üstü 7 varyant, %10 ve üstü 3 varyant, %20 ve üstü 2 varyant bulundu. Ayrıca varyantlar VAF'a göre (%2-5, %5-10, %10-20 ve %20 üstü) gruplandırılarak değerlendirildi. Hastanın moleküler sonuçları ile IPSS-M risk skoru hesaplandığında yeni risk grubu çok yüksek risk (IPSS-M skor: 2.20) olarak bulundu. Hasta bu risk grubunda değerlendirilseydi lösemisiz sağ kalım ortalama 0.76 yıl, genel sağ kalım ortalama 1 yıl ve 1 yılda AML dönüşüm riski %28.2 olarak beklenenecekti.



Şekil 10. Hasta 2-IPSS-M risk skoru

Tablo 32. Hasta 2-VAF $\geq$ 2 - <%5 Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>TET2</i>	c.1342G>T p.E448*	670	%2	Tier 1
<i>EZH2</i>	c.484+2T>A	192	%3	Tier 1
<i>ASXL1</i>	c.1774C>T p.Q592*	1006	%3	Tier 1
<i>ZRSR2</i>	c.121+1G>A	177	%3	Tier 1
<i>DNMT3A</i>	c.2478+1G>A	233	%3	Tier 1
<i>BCOR</i>	c.426G>A p.W14*	784	%3	Tier 1
<i>TET2</i>	c.5134A>T p.R1712*	994	%3	Tier 1
<i>TET2</i>	c.3399C>A p.C1133*	159	%4	Tier 1

Tablo 33. Hasta 2-VAF $\geq$ %5 - <%10 Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>PPM1D</i>	c.1535del p.Asn512IlefsTer2	1517	%5	Tier 1
<i>SRSF2</i>	c.284C>A p.P95H	711	%5	Tier 1
<i>RUNX1</i>	c.806-1G>A	1965	%6	Tier 1
<i>TET2</i>	c.3359T>A p.L1120*	121	%9	Tier 1

Tablo 34. Hasta 2-VAF $\geq$ %10 - <%20 Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>TET2</i>	c.2644_2645insA p.C882*	524	%11	Tier 1

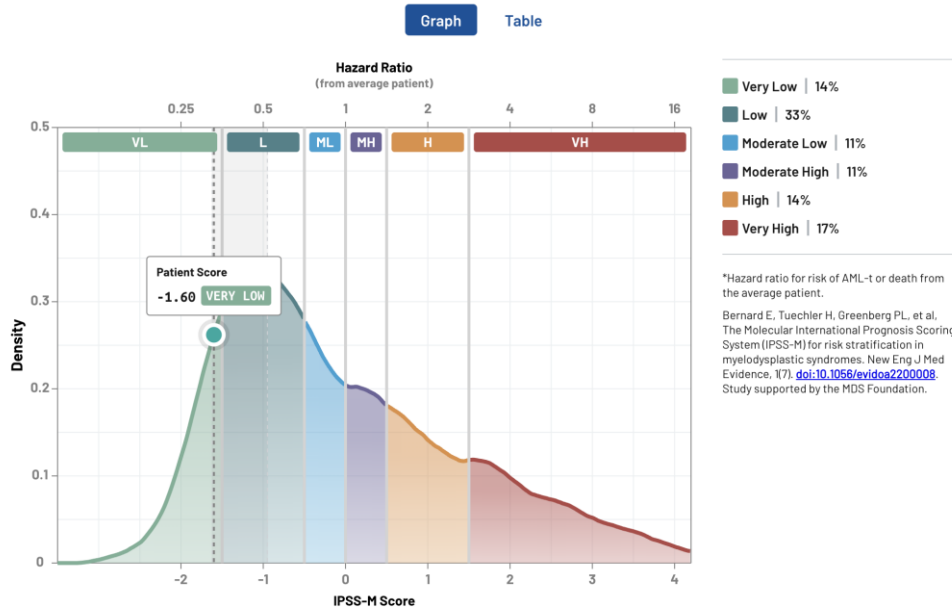
Tablo 35. Hasta 2-VAF %20 Ve Üstü Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>STAG2</i>	c.385+1dup	104	%28	Tier 1
<i>IDH2</i>	c..419G>A p.R140Q	874	%43	Tier 1

HASTA 3: 87 yaşında kadın hasta; Mart 2020’de nötropenik ateş nedeni ile yapılan periferik yaymasında blastik transformasyon şüphesi sonucunda kemik iliği aspirasyon biyopsisi yapılmıştır. Hastada eşlik eden komorbidite olarak aritmi bildirilmiştir. Hastanın hemogram sonuçları Hb:10,5 g/dL (11.7 – 16), WBC: $1.15 \times 10^3/\mu\text{L}$ (4.5 – 11), Trombosit: $291 \times 10^3/\mu\text{L}$ (150 – 400), Nötrofil: $0.26 \times 10^3/\mu\text{L}$ (2.02-7.46) şeklindedir. Periferik kan yaymasında lökopenik ve atipik hücreler ile; eritroid seride anizositoz, hedef hücre, poikilositoz, mikrositer ve normokrom formasyonu izlenmiştir. Kemik iliği aspirasyon biyopsisi sonucunda selülarite %70 olarak bulunmuş ve hiperselüler olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca granülositer seri hakimiyeti özellikle erken elemanlarında ve promyelositik hücrelerde

belirgin artış görülmüş, hafifçe azalmış oranlarda izlenen eritroid serinin bir kısmında diseritropoez, %5 lenfosit, %4 plazma hücresi, %2 blastik hücre görülmüştür. Hastaya ait karyotip ve FISH çalışmaları normal sonuçlanmıştır. Elde edilen veriler sonucunda hasta MDS multilineage displazi ve orta derece-1 risk grubu olarak sınıflandırılmıştır. Hasta destek tedavisi ile izlenmekte iken; Haziran 2020 yılında karın bölgesinde ekimotik alan nedeni ile olan karın ağrısı ve genel durum bozukluğu ile tekrar hastaneye başvurusu olmuştur. Batın ön duvar tomografisinde mevcut ekimotik bölge nekrotizan selülit olarak yorumlanmıştır. Yatışı süresinde de nötropenik ateş tablosu, inotrop ihtiyacı devam etmiştir fakat hasta yapılan tüm müdahalelere rağmen Temmuz 2020 yılında hayatını kaybetmiştir.

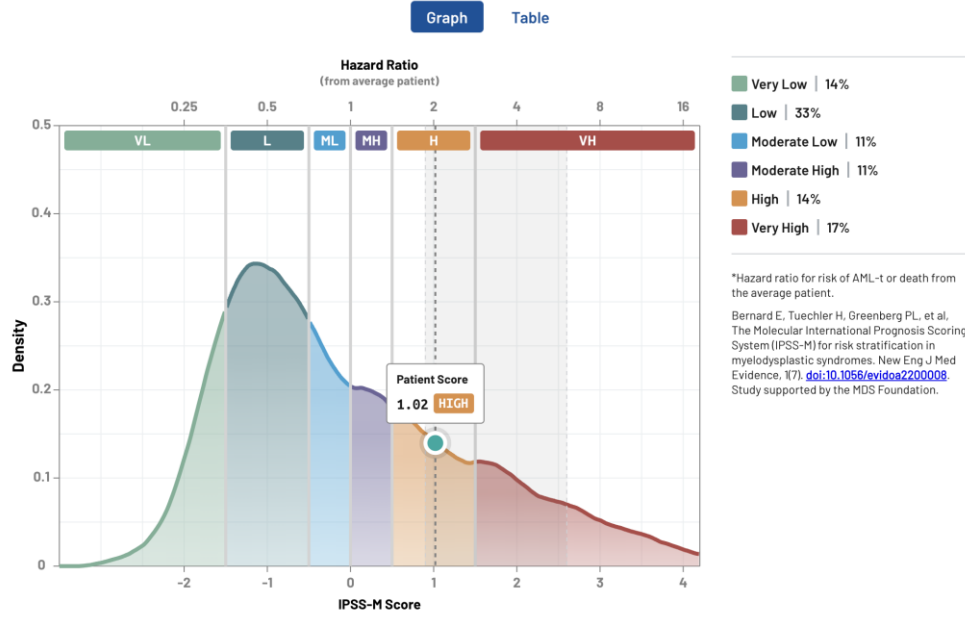
Hastanın Mart 2020 yılına ait kemik iliği aspirasyon biyopsisi örneği arşivden elde edilerek çalışmaya dahil edildi ve DNA konsantrasyonu 40 ng/uL olarak bulundu. Kalite skorlarını geçen çalışmada; uygulanan filtrelemeler doğrultusunda hastaya ait anlamlı mutasyon saptanmadı. IPSS-M risk hesaplama programı kullanılarak hastanın mevcut risk grubu tekrar değerlendirildiğinde çok düşük risk grubu (IPSS-M skor: -1.60) olarak tespit edildi. Hasta bu risk grubunda değerlendirilseydi lösemisiz sağ kalım ortalama 9.7 yıl, genel sağ kalım ortalama 10.6 yıl ve 1 yılda AML dönüşüm riski %0 olarak beklenenecekti.



Şekil 11. Hasta 3-IPSS-M risk skoru

HASTA 4: 2017 yılında MDS tanısı alan 55 yaşında kadın hasta; 2016 yılında metastatik (akciğer ve karaciğer) kolon kanseri ve 2018 yılında over kanseri (krukenberg tümörü) ile takip altındaydı. Takipleri sırasında yapılan hemogram sonuçları Hb:12,5 g/dL (11.7 – 16), WBC: $4,66 \times 10^3/\mu\text{L}$ (4.5 – 11), Trombosit: $44 \times 10^3/\mu\text{L}$ (150 – 400), Nötrofil: $2.6 \times 10^3/\mu\text{L}$ (2.02 - 7.46) tespit edilmiştir. Hastanın periferik yaymasında trombosit sayısı azalmış, nötrofiller hipogranüle ve eritrositler ise hipokromi, poikilositoz, anizositoz, mikrositer, hedef hücre ve polikromazi olarak değerlendirilmiştir. Kemik iliği aspirasyon biyopsi sonucunda ise kemik iliği selülaritesi %70 görülmüş, diseritropoez ve dismegakaryopoez bulguları gözlenmiştir. Ayrıca %2-3 dolayında blastik hücre, %8 lenfosit, %6 plazma hücresi görülmüştür. Hastaya ait kemik iliğinden yapılan karyotip ve FISH incelemeleri normal sonuçlanmıştır. Hastadan elde edilen bulgular doğrultusunda MDS multilineage displazi tanısı konmuştur ve hasta düşük risk grubunda değerlendirilmiştir. Hasta MDS açısından destek tedaviler ile takip edilmiştir. 2019 yılında hastada akut sarılık nedeni ile yapılan incelemeler sonucunda malign biliyer darlık tespit edilmiş ve buna yönelik tedaviler uygulanmıştır fakat hasta gelişen komplikasyonlara bağlı olarak hayatını kaybetmiştir.

2017 yılında yapılan kemik iliği biyopsi örneği çalışmaya dahil edildi ve örneğin DNA konsantrasyonu 45 ng/ul olarak hesaplandı. Hedeflenen kalite skorlarını ulaşan çalışma analiz edildi ve toplam 13 anlamlı mutasyon tespit edildi. Saptanan mutasyonların VAF %5 altında olan 10, %5 ve %10'dan küçük 3 adet mutasyon görüldü. VAF %5'in üstünde diğer filtreleme parametrelerine uygun varyant saptanamadı. Elde edilen moleküler verilerin IPSS-M risk hesaplama sitesine girilmesinden sonra hastanın yeni risk grubu yüksek risk (IPSS-M skor: 1.02) olarak sonuçlandı. Hasta bu risk grubunda değerlendirilseydi lösemisiz sağ kalım ortalama 1.5 yıl, genel sağ kalım ortalama 1.7 yıl ve 1 yılda AML dönüşüm riski %14.3 olarak beklenecekti.



Şekil 12. Hasta 4-IPSS-M risk skoru

Tablo 36. Hasta 4-VAF %2-%5 Mutasyon Listesi

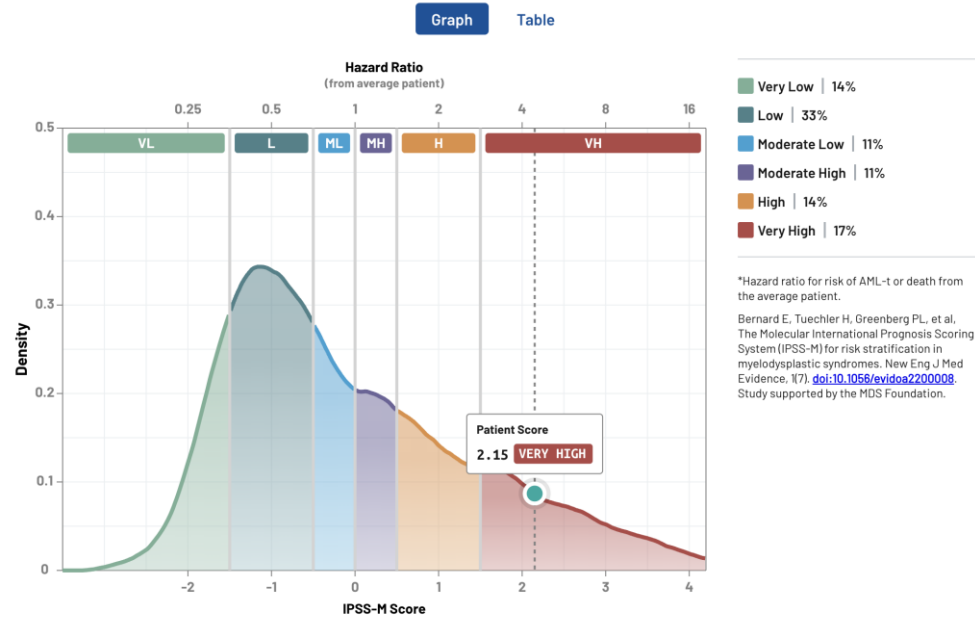
GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>DNMT3A</i>	c.941G>A p.W314*	1551	%2	Tier 1
<i>TET2</i>	c.4807C>T p.Q1603*	410	%2	Tier 1
<i>EZH2</i>	c.625+1G>A	353	%2	Tier 1
<i>TP53</i>	c.1043T>A p.L348*	1341	%3	Tier 1
<i>STAG2</i>	c.1054C>T p.Q352*	791	%3	Tier 1
<i>STAG2</i>	c.774T>A p.Y248*	1058	%3	Tier 1
<i>HRAS</i>	c.35G>A p.G12D	4138	%3	Tier 1
<i>DNMT3A</i>	c.1122+2T>C	326	%3	Tier 1
<i>STAG2</i>	c.2401C>T p.Q801*	507	%4	Tier 1
<i>ETV6</i>	c.34C>T p.Q12*	633	%4	Tier 1

Tablo 37. Hasta 4-VAF $\geq$ %5 - <%10 Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>ASXL1</i>	c.2987del	710	%5	Tier 1
<i>DNMT3A</i>	c.1279+1G>A	929	%5	Tier 1
<i>BCOR</i>	c.3238+1G>A	2157	%5	Tier 1

HASTA 5: 81 yaşında kadın hasta; 2019 yılında başlayan yaygın vücut ağrısı, pansitopeni ve son bir yılda 10 kilo kaybı nedeni ile tetkik edildi. Aynı zamanda hastada eşlik eden primer biliyer siroz ve osteoporoz hastalıkları mevcuttu. Tanı anında yapılan periferik yaymasında sonuçları Hb:10,8 g/dL (11.7 – 16), WBC: $3,52 \times 10^3/\mu\text{L}$ (4.5 – 11), Trombosit: $113 \times 10^3/\mu\text{L}$ (150 – 400), Nötrofil: $1.59 \times 10^3/\mu\text{L}$ (2.02 - 7.46) olarak bulundu. Ardından MDS ön tanısı ile kemik iliği aspirasyon biyopsisi yapıldı ve hiperselüler kemik iliği ve plazma hücre artışı görüldü. Her 3 seride herhangi bir displazi bulgusuna rastlanmadı. Patoloji sonucunda da kemik iliği biyopsi kesitinde sellülarite değişken izlenmiştir (Yaklaşık yarısında %50 dolayında iken, kalan yarısında %30 dolayında hiposellüler görünüm). Eritroid seride belirginleşme, megakaryositer seride görece azalma izlenmiş, megakaryositler genelde küçük ve hipolobe morfolojide bulunmuştur. Ayrıca granülositer seri matür elemanlarının bir kısmında hipersegmentasyon ve interstisyel plazma hücrelerinde artış görülmüştür. Yapılan kemik iliği aspirasyon biyopsisinde blasta rastlanmamıştır. Hasta IPSS risk skorlama sistemine göre orta derece-1 risk grubunda değerlendirildi ve hastaya yaşı ve mevcut bulguları nedeni ile destek tedavisi uygulandı. Hastanın takipleri sırasında AML dönüşümü görülmedi fakat hasta Ekim 2021 tarihinde hayatını kaybetmiştir.

Hastanın tanı sırasında yapılan kemik iliği aspirasyon biyopsi örneğinden DNA izole edilerek çalışmaya alındı. Elde edilen konsantrasyon 48 ng/ul'dır. Ölçümü yeterli olan DNA örneği laboratuvar basamaklarına alındı ve kalite skorlarını geçtikten sonra analiz gerçekleştirildi. Analiz sonucunda hastada 17 anlamlı mutasyon saptandı. Saptanan mutasyonların VAF aralığı %2 ile %10 arasında bulundu. Mutasyonlardan 14 tanesinin VAF %5'in altında iken, 3 tanesi %5 ve üzerindeydi. Mutasyon listeleri VAF'a göre aşağıdaki tablolarda verilmiştir. (Tablo 38-39) Mevcut bulgularla hastanın IPSS-M risk skoru hesaplandığında hasta çok yüksek risk grubu (IPSS-M skoru: 2.15) olarak değerlendirilmiştir. Hasta bu risk grubunda değerlendirilseydi lösemisiz sağ kalım ortalama 0.76 yıl, genel sağ kalım ortalama 1 yıl ve 1 yılda AML dönüşüm riski %28.2 olarak beklenenecekti.



Şekil 13. Hasta 5-IPSS-M risk skoru

Tablo 38: Hasta 5- VAF $\geq$ %2 - <%5 Mutasyon Listesi

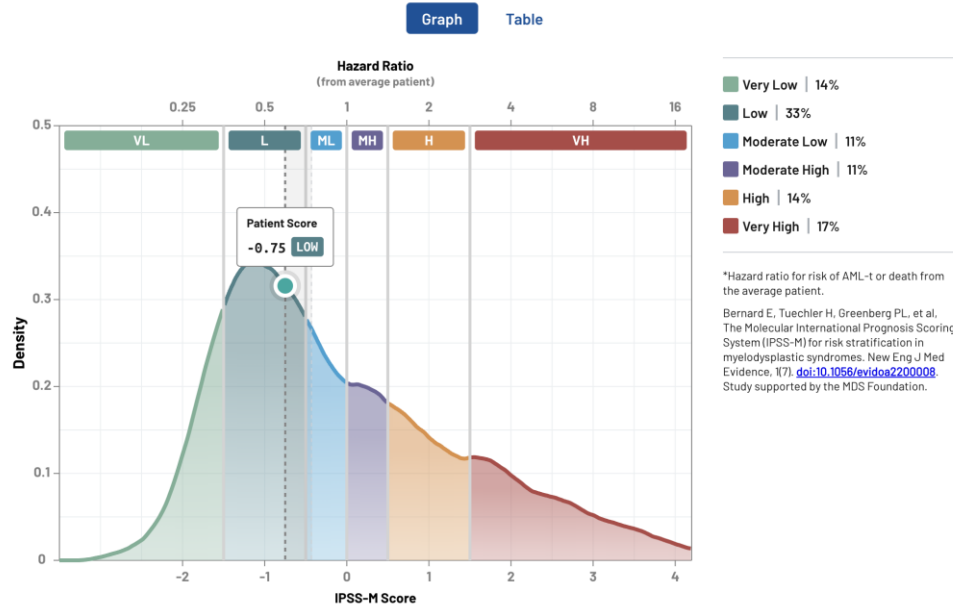
GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>TET2</i>	c.1965del p.Lys655AsnfsTer45	416	%2	Tier 1
<i>TET2</i>	c.4977T>A p.Y1959*	246	%2	Tier 1
<i>BCOR</i>	c.3502+1G>A	588	%2	Tier 1
<i>ASXL1</i>	c.3262C>T p.Q1088*	447	%2	Tier 1
<i>TP53</i>	c.328C>T p.R110C	2908	%2	Tier 1
<i>DNMT3A</i>	c.2596del p.Arg866GlyfsTer15	247	%2	Tier 1
<i>ASXL1</i>	c.2388G>A p.W796*	546	%3	Tier 1
<i>TP53</i>	c.596C>T p.P190L	615	%3	Tier 1
<i>DNMT3A</i>	c.742C>T p.Q248*	530	%3	Tier 1
<i>BCOR</i>	c.4759C>T p.Q1587*	306	%3	Tier 1
<i>TP53</i>	c.835G>A p.G279R	416	%3	Tier 1
<i>TET2</i>	c.5541G>A p.W1847*	495	%3	Tier 2
<i>TET2</i>	c.3571C>T p.Q1191*	409	%4	Tier 1
<i>SF3B1</i>	c.2098A>G p.K700E	578	%4,6	Tier 1

Tablo 39. Hasta 5- VAF $\geq$ %5 - <%10 Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>DNMT3A</i>	c.457C>T p.Q153*	128	%5	Tier 1
<i>RUNX1</i>	c.494G>A p.G165D	163	%6	Tier 1
<i>SETBP1</i>	c.2573A>G p.E858G	1200	%7	Tier 1

HASTA 6: 57 yaşında kadın hastanın; Ocak 2019 tarihinde sağ temporal kitle nedeni ile operasyon öyküsü bilinmektedir. Hastanın Ağustos 2019’da yapılan kontrollerinde trombositopeni ve lökopeni saptanması üzerine periferik yayma ve kemik iliği aspirasyon biyopsisi planlanmıştır. Periferik yaymasında Hb:11.7 g/dL (11.7 – 16), WBC: $4.06 \times 10^3/\mu\text{L}$ (4.5 – 11), Trombosit: $93 \times 10^3/\mu\text{L}$ (150 – 400), Nötrofil: $2.71 \times 10^3/\mu\text{L}$ (2.02 - 7.46) bulunmuştur. Kemik iliği aspirasyon biyopsi sonucunda ise diseritropoez (erken eritroblastlarda artış, nükleer şekil bozuklukları, bilobule nükleuslar), dismegakaryopoez (monolobe hiperkromatik nükleuslu formlar, multinükleer formlar), disgranülopoez (hipogranülasyon), %3 küçük lenfosit, <%1 plazma hücresi ve %1-2 blastik hücre izlenmiş, ayrıca bir adet makrofajda eritrosit fagositozu görülmüştür. Ayrıca kemik iliği selülaritesi normoselüler olarak (%45) olarak değerlendirilmiştir. Kemik iliğinden yapılan karyotip ve FISH çalışmaları da normal olarak sonuçlanmıştır. Hasta mevcut bulgularla MDS multilineage displazi ve IPSS risk skorlamasında düşük risk grubu olarak sınıflanmıştır. Hastaya destek tedavisi verilmiştir. İzlem sırasında AML dönüşümü gerçekleşmemiştir ve hasta Şubat 2020 yılında hayatını kaybetmiştir.

Hastanın yapılan kemik iliği aspirasyon biyopsi materyalinden 45 ng/ul DNA izole edilmiştir. Çalışma sonucunda istenilen kalite skorlarına ulaşan örnek analiz edilmiştir. Analiz sonucunda hastada 2 adet anlamlı mutasyon görülmüştür. Saptanan mutasyonların VAF değerleri %6 ve %10 olarak bulunmuştur. Mutasyonlar Tablo 40 ve 41’de verilmiştir. Hasta için mevcut bulguları ve moleküler bulguları ile IPSS-M risk hesaplaması yapıldığında hasta düşük risk (IPSS-M skoru: -0.75) olarak değerlendirilmiştir. Hasta bu risk grubunda değerlendirilseydi lösemisiz sağ kalım ortalama 5.9 yıl, genel sağ kalım ortalama 6 yıl ve 1 yılda AML dönüşüm riski %1.7 olarak beklenecekti. Aslında saptanan mutasyonlarla birlikte değerlendirildiğinde hastanın risk grubu IPSS’e göre değişmemiş olarak bulunmuştur.



