

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

AKUT MİYELOİD LÖSEMİLERİN AKIM SİTOMETRİ
İLE TANIMLANMASINDA MPO EKSPRESYONUNUN
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
Rana ERBAY SIR

Danışman
Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER

Yüksek Lisans Tezi

HAZİRAN 2022
KAYSERİ

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**AKUT MİYELOİD LÖSEMİLERİN AKIM SİTOMETRİ
İLE TANIMLANMASINDA MPO EKSPRESYONUNUN
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

**Hazırlayan
Rana ERBAY SIR**

**Danışman
Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER**

**HAZİRAN 2022
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Rana ERBAY SIR

İMZA

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

Akut Miyeloid Lösemilerin Akım Sitometri ile Tanımlanmasında MPO Ekspresyonunun Etkisinin Araştırılması” adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Rana ERBAY SIR

Danışman

Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER



Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER

KABUL VE ONAY

Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER danışmanlığında **Rana ERBAY SIR** tarafından hazırlanan “**Akut Miyeloid Lösemilerin Akım Sitometri İle Tanımlanmasında MPO Ekspresyonunun Etkisinin Araştırılması**” konulu bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalı’nda **Yüksek Lisans** Tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

İMZA

Danışman: Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER

Üye: Prof. Dr. Ali ÜNAL

Üye: Prof. Dr. İnsu YILMAZ

Üye: Doç. Dr. Mustafa NİSARİ

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin AVCILAR

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun/...../22 tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../2022

Prof.Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim süresi ve tez çalışmamda bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım aynı zamanda tez danışmanlığımı yapan, değerli hocam Anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER'e,

Tez yazım sürecimde katkı ve önerileri için Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin AVCILAR'a, İmmünoloji doktora öğrencileri Sinan KÜTÜK ve Sevil ŞİMŞEK'e

Tez çalışmam süresince, desteğini esirgemeyen İmmünoloji laboratuvarı çalışanı ekip arkadaşım teknisyen Hüsniye TAYYAR ve tüm doku tipleme laboratuvarı personeli arkadaşlarıma,

Hayatımın her döneminde yanımda olan özellikle ANNEM olmak üzere aileme ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen eşim İbrahim SIR, oğullarım Egehan ve Tunahan'a

Teşekkür ederim.

**AKUT MYELOİD LÖSEMİLERİN AKIM SİTOMETRİ İLE
TANIMLANMASINDA MPO EKSPRESYONUNUN ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Rana ERBAY SIR

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

İmmünoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi-HAZİRAN 2022

Danışman: Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER

ÖZET

Akut lösemiler, hemotopoetik kök hücrelerin neoplastik gelişimi sonucu oluşan kemik iliğinin malign bir hastalığıdır. Akut myeloid lösemi (AML) ise kemik iliğindeki myeloid progenitör hücrelerin etkilenmesi sonucu oluşur. Myeloperoksidaz (MPO) enzimi ise myeloid seride nötrofilde yer alan ve fagozom içerisinde NADPH oksidaz enzimi ile etkileşen ve öldürücü reaktif oksijen ürünleri üretimine katkı sağlayan lizozomal bir enzimdir.

Akım sitometri ile AML tanısında MPO ekspresyonunun gösterilmesi tanıya yardımcı önemli bir işlemdir. Akım sitometri ile AML immünofenotiplendirmesinde MPO pozitif ve negatif AML subtiplerinin ayrımı yapılabilir.

Çalışmamız, akım sitometri ile AML tanısı doğrulanan 13'ü kadın hasta (31-83 yaş), 27'si erkek (29-86 yaş) olmak üzere toplamda 40 erişkin yeni tanı AML hastası ile yürütüldü. Akım sitometride %20 ve üzerinde blast varlığı AML olarak kabul edildi. AML karakterizasyonunda kullanılan CD117, CD13, CD33 ve HLADR gibi blastik yüzey markerlarının MPO pozitif (+) ve MPO negatif (-) hastalardaki durumu karşılaştırıldı.

MPO'nun pozitif ve negatif hastalar arasında CD117, CD13, CD34, CD33 ve HLA-DR ekspresyonları yönünden anlamlı bir istatistik farklılık olduğu gözlemlendi. ($p < 0.001$) MPO pozitif hasta grubunda ortalama CD117⁺ ve CD13⁺ blast yüzdesinin MPO negatif hastalardan sırası ile 1.96 ve 1.54 kat daha yüksek olduğu gözlemlendi.

Çalışmamız MPO ekspresyonunun AML karakterizasyonu ve subtiplendirmesinde belirleyici önemli bir faktör olduğunu göstermiştir. MPO ekspresyon durumunun hastaların klinik izlemi ile birlikte değerlendirilmesi hasta takibinde yardımcı bir parametre olabilir.

Anahtar Kelimeler: Akut Myeloid Lösemi; Blast; Myeloperoksidaz; Akım sitometri.

**INVESTIGATION OF THE EFFECT OF MPO EXPRESSION ON THE
DEFINITION OF ACUTE MYELOID LEUKEMIA WITH FLOW
CYTOMETRIC**

Rana ERBAY SIR

Erciyes University, Graduate School of HealthSciences

Department of Immunology

Master of Science Thesis--M.Sc. Thesis, June 2022

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER

ABSTRACT

Acute leukemias are a malignant disease of the bone marrow resulting from the neoplastic development of hematopoietic stem cells. Acute myeloid leukemia (AML) occurs as a result of the myeloid progenitor cells in the bone marrow being affected. On the other hand, Myeloperoxidase (MPO) enzyme is a lysosomal enzyme that takes place in the neutrophil in the myeloid series and interacts with the NADPH oxidase enzyme in the phagosome and contributes to the production of lethal reactive oxygen products.

Demonstrating MPO expression by flow cytometry in the diagnosis of AML is an important procedure that helps the diagnosis. MPO positive and negative AML subtypes can be differentiated in AML immunophenotyping by flow cytometry.

Our study was worked out with a total of 40 adult newly diagnosed AML patients, 13 of whom were female (31-83 years old) and 27 were male (29-86 years old), whose AML diagnosis was confirmed by flow cytometry. The presence of 20% or more blasts in flow cytometry was accepted as AML. The status of blastic surface markers such as CD117, CD13, CD33 and HLADR used in AML characterization in MPO positive (+) and MPO negative (–) patients were compared.

It was observed that there was a statistically significant difference in CD117, CD13, CD34, CD33 and HLA-DR expressions between MPO positive and negative patients. ($p < 0.001$) It was observed that the mean percentage of CD117+ and CD13+ blasts in the MPO positive patient group was 1.96 and 1.54 times higher than the MPO negative patients, respectively.

Our study showed that MPO expression is an important determining factor in AML characterization and subtyping. Evaluation of MPO expression status together with the clinical follow-up of the patients may be a helpful parameter in patient follow-up.

Key words: Acute Myeloid Leukemia; Blast; Myeloperoxidase; Flow cytometry.

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
KABUL VE ONAY	iii
ONAY	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR ve SİMGELER	x
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiii
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kök Hücre	3
2.1.1. Kaynaklarına Göre Kök Hücre Çeşitleri	4
2.1.1.1. Mezenkimal kök hücreler	4
2.2. Kemik İliği Yapısı ve Hücreleri	5
2.2.1. Miyelopoez	6
2.3. Nötrofil Nedir?	8
2.3.1. Nötrofil Yaşam Döngüsü.....	10
2.3.2. Granülopoez	10
2.4. Akut Lösemi	13
2.4.1. Akut Löseminin Tarihçesi	13
2.4.2. Akut Lösemide Sınıflandırma	13
2.4.2.1. Sınıflandırmada Sayısal Değerlendirme	14
2.4.2.2. Sınıflandırmada Morfolojik Değerlendirme	14
2.4.2.3. Sınıflandırmada İmmünoloji İle Değerlendirme	15
2.5. Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)	16
2.6. Akut Myeloblastik Lösemi.....	16

2.6.1. Tanım.....	16
2.6.2. AML Sıklığı, İnsidansı, Risk Faktörleri	17
2.6.3. AML Subtipleri	18
2.6.3.1. AML M0 (Minimal Farklılaşma Gösteren Akut Myeloid Lösemi)	18
2.6.3.2. AML M1 (Olgunlaşma Göstermeyen Akut Myeloblastik Lösemi).....	19
2.6.3.3. AML M2 (Granülositik Olgunlaşma Gösteren Akut Myeloblastik Lösemi).....	20
2.6.3.4. AML M3 (Akut Promyelositer Lösemi).....	20
2.6.3.5. AML M4 (Myelomonositik Lösemi).....	21
2.6.3.6. AML M5 (Akut Monoblastik/Monositik Lösemi)	22
2.6.3.7. AML M6(Akut Eritro Lösemi)	23
2.6.3.8. AML M7 (Megakaryo-blastik Lösemi)	24
2.7. Akut Lösemilerde Tanı	24
2.8. Myeloperoksidaz (MPO) Enzimi	26
2.9. Myeloid Sistemin Değerlendirilmesinde İzlenecek Yöntemler	28
2.9.1. Sayısal Değerlendirme.....	28
2.9.2. Morfolojik Değerlendirme.....	29
2.9.3. Akım Sitometri ve immünolojik değerlendirme.....	29
2.9.3.1 Akım Sitometrinin Avantajları	31
2.9.3.2 Akım Sitometrinin Dezavantajları	31
2.9.4. Lösemilerde Akım Sitometri ile İmmüno fenotipleme	33
3.GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.1. Gereçler	36
3.1.1 Alet ve Cihazlar	36
3.1.2 Kullanılan Sarf Malzemeler	36
3.1.3 Çalışmada Kullanılan Monoklonal Antikorlar	36
3.2. Deneysel yöntem	36
3.2.1. Hasta Örneklerinin Eldesi.....	36
3.3. Akım Sitometrik Analiz Uygulamaları	37
3.3.1. Akım Sitometrinin Hazırlanma Aşaması.....	37

3.3.2. Akım Sitometri Örnek Hazırlama İşlem Basamakları.....	37
3.4. Hücre Karakterizasyonunda Kullanılan Kapılama İşlemleri	38
3.5. İstatistiksel Analiz	39
4. BULGULAR	40
4.1. Çalışmaya Dahil Olan Hastalar ve Özellikleri	40
4.2. Çalışmada Yer Hastaların İmmüno-fenotiplendirilmesi	42
4.3. MPO pozitif/negatiflik Durumu ve Blastik Marker İlişkisi	44
4.3.1. Hastalarda CD117 ve MPO Ekspresyon İlişkisi	44
4.3.2. Hastalarda CD13 ve MPO Ekspresyon İlişkisi	44
4.3.3. Hastalarda CD33 ve MPO Ekspresyon İlişkisi	45
4.3.4. Hastalarda CD34 ve MPO Ekspresyon İlişkisi	46
4.3.5. Hastalarda HLADR ve MPO Ekspresyon İlişkisi	47
4.3.6. CD45 dim kapısı Blast yüzdesi ve MPO Ekspresyon İlişkisinin gösterilmesi.....	47
4.4. Ortalama Blast Yüzdesine göre AML Markerlarının Karşılaştırılması	48
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	51
6.KAYNAKLAR	54
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR ve SİMGELER

ALL	: Akut lenfoblastik lösemi
ALL	: Akut Lenfoblastik Lösemi
AML	: Akut Myeloid Lösemi
AML	: Akut myeloid lösemi
AMML	: Acute myelomonocytic leukemia
ASM	: Akım Sitometi
BMSC	: Kemik İliği Stromal Hücresi
CD	: Cluster of Differentiation
CFU-GM	: Granulocyte-Macrophage colony forming unit
CLP	: Common lenfoid progenitor
CMP	: Common myeloid progenitor
DNA	:Deoksiribo Nükleik Asit
ECM	: Ekstrasellüler matriks
EGIL	: European Group for the Immunological Classification of Leukemias
EKH	: Endotel Progenitör Hücreler
FAB	: Fransız-Amerikan-British
FCM	: Flow sitometri
FITC	: Florescein İsotiyosiyanat
G-CSF	: Granülosit Koloni Stimulan Faktör
G-CSF	: Granülosit colony stimule factor
GM-CSF	: Granülosit Makrofaj Koloni Stimulan Faktör
GM-CSF	:Granulocyte-Macrophage colony stimule factor
GMP	: Granulocyte Monosit progenitor
GVH	: Graft Versus Host

GVHH	: Graft Versus Host Hastalığı
HKH	: Hemaopoetik Kök Hücre
HLA	: İnsan Lökosit Antijeni
HSC	: Hematopoetik kök hücre
IHC	: İmmünohistokimya
Kİ	:Kemik İliği
KLL	:Kronik Lenfositik Lösemi
KML	:Kronik Miyeloid Lösemi
LKH	:Lösemik Kök Hücre
LMPP	: Lymphomyeloid primed progenitor
M-CSF	: Makrofaj koloni uyarıcı faktör
MKH	: Mezenkimal kök hücre
MPO	: Myeloperoksidaz
MPP	: Multipotential progenitor
NK	: Doğal öldürücü
PMN	: Polimorfonükleer monosit
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
WHO	: World health organisation, Dünya sağlık örgütü

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 4.1. Çalışma grubundaki hastaların yaş, cinsiyet ve blast yüzdesi.....	41
Tablo 4.2. MPO negatif hastalarda AML blast yüzdeleri ve karakterizasyonu	42
Tablo 4.3. MPO pozitif hastalarda AML blast karakterizasyonu.....	43
Tablo 4.4. MPO+/MPO- Hastalarda ortalama AML Markerlar ve Blast Yüzdeleri	48
Tablo 4.5. Markerlara Göre Ortalama Blastın MPO+/MPO- Hastalarda oranı	49



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Hematopoetik kök hücrenin bölünme süreci	5
Şekil 2.2.	Miyelopoez ve sentezlenen hücreler	8
Şekil 2.3.	Nötrofil gelişimsel süreci ve olgunlaşma aşamaları	11
Şekil 2.4.	Granül oluşumunun zamanlamasını.....	12
Şekil 2.5.	Normal ve blastik hücre görüntüsü	15
Şekil 2.6.	AML M0 da blastların CD45 kapısında yerleşimi.....	19
Şekil 2.7.	AML M1’de blastların CD45 kapısında yerleşimi	19
Şekil 2.8.	AML M2’de blastların CD45 kapısında yerleşimi	20
Şekil 2.9.	AML M3de blastların CD45 kapısında yerleşimi.....	21
Şekil 2.10.	AML M4’de blastların CD45 kapısında yerleşimi	22
Şekil 2.11.	AML M5’de blastların CD45 kapısında yerleşimi	23
Şekil 2.12.	AML M6’da blastların CD45 kapısında yerleşimi	24
Şekil 2.13.	AML suptiplendirilmesinde akım sitometrik kapılama ile blast tayini	26
Şekil 2.14.	Myeloperoksidaz protein sentezinde yeralan ardışık adımlar.....	28
Şekil 2.15.	Akım Sitometri Cihazının Çalışma Prensibi.....	31
Şekil 2.16.	Akım Sitometri Cihaz görüntüsü	32
Şekil 3.1.	CD45 dim de yerleşik MPO pozitif blastlardaki AML markır analizi	38
Şekil 4.3.	CD117 ⁺ blast yüzdesi ve MPO ilişkisinin karşılaştırması	44
Şekil 4.4.	CD13 ⁺ blast yüzdesi ve MPO ilişkisinin karşılaştırması	45
Şekil 4.5.	CD33 ⁺ blast yüzdesi ve MPO ilişkisinin karşılaştırması	46
Şekil 4.6.	CD34 ⁺ blast yüzdesi ve MPO ilişkisinin karşılaştırması	46
Şekil 4.7.	HLADR ⁺ blast yüzdesi ve MPO ilişkisinin karşılaştırması	47
Şekil 4.8.	CD45dim kapısı blast yüzdesi ve MPO ilişkisinin karşılaştırması.....	48
Şekil 4.9.	Örneklerde ortalama blast yüzdesine göre AML markırlarının karşılaştırılması.....	49
Şekil 4.10.	MPO+/MPO- Hastalarda ortalama AML Markerlar ve Blast oranı	50

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Akut lösemiler, hemotopoetik kök hücrelerin normal gelişimsel sürecinin bozulması sonucu oluşan kemik iliğinin malign bir hastalığıdır. Akut miyeloid lösemi (AML) ise kemik iliğinde miyeloid progenitör hücrelerin kontrolsüz çoğalmasıyla karakterize bir hastalıktır. Enfeksiyonlara karşı koruyuculuk görevi olan sağlıklı nötrofil ve monositler eksikliği ağır enfeksiyon tablolarına neden olabilir. Blastların fenotiplendirilmesi ile hücre kökenlerini (miyeloid, B lenfoid, T-lenfoid veya belirsiz) ve farklılaşma/olgunluk aşamalarını gösterebiliriz. Akım sitometri immünfenotiplemede ilk tercih edilen laboratuvar yöntemlerinden birisidir.

Myelo-monositik seride yer alan hücre popülasyonlarının (nötrofil, monosit, eozinofil, vb) kantitatif olarak gösterilebilmesi, maturasyon düzeylerinin belirlenmesi, blastik hücrelerin normal hücrelerden ayrı olarak kapılanarak tanımlanması akım sitometri uygulamaları ile mümkün olabilmektedir. Akım sitometri ile hücrelerin büyüklük (çap), sitoplazmik granüler yapı ve yüzey antijenlerinin ekspresyon miktarı konusunda bilgi edinilebilmektedir. Akut lösemilerin tanısında kemik iliği ve kandan yapılan akım sitometri ile immün-fenotiplendirme önemli yer tutmaktadır.

Akut miyeloid lösemi tanısında blastlarda miyeloid spesifik antijenler ve miyeloperoksidaz (MPO) ekspresyonun ölçümü yapılır. Akım sitometri yanısıra immünohistokimya (IHC) veya sitokimya ile boyama yapılabilir. AML tanısı, subtiplendirmesi ve blast yüzdesinin belirlenmesinde akım sitometri ile immünfenotiplendirme sıklıkla başvuru alan standart bir yöntemdir. MPO ise AML'nin diğer lösemilerden (akut lenfoblastik lösemi) ayırt edilmesinde kullanılan önemli bir belirteçtir.

Çalışmamızda, %20 üzerinde blastik hücreye rastlanan 40 erişkin yeni tanı AML hastasında akım sitometri ile immün-fenotiplendirme çalışması yürütüldü. Bu çalışmada, hasta grubunda MPO (pozitif/negatif) ile myeloid spesifik hücre yüzey markırları CD117, CD13, CD33 ve HLADR arasındaki etkileşimi karşılaştırmak amaçlanmıştır.

Çalışma AML subtiplendirmesi ile MPO pozitif ve MPO negatif ekspresyon durumunun klinik tanı, fenotip, subtip ilişkisi ile hastalık izleminde prognostik bir belirteç olarak kullanılabilmesine ışık tutulacaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücre

Bilim tarihinde en çok yankı uyandıran araştırma sonuçlarından kök hücrelerin tanımlanması ve izole edilmesi. Kök hücreler eşsiz özelliklere sahiptirler ve bu sayede hem temel biyolojik hem de klinik araştırmalar için oldukça değerlidirler. Kök hücreler bölünebilme özelliğinde, yenilenebilen ve özelleşmiş fonksiyonel hücrelere başkalaşma (diferansiyasyon) yeteneğine sahip farklılaşmamış hücrelerdir (Weissman, 2000). Kök hücreler, geniş bir rejeneratif potansiyele ve çeşitli hücre soylarına fonksiyonel olarak farklılaşma yeteneğine sahiptir, bu da onları doku mühendisliği, hücre tedavisi ve ilaç taraması gibi birçok uygulama için çok çekici hale getirir (Lemischka, 2001). Kök hücreler, kökenlerine bakılmaksızın üç temel kritere göre tanımlanır. Bunlardan ilki; kök hücre havuzunun devamını sağlamak için gerekli olan farklı hücre bölünmelerinin, uzun süreler boyunca bölünme ve kendini yenileme yeteneğidir. İkincisi; tek hücre düzeyinde, tipik olarak çoklu soylara farklılaşan hücreler üretme yeteneğidir. Üçüncü kriter, belirli bir dokuyu in vivo olarak işlevsel olarak yeniden oluşturma yeteneğidir (Eaves ve ark., 1997). Kök hücreler vücudumuzu meydana getiren tüm doku ve organların yapısını oluşturan ve herhangi bir hücreye dönüşebilme yetenekleri olduğu için kanser, diyabet, çok çeşitli otoimmün hastalıklar ile özellikle Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların dahil olduğu birçok hastalıkların tedavisi için umut vermektedir. Bu sebeple kök hücre çalışmaları, vücudun fizyoloji ve patolojisinin anlaşılabilmesi ve hastalıkların tedavisi için son derece önem arz etmektedir (Akashi ark., 2000).