Şekil 14. Hasta 6-IPSS-M risk skoru

Tablo 40. Hasta 6-VAF $\geq$ %5 - <%10 Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
BCOR	c.3726del p.Gln1242HisfsTer52	2153	%6	Tier 1

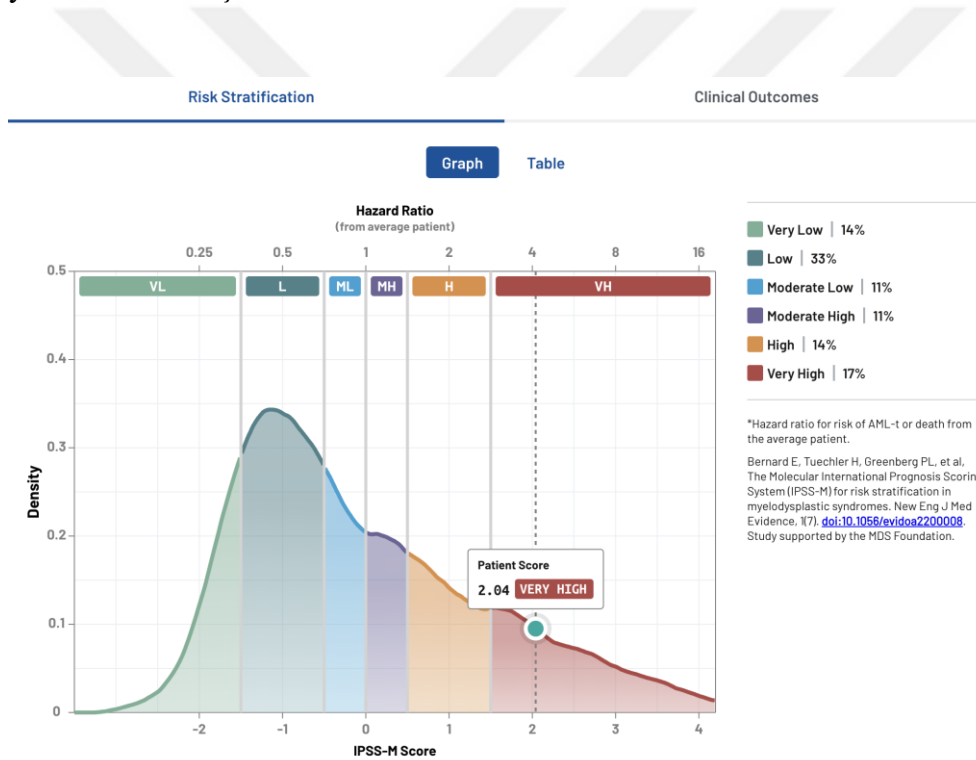
Tablo 41. Hasta 6-VAF $\geq$ %10 - <%20 Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
DNMT3A	c.2076del p.Lys693SerfsTer12	831	%10	Tier 1

HASTA 7: 77 yaşında geçirilmiş skuamoz hücreli karsinom öyküsü olan erkek hasta; Ocak 2020 yılında bisitopeni (anemi ve trombositopeni) nedeni ile araştırılmıştır. Yapılan periferik kan yaymasında Hb:8.16 g/dL (11.7 – 16), WBC: $6.87 \times 10^3/\mu\text{L}$ (4.5 – 11), Trombosit: $96 \times 10^3/\mu\text{L}$ (150 – 400), Nötrofil: $3.98 \times 10^3/\mu\text{L}$ (2.02 - 7.46) şeklinde izlenmiştir. Hastadan MDS ön tanısıyla kemik iliği aspirasyon biyopsisi yapılmıştır. Sonucunda hiperselüler kemik iliği (%80) ile diseritropoez ve diskaryopoez görülmüştür. Ayrıca %8 küçük lenfosit, %1 plazma hücresi ve <%1 blastik hücre saptanmıştır. Hastadan aynı anda istenen karyotip ve FISH

MDS paneli normal olarak sonuçlanmıştır. Hastanın elde edilen bulguları ile tanısı MDS multilineage displazi olarak konulmuştur ve IPSS'a göre orta derece-1 risk grubundadır. Hasta destek tedavisi almıştır. Tanı anından hayatını kaybettiği Mayıs 2020 tarihine kadar AML dönüşümü izlenmemiştir.

Hastanın Ocak 2020 yılına ait kemik iliği aspirasyon arşiv örneğinden 38 ng/ul DNA izole edilerek çalışmaya alınmıştır. Kalite skorlarını geçen çalışma analiz edilmiştir. Analiz sonucunda hastada toplam 14 mutasyon saptanmıştır. Saptanan mutasyonların iki tanesinin VAF oranı %5 ve %7 olup, geri kalan mutasyonların VAF oranları %5'in altında bulunmuştur. Mutasyon listesi Tablo 42 ve 43'te verilmiştir. Hastanın IPSS-M risk hesaplaması yapıldığında çok yüksek grubunda (IPSS-M skoru: 2.04) değerlendirilmiştir. Hasta bu risk grubunda değerlendirilseydi lösemisiz sağ kalım ortalama 0.76 yıl, genel sağ kalım ortalama 1 yıl ve 1 yılda AML dönüşüm riski %28.2 olarak beklenenecekti.



Şekil 15. Hasta 7-IPSS-M risk skoru

Tablo 42. Hasta 7-VAF $\geq$ %2 - <%5 Mutasyon Listesi

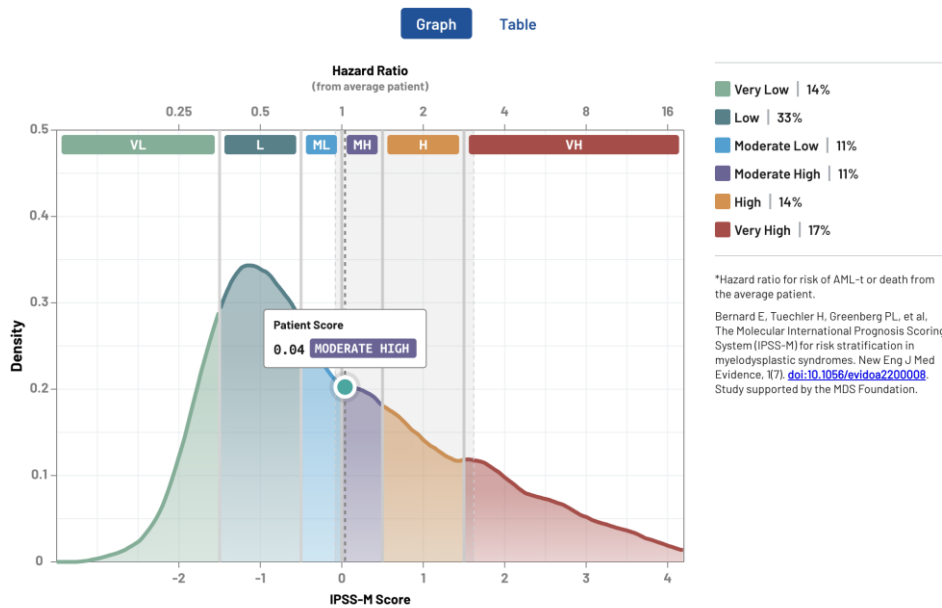
GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>TP53</i>	c.993+1G>A	422	%2	Tier 1
<i>PPM1D</i>	c.1074_1076delinsAAA	502	%2	Tier 1
<i>TP53</i>	c.689C>T p.T230I	309	%2	Tier 1
<i>PTPN11</i>	c.332+1G>A	203	%2,5	Tier 1
<i>BCOR</i>	c.4173+1G>A	367	%2,8	Tier 1
<i>IDH1</i>	c.394CC>T p.R132C	208	%3	Tier 1
<i>TET2</i>	c.1965del p.Lys655AsnfsTer45	183	%3	Tier 1
<i>PTPN11</i>	c.1508G>A p.G503E	194	%3	Tier 1
<i>DNMT3A</i>	c.2146G>A p.V716I	561	%3	Tier 1
<i>BCOR</i>	c.3154del p.Glu1052LysfsTer3	158	%3	Tier 1
<i>DNMT3A</i>	c.630G>A p.W210*	271	%4	Tier 1
<i>TP53</i>	c.844C>T p.R282W	159	%4	Tier 1

Tablo 43. Hasta 7-VAF $\geq$ %5 - <%10 Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>ZRSR2</i>	c.1061del p.Gly354AlafsTer?	110	%5	Tier 1
<i>TET2</i>	c.1318C>T p.Q440*	76	%7	Tier 1

HASTA 8: 78 yaşında daha önceden bel fitiği operasyonu sonrası paraplejik kaldığı bilinen kadın hastada Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon yatışı sırasında (2016 Şubat) ılımlı pansitopeni saptanmıştır. Yapılan periferik yaymasında Hb:10.4 g/dL (11.7 – 16), WBC: $4.44 \times 10^3/\mu\text{L}$ (4.5 – 11), Trombosit: $117 \times 10^3/\mu\text{L}$ (150 – 400), Nötrofil: $2.40 \times 10^3/\mu\text{L}$ (2.02 – 7.46) olarak görülmüş. İleri inceleme olarak yapılan kemik iliği aspirasyon biyopsisinde ise selülarite %50 civarında bulunmuş, eritroidlerde ve megakaryositlerde displastik değişiklikler görülmüştür. %6-7 dolayında plazma hücresi izlenmiş fakat blastik hücrelere hiç rastlanmamıştır. Hastadan yapılan karyotip ve FISH çalışmaları da normal sonuçlanmıştır. Hasta MDS multilineage displazi olarak değerlendirilmiştir ve orta derece-1 risk grubunda olduğu tespit edilmiştir. Hastaya destek tedavisi uygulanmıştır. Hastanın Nisan 2017’de AML dönüşümü gerçekleşmeden öldüğü bilinmektedir.

Hastadan alınan kemik iliği aspirasyon biyopsi materyaline ait arşiv örneğinden 43 ng/ul DNA izole edilerek çalışmaya başlanmıştır. Çalışma sonunda hedeflenen kalite değerlerine ulaşan örnek analize hazır gelmiştir. Analiz sonucunda hastada toplam 11 varyant tespit edilmiştir. Bu varyantların 8 tanesinin VAF değeri %5’in altında olup; diğer 3 varyantın VAF değerleri %5 ve 10 arasında bulunmaktadır. Varyantlar Tablo 44 ve 45’te VAF değerlerine göre belirtilmiştir. Moleküler bulgular elde edildikten sonra IPSS-M risk durumu değerlendirilmiştir ve hasta orta-yüksek risk (IPSS-M risk skoru: 0.04) olarak tespit edilmiştir. Hasta bu risk grubunda değerlendirilseydi lösemisiz sağ kalım ortalama 2.3 yıl, genel sağ kalım ortalama 2.8 yıl ve 1 yılda AML dönüşüm riski %9.5 olarak beklenenecekti.



Şekil 16. Hasta 8-IPSS-M risk skoru

Tablo 44. Hasta 8-VAF $\geq$ %2 - <%5 Mutasyon Listesi

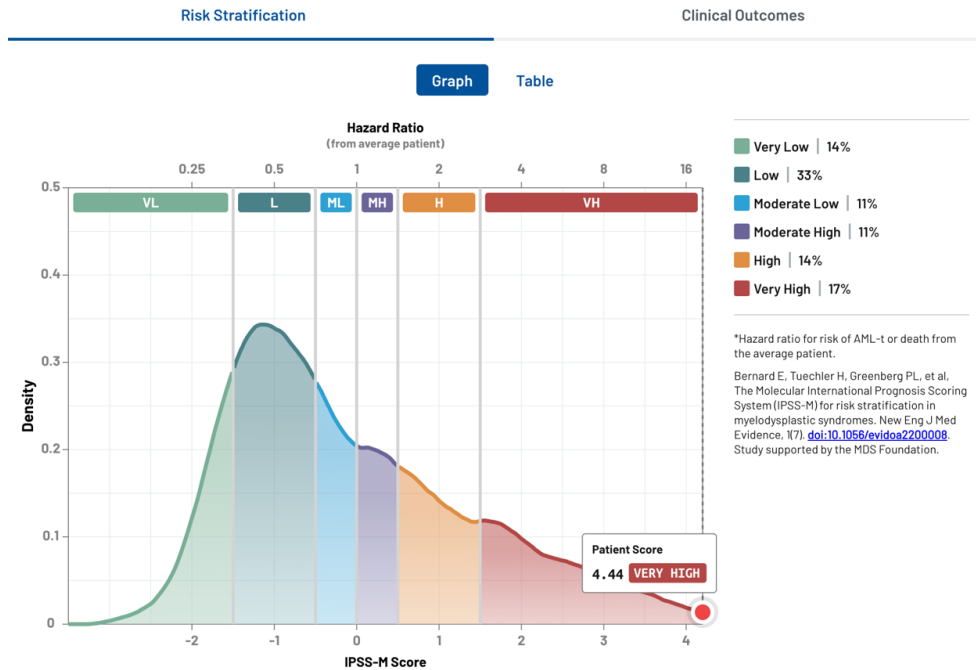
GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>TET2</i>	c.1249C>T p.Q417*	259	%2	Tier 1
<i>TET2</i>	c.1247_1249delinsTTT	263	%2	Tier 1
<i>STAG2</i>	c.913C>T p.R305*	240	%2	Tier 1
<i>GATA2</i>	c.1193G>A p.R398Q	398	%2	Tier 1
<i>CSF3R</i>	c.2308C>T p.Q770*	349	%2	Tier 1
<i>TET2</i>	c.3014del p.Lys1005ArgfsTer2	264	%2,6	Tier 1
<i>TET2</i>	c.2148dup p.His717ThrfsTer6	176	%3	Tier 1
<i>DNMT3A</i>	c.1010C>T p.S337L	1010	%3	Tier 2

Tablo 45. Hasta 8-VAF $\geq$ %5 - <%10 Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>ASXL1</i>	c.2423del p.Pro808LeufsTer10	501	%5	Tier 1
<i>TP53</i>	c.713G>A p.C238Y	486	%5	Tier 1
<i>TET2</i>	c.4546C>T p.R1516*	357	%9	Tier 1

HASTA 9: 61 yaş hiperlipidemi öyküsü olan erkek hasta; Mayıs 2016 yılında ortaya çıkan efor çarpıntısı ve gece terlemesi nedeni ile yapılan tetkiklerinde derin anemi ve lökopeni saptanmıştır. Periferik yayması Hb:4.26 g/dL (11.7 – 16), WBC: 3.71 x10³/μL (4.5 – 11), Trombosit: 181 x10³/μL (150 – 400), Nötrofil: 2.37 x10³/μL (2.02 - 7.46) şeklindedir. Yapılan kemik iliği aspirasyon biyopsisinde hiperselüler kemik iliği (%95) ve dismegakaryopoez (megakaryositlerde belirgin artış, kümelenmeler, displastik değişiklikler (çok küçük ve hipolobe morfolojide ve bir kısmında multinükleasyon) ile birlikte %6 civarında blastik hücre görülmüştür. Karyotip ve FISH MDS paneli normal olarak sonuçlanmıştır. Hasta MDS artmış blast Tip 1 olarak tanı almıştır ve orta derece-1 risk grubunda değerlendirilmiştir. Hasta için azasitidin tedavisi uygulanmıştır. Hasta Aralık 2016 yılında hayatını kaybetmiştir ve bu süre içerisinde AML dönüşümü hastada izlenmemiştir.

Tanı anındaki arşivlenmiş kemik iliği aspirasyon biyopsi materyalinden elde edilen DNA konsantrasyonu 34 ng/ul'dir. Çalışma istenen kalite skorlarına ulaştıktan sonra analiz edilmiştir. Analiz sonucunda hastada 17 anlamlı mutasyon görülmüştür. VAF aralığı %2 ile %61 arasında değişmektedir. %5 altında 4 adet, %5 ve %10'dan küçük olan 9 adet, %10 ve %20'den küçük olan 2 adet, %20 ve üstü varyant sayısı ise 2 adet görülmüştür. Saptanan mutasyonlar VAF aralığına göre Tablo 46-49'da belirtilmiştir. Hastadaki mutasyonları ile mevcut bulguları IPPS-M risk hesaplama sitesine girildiğinde hastanın risk grubu çok yüksek risk (IPSS-M risk skoru:4.44) olarak yorumlanmıştır. Hasta bu risk grubunda değerlendirilseydi lösemisiz sağ kalım ortalama 0.76 yıl, genel sağ kalım ortalama 1 yıl ve 1 yılda AML dönüşüm riski %28.2 olarak beklenecekti.



Şekil 17. Hasta 9-IPSS-M risk skoru

Tablo 46. Hasta 9-VAF $\geq$ %2 - <%5 Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>DNMT3A</i>	c.88G>T p.E30*	795	%2	Tier 1
<i>TP53</i>	c.472C>T p.R158C	999	%3	Tier 1
<i>TP53</i>	c.672G>T p.E224D	252	%3	Tier 2
<i>DNMT3A</i>	c.856-1G>T	354	%4	Tier 1

Tablo 47. Hasta 9-VAF $\geq$ %5 - <%10 Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>DNMT3A</i>	c.742C>T p.Q248*	166	%5	Tier 1
<i>TP53</i>	c.839G>T p.R280I	103	%6	Tier 1
<i>TET2</i>	c..1815C>A p.Y605*	80	%6	Tier 1
<i>BCOR</i>	c.3809G>A p.W1270*	150	%6	Tier 1
<i>KRAS</i>	c.57G>C p.L19F	112	%6	Tier 1
<i>RUNX1</i>	c.796C>T p.Q266*	8880	%7	Tier 1
<i>ASXL1</i>	c.4611C>A p.C1537*	152	%7	Tier 1
<i>ZRSR2</i>	c.130C>T p.Q44*	140	%9	Tier 1
<i>TET2</i>	c.3501-1G>T	99	%9	Tier 1

Tablo 48. Hasta 9-VAF $\geq$ %10 - <%20 Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>TP53</i>	c.440T>C p.V147A	1819	%10	Tier 2
<i>ASXL1</i>	c..2740G>T p.E914*	135	%12	Tier 1

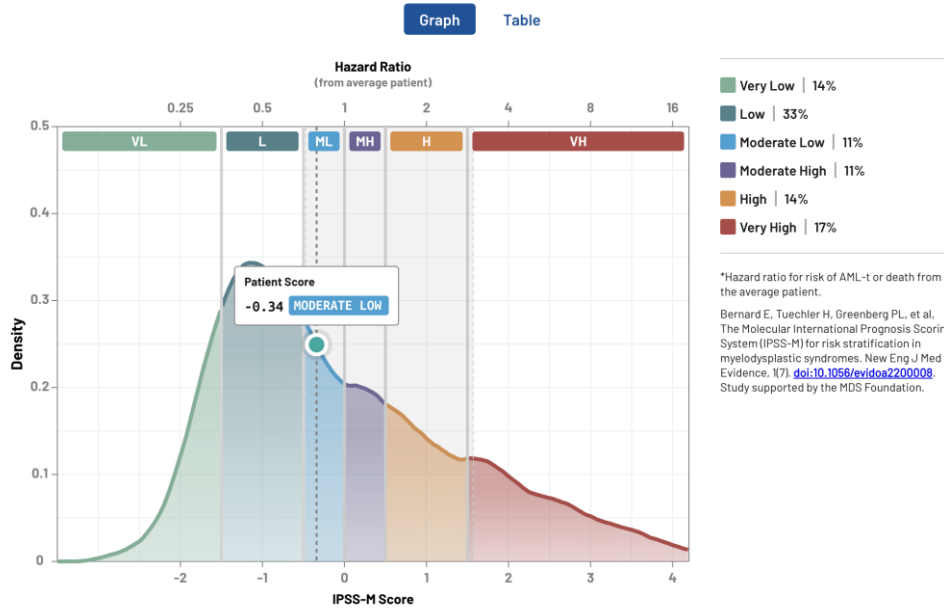
Tablo 49. Hasta 9-VAF %20 ve Üstü Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>BCOR</i>	c.4319del p.Pro1440LeufsTer44	84	%21	Tier 1
<i>STAG2</i>	c.646C>T p.R216*	283	%62	Tier 1

HASTA 10: 83 yaşında bilinen hipertansiyon ve diyabet tanıları mevcut erkek hasta; Aralık 2014 yılında anemi nedeniyle tetkik edilmiştir. Yapılan periferik yaymasında Hb:8.16 g/dL (11.7 – 16), WBC: $7.26 \times 10^3/\mu\text{L}$ (4.5 – 11), Trombosit: $815 \times 10^3/\mu\text{L}$ (150 – 400), Nötrofil: $2.71 \times 10^3/\mu\text{L}$ (2.02 - 7.46) bulunmuştur. Kemik iliği aspirasyonunda diseritropoez, %80 civarında ring sideroblast, disgranülopoez (Hipo-agranülasyon, Hipersegmentasyon) ve %6-7 oranında blastik hücre izlenmiştir. Kemik iliği aspirasyon biyopsi raporunda ise selülarite %90 civarında görülmektedir ve dismegakaryopoez ile birlikte lenfoid hücreler %5, plazma hücreleri %5-8, blastik hücreler %1 dolayında izlenmiştir. Ayrıca hastanın yapılan sitogenetik ve FISH analizi normal olarak sonuçlanmıştır. Hasta MDS ring sideroblast tanısını almıştır ve intermediaete-1 risk grubunda değerlendirilmiştir. Hastaya talidomid tedavisi başlanmıştır. Hastanın 2018 yılında hastalığının progrese olduğu gözlenmiştir. 2018’de yenilenen kemik iliği aspirasyon örneğinde blast oranı %6-7 civarına çıkmıştır. Hasta Ağustos 2019 tarihinde hayatını kaybetmiştir.

2014 yılında yapılan kemik iliği biyopsi arşiv materyalinden elde edilen DNA konsantrasyonu 38 ng/ul olarak tespit edilmiştir ve çalışmaya alınmıştır. Hedeflenen kalite skorlarını geçtikten sonra analizi yapılan hastada 10 adet anlamlı mutasyon görülmüştür. Saptanan mutasyonlar VAF’a göre gruplandırılmıştır. Buna göre VAF %5’in altında olan

varyant sayısı 5, %5 ile %10'dan küçük varyant sayısı 1, %10 ve %20'den küçük varyant sayısı 2, %20 ve üstü olan varyant sayısı 2'dir. Mutasyonlar aşağıdaki tablolarda (Tablo 50-53) detaylı olarak belirtilmiştir. Hasta IPSS-M risk hesaplaması sonucunda orta-düşük risk grubunda (IPSS-M skor: -0.34) belirlendi. Hasta bu risk grubunda değerlendirilseydi lösemisiz sağ kalım ortalama 4.5 yıl, genel sağ kalım ortalama 4.6 yıl ve 1 yılda AML dönüşüm riski %4.9 olarak beklenenecekti.



Şekil 18. Hasta 10-IPSS-M risk skoru

Tablo 50. Hasta 10-AF $\geq$ %2 - <%5 Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
ZRSR2	c.439-1G>A	216	%2	Tier 1
ZRSR2	c.3376G>T p.E113*	778	%2	Tier 1
TET2	c.2392G>T p.E798*	276	%2	Tier 1
ZRSR2	c.883C>T p.R295*	326	%3	Tier 1
BCOR	c.2507_2508insT p.Glu836AspfsTer8	460	%3	Tier 1

Tablo 51. Hasta 10-VAF $\geq$ %5 - <%10 Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>TP53</i>	c.310C>T p.Q104*	1777	%6	Tier 1

Tablo 52. Hasta 10-VAF $\geq$ %10 - <%20 Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>SRSF2</i>	c.284C>T p.P95L	1276	%12	Tier1
<i>BCOR</i>	c.2994_2995insA	149	%15	Tier 1

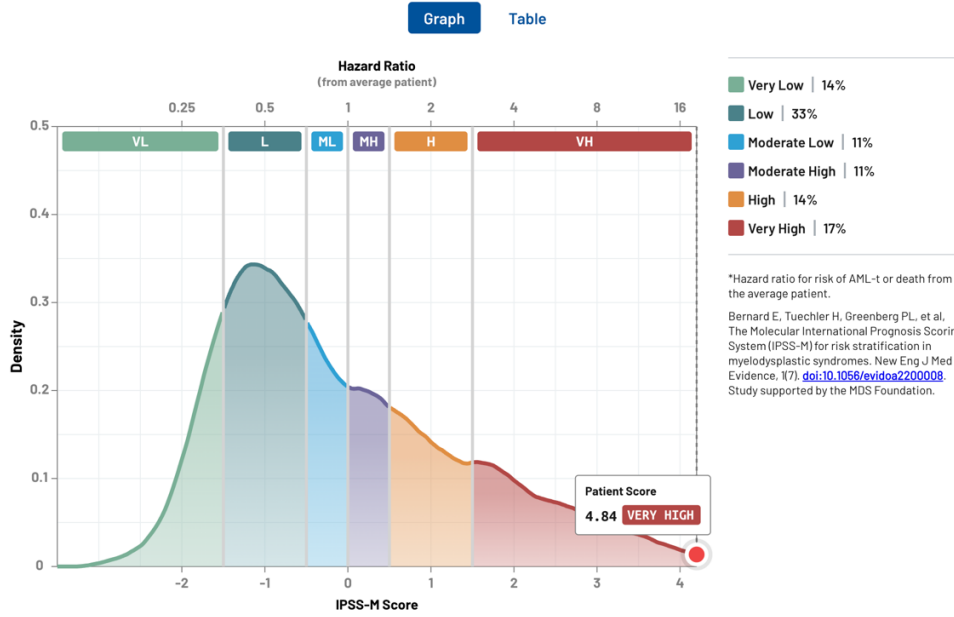
Tablo 53. Hasta 10-VAF %20 ve Üstü Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>SF3B1</i>	c.2098A>G p.K700E	1022	%30	Tier1
<i>TET2</i>	c.3571C>T p.Q1191*	949	%32	Tier 1

HASTA 11: 78 yaşında hipertansiyon dışında bilinen kronik hastalığı olmayan erkek hasta; derin anemi nedeniyle Mayıs 2018 yılında tetkik edilmiştir. Yapılan incelemelerde Hb:5.21 g/dL (11.7 – 16), WBC: $4.07 \times 10^3/\mu\text{L}$ (4.5 – 11), Trombosit: $158 \times 10^3/\mu\text{L}$ (150 – 400), Nötrofil: $2.30 \times 10^3/\mu\text{L}$ (2.02 - 7.46) şeklinde görülmüştür. Kemik iliği aspirasyon biyopsi örneğinde selülarite %90 civarında görülmüş ve her 3 seride birden displazi özellikleri tespit edilmiştir. Ayrıca %10 dolayında blastik hücreye rastlanmıştır. Hastanın kemik iliği örneğinden yapılan genetik incelemelerde ise karyotip ve FISH MDS paneli normal sonuçlanmıştır. Hasta mevcut bulguları ile değerlendirildiğinde MDS artmış blastlı 2 tanısı almış ve risk grubu olarak da orta derece-1 risk grubunda değerlendirilmiştir. Hasta için azasitidin tedavisi başlanmıştır. Hastanın Kasım 2018 tarihinde hipotansiyona sekonder düşme

sonrası genel durumunda bozulma ve yüksek ateş nedeni ile hastaneye kaldırılmış, nötropenik ateş ve solunum yetmezliğine bağlı yoğun bakımda yatışı sırasında hayatını kaybetmiştir.

Hastanın yapılan kemik iliği aspirasyon biyopsi materyalinden elde edilen DNA konsantrasyonu 38 ng/ul'dir. Hedeflenen kalite değerlerini geçen çalışma örneği analiz edilmiştir ve analiz sonucunda hastada toplam 15 anlamlı mutasyon tespit edilmiştir. Mutasyonlar VAF'a göre gruplandırıldığında %5'in altında 12 adet, %5 ve %10'dan küçük olan 2 adet, %20 üstünde ise 1 adet mutasyon görülmektedir. Mutasyonlar aşağıdaki tablolarda (Tablo 54-56) detaylı olarak verilmiştir. Hastanın saptanan mutasyonları ve tanı anındaki bulguları IPSS-M risk hesaplama sitesine girildiğinde hastanın risk profili çok yüksek risk (IPSS-M skoru:4.84) olarak bulunmuştur. Hasta bu risk grubunda değerlendirilseydi lösemisiz sağ kalım ortalama 0.76 yıl, genel sağ kalım ortalama 1 yıl ve 1 yılda AML dönüşüm riski %28.2 olarak beklenecekti.



Şekil 19. Hasta 11-IPSS-M risk skoru

Tablo 54. Hasta 11-VAF $\geq$ %2 - <%5 Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>RUNX1</i>	c.5del p.Ala2ValfsTer17	393	%2	Tier 1
<i>DNMT3A</i>	c.178-2A>G	373	%2	Tier 1
<i>RUNX1</i>	c.595G>A p.G199R	1447	%2	Tier 1
<i>TP53</i>	c.848G>A p.R283H	558	%2	Tier 1
<i>RUNX1</i>	c.668C>>T p.Q230*	4591	%3	Tier 1
<i>DNMT3A</i>	c.2524C>T p.Q842*	378	%3	Tier 1
<i>BCOR</i>	c.853A>T p.K285*	459	%3	Tier 1
<i>TP53</i>	c.560-7C>T	531	%3	Tier 1
<i>DNMT3A</i>	c.919C>T p.P307S	712	%3	Tier 1
<i>DNMT3A</i>	c.2478+1G>A	131	%4	Tier 1
<i>DNMT3A</i>	c.1319G>A -W440*	316	%4	Tier 1
<i>PPM1D</i>	c.302del p.Phe101SerfsTer64	754	%4	Tier 1

Tablo 55. Hasta 11-VAF $\geq$ %5 - <%10 Mutasyon Listesi

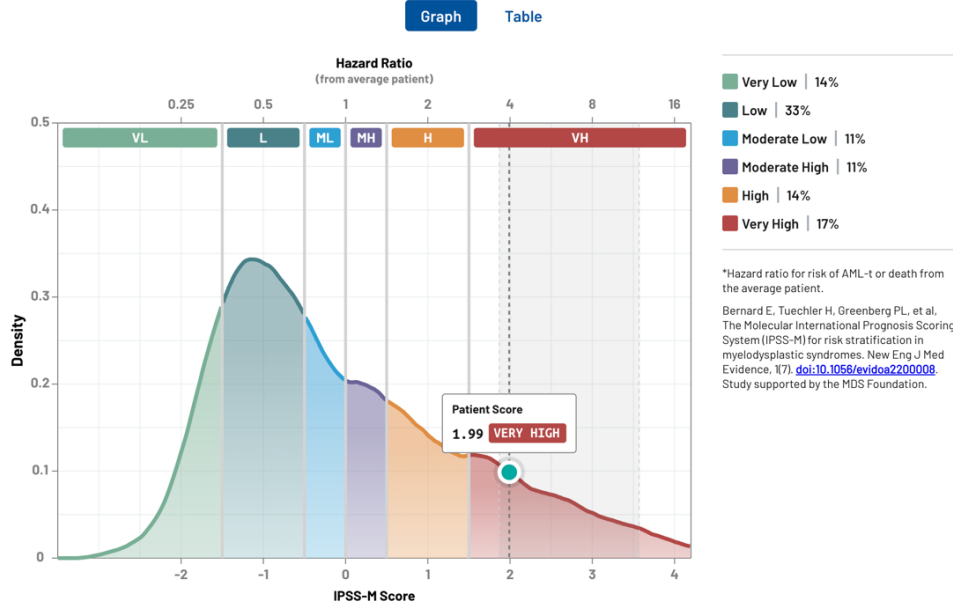
GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>PTPN11</i>	c.155C>T p.T52I	123	%5	Tier1
<i>EZH2</i>	c.2068C>T p.R690C	107	%5	Tier 1

Tablo 56. Hasta 11- VAF %20 ve Üstü Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>U2AF1</i>	c..470A>C p.Q157P	397	%32	Tier 1

HASTA 12: 78 yaşında bilinen ek bir hastalığı olmayan kadın hasta; 2021 Şubat ayında hastanemize yaptığı başvurusu sırasında yapılan tetkiklerinde Hb:10.24 g/dL (11.7 – 16), WBC: $3.17 \times 10^3/\mu\text{L}$ (4.5 – 11), Trombosit: $67 \times 10^3/\mu\text{L}$ (150 – 400), Nötrofil: $1.83 \times 10^3/\mu\text{L}$ (2.02 - 7.46) olarak bulunmuştur. Pansitopeni tespit edilen hastada tanıya gidebilmek için yapılan kemik iliği aspirasyon biyopsi örneğinde ise selülarite değişken (%35-65) gözükmüş, myelofibrozis, dismegakaryopoez ve %7 civarında blast tespit edilmiştir. Hastanın kemik iliği örneğinden yapılan karyotip ve FISH analizleri normal sonuçlanmıştır. Hasta MDS artmış blastlı 1 tanısı almış ve orta derece-1 risk grubunda değerlendirilmiştir. Hastanın daha sonraki dönemler için takibi sistemde ve kayıtlarda bulunamamıştır, dolayısıyla aldığı tedavi ile ilgili veriye ulaşamamıştır. Hastanın Haziran 2021 yılında vefat ettiği bilinmektedir.

Hastanın tanı aldığı anda yapılan kemik iliği aspirasyon biyopsi arşiv materyaline ulaşılmıştır ve 47 ng/ul DNA izole edilmiştir. DNA örneğinden yapılan çalışma hedeflenen kalite eşiklerini geçerek analize alınmıştır. Analiz sonucunda hastada toplam 14 adet anlamlı varyant saptanmıştır. Varyantlardan 11 tanesinin VAF değeri %5'in altında görülmüştür. Kalan 3 varyantın VAF değerleri ise %5 ve %10'un altındadır. Hastada %10 ve üstü herhangi bir varyanta rastlanmamıştır. Hastadaki varyantlar Tablo 57 ve 58'de listelenmiştir. Hastanın risk grubu IPSS-M ile yeniden değerlendirildiğinde çok yüksek risk (IPSS-M skor: 1.99) grubuna ait bulunmuştur. Hasta bu risk grubunda değerlendirilseydi lösemisiz sağ kalım ortalama 0.76 yıl, genel sağ kalım ortalama 1 yıl ve 1 yılda AML dönüşüm riski %28.2 olarak beklenecekti.



Şekil 20. Hasta 12-IPSS-M risk skoru

Tablo 57. Hasta 12-VAF $\geq$ %2 - <%5 Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>SRSF2</i>	c.284C>G p.P95R	883	%2	Tier 1
<i>RUNX1</i>	c.806-1G>A	392	%2	Tier 1
<i>TP53</i>	c.638G>A p.R213Q	313	%2	Tier 1
<i>DNMT3A</i>	c.1937-1G>A	264	%2	Tier 1
<i>TET2</i>	c.5540G>A p.W1847*	323	%2	Tier 2
<i>WT1</i>	c.872+1G>A	278	%2	Tier 1
<i>EZH2</i>	c.1675C>T p.Q559*	211	%3	Tier 1
<i>ZRSR2</i>	c.41+1G>A	194	%3	Tier 1
<i>DNMT3A</i>	c.388A>T p.R130*	258	%3	Tier 1
<i>TET2</i>	c.1965del p.Lys655AsnfsTer45	183	%3	Tier 1
<i>CEBPA</i>	c.8C>A p.S3*	2573	%3	Tier 2

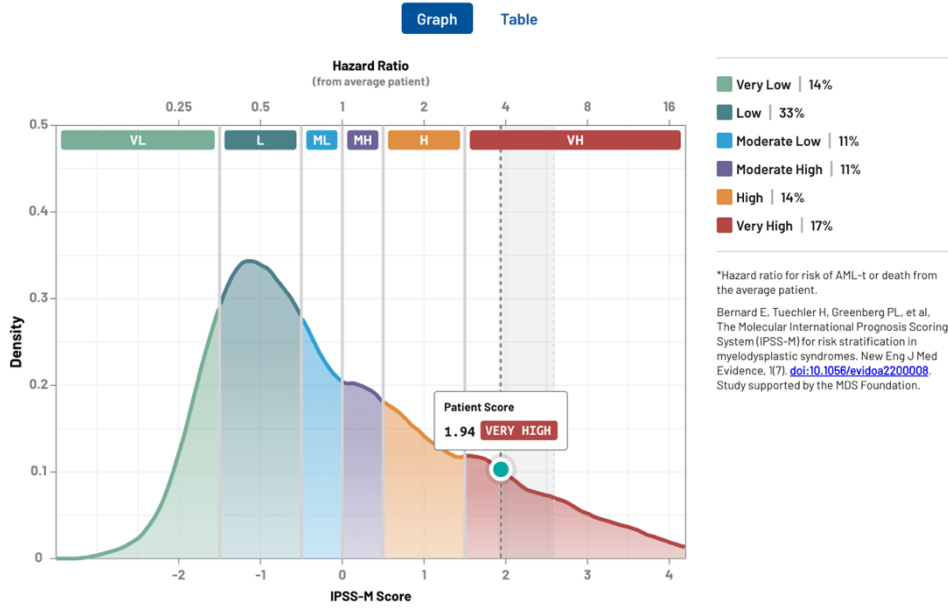
Tablo 58. Hasta 12-VAF $\geq$ %5 - <%10 Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>DNMT3A</i>	c.1913C>T p.S638F	125	%5	Tier 2
<i>STAG2</i>	c.2725C>T p.Q909*	208	%8	Tier 1
<i>STAG2</i>	c.3337_3356del p.Pro1113ThrfsTer16	91	%8	Tier 1

HASTA 13: 60 yaşında hipertansiyon ve koroner arter hastalığı öyküsü olan erkek hasta; 2019 Eylül ayında halsizlik ve iştahsızlık nedeni ile bakıldığı rutin tetkiklerinde pansitopeni saptanması nedeni ile ileri incelemeye alınmış. Periferik yaymasında Hb:8.80 g/dL (11.7 – 16), WBC: $2.5 \times 10^3/\mu\text{L}$ (4.5 – 11), Trombosit: $56 \times 10^3/\mu\text{L}$ (150 – 400), Nötrofil: $0.48 \times 10^3/\mu\text{L}$ (2.02 - 7.46) şeklinde saptanmıştır. Hastanın kemik iliği aspirasyon biyopsi sonucunda kemik iliği hiperselüler (%98) bulunmuş ve diseritropoez, %5-6 plazma hücresi, %7 lenfosit, %4-5 blastik hücre saptanmıştır. Hasta mevcut bulgularıyla MDS artmış blastlı 1 tanısı almış ve orta derece-1 risk grubunda değerlendirilmiştir. Hastaya azasitidin tedavisi başlanmıştır ve 3 kür aldıktan sonra Mayıs 2020 tarihinde tam uyumlu kardeşten allojenik kemik iliği nakli gerçekleştirilmiştir. Nakil sonrası 2. ay kontrolünde sitopenilerin derinleşmesi nedeni ile yapılan kemik iliği aspirasyon biyopsisinde %20 blast görülmüş ve AML dönüşümü tespit edilmiştir. Daha sonra hastaya AML'ye yönelik kemoterapiler uygulanmıştır. Hasta Aralık 2020 yılında derin nötropenik ve trombositopenik tablodayken genel durum kötüleşmesi ve fungal pnömoni nedeni ile hayatını kaybetmiştir.

Hastanın MDS tanısı aldığı sırasında yapılan ilk kemik iliği aspirasyon arşiv materyaline ulaşılarak DNA izolasyonu gerçekleştirildi ve elde edilen DNA konsantrasyonu 48 ng/ul olarak bulundu. Çalışmaya dahil edilen örneğin çalışma sonunda kalite skorlarını geçtiği görüldükten sonra analiz edildi. Analiz sonucunda hastada toplam 5 adet anlamlı mutasyon saptandı. Mutasyonlardan sadece 1 tanesinin VAF değeri %5'in altında iken; kalan mutasyonların VAF değeri %20'nin üstünde tespit edildi. Mutasyonlar Tablo 59 ve 60'da detaylı olarak verilmiştir. Hasta IPSS-M risk hesaplama programına göre değerlendirildiğinde çok yüksek risk grubu (IPSS-M risk skoru: 1.94) olarak değerlendirilmiştir. Hasta bu risk grubunda değerlendirilseydi

lösemisiz sağ kalım ortalama 0.76 yıl, genel sağ kalım ortalama 1 yıl ve 1 yılda AML dönüşüm riski %28.2 olarak beklenecekti.



Şekil 21. Hasta 13 IPSS-M risk skoru

Tablo 59. Hasta 13- VAF $\geq$ %2 - < %5 Mutasyon Listesi

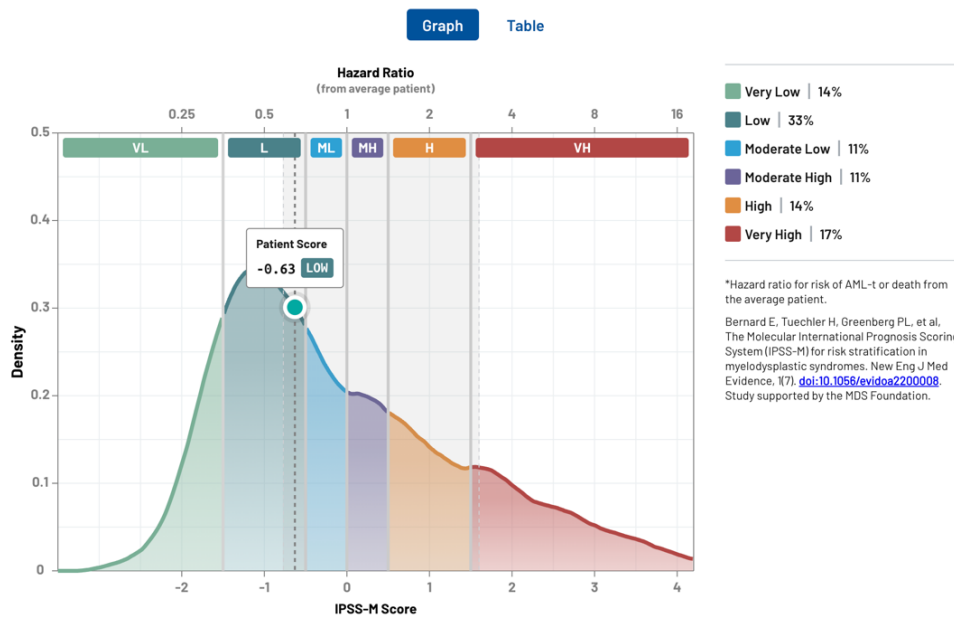
GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>SRSF2</i>	c.284C>A p.P95H	1825	%3	Tier 1

Tablo 60. Hasta 13- VAF %20 ve Üstü Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>RUNX1</i>	c.592G>A p.D198N	1830	%23	Tier 1
<i>ETV6</i>	c.460dup p.Glu154GlyfsTer3	247	%27	Tier 1
<i>U2AF1</i>	c.101C>T p.S34F	650	%34	Tier 1
<i>DNMT3A</i>	c.503del p.Gly168AlafsTer57	1412	%37	Tier 1

HASTA 14: 77 yaşında ek hastalık öyküsü olmayan kadın hasta 2019 Haziran tarihinde yapılan tetkiklerinde lökositöz saptanması üzerine detaylı incelemeye alınmıştır. Periferik yayması Hb:10.5 g/dL (11.7 – 16), WBC: 134 x10³/μL (4.5 – 11), Trombosit: 400 x10³/μL (150 – 400), Nötrofil: 111 x10³/μL (2.02 - 7.46) şeklinde sonuçlanmıştır. Kemik iliği aspirasyon biyopsisinde ise kemik iliği selülaritesi %100, granülositer seri hakimiyeti, eritroid seride görece azalma, megakaryositlerde belirgin artış, kümelenmeler ve displastik değişiklikler (bir kısmı küçük hipolobe/nonlobe, bazılarında multinükleasyon), diseritropoez ve %1 blastik hücre izlenmiştir. Hastanın karyotip ve FISH MDS paneli normal sonuçlanmıştır. Hastanın tanısı MDS/Myeloproliferatif neoplazi olarak konulmuş ve orta derece-1 risk grubunda değerlendirilmiştir. Tedavi olarak hidroksiüre ve ruksolutinib tedavisi uygulanmıştır. Hastanın Mart 2020’de ateş yüksekliği ve karın ağrısı nedeniyle genel durumunda kötüleşme sonrası hayatını kaybettiği öğrenilmiştir.

Hastanın Haziran 2019’da yapılan kemik iliği aspirasyon biyopsi örneğinden 35 ng/ul DNA izole edilmiştir ve çalışmaya alınmıştır. Çalışma sonrası hedeflenen parametrelere ulaşan örnek analize hazır hale gelmiştir. Analiz sonucunda hastada toplam 3 mutasyon görülmüştür. Mutasyonlardan iki tanesinin VAF değeri %5’in altında iken, diğer mutasyon VAF aralığı %10-20 arasında tespit edilmiştir. Mutasyonlar Tablo 61 ve 62’de belirtilmiştir. IPSS-M risk hesaplama programında hastanın risk grubu yeniden değerlendirildiğinde düşük risk grubu (IPSS-M skoru: -0.63) olarak bulunmuştur. Hasta bu risk grubunda değerlendirilseydi lösemisiz sağ kalım ortalama 5.9 yıl, genel sağ kalım ortalama 6 yıl ve 1 yılda AML dönüşüm riski %1.7 olarak beklenenecekti



Şekil 22. Hasta 14-IPSS-M risk skoru

Tablo 61.Hasta 14-VAF $\geq$ %2 - <%5 Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>SRSF2</i>	c.284C>A p.P95H	271	%3	Tier 1
<i>TP53</i>	c.234del p.Ala79LeufsTer44	877	%4	Tier 1

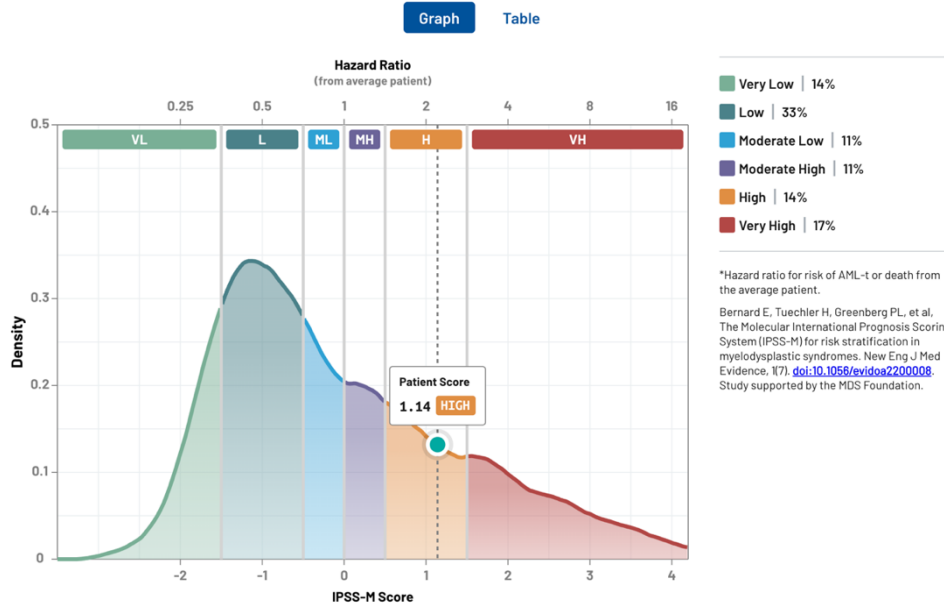
Tablo 62. Hasta 14-VAF $\geq$ %10 - <%20 Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>RUNX1</i>	c.1029_1030insT p.Asp344Ter	713	%16	Tier 1

HASTA 15: 61 yaşında Kronik Obstruktif Akciğer Hastalığı (KOAH) hastası erkek hasta Ocak 2017 tarihinde kilo kaybı ve gece terlemeleri nedeni ile tetkik edilmiştir. Tetkikler sonucunda anemi ve trombositopeni saptanması üzerine periferik yayma ve kemik iliği aspirasyon biyopsisi yapılmıştır. Periferik yaymasında yaymasında Hb:10.60 g/dL (11.7 – 16), WBC: 377.4 $\times 10^3/\mu\text{L}$ (4.5 – 11), Trombosit: 107 $\times 10^3/\mu\text{L}$ (150 – 400), Nötrofil: 25.47 $\times 10^3/\mu\text{L}$ (2.02 - 7.46) görülmüştür. Kemik iliği aspirasyon biyopsi sonucunda ise kemik iliği %90 oranında hiperselüler bulunmuştur. Ayrıca her 3 seride displazi bulguları ile birlikte %2 oranında blast görülmüştür. Hasta MDS multilineage displazi olarak tanı almış ve orta derece-1 risk grubunda değerlendirilmiştir. Tedavi olarak azasitin tedavisi almıştır. İzlemlerinde AML dönüşüm gerçekleşmemiştir ve hasta Aralık 2017 yılında pnömoni nedeniyle yatışı sırasında gelişen solunum yetmezliğine bağlı hayatını kaybetmiştir.

Hastanın MDS tanısı anında yapılan kemik iliği aspirasyon biyopsi örneğinden 47 ng/ul DNA izole edilerek çalışmaya dahil edilmiştir. Kalite skorlarını geçen çalışma analiz edilmiştir. Analiz sonucunda hastada 13 adet mutasyon görülmüştür. Saptanan mutasyonlar VAF'a göre gruplandırılığında %5'in altında 6 tane, %5 ve %10'un altında 3 tane, %10 ve %20'den küçük 1 adet, %20 ve üstünde ise 3 adet mutasyon bulunmaktadır. Mutasyonlar aşağıdaki tablolarda (Tablo 63-66) detaylı olarak verilmiştir. Hastanın risk durumu IPSS-M risk hesaplama programında hesaplandığında yüksek riskli (IPSS-M skoru:1.14) olarak bulunmuştur. Hasta bu

risk grubunda değerlendirilseydi lösemisiz sağ kalım ortalama 1.5 yıl, genel sağ kalım ortalama 1.7 yıl ve 1 yılda AML dönüşüm riski %14.3 olarak beklenenecekti.