2.1.1. Kaynaklarına Göre Kök Hücre Çeşitleri

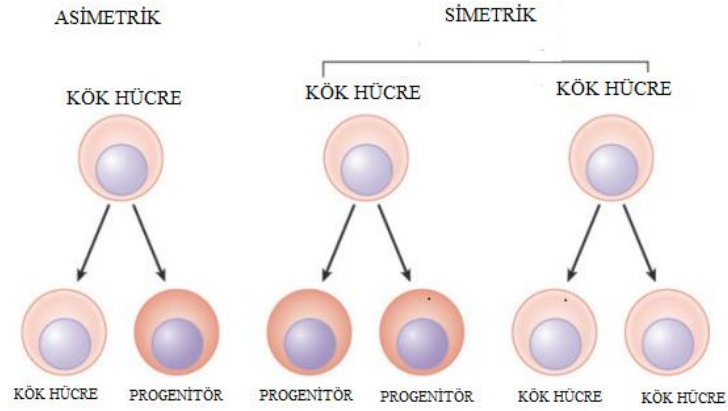
Embriyonik kök hücrelere ek olarak blastosist, embriyonik yaprak ve fetal doku, kök hücreler, kemik iliği, kas dokusu, süngerimsi kemik, nöral krest, dermis, yağ dokusu, periosteum, perisitler, sinovyum, kan, amniyotik sıvı, Wharton jel, göbek kordonu kan, göbek kordonu stroması ve diş özü gibi birçok farklı yetişkin dokusundan da izole edilebilir. Sınıflandırma konusunda çok farklı görüşler olsa da kök hücreler temel olarak kendini yenileme ve farklılaşma yeteneklerine göre iki kategoriye ayrılmaktadır(Zhang & Wang, 2008).

2.1.1.1. Mezenkimal kök hücreler

Mezenkimal kök hücreler (MKH'ler), birçok yetişkin dokunun stromal fraksiyonunda bulunan çeşitli pluripotent öncü hücrelerin alt kümesidir. İn vitro proliferasyondan sonra osteoblastlara, adipositlere ve kondrositlere farklılaşma yetenekleri ile fonksiyonel olarak tanımlanırlar. (Nombela-Arrieta ve ark., 2011) MKH'ler, kemik iliği (Kİ) mikro ortamında önemli bir hücre popülasyonudur ve bu hücrelerin Kİ stromasına farklılaşması nedeniyle hematopoezi teşvik etmede önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir(Wexler ve ark., 2003).

2.1.1.2. Hematopoetik Kök Hücreler

Hematopoetik kök hücreler bölünerek kendi kendini yenileyebilen (self-renewal),farklılaşarak olgun kan hücrelerine dönüşebilen (differansiasyon) ve farklılaşarak fonksiyonel hücreye dönüşebilen hücrelerdir. Dolayısıyla hematopoez kan hücrelerinin kontrollü bir şekilde üretilmesini içeren bir süreçtir. Hematopoetik kök hücreler(HKH) sessiz(uykuda) durumdadırlar, 2-3 ayda bir bölünmek için uyanırlar böylelikle mutasyondan da korunurlar. Ancak anemi veya enfeksiyon gibi acil durumlarda bu süre kısalacak ve normal şartlarda bir HKH ve bir farklılaşacak şekilde progenitör hücre oluşturacak şekilde asimetrik bölünecek olan hücre, daha çok progenitör hücre oluşturmak için simetrik bölünme gösterir(Rieger & Schroeder, n.d.).(Şekil 2.1.)



Şekil 2.1. Hematopoetik kök hücrenin bölünme süreci

Nişlerinde, hematopoietik kök hücreler (HKH'ler), Kİ mikroçevresinde kendi kendilerini yeniledikleri özel bölgelerdir. Kök hücre sessizliğini, çoğalma, farklılaşma ve göçünü düzene koyar. Kök hücreler, yapışma mekanizmaları dahil olmak üzere çeşitli moleküler sinyalleri değiştirerek nişlerle etkileşime girer. Kİ'de iki farklı mikro-çevresel niş, osteoblast (endosteal) ve vasküler nişlerin uyum içinde çalıştığı gösterilmiştir(Perry & Li, 2007).

2.2. Kemik İliği Yapısı ve Hücreleri

Fonksiyonel açıdan kemik iliğini hematopoetik, parankimal, stromal veya mezenkimal olarak sınıflandırılabiliriz. Hematopoez, stromal hücreler, hücre dışı alan ve hematopoietik hücrelerden ibaret bir mikroçevrede ortaya çıkar. Hematopoietik progenitör proliferasyonu ve farklılaşması, progenitörler yada sitokinler ile bu mikroçevredeki ekstra selüler matriks (ECM) bileşenleri yada stromal hücreler arasındaki karşılıklı etki dolayısıyla başlatılan reseptör sinyali ile düzenlenir.

Hematopoetik hücrelerin çoğalması farklılaşması için kemik iliğindeki kan hücrelerinin beraberinde stromal hücreler ve aralarında yağ hücrelerini barındıran vasküler kanallar bulunan mikro çevre elzemdir. HKH ve progenitör hücreler ile onlara destek sağlayan bir hücre ağı tarafından desteklenir(Tabe & Konopleva, 2014).

Stromal hücrelerin görevi:

1. Gelişen hücreler için hücre dışı bir zemin, matriks oluşturmak
2. Hematopoetik büyüme faktörlerini sentezlemek

Kemik iliği stroması, hematopoezde doğrudan rolü olmayan bir bağ dokusudur. Stromada bulunan mezenkimal hücreler, hematopoez için yapıcı bir mikroçevre oluşturmaktadır. Büyüme faktörleri, sitokinler ve ECM proteinleri mezenkimal hücreler tarafından üretilirler. Kök hücre sessizliğini ve kök hücrenin kendi kendine yenilenmesini sağlayarak hematopoez kabiliyetini oluşturan mezenkimal hücrelerdir. Beraberinde olgun hematopoetik hücrelerin çoğalması, olgunlaşması ve apoptosisine neden olan sinyalleri meydana getirmektedirler. Kemik iliği stromasını oluşturan mezenkimal hücreler, adventif retiküler hücreler, adipositler, fibroblastlar, osteoblastlar, osteoklastlar, mezenkimal kök hücreler (MKH), endotel öncü ve endotel hücreleridir. En önemli lenfoid hücreler doğal öldürücü (NK) hücreleri, T hücrelerini ve B hücreleriyken önemli miyeloid hücreler arasında granülositler, monositler, makrofajlar, mikrogial hücreler ve dendritik hücreler bulunur. HSC'ler, ardışık bir dizi ara progenitör aracılığıyla çoklu hematopoietik soylar üretir. Bunlar, yalnızca B, T ve NK hücreleri üretebilen ortak lenfoid progenitörleri (CLP'ler) ve yalnızca kırmızı hücreler, trombositler, granülositler ve monositler üretebilen ortak miyeloidprogenitörleri (CMP'ler) içerir.

Hematopoez olarak adlandırılan bu süreç karmaşık, birbiriyle ilişkili ve çok adımlı bir süreçtir. Hematopoez, olgunlaşmamış öncü hücrelerden fonksiyonel olgun kan hücrelerine kadar spesifik kemik iliği hücrelerinin gelişimini ve üretimini kontrol eder. Öncü hücrelerin çoğalması, bunların olgunlaşması olgun hücreler ve hematopoietik hücrelerin hayatta kalması, spesifik büyüme faktörlerinin varlığını gerektirir(Caligiuri ve ark., 1997).

2.2.1. Miyelopoez

Eritrosit, granulosit, trombositler gibi miyeloid seri hücrelerin gelişimi, myeloid progenitör aşamasında büyüme faktörlerince kontrol edilir. (Şekil 2.2.) Farklılaşma başlayınca kendilerini yenileme kapasiteleri azalırken hücre bölünme kapasiteleri artar ve bazı hematopoetik büyüme faktörleri için reseptörler sergilemeye başlarlar.

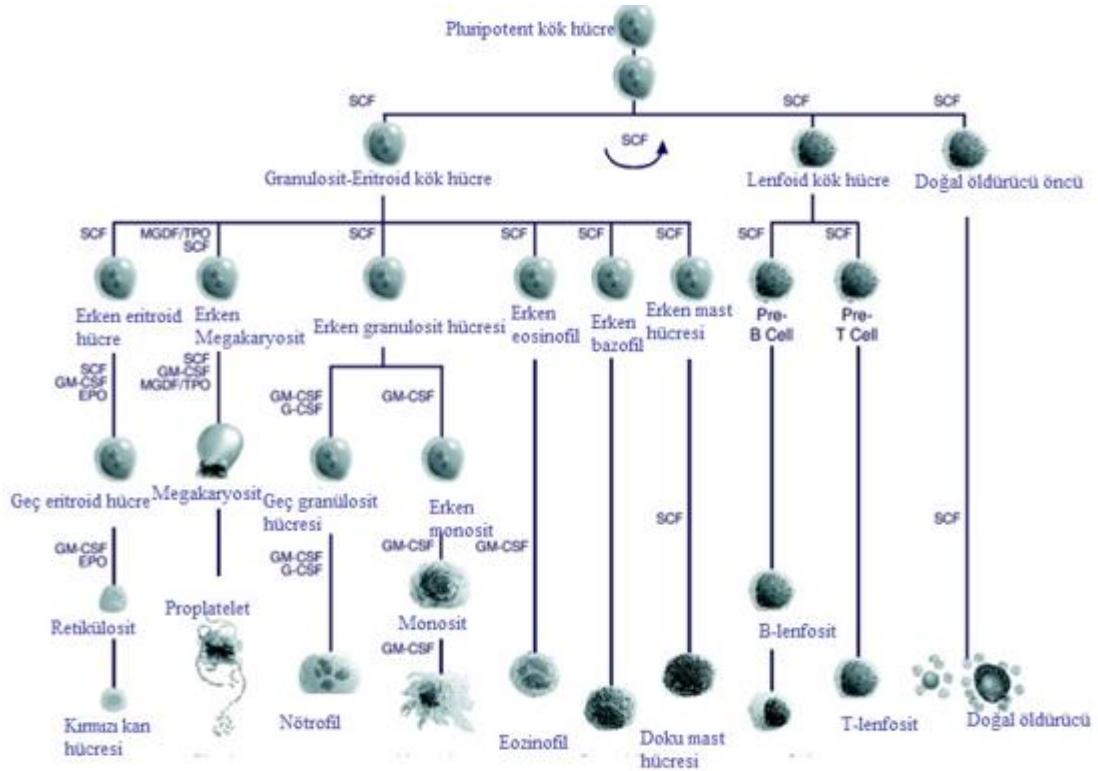
Stem Cell Factor(SCF, c-KIT ligandı) ve Interlökin(IL-3) gibi bazı büyüme faktörleri çeşitli öncü hücrelerde etkili olurken eritropoetin(EPO), trombopoietin(TPO), granulosit koloni stimüle edici faktör(G-CSF) ise sadece belli seri hücrelerinde etkili olur. EPO'in erken eritroid öncülerin gelişiminde önemli rolü vardır; oksijen düzeyine duyarlıdır. TPO, megakaryositer seri için önemlidir. G-CSF, makrofaj, endotelial hücre ve fibroblastlardan salınabilir. IL-1, TNF gibi enflamatuarsitokinler G-CSF artışına ve nötrofilsayısında artışa sebep olur. Her üç sitokin de JAK-STAT, Ras ve AKT yolları ile hücreleri uyarır ve yaklaşık 10 gün içinde öncüler farklılaşmaya yönelerek hücre sayılarında artış sağlar. 20'den fazla hematopoetik büyüme faktörü tanımlanmıştır. Bu büyüme faktörlerinin kimyasal özellikleri karakterize edilmiş ve faktörü kodlayan gen tanımlanıp klonlanmıştır. Birkaç hematopoetik büyüme faktörü, ticari olarak rekombinant insan formları olarak temin edilebilir ve klinik uygulamada kullanımları vardır. Bu faktörler arasında; iki miyeloid hematopoetik büyüme faktörünün rekombinant formları, granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) ve granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF); eritropoietin (EPO), kırmızı hücre faktörü; erken etkili bir hematopoetik büyüme faktörü olan kök hücre faktörü (SCF); ve trombosit faktörleri, trombopoietin (TPO) ve interlökin-11 (IL-1) bulunmaktadır(Demircan ve ark., 1994).

T lenfositler, monositler/makrofajlar, fibroblastlar ve endotel hücreleri, EPO ve TPO hariç, çoğu hematopoietik büyüme faktörünün önemli hücre kaynaklarıdır. EPO esas olarak yetişkin böbrek tarafından üretilir ve TPO akciğer ve böbrekte üretilir. Granülosit koloni uyarıcı faktör (rekombinant ürünler: filgrastim, lenograstim, pegfilgrastim) nötrofili korur(Yanada et al., 2005). Rekombinant insan G-CSF (rHuG-CSF) nötrofili artırır 5 günden 1 güne olgunlaşma süresi, hızlı salınmasına yol açar olgun nötrofiller kemik iliğini kana dönüştürür. rHuG-CSF ayrıca nötrofillerin dolaşımdaki yarı ömrünü artırır ve kemotaksi ve süperoksit üretimini artırır.

Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (rekombinant ürünler: molgramostim, sargramostim) lokal olarak aktiftir ve nötrofilleri lokalize etmek ve aktive etmek için enfeksiyon bölgesinde kalır. G-CSF gibi, GM-CSF de olgun nötrofillerin proliferasyonunu, farklılaşmasını ve aktivasyonunu uyarır ve süperoksit üretimini artırır. Fagositoz ve hücre içi öldürmede görevlidir. GM-CSF, G-CSF'den farklı olarak, olgun monositlerin/makrofajların proliferasyonunu, farklılaşmasını ve

aktivasyonunu uyarır. Eritropoietik faktörler ile eritroid progenitör hücrelerin çoğalmasına ve eritropoietik soyda çekirdekli öncü hücrelere (normoblastlara) farklılaşmasına neden olarak kırmızı kan hücresi sayılarını artırır.

Lökositler, doğuştan gelen ve adaptif bağışıklıkta yer alan birçok özel hücre tipini temsil eder. Eitrositler, oksijen ve karbondioksit taşırken, megakaryositler, kanın pıhtılaşması ve yara iyileşmesi için trombositler üretir. Proliferatif veya mitotik havuz, miyeloblastlar, promiyelositler ve miyeloid hücreler dahil olmak üzere kemik iliğinde bulunan ve nötrofil sayısını yenilemek için çoğalma yeteneklerini koruyan erken nötrofil öncülerinden oluşur(Grimwade et al., 2017).



Şekil 2.2. Miyelopoez ve sentezlenen hücreler

2.3. Nötrofil Nedir?

Nötrofiller, dolaşımdaki en bol beyaz kan hücreleridir ve bağışıklık sisteminin doğuştan gelen kolunda ilk savunma hattı olarak kabul edilmiştir. Fagositoz ve hücre içi bozunma, partikül salınımı ve patojenlerin saptanması üzerine nötrofil hücre dışı tuzaklarının oluşumu yoluyla istilacı mikroorganizmaları yakalar ve yok ederler,

inflatuar ve immün yanıtların önemli düzenleyicileri olarak yerleştirdiğini göstermektedir Nötrofiller ayrıca inflamasyon araçları olarak da yer alır. Nötrofiller ve bunların öncülleri kemik iliğinin en önemli bileşenlerinden biridir. Nötrofil morfolojik karakterleri olgunlaştıkça değişkenlik gösterebilir. Nötrofillerin en tanınan öncülleri myeloblasttır. Bu hücreler oldukça büyük hücrelerdir, olgunlaştıkça volüm olarak küçülür ve granüler karakterleri artar. Polimorfonükleer (PMN) lökositler olarak da bilinen nötrofiller, insan kanında en bol bulunan hücre tipidir. Kemik iliğinde çok sayıda üretilirler Homeostatik koşullar altında nötrofiller dolaşıma girerler, dokulara göç ederler, burada işlevlerini tamamlarlar ve en sonunda makrofajlar tarafından bir gün içinde elimine edilirler.

Nötrofiller, bağışıklık sisteminin doğuştan gelen kolundaki önemli efektör hücrelerdir(Mayadas ve ark., 2014). Mikrobiyal enfeksiyon belirtileri için organizmada sürekli devriye gezerler ve bu hücreler mevcut olduğunda istilacı patojenleri yakalamak ve öldürmek için hızla tepki verirler. Nötrofillerin üç ana antimikrobiyal işlevi vardır:

1. Fagositoz

2. Degranülasyon

3. Nükleer materyalin nötrofil hücre dışı tuzakları (NET'ler) şeklinde salınması

Yakın zamana kadar, bu işlevlerin nötrofillerin tek amacı olduğu düşünülüyordu. Bununla birlikte, nötrofil biyolojisinin çeşitli alanlarındaki araştırmacılar tarafından yapılan mevcut araştırmalar, nötrofillerin basitçe mikroorganizmaları öldürmenin ötesine geçen çeşitli fonksiyonel tepkilere sahip olduğunu göstermektedir. Nötrofiller çeşitli sinyallere yanıt verir ve çeşitli sitokinler ve diğer inflamatuvar faktörler üreterek inflamasyonu ve ayrıca bağışıklık sistemini etkiler ve düzenler(Nauseef & Borregaard, 2014). Şu anda nötrofillerin, sitokinler üreten transkripsiyonel olarak aktif kompleks hücreler olduğu kabul edilmektedir(Porwit & Béné, 2015). İlaveten komşu hücrelerin aktivitelerini modüle eder ve iltihabın çözülmesine katkıda bulunur (Greenlee-Wacker, 2016), uzun vadeli bağışıklık tepkileri için makrofajları düzenler, kanser dahil çeşitli hastalıklara aktif olarak katılır(Uribe-Querol & Rosales, 2015)

(Mishalian ve ark., 2014) ve hatta doğuştan gelen bağışıklık hafızasında görevi mevcuttur.

Nötrofil fonksiyonel tepkilerinin çokluğu, transkripsiyonel aktivasyon ve yüzey moleküllerinin veya aktivitenin ekspresyonundaki değişiklikler tarafından indüklenir. Bu fenotipik değişiklikler genellikle nötrofillerin yalnızca bir alt kümesinde saptanır, bu da büyük nötrofil heterojenliğinin var olduğunu düşündürür (Kim ve ark., 2012). Nötrofil kemik iliğini terk edip dolaşıma girdiğinden dolaşımdan elimine olduğu zamana kadar farklı yüzeysel fenotipler gösterebilirler. Bu değişim, tek bir gün içinde gerçekleştiği ve farklı özelliklere sahip çeşitli nötrofillerle sonuçlandığı için yaşlanma olarak bilinir (Adrover ve ark., 2016). Farklı doku mikro çevreleri nötrofillerin özel işlevler kazanmasını sağlayabilir. Bu nedenle, nötrofillerin birçok fonksiyonel fenotip gösterebilmesi mümkündür.

2.3.1. Nötrofil Yaşam Döngüsü

Nötrofiller tüm lökositlerin yaklaşık %70'ini temsil eder (Dancey ve ark., 1976). Oradan nötrofiller, dokulara ayrılana kadar dolaştıkları kana girerler. Nötrofiller dokulardaki yaşam sürelerinin sonuna geldiklerinde, fagositoz süreci boyunca çoğunlukla makrofajlar tarafından temizlenirler (Korns et al., 2011).

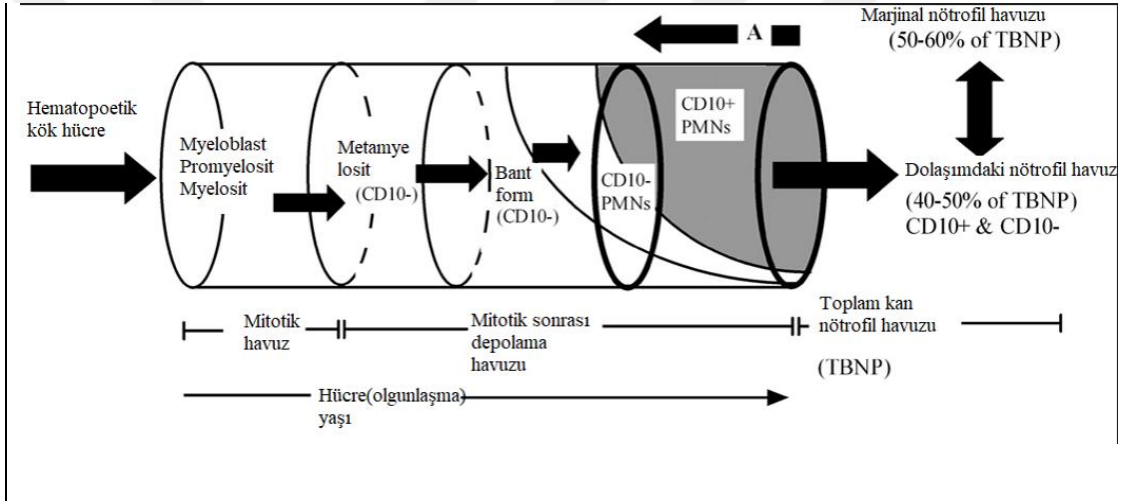
2.3.2. Granülopoez

Kİ'de HKH'lerden çok sayıda nötrofil üretilir (Görgens ve ark., 2013). HKK'ler multipotent progenitör (MPP) hücrelere farklılaşır daha sonra, granülosit-monosit progenitörlerine (GMP) farklılaşan lenfoid ile hazırlanmış multipotent progenitörlere (LMPP) dönüşür. Granülosit-koloni uyarıcı faktörün (G-CSF) kontrolü altında myeloblastlara dönüşürler ve nötrofil oluşumunu başlatırlar. Fizyolojik granülopoezin ana düzenleyicisi, progenitör hücrelerin myeloid soyuna bağlanmasını, granülositik bölmeden geçiş süresinin azalmasını ve olgun hücrelerin kemik iliğinden salınmasını içeren granülosit koloni uyarıcı faktördür (G-CSF) (Lord ve ark., 1989). Nötrofilde sırasıyla promyelosit, myelosit, metamyelosit, bant hücre ve olgun nötrofil aşamalarını içeren bir olgunlaşma süreci meydana gelir. Farklılaşma aşamasında nötrofil gelişimiyle beraber çekirdeği yuvarlak halden bantlı sonrasında lobüle bir morfolojiye ve çeşitli reseptörlerin ekspresyonuna değişir.