Şekil 23. Hasta 15-IPSS-M risk skoru

Tablo 63. Hasta 15-VAF $\geq$ 2 - <%5 Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>BCOR</i>	c.3460G>T p.E1154*	263	%2	Tier 1
<i>DNMT3A</i>	c.1667+1G>A	401	%2,5	Tier 1
<i>STAG2</i>	c.913C>T - R305*	166	%3,6	Tier 1
<i>TET2</i>	c.4317del p.Lys1439AsnfsTer9	146	%4	Tier 1
<i>TET2</i>	c.2243T>A p.L748*	175	%4	Tier 1
<i>TET2</i>	c.4636C>T p.Q15446*	208	%4	Tier 1

Tablo 64. Hasta 15-VAF $\geq$ %5 - <%10 Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>BCOR</i>	c.165+1G>A	92	%5	Tier 1
<i>STAG2</i>	c.1751del p.Lys584ArgfsTer2	310	%5	Tier 1
<i>BRAF</i>	c.1742A>G p.N581S	703	%5	Tier 1

Tablo 65. Hasta 15-VAF $\geq$ %10 - <%20 Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>STAG2</i>	c.1196+2T>A	41	%12	Tier 1

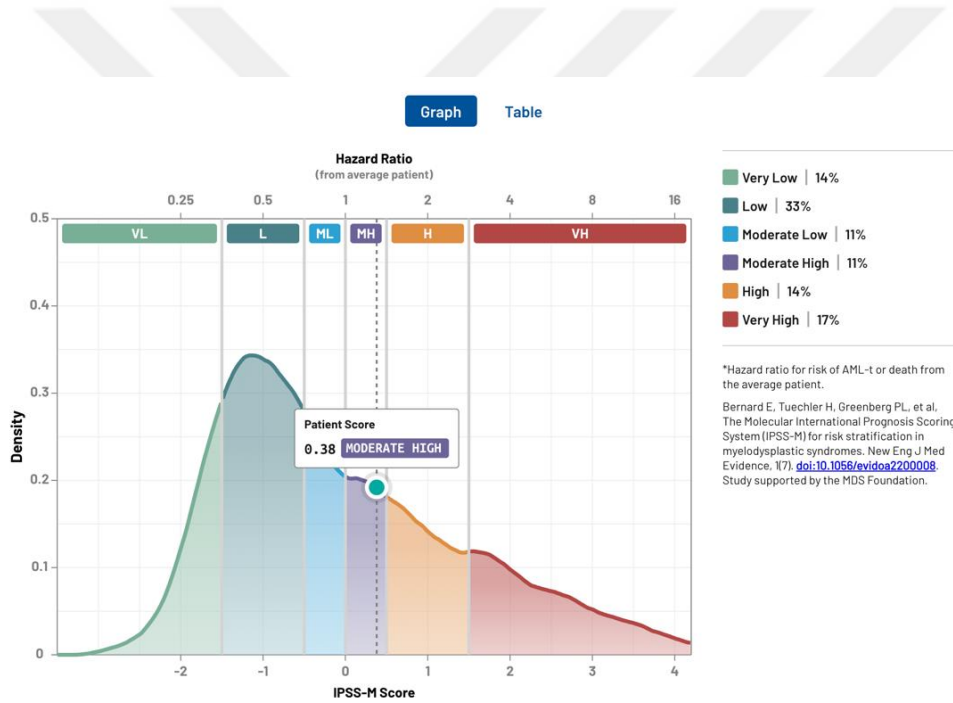
Tablo 66. Hasta 15-VAF $\geq$ %20 ve Üstü Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>ASXL1</i>	c.1900_1922del p.Glu635ArgfsTer15	2062	%25	Tier 1
<i>RUNX1</i>	c.493_494dup p.Arg166ValfsTer11	205	%33	Tier 1
<i>CBL</i>	c.1142G>A p.C381Y	334	%87	Tier 1

HASTA 16: 66 yaşında erkek hasta Temmuz 2016 yılında anemi nedeniyle tetkik edilmiştir. Periferik kan yaymasında Hb:9.61 g/dL (11.7 – 16), WBC: $5.17 \times 10^3/\mu\text{L}$ (4.5 – 11), Trombosit: $334 \times 10^3/\mu\text{L}$ (150 – 400), Nötrofil: $2.46 \times 10^3/\mu\text{L}$ (2.02 - 7.46) olarak tespit edilmiştir. Kemik iliği aspirasyon biyopsi sonucunda ise kemik iliği normoselüler (%30) bulunmuş ve diseritropoez ve dismegakaryopoez izlenmiştir. Ayrıca %3 civarında blast hücresine rastlanmıştır. Hastanın karyotip ve FISH sonuçları da normal olarak sonuçlanmıştır. Hastanın tanısı MDS refrakter anemi olarak konmuştur ve düşük risk grubunda değerlendirilmiştir. Hastanın takiplerine ait verilere sistemde ulaşılammıştır ve hangi tedaviyi

aldığına dair bilgiye erişilememiştir. Hastanın Ocak 2019 yılında hayatını kaybettiği öğrenilmiştir.

Hastanın kemik iliği aspirasyon örneğinden yapılan DNA izolasyonundan 44 ng/ul DNA elde edilmiştir ve çalışmaya alınmıştır. Çalışma sonucu istenilen kalite skorlarına ulaşan örnek analiz edilmiştir. Analiz sonucunda hastada 13 adet mutasyon görülmüştür. Mutasyonlar VAF'a göre sınıflandırıldığında; %5'in altında 5 mutasyon, %5 ve %10 arası 5 mutasyon, %10 ve %20 arası 1 mutasyon, %20 ve üstünde ise 2 mutasyon tespit edilmiştir. Mutasyonlar aşağıdaki tablolarda (Tablo 67-70) detaylı olarak verilmiştir. Hastanın risk grubu IPSS-M'e göre yeniden hesaplandığında orta-yüksek risk grubu (IPSS-M risk skoru:0.38) olarak değerlendirilmiştir. Hasta bu risk grubunda değerlendirilseydi lösemisiz sağ kalım ortalama 2.3 yıl, genel sağ kalım ortalama 2.8 yıl ve 1 yılda AML dönüşüm riski %9.5 olarak beklenenecekti.



Şekil 24. Hasta 16-IPSS-M risk skoru

Tablo 67. Hasta 16- VAF $\geq$ %2 - <%5 Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>EZH2</i>	c.139C>T p.Q47*	298	%2	Tier 1
<i>PTPN11</i>	c.1508G>T p.G503V	407	%2,4	Tier 1
<i>ASXL1</i>	c.3509del p.Leu1170Ter	204	%2,5	Tier 1
<i>ZRSR2</i>	c.328C>T p.Q110*	646	%3	Tier 1
<i>BCOR</i>	c.2319del p.Lys774SerfsTer12	137	%3	Tier 1

Tablo 68. Hasta 16- VAF $\geq$ %5 - <%10 Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>ASXL1</i>	c.2572C>T p.L1170*	749	%6	Tier 1
<i>DNMT3A</i>	c.2083-1G>A	852	%6	Tier 1
<i>GATA2</i>	c.1018-1G>A	625	%6	Tier 1
<i>STAG2</i>	c.2539C>T p.Q847*	62	%8	Tier 1
<i>WT1</i>	c.1423+1G>A	543	%8	Tier 1

Tablo 69. Hasta 16- VAF $\geq$ %10 - <%20 Mutasyon Listesi

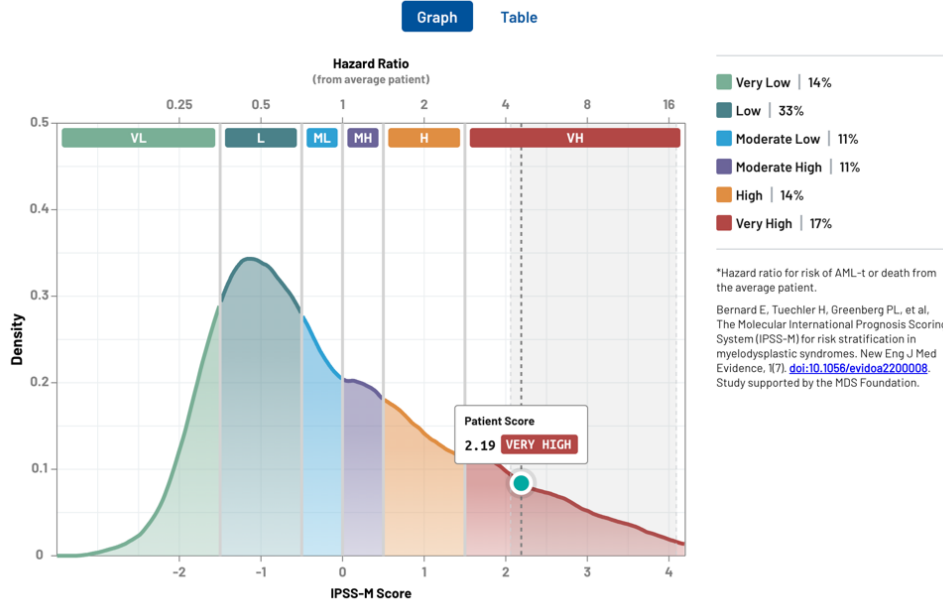
GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>EZH2</i>	c.598C>T p.Q200*	296	%13	Tier 1

Tablo 70. Hasta 16-VAF %20 ve Üstü Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>ASXL1</i>	c.2269dup p.Gln757ProfsTer17	839	%24	Tier 1
<i>DNMT3A</i>	c.1453C>T p.Q485*	421	%24	Tier 1

HASTA 17: 96 yaşında mide kanseri tanılı kadın hasta; rutin kontrollerinde hemoglobin düşüklüğü saptanması üzerine 2020 Nisan ayında hematoloji bölümüne yönlendirilmiş. Yapılan testlerde Hb:7.91 g/dL (11.7 – 16), WBC: 6.21 x10³/μL (4.5 – 11), Trombosit: 212 x10³/μL (150 – 400), Nötrofil: 3.67 x10³/μL (2.02 - 7.46) olarak bulunmuştur. Kemik iliği aspirasyon biyopsi örneğinde hiperselülarite (%65), eritroid seride belirginleşme, granülositer seri matür elemanlarında hipersegmentasyon, %7 lenfosit, %5 plazma hücresi, %2 blastik hücre izlenmiştir. Hastanın yapılan karyotip ve FISH MDS paneli normal sonuçlanmıştır. Hasta MDS refrakter anemi tanısı almıştır ve düşük risk grubunda değerlendirilmiştir. Hastaya destek tedavisi uygulanmıştır. Hastanın izlemlerinde AML gelişmemiştir. Hasta 2021 Eylül ayında hayatını kaybetmiştir.

Hastanın tanı sırasında yapılan kemik iliği aspirasyon materyali arşivden elde edilerek 43 ng/ul DNA izole edilmiştir. Çalışmaya alınan örnek; çalışma sonucunda kalite skorlarını geçmesi üzerine analiz edilmiştir. Analiz sonucunda hastada toplam 11 adet anlamlı varyant görülmüştür. Varyantlar allel fraksiyonuna göre gruplandırıldığında %5'in altında 10 tane, %5 ve %10'dan küçük 1 tane varyant tespit edilmiştir. Varyantlar Tablo 71 ve 72'de özetlenmiştir. Hasta IPSS-M risk skorlamasına göre değerlendirildiğinde çok yüksek risk grubunda (IPSS-M risk skoru: 2.19) bulunmuştur. Hasta bu risk grubunda değerlendirilseydi lösemisiz sağ kalım ortalama 0.76 yıl, genel sağ kalım ortalama 1 yıl ve 1 yılda AML dönüşüm riski %28.2 olarak beklenenecekti.



Şekil 25. Hasta 17-IPSS-M risk skoru

Tablo 71. Hasta 17-VAF $\geq$ 2 - <5 Mutasyon Listesi

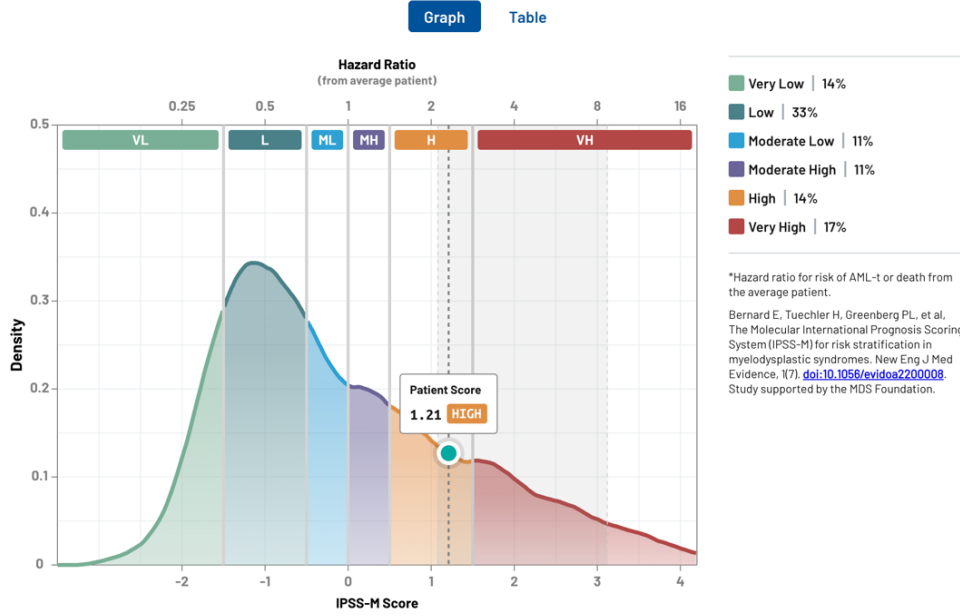
GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>EZH2</i>	c.280C>T p.Q94*	354	%2	Tier 1
<i>RUNX1</i>	c.5del p.Ala2ValfsTer17	1211	%2	Tier 1
<i>TET2</i>	c.3872G>A p.W1291*	242	%2	Tier 1
<i>ETV6</i>	c.460dup p.Glu154GlyfsTer3	287	%2	Tier 1
<i>BCOR</i>	c.3239-1G>A	305	%2	Tier 2
<i>U2AF1</i>	c.101C>T - S34F	736	%2	Tier 1
<i>BCOR</i>	c.811del p.Ser271ArgfsTer107	2590	%2,8	Tier 1
<i>TP53</i>	c.314G>A p.G105D	1871	%3	Tier 1
<i>SRSF2</i>	c.284C>A p.P95H	970	%3	Tier 1
<i>EZH2</i>	c.625+1G>A	143	%4	Tier 1

Tablo 72. Hasta 17 -VAF $\geq$ %5 - <%10 Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>DNMT3A</i>	c.503del p.Gly168AlafsTer57	1309	%5,5	Tier 1

HASTA 18: 77 yaşında psöriazis tanılı erkek hastanın öyküsünde çok kez metotreksat ve asitretin kullanımı olduğu bilinmektedir. Temmuz 2019 yılında yapılan kontrollerinde anemi ve trombositopeni saptanması üzere periferik yayma ve kemik iliği aspirasyon biyopsisi planlanmıştır. Periferik yaymasında Hb:8.66 g/dL (11.7 – 16), WBC: $6.78 \times 10^3/\mu\text{L}$ (4.5 – 11), Trombosit: $73 \times 10^3/\mu\text{L}$ (150 – 400), Nötrofil: $4.94 \times 10^3/\mu\text{L}$ (2.02 - 7.46) şeklinde görülmüştür. Kemik iliği aspirasyon biyopsi sonucunda %75 civarında selülarite (hiperselüler) kemik iliği ve her 3 seride görülen displazi bulguları tespit edilmiştir. Ayrıca %2 civarında blastik hücreye rastlanmıştır. Hastanın karyotip ve FISH MDS paneli normal olarak sonuçlanmıştır. Hasta MDS multilineage displazi olarak tanı almış ve orta derece-1 risk grubunda değerlendirilmiştir. Hastaya destek tedavisi uygulanmıştır. Hastanın takipleri sırasında AML dönüşümü gerçekleşmemiştir ve hasta tanı aldığı ay içerisinde hayatını kaybetmiştir.

Hastanın tanı sırasındaki kemik iliği örneği arşivden elde edilerek DNA izolasyonu yapılmıştır ve 43 ng/ul DNA elde edilmiştir. Çalışmaya alınan örnek kalite skorlarını geçmesi üzerine analize alınmıştır. Analizler sonucunda hastada 9 mutasyon saptanmıştır. VAF %5'in altında 4 mutasyon, %5-10 arasında 2 mutasyon, %10-20 arasında 1 mutasyon ve %20 üstü 2 mutasyon bulunmaktadır. Mutasyonlar detaylı olarak tablolarda (Tablo 73-76) verilmiştir. Hastanın risk grubu moleküler veriler ile yeniden değerlendirildiğinde yüksek risk (IPSS-M risk skoru:1.21) olarak tespit edilmiştir. Hasta bu risk grubunda değerlendirilseydi lösemisiz sağ kalım ortalama 1.5 yıl, genel sağ kalım ortalama 1.7 yıl ve 1 yılda AML dönüşüm riski %14.3 olarak beklenecekti.



Şekil 26. Hasta 18-IPSS-M risk skoru

Tablo 73. Hasta 18-VAF $\geq$ %2 - <%5 Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
BCOR	c.4526G>A p.W1509*	685	%2	Tier 1
RUNX1	c.1345C>T p.Q449*	1794	%2	Tier 1
TP53	c.672+2T>G	878	%2,5	Tier 1
EZH2	c.2075C>T - A692V	207	%3	Tier 1

Tablo 74. Hasta 18-VAF $\geq$ %5 - <%10 Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
ZRSR2	c.883C>T p.R295*	586	%5	Tier 1
ZRSR2	c.828-2A>T	298	%6	Tier 1

Tablo 75. Hasta 18- $\text{VAF} \geq 10\%$ - $< 20\%$ Mutasyon Listesi

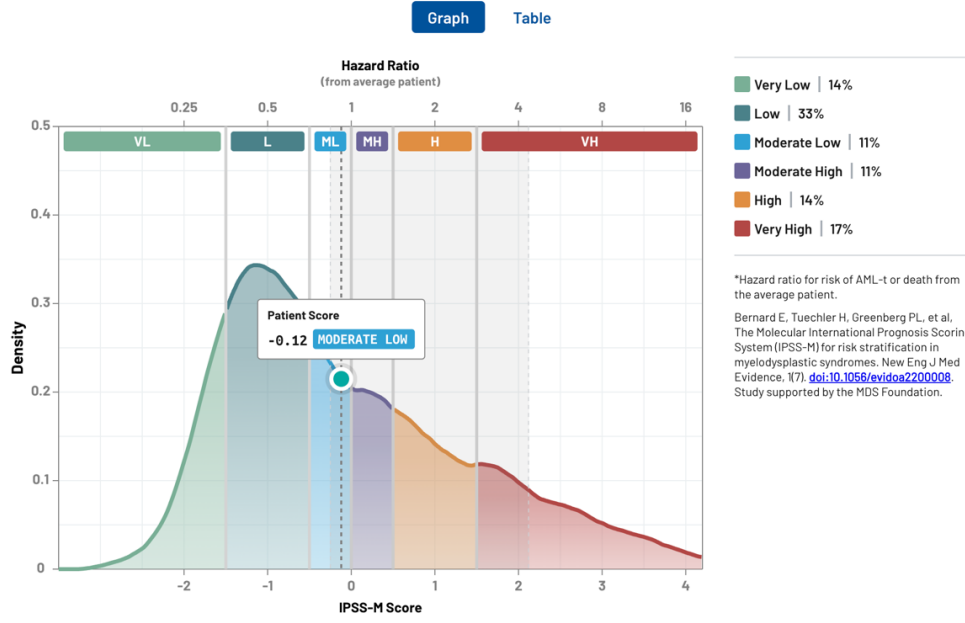
GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>ZRSR2</i>	c.920G>A - W307*	516	%11	Tier 1

Tablo 76. Hasta 18- $\text{VAF} \geq 20\%$ ve Üstü Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>SRSF2</i>	c.284C>A p.P95H	2531	%41	Tier 1
<i>TET2</i>	c.1342G>T p.E448*	668	%45	Tier 1

HASTA 19: 83 yaşında hipertansiyon, gut, koroner arter hastalığı ve kolon kanseri tanılı erkek hasta Temmuz 2019 tarihinde halsizlik, yorgunluk ve üşüme nedeni ile başvurusu sırasında anemi ve lökositoz saptanmıştır. İleri inceleme için hematolojiye yönlendirilen hastanın yapılan periferik yaymasında Hb:8.18 g/dL (11.7 – 16), WBC: $34.6 \times 10^3/\mu\text{L}$ (4.5 – 11), Trombosit: $166 \times 10^3/\mu\text{L}$ (150 – 400), Nötrofil: $22.9 \times 10^3/\mu\text{L}$ (2.02 - 7.46) şeklinde görülmüştür. Yapılan kemik iliği aspirayon biyopsisi ise hiperselüler kemik iliği (%97), dismegakaryopoez ve %1'in altında blast hücre görüldü şeklinde sonuçlanmıştır. Hastanın kemik iliğinden yapılan karyotip ve FISH MDS paneli normal gelmiştir. Hasta MDS/Myeloproliferatif neoplazi tanısı almıştır ve orta derece-1 risk grubunda değerlendirilmiştir. Tedavi olarak hastaya rüksolitin tedavisi başlanmıştır. Hastanın takipleri sırasında AML dönüşümü gerçekleşmemiştir ve 2021 Eylül ayında hayatını kaybetmiştir.

Hastanın yapılan kemik iliği aspirasyon biyopsi arşiv materyalinden 52 ng/ul DNA izole edilmiştir ve çalışmaya alınmıştır. Çalışma istenen kalite skorlarını geçtikten sonra analize alınmıştır. Analiz sonucunda hastada 5 adet mutasyon görülmüştür. Mutasyonlar VAF'a göre değerlendirildiğinde %5'in altında 2, %5-10 arası 1 ve %20 ve üstü 2 mutasyon saptanmıştır. Mutasyonlar tablolarda (Tablo 77-79) detaylıca verilmiştir. Hasta IPSS-M risk hesaplama programında mevcut bulgularıyla değerlendirildiğinde orta-düşük risk (IPSS-M risk skoru:-0.12) grubu olarak tespit edilmiştir. Hasta bu risk grubunda değerlendirilseydi lösemisiz sağ kalım ortalama 4.5 yıl, genel sağ kalım ortalama 4.6 yıl ve 1 yılda AML dönüşüm riski %4.9 olarak beklenecekti.



Şekil 27. Hasta 19-IPSS-M risk skoru

Tablo 77. Hasta 19-VAF $\geq$ %2 - <%5 Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>ASXL1</i>	c.3328C>T p.Q1110*	384	%2	Tier 1
<i>TP53</i>	c.313G>A p.G105S	1756	%3	Tier 1

Tablo 78. Hasta 19-VAF $\geq$ %5 - <%10 Mutasyon Listesi

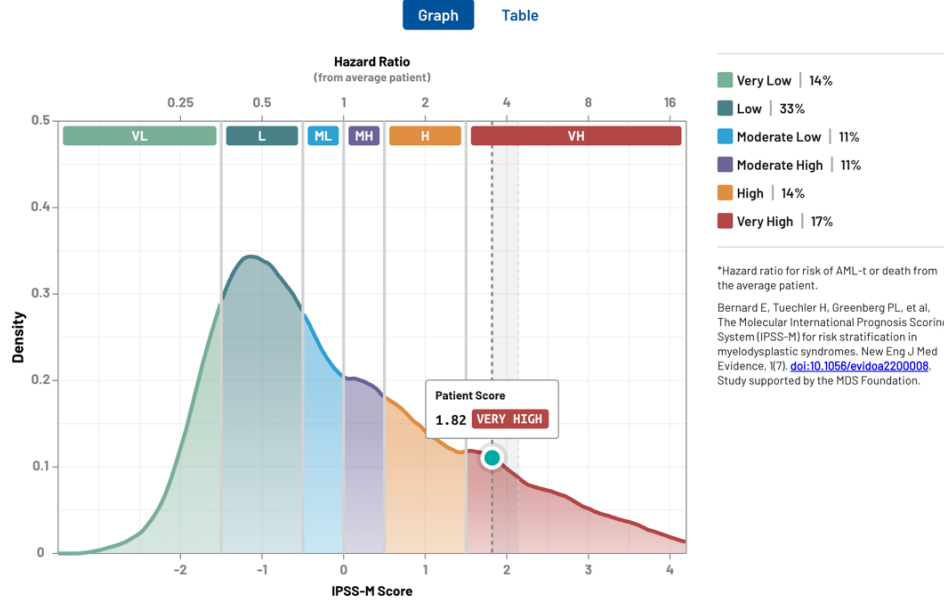
GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>DNMT3A</i>	c.503del p.Gly168AlafsTer57	1107	%6	Tier 1

Tablo 79. Hasta 19-VAF %20 ve Üstü Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>TET2</i>	c.3359T>A p.L1120*	22	%27	Tier 1
<i>TET2</i>	c.4481C>A S1494*	131	%34	Tier 1

HASTA 20: 83 yaşında hipertansiyon, KOAH ve kronik böbrek yetmezliği tanıları olan kadın hastaya Aralık 2018’de yapılan kemik iliği aspirasyon biyopsisi sonucunda MDS tanısı konulmuştur. Hastanın tanı aldığı sıradaki periferik yaymasında Hb:7.40 g/dL (11.7 – 16), WBC: 6.69 x10³/μL (4.5 – 11), Trombosit: 382 x10³/μL (150 – 400), Nötrofil: 4.69 x10³/μL (2.02 - 7.46) olarak görülmüştür. Kemik iliği aspirasyon biyopsi sonucunda kemik iliği normoselüler (%40) görünümde olup; diseritropoez ve dismegakaryopoez bulguları tespit edilmiştir. Ayrıca %2 civarında blastik hücreye rastlanmıştır. Hastanın genetik analizlerinde karyotip ve FISH MDS paneli normal sonuçlanmıştır. Hasta MDS refrakter anemi tanısı almış ve düşük risk grubu olarak değerlendirilmiştir. Hastaya eritropoetin tedavisi düzenlenmiştir. Hastanın takiplerinde AML dönüşümü olmamıştır. Hasta Temmuz 2021’de hayatını kaybetmiştir.

Hastanın tanı aldığı kemik iliği aspirasyon biyopsi arşiv örneğinden 42 ng/ul DNA izole edilmiştir ve çalışmaya alınmıştır. Çalışma sonunda kalite skorlarını geçen örnek analiz edilmiştir. Analiz sonucunda hastada toplam 20 mutasyon görülmüştür. Mutasyonlardan 15 tanesinin VAF değeri %5’in altındadır. %5 ve %10 arasında 4 adet, %10 ve üstü ise 1 adet mutasyon görülmüştür. Mutasyonlar aşağıdaki tablolarda (Tablo 80-82) detaylı olarak verilmiştir. Hastanın mevcut bulguları IPSS-M risk hesaplama programında çok yüksek risk (IPSS-M risk skoru: 1.82) olarak değerlendirilmiştir. Hasta bu risk grubunda değerlendirilseydi lösemisiz sağ kalım ortalama 0.76 yıl, genel sağ kalım ortalama 1 yıl ve 1 yılda AML dönüşüm riski %28.2 olarak beklenecekti.



Şekil 28. Hasta 20-IPSS-M risk skoru

Tablo 80. Hasta 20- VAF $\geq$ %2 - <%5 Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>ASXL1</i>	c.1867C>T p.Q623*	4956	%2	Tier 1
<i>ASXL1</i>	c.1867C>T p.Q623*	5254	%2	Tier 1
<i>TET2</i>	c.2233C>T p.Q745*	439	%2	Tier 1
<i>TET2</i>	c.3014del p.Lys1005ArgfsTer2	636	%2	Tier 1
<i>STAG2</i>	c.631C>T p.Q211*	1080	%2	Tier 1
<i>STAG2</i>	c.3426del p.Pro1143GlnfsTer17	643	%2	Tier 1
<i>TP53</i>	c.467G>A p.R156H	4606	%2	Tier 1
<i>TP53</i>	c.782G>A p.261N	1837	%2	Tier 1
<i>TP53</i>	c.460G>A p.G154S	5499	%2	Tier 2
<i>ZRSR2</i>	c.247C>T p.Q83*	588	%3	Tier 1
<i>TET2</i>	c.958G>T p.E320*	783	%3	Tier 1
<i>DNMT3A</i>	c.1319G>A p.W440*	978	%3	Tier 1
<i>STAG2</i>	c.1319G>A p.W440*	1011	%3	Tier 1
<i>STAG2</i>	c.1485G>A p.W495*	1114	%3	Tier 1
<i>TET2</i>	c.7C>T - Q3*	1084	%4	Tier 1

Tablo 81. Hasta 20- $\text{VAF} \geq 5\%$ - $< 10\%$ Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>TET2</i>	c.4807del p.Gln1603LysfsTer7	485	%5	Tier 1
<i>TP53</i>	c.848G>A p.R283H	1325	%5	Tier 1
<i>TP53</i>	c.517G>A p.V173M	3296	%6	Tier 1
<i>TP53</i>	c.676G>A p.G226S	1539	%8	Tier 2

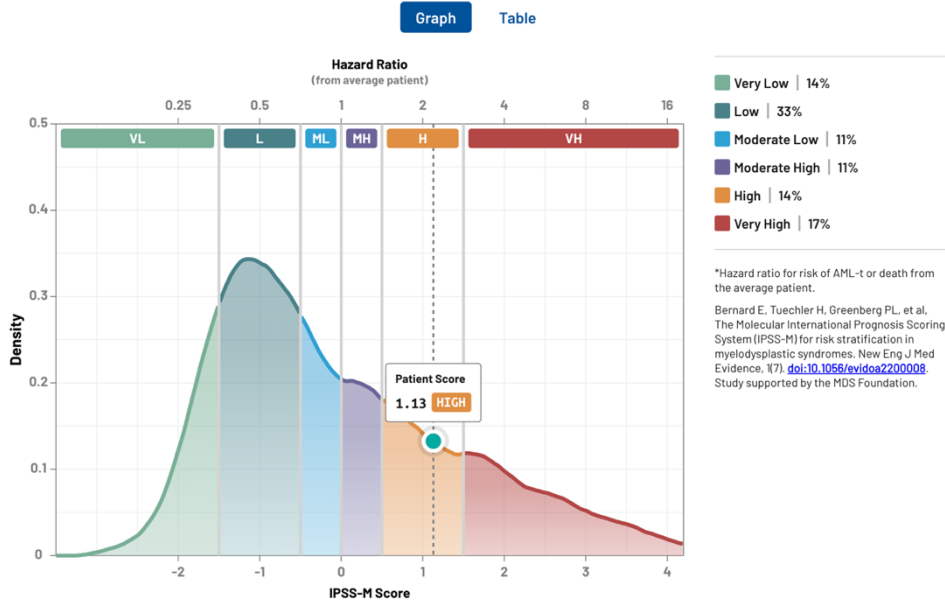
Tablo 82. Hasta 20- $\text{VAF} \geq 10\%$ - $< 20\%$ Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>TET2</i>	c.2525C>A p.S842*	1177	%15	Tier 1

HASTA 21: 77 yaşında hipertansiyon, kalp yetmezliği ve iskemik kalp hastalığı öyküsü olan erkek hasta 2017 yılında nefes darlığı, efor dispnesi şikayetleri nedeni ile kalp yetmezliği tanısı almış fakat aynı zamanda eşlik eden anemi görülmüştür ve detaylı incelemeler yapılmıştır. Periferik yaymasında Hb:9.54 g/dL (11.7 – 16), WBC: $5.47 \times 10^3/\mu\text{L}$ (4.5 – 11), Trombosit: $206 \times 10^3/\mu\text{L}$ (150 – 400), Nötrofil: $3.84 \times 10^3/\mu\text{L}$ (2.02 - 7.46) bulunmuştur. Yapılan kemik iliği aspirasyon biyopsisinde ise %70 civarında selülarite, diseritropoez ve %2 oranında blast görülmüştür. Hasta MDS refrakter anemi tedavisi almış ve düşük risk grubunda değerlendirilmiştir. Tedavi olarak eritropoetin tedavisi almıştır. Hastanın takiplerinde AML dönüşümü olmamıştır ve hasta Ağustos 2018 yılında hayatını kaybetmiştir.

Hastanın 2017 yılında yapılan kemik iliği biyopsi materyalinden 25 ng/ul DNA izole edilerek çalışmaya alınmıştır. Çalışma hedeflenen kalite parametrelerini geçtikten sonra analiz edilmiştir. Analiz sonucunda hastada 4 adet mutasyon saptanmıştır ve saptanan mutasyonların hepsinde varyant allel fraksiyonu %20'nin üstünde bulunmuştur. Tablo 83'de saptanan mutasyonlar listelenmiştir. Hasta IPSS-M risk hesaplamasına göre yüksek risk (IPSS-M skoru 1.13) olarak değerlendirilmektedir. Hasta bu risk grubunda değerlendirilseydi lösemisiz sağ

kalım ortalama 1.5 yıl, genel sağ kalım ortalama 1.7 yıl ve 1 yılda AML dönüşüm riski %14.3 olarak beklenecekti.



Şekil 29. Hasta 21-IPSS-M risk skoru

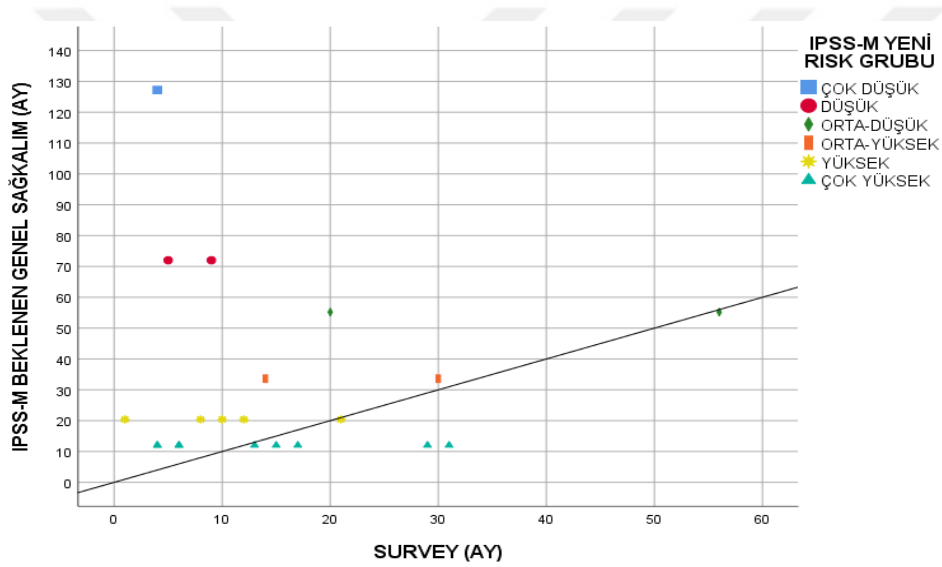
Tablo 83. Hasta 21-VAF %20 ve Üstü Mutasyon Listesi

GEN	MUTASYON	OKUMA DERİNLİĞİ	ALLEL FRAKSİYONU	TİER SINIFLAMASI
<i>BCOR</i>	c.2542C>T p.Q848*	21	%29	Tier 1
<i>TP53</i>	c.356C>T p.A119V	601	%35	Tier 2
<i>TP53</i>	c.356C>T p.A119V	2073	%38	Tier 2
<i>PTPN11</i>	c.215C>T p.A72V	22	%41	Tier 1

4.3 İstatistiksel analiz sonuçları

Hastaların yeni belirlenen IPSS-M risk gruplarının literatürde verilen beklenen sağ kalım oranları ile gerçek sağ kalımları arasında Wilcoxon işaretli sıralar testi kullanılarak karşılaştırma yapılmıştır. Karşılaştırma sonucunun grafiği Şekil 32’de ve tabloda detaylı olarak verilmiştir.

IPSS-M’de beklenen genel sağ kalımlar; çok düşük risk grubunda 127.2 ay, düşük risk grubunda 72 ay, orta düşük risk grubunda 55.2 ay, orta yüksek risk grubunda 33.6 ay, yüksek risk grubunda 20.4 ay ve çok yüksek risk grubunda ise 12 aydır(11).



Şekil 30. IPSS-M beklenen genel sağ kalım ve yaşam süresi karşılaştırma grafiği

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda popülasyondaki hastalarda gerçek yaşam süreleri; IPSS-M beklenen genel sağ kalımlarından anlamlı derecede düşük olarak bulunmuştur. (Tablo 84)

Tablo 84. IPSS-M beklenen genel sağ kalım ve gerçek sağ kalım karşılaştırma tablosu

IPSS-M Beklenen Genel Sağ kalım(Ay) – Gerçek Sağ kalım (AY)		N (Sayı)	Ortalama	Toplam
	Negatif Sıralama	7 ^a	6.43	45,00
	Pozitif Sıralama	14 ^b	13,29	186,00
	Aynı Değer	0		
	Total	21		
a. IPSS-M BEKLENEN GENEL SAĞ KALIM (AY) < SURVEY (AY) b. IPSS-M BEKLENEN GENEL SAĞ KALIM (AY) > SURVEY (AY) c. IPSS-M BEKLENEN GENEL SAĞ KALIM (AY) = SURVEY (AY) Z: -2.451, P değerı: 0,014				

Hastaların belirlenen yeni risk grupları tek tek kendi içerisinde IPSS-M beklenen genel sağ kalım ve gerçek sağ kalım açısından değerlendirildiğinde risk grupları karşılaştırılmıştır. (Tablo 85) Risk grupları arasında tek tek yapılan beklenen genel sağ kalım ve gerçek sağ kalımları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark elde edilememiştir. (Tablo 86)

Tablo 85. Hastaların yeni belirlenen risk gruplarına göre beklenen genel sağ kalım ve gerçek sağ kalım karşılaştırılması

IPSS-M YENİ RISK GRUBU			N	Ortalama	Toplam
DÜŞÜK	IPSS-M BEKLENEN	Negatif Sıralama	0 ^a	0,00	0,00
	GENEL SAĞ KALIM (AY)- SURVEY (AY)	Pozitif Sıralama	2 ^b	1,50	3,00
		Aynı Değer	0 ^c		
		Total	2		
ORTA- DÜŞÜK	IPSS-M BEKLENEN	Negatif Sıralama	1 ^a	1,00	1,00
	GENEL SAĞ KALIM (AY)- SURVEY (AY)	Pozitif Sıralama	1 ^b	2,00	2,00
		Aynı Değer	0 ^c		
		Total	2		
ORTA- YÜKSEK	IPSS-M BEKLENEN	Negatif Sıralama	0 ^a	0,00	0,00
	GENEL SAĞ KALIM (AY)- SURVEY (AY)	Pozitif Sıralama	2 ^b	1,50	3,00
		Aynı Değer	0 ^c		
		Total	2		
YÜKSEK	IPSS-M BEKLENEN	Negatif Sıralama	1 ^a	1,00	1,00
	GENEL SAĞ KALIM (AY) SURVEY (AY)	Pozitif Sıralama	4 ^b	3,50	14,00
		Aynı Değer	0 ^c		
		Total	5		
ÇOK YÜKSEK	IPSS-M BEKLENEN	Negatif Sıralama	5 ^a	4,60	23,00
	GENEL SAĞ KALIM (AY)- SURVEY (AY)	Pozitif Sıralama	4 ^b	5,50	22,00
		Aynı Değer	0 ^c		
		Total	9		
a. IPSS-M BEKLENEN GENEL SAĞ KALIM (AY) < SURVEY (AY)					
b. IPSS-M BEKLENEN GENEL SAĞ KALIM (AY) > SURVEY (AY)					
c. IPSS-M BEKLENEN GENEL SAĞ KALIM (AY) = SURVEY (AY)					

Tablo 86. Hastaların beklenen sağ kalım ve yaşam sürelerinin istatistiksel karşılaştırması

IPSS-M YENİ RISK GRUBU		IPSS-M BEKLENEN GENEL SAĞ KALIM (AY) - SURVEY (AY)
DÜŞÜK	Z	-1.342 ^b
	Asymp. Sig. (2-tailed)	0,180
ORTA-DÜŞÜK	Z	-.447 ^b
	Asymp. Sig. (2-tailed)	0,655
ORTA-YÜKSEK	Z	-1.342 ^b
	Asymp. Sig. (2-tailed)	0,180
YÜKSEK	Z	-1.753 ^b
	Asymp. Sig. (2-tailed)	0,080
ÇOK YÜKSEK	Z	-.059 ^c
	Asymp. Sig. (2-tailed)	0,953

Blast oranı (%0-2, %2-5, %5-10) ile belirlenen VAF oranları arasındaki mutasyon sayısının ilişkisini değerlendirmek için Kruskal-Wallis Testi kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki tablolarda verilmiştir (Tablo 87). Yapılan istatistiksel test sonucunda her iki grup arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır (Tablo 88).

Tablo 87. Blast oranı ve belirli VAF aralıklarındaki mutasyon sayıları tablosu

BLAST ORANI		N	Ortalama
VAF $\geq$ %2 - < %5 Mutasyon sayısı	$0 \leq X \leq 2$	14	10,46
	$2 < X < 5$	3	12,50
	$5 \leq X \leq 10$	4	11,75
	Total	21	
VAF $\geq$ %5 - < %10 Mutasyon sayısı	$0 \leq X \leq 2$	14	9,18
	$2 < X < 5$	3	17,83
	$5 \leq X \leq 10$	4	12,25
	Total	21	
VAF $\geq$ %10 - < %20 Mutasyon sayısı	$0 \leq X \leq 2$	14	10,89
	$2 < X < 5$	3	12,83
	$5 \leq X \leq 10$	4	10,00
	Total	21	
VAF $\geq$ %20 Mutasyon sayısı	$0 \leq X \leq 2$	14	10,00
	$2 < X < 5$	3	12,33
	$5 \leq X \leq 10$	4	13,50
	Total	21	

Tablo 88. Blast oranı ile belirli VAF değerleri arasındaki istatistiksel test sonuçları

	VAF $\geq$ %2 - < %5 Mutasyon sayısı	VAF $\geq$ %5 - < %10 Mutasyon sayısı	VAF $\geq$ %10 - < %20 Mutasyon sayısı	VAF $\geq$ %20 Mutasyon sayısı
Kruskal-Wallis	0,340	5,179	0,476	1,381
H				
df	2	2	2	2
Asymp. Sig.	0,844	0,075	0,788	0,501

5.TARTIŞMA

Miyelodisplastik sendrom; kemik iliği yetmezliğine bağlı olarak gelişen ve akut miyeloid lösemi dönüşüm riski olan klonal hematopoetik bir hastalıktır. Miyelodisplastik sendromun klinik spektrumu oldukça geniş olduğu için özellikle AML dönüşüm riski yüksek olan ve kötü prognozlu hastaları ön görebilmek kritik önem taşımaktadır. Hastalığın gidişatını tahmin etmek için çeşitli prognostik skorlama sistemleri (IPSS, IPSS-R, WPSS) geliştirilmiştir (37–39). Genellikle prognostik skorlama sistemleri; sitopeni varlığı, kemik iliği blast oranı ve sitogenetik bulguları dikkate alarak oluşturulmuştur. Belirtilen parametreler kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda hasta kabaca düşük, orta ve yüksek risk olarak gruplanır. Son yıllarda yapılan araştırmalarda moleküler parametrelerinin de sağ kalım üzerinde etkisinin olduğu gösterilmiştir (5,7,36). Günümüzde genetik testlerin gelişmesinin hız kazanması ve kullanımının yaygınlaşmasıyla klasik prognostik skorlama sistemlerine moleküler belirteçler dâhil edilmeye ve yeni prognostik skorlama sistemleri geliştirilmeye başlanmıştır (9–11). Ulusal Kapsamlı Kanseri Ağı (NCCN, The National Comprehensive Cancer Network), MDS güncel kılavuzunda yeni geliştirilen prognostik skorlama sistemi olan IPSS-M'e yer vermiştir ve kılavuzda hastalar için karyotip testine ek olarak mutlaka moleküler testlerin yapılmasını önermektedir (4). Moleküler profillemeye güncel kılavuzlarda yerini alsa da ne yazık ki günümüzde rutin pratikte yaygın kullanılmamaktadır. Çalışmamız; ülkemizde yapılan düşük riskli MDS grubunda ilk moleküler profillemenin ve IPSS-M'in kullanılarak yeni risk grubu değerlendirmesinin yapıldığı ilk çalışma niteliğini taşımaktadır. Çalışmamızda daha önceden düşük riskli olarak tanımlanan, karyotip ve FISH bulguları normal fakat takiplerinde hayatını kaybettiği belirlenen 21 hastanın tanı anındaki kemik iliği aspirasyon örnekleri (Patoloji arşivinden taranarak) incelenmiştir. IPSS-M skorlama programına; hastaların çalışma sonucunda elde edilen moleküler veriler ve mevcut olan klinik bulguları girilerek yeni risk grupları oluşturulmuştur. Yapılan değerlendirme sonucunda çalışma grubumuzdaki düşük riskli 16 hasta (%76) yüksek risk gruplarına (orta yüksek (OY), yüksek (Y), çok yüksek (ÇY) geçiş göstermiştir.

Miyelodisplastik sendrom risk sınıflamasında moleküler yöntemlerin prognostik skorlama sistemlerine ilave edilerek risk gruplarını nasıl değiştirebileceğini gösteren oldukça çeşitli çalışmalar literatürde güncel olarak mevcuttur (9–11). IPSS-M skorlamasının oluşturulduğu çalışmada 2957 hasta ve 157 genlik panel kullanılarak hastaların lösemisiz sağ kalım, genel sağ kalım ve lösemi dönüşümü incelenmiştir. Yapılan istatistiksel analizlerde belirtilen klinik parametrelerle korelasyon gösteren 31 gen tespit edilmiştir. Geliştirilen skorlama sisteminde ayrıca hematolojik parametreler ve sitogenetik risk kategorileri de

kullanılarak 6 risk grubu oluşturulmuştur. Analizler sonucunda IPSS-R'a kıyasla hastaların %46'sında yeniden risk sınıflandırması gerçekleşmiş ve bu hastalar içerisinde de %74'ünde daha yüksek riskli gruba geçiş görülmüştür. Çalışmadaki validasyon kohortunda da, IPSS-M skorlaması uygulandığında hastaların %42'sinin risk grubunun değiştiği görülmüştür (11).

Düşük riskli MDS hastalarının (181 hasta) kullanıldığı bir başka çalışmada da 40 genlik panel kullanılarak moleküler parametrelerin klinik ile ilişkisi araştırılmıştır. Çalışmadaki hastaların IPSS'e göre orta derece-1 hasta yüzdesi %53, IPSS-R'a göre ise bu hastalar (%53'lük) içerisinde %7'si yüksek riskli olarak bulunmuştur. Bu çalışmadaki hastalara ait veriler kullanılarak IPSS-M risk skorlaması yapıldığında ise bu gruptaki hastaların yaklaşık üçte birinde yüksek riskli gruplara geçiş gözlenmiştir (81).

IPSS-M ile yeniden risk hesaplaması yapan literatürdeki bir başka çalışmada ise 852 de novo MDS hastası ve sağ kalımları incelenmiştir. Hastalarda 141 ve 267 genlik iki ayrı panel uygulanmıştır. Elde edilen moleküler veriler IPSS-M programında birleştirildiğinde 351 hastanın (%41) risk gruplarının değiştiği görülmüştür. Bu hastalar içerisinde %76'sının risk grubunun yükseldiği; %34'ünün ise risk grubunun düştüğü belirtilmiştir. IPSS-R verileri kullanılarak yapılan karşılaştırma sonuçlarında ise IPSS-R düşük risk kategorisinde bulunan 83 hastanın (%45) IPSS-M'de daha yüksek riskli gruba (OY-Y-ÇY) geçtiği; IPSS-R orta risk grubundaki %34 hastanın IPSS-M yüksek ve çok yüksek risk grubuna geçtiği gösterilmiştir (84). Çalışmamızda VAF oranları %2, 5, 10 ve 20 üstü olacak gruplandırılmıştır. IPSS-M'de kullanılan ve bizim çalışmamızdaki esas kriter olarak belirlenen VAF değeri %2 üstü olarak kabul edildiğinde hasta popülasyonumuzda literatür verilerinden daha yüksek oranda risk değişiklikleri tespit edilmiştir. Çalışmadaki düşük (7) ve orta derece-1 (14) risk grubundaki hastalar içerisinde toplamda 16 hasta (%76); tek tek incelendiğinde ise 9 hasta (%45) çok yüksek risk, 5 hasta (%23) yüksek, 2 hasta (%9.5) ise orta-yüksek risk grubuna geçmiştir. VAF oranı sadece %20'nin üstünde mutasyonlar hesaplandığında mutasyon saptanan toplam hasta sayısı 11'dir. Bu hastalar içerisinde moleküler profillemeye sonrasında yapılan IPSS-M risk skorlamasında; 4 hasta çok yüksek risk grubuna, 3 hasta yüksek risk grubuna, 1 hasta orta-yüksek risk grubuna, 2 hasta orta-düşük risk grubuna ve 1 hastada düşük risk grubuna geçmiştir. Total olarak bakıldığında VAF %20 üstünde mutasyon saptanan 8 hasta (%72); IPSS-M sınıflamasında yüksek riskli grupta (OY-Y-ÇY) değerlendirilmiştir. VAF oranı %5 ve üstü mutasyonlar IPSS-M'e girildiğinde 3 hasta orta yüksek, 4 hasta yüksek, 3 hasta çok yüksek risk grubu olarak değerlendirilmiştir. VAF %10 üstü alındığında ise 1 hasta orta yüksek, 2 hasta yüksek, 2 hasta çok yüksek riskli olarak hesaplanmıştır. Bu verilere bakılarak VAF alt değeri yükseldikçe yüksek riskli gruptaki (OY-Y-ÇY) hasta sayısı azalmakta olduğu görülmektedir. VAF %5'te 10 hasta (%48), VAF %10 ve %20'de beşer hasta (%24) daha yüksek risk gruplarına

geçiş göstermiştir. Literatürdeki çalışmalara kıyasla çalışmamızdaki yüksek riskli gruplara geçiş oranının daha yüksek olması; hasta popülasyonun seçilmiş olmasına yani düşük riskli olup hayatını kaybeden hastalar içerisinde belirlenmesine bağlı olabileceği düşünülmüştür. Literatürdeki çalışmalarda genellikle başlangıçta risk grubuna bakılmadan her risk grubuna ait hasta verileri toplanmaktadır.