Kemik iliğindeki nötrofil popülasyonu üç havuza ayrılabilir:

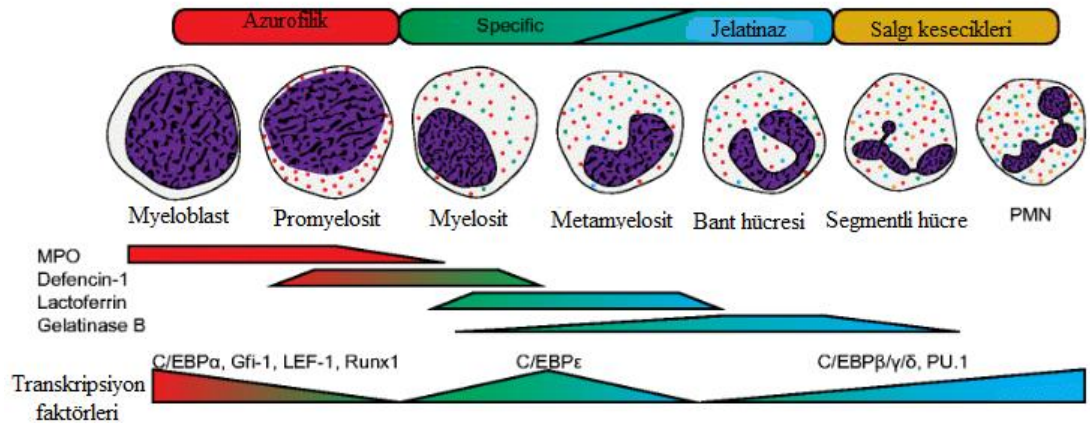
kök hücre havuzu, mitotik havuz ve mitotik sonrası havuz.(Şekil 2.3.)

Kök hücre havuzu, farklılaşmamış hematopoietik kök hücrelerden (HSC'ler) oluşur, mitotik havuz, proliferasyon ve farklılaşma geçiren kararlı granülositleri progenitör hücrelere gönderir. Son olarak, tamamen farklılaşmış olgun nötrofiller, kemik iliği rezervini oluşturan ve salınmaya hazır olan post-mitotik havuzu oluşturur. Tek bir sınırlı havuzun boyutu, organ boyunca ortalama intravasküler geçiş süresinin (yani, nötrofillerin kılcal yataktan geçmesi için geçen ortalama süre) ve kan akışının ürünüdür. Çalışmalar insanlarda post-mitotik havuzdan geçiş süresinin 4-6 gün olduğunu göstermiştir(Lemischka, 2001).



Şekil 2.3. Nötrofil Gelişimsel Süreci ve Olgunlaşma Aşamaları

Olgun nötrofiller görevleriyle ilgili kendilerine özgü proteinleri depolayan granüller ve salgı kesecikleri içerir(Häger ve ark., 2010). (Şekil 2.4.) Bu granüller belirli farklılaşma aşamalarında oluşur. Primer (azurofil) granüller myeloblasttan promyelosit evresine kadar bulunur. Sekonder (spesifik) granüller miyelosit ve metamiyelosit aşamalarında tespit edilir. Üçüncül (jelatinaz) granüller bant hücre aşamasında bulunur. Son olarak, salgı kesecikleri yalnızca olgun nötrofillerde saptanır. Bu salgı keseciklerinde istilacı patojenleri yok etmek için kullanılan antimikrobiyal enzimler depolanır.



Şekil 2.4. Granül Oluşumunun Zamanlaması. seçilen granül protein ekspresyonunun zamanlamasını ve transkripsiyon faktörü ekspresyonunun zamanlamasını gösteren nötropoez şeması (Yin & Heit, 2018)

Miyeloblastlar, nötropoezin ilk kararlı farklılaşma aşamasıdır ve granülopoezin başladığı nötrofil gelişimi aşamasıdır. Miyeloblastlar, promiyelositlere ve daha sonra miyelositlere farklılaşır, bu noktada hücre bölünmesi durur ve terminal farklılaşma metamiyelosit, bant hücre ve farklılaşmanın segmentli hücre aşamaları boyunca devam eder. Segmentli hücre evresini takiben, olgun nötrofiller (PMN) kemik iliğinden dolaşıma salınır.

Granulosit-monosit kolonileri oluşturabilen birimden(CFU-GM), GM-CSF etkisi ile nötrofil ve makrofajlara farklılaşma sağlanırken; G-CSF nötrofillerin; M-CSF, monositlerin farklılaşmalarını sağlar. Eozinofil gelişimi için GM-CSF, IL-5, IL-3 gerekli iken bazofile farklılaşma için IL-3 ve kit ligandın gerekli olduğu bilinmektedir. Granulopoez olarak adlandırılan sürecin belirlenebilen ilk hücresi, ince yaygın olarak dağılmış kromatin parçacıkları içeren soluk bir çekirdeğe sahip miyeloblastlardır. Hidrolitik ve sindirimsel enzimler içeren azurofilik granüllerin artması ve sitoplazmanın bazofilik rengi bu hücrelerin promiyelosit evresine geçtiklerinin işaretleridir. Promiyelositlerin neutrofilik, eozinofilik, bazofilik miyelositler olarak mı yola devam edecekleri çevresel etkiler ile kontrol altındadır. Miyelositlerin en önemli özelliği alt tiplerine göre azurofilik granüllerin yanı sıra içerdikleri özgün granüllerin varlığıdır(Yin & Heit, 2018).

metamiyelositlerin çapı küçülür. Olgunlaşmaya devam eden her alt grubun çekirdeği de kendine özgü bir şekil almaya başlar. Nötrofillerde 2-3 loblu segmentli;

eozinofillerde genellikle böbreğe benzer tek loblu; bazofillerde 2 loblu çekirdekler oluşacaktır.

2.4. Akut Lösemi

Akut lösemiler, hemotopoetik kök hücrelerin normal gelişimsel sürecinin bozulması sonucu oluşan kemik iliğinin malign bir hastalığıdır Akut lösemili hastalar uygun şekilde tedavi edilmezlerse, lösemik hücrelerin çoğaldığı yerlerde neden oldukları infiltrasyon, yetersizlik ve bunların sonucunda eklenen komplikasyonlar nedeniyle kaybedilir. Hastalardan elde edilen veriler ve tedavi uygulamalarından kazanılan deneyimlerden anlaşılabilceği gibi akut lösemiler, birbirlerinden oldukça farklı özellikleri olan heterojen alt gruplardan oluşurlar. Bu nedenle, gerekli olan tedavinin uygulanabilmesi için hastanın hastalığının özelliklerinin mümkün olduğunca ayırt edilmesi gerekir.

2.4.1. Akut Löseminin Tarihçesi

Hipokrat'ın löseminin belirti ve semptomlarından bahsettiği raporlarından sonra, löseminin klinik belirtileri ilk kez 1827'de Velpau tarafından tanımlandı. 1839 ve 1845 yılları arasında tanısız gelişmeler yaşanmaya başladı. Malpighi'nin 17. yüzyılda mikroskopinin önemini kabul etmesi, hematoloji tarihinde önemli bir dönüm noktası oluşturdu. Carigie ve Bennett ilk olarak 1845'te yaşayan hastalarda lösemi tanımladı. 1847'de Virchow, hastalığı adlandırmak için "lösemi" terimini kullandı. İlk akut lösemi tanımını ilk kez 1889'da Ebstein kullanmıştır. Ehrlich boyama tekniklerini tanımladıktan ve granüllerine göre lökositleri farklılaştırdıktan sonra, Naegeli ilk olarak 1879'da miyeloblastları ve miyeloid hücreleri tanımladı. 1913 yılında Schilling-Torgau, Türk hematolog Hasan Reşad Sığındı ile monositik lösemi ilk kez tanımladı(Scapini ve ark., 2016).

2.4.2. Akut Lösemide Sınıflandırma

Akut löseminin orijinal FAB sınıflandırması 1976'da Fransa, Amerika Birleşik Devletleri ve Birleşik Krallık'ta bir grup hematolog tarafından oluşturuldu. Bu sınıflandırmada akut lösemiler morfolojik ve sitokimyasal boyama ve akım sitometri ekspresyon özelliklerine göre gruplandırılır. Elimizde bulunan yöntemlerin ayırıştırma gücüne göre düzenlenmekte olan sınıflamaların yeni yöntemlerin

bulunmasıyla zaman içinde güncellenmesi yada değişmesi gerekebilir. Bu değişikliklerin kimi zaman yöntemin tanısal değeri ile kimi zaman da sınıflamanın prognostik değeriyle bağlantısı olmaktadır. Bu bağlamda uzun zaman güncel kalmış olan ve esas olarak rutin ve sitokimyasal morfoloji temellerinde bina edilmiş olan FAB sınıflaması yerini 2001 yılından itibaren morfoloji yanında immünolojik ve genetik verileri daha çok kullanan World Health Organisation (WHO) sınıflamasına bırakmıştır(Bennett ve ark., 1976).

FAB sınıflandırmasında blastik hücre sayısı %20 olarak kabul edilmiş ve nadiren görülen lösemi tipleri de dahil edilmiştir.

2.4.2.1. Sınıflandırmada Sayısal Değerlendirme

Tüm lösemi tiplerinde blastik hücre proliferasyonu, kemik iliğinde yeni oluşan sağlıklı hücre sayısında azalmaya yol açar. Bu nedenle kırmızı kan hücrelerinin azalmasına "anemi", trombositlerin azalmasına "trombositopeni", beyaz kan hücrelerinin azalmasına "nötropeni" denir. Akut lösemi, kronik lösemiden daha belirgin bulgulara sahip olabilir. Tam kan sayımında anormal beyaz küre sayısı değişebilir, anemi ve trombositopeni tespit edilebilir.

2.4.2.2. Sınıflandırmada Morfolojik Değerlendirme

Anemi ve trombositopeni ile ilişkili periferik kandaki blast hücreleri, akut lösemiye kuvvetle düşündürür. Beyaz kan hücrelerini oluşturan hücrelerden türetilen granülositler ve monositler, zamanla kemik iliğinde blast adı verilen genç hücrelerden oluşur. Bu olgun hücreler, mikroplarla savaşmak için bağışıklık sisteminde rol oynar. Akut miyeloid lösemide normal olgunlaşma süreci bozulur, blast adı verilen genç hücreler olgunlaşamaz ve kemik iliğinde ve kanda birikir.

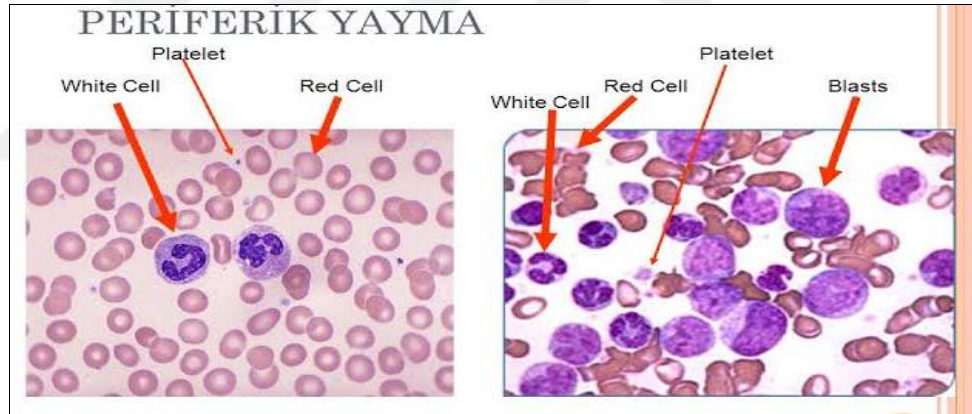
Blast Nedir?

Anemi ve trombositopeni ile ilişkili periferik kandaki blast hücreleri, akut lösemiye kuvvetle düşündürür. Beyaz kan hücrelerini oluşturan hücrelerden türetilen granülositler ve monositler, zamanla kemik iliğinde blast adı verilen immatür hücreleri oluşturur.

Blastik Hücrelerinin Bazı Özellikleri

- Blastik hücreler olgun hücrelere göre daha büyüktür.

- Bazı durumlarda; promiyelositler miyeloblastlardan daha büyüktür, megakaryositler megakaryoblastlardan çok daha büyüktür.
- İmmatür hücrelerde hücrenin büyük bir bölümü çekirdekten oluşur ve sitoplâzma çok dardır. Bu nedenle blastik hücrelerde çekirdek sitoplâzma oranı çekirdek lehinedir.
- Blastik hücrelerde çekirdek kromatini ince ağsı bir görünümde ve kromatin kabalaşmamıştır.
- Nükleoller tek olabilir.
- Sitoplâzma rengi farklı bir koyuluktur ve bazofilik olarak boyanabilir.
- Bölünerek olgunlaşan blastik hücrelerde sitoplâzmanın kapladığı alan artar ve çekirdek küçülür, nükleol yapıları kaybolur, bazı hücre dizilerinde çekirdek topaklaşır ve kromatin yapısı kaba bir hal alır. Blast hücrelerin bu durumuna örnek olarak AML blastları gösterebiliriz(Leong ve ark., 1979). (Şekil 2.5.)



Şekil 2.5. Normal ve Blastik Hücre Görüntüsü(Arginine.umdj.edu Sources from beyond2000.com).

Nötrofiller ve monositler gibi olgun hücreler oluşamadığı için vücut mikroplara karşı savunmasız kalır. Kemik iliğinde kırmızı kan hücresi ve trombosit üretimi, miyeloblastların anormal proliferasyonu nedeniyle bozulur. Bunun sonucunda kansızlık ve trombosit sayısında azalma meydana gelir(Lakshman & Finn, 2001).

2.4.2.3. Sınıflandırmada İmmünoloji ile Değerlendirme

Bir hücrede spesifik bir yapının (=antijen) varlığı, boyaların/enzimlerin immünohistokimyası veya ürettiği proteine karşı yönlendirilen, floresan materyale eklenen antikor ile immünofloresan mikroskopi/akış sitometrisi yöntemleriyle

gösterilebilir. Bu yöntemlerin diğer yöntemlere göre avantajları, akış sitometrisinin bazı dezavantajları ve sakıncaları olmakla birlikte akut lösemi alanında önemli bir yeri vardır.

2.5. Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)

Beyaz kürelerin bir kısmı lenfositler tarafından oluşturulur lenfositlerin kemik iliğindeki öncü hücreleri lenfoblastlardır. Kemik iliğinde B lenfoid öncüllerinin lösemik transformasyonu sonucu hem çocuklarda hem de yetişkinlerde oluşur. Akut lenfoblastik lösemi, lenfoblastların olgunlaşma sürecinin bozulur anormal hücrelerin kontrolsüz olarak aşırı çoğalmaları ile gerçekleşir. Lösemik hücre olarak tanımlanan bu anormal hücreler aslı görevlerini yapamaz ve işlevsizdirler. Hızla çoğalmaları nedeniyle normal hücrelerin yerini alır ve fonksiyon kaybına yol açarlar. Akut lenfoblastik lösemi çocukluk döneminin en sık görülen kanser türüdür. Erkek çocuklarda daha sık olduğu bildirilmiştir. ALL çocukluk çağı lösemilerinin % 80'i iken, tüm erişkin lösemilerinde bu oran %20 'yi oluşturur.

ALL patogenezinin genetik bozukluklar, kimyasal ajanlara maruziyet ve bazı kromozom anomalileri sorumludur. Hastalık genellikle halsizlik, solukluk, kanama ve ateş gibi belirtilerle ortaya çıkar. Fizik muayenede lenfadenopati, hepatosplenomegali, solukluk ve cilt döküntüleri görülür. Tanıda fizik muayene, periferik kan bulguları ve kemik iliği incelemesi gereklidir. Blast hücrelerinin morfolojik incelemesi ve sitokimyasal boyaması ile genellikle ALL akut miyeloid lösemiden ayırt edilir. Bu yöntemler hücrenin immünolojik alt tipini belirlemez, bu kapsamlı tanıda gerekli bir husustur. Çoğu lösemik hücre, normal hematopoetik progenitörlerle aynı özellikleri paylaşır. Gelişimsel olarak ilgili gen ekspresyon kalıplarını tanıyarak, lösemik hücreler normal olgunlaşma dizilerine göre sınıflandırılır(Greaves, 2006).

2.6. Akut Myeloblastik Lösemi

2.6.1. Tanım

Akut miyeloid lösemi (AML) hematopoetik sistemin, kemik iliği kan oluşumunun bozulması ve immatür lökositlerin aşırı çoğalması ile seyreden malign bir hastalıktır. Normal şartlarda, tüm kan hücreleri bir denge içerisinde kendilerini yeniler ve kemik iliğinde olgunlaşma süreci geçirirler. AML blastları bu süreçte

beyaz kan hücreleri olarak hızlı ve kontrolsüz çoğalmaya başlayarak kemik iliğini, periferik kanı ve diğer dokuları kaplar(Burness, M.L, Sipkins, D.A. 2010).

AML blastları WHO'ya göre

- a. Sitogenetik anomalilerle seyreden AML,
- b. Displazisi ile seyreden AML,
- c.Sekonder AML ve MDS,
- d. Tanım dışı AML olmak üzere dört gruba ayrılarak değerlendirilmiştir.

2.6.2. AML Sıklığı, İnsidansı, Risk Faktörleri

AML, en fazla görülen lösemi tipidir, 40 yaşından itibaren AML oranı yaşla artış gösterir. AML insidansı oranı, gelişmiş ve endüstriyel ülkelerde daha yoğundur. AML insidansı, cinsiyet ve ırka göre değişim gösterir. AML birçok ülkede erkeklerde daha yaygındır. Özellikle ABD'de erkek insidansı diğer ülkelere göre yüksektir. Kötü yöndeki sitogenetik insidans yaş ilerledikçe daha olumsuz sonuçlara yol açar ve her bir sitogenetik risk grubunda tedaviye yanıt yaşla birlikte azalır.

AML ile bağlantılı genetik hastalıklar yüksek risk faktörlerinin başındadır. Genetik bozukluklar ve konjenital defektler nedeniyle akut lösemi ortaya çıkma olasılığı diğer nedenlere göre 10 ila 20 kat fazladır. AML'li hastalarda çok büyük oranda kromozomal anomaliler saptanabilir.

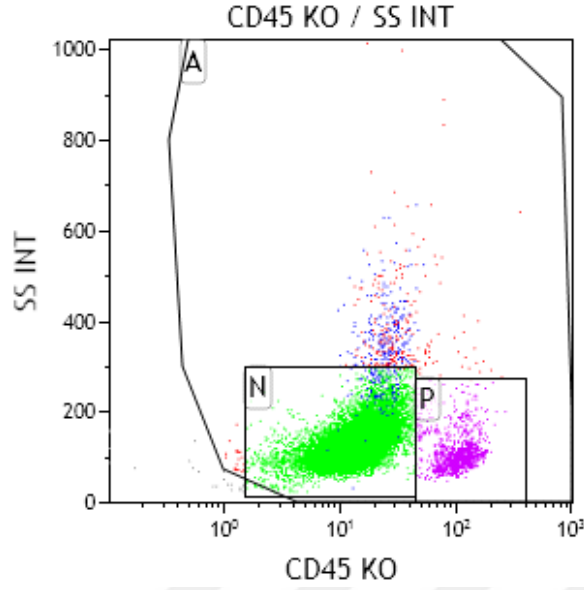
AML, hematopoietik multipotansiyel kök hücre ya da yönlendirilmiş hücrelerin bir seri somatik mutasyonuna bağlı olarak ortaya çıkar. Kromozomal translokasyonlar sonucu somatik mutasyonlar meydana gelir. Translokasyonlara bağlı olarak protoonkogenler aktif hale gelir. RAR, homeobox ailesi (HOX9, MLL (11q23 loküsünde) vb. mutant genlere örnek verilebilir. Bu birincil mutasyonlar AML gelişmesi için yetmez. Hücre proliferasyonunda artışa neden olan ikincil mutasyonlar gerekir. Özellikle ikincil lösemi gelişmiş veya ileri yaş AML'li hastaların %50-80'inde sonradan gelişmiş klonal kromozom bozukluklar mevcuttur. AML gelişiminde çevresel faktörlerde önemli oranda yer tutmaktadır. İyonize radyasyona direkt maruziyetinde tedavi amaçlı uygulanan radyasyonun AML riskini arttırdığı tespit edilmiştir. Çocukluk veya 20-30 yaş döneminde tümör nedeniyle tedavi olup

iyileşenlerde, tedaviyle ilişkili olarak myeloid lösemi gelişme insidansında artış gözlenmektedir. Yine tümör tedavisi yada hematolojik malignite sonucunda yapılan sitotoksik tedavide myeloid lösemiye sebebiyet verebilmektedir. Kronik olarak bazı kimyasallara maruz kalmakta AML'ye yakalanma riskini artırmaktadır. Benzen bunlardan en bilinenidir. Bununla birlikte sigara kullanımıda 60-75 yaş arası AML gelişme oranında artışa sebebiyet vermektedir(McLeod ve ark., 1993).