Miyelodisplastik sendromlu hastalarda yapılan çeşitli moleküler çalışmalar sonucunda özellikle bazı genlerin daha kısa sağ kalımla ilişkilendirildiği bilinmektedir. Örnek olarak bir çalışma sonucunda *TP53* ve *EZH2*'nin kısa sağ kalım ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (5). Ayrıca NCCN, MDS kılavuzunda bağımsız kötü prognoz kısa sağ kalım göstergesi olan 5 geni (*TP53*, *EZH2*, *ASXL1*, *RUNX1* ve *ETV6*) belirtmiştir (70). Çalışma grubumuz içerisinde; *TP53* geninde 14 hastada (%67) 28 mutasyon, *RUNX1* geninde 10 hastada (%48) 12 mutasyon, *ASXL1* geninde 9 hastada (%43) 14 mutasyon, *EZH2* geninde 8 hastada (%38) 10 mutasyon ve *ETV6* geninde 3 hastada (%14) 3 mutasyon görülmüştür. Çalışma grubumuzdaki hastalar düşük ve orta derece-1 risk grubundaki hastalar içerisinde seçilmesine rağmen; azımsanmayacak sayıda hastada, NCCN MDS kılavuzunda bağımsız kötü prognoz genleri olarak belirtilen genlerde mutasyon görülmüştür. Bu durum da aslında düşük riskli hasta gruplarında moleküler profillemenin önemine işaret etmektedir.

Bir başka çalışmada IPSS-R verilerine moleküler parametrelerin eklenmesiyle geliştirilen MIPSS-R sisteminde hastaların %57,41'inde risk grubunun değiştiği ve %38,71'inin ise erken tedavi seçeneklerinden fayda görebileceği bildirilmiştir (7). Düşük riskli 159 MDS hastasında; MDS ile ilişkili 15 genlik panel uygulanan bir başka çalışmada kısa sağ kalım ile ilişkilendirilen genler *ASXL1*, *RUNX1*, *EZH2*, *TP53*, *JAK2*, *IDH2* ve *TET2* olmuştur. Çalışmamızdaki hastalar içerisinde *JAK2* geninde mutasyon saptanan hasta olmamıştır. *IDH2* geninde 1 hastada (%5) 1 mutasyon görülmüştür. *TET2* geninde ise 14 hastada (%67) 37 mutasyon saptanmıştır.

Bu çalışmada ayrıca hastalardaki mutasyon sayısının artışına bağlı olarak sağ kalımın azaldığı gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada geliştirilen yeni prognostik sistemde; *ASXL1*, *TP53*, *JAK2* ve *TET2*-VAF $\geq$ %18 mutasyonel durumunun var olup olmaması IPSS ile entegre edilmiştir ve %10 hasta daha yüksek risk grubunda değerlendirilmiştir (85). Güncel bir başka çalışmada 201 MDS hastası ve 115 validasyon hasta grubuna ait klinik veriler ile MDS ilişkili 18 gen arasındaki ilişki Cox regresyon analizi ile incelenmiştir. Bu çalışma sonucunda yaş, kemik iliği blast oranı, *ETV6*, *TP53*, *EZH2* ve *ASXL1* genlerindeki mutasyonlar anahtar prognostik faktörler olarak belirlenmiştir (86). Bu veriler ışığında çalışma grubumuzdaki hastalarda karyotip ve FISH analizine ek olarak moleküler testler yapılmış olsa idi prognoz

tahminleri daha iyi ön görülerek farklı agresif tedavi seçenekleri ile en azından belli bir hasta grubunun sağ kalımlarını uzatmak sağlanabilecekti.

Çalışmamızdaki hastalarda saptanan mutasyonlar değerlendirilirken VAF oranlarına göre yaklaşım sergilenmiştir. Bu şekilde yaklaşmamızın nedeni literatürde alt sınır olarak belirtilen VAF değerlerinin farklılığıdır. IPSS-M çalışması sonucunda VAF değerlerinin gen etkileşimi açısından anlamlı olmadığı gösterilmiş ve bu nedenle VAF %2'nin üstünde saptanan mutasyonların hepsi var ya da yok olarak ikili değişken olarak hesaplanmıştır (11). Ayrıca literatür verileri incelendiğinde VAF sınırını %2 olarak kabul eden çeşitli çalışmalar da mevcuttur (87,88). Bir başka çalışmada; MDS hastalarında moleküler ve klinik verilerin kullanılması ile geliştirilmiş farklı bir kişiselleştirilmiş tahmin modelinde VAF sınırı %5 olarak alınmıştır (10). Retrospektif olarak 2355 MDS hastasının klinik, sitogenetik ve moleküler verilerinin incelendiği ve IPSS-M'in uygulandığı bir başka çalışmada VAF değerinin sınırı %5 olarak alınmıştır (89). Güncel bir başka çalışmada ise MDS hastaları için uygulanan miyeloid mutasyon panellerinin faydası araştırılırken VAF değerlerinin %10 ve %20 olarak sınır kabul edildiği pozitif prediktif değerleri karşılaştırılmıştır ve %10 VAF değerinin daha yüksek prediktif değere sahip olduğu belirtilmiştir (90). MDS hastalarında saptanan mutasyonların sahip olduğu VAF değerlerinin prognoza katkısı oldukça merak konusudur. Literatürde yer alan bir çalışmada 382 hastada yeni tanı MDS hastasına NGS paneli yapılarak mutasyon VAF değerlerinin prognoza etkisi araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda *EZH2* ve *NRAS* genlerinin VAF'dan bağımsız kötü prognoz göstergesi olduğu; *TET2* geni mutasyonu için VAF değerinin $\geq\%32$, *TP53* için VAF $\geq\%27$ mutasyon varlığında kısa sağ kalım ve *SF3B1* geni için VAF $\geq\%15$ mutasyon varlığında iyi prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (91). Bir başka çalışmada ise kompleks karyotip yokluğunda VAF $<\%10$ altında olan *TP53* mutasyonlarının wild-type *TP53* taşıyıcıları ile karşılaştırıldığında sağ kalım açısından farklılık olmadığı ve bu nedenle kliniğin VAF $>\%10$ *TP53* taşıyıcılarına göre daha iyi gittiği belirtilmiştir (88). Yapılan çalışmalara bakıldığında MDS'de moleküler analiz ve yorumlama kısmında VAF değerleri ile ilgili kabul gören ortak bir değer bulunmadığı görülmektedir. MDS'de moleküler analizlerin hangi testlerle, hangi genler ve hani filtrelemelerle yapılması gerektiği ile ilgili henüz bir rehber oluşturulmamıştır. VAF değerlerinin; klinik yorumlamalar açısından genler arasında bile farklılık gösterdiği vurgulanmaktadır. Literatürdeki VAF ile ilgili kabul gören farklı değerlerden ve yaklaşımlardan yola çıkarak; çalışmamızda varyantları değerlendirirken VAF değerlerine göre gruplama yapılmıştır.

Miyelodisplastik sendromda en sık mutasyona uğrayan genler RNA uçbirleştirme (splicing) (%60) ve DNA metilasyon (%30-40) genleri olarak bilinmektedir (71). Çalışmamızda 21 hastada; alt sınır VAF %2 olarak kabul edildiğinde toplamda 222 mutasyon (20 hasta-%95),

VAF %5 kabul edildiğinde 84 mutasyon (20 hasta-%95), VAF %10 kabul edildiğinde 35 mutasyon (13 hasta-%62) ve VAF %20 olarak alındığında 24 mutasyon (10 hasta-%48) saptanmıştır. VAF %2 olarak alındığında en sık mutasyona uğrayan genler sırasıyla *DNMT3A*, *BCOR* ve *TET2*; VAF %5'in üstünde *DNMT3A*, *TET2*, *BCOR*; VAF %10 üstünde *TET2*, *STAG2*, *ASXL1*; %20 üstünde ise *TET2*, *ASXL1* ve *BCOR* genleri olduğu görülmüştür. (Detaylı olarak Tablo 26'da verilmiştir.) Bu veriler değerlendirildiğinde hasta popülasyonumuzdaki en sık mutasyona uğrayan gen grubu DNA metilasyon (71 mutasyon-%32) ve histon modifikasyonu (44 mutasyon-%20) genlerinde görülmüştür. Bu veriler literatür verilerinden farklı bulunmuştur çünkü hasta popülasyonumuzdaki mutasyon listesinde uçbirleştirme (splice) faktör genlerindeki mutasyon sayısı 25 (%11) olarak bulunmuştur. RNA uçbirleştirme (splicing) genlerindeki mutasyonların daha çok hastalığın erken evresinde görüldüğü ve daha sık olarak görüldüğü, ayrıca histon modifikasyonu gen mutasyonlarının da geç evrede olduğu bilinmektedir (71). Hasta popülasyonumuzda RNA uçbirleştirme genlerinde daha az oranda mutasyon saptanması hastalarımızın daha çok geç evrede yakalanmış olabileceğini göstermektedir. Yine aynı şekilde histon modifikasyonu ile ilişkili gen mutasyonlarının da sık görülmesi hasta popülasyonumuzun geç evrede olabileceğinin göstergesidir. Bunun yanında bu farklılığın bir diğer sebebi Türk popülasyonuna özgü bir fark da olabilir. Türk popülasyonunda buna benzer çalışma olmadığı için bunun karşılaştırması yapılamamıştır. Ayrıca MDS hastalarında DNA metilasyon ve histon modifikasyonları genlerinin sıklıkla mutasyona uğraması hastalığın gelişiminde epigenetik mekanizmaların da etkili olduğunun kanıtıdır.

Çalışmamızda hastalarda saptanan mutasyonlar VAF oranlarına göre değerlendirilip, hangi VAF aralığının moleküler incelemelerde dikkate alınması gerektiği de araştırılmak istenmiştir. Moleküler analizler sonucunda saptanan mutasyonlar; Tier 1 ve Tier 2 grubunda olup ONCOKB ve COSMIC veri tabanları kullanılarak seçilmiştir. Etkin VAF aralığını tespit etmek adına istatistiksel çalışma yapılmıştır. VAF aralıklarına göre saptanan mutasyon sayılarının blast oranı ve AML dönüşüm ilişkisi incelenmiştir fakat istatistiksel anlamlı sonuç elde edilememiştir. Bunun nedeni hasta popülasyon sayımızın azlığı ve aynı zamanda hasta popülasyonu içerisinde AML dönüşümünün 2 hastada gerçekleşmesi olabilir.

MDS ileri yaş hastalığı olarak bilinmektedir ve ortalama tanı yaşı 70-75'tir (13). Sağlıklı popülasyonda MDS ile ilişkili genlerdeki mutasyonların yaşla birlikte arttığı bilinmektedir (15). İleri yaşlarda somatik mutasyonun artışının ve yükünün; MDS gelişimine zemin hazırladığı söylenebilir. Güncel bir çalışmada 852 de novo MDS hastasının klinik verileri ve 141 genlik panel sonucunda saptanan mutasyonların ilişkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada 60 yaş üstü hastalarda IPSS-M ilişkili genlerdeki ortalama mutasyon sayısı daha çok bulunmuştur. 60 yaş üstü grupta *RUNX1*, *TP53*, *TET2*, *SRSF2*, *DNMT3A*, *STAG2*, *EZH2*, *DDX41* genlerindeki

mutasyon insidansı daha yüksek iken; 60 yaş altında sadece *U2AF1* gen mutasyonlarının daha sık olduğu gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada elde edilen diğer bir veriyse IPSS-M'in 60 yaş üstü hastalarda daha avantajlı olduğudur (84). Çalışmadaki hastaların yaş ortalaması 73,57 (min 55 – max 96) literatür verileri ile uyumludur. Hasta popülasyonumuz içerisinde beklenenden daha erken yaşta hastalığın ortaya çıktığı bir hastada (55) saptanan mutasyonlara bakıldığında VAF aralığı %5'in üstünde varyant bulunmadığı için germline bir mutasyon olası gözükmemektedir.

Miyelodisplastik sendrom hastalarının yaklaşık üçte birinde AML dönüşüm riski bulunmaktadır (2). *DNMT3A*, *IDH1* ve *IDH2* gen mutasyonlarının AML hastalarında MDS'ye kıyasla daha sık mutasyona uğradığı bildirilmektedir (4). MDS hastalarında *IDH1* ve *IDH2* mutasyonlarının görülmesi kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (50). Ayrıca yeni hedefli tedavilerde *IDH1* ve *IDH-2* inhibitörleri (ivosidenib ve enasidenib) AML tedavisinde FDA tarafından onaylanmıştır ve MDS için klinik çalışmalar devam etmektedir (51). Son yapılan bir çalışma sonucunda enasidenib monoterapisi ve azasitidinle kombinasyonu tedavi cevabı açısından karşılaştırılmış ve sırasıyla tedavi yanıt oranları sırasıyla %35 ve %74 olarak bulunmuştur (92). Çalışmamızdaki hasta grubu içerisinde sadece iki tanesinde (%1) AML dönüşümü gerçekleşmiştir. Bu hastalarda saptanan genetik bulgular Tablo 28'de verilmiştir. Her iki hastada moleküler analiz sonrası yapılan IPSS-M risk skorum programında çok yüksek riskli grupta değerlendirilmiştir. Saptanan mutasyonlar incelendiğinde ve AML dönüşümü gerçekleşmeyen diğer hastalarla kıyaslandığında 2 numaralı hastada farklı olarak göze çarpan *IDH2* c..419G>A-p.R140Q (Tier 1) mutasyonudur. Bu mutasyon hastada %43 allel fraksiyonunda görülmektedir. Diğer hastaların hiçbirinde *IDH2* geninde mutasyon görülmemiştir. MDS hastalarında yapılan moleküler profillemeye sonrası saptanan mutasyonlar hastalığın gidişatının yanında yeni tedavi umutları açısından da oldukça önemlidir. Moleküler profillemeye sonrası saptanan mutasyona göre tedavi seçeneklerinin belirlenmesi önümüzdeki yıllarda oldukça popüler hale gelecektir. Nasıl ki AML hastalarında *IDH* mutasyon varlığında *IDH* inhibitörleri FDA onayı aldıysa, MDS hastalarında daha sık olarak uygulanacak moleküler analizler sonucunda saptanan *IDH2* mutasyonlu hasta sayısının artması; *IDH2* inhibitörü ile tedavi şansına yönelik yapılan klinik çalışmalarının sayısının artmasına ve güncel pratikte uygulanabilir olmasına olanak sağlayacaktır.

Miyelodisplastik sendrom çalışma grubumuz içerisinde AML dönüşümü gerçekleşen bir diğer hastanın klinik verilerinden bulgular kısmında detaylı olarak bahsedilmiştir. AML dönüşümü gerçekleşen hastalarda saptanan mutasyonların gen dağılımı Tablo 28'de verilmiştir. Bu hastamızda saptanan mutasyonlar içerisinde dikkat çeken nokta VAF %20'nin üstünde 4 farklı gende (*RUNX1*, *ETV6*, *U2AF1* ve *DNMT3A*) mutasyon görülmesidir. Özellikle *RUNX1*

ve *ETV6* genleri NCCN MDS kılavuzunun MDS için belirlediği bağımsız kötü prognoz belirteci olan 5 genin (*TP53*, *ASXL1*, *RUNX1*, *EZH2*, *ETV6*) içerisinde bulunmaktadır. Ayrıca bu hastadaki daha agresif gidişin ve AML dönüşümünün VAF %20 üstünde görülen mutasyon sayısının çokluğu ve mutasyona uğrayan genlerden kaynaklı olabileceği yorumu yapılabilir.

Miyelodisplastik sendromda prognostik skorlama sistemlerinde yer alan kemik iliği blast yüzdesi; risk grubu belirlemede oldukça önemli bir role sahiptir. IPSS-R skorlamasında blast yüzdeleri; %0-2, %2-5, %5-10 ve %10 üstü olacak şekilde gruplara ayrılmış ve puanlandırılmıştır (39). Yüksek blast oranları AML dönüşüm riski ve kötü prognozla ilişkilendirilmektedir. Yapılan moleküler testler sonucunda özellikle *NRAS*, *RUNX1* ve *TP53* mutasyonlarının yüksek blast oranı ile ilişkili bulunduğu görülmektedir (3). Çalışmamızdaki hastaların blast oranları; %0-2 arası (1.grup), %2-5 arası (2.grup) ve %5-10 (3.grup) şeklinde incelenmiştir. Çalışma grubu hastaları içerisinde blast oranı %10'u geçen hasta olmadığı için %10 üstü için grup oluşturulmamıştır. 1. grupta 14 hasta, 2. grupta 3 hasta (Hasta No 2,4,16) ve 3. grupta 4 hasta (Hasta No 9,11,12,13) görülmüştür. Bu hastalar içerisinde blast oranı yüksek olan 3. grup incelendiğinde hastalarda sırasıyla %6, %10, %7 ve %5 oranlarında blast izlenmiştir. Yüksek blast oranına sahip hastalardan bir tanesi hasta orta derece-1 risk grubundan yüksek risk grubuna; diğer kalan 3 hasta da orta derece-1 risk grubundan çok yüksek risk grubuna geçiş göstermiştir. Ayrıca bu hasta grubu içerisinde sadece bir hastada AML dönüşümü gerçekleşmiştir. Hastalara ait moleküler mutasyonların gen dağılımı bulgular kısmında Tablo 29'da verilmiştir. Hastalarda mutasyon saptanan genlere bakıldığında ortak olarak dikkat çeken hepsinde *RUNX1* geni olmuştur. Ayrıca *TP53* geni de hemen hemen tüm hastalarda mutasyona uğramış şekilde görülmektedir. Bu veriler literatürle uyumlu bulunmuştur fakat yüksek blastla ilişkili olduğu bilinen *NRAS* geninde hastalarımızın hiçbirinde mutasyon saptanmamıştır.

Miyelodisplastik sendrom tanısı alan hastalarda en az bir mutasyon görülme oranı yaklaşık %90 civarındadır (15). Literatürdeki farklı çalışmalara bakıldığında bu oranlar %78, %94 ve %81 olarak değişmektedir (10,11,89). Karyotipi normal olan MDS hasta popülasyonunda genetik mutasyon saptanma oranı ise %70 olarak belirtilmiştir (74). Çalışma grubumuzdaki hasta popülasyonumuzun çalışmaya dahil edilme kriterleri içerisinde karyotip ve FISH sonuçlarının normal olması koşulu bulunmaktadır. Dolayısıyla çalışmadaki tüm hastaların daha önceden yapılan karyotip ve FISH analizleri normal sonuçlanmıştır. Allel fraksiyonlarına göre gruplandırılarak değerlendirildiğinde AF sınırı %5 ve üstü alındığında 21 hasta içerisinde 20 hastada (%95); AF %10 ve üstü alındığında 21 hastadan 13 hastada (%62); AF %20 ve üstü alındığında ise 21 hasta içerisinde 10 hastada (%48) mutasyon saptanmıştır. Veriler değerlendirildiğinde normal karyotipli hastalar içerisindeki mutasyon görülme oranının

literatüre en uyumlu olarak saptanan VAF değeri %10 ve üstündeki mutasyonların alındığı grup olduğu görülmektedir. Bu grupta hastaların normal sitogenetik verilerine rağmen %62'sinde genetik değişiklik moleküler olarak görülmüştür. Tüm VAF değerlerinden elde edilen sonuçlara bakıldığında da VAF %20 üstü olarak değerlendirildiğinde bile normal karyotipli hastaların neredeyse yarısında; VAF %5 üstü alındığında ise neredeyse normal karyotipli hastaların tamamında moleküler değişiklikler gözlenmiştir. Bu veriler sonucunda çalışmamızın literatüre uyumlu olarak katkı sağladığı söylenebilir. Ayrıca düşük riskli grupta karyotip ve FISH sonuçları normal olsa bile moleküler çalışmaların ne denli önemli olduğu, aslında hastaların çoğunda sitogenetik yöntemlerle saptanamayan moleküler düzeydeki değişikliklerin hastaların risk gruplamasında ve tedavi seçiminde ne kadar kritik role sahip olduğu sonucuna varılmaktadır.

WHO 2022 MDS sınıflandırmasında yeni tanımlanan genetik alt tipler MDS-5q, MDS-*SF3B1* ve MDS-bi*TP53* olarak belirlenmiştir (29). Çalışma popülasyonumuz içerisinde normal karyotipli hastalar dahil edildiği için MDS-5q alt tipinde hasta bulunmamaktadır. Çalışma grubunda MDS-*SF3B1* genetik alt tipini karşılayan (VAF:>%10, diğer kriterler genel bilgiler kısmında verilmiştir) tek bir hastamız mevcuttur. Hastaya ait detaylı klinik bilgiler bulgular kısmında verilmiştir. Hastamızda *SF3B1* geninde %30 allel fraksiyonunda c.2098A>G (K700E) mutasyonu (Tier 1) görülmüştür. Beklenildiği gibi hastanın tanısı MDS-Ring sideroblast'tır. Çalışma grubu içerisinde ring sideroblast tanılı başka hastamız yoktur. *SF3B1* mutasyonlarında beklenen fenotip-genotip korelasyonu oldukça güçlüdür (8). Bu fenotip ve genotip korelasyon açısından hasta değerlendirildiğinde blast oranının düşüklüğü uyumludur; fakat diğer beklenen parametrelere (yüksek WBC-PLT) hastada rastlanmamıştır (15). Ayrıca *SF3B1* mutasyonları genellikle kadınlarda görülmekte iken, hastanın cinsiyeti erkektir. Bilindiği üzere *SF3B1* mutasyonu MDS hastalığında iyi prognozla ilişkilendirilen tek gendir. Çalışma grubundaki hastaların sağ kalım süreleri değerlendirildiğinde sağ kalımı en uzun hasta 56 ay olarak belirlenen bu hastadır. Bu hasta; çalışma grubu içerisinde MDS-*SF3B1* genetik alt tipini sağlayan tek hasta ve sağ kalımı en uzun olan hastadır. Ayrıca hastanın moleküler profiline bakıldığında VAF %2-5 aralığında *ZRSR2*, *TET2*, *BCOR*; %5-10 aralığında *TP53*; %10-20 aralığında *SRSF2*, *BCOR*; %20 üstünde ise *SF3B1* ve *TET2* genlerine ait mutasyonlar görülmektedir. Literatür verisi olarak *SF3B1* mutasyonuna eşlik eden *RUNX1* mutasyonunun prognozu kötüleştirdiği bilinmektedir (15). Bizim hastamızda ise *RUNX1* mutasyonuna rastlanmamaktadır. Hasta moleküler analiz sonrası IPSS-M risk hesaplama programına göre değerlendirildiğinde orta-düşük risk grubunda değerlendirilmiştir. *SF3B1* mutasyon varlığında ve ring sideroblast varlığında luspatercept tedavisinin transfüzyon bağımsızlığı ve hematolojik

iyileşme sağladığı kanıtlanmış ve düşük riskli MDS hastalarında FDA tarafından onaylanmıştır (45).

WHO 2022 sınıflandırmasında yer alan diğer bir genetik alt tip ise MDS-bi*TP53* (biallelik *TP53* mutasyonu)'dir. Bu genetik alt tipi sağlayan koşullar; ≥ 2 *TP53* mutasyon varlığı, 1 mutasyonla birlikte 17p *TP53* lokusunda kopya sayısı kaybı veya heterozigosite kaybı, $VAF \geq \%23$ olmasıdır (29). Çalışma grubumuzda 17p *TP53* lokusuna ait kopya sayısı değişiklikleri ve heterozigosite kaybı değerlendirilememiştir. Çalışma popülasyonumuzda diğer koşulları sağlayan hasta sayısı 6 olarak belirlenmiştir. Hastalar ve *TP53* mutasyon durumları bulgular kısmındaki tablo 27'de detaylı olarak gösterilmiştir. Bu hastaların hepsi ikiden fazla *TP53* mutasyonu taşımaktadır. Tek başına $VAF \geq \%23$ kriteri ile MDS-bi*TP53* sınıfına giren hasta yoktur. Sadece bir hastada *VAF*'ları $\%38$ ve $\%35$ olarak tespit edilen iki mutasyon birlikte görülmüştür. Hastaların moleküler analiz sonrası IPSS-M'e göre belirlenen yeni risk gruplarına bakıldığında; orta derece-1 risk grubundaki 4 hastanın çok yüksek risk grubuna geçtiği, düşük risk grubundaki 2 hastadan birinin düşükten çok yüksek risk grubuna, diğerinin ise yüksek risk grubuna geçtiği görülmüştür. Hastaların risk gruplarının değişmesinde özellikle *TP53* mutasyon sayısının çokluğu ve diğer genlerdeki mutasyonların varlığı etkili olduğu düşünülmektedir.