2.6.3. AML Subtipleri

2.6.3.1. AML M0 (Minimal Farklılaşma Gösteren Akut Myeloid Lösemi)

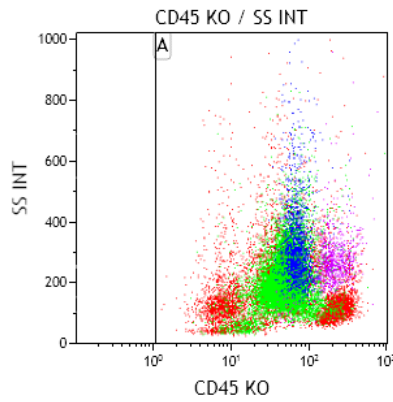
AML-M0 blastları, olgunlaşmamış ve agranüler olarak tanımlanır ve sıklıkla belirli bir hücre soyunun morfolojik özelliklerinden yoksundur. AML olgularının %3 kadarını oluşturur. Sitokimyasal ve fenotipik kriterlere göre kategorize edilir. Farklılaşmamış blastlarda MPO negatiftir. Her ne kadar blastlar miyeloperoksidaz (MPO) veya Sudan Black Boya (SBB) reaksiyonları için negatif olsa da, miyeloid soy miyeloid ile ilişkili işaretleyicilerin varlığı ile tanımlanır. M0 vakalarının birçoğunda, erken hematopoez antijenleri CD34, CD38, HLA-DR ve miyeloid antijenleri CD13, CD117, CD33 eksprese ederler. CD64, CD11b, CD14, CD15 gibi daha olgun miyeloid farklılaşma antijenlerini eksprese etmez ve T hücre belirteci CD7'yi eksprese edebilirler(Lee ve ark., 1987) Değişik hematopoetik dizelerin farklılaşmalarının CD45-SS grafiklerindeki izdüşümleri ile bu kökenlerden AML M0 blast popülasyonu yerleşim bölgesi Şekil 2.6. de gösterilmektedir.



Şekil 2.6. AML M0 da blastların CD45 kapısında yerleşimi

2.6.3.2. AML M1 (Olgunlaşma Göstermeyen Akut Myeloblastik Lösemi)

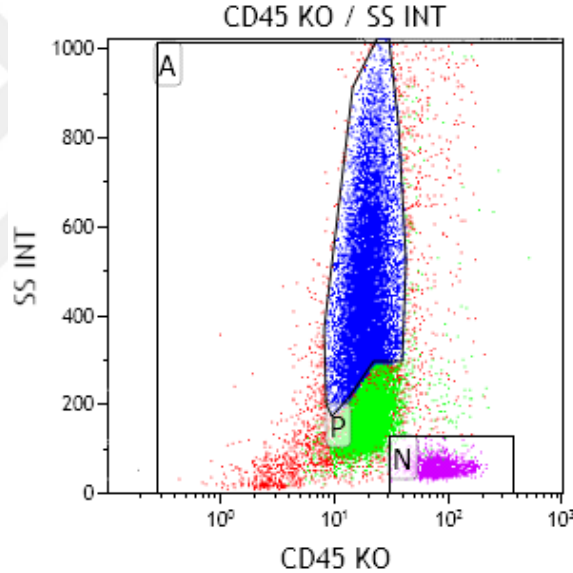
Granül yapıları ve büyüklükleri AML M0 ile benzerlik gösterir. AML vakalarında görülme sıklığı %10-18 civarındadır. Miyeloblastlar az miktarda granülositik farklılaşma gösterirken kısmen miyeloperoksidaz aktivitesi gösterirler. Blastlar biraz granüllü olabilirler. HLA-DR, CD13 ve CD33 pozitif olmasına karşın CD34 ve CD117 pozitifliği MO'dan daha azdır CD15'in ise kısmi pozitifliği olabilmektedir (Knapp ve ark.,1994). Değişik hematopoetik dizelerin farklılaşmalarının CD45-SS grafiklerindeki izdüşümleri ile bu kökenlerden AML M1 blast popülasyonu yerleşim bölgesi Şekil 2.7. de gösterilmektedir.



Şekil 2.7. AML M1'de blastların CD45 kapısında yerleşimi

2.6.3.3. AML M2 (Granülositik Olgunlaşma Gösteren Akut Myeloblastik Lösemi)

AML M2’de maturasyona bağlı olarak blast granülü belirgindir. AML M1’den farklı blast yüzdesindedir. Blastlar CD45/SS myeloblast bölgesinde bulunurlar. M2 blastlar, M1 blastlardan daha düşük CD34 pozitifliği, daha fazla CD15 pozitifliği ile karakterizedir. Blastlarda MPO>%3 olmalıdır. HLA DR, CD13, CD33 pozitifdir. Lenfoid işaretleyicilerden CD19 pozitifliğide gözlenmektedir (Kheiri ve ark., 1998). Değişik hematopoetik dizelerin farklılaşmalarının CD45-SS grafiklerindeki izdüşümleri ile bu kökenlerden AML M2 blast popülasyonu yerleşim bölgesi Şekil 2.8. da gösterilmektedir.

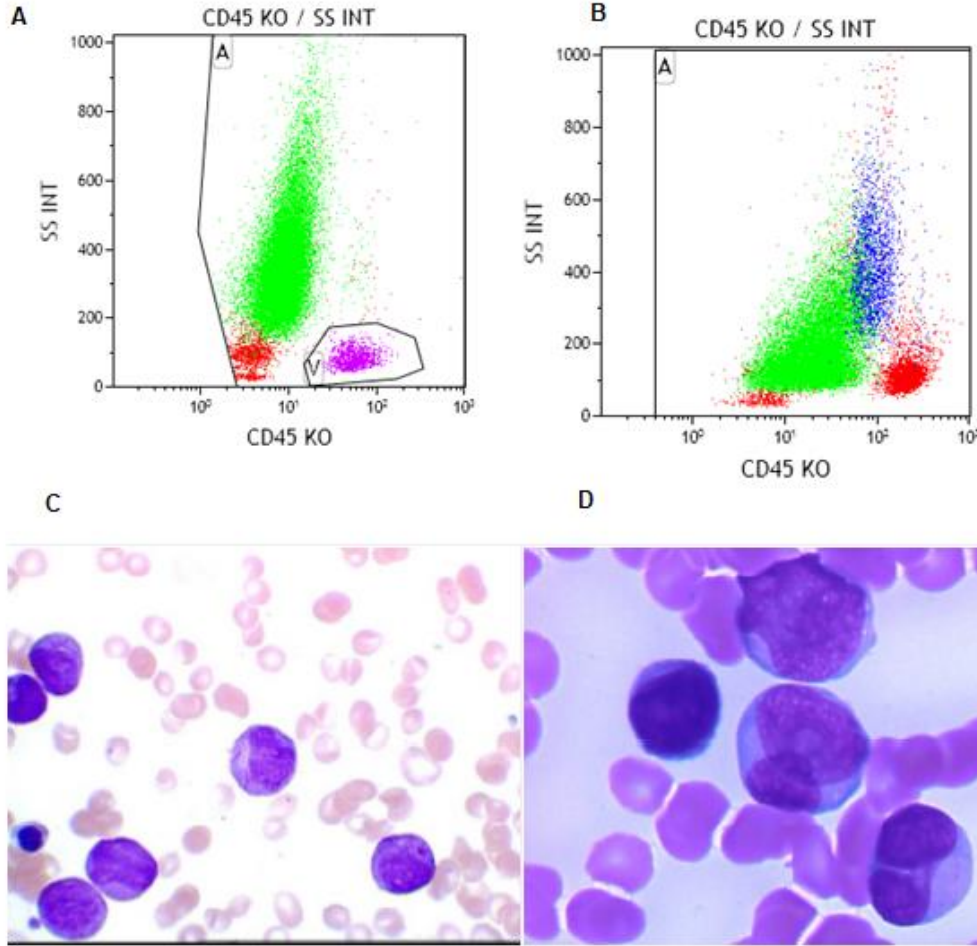


Şekil 2.8. AML M2’de blastların CD45 kapısında yerleşimi

2.6.3.4. AML M3 (Akut Promyelositer Lösemi, APL)

Morfolojik açıdan değerlendirildiğinde Hipergranüler ve hipogranüler olmak üzere olarak iki farklı blast türü mevcuttur. Akut promyelositik lösemi (APL), yetişkinlerde AML'nin %5-8'ini temsil eder. Ortalama yaş yaklaşık 40'tır ve bu, AML'nin diğer alt tiplerinden (70 yaş) oldukça gençtir. HLA-DR negatiftir, CD13, CD33 ve CD15 pozitifdir. CD45/SS grafiğindeki lokalizasyon bu iki M3 tipi blastları birbirinden ayıran en önemli farktır. (Şekil 2.9.A ve Şekil 2.9.B) Bazı mikrogranüler tipteki M3

blastlarda CD2 antijen pozitifliği mevcut olabilir. CD2 pozitifliğinin beraberinde HLA-DR negatifliğinin olduğu M3 vakalarında t(15;17) sitogenetik anomalisi düşünülmelidir(Fitzgibbon & Ph, 1995).



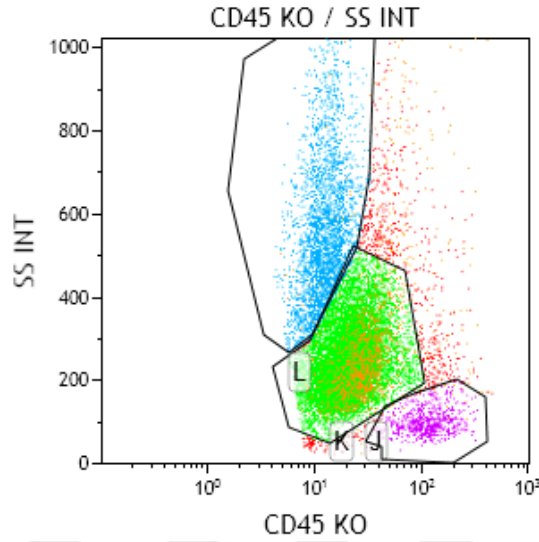
Şekil 2.9. AML M3 Akım Sitometri CD45 Kapılaması ve Mikroskop Görüntüsü

(A. Hipergranüler AML M3 blast yerleşimi B. Hipogranüler AML M3 blast yerleşimi C. Hipergranüler AML M3 mikroskop görünümü D. Hipogranül AML M3 mikroskop görünümü)

2.6.3.5. AML M4 (Myelomonositik lösemi)

Myeloblastlar ve Monositik hücrelerle birlikte bulunur. Non eritroid seri elemanları sayıldığında, %20-80 oranında monositik yapılandırma ile birlikte %20'yi aşan miyeloblast vardır. SB boyası ve peroksidaz ile boyanabilirler. Miyelositik hücreler AML M2'ye benzerler. Periferik kanda monositoz olabilir. Akım sitometrik

incelemesinde miyeloid antijen olan CD15 ile monositik antijen olan CD14 ve CD68 pozitifdir. Bunlara ilaveten CD11, CD13, CD33 ve önemli oranda HLA-DR dede pozitiflik gözlenmektedir. Değişik hematopoetik dizelerin farklılaşmalarının CD45-SS grafiklerindeki izdüşümleri ile bu kökenlerden AML M4 blast popülasyonu yerleşim bölgesi Şekil 2.10. da gösterilmektedir.



Şekil 2.10. AML M4'de blastların CD45 kapısında yerleşimi

AML M4Eo

Monoblastlar, orta ila yoğun bazofilik olan bol sitoplazmalı büyük hücrelerdir. Dağınık azurofilik granüller ve vakuoller vardır. Monoblastlar dantelli nükleer kromatine ve bir veya daha fazla baskın nükleollere sahiptirler. AML-M4'ün bir varyantı eozinofillerde artışa sahiptir ve AML-M4Eo olarak sınıflandırılır. CD2 pozitifliği M4 ün bir alt grubu olan M4 Eo için çok önemli bir bulgudur. M4Eo varyantı inv (16) kromozomal anomalisi ile birlikte olup iyi prognostik özellik taşır. Bu grup %16-25 oranında görülür(Renato Bassan,ve ark.,2004).

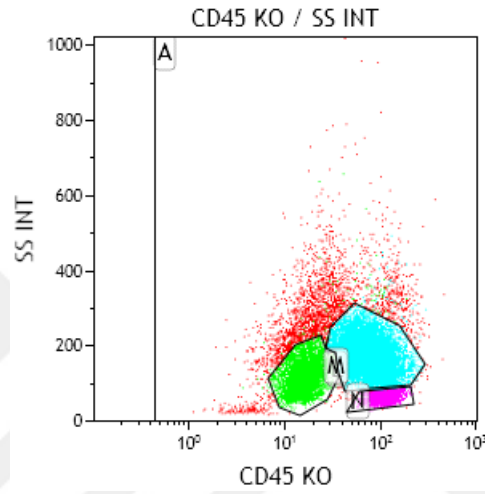
2.6.3.6. AML M5 (Akut Monoblastik/Monositik lösemi)

M5a: (Farklılaşmamış) Pür monoblastik Lösemi

M5b: (Farklılaşmış)

Akut monositik (monoblastik) lösemi (AML-M5), lösemik hücrelerin %80 veya daha fazlasının monositik soydan (monoblastlar, promonositler ve monositler) olduğu miyeloid lösemi olarak tanımlanır. Lösemik hücreler sıklıkla biçimsiz olup

sitoplazmalarında çok az ince granüller içerir ve psödopod ve sitoplazmik vakuollerle düzensiz sınırlar gösterebilen bol sitoplazmaya sahiptirler. Çekirdek çoğunlukla kıvrımlı olup 1-4 adet büyük nükleolus içerirler. Sitokimyasal boyanma olarak NSE ve PAS boyanırlar. AML M4 ile karışabilirler. Akım sitometride CD14 ve CD68 ekspresyonu vardır. 11q23 MLL gen yeniden düzenlenmesi ve t(9;11) ile birlikte olabilir. Görülme sıklığı %12-23 arasında değişir ve kötü prognoza sahiptir. Şekil 2.11’de M olarak belirtilen iki popülasyon monoblasttır.

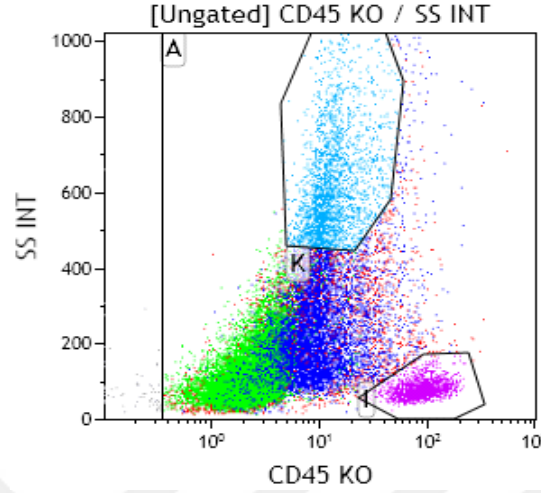


Şekil 2.11. AML M5’de blastların CD45 kapısında yerleşimi

2.6.3.7. AML M6(Akut Eritro Lösemi)

Eritro lösemi ya da "akut Di Guglielmo sendromu olarak da isimlendirilir. Miyelo proliferasyonun eritrosit öncüllerinden olduğu az görülen akut miyeloid lösemi (AML) şeklidir. Kİ ve periferik kanda bol miktarda atipik, megaloblastik görünümde eritroblastlar hakim durumdayken, sonrasında miyeloblastlar ortaya çıkar ve artarak hakim duruma gelir. M6 veya eritrolösemi teşhis edilmesi güç bir lösemi tipidir. Çekirdekli kemik iliği hücrelerinin %30-50'sinden fazlası anormal çekirdekli kırmızı kan hücreleridir. Nadiren görülen ve iyi karakterize edilememiş lösemi tipidir. Sıklıkla infantil dönemde görülüp %1-3 oranında izlenirler. CD45/SS grafiğinde eritroid hücrelerle karışmış ya da az üzerinde konumlanırlar.(Şekil 2.12.) CD235a (glikoforin A) pozitifliği vardır. Fakat normal eritroid hücrelerde de CD235a pozitifliği çok parlak olduğundan, metod üzerinde dikkatli olunmalıdır

neticede CD34 pozitif hücreler üzerinde CD235a pozitif olup olmadığı kontrol edilmelidir.



Şekil 2.12. AML M6'da blastların CD45 kapısında yerleşimi

2.6.3.8. AML M7 (Megakaryo-blastik Lösemi)

Non eritroid seriden kaynaklanan hücrelerin %20'den fazlası megakaryoblastları oluşturur. Megakaryoblastlar miyeloperoksidaz enzimi yönünden fakir ve PAS pozitif özelliktedir. Morfolojik olarak ALL-L2 ile benzeşebilir. Akım sitometride yüzey belirteçleri ile izlenir. Periferik kanda blastik hücre sayısı az ve organ infiltrasyonu nadirdir. Miyelofibrozis tablosu bu hastalarda izlenebilir. Bu nedenle Kİ alımında güçlük yaşanır. Down sendromlularda artmış olup, bir yaştan altında sık görülür. Sıklığı %4-8 oranında değişmektedir. Megakaryoblastlar tipik olarak CD61 ve CD41'in parlak ifadesini gösterir. Aşırı yorumlamayı önlemek için dikkatli olunmalıdır(Parker, 1988).

2.7. Akut Lösemilerde Tanı

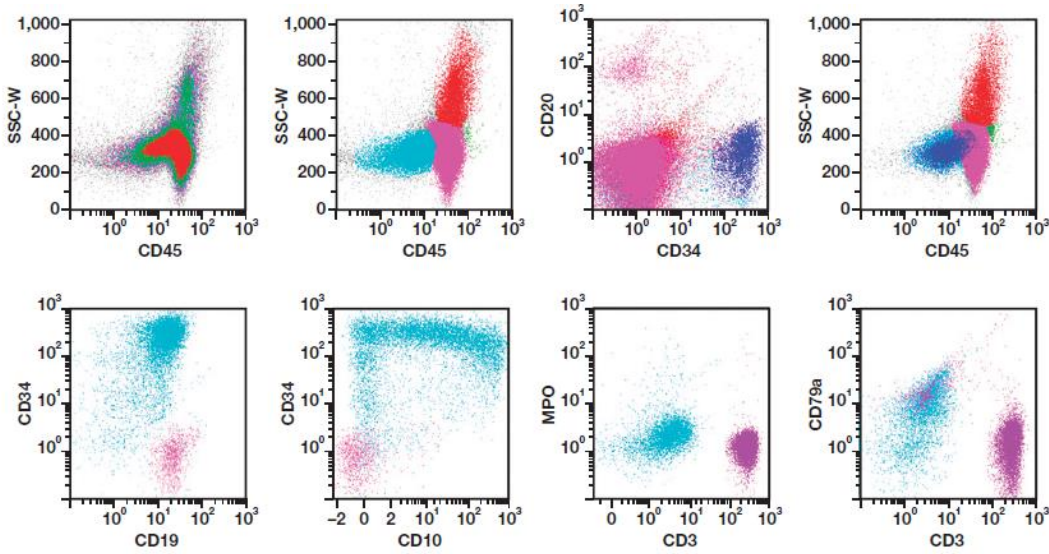
Kan hücrelerinin üretim süreci bir düzen içerisinde kemik iliğinde ve timüs ta belirli mikro çevrelerde gerçekleşir ve bu hücreler, işlevsel bir biçimde doku ve organlara gönderilir. Süreç esnasında bir hücreden kaynaklanan malign hücrelerin çoğalması sonucu üretilen hücreler morfolojik ve fonksiyonel olarak normal dışı bazı özellikler gösterirler. Bu gibi ipuçları değerlendirilerek, klinik şüpheler doğrulanmaya ve hastalardaki malignitenin tipi/alt tipi tanımlanmaya çalışılır(Kamu Hastaneler

Kurumu Demirci Devlet Hastanesi ve ark., 2015). Akut lösemi kendisini ağırlıklı olarak kemik iliği yetersizliğinin belirli bariz bulgularıyla gösterir. Bunun için kan sayımının değerlendirilmesi ve kemik iliğinin morfolojik olarak incelenmesi en öncelikli aşamalardır. Buradan elde edilen bilgilere dayanarak histokimyasal boyama, konvansiyonel sitogenetik ile FISH vb.genetik, PZR (polimeraz zincir reaksiyonu) vb. moleküler yöntemler kullanılarak tanı konulmaya çalışılır. Rutin boyama ve sitokimyasal incelemeler akut lösemi tanısında kimi olgularda yardımcı olabileceği gibi kimisinde de şüphe giderilememekte ve malignitenin alt tipinin tanısı konmasında yardımcı olamamaktadır. İşte bu noktalarda, immünolojik tekniklerin kullanıldığı yöntemler ön plana çıkmaktadır.