MDS'de klinik tablo sıklıkla izole sitopeniler veya pansitopeni bulguları sonucunda oluşmaktadır. Literatür verilerine bakıldığında MDS hastalarının yaklaşık $\%52$ 'sinde anemi, $\%40$ 'ında trombositopeni ve $\%18$ 'inde ise nötropeni görülmektedir (23). MDS hastaları değerlendirilirken kılavuzlarda tanımlanan sitopeni değerleri şu şekildedir (24): Anemi: Hb $<10\text{g/dL}$, Nötropeni: Mutlak nötrofil $<1.8 \times 10^9/\text{L}$, Trombositopeni: Platelet $<100 \times 10^9/\text{L}$. Çalışma grubumuzdaki hastalar incelendiğinde 21 hastadan 12'sinde ($\%57$) anemi, 6'sında ($\%28$) trombositopeni ve 4 tanesinde ($\%19$) nötropeni gözlenmiştir. Elde edilen yüzdeler genel olarak literatürle uyumlu bulunmuştur.

Düşük riskli MDS hastaları içerisinde bile belirli bir grubun morbidite ve mortalitesinin yüksek olduğu bilinmektedir (5,6). Bu nedenle düşük riskli grup içerisinde kötü gidişat gösteren hastaları ön görebilmek MDS için oldukça kritik rol oynamaktadır ve buna yönelik araştırmalar devam etmektedir. Bir çalışmada IPSS-R orta risk grubundaki hastaların kötü gidişini saptamayabilmek için ek belirteçler oluşturulmuştur (18). Bu belirteçler; ileri yaş (>60), wild-type *SF3B1*, ≥ 3 sürücü mutasyon, çoklu *TP53* mutasyonları, Doğu Kooperatif Onkoloji Grubu (Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG) performans skoru ≥ 2 ve serum ferritin ≥ 520 ng/ml olmasıdır. Görüldüğü üzere düşük riskli hastaların prognostik sınıflamasında etkili olan hastaların moleküler bulgularının yanı sıra çeşitli klinik parametreler de kullanılmaktadır. Çalışma grubumuz içerisindeki hastaların 5 tanesi; IPSS-M risk hesaplamasında da düşük riskli grupta (çok düşük-düşük-orta düşük) kalmıştır. Bu hastalar arasından sadece bir hastada

belirlenen kriterlere uygun hiçbir mutasyon saptanmadığı için direk olarak çok düşük risk grubunda değerlendirilmiştir fakat hastanın klinik durumu incelendiğinde yaşam süresinin tanıdan itibaren beklenenin aksine 4 ay olduğu görülmüştür. Çalışma grubumuz içerisinde IPSS-M skorlama sonrasında düşük risk grubuna geçen iki hasta da tanı aldıktan 5 ve 9 ay içerisinde hayatını kaybetmiştir. Hastaların sağ kalım sürelerini sitogenetik ve moleküler verilerinin dışında klinik gidişatını etkileyen başka parametrelerin de söz konusu olduğu ortadadır. MDS hastalarında sağ kalımı etkileyen en önemli faktörlerden biri de hastaların ileri yaşına bağlı olarak gelişmiş olan eşlik eden komorbiditelerdir. Çalışma grubumuzdaki hastalarda istatistiksel analizler sonucunda hastaların sağ kalımları; IPSS-M yeni risk grubuna göre beklenen genel sağ kalımlarından anlamlı olarak kısa bulunmuştur (Tablo 84). Bunun nedeni olarak hastaların sağ kalımı üzerinde günümüzde sık olarak kullanılan belirteçler (sitopeni dereceleri, kemik iliği blast oranları, sitogenetik ve moleküler bulgular) dışında; eşlik eden komorbiditelerin varlığı ve belki de henüz keşfedilmemiş epigenetik mekanizmaların etkisinin olabileceği düşünülebilir.

Çalışmamızda belirlenen hedef popülasyon sayısı 21'dir ve hedef popülasyon sayısının düşüklüğü çalışmamızın en önemli kısıtlılıklarından biridir. Ayrıca çalışma planımızı ve hedefimizi belirlerken çalışma hipotezine uygun olarak hedeflediğimiz popülasyonun düşük riskli MDS hasta grubundaki ölen hastalardan oluşması popülasyonumuzun seçilmiş grup olarak değerlendirildiği için; bazı verileri (özellikle literatüre kıyasla yüksek riskli gruba geçiş oranlarının daha yüksek bulunması gibi) etkilemiş olması bir başka çalışma kısıtlılığı olarak yorumlanabilir. Çalışmamızda moleküler analiz için kullanılan panel 58 geni kapsamaktadır. IPSS-M genlerinden sadece *GNB1* ve *PRPF8* panel içerisinde bulunmamaktadır. IPSS-M risk hesaplaması yapılırken bu genlerin değerlendirilemediği bilgisi girilerek risk skoru oluşturulmuştur. MDS hastalarında *TP53* lokusuna ait kopya sayısı değişikliklerinin ve heterozigosite kaybının prognoz açısından oldukça önem taşıdığı bilinmektedir (29,30). Çalışmamızda *TP53* allelik durumu kopya sayısı değişiklikleri ve heterozigosite kaybı açısından değerlendirilememiştir.

Güncel MDS kılavuzları hastalarda moleküler analiz yapılmasını ve NGS panel uygulanmasını önermektedir fakat hangi testlerin hangi gen içerikleri bakılarak yapılması gerektiğini gösteren kapsamlı verilerin olduğu bir rehber henüz oluşturulmamıştır (4,12). Güncel yapılan bir çalışmada 2876 MDS hastasının verileri retrospektif olarak değerlendirilmiş ve sağ kalımları IPSS-M açısından karşılaştırılmıştır. Çalışmada kullanılan her iki kohort grubu için minimum MDS ile ilişkili 15 genlik panel kullanıldığında IPSS-M prognoz tahmininin %80-%70 oranında doğruluğu olduğu, kullanılan paneldeki gen sayısının 10 ve altı olduğu durumlarda ise IPSS-M prognoz tahmini oranlarının düştüğü gösterilmiştir (93).

Miyelodisplastik sendrom hasta grubunda prognoz tahminini daha net olarak ön görebilmek için moleküler testlerin önemi gün geçtikçe artmaktadır. Moleküler testlerin pahalılığı, elde edilen verilerin yorumlama zorluğu ve moleküler verilere yönelik güncel bir kılavuzun oluşmaması nedeniyle henüz günlük pratikte kullanılmamaktadır fakat moleküler analizlerin yaygınlaşması ve yapılan çalışmaların hızla artmasına bağlı önümüzdeki yıllarda MDS hastalığında moleküler testlerin pratikte daha sık kullanılacağı düşünülmektedir. Çalışmamız; özellikle düşük riskli MDS hastalarındaki moleküler profillemenin önemini vurgulayan ülkemizdeki ilk çalışmadır. Ayrıca çalışmamız; ülkemizden daha fazla sayıda hasta örneği içeren yeni çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir. Literatür verileri ile bu çalışma sonucunda elde edilen bulgular; moleküler testlerin daha yaygın şekilde kullanılması gerekliliğini belirtmekte ve moleküler testlerin gelecekte rutin olarak yapılması beklenmektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda 2016-2021 yılları arasında karyotip ve FISH analizi normal sonuçlanan düşük ve intermediate-1 risk grubunda olup ölmüş 21 hastanın tanı anındaki kemik iliği aspirasyon biyopsi örnekleri; DNA temelli 58 genlik panel ile analiz edilmiştir. Moleküler analizler sonucunda saptanan mutasyonlar ve hastaların klinik verileri kullanılarak IPSS-M risk skorumaya sistemine girilmiş ve her hasta için yeni risk grubu oluşturulmuştur. Çalışmamız düşük riskli MDS grubunda moleküler profillemeye yapan ülkemizdeki ilk çalışma niteliğindedir ve özellikle düşük riskli olarak bilinen hastalarda moleküler testlerin önemini vurgulamaktadır.

Çalışmamızda VAF %2 üstü alındığında 21 hasta içerisinde 20 hastada (%95) toplam 222 mutasyon saptanmıştır. Çalışma grubundaki hastaların karyotip ve FISH sonuçları normal gelmesine ve mevcut klinik verileri ile düşük riskli grupta değerlendirilmesine rağmen, saptanan mutasyonlar sonucunda IPSS-M risk skorumaya programına göre toplamda 16 hastanın (%76) daha yüksek risk gruplarına geçiş gösterdiği görülmüştür. Çalışmamız; sonuç olarak MDS hastalarında rutin olarak yapılan karyotip ve FISH testlerinin yanında moleküler testlerin de yapılması gerekliliğini göstermektedir.

Bu çalışma ülkemizde; düşük riskli MDS hasta grubunda kapsamlı somatik mutasyon analizi sonrası IPSS-M risk skorumaya sisteminin kullanıldığı ilk çalışmadır. IPSS-M risk skorumaya programına göre hastaların oluşan yeni risk gruplarında beklenen genel sağ kalım süreleri ve tanı anından itibaren yaşam süreleri istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Hastaların yaşam süreleri; IPSS-M beklenen genel sağ kalım sürelerine göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuştur.

Çalışmamız arşivlenmiş kemik iliği aspirasyon biyopsi örneklerinin DNA temelli testler için kullanılabileceğinin mümkün olduğunu göstermiştir. Fakat çalışmamızın kısıtlılıklarından bir tanesi; kullanılan moleküler test yönteminin genomik yeniden düzenlemeleri saptayamamasıdır. Ayrıca en önemli çalışma kısıtlılıklarımızdan biri de örneklem grubumuzun sayısının azlığıdır. Literatürde Türk popülasyonu ile buna benzer çalışma olmaması nedeniyle daha fazla sayıda hasta ile yapılacak çalışmalara özellikle ülkemizde ihtiyaç duyulmaktadır.

Moleküler profillemeye, MDS hastalarında prognoz tahmini, tedavi yaklaşımı, risk grubunu daha iyi ön görebilmek ve klinik gidişatı tahmin edebilmek açısından oldukça önemlidir. Gelecekte MDS hastalığında moleküler testlerin pratikte daha sık kullanılacağını düşünülmektedir. Ülkemizde de moleküler testlerin daha yaygın şekilde kullanılmasının hasta yönetiminde büyük avantajlar sağlayacağı ortadadır. Çalışmamız, moleküler testlerin özellikle düşük riskli MDS hastalarında önemini vurgulayan bir çalışmadır.

7. KAYNAKÇA

1. Browse the Tables and Figures - SEER Cancer Statistics Review (CSR) 1975-2016 [Internet]. [cited 2023 Jun 1]. Available from: https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2016/browse_csr.php?sectionSEL=30&pageSEL=sect_30_table.02
2. Menssen AJ, Walter MJ. Genetics of progression from MDS to secondary leukemia. *Blood* [Internet]. 2020 Jul 2 [cited 2023 Jun 1];136(1):50–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32430504/>
3. Awada H, Thapa B, Visconte V. The Genomics of Myelodysplastic Syndromes: Origins of Disease Evolution, Biological Pathways, and Prognostic Implications. *Cells* [Internet]. 2020 Nov 20 [cited 2023 Jun 1];9(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33233642/>
4. Al-Kali A, Bennett JM, Borate U, Brunner AM, Chai-Ho W, Jonsson U, et al. NCCN Guidelines Version 1.2023 Myelodysplastic Syndromes Continue NCCN Guidelines Panel Disclosures ‡ Hematology † Internal medicine † Medical oncology † Pathology § Transplantation * Discussion section writing committee [Internet]. 2022. Available from: <https://www.nccn.org/home/member->
5. Bejar R, Stevenson KE, Caughey BA, Abdel-Wahab O, Steensma DP, Galili N, et al. Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* [Internet]. 2012 Sep 20 [cited 2023 Jun 1];30(27):3376–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22869879/>
6. Garcia-Manero G, Shan J, Faderl S, Cortes J, Ravandi F, Borthakur G, et al. A prognostic score for patients with lower risk myelodysplastic syndrome. *Leukemia* [Internet]. 2008 [cited 2023 Jun 1];22(3):538–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18079733/>
7. Gu S, Xia J, Tian Y, Zi J, Ge Z. A novel scoring system integrating molecular abnormalities with IPSS-R can improve the risk stratification in patients with MDS. *BMC Cancer* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Jun 1];21(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33549060/>
8. Voso MT, Gurnari C. Have we reached a molecular era in myelodysplastic syndromes? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* [Internet]. 2021 Dec 10 [cited 2023 Jun 1];2021(1):418–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34889424/>
9. Bersanelli M, Travaglino E, Meggendorfer M, Matteuzzi T, Sala C, Mosca E, et al. Classification and Personalized Prognostic Assessment on the Basis of Clinical and Genomic Features in Myelodysplastic Syndromes. *J Clin Oncol* [Internet]. 2021 Apr 10 [cited 2023 Jun 1];39(11):1223–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33539200/>
10. Nazha A, Komrokji R, Meggendorfer M, Jia X, Radakovich N, Shreve J, et al. Personalized Prediction Model to Risk Stratify Patients With Myelodysplastic Syndromes. *J Clin Oncol* [Internet]. 2021 Nov 20 [cited 2023 Jun 1];39(33):3737–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34406850/>
11. Bernard E, Tuechler H, Greenberg PL, Hasserjian RP, Arango Ossa JE, Nannya Y, et al. Molecular International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *NEJM Evidence*. 2022 Jun 28;1(7).
12. Fenaux P, Haase D, Santini V, Sanz GF, Platzbecker U, Mey U. Myelodysplastic syndromes: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†☆. *Ann Oncol* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2023 Jun 1];32(2):142–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33221366/>
13. Browse the Tables and Figures - SEER Cancer Statistics Review (CSR) 1975-2016 [Internet]. [cited 2023 Jun 1]. Available from:

- https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2016/browse_csr.php?sectionSEL=30&pageSEL=sect_30_intro.01
14. Miyazaki Y, Tuechler H, Sanz G, Schanz J, Garcia-Manero G, Solé F, et al. Differing clinical features between Japanese and Caucasian patients with myelodysplastic syndromes: Analysis from the International Working Group for Prognosis of MDS. *Leuk Res* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2023 Jun 2];73:51–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30219650/>
 15. Hoff FW, Madanat YF. Molecular Drivers of Myelodysplastic Neoplasms (MDS)-Classification and Prognostic Relevance. *Cells*. 2023 Feb 1;12(4).
 16. Candelaria M, Dueñas-Gonzalez A. Therapy-related myelodysplastic syndrome. *Expert Opin Drug Saf* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2023 Jun 2];14(5):655–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25675961/>
 17. Bhatia R, Deeg HJ. Treatment-related myelodysplastic syndrome: molecular characteristics and therapy. *Curr Opin Hematol* [Internet]. 2011 Mar [cited 2023 Jun 2];18(2):77–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21252656/>
 18. Li H, Hu F, Gale RP, Sekeres MA, Liang Y. Myelodysplastic syndromes. *Nat Rev Dis Primers* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2023 Jun 2];8(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36396662/>
 19. Bewersdorf JP, Xie Z, Bejar R, Borate U, Boultonwood J, Brunner AM, et al. Current landscape of translational and clinical research in myelodysplastic syndromes/neoplasms (MDS): Proceedings from the 1st International Workshop on MDS (iwMDS) Of the International Consortium for MDS (icMDS). *Blood Rev* [Internet]. 2023 Mar [cited 2023 Jun 10];101072. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36934059/>
 20. Fozza C, Murtas A, Caocci G, La Nasa G. Autoimmune disorders associated with myelodysplastic syndromes: clinical, prognostic and therapeutic implications. *Leuk Res* [Internet]. 2022 Jun 1 [cited 2023 Jun 5];117. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35525186/>
 21. Bazinet A, Bravo GM. New Approaches to Myelodysplastic Syndrome Treatment. *Curr Treat Options Oncol* [Internet]. 2022 May 1 [cited 2023 Jun 9];23(5):668–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35320468/>
 22. Wang C, Sallman DA. Current Therapeutic Landscape in Lower Risk Myelodysplastic Syndromes. *Curr Treat Options Oncol* [Internet]. 2023 May 1 [cited 2023 Jun 9];24(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36966266/>
 23. Sekeres MA, Taylor J. Diagnosis and Treatment of Myelodysplastic Syndromes: A Review. *JAMA* [Internet]. 2022 Sep 6 [cited 2023 Jun 6];328(9):872–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36066514/>
 24. Valent P, Horny HP, Bennett JM, Fonatsch C, Germing U, Greenberg P, et al. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leuk Res* [Internet]. 2007 [cited 2023 Jun 5];31(6):727–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17257673/>
 25. Vardiman J. The classification of MDS: from FAB to WHO and beyond. *Leuk Res* [Internet]. 2012 Dec [cited 2023 Jun 5];36(12):1453–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22940257/>
 26. Bennett JM. Changes in the Updated 2016: WHO Classification of the Myelodysplastic Syndromes and Related Myeloid Neoplasms. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2023 Jun 5];16(11):607–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27693133/>
 27. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and

- acute leukemia. *Blood* [Internet]. 2016 May 19 [cited 2023 Jun 5];127(20):2391–405. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27069254/>
28. Cazzola M. Risk stratifying MDS in the time of precision medicine. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* [Internet]. 2022 Dec 9 [cited 2023 Jun 5];2022(1):375–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36485160/>
29. Khoury JD, Solary E, Abela O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* [Internet]. 2022 Jul 1 [cited 2023 Jun 6];36(7):1703–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35732831/>
30. Bernard E, Nannya Y, Hasserjian RP, Devlin SM, Tuechler H, Medina-Martinez JS, et al. Implications of TP53 allelic state for genome stability, clinical presentation and outcomes in myelodysplastic syndromes. *Nat Med* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2023 Jun 5];26(10):1549–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32747829/>
31. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, Kvasnicka HM, et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood* [Internet]. 2022 Sep 15 [cited 2023 Jun 5];140(11):1200–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35767897/>
32. Valent P, Valent P. ICUS, IDUS, CHIP and CCUS: Diagnostic Criteria, Separation from MDS and Clinical Implications. *Pathobiology* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2023 Jun 5];86(1):30–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29860246/>
33. Bejar R. CHIP, ICUS, CCUS and other four-letter words. *Leukemia* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2023 Jun 5];31(9):1869–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28592887/>
34. Malcovati L, Galli A, Travaglino E, Ambaglio I, Rizzo E, Molteni E, et al. Clinical significance of somatic mutation in unexplained blood cytopenia. *Blood* [Internet]. 2017 Jun 22 [cited 2023 Jun 15];129(25):3371–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28424163/>
35. Niemeyer CM. JMML genomics and decisions. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* [Internet]. 2018 Nov 30 [cited 2023 Jun 6];2018(1):307–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30504325/>
36. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* [Internet]. 2011 Jun 30 [cited 2023 Jun 6];364(26):2496–506. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21714648/>
37. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* [Internet]. 1997 Mar 15 [cited 2023 Jun 6];89(6):2079–88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9058730/>
38. Malcovati L, Porta MGD, Strupp C, Ambaglio I, Kuendgen A, Nachtigal K, et al. Impact of the degree of anemia on the outcome of patients with myelodysplastic syndrome and its integration into the WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS). *Haematologica* [Internet]. 2011 Oct [cited 2023 Jun 6];96(10):1433–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21659359/>
39. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* [Internet]. 2012 Sep 20 [cited 2023 Jun 6];120(12):2454–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22740453/>
40. Pfeilstöcker M, Tuechler H, Sanz G, Schanz J, Garcia-Manero G, Solé F, et al. Time-dependent changes in mortality and transformation risk in MDS. *Blood* [Internet]. 2016

- Aug 18 [cited 2023 Jun 6];128(7):902–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27335276/>
41. Morita K, Arai S, Kogure Y, Honda A, Nakazaki K, Kurokawa M. Serum LDH Is Useful to Predict Prognosis for Intermediate-Risk Myelodysplastic Syndrome. 2015 [cited 2023 Jun 7]; Available from: <http://doi.org/10.1182/blood.V126.23.5255.5255>
 42. DeZern AE, Greenberg PL. Recent Clinical and Molecular Advances for the Classification of Myelodysplastic Neoplasms. *J Natl Compr Canc Netw* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2023 Jun 8];20(12):1280–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36509078/>
 43. Richardson DR, DeZern AE. Evidence-Based Minireview: Molecular precision and clinical uncertainty: should molecular profiling be routinely used to guide risk stratification in MDS? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* [Internet]. 2021 Dec 10 [cited 2023 Jun 7];2021(1):435–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34889375/>
 44. Hellström-Lindberg E, Negrin R, Stein R, Krantz S, Lindberg G, Vardiman J, et al. Erythroid response to treatment with G-CSF plus erythropoietin for the anaemia of patients with myelodysplastic syndromes: proposal for a predictive model. *Br J Haematol* [Internet]. 1997 [cited 2023 Jun 9];99(2):344–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9375752/>
 45. Kelaidi C, Park S, Brechignac S, Mannone L, Vey N, Dombret H, et al. Treatment of myelodysplastic syndromes with 5q deletion before the lenalidomide era; the GFM experience with EPO and thalidomide. *Leuk Res* [Internet]. 2008 Jul [cited 2023 Jun 8];32(7):1049–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18191202/>
 46. Fenaux P, Platzbecker U, Mufti GJ, Garcia-Manero G, Buckstein R, Santini V, et al. Luspatercept in Patients with Lower-Risk Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Jan 9 [cited 2023 Jun 8];382(2):140–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31914241/>
 47. Kantarjian H, Fenaux P, Sekeres MA, Becker PS, Boruchov A, Bowen D, et al. Safety and efficacy of romiplostim in patients with lower-risk myelodysplastic syndrome and thrombocytopenia. *J Clin Oncol* [Internet]. 2010 Jan 20 [cited 2023 Jun 8];28(3):437–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20008626/>
 48. Stahl M, DeVeaux M, De Witte T, Neukirchen J, Sekeres MA, Brunner AM, et al. The use of immunosuppressive therapy in MDS: clinical outcomes and their predictors in a large international patient cohort. *Blood Adv* [Internet]. 2018 Jul 24 [cited 2023 Jun 8];2(14):1765–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30037803/>
 49. Robin M, Fenaux P. Which lower risk myelodysplastic syndromes should be treated with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation? *Leukemia* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2023 Jun 8];34(10):2552–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32661295/>
 50. Scalzulli E, Pepe S, Colafigli G, Breccia M. Therapeutic strategies in low and high-risk MDS: What does the future have to offer? *Blood Rev* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2023 Jun 10];45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32253020/>
 51. Ogawa S. Genetics of MDS. *Blood* [Internet]. 2019 Mar 7 [cited 2023 Jun 10];133(10):1049–59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30670442/>
 52. Komrokji R, Al Ali N, Chan O, Sweet K, Kuykendall A, Lancet J, et al. IDH mutations are enriched in myelodysplastic syndrome patients with severe neutropenia and can be a potential for targeted therapy. *Haematologica* [Internet]. 2023 Nov 24 [cited 2023 Jun 10];108(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36420802/>
 53. Bănescu C, Tripon F, Muntean C. The Genetic Landscape of Myelodysplastic Neoplasm Progression to Acute Myeloid Leukemia. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023 Mar 17 [cited 2023 Jun 10];24(6):5734. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36982819/>