Yeni tanı alan akut lösemilerin köken ilişkisinin belirlenmesinde multiparametrelili akım sitometri kullanılır. Birçok belirteç için genellikle kullanılan ölçüt, lösemik hücrelerin sunduğu belirtecin % 20 veya daha fazla olmasıdır. Seçilmiş belirteçler CD3, MPO, TdT, CD34, CD117 için alt sınır %10 olarak kabul görmektedir. Minimal farklılaşma gösteren AML, kökeni belirlenemeyen akut lösemi veya akut megakaryoblastik lösemi tanısını koymada immünofenotipleme şarttır. Vakaların çoğunda erken hematopoez ile ilişkili antijenler CD34, CD38 ve HLA-DR saptanırken erken myeloid ve monositik matürasyon belirteçlerin olmayabilir. MPO sitokimya tarafından negatif saptandığında, blastların en azından bir bölümünde akım sitometri pozitif olabilir(Reyes M, 2002).

AML tanısı için, immünofenotipik çalışmalar yapılırken özellikle CD3, CD7, CD13, CD14, CD33, CD34, CD64, CD117, sitoplazmik MPO ve HLA-DR belirteçlerine bakılır. Lenfoid hücrelere çok özel cCD3 ve cCD79a gibi yüzey belirteçlerinin olup olmadığı gösterilmelidir. İmmünofenotipik çalışmalarda blast oranını belirlemek amacı ile CD45, CD34 veya CD117 kullanılır(Li Z, Li L. 2006). Tekrarlayan genetik anormallikleri olan bazı AML'ler, karakteristik immünofenotipik özelliklere sahiptir. Örneğin t(8,21) ile birlikte olan AML'ler, lenfoid marker olan CD19'u sıklıkla eksprese ederken CD7 ve CD 56'ı belirteçlerini daha az eksprese ederler. İnv(16) ile birlikte olan AML'ler T-köken ilişkili CD2 eksprese ederler. NPM1 mutasyonu ile birlikte olan AML'ler CD33 sıklıkla sunarken, CD34 ya hiç sunmazlar ya da daha az sıklıkta sunarlar(Gurman, G,ve ark.1995).

CD45 düşük blastları diğer lökositlerden ayırt etmek zor ve karmaşıktır (Şekil 2.13.'de sol üst sıradaki grafikler). Granülositler blastlarla karışır ve ayrıca lenfositler ve blastlar arasında bir süreklilik vardır. CD34, miyeloid blast popülasyonunun ayırt edilmesini sağlar (Şekil 2.13'de üst sıra, sağ grafikler, CD34: koyu mavi noktalar, arka kapı) CD34⁺ hücreleri CD19⁺'dir ve alışılmadık bir heterojen CD10 modeli (alt sıra, soldaki grafikler) ifade eder. Miyeloperoksidaz ekspresyonu zayıftır ancak kesin olarak pozitifdir ve sitoplazmik CD79, normal B hücreleriyle benzer bir düzeyde pozitifdir (Şekil 2.13'de alt sıra, sağ grafikler). SSC, yan dağılım. Nötrofiller; kırmızı; monositler yeşil; lenfositler pembe; blastlar açık mavi(Porwit & Béné, 2015).



Şekil 2.13. AML subtiplendirilmesinde akım sitometrik kapılama ile blast tayini(Porwit & Béné, 2015).

2.8. Miyeloperoksidaz (MPO) Enzimi

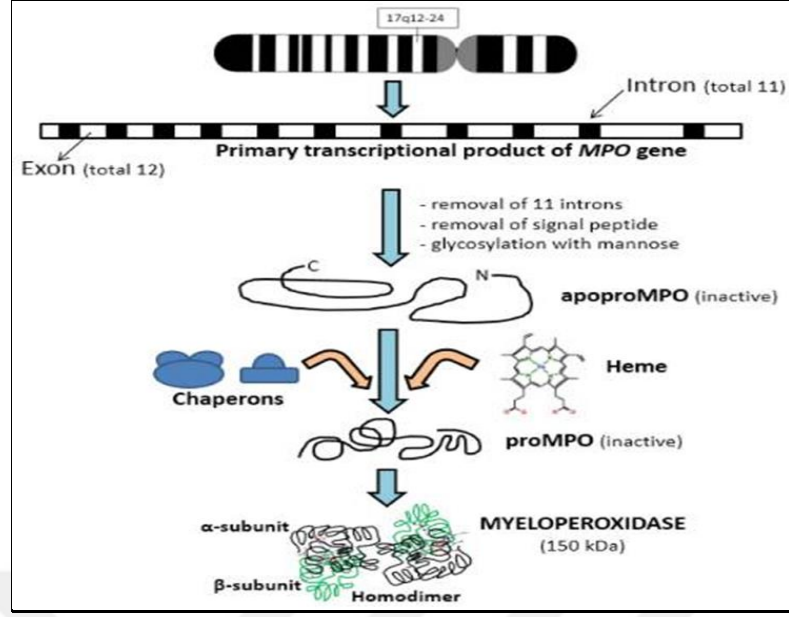
MPO, insan nötrofillerinin ve monositlerinin birincil azurofilik granüllerinde bulunan, demir içeren, inflamatuvar yanıtlarında yer alan miyeloid hücrelerin en yaygın fonksiyonel bir enzimidir. MPO enzimi 17. kromozomun uzun kolunda yerleşik MPO geninde kodlanır. Miyeloperoksidaz (MPO), iki adet 60 kD ağır ünite ve iki adet 12 kD hafif ünitelerden oluşan heterotetramerik bir proteindir. Hem benzeri demir içeren bir protez grubu, her ağır alt birime kovalent olarak 4 veya 5 yüksek mannoz oligosakarit yan zincirileri vardır.

Bir lizozomal enzim olan MPO, nötrofil solunum patlaması sırasında hidrojen peroksit ve klorür anyonundan güçlü bir mikrobisidal ajan olan hipokloröz asit

üretimini katalize edebilir. MPO'nun, hücrenin kuru ağırlığının %5'ini oluşturur ve granülomonositik farklılaşmaya bağlı hücrelerde seçici olarak eksprese edilir. Miyeloperoksidaz enzimi akut miyeloid ve lenfoblastik lösemiler arasındaki ayırt edici unsurdur (Klebanoff, 2005) (Bennett ve ark., 1976). FAB M0 tipi akut miyeloblastik lösemilerde ışık mikroskopisi ile negatif mieloperoksidaz reaksiyonu ve miyeloid antijenleri eksprese eden erken bir miyeloblast görülür. Geleneksel ışık mikroskobu yöntemleriyle blast hücrelerinde MPO aktivitesini göstermek zordur.

MPO, diğer reaktif enzimlerde dahil olmak üzere nötrofilin granül içeriği, fagolizozom veya hücre dışı boşluğa salınarak mikroplar ve tümör hücreleri için sitotoksik bir ortam yaratır. Monositler nötrofillerin yalnızca üçte biri kadar MPO aktivitesine sahiptir. Nötrofillerin oksijene bağımlı konak savunma sistemindeki merkezi rolüne ek olarak, MPO'nun ayrıca kemoatraktan formil metionil lösil fenilalanin ve aynı zamanda kemoatraktan inaktive eden oto oksidanlar üreterek inflamatuvar yanıtın çeşitli yönlerini değiştirip düzenlediği düşünülmektedir.

Monoklonal antikorlarla akım sitometrik analizi ile MPO öncü proteininin tespiti, akut lösemilerin %5'inden daha azını oluşturan akut sınıflandırılmayan löseminin soyunun belirlenmesi ve kesin teşhisi için esastır. Sitokimyasal tahlil ile MPO negatif blastlar, AML-M0 vakalarının %20-40'ında MPO monoklonal antikorları için pozitif olabilir, bu da anti-MPO antikorlarının MPO'nun enzimatik olarak aktif olmayan öncü formlarını tanıyabileceğini düşündürür. MPO, enfeksiyona karşı savunmadaki biyolojik önemine ek olarak, yüksek doku özgüllüğü nedeniyle özel ilgi görmektedir; normal ve lösemik granüositlerde değişken fakat genellikle büyük miktarlarda bulunur ancak lenfositte yoktur.(Şekil 2.14.)



Şekil 2.14. Myeloperoksidaz protein sentezinde yer alan ardışık adımlar(Khan ve ark.,2018).

Miyeloperoksidaz, akut miyeloid soyunun ayırt edici bir enzimidir. Sitokimyaya dayalı Amerikan-İngiliz grup kılavuzları, kemik iliği yaymalarında MPO pozitif blastların % 3 varlığını lösemi MPO pozitif olarak adlandırmak için yeterli bulmuştur(Fuda & Chen, 2014). EGIL grubu tarafından ise %10 eşik kabul edilmiştir(Bennett ve ark., 1976).

2.9. Myeloid Sistemin Değerlendirilmesinde İzlenecek Yöntemler

Myeloid sistemin değerlendirilmesi üç temel mekanizma ile yapılır:

1. Sayısal Değerlendirme
2. Morfolojik Değerlendirme
3. Akım Sitometri ve immunolojik değerlendirme

2.9.1. Sayısal Değerlendirme

Myeloid seri ögeleri olan nötrofiller ve monositlerin CBC (Cell blood counter) otoanalizör cihazları ile ölçülerek değerlendirilmesi yapılır. Önce mutlak nötrofil sayısı değerlendirilerek nötrofil fazlalığı ya da azlığı kontrol edilip nötropeni ve nötrofili ekarte edilir. Nötropeni, nötrofil sayısının düşmesidir. Nötropeni hafif, orta ve ağır nötropeni olarak 3 ayrı şekilde tanımlanmaktadır.

Ağır nötropeni: Mutlak nötrofil sayısı $<500/\text{mm}^3$

Orta nötropeni: Mutlak nötrofil sayısı $500-1000/\text{mm}^3$

Hafif nötropeni: Mutlak nötrofil sayısı $1000-1500/\text{mm}^3$ olarak tanımlanır

Nötropeni, ailesel ya da edinsel nötropeni olabilir. Nötrofilin yüksekliği ile seyreden durumlarda konjenital olarak; Ciddi konjenital nötropeni (Kostmann Sendromu), kronik benign nötropeni, Schwachman Sendromu, Barth sendromu gibi hastalıklarda olur. Edinsel nötropeni Felty Sendromu, Aplastik anemi, T- γ lenfositoz, Saçlı hücreli lösemi, Miyelodisplastik sendrom, Akut lösemiler vb. hastalıklarda ortaya çıkar (Manuaba, 2007). Nötrofili ise nötrofil sayısındaki artış olmasıdır. Lökosit sayısı $<11000 \text{ h}/\mu\text{L}$ iken nötrofil sayısı $>7700 \text{ h}/\mu\text{L}$ dir. Nötrofiliye sebep olan durumlar, enfeksiyonlar, İnflamatuvar bozukluklar, akut stres, ağır fiziksel egzersiz, inme, doku hasarı, nekroz, cerrahi, yanık, travma, miyokard enfarktüsü, hipertermi, Hodgkinlenfoma ve diğer maligniteler, Metabolik bozukluklar: Diyabetik ketoasidoz vb. olabilir.

2.9.2. Morfolojik Değerlendirme

Periferik yaymanın boyanması mikroskop ile incelenerek yapısal bozukluk var mı araştırılması ve ihtiyaç duyulması durumunda da fonksiyonel bozukluklar varsa fonksiyonel analiz yöntemlerine yönlendirilmesi, özellikle karakterizasyonunun belirlenmesi için myeloid hücrelerin blastik karakter olup olmadığının araştırılması yönünden akım sitometrik tayin yapılması AML gibi lösemilerin tanımlanmasını sağlar. Bu gibi blastik bozukluklar ve diğer patolojiler ekarte edilir.

2.9.3. Akım Sitometri ve immunolojik değerlendirme

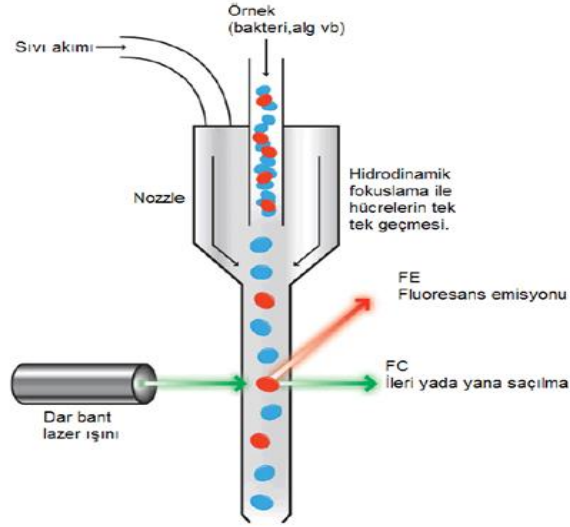
Akım sitometri, hücre süspansiyonu halindeki sıvıların bir akış kanalı boyunca tek hücre seviyesinde lazer önünden geçerken yansıyan foton enerjisinin ölçümüne bağlı olarak hücrelerin büyüklük, granularite ve floresans özelliklerine göre hücre popülasyonlarını, organelleri veya benzer ölçüde partikülleri kantitatif olarak araştırma imkanı sunan bir cihazdır. Akım sitometri, süspansiyon halindeki hücrelerde yüzey antijenlerinin belirlenmesi, B ve T hücre alt gruplarının tayini, lösemi ve lenfoma tiplmesi, DNA analizi, nötrofil fonksiyonları, hücrelerin

fonksiyon özelliklerinin belirlenmesi, hücre içi sitokin tayini ve kromozom analizi gibi çok geniş bir alanda kullanılmaktadır.

Akım sitometride temel kısımlar; akışkan sistemi, hidrodinamik odaklama ile örneğin tek tek lazer demetinin önünden sabit bir akış hızıyla düzenli geçmesinden sorumludur. Laserler, farklı dalga boyunda ışık verirler. Optik sistem, ileri ve yana saçılma için blazer ışını ayarlar, farklı detektörlere farklı ışınların ulaşmasına izin verirler(Baumgarth&Bigos, 2004). Dedektörler, optik sistem tarafından ayrılmış olan farklı ışınların elektronik olarak algılanması ve değerlendirilmesini yapar. Elektronik ve bilgisayar sistemi, detektörlere gelen elektronik bilginin değerlendirilmesi ve bilgisayar tarafından analiz edilerek kullanıcıya sunulması yapılır. Analiz sonunda elde edilen verilerin ileri yöntemlerle değerlendirilmesi mümkündür(Wilkins ve ark., 2001).

Vücut sıvıları doğal olarak süspansiyon halinde olduğundan kullanıma hazırdırlar ancak taze ve fıkse edilmiş solid dokularla çalışmak için bunların çeşitli yöntemlerle süspansiyon haline getirilmesi gerekir. Süspansiyon halinde hazırlanan hücreler analiz için floresan işaretli Monoklonal antikolar ile doğrudan ya da dolaylı olarak işaretlenir. Sistem floresan yoğunluğu ölçümü prensibine dayalı olduğundan işaretli hücrelerden floresanı açığa çıkaracak güç kaynağı olarak lazer kullanılır. Bu kaynak argon, kripton, helium-kadmium, helium-neon veya daha yüksek yoğunluktaki ışık kaynakları kullanılır.

Akan hücre ölçer süspansiyon halindeki hücrelerin büyüklük , floresan yoğunluğuna bağlı olarak granularitesine göre tek hücre seviyesinde kantitatif ölçüm yapan bir sistemdir.Süspansiyon halindeki hücreler hava basıncı ile sıvı içinden geçirilir.Sıvının çok hızlı akışı yüksek bir hidrostatik basınç oluşturur ve bu basınçla hücreler cam veya quartzdan yapılmış (flowcell) akış kabineye gelirler.Bu kabinin geometrik şekli ve sıvının laminar akışı hücrelerin tek bir sıra halinde lazer kaynağı önünden geçişini sağlar. Tek hücre olarak lazer kaynağının önünden geçen floresan işaretli hücrelerin analizi için sistemde; forward scatter(FS), sidescatter(SS) ve floresan (FL-1,FL-2,FL-3,FL-4 vb.) dedektörleri bulunmaktadır.



Şekil 2.15. Akım Sitometri Cihazının Çalışma Prensibi(Olson ve ark. 2005).

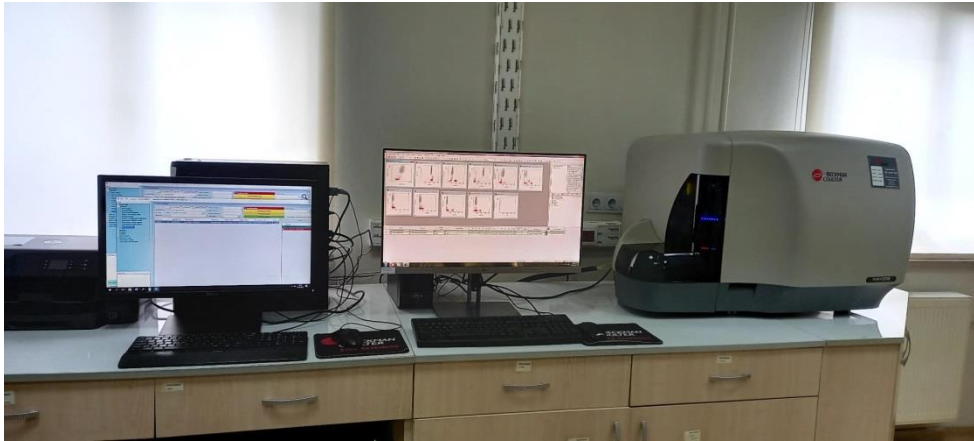
2.9.3.1 Akım Sitometrinin Avantajları

- Akım sitometri tekniği hızlıdır, saniyede binlerce partikül sayımı yapabilir.
- Yüksek duyarlılıkla analiz yapma imkanı sağlar. Her bir dalga boyunu yada her bir partikül boyunun ayrı ayrı sayılabilir.
- Tek tip mikro küreciklerin ışık saçılımı ve floresan ölçümleri için varyasyon sabiti ($CV = \frac{\text{standart sapma}}{\text{ortalama}}$); %1 küçüktür. Yani doğruluk üst düzeydedir.
- Akım sitometrinin en özgün avantajı, herhangi bir optik karakteristiğe veya bunların kombinasyonlarına bağlı olarak hücreleri fiziksel olarak birbirlerinden ayırabilir. Böylece daha ileri analizler yapabilmek için, spesifik hücrelerin saf örneklerini elde etmek mümkün olur(Olson ve ark. 2005).
- Akış hızına bağlı olarak yüksek hızlı analizler (100.000 olay / seg) yapılabilir.
- Çoklu parametrelerle eşzamanlı analizler yapılabilir ve küçük popülasyonlar tanımlanabilir.
- Taşınabilir ekipmanlar oldukları için kullanım kolaylığı vardır(Stauber ve ark., 2002).

2.9.3.2 Akım Sitometrinin Dezavantajları

- Hücrelerin çevreleriyle olan ilişkilerini gözlemek mümkün olmayabilir.
- T hücreden zengin lenfomalarda az bir monoklonal B hücre klonunun tanımlanması mümkün olmayabilir.

- T hücreli lenfomaların aberan bir antijen (örneğin bir pan T hücre belirleyicinin kaybı/azalması) bulundurmadıkları sürece tanınması mümkün olmaz.
- Aberan bir T hücre immunfenotipi, her zaman bir malignite göstergesi olmayıp; enfeksiyözmononükleoz, reaktif dermatoz, enflamatuvar hastalıklarda da görülebilir.
- Akış sitometrisi tekniği hücrelerin sıvı akışından geçirilmesini gerektirdiğinden dolayı analizi sadece hücre süspansiyon çözeltileriyle sınırlıdır.
- Hodgkin hastalığında neoplastik hücre sayısının az olması nedeniyle de tanıda ASM kullanımının bir faydası olmaz.
- Dezavantajları nedeni ile ASM sonuçlarının daima ışık mikroskobu verileri ile birlikte değerlendirilmesi gerekir. Klinik veriler, moleküler/sitogenetik çalışmalar da verilerin değerlendirilmesinde yardımcı olan unsurlardır. ASM, morfolojik olarak şüphelenilen çeşitli hastalıkları doğrulamakta, hastalık alt tiplerinin belirlenmesinde, ayırıcı tanıda seçenekleri azaltmada kullanılabilir. Bazı durumlarda morfoloji bilinmese de tanısal değerlendirmelerin yapılabileceği savunulmaktadır.



Şekil 2.16. Akım Sitometri Cihaz görüntüsü,

İmmünoloji laboratuvarı, Erciyes Üniversitesi Tıp fakültesi, (Cihaz; Beckman Coulter, Navios, 2022)

2.9.4. Lösemilerde Akım Sitometri ile İmmünojenotipleme

Akut lösemide hücre yüzey antijenleri ve sitogenetiğin öneminin anlaşılması ve FAB sınıflandırmasının yetersiz olduğunun gözlemlenmesiyle akut lösemilerin immünolojik sınıflandırmaları (MIC ve EGIL) gündeme gelmiştir. "EGIL sınıflandırmasında" (Avrupa Lösemi İmmünolojik Sınıflandırma Grubu), AML'ler iki veya daha fazla miyeloid belirteç (MPO, CD13, CD33, CDw65, Cd117) ekspresyonu ile tanımlanır, akut lenfoblastik lösemiler de B-I pro-B hücreli, B-II common-B hücreli ve B-III pre-B hücreli olarak 3 alt gruba ayrılmıştır.

Blastların morfolojik incelemesi, ilgili soya yalnızca kısmi bir yaklaşım sağladığından, soy ataması immünojenotiplemenin ilk hedefidir. Akut miyeloid lösemi (AML) ve akut lenfoblastik lösemi (ALL) en sık görülenler olmasına rağmen, tüm hematopoetik soyların tayininde mümkün olabilmektedir.

İmmünojenotipleme, taze hücreler gerektirir ve sonuçlar kemik iliği örneklemeinden sonraki saatler içinde alınabilir. Taze kemik iliği antikoagulan ile dikkatlice karıştırılmalı ve oda sıcaklığında hızlı bir şekilde akım sitometri laboratuvarına nakledilmelidir. Burada, lökosit farklılaşma antijenlerine karşı birkaç monoklonal antikor, tek veya çok renkli boyama yöntemleriyle tüm kemik iliği numunelerine uygulanır. İncelenen farklılaşma antijeninin ekspresyonu dört farklı amaçla yapılır;

1-Soy tayini için

2-Bifenotipik akut lösemiye saptamak

3-Mevcut immünojenotipik sınıflandırmaları uygulamak

4-Hastanın takibi için faydalı anormal belirteçler veya paternler tasarlamak için.

Nötrofilik olgunlaşma basamaklarında hücreler blast, promiyelosit, miyelositler, metamiyelositler, bantlar ve olgun nötrofil aşamalarını geçirir. Olgunlaşma basamaklarında farklı yüzey belirteçlerinin ekspresyonu gerçekleşir. Promiyelositik aşamada CD34 ve HLADR ekspresyonunun kaybı; miyelosit aşamasında CD117 ekspresyon kaybı, miyelosit aşamasında CD11b ve CD11c ekspresyonunun edinilmesi ve olgun nötrofillerde CD10 ekspresyonu olur(Wood, 2004). Hücreler geç miyelositlere ve metamiyelositlere olgunlaştıkça CD11b yoğunluğu artar (aynı

zamanda CD4 ekspresyonu kaybolur). CD64, metamiyelositler yoluyla promiyelositler tarafından eksprese edilir. CD13 ve CD33, olgunlaşmanın tüm aşamalarında eksprese edilir; CD13 blastlar ve nötrofiller tarafından parlak şekilde; metamiyelositler tarafından zayıf bir şekilde eksprese edilir. Hücreler daha olgunlaştıkça CD33 ekspresyonunun yoğunluğunda azalma olur. Metamiyelositler, hücreler olgun nötrofillere doğru geliştikçe CD10 ve CD16'yı eksprese etmeye başlar. Olgun myeloid hücreler CD11b, CD10, CD16 ve CD15 belirteçlerini parlak şekilde eksprese ederler.

Akım Sitometride Kullanılan Monoklonal Antikorların Özellikleri

CD45: Lökosit ortak antijeni olarak bilinir ve 180-240 Kd'lık bir glikoproteindir. Olgun eritrositler ve trombositler hariç tüm hematopoietik hücrelerde eksprese edilen CD45 trans-membran glikoprotein yapısında olan bir tirozin fosfatazdır ve hücrenin aktivasyon düzeyine göre 5 izoformu bulunur. Bütün hematopoietik hücrelerde anti-CD45 antikorlu ile değişik düzeylerde ekspresyon izlenir. CD45 hücrelerin hematopoietik kökeni ayırmada kullanılan en yararlı belirteçlerden biri olarak kabul edilir (Avcılar et al., 2014).

CD13: 150-170 kD tip II bir transmembran glikoproteinidir. Bu çinko metalopeptidaz, granülositler, miyeloid progenitörler, endotelial hücreler, epitelyal hücreler ve granüler lenfoid hücrelerin alt kümesi üzerinde bir homodimer olarak ifade edilir. Trombositlerde veya eritrositlerde ifade edilmez.

CD33: 67 kD tip I bir transmembran glikoproteinidir. Mieloid progenitörler, monositler, granülositler, dendritik hücreler ve mast hücreleri üzerinde eksprese edilen bir sialoadhesion immünoglobulin süper ailesi üyesidir. Normal trombositler, lenfositler, eritrositler ve hematopoietik kök hücrelerde CD33 yoktur. CD33, karbonhidrat/lektin bağlama aktivitesine sahip sialik aside bağımlı hücre yapışma molekülü olarak işlev görür.

CD34: Yaklaşık moleküler ağırlığı 105-120 kD olan bir tip I monomerik sialomusin benzeri glikofosfoproteindir. Hematopoietik kök/progenitör hücrelerin, kemik iliği stromal hücrelerinin, kılcal endotel hücrelerinin, embriyonik fibroblastların ve bazı sinir dokularının çoğunda seçici olarak eksprese edildiğinden, CD34 insan hematopoietik kök/progenitör hücrelerini tanımlamak için yaygın olarak kullanılan

bir belirteçtir. Enzimatik bölünmeye karşı farklı duyarlılığa göre, dört grup CD34 epitopu tarif edilmiştir. CD34, L-selektin ve E-selektin ligandlarına bağlanma yoluyla hücre yapışmasına ve lenfositlerin hedeflenmesine aracılık eder. Akut miyeloid lösemilerin yaklaşık %40'ı ve B öncesi akut lenfoblastik lösemilerin %65'i CD34 eksprese ederken, akut T-lenfoid lösemilerin yalnızca %1-5'i CD34 pozitifdir.

CD117: c-kit ve kök hücre faktör reseptörü (SCFR) olarak da bilinen 145 kD'lik bir immünoglobulin üst aile üyesidir. C-kit ligandını (çelik faktörü, kök hücre faktörü ve mast hücre büyüme faktörü olarak da bilinir) bağlayan bir transmembran tirozin-kinaz reseptörüdür. CD117, hematopoietik kök hücreler (multipotent hematopoietik kök hücreler, miyeloid ve/veya eritroid soylarına bağlı progenitörler ve T ve B hücre öncüleri dahil), mast hücreleri ve akut miyeloid lösemi (AML) hücrelerinde eksprese edilir. CD117'nin ligandı ile etkileşimi, hematopoietik kök hücrelerin gelişimi için kritik öneme sahiptir.

HLADR: 36 kD α (ağır) zincir ve 27 kD β (hafif) zincirden oluşan bir heterodimerik hücre yüzeyi glikoproteinidir. B hücreleri, aktive edilmiş T hücreleri, monositler/makrofajlar, dendritik hücreler ve diğer profesyonel olmayan APC'lerde eksprese edilir. CD3/TCR kompleksi ve CD4 molekülleri ile birlikte HLA-DR, CD4 T hücrelerine etkili peptit sunumu için kritiktir(Hla-dr, 2020).

MPO (Myeloperoksidaz): İki 60 kD ağır zincir ve iki 12 kD hafif zincirden oluşan heterotetramerik bir proteindir. Bir lizozomal enzim olan MPO, nötrofil solunum patlaması sırasında hidrojen peroksit ve klorür anyonundan güçlü bir mikrobisidal ajan olan hipokloröz asit üretimini katalize eder. MPO, nötrofillerin inflamatuvar yanıtlarında yer alan önemli bir enzimdir. MPO, olgun nötrofil ve monositlerin azurofilik granüllerinde lokalizedir ve ayrıca bazı akut miyeloid lösemi altiplerinde blastik hücrelerinde eksprese edilir.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Alet ve Cihazlar

Akım Sitometri Cihazı (Beckman coulter NAVIOS, 3 LAZER / 10 RENK, USA), Nüve NF 800R Model Santrifüj Cihazı, Vorteks Cihazı (Scilogex MX-S), +2-8 °C Buzdolabı (Profilo, 07.073603.13315.007), ISOLAB 10-100 µl otomatik pipet, DLAB 100-1000 µl otomatik pipet, ISOLAB pipet uçları (10-100 µl, 100-1000 µl), 12x75 mm test tüpü (Falcon TM polistiren test tüpleri), Hücre Süzgeci 40 µl Nylon, ISOLAB mekanik süre ölçer

3.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

Hücre yıkama işlemlerinde kullanılan İsoflow (BC, 8546859), Akım sitometre cihazı yıkama solüsyonu Clenz (BC, 8448222), Optilyse C Lysing Solution (BC, A11895), Intraprep Permeabilization Reagent

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Monoklonal Antikorlar

Anti-human CD45-PC7 (IM3548), Anti-human CD45-KrO (B36294), Anti human CD13-APC (A87783), Anti-human CD33-PC5 (IM2647), Anti-human CD34-PC7 (A21691), Anti-human CD117-APCA750 (B92450), Anti-human HLADR-PB (B36291), Anti-human MPO-PE (B36288) (Beckman coulter, USA).

3.2. Deneysel yöntem

3.2.1. Hasta Örneklerinin Eldesi

Çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, İmmünoloji laboratuvarı bünyesinde bulunan Akım Sitometri Laboratuvar'ında yürütülmüştür.

3.3. Akım Sitometrik Analiz Uygulamaları

3.3.1. Akım Sitometrinin Hazırlanma Aşaması

Akım Sitometri Cihazı (Beckman coulter Navios EX) cihazının önce kompresörü daha sonra bilgisayarı açılır. Sonra Cytometer on tıklanarak cihazı aktive edilir. Cihaza yıkama tüpleri verilir ve açılış yıkaması yapılır daha sonra lazer ayarlarını kontrol etmek amacıyla flow check boncukları cihazdan geçirilir bunun neticesinde cihazımız hücre geçirme işlemine hazır hale gelir. Cihazda önceden hazırlanmış olan ve her kullanımda optimize edilen hücre okuma protokolü / paneli kullanılarak hücresel verilerin analizi yapılır. Hücresel verilerin elde edilmesinden sonra hücresel verilerin kaluza programı kullanılarak analiz edilmesi ile ölçüm işlemi sonuçlandırılır.

3.3.2. Akım Sitometri Örnek Hazırlama İşlem Basamakları

Her bir hastadan alınan 100 µL kan örneği ayrı akım sitometri test tüplerine eklendi. Her bir örnek için 2 test tüpü kullanıldı.

1.Tüpe CD14-PE, CD16-ECD, CD33-PC5.5, CD34-PC7, CD13-APC, CD117-APCA750, HLADR-PB, CD45-CO markerları 5 ‘er µL eklendi.

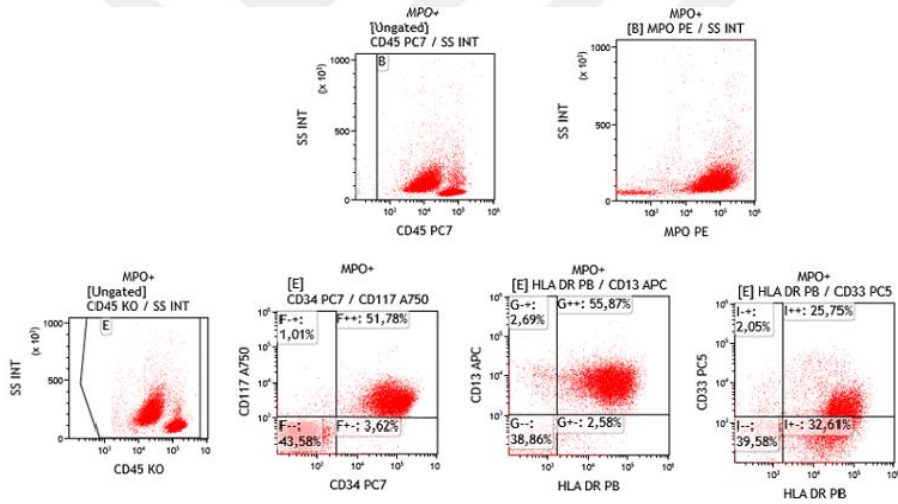
2.Tüpe MPO-PE, CD45-PC7 markerleri 5 ‘er µL eklendi

Her bir örnek sayısı kadar akım sitometri tüpü hazırlandı. 1. tüpte yüzeyel boyama 2. tüpte ise hücre içi boyama yapıldı yani belirteçler permabilizasyon (hücrenin brüt morfolojisini etkilemeden zarda delikler açma) işleminden sonra eklendi. 1.tüpe belirteçler eklendikten sonra 100 µL kan örneği eklendi, 2.tüpe ise 100 µL kan örneği eklendikten sonra hücre zarını sabitleyen solüsyon 1 eklendi ve vortex yapıldı. Daha sonra 20 dk. inkübasyon işlemi uygulandı. Her bir örnekten alınan 100 µL kan örneği üzerine 1.tüpte lysing solüsyonundan 0,5 mL, 2.tüpte ise antikor eklenmesinden sonra permabilizasyon solüsyonundan 100 µL eklendi ve her iki tüpte de elde edilen karışım karanlıkta 10 dakika inkübe edildi. Süre sonunda 1. tüpteki örneğe 2 mL hücre yıkama solüsyonu eklenerek, 2.tüp ise ekleme yapmadan doğrudan oda sıcaklığında 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Her iki tüpte de üst faz uzaklaştırıldı. 1.tüpte aynı işlem üç kez tekrarlandı. 2. tüpe ise eritrositleri parçalayan solüsyon 2 eklendi ve 10 dk karanlıkta inkübasyon yapıldı. İnkübasyon

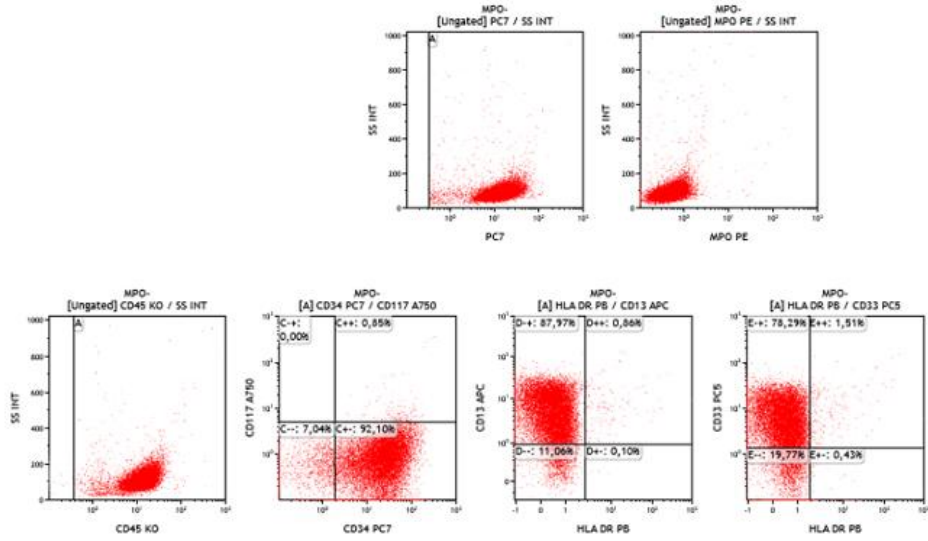
sonunda 2 ml hücre yıkama solüsyonu ekleyerek birinci tüpte olduğu gibi 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi yapıldı ve üst faz uzaklaştırıldı. Gerçekleştirdiğimiz işlem basamaklarından sonra her iki tüpümüzde 1 ml isoflow ekleyerek Beckman Coulter marka, Navios model akım sitometri cihazımızda 50 bin hücre sayıldı. Hücre sayımı sonucunda, Kaluza yazılım programı kullanılarak analiz yapıldı.

3.4. Hücre Karakterizasyonunda Kullanılan Kapılama İşlemleri

Hücreler CD45 kapısında görüntülenerek CD45 dim kapısında yerleşik olan hücrelerde CD117⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD34⁺ ve HLADR⁺ ekspresyonları ve yüzdeleri ölçüldü. Testlerin optimizasyonu için Erciyes üniversitesi akım sitometri laboratuvarında klinik tanı için kullanılan standart prosedüre uyuldu. Şekil 3.1.'de MPO pozitif, Şekil 3.2.'de ise MPO negatif AML örneklerinin akım sitometri analiz sonuçları gösterildi.



Şekil 3.1. CD45 dim de yerleşik MPO pozitif blastlardaki AML marker analizi



Şekil 3.2. CD45 dim de yerleşik MPO negatif blastlardaki AML marker analizi

3.5. İstatistiksel Analiz

Tüm verilerin normal dağılıma uygunluğu histogram ve Q-Q grafikleri ve Shapiro-wilk Testi ile değerlendirildi. Gruplar arası karşılaştırmalarda nicel değişkenleri için Mann-Whitney U Testi uygulandı. Nicel veriler arasındaki ilişki Spearman korelasyon analizi ile değerlendirildi. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmada AML tanısı alan hasta örneklerinde akım sitometri yöntemi ile blastik hücrelerin karakterizasyonu yapılarak MPO ekspresyonunun bu karakterizasyonda etkisi araştırıldı. Akım sitometrik analizde CD45 dim (zayıf) kapısında elli bin (5×10^4) hücrenin yer alması sağlandı.

4.1. Çalışmaya Dahil Olan Hastalar ve Özellikleri

Çalışmamız AML tanısı alan ve akım sitometri ile tanısı doğrulanan hastaların ilk tanı örnekleri ile yürütüldü. Akım sitometri ile immünofenotiplendirmede hastalar blast oranı %20 ve üzeri örneklerden seçildi. Çalışma grubumuzda medyan yaşı 60 olan 40 erişkin yeni tanı AML hastası yer aldı. Hastaların 13'ü 31-83 yaş aralığında olan kadın ve 27'si 29-86 yaş aralığında olan erkekti. Hastaların yaş, cinsiyet ve blast yüzdeleri Tablo (4.1.) gösterildi.

Tablo 4.1. Çalışma grubundaki hastaların yaş, cinsiyet ve blast %'si

Hasta Adı	Yaş	Cinsiyet	Blast %	MPO
Hasta 1	56	E	52	Pozitif
Hasta 2	55	E	50	Pozitif
Hasta 3	29	E	85	Pozitif
Hasta 4	46	E	25	Pozitif
Hasta 5	83	K	95	Pozitif
Hasta 6	44	K	45	Pozitif
Hasta 7	71	K	95	Pozitif
Hasta 8	66	K	35	Pozitif
Hasta 9	45	E	70	Pozitif
Hasta 10	68	E	40	Pozitif
Hasta 11	61	E	72	Pozitif
Hasta 12	71	E	97	Pozitif
Hasta 13	41	E	60	Pozitif
Hasta 14	65	E	40	Pozitif
Hasta 15	67	K	30	Pozitif
Hasta 16	53	K	80	Pozitif
Hasta 17	52	E	45	Pozitif
Hasta 18	72	E	60	Pozitif
Hasta 19	82	K	45	Pozitif
Hasta 20	31	K	80	Pozitif
Hasta 21	86	E	25	Negatif
Hasta 22	71	E	18	Negatif
Hasta 23	59	E	20	Negatif
Hasta 24	68	E	15	Negatif
Hasta 25	82	E	25	Negatif
Hasta 26	75	E	40	Negatif
Hasta 27	78	E	33	Negatif
Hasta 28	80	E	46	Negatif
Hasta 29	62	E	54	Negatif
Hasta 30	68	K	47	Negatif
Hasta 31	42	E	40	Negatif
Hasta 32	66	E	27	Negatif
Hasta 33	42	K	15	Negatif
Hasta 34	63	E	32	Negatif
Hasta 35	44	E	55	Negatif
Hasta 36	43	E	20	Negatif
Hasta 37	48	K	85	Negatif
Hasta 38	66	K	53	Negatif
Hasta 39	38	K	90	Negatif
Hasta 40	68	E	15	Negatif

4.2. Çalışmada Yer Hastaların İmmüno-fenotiplendirilmesi

Çalışma protokolümüze göre AML tanısı alan ve blast oranı %20 ve üzerinde olan 40 hastada AML ilişkili yüzey antijenlerinin karakterizasyonu yapılarak yüzde değerleri hesaplandı ve Tablo 4.2. ve Tablo 4.3. de verildi.