54. Park HS, Choi J, See CJ, Kim JA, Park SN, Im K, et al. Dysregulation of Telomere Lengths and Telomerase Activity in Myelodysplastic Syndrome. *Ann Lab Med* [Internet]. 2017 [cited 2023 Jun 10];37(3):195–203. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28224765/>
55. Fenaux P, Raza A, Vellenga E, Platzbecker U, Santini V, Samarina I, et al. Efficacy and Safety of Imetelstat in RBC Transfusion-Dependent (TD) IPSS Low/Int-1 MDS Relapsed/Refractory to Erythropoiesis-Stimulating Agents (ESA) (IMerge). 2017 [cited 2023 Jun 10]; Available from: http://doi.org/10.1182/blood.V130.Suppl_1.4256.4256
56. Steensma DP, Fenaux P, van Eygen K, Raza A, Santini V, Germing U, et al. Imetelstat Achieves Meaningful and Durable Transfusion Independence in High Transfusion-Burden Patients With Lower-Risk Myelodysplastic Syndromes in a Phase II Study. *J Clin Oncol* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2023 Jun 10];39(1):48–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33108243/>
57. Pophali P, Desai SR, Shastri A. Therapeutic Targets in Myelodysplastic Neoplasms: Beyond Hypomethylating Agents. *Curr Hematol Malig Rep* [Internet]. 2023 Jun 1 [cited 2023 Jun 10];18(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37052811/>
58. Seiler M, Yoshimi A, Darman R, Chan B, Keaney G, Thomas M, et al. H3B-8800, an orally available small-molecule splicing modulator, induces lethality in spliceosome-mutant cancers. *Nat Med* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2023 Jun 10];24(4):497–504. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29457796/>
59. Maslah N, Salomao N, Drevon L, Verger E, Partouche N, Ly P, et al. Synergistic effects of PRIMA-1Met (APR-246) and 5-azacitidine in TP53-mutated myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Haematologica* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2023 Jun 10];105(6):1539–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31488557/>
60. Henry DH, Glaspy J, Harrup R, Mittelman M, Zhou A, Carraway HE, et al. Roxadustat for the treatment of anemia in patients with lower-risk myelodysplastic syndrome: Open-label, dose-selection, lead-in stage of a phase 3 study. *Am J Hematol* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2023 Jun 11];97(2):174–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34724251/>
61. A PHASE 1, DOSE ESCALATION TRIAL WITH NOVEL ORAL IRAK4 INHIBITOR.... EHA Library. Garcia-Manero G. Jun 9 2021; 324573 [Internet]. [cited 2023 Jun 11]. Available from: <https://library.ehaweb.org/eha/2021/eha2021-virtual-congress/324573/guillermo.garcia-manero.a.phase.1.dose.escalation.trial.with.novel.oral.irak4.html?f=listing%3D0%2Abrowseby%3D8%2Asortby%3D2%2Asearch%3Dblast>
62. Duncavage EJ, Bagg A, Hasserjian RP, DiNardo CD, Godley LA, Iacobucci I, et al. Genomic profiling for clinical decision making in myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* [Internet]. 2022 Nov 24 [cited 2023 Jun 12];140(21):2228–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36130297/>
63. Hosono N. Genetic abnormalities and pathophysiology of MDS. *Int J Clin Oncol* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2023 Jun 13];24(8):885–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31093808/>
64. Gaballa MR, Besa EC. Myelodysplastic syndromes with 5q deletion: pathophysiology and role of lenalidomide. *Ann Hematol* [Internet]. 2014 [cited 2023 Jun 13];93(5):723–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24627193/>
65. Ebert BL, Pretz J, Bosco J, Chang CY, Tamayo P, Galili N, et al. Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* [Internet]. 2008 Jan 17 [cited 2023 Jun 13];451(7176):335–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18202658/>

66. Zahr AA, Aldin ES, Komrokji RS, Zeidan AM. Clinical utility of lenalidomide in the treatment of myelodysplastic syndromes. *J Blood Med* [Internet]. 2014 Dec 22 [cited 2023 Jun 13];6:1–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25565910/>
67. Stahl M, DeVeaux M, De Witte T, Neukirchen J, Sekeres MA, Brunner AM, et al. The use of immunosuppressive therapy in MDS: clinical outcomes and their predictors in a large international patient cohort. *Blood Adv* [Internet]. 2018 Jul 24 [cited 2023 Jun 8];2(14):1765–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30037803/>
68. Sánchez-Castro J, Marco-Betés V, Gómez-Arbonés X, Arenillas L, Valcarcel D, Vallespi T, et al. Characterization and prognostic implication of 17 chromosome abnormalities in myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* [Internet]. 2013 Jul [cited 2023 Jun 13];37(7):769–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23639672/>
69. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, Okuno Y, Bacher U, Nagae G, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* [Internet]. 2014 Feb [cited 2023 Jun 7];28(2):241–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24220272/>
70. Greenberg PL, Stone RM, Al-Kali A, Bennett JM, Borate U, Brunner AM, et al. NCCN Guidelines® Insights: Myelodysplastic Syndromes, Version 3.2022. *J Natl Compr Canc Netw* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2023 Jun 7];20(2):106–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35130502/>
71. Xie Z, Chen EC, Stahl M, Zeidan AM. Prognostication in myelodysplastic syndromes (neoplasms): Molecular risk stratification finally coming of age. *Blood Rev* [Internet]. 2023 May 1 [cited 2023 Jun 7];59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36357283/>
72. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2023 Jun 15];19(1):4–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27993330/>
73. Chakravarty D, Gao J, Phillips S, Kundra R, Zhang H, Wang J, et al. OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base. *JCO Precis Oncol* [Internet]. 2017 Nov [cited 2023 Jun 15];2017(1):1–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28890946/>
74. Spaulding TP, Stockton SS, Savona MR. The evolving role of next generation sequencing in myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2023 Jun 15];188(2):224–39. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31571207/>
75. Tobiasson M, Kittang AO. Treatment of myelodysplastic syndrome in the era of next-generation sequencing. *J Intern Med* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2023 Jun 15];286(1):41–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30869816/>
76. Brian Dalton W, Helmenstine E, Pieterse L, Li B, Gocke CD, Donaldson J, et al. The K666N mutation in SF3B1 is associated with increased progression of MDS and distinct RNA splicing. *Blood Adv* [Internet]. 2020 Apr 14 [cited 2023 Jun 15];4(7):1192–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32211880/>
77. Wang H, Guo Y, Dong Z, Li T, Xie X, Wan D, et al. Differential U2AF1 mutation sites, burden and co-mutation genes can predict prognosis in patients with myelodysplastic syndrome. *Sci Rep* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2023 Jun 16];10(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33122737/>
78. Nazha A, Sekeres MA, Gore SD, Zeidan AM. Molecular Testing in Myelodysplastic Syndromes for the Practicing Oncologist: Will the Progress Fulfill the Promise? *Oncologist* [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2023 Jun 16];20(9):1069–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26194858/>

79. Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Cheok M, Grabar S, Della-Valle V, Picard F, et al. TET2 mutation is an independent favorable prognostic factor in myelodysplastic syndromes (MDSs). *Blood* [Internet]. 2009 [cited 2023 Jun 16];114(15):3285–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19666869/>
80. Thol F, Weissinger EM, Krauter J, Wagner K, Damm F, Wichmann M, et al. IDH1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes are associated with an unfavorable prognosis. *Haematologica* [Internet]. 2010 Oct [cited 2023 Jun 16];95(10):1668–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20494930/>
81. Falantes JF, Márquez-Malaver FJ, Carrillo E, Culebras MG, Morales R, Prats C, et al. SF3B1, RUNX1 and TP53 Mutations Significantly Impact the Outcome of Patients With Lower-Risk Myelodysplastic Syndrome. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2023 Jun 16];22(12):e1059–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36117041/>
82. Rinke J, Chase A, Cross NCP, Hochhaus A, Ernst T. EZH2 in Myeloid Malignancies. *Cells* [Internet]. 2020 Jul 8 [cited 2023 Jun 16];9(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32650416/>
83. Nazha A. The MDS genomics-prognosis symbiosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* [Internet]. 2018 Nov 30 [cited 2023 Jun 16];2018(1):270–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30504321/>
84. Wu J, Zhang Y, Qin T, Xu Z, Qu S, Pan L, et al. IPSS-M has greater survival predictive accuracy compared with IPSS-R in persons ≥ 60 years with myelodysplastic syndromes. *Exp Hematol Oncol* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2023 Sep 4];11(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36253799/>
85. Jiang L, Luo Y, Zhu S, Wang L, Ma L, Zhang H, et al. Mutation status and burden can improve prognostic prediction of patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *Cancer Sci* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2023 Sep 4];111(2):580–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31804030/>
86. Liang H, Feng Y, Guo Y, Jian J, Zhao L, Luo X, et al. Development and validation of a novel prognosis prediction model for patients with myelodysplastic syndrome. *Front Oncol* [Internet]. 2022 Oct 12 [cited 2023 Sep 4];12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36313674/>
87. Malcovati L, Galli A, Travaglino E, Ambaglio I, Rizzo E, Molteni E, et al. Clinical significance of somatic mutation in unexplained blood cytopenia. *Blood* [Internet]. 2017 Jun 22 [cited 2023 Sep 4];129(25):3371–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28424163/>
88. Montalban-Bravo G, Kanagal-Shamanna R, Benton CB, Class CA, Chien KS, Sasaki K, et al. Genomic context and TP53 allele frequency define clinical outcomes in TP53-mutated myelodysplastic syndromes. *Blood Adv* [Internet]. 2020 Feb 11 [cited 2023 Sep 4];4(3):482–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32027746/>
89. Aguirre LE, Al Ali N, Sallman DA, Ball S, Jain AG, Chan O, et al. Assessment and validation of the molecular international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Leukemia* [Internet]. 2023 Jul 1 [cited 2023 Sep 4];37(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37147425/>
90. Ibrar W, Zhang W, Cox JL, Cushman-Vokoun A, Fu K, Greiner TC, et al. The utility of a myeloid mutation panel for the diagnosis of myelodysplastic syndrome and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasm. *Int J Lab Hematol* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Sep 4];43(6):1501–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34270867/>
91. Impact of mutational variant allele frequency on prognosis in myelodysplastic syndromes - PubMed [Internet]. [cited 2023 Sep 4]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33415012/>

92. DiNardo CD, Venugopal S, Lachowiez C, Takahashi K, Loghavi S, Montalban-Bravo G, et al. Targeted therapy with the mutant IDH2 inhibitor enasidenib for high-risk IDH2-mutant myelodysplastic syndrome. *Blood Adv* [Internet]. 2023 Jun 13 [cited 2023 Sep 2];7(11):2378–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35973199/>
93. Sauta E, Robin M, Bersanelli M, Travaglino E, Meggendorfer M, Zhao LP, et al. Real-World Validation of Molecular International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *J Clin Oncol* [Internet]. 2023 May 20 [cited 2023 Sep 4];41(15):2827–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36930857/>



8.EKLER

8.1 Etik Kurul Onay Belgesi

Ege Üniv. Evrak Tarih ve Sayısı: 28.06.2022-E.752763



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : E-99166796-050.06.04-752763
Konu : Onay Kararı 22-6.1T/67

Prof. Dr. Haluk AKIN
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Kurulumuza başvurusunu yaptığınız "**Düşük ve intermediate-1 risk grubu, miyelodisplastik sendrom tanılı hastalarda yeni nesil dizi analizi tabanlı hedefe yönelik somatik mutasyon analizi**" konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmaktadır.

Başvuru dosyasının araştırmanın yürütüleceği kuruma iletilerek kurum iznini gösterir belgenin alınmasından sonra çalışmaya başlanması ve süreç içinde bu belgenin (daha öncesinde sunulmamış ise) Kurulumuza iletilmesi gerekmektedir.

Ayrıca ilgili mevzuat gereği araştırmaya başlama bildiriminin, bir yıllık süreyi aşması durumunda Yıllık Bildirimlerin, Ciddi Advers Olay bildirimlerinin, bitirme tarihinin ve sonuç raporunun kurulumuza sunulması ve her türlü yazışmanın araştırma tam adı/kodu, karar, tarih ve sayısı bildirilerek Etik Kurul Bilgilendirme formu ile yapılması gerekmektedir.

Başvuru dosyası kapsamında, araştırma giderlerinin **Genel Araştırma Projesi (GAP)** tarafından karşılanacağına ilişkin sunulmuş bulunan belge doğrultusunda, araştırmanızın desteklendiğine dair belgenin alınmasından sonra çalışmaya başlanması ve süreç içinde bu belgenin Kurulumuza iletilmesi gerekmektedir

Varsa **Biyolojik Materyal Transfer Formu'nun** imzaları tamamlanarak Kurulumuza iletilmesi gerekmektedir. 10.04.2016 tarih ve 29680 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanan Tıbbi Laboratuvarlar Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmeliğin 34. maddesinde "**yurtdışına tetkik amaçlı numune gönderme yetkisi sadece ruhsatlı tıbbi laboratuvarlara aittir**" ifadesi yer almakta olup bu madde Klinik Araştırmalar için de yürürlüğe girmiştir. Gönderilen insan kaynaklı biyolojik materyal klinik araştırma için gönderilse bile ruhsatlı bir tıbbi laboratuvar aracılığı ile <http://numunetransfer.saglik.gov.tr> adresindeki numune transfer yazılımı kullanılarak gönderilmesi konusuna dikkat edilmelidir.

Yazımızın bir örneğinin diğer araştırma merkezlerine ve destekleyiciye iletilmesi hususunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Güzide AKSU
Kurul Başkanı

Ek:İlgili Etik Kurul Kararı (1 Adet aslı gibidir örneği elden gönderilecektir)

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu :BS4PUK0M7Z

Belge Takip Adresi : <https://www.turkiye.gov.tr/ege-universitesi-ebys>

8.2 Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU
LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ !!! Bu çalışmaya vefat etmiş yakınınıza ait daha önce alınmış ve arşivde saklanan kemik iliği örneğinin kullanılmasına onay vermek üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yakınınıza ait örneğin kullanılmasını kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz.
Bu çalışmanın adı ne? Düşük ve intermediate-1 risk grubu, miyelodisplastik sendrom tanılı hastalarda yeni nesil dizi analizi tabanlı hedefe yönelik somatik mutasyon analizi
Bu çalışmanın amacı ne? Kemik iliği aspirasyon biyopsisi yapılmış düşük risk grubunda olup ölen MDS hastalarında moleküler profillemeye yaparak MDS hastalığına ait mevcut risk sınıflamasına ve tedavi seçimine yardımcı olmaktır.
Vefat etmiş yakınınıza ait daha önce alınan örneğe nasıl bir uygulama yapılacaktır? Daha önce kemik iliği aspirasyon biyopsisi uygulanan ve kriterleri sağlayan MDS hastalarına ait arşivdeki örnekler toplanarak, yeni nesil dizileme analizi tabanlı olarak genetik değişiklikler taranacaktır.
Farklı tedaviler için araştırma gruplarına rastgele atanma olasılığı nedir? Bu çalışmada tedavi üzerine bir yöntem planlanmamıştır.
Ne kadar zamanınızı alacaktır? Vefat etmiş yakınınıza ait kullanılacak örnekler daha önce alınmış olduğu için sadece sonuçlar için 15 dakikalık görüşme yapılacaktır.
Araştırmaya katılması beklenen tahmini gönüllü sayısı kaçtır? 21
Vefat etmiş yakınınıza ait daha önce alınan biyolojik materyallere ne olacak ve analizler nerede yapılacaktır? (Analizlerin yurtdışında yapılması durumunda biyolojik materyallerin nereye gönderileceğinin açıklanması) Kemik iliği aspirasyon biyopsileri lama yayılarak incelenmekte ve daha sonra arşivde saklanmaktadır. Bu örnekler öncelikle lamdan kazınarak örnekler ait DNA elde edilecek ve daha sonra EÜTF Tıbbi Genetik AD içerisinde örneklerin analizi yapılacaktır. Örnekler yurtdışına çıkmayacaktır.
Sizden beklenen nedir? Sizin sorumluluklarınız nelerdir? Vefat etmiş yakınınıza ait arşivde bekleyen kemik iliği aspirasyon biyopsi örneklerinin kullanımına izin vermeniz istenmektedir.
Çalışmaya katılmak vefat etmiş yakınınıza ne yarar sağlayacaktır? Bu çalışma yurt içerisinde bu tarz testlerin yapılabilmesine olanak sağlayacaktır.
Araştırmaya katılımının sona erdirilmesini gerektirecek durumlar nelerdir? Örneğin yetersiz ya da uygunsuz olması durumunda katılım iptal edilecektir.
Çalışmaya katılmak vefat etmiş kişiye herhangi bir zarar verebilir mi? Hayır.
Eğer katılmak istemezseniz ne olur? Çalışmaya katılmak istemezseniz vefat etmiş yakınınıza ait örnek çalışmaya dahil edilmez.
Size uygulanabilecek olan alternatif yöntemler nelerdir? Yoktur.

Bu çalışmaya vefat etmiş yakınımaya ait örneğin dahil edilmesine onay verdiğim için bana herhangi bir ücret ödenecek mi?												
Hayır.												
Bu çalışmaya vefat etmiş yakınımaya ait örneğin dahil edilmesine onay verdiğim için ben herhangi bir ücret ödeyecek miyim?												
Yapılacak her tür tetkik, fizik muayene ve diğer araştırma masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir.												
Bilgilerin gizliliği: Vefat etmiş yakınınıza ait tüm kişisel ve tıbbi bilgiler gizli kalacak, sadece bilimsel amaçlarla kullanılacaktır. Araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi yakınınızın kimliği gizli kalacaktır.												
Bu çalışmanın sorumlusunun iletişim bilgileri												
1- Adı, soyadı: Prof. Dr. Haluk AKIN												
2- Ulaşılabilir telefon numarası:												
3- Görev yeri: EÜTF, Tıbbi Genetik AD.												
Çalışmaya Katılma Onayı:												
Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya vefat etmiş yakınımaya ait örneğin dahil edilmesini isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, vefat etmiş yakınımaya ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin vefat eden yakınımaya ait örneğin kullanılması adına bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. Araştırmaya vefat etmiş yakınımaya ait örneğin kullanılması için gönüllü olarak onay verdiğimi, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan yakınımaya ait örneğin çıkarılmasına karar verebileceğimi biliyorum. Bu formu imzalamakla yerel yasaların bana sağladığı hakları kaybetmeyeceğimi biliyorum. Bilgilendirilmiş gönüllü olurunun imzalı ve tarihli bir kopyasının bana verileceğini biliyorum.												
<table><tr><th colspan="2">GÖNÜLLÜNÜN</th><th>İMZASI</th></tr><tr><td>ADI & SOYADI</td><td></td><td rowspan="4"></td></tr><tr><td>ADRESİ</td><td></td></tr><tr><td>TELEFONU</td><td></td></tr><tr><td>TARİH</td><td></td></tr></table>	GÖNÜLLÜNÜN		İMZASI	ADI & SOYADI			ADRESİ		TELEFONU		TARİH	
GÖNÜLLÜNÜN		İMZASI										
ADI & SOYADI												
ADRESİ												
TELEFONU												
TARİH												
<table><tr><th colspan="2">Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasiinin</th><th>İMZASI</th></tr><tr><td>ADI & SOYADI</td><td></td><td rowspan="4"></td></tr><tr><td>ADRESİ</td><td></td></tr><tr><td>TELEFONU</td><td></td></tr><tr><td>TARİH</td><td></td></tr></table>	Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasiinin		İMZASI	ADI & SOYADI			ADRESİ		TELEFONU		TARİH	
Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasiinin		İMZASI										
ADI & SOYADI												
ADRESİ												
TELEFONU												
TARİH												
<table><tr><th colspan="2">Araştırma ekibinde yer alan ve araştırma hakkında bilgilendirmeyi yapan yetkin bir araştırmacının</th><th>İMZASI</th></tr><tr><td>ADI & SOYADI</td><td></td><td rowspan="4"></td></tr><tr><td>ADRESİ</td><td></td></tr><tr><td>TELEFONU</td><td></td></tr><tr><td>TARİH</td><td></td></tr></table>	Araştırma ekibinde yer alan ve araştırma hakkında bilgilendirmeyi yapan yetkin bir araştırmacının		İMZASI	ADI & SOYADI			ADRESİ		TELEFONU		TARİH	
Araştırma ekibinde yer alan ve araştırma hakkında bilgilendirmeyi yapan yetkin bir araştırmacının		İMZASI										
ADI & SOYADI												
ADRESİ												
TELEFONU												
TARİH												

8.3 Veri Toplama Formu

VERİ TOPLAMA / OLGU RAPOR FORMU	
Olgu Numarası:	Tarih:
1- Kimlik bilgileri • Yaş • Cinsiyet • Exitus durumu 2- Kemik iliği aspirasyon biyopsi sonucu 3- IPSS risk sınıflaması 4- Saptanan somatik mutasyonlar 5- Çalışmada kullanılacak genetik panel içerisinde özellikle literatürde ve güncel kılavuzlarda belirlenen moleküler parametreler (<i>SF3B1</i>, <i>TP53</i>, <i>EZH2</i>, <i>EVT6</i>, <i>RUNX1</i>, <i>ASXL1</i>, <i>IDH1</i> ve <i>IDH2</i>)	
Açıklamalar:	

8.4 Tez Çalışması Orijinallik Raporu

Ege Ün. Evrak Tarih ve Sayısı: 14.09.2023-E.1454413



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Dekanlığı
Asistan Bürosu

Sayı : E-71437136-903.07.03-1454413
Konu : Dr. Duygu ARICAN NOROOZI

DAĞITIM YERLERİNE

İlgi : 07.09.2023 tarihli ve 1445150 sayılı yazı.

Anabilim Dalınızda tıpta uzmanlık öğrencisi olarak görev yapmakta olan Dr. Duygu ARICAN NOROOZI'nın "Düşük ve Intermediate-1 Risk Grubu, Miyelodisplastik Sendrom Tanılı Hastalarda Yeni Nesil Dizi Analizi Tabanlı Hedefe Yönelik Somatik Mutasyon Analiz" konulu tezi, Tez Çalışması Benzerlik Tespit Yazılım Programında incelenmiş olup, tez savunma sınavına girmesi, Dekanlığımızca uygun görülmüştür.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Rüçhan SERTÖZ
Dekan V.

Dağıtım:
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanlığına
Sayın Prof. Dr. Haluk AKIN

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu :BS5Y75K5YP

Belge Takip Adresi : <https://www.turkiye.gov.tr/ege-universitesi-ebys>

Düşük ve İntermediate-1 Risk Grubu, Miyelodisplastik Sendrom Tanılı Hastalarda Yeni Nesil Dizi Analizi Tabanlı Hedefe Yönelik Somatik Mutasyon Analizi

ORJİNALLIK RAPORU

%**5**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**4**

İNTERNET KAYNAKLARI

%**1**

YAYINLAR

%**1**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

%**1**

2

docplayer.biz.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

3

www.thd.org.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

4

Submitted to Ege Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

<%**1**

5

openaccess.ogu.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

<%**1**

6

www.yslmhy.com

İnternet Kaynağı

<%**1**

7

Marc Abi Karam, Hampig Raphael Kourie, Nadine Jalkh, Cybel Mehawej et al. "Molecular profiling of basal cell carcinomas in young patients", BMC Medical Genomics, 2021

Yayın

<%**1**

8	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	<% 1
9	f.hubspotusercontent30.net İnternet Kaynağı	<% 1
10	dspace.kocaeli.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
11	Submitted to Perdana University Öğrenci Ödevi	<% 1
12	9lib.net İnternet Kaynağı	<% 1
13	jnccn.org İnternet Kaynağı	<% 1
14	cibmtr.org İnternet Kaynağı	<% 1
15	www.intechopen.com İnternet Kaynağı	<% 1
16	Submitted to Eskisehir Osmangazi University Öğrenci Ödevi	<% 1
17	cdn.reachmd.com İnternet Kaynağı	<% 1
18	www.mikrogenlab.com İnternet Kaynağı	<% 1
19	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1

20	bio2vec.cbrc.kaust.edu.sa İnternet Kaynağı	<% 1
21	Submitted to Utica College Öğrenci Ödevi	<% 1
22	med.ege.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
23	www.janssen.com.tr İnternet Kaynağı	<% 1
24	www.medimagazin.com.tr İnternet Kaynağı	<% 1
25	f749d2de-b9db-4cec-b6d0-ee07a424fefb.filesusr.com İnternet Kaynağı	<% 1
26	imcidu.idu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
27	tibbigenetik-med.ege.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
28	www.mayocliniclabs.com İnternet Kaynağı	<% 1
29	"Plant Long Non-Coding RNAs", Springer Science and Business Media LLC, 2019 Yayın	<% 1
30	Li, Shiqiang, Li Huang, Xueshan Xiao, Xiaoyun Jia, Xiangming Guo, and Qingjiong Zhang. "Identification of CNGA3 Mutations in 46	<% 1

Families : Common Cause of Achromatopsia and Cone-Rod Dystrophies in Chinese Patients", JAMA Ophthalmology, 2014.

Yayın

31	Richard T. Silver, Ariella C. Barel, Elena Lascu, Ellen K. Ritchie et al. "The effect of initial molecular profile on response to recombinant interferon- α (rIFN α) treatment in early myelofibrosis", Cancer, 2017	<%1
32	bdm.ufmt.br İnternet Kaynağı	<%1
33	hdl.handle.net İnternet Kaynağı	<%1
34	acikerisim.selcuk.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
35	seer.cancer.gov İnternet Kaynağı	<%1
36	acikerisim.firat.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
37	jag.journalagent.com İnternet Kaynağı	<%1
38	www.mdpi.com İnternet Kaynağı	<%1
39	Pongthep Vittayawacharin, Piyanuch Kongtim, Stefan O. Ciurea. "Comprehensive Review on	<%1

Allogeneic Stem Cell Transplantation for
Patients with Myelodysplastic Syndromes",
American Journal of Hematology, 2022

Yayın

40	ctep.cancer.gov İnternet Kaynağı	<% 1
41	egehastane.ege.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
42	surface.syr.edu İnternet Kaynağı	<% 1
43	www.jove.com İnternet Kaynağı	<% 1
44	www.kvakademi.org İnternet Kaynağı	<% 1
45	www.nature.com İnternet Kaynağı	<% 1
46	www.ncbi.nlm.nih.gov İnternet Kaynağı	<% 1
47	www.tandfonline.com İnternet Kaynağı	<% 1
48	Barbara J. Bain. "Leukaemia Diagnosis", Wiley, 2017 Yayın	<% 1