4.2.1. MPO (-) Hastalarda Blast Karakterizasyonu

Çalışma protokolümüze göre MPO negatif AML tanısı alan 20 hastada AML ilişkili yüzey antijenlerinin karakterizasyonu yapılarak yüzde değerleri hesaplandı ve Tablo 4.2.'de gösterildi. Ortalama CD117⁺ blast yüzdesi %28.55±16, ortalama CD13⁺ blast yüzdesi %37.25±22, ortalama CD33⁺ blast yüzdesi %36.50±22, ortalama CD34⁺ blast yüzdesi %32.55±20 ve ortalama HLADR⁺ blast yüzdesi %26.00 ±16 olarak bulundu. MPO negatif hasta grubunda genel blast CD45 Dim yüzde ortalaması ise %38.6 olarak bulundu.

Tablo 4.2. MPO negatif hastalarda AML blast yüzdeleri ve karakterizasyonu

Hasta No	CD 117%	CD 13%	CD 33%	CD 34%	HLA DR%	Dim Blast%
Hasta 1	25	25	10	25	25	25
Hasta 2	18	18	18	9	18	20
Hasta 3	20	20	20	20	20	20
Hasta 4	15	15	15	15	15	20
Hasta 5	25	25	25	25	25	25
Hasta 6	40	40	40	40	1	40
Hasta 7	33	33	33	33	33	33
Hasta 8	46	46	46	46	46	46
Hasta 9	54	54	54	54	10	54
Hasta 10	47	47	47	47	47	47
Hasta 11	25	30	30	40	30	40
Hasta 12	27	27	27	27	23	27
Hasta 13	15	15	15	15	15	20
Hasta 14	32	32	32	32	32	32
Hasta 15	55	55	55	55	55	55
Hasta 16	20	20	20	20	20	20
Hasta 17	5	85	85	85	1	85
Hasta 18	53	53	53	53	53	53
Hasta 19	1	90	90	1	50	90
Hasta 20	15	15	15	9	15	20

4.2.2. MPO (+) Hastalarda Blast Karakterizasyonu

Çalışma protokolümüze göre MPO pozitif AML tanısı alan 20 hastada AML ilişkili yüzey antijenlerinin karakterizasyonu yapılarak yüzde değerleri hesaplandı ve Tablo 4.3'de gösterildi. Bu tabloya göre ortalama CD117⁺ blast yüzdesi %56.15±23, ortalama CD13⁺ blast yüzdesi %57.45±22, ortalama CD33⁺ blast yüzdesi %57.30±22, ortalama CD34⁺ blast yüzdesi %34.85±30, ortalama HLADR⁺ blast yüzdesi %35.95 ±24 ve dim kapısı blast yüzde ortalaması ise %60.05 olarak hesaplandı.

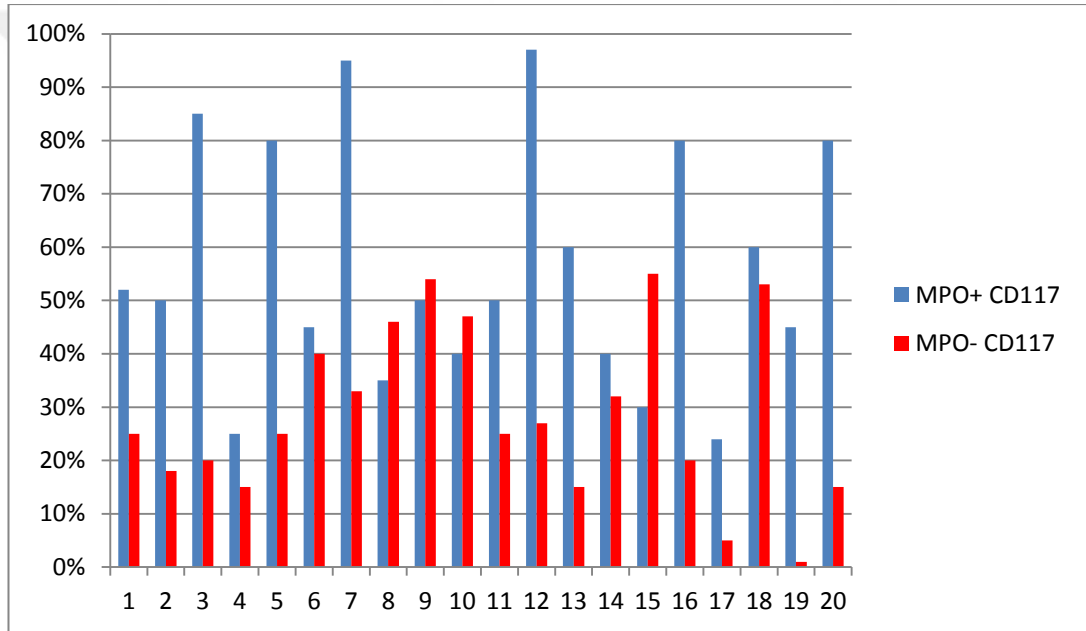
Tablo 4.3. MPO pozitif hastalarda AML blast karakterizasyonu

Hasta No	CD 117%	CD 13%	CD 33%	CD 34%	HLA DR%	Dim Blast%
Hasta 1	52	52	52	35	52	52
Hasta 2	50	50	50	50	50	50
Hasta 3	85	85	85	10	5	85
Hasta 4	25	25	25	1	25	25
Hasta 5	80	95	95	1	15	95
Hasta 6	45	45	45	35	45	45
Hasta 7	95	95	40	95	95	95
Hasta 8	35	35	35	30	35	35
Hasta 9	50	70	70	1	1	70
Hasta 10	40	40	40	15	40	40
Hasta 11	50	72	72	55	40	72
Hasta 12	97	75	97	97	65	97
Hasta 13	60	60	60	60	60	60
Hasta 14	40	40	40	1	10	40
Hasta 15	30	30	30	30	30	30
Hasta 16	80	80	80	55	25	80
Hasta 17	24	45	45	20	20	45
Hasta 18	60	30	60	60	60	60
Hasta 19	45	45	45	45	45	45
Hasta 20	80	80	80	1	1	80

4.3. MPO pozitif/negatiflik Durumu ve Blastik Marker İlişkisi

4.3.1. Hastalarda CD117 ve MPO Ekspresyon İlişkisi

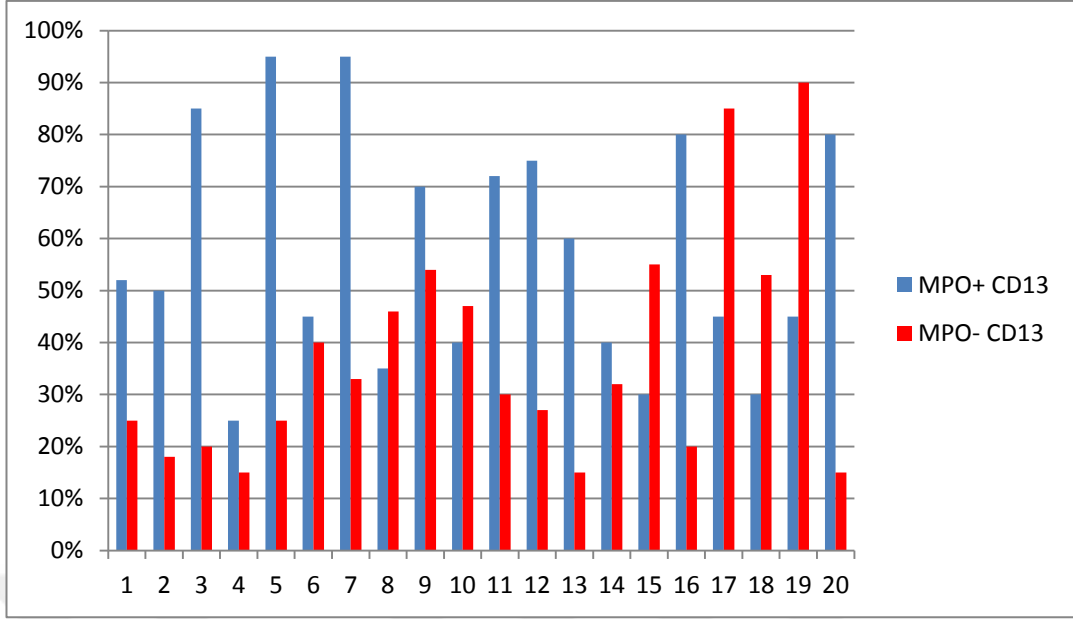
AML tanısı alan 40 hasta örneğinden elde edilen verilerde CD117 ve MPO ekspresyon yüzde değerleri belirlendi. Yapılan istatistiksel analize göre CD117 ekspresyonu ve MPO'nun pozitif/negatif değerleri arasında anlamlı bir istatistik farklılık olduğu ve MPO pozitif örneklerde CD117⁺ blast yüzdesinin daha yüksek olduğu gözlemlendi.($p<0.001$)(Şekil 4.3.) MPO pozitif hasta grubunda ortalama CD117⁺ blast yüzdesinin 1.96 oranında yüksek olduğu gözlemlendi. (Tablo 4.5)



Şekil 4.3. CD117⁺ blast yüzdesi ve MPO ilişkisinin karşılaştırması

4.3.2. Hastalarda CD13 ve MPO Ekspresyon İlişkisi

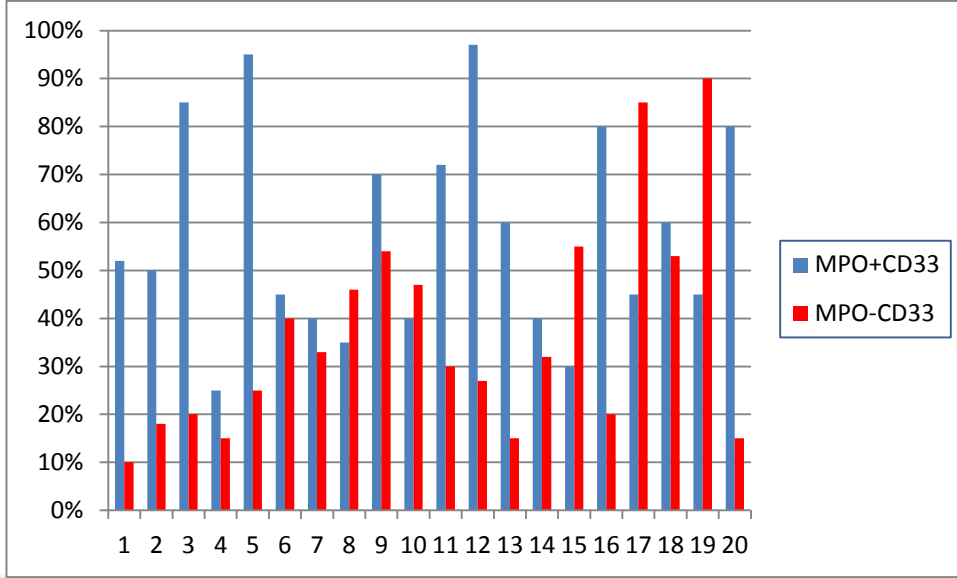
AML tanısı alan 40 hasta örneğinden elde edilen verilerde CD13 ve MPO ekspresyon yüzde değerleri belirlendi. Yapılan istatistiksel analize göre CD13 ekspresyonu ve MPO'nun pozitif/negatif değerleri arasında anlamlı bir istatistik farklılık olduğu ve MPO pozitif örneklerde CD13⁺ blast yüzdesinin daha yüksek olduğu gözlemlendi.($p<0.001$) (Şekil 4.4.) MPO pozitif hasta grubunda ortalama CD13⁺ blast yüzdesinin 1.54 oranında yüksek olduğu gözlemlendi. (Tablo 4.5)



Şekil 4.4. CD13⁺ blast yüzdesi ve MPO ilişkisinin karşılaştırması

4.3.3. Hastalarda CD33 ve MPO Ekspresyon İlişkisi

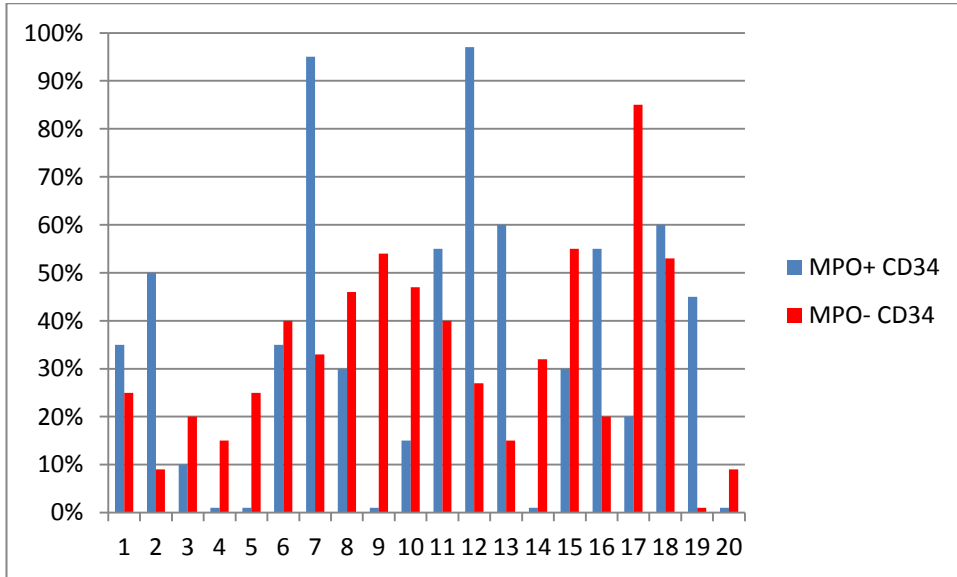
AML tanısı alan 40 hasta örneğinden elde edilen verilerde CD33 ve MPO ekspresyon yüzde değerleri belirlendi. Yapılan istatistiksel analize göre CD33 ekspresyonu ve MPO'nun pozitif/negatif değerleri arasında anlamlı bir istatistik farklılık olduğu ve MPO pozitif örneklerde CD33⁺ blast yüzdesinin daha yüksek olduğu gözlemlendi. ($p < 0.001$) (Şekil 4.5.) MPO pozitif hasta grubunda ortalama CD33⁺ blast yüzdesinin 1.56 oranında yüksek olduğu gözlemlendi. (Tablo 4.5.)



Şekil 4.5. CD33⁺ blast yüzdesi ve MPO ilişkisinin karşılaştırması

4.3.4. Hastalarda CD34 ve MPO Ekspresyon İlişkisi

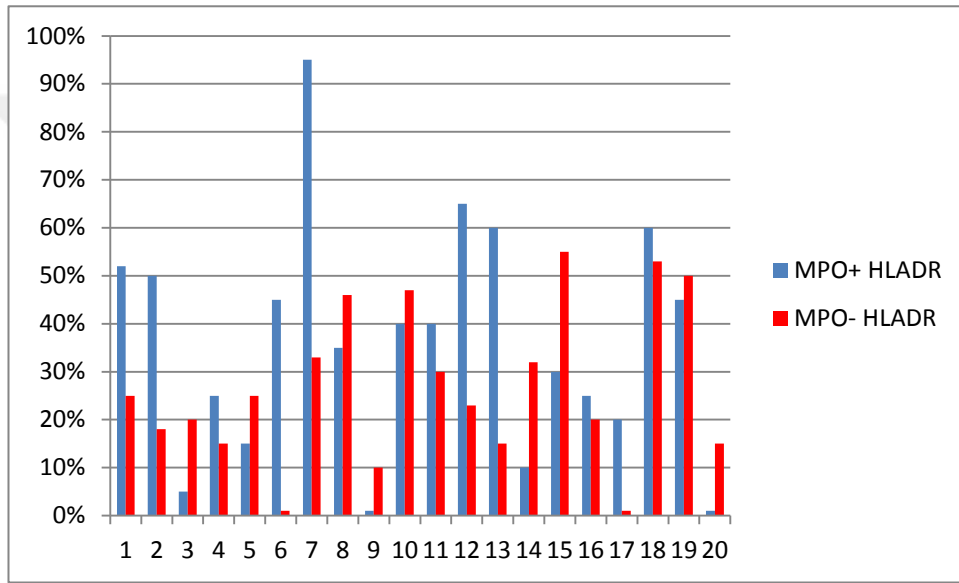
AML tanısı alan 40 hasta örneğinden elde edilen verilerde CD34 ve MPO ekspresyon yüzde değerleri belirlendi. Yapılan istatistiksel analize göre CD34 ekspresyonu ve MPO'nun pozitif/negatif değerleri arasında anlamlı bir istatistik farklılık olduğu ve MPO pozitif örneklerde CD34⁺ blast yüzdesinin daha yüksek olduğu gözlemlendi. ($p < 0.001$) (Şekil 4.6.) MPO pozitif hasta grubunda ortalama CD34⁺ blast yüzdesinin 1.07 oranında yüksek olduğu gözlemlendi. (Tablo 4.5)



Şekil 4.6. CD34⁺ blast yüzdesi ve MPO ilişkisinin karşılaştırması

4.3.5. Hastalarda HLADR ve MPO Ekspresyon İlişkisi

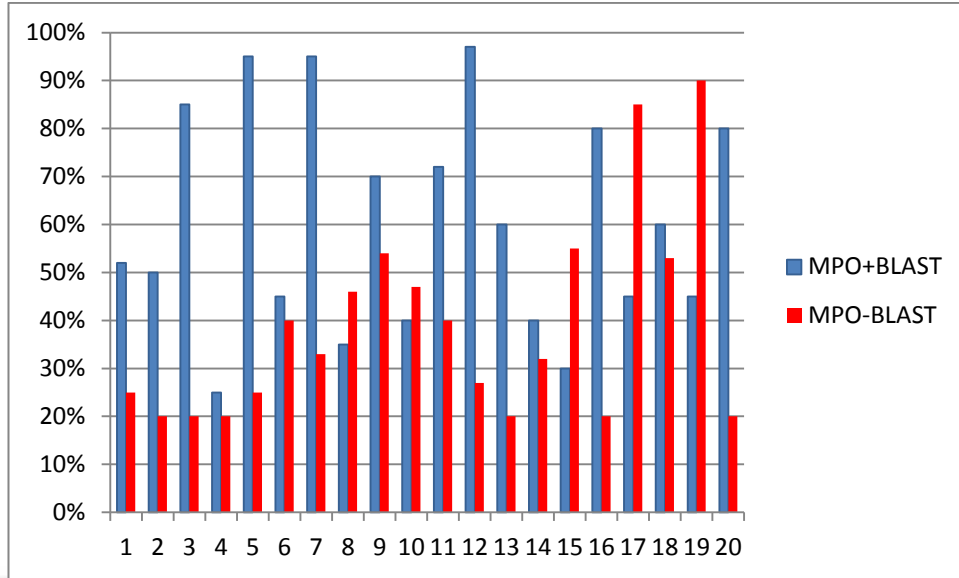
AML tanısı alan 40 hasta örneğinden elde edilen verilerde HLADR ve MPO ekspresyon yüzde değerleri belirlendi. Yapılan istatistiksel analize göre HLADR ekspresyonu ve MPO'nun pozitif/negatif değerleri arasında anlamlı bir istatistik farklılık olduğu ve MPO pozitif örneklerde HLADR⁺ blast yüzdesinin daha yüksek olduğu gözlemlendi.($p<0.001$)(Şekil 4.7.) MPO pozitif hasta grubunda ortalama HLADR⁺ blast yüzdesinin 1.38 oranında yüksek olduğu gözlemlendi. (Tablo 4.5)



Şekil 4.7. HLADR⁺ blast yüzdesi ve MPO ilişkisinin karşılaştırması

4.3.6. CD45 Dim Kapısı Blast yüzdesi ve MPO Ekspresyon İlişkisinin Gösterilmesi

AML tanısı alan 40 hasta örneğinden elde edilen verilerde blast ve MPO ekspresyon yüzde değerleri belirlendi. Yapılan istatistiksel analize göre blast ekspresyonu ve MPO'nun pozitif/negatif değerleri arasında anlamlı bir istatistik farklılık olduğu ve MPO pozitif örneklerde blast yüzdesinin daha yüksek olduğu gözlemlendi.($p<0.001$) (Şekil 4.8.) MPO pozitif hasta grubunda ortalama blast yüzdesinin 1.48 oranında yüksek olduğu gözlemlendi (Tablo 4.5).



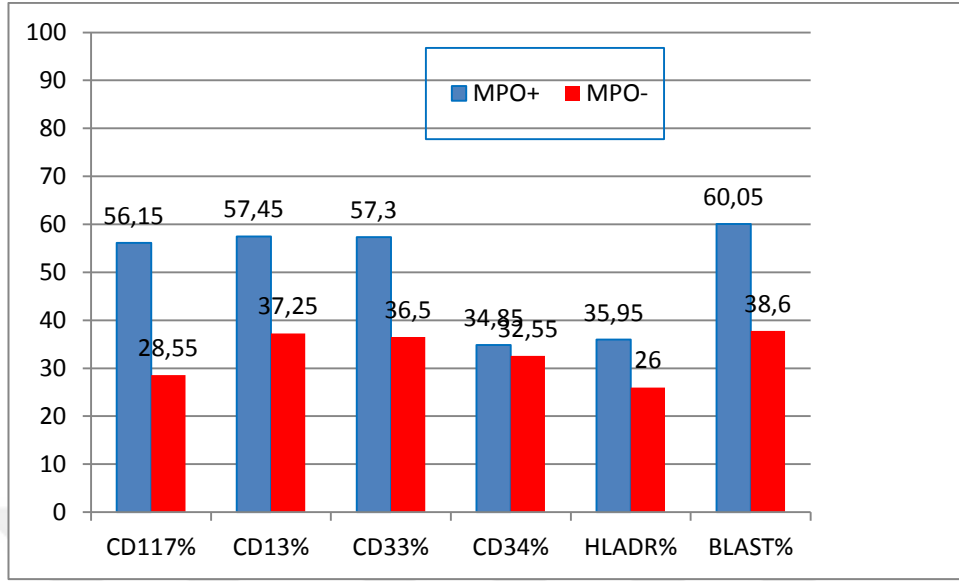
Şekil 4.8. CD45dim kapısı blast yüzdesi ve MPO ilişkisinin karşılaştırması

4.4. Ortalama Blast Yüzdesine Göre AML Markerlarının Karşılaştırılması

Çalışmaya katılan MPO pozitif/negatif 40 AML hastasındaki yüzey antijenlerinin karakterizasyonu yapılarak ortalama değerler Tablo 4.4. de verildi. MPO pozitif /MPO negatif hasta grubunda bu ortalama değerlerin oranı ise Tablo 4.5. de verildi. Örneklerde ortalama blast yüzdesine göre AML markerlarının karşılaştırılması ise Şekil 4.9.'da gösterildi MPO pozitif /negatif hasta grubunda ortalama CD117⁺ blast oran 1.96, CD13⁺ blast oranı 1.54, CD33⁺ blast oranı 1.56, CD34⁺ blast oranı 1.07, HLADR⁺ blast oranı 1.38 ve dim kapısı blast oranı ise 1.55 olarak hesaplanmıştır. (Tablo 4.5.) Ayrıca MPO+/MPO- hastalarda ortalama AML markerlar ve blast oranı ise Şekil 4.10.'da gösterildi.

Tablo 4.4. MPO pozitif ve MPO negatif Hastalarda ortalama AML Markerlar ve Blast Yüzdeleri

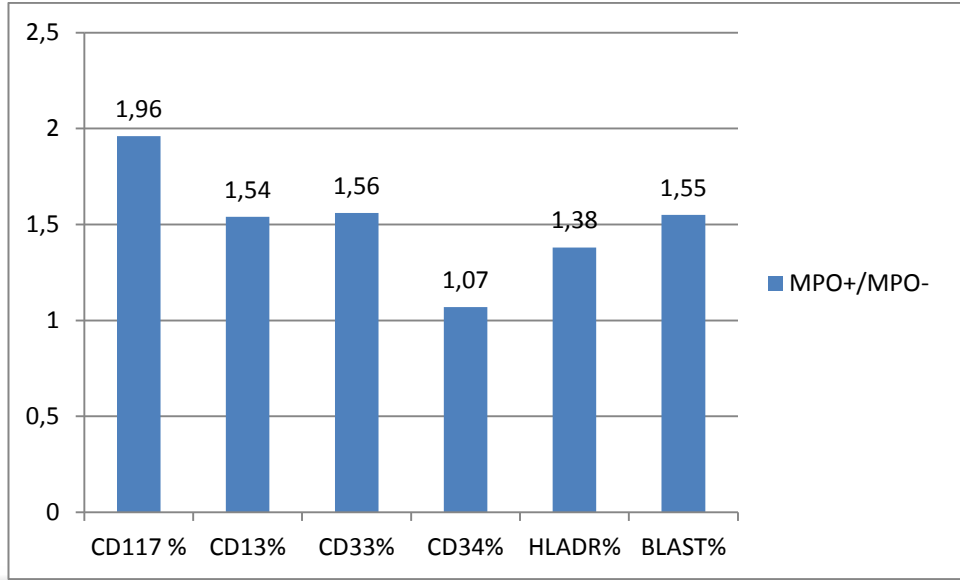
Ortalama %	CD117	CD 13	CD 33	CD 34	HLA DR	Blast
MPO pozitif	56.15±23	57.45±22	57.30±22	34.85±30	35.95 ±24	60.05
MPO negatif	28.55±16	37.25±22	36.50±22	32.55±20	26.00 ±16	38.6



Şekil 4.9. Örneklerde ortalama blast yüzdesine göre AML markerlarının karşılaştırılması

Tablo 4.5. Markerlara Göre Ortalama Blastın MPO+/MPO- Hastalarda oranı

Ortalama %	CD117	CD 13	CD 33	CD 34	HLA DR	Ortalama Blast %
MPO pozitif/MPO negatif	1.96	1.54	1.56	1.07	1.38	1.55



Şekil 4.10. MPO+/MPO- Hastalarda ortalama AML Markerlar ve Blast oranı

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Akut löseminin ayırıcı tanısında immün-fenotiplemenin önemi iyi bilinmektedir. Akım sitometre ile immün fenotiplendirme AML tanısında, subtiplendirmesinde ve blast yüzdesinin belirlenmesinde altın standart bir yöntemdir. Genetik çalışmalar için ön bilgi sunmakla birlikte AML MRD çalışmalarında da önemli bir araçtır. AML'deki immün belirteç markırlar modern tedavi protokollerinin kullanılmasında yol gösterici bir araçtır. Hücre yüzey markırları gen tedavisi gibi yeni jenerasyon tedavilerin uygulamasında da önemli bir araçtır ve hematopoietik kök hücrenin tanımlanması ve izolasyonunda katkı sunar(Wang ve ark., 1995).

Akım sitometri ile immün fenotiplemenin gelişmesi ile beraber normal blastik hücreler aynı anda birçok markır ile işaretlenerek boyanabilmektedir. Bu durum hücre karakterizasyonu ve kantitasyonunu mümkün kılmıştır. Bu şekilde, myeloid hücrelerin indifferansiye (erken) evreleri kolaylıkla ve daha net olarak ayırt edilebilmektedir. Özellikle, indifferansiye AML tanısında hücre içi myeloperoksidaz (MPO) ve onunla ilişkili inaktif öncüllerinin gösterilmesinde kolaylık sağlar. Son yıllarda sitoplazmada lokalize, oldukça erken farklılaşma evrelerinde eksprese edilen, pek çok tanımlayıcı yüzey belirleyicisi kullanıma sunulmuştur. Bu amaçla granülo-monositer seri için MPO iyi bir göstergedir. Ayrıca AML hastalarında MPO ekspresyonu hastalığın prognozunun takibinde kullanılan önemli parametrelerden birisidir.

Çalışmamız, akım sitometrik işaretleme ile yeni AML tanısı alan hasta verileri ile gerçekleştirildi. Akım sitometri ile immün-fenotiplendirme de %20 üzerinde blastik hücreye rastlanan erişkin AML hastalarında MPO pozitif ve negatif 'liğinin AML hücre karakteri gösteren yüzey reseptörlerine (CD117, CD13, CD33 ve HLADR) etkisini araştırdık.

Literatürde Anne E. Bras ve arkadaşları lösemik hücre grubunda >%20 den fazla hücrede MPO varlığını pozitiflik olarak tanımlamıştır(Bras et al., 2021). Bizde bu kriterleri lenfoid hücreleri negatiflik noktası kabul ederek değerlendirmeye aldık. Çalışmaya katılan AML hastalarımızda MPO negatif blast yüzdesi ile MPO pozitif blast yüzdesi arasında anlamlı bir farklılık olduğu gözlemlendi (Tablo 4.4.1). MPO pozitifliği olan vakalarda AML spesifik markerların ekspresyon yüzdelerinde artış gözlemlendi.

Literatürde Yundeok Kim ve ark.'larının AML tanısı konan 81'i erkek, 59'u kadın olmak üzere toplam 140 hastada yaptığı çalışmasında MPO pozitif 86 hasta (%62) ve MPO negatif 54 hasta (%38) bularak MPO ekspresyonunun prognostik önemini geriye dönük olarak analiz etmişlerdir. MPO pozitif ve MPO negatif AML hastalarının hastalıksız yaşam dönemlerine bakıldığı zaman anlamlı bir istatistik olmasada MPO pozitif hastaların daha iyi seyirli olduğu MPO pozitifliğinin iyi bir prognoz yönünden anlamlı bir belirteç olduğu vurgulanmıştır(Kim et al., 2012). Bizim çalışmamızdaki verilerin klinik korelasyonu henüz yapılmamıştır. Klinik korelasyon çalışması ile benzer anlamlı sonuçlara ulaşmak mümkün olabilir. MPO negatifliği indeferansiasyon (immatür) göstergesi olup daha immatür karakterli ve aguranüler blast tipini işaret etmektedir.

MPO pozitifliği özellikle AML M3 karakterizasyonunda önemli bir pozitif markıdır. Literatürde Jamal Eivazi-Ziaei ve ark.'nın 72 yetişkin kemoterapi almamış AML hastasını dahil ettiği çalışmasında, hastaların tıbbi kayıtlarını inceleyerek elde ettikleri verilerinde M3 vakalarında %75 MPO pozitifliği olduğunu bildirmiştir.Öte yandan AML M0 durumunda MPO negatifliği olduğu anlaşılmaktadır(Eivazi-Ziaei, 2009). Bazı hücre sayım cihazları Technicon H1 (Bayer) MPO parametresine göre çalışmaktadır. Özellikle blastlarda MPO negatifliğinde veya MPO defekti olan normal kişilerde durum tespiti yapabilmektedir.

İmmünofenotip olgunlaşmaya bağlı miyeloid antijenler CD13, CD33, sitoplazmik MPO, soy ilişkili olmayan CD34 ve HLA-DR antijenleri, immünofenotipik çalışmalarda blast oranını belirlemek amacı ile CD45, CD34 veya CD117

kullanılmaktadır. MPO ekspresyon durumu AML subtiplendirilmesinde standardize edilmesi gereken önemli bir parametredir.

Sonuç olarak;

- MPO pozitif AML'lerde blast yüzdeleri MPO negatiflere göre daha fazla olduğu gösterildi.
- MPO pozitif AML'lerde MPO negatif AML'lere göre marker ekspresyonlarının daha yüksek düzeyde olduğu gözlemlendi.
- MPO ölçümü AML subtiplendirilmesinde, AML tanısında ve AML hastalarının takibinde kullanılabilecek önemli bir parametredir.
- Daha geniş hasta kitlesiyle MPO-AML-marker ilişkisinin araştırılması bize AML'nin daha iyi tanımlanması ve MPO-prognoz ilişkisinin hasta takibinde kullanılmasına fırsat verecektir.

6. KAYNAKLAR

- Adrover JM, Nicolás-Ávila JA, Hidalgo A. Aging: A Temporal Dimension for Neutrophils. *Trends Immunol.* 2016;37(5):334-345. doi:10.1016/j.it.2016.03.005
- Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature.* 2000;404(6774):193-197. doi:10.1038/35004599
- Avcılar H, Köker MY, Eser B. Derleme-Review Sağlıklı kemik iliği ve kan örneklerinde akım sitometri uygulamaları Flow cytometry application in normal bone marrow and peripheral blood. *Cumhur Med J* *Cumhur Med J.* 2014;36:415-421.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel M -T, et al. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *Br J Haematol.* 1976;33(4):451-458. doi:10.1111/j.1365-2141.1976.tb03563.x
- Bras AE, Osmani Z, de Haas V, et al. Standardised immunophenotypic analysis of myeloperoxidase in acute leukaemia. *Br J Haematol.* 2021;193(5):922-927. doi:10.1111/bjh.17210
- Caligiuri MA, Strout MP, Gilliland DG. Molecular biology of acute myeloid leukemia. *Semin Oncol.* 1997;24(1):32-44.
- Dancey JT, Deubelbeiss KA, Harker and Finch LACA. Neutrophil kinetics in man. *J Clin Invest.* 1976;58(3):705-715. doi:10.1172/JCI108517
- Demircan C, Fiskeci A, Yücel İ. Hematopoetik büyüme faktörleri. *OMÜ tıp Derg.* 1994;11(2):141-148.
- Eaves C, Miller C, Cashman J, et al. Hematopoietic stem cells: Inferences from in vivo assays. *Stem Cells.* 1997;15(SUPPL. 1):1-5. doi:10.1002/stem.5530150802
- Eivazi-Ziaei J. Myeloperoxidase index and subtypes of acute myeloid leukemia. *J Pak Med Assoc.* 2009;59(6):406-407.

- Fitzgibbon J, Ph D. Mutation of. 1995;510(607):505-510.
- Fuda F, Chen W. Lineage determination in mixed phenotype acute leukemia: Response to marcondes et al. Cytom Part B - Clin Cytom. 2014;86(3):150-151. doi:10.1002/cyto.b.21159
- Görgens A, Radtke S, Möllmann M, et al. Revision of the Human Hematopoietic Tree: Granulocyte Subtypes Derive from Distinct Hematopoietic Lineages. Cell Rep. 2013;3(5):1539-1552. doi:10.1016/j.celrep.2013.04.025
- Greaves M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. Nat Rev Cancer. 2006;6(3):193-203. doi:10.1038/nrc1816
- Greenlee-Wacker MC. Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. Immunol Rev. 2016;273(1):357-370. doi:10.1111/imr.12453
- Grimwade LF, Fuller KA, Erber WN. Applications of imaging flow cytometry in the diagnostic assessment of acute leukaemia. Methods. 2017;112(2016):39-45. doi:10.1016/j.ymeth.2016.06.023
- Häger M, Cowland JB, Borregaard N. Neutrophil granules in health and disease. J Intern Med. 2010;268(1):25-34. doi:10.1111/j.1365-2796.2010.02237.x
- Hla-dr PC. PerCP/Cyanine5.5 anti-human HLA-DR. Published online 2020.
- Kamu Hastaneler Kurumu Demirci Devlet Hastanesi T, Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği Ç, Geliş Tarihi M. Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemileri Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Kadir YÜMLÜ. Vol 16.
- Khan AA, Alsahli MA, Rahmani AH. medical sciences Myeloperoxidase as an Active Disease Biomarker: Recent Biochemical and Pathological Perspectives. doi:10.3390/medsci6020033
- Kheiri SA, MacKerrell T, Bonagura VR, Fuchs A, Billett HH. Flow cytometry with or without cytochemistry for the diagnosis of acute leukemias? Commun Clin Cytom. 1998;34(2):82-86. doi:10.1002/(SICI)1097-0320(19980415)34:2<82::AID-CYTO4>3.0.CO;2-E
- Kim Y, Yoon S, Kim SJ, Kim JS, Cheong JW, Min YH. Myeloperoxidase expression in acute myeloid leukemia helps identifying patients to benefit from transplant. Yonsei Med J. 2012;53(3):530-536. doi:10.3349/ymj.2012.53.3.530
- Klebanoff SJ. Myeloperox. J Leukoc Biol. 2005;77(301):598-625. doi:10.1189/jlb.1204697.1

- Knapp W, Strobl H, Majdic O. Flow cytometric analysis of cell-surface and intracellular antigens in leukemia diagnosis. *Cytometry*. 1994;18(4):187-198. doi:10.1002/cyto.990180402
- Korns D, Frasch SC, Fernandez-Boyanapalli R, Henson PM, Bratton DL. Modulation of macrophage efferocytosis in inflammation. *Front Immunol*. 2011;2(NOV):1-10. doi:10.3389/fimmu.2011.00057
- Lakshman R, Finn A. Neutrophil disorders and their management. *J Clin Pathol*. 2001;54(1):7-19. doi:10.1136/jcp.54.1.7
- Lee EJ, Pollak A, Leavitt RD, Testa JR, Schiffer CA. Minimally differentiated acute nonlymphocytic leukemia: A distinct entity. *Blood*. 1987;70(5):1400-1406. doi:10.1182/blood.v70.5.1400.1400
- Lemischka I. Stem cell dogmas in the genomics era. *Rev Clin Exp Hematol*. 2001;5(1):15-25. doi:10.1046/j.1468-0734.2001.00030.x
- Leong ASY, Forbes IJ, Cowled PA, et al. Surface marker studies in chronic lymphocytic leukaemia and non-hodgkin's lymphoma. *Pathology*. 1979;11(3):461-471. doi:10.3109/00313027909059023
- Lord BI, Bronchud MH, Owens S, et al. The kinetics of human granulopoiesis following treatment with granulocyte colony-stimulating factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(23):9499-9503. doi:10.1073/pnas.86.23.9499
- Manuaba. Manuaba. *J Cell Sci*. 2007;2007(1):3157-3161.
- McLeod BC, Strauss RG, Ciavarella D, et al. Management of hematological disorders and cancer. *J Clin Apher*. 1993;8(4):211-230. doi:10.1002/jca.2920080404
- Mishalian I, Bayuh R, Eruslanov E, et al. Neutrophils recruit regulatory T-cells into tumors via secretion of CCL17 - A new mechanism of impaired antitumor immunity. *Int J Cancer*. 2014;135(5):1178-1186. doi:10.1002/ijc.28770
- Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. *Nat Immunol*. 2014;15(7):602-611. doi:10.1038/ni.2921
- Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein LE. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(2):126-131. doi:10.1038/nrm3049
- Parker JW. Flow cytometry in the diagnosis of lymphomas. *Cytometry*. 1988;9(3 S):38-43. doi:10.1002/cyto.990090809

- Perry JM, Li L. Disrupting the Stem Cell Niche: Good Seeds in Bad Soil. *Cell*. 2007;129(6):1045-1047. doi:10.1016/j.cell.2007.05.053
- Porwit A, Béné MC. Acute leukemias of ambiguous origin. *Am J Clin Pathol*. 2015;144(3):361-376. doi:10.1309/AJCPSTU55DRQEGTE
- Rieger MA, Schroeder T. Hematopoiesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(12). doi:10.1101/cshperspect.a008250
- Rieger MA, Schroeder T. Hematopoiesis. doi:10.1101/cshperspect.a008250
- Scapini P, Marini O, Tecchio C, Cassatella MA. Human neutrophils in the saga of cellular heterogeneity: insights and open questions. *Immunol Rev*. 2016;273(1):48-60. doi:10.1111/imr.12448
- Sempozyumu KB, Pamukkale R, Hotel T. Konferans Özetleri.; 2018.
- Tabé Y, Konopleva M. Advances in understanding the leukaemia microenvironment. *Br J Haematol*. 2014;164(6):767-778. doi:10.1111/bjh.12725
- Uribe-Querol E, Rosales C. Neutrophils in cancer: Two sides of the same coin. *J Immunol Res*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/983698
- Wang JCY, Beauregard P, Soamboonsrup P, Neame PB. Monoclonal antibodies in the management of acute leukemia. *Am J Hematol*. 1995;50(3):188-199. doi:10.1002/ajh.2830500307
- Weissman IL. Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 2000;100(1):157-168. doi:10.1016/S0092-8674(00)81692-X
- Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows JM. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal “stem” cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol*. 2003;121(2):368-374. doi:10.1046/j.1365-2141.2003.04284.x
- Wood B. Multicolor immunophenotyping: Human immune system hematopoiesis. *Methods Cell Biol*. 2004;2004(75):559-576. doi:10.1016/s0091-679x(04)75023-2
- Yanada M, Suzuki M, Kawashima K, et al. Long-term outcomes for unselected patients with acute myeloid leukemia categorized according to the World Health Organization classification: A single-center experience. *Eur J Haematol*. 2005;74(5):418-423. doi:10.1111/j.1600-0609.2004.00397.x
- Yin C, Heit B. Armed for destruction: formation, function and trafficking of neutrophil granules. *Cell Tissue Res*. 2018;371(3):455-471. doi:10.1007/s00441-017-2731-8

Zhang H, Wang ZZ. Mechanisms that mediate stem cell self-renewal and differentiation. *J Cell Biochem*. 2008;103(3):709-718. doi:10.1002/jcb.21460



KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU (2011 - KAEK-80)

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Akut lösemilerde blastik hücrelerin akım sitometre ile karakterizasyonu, ilişkili molekül ve enzimlerin tanımlanması			
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU					
DEĞERLEN DIRİLEN BELGELER	BELGE ADI	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili	
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	BELGE ADI	Açıklama			
	SIGORTA				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ				
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU				
	İLAN				
	YILLIK BİLDİRİM				
	SONUÇ RAPORU				
	GÜVENLİK BİLDİRİMLERİ				
KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2018/53	Tarih : 26.01.2018			
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak in araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmeinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya kat verilmiştir.				

KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI					
ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI		Prof. Dr. Sami Aydoğan			
Unvanı / Adı Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyeti		Araştırma ile İlişi
Prof. Dr. Sami AYDOĞAN	Fizyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒	K ☐	E ☐ H ☒
Prof. Dr. Ahmet ÖZTÜRK	Halk Sağlığı	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒	K ☐	E ☐ H ☒
Prof. Dr. Kemal DENİZ	Patoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒	K ☐	E ☐ H ☒
Prof. Dr. Aydın ÜNAL	İç Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒	K ☐	E ☐ H ☒
Doç. Dr. Güven KAHRİMAN	Radyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒	K ☐	E ☐ H ☒
Doç. Dr. Kemal ÖZYURT	Dermatoloji	Kayseri Eğitim Hast.	E ☒	K ☐	E ☐ H ☒
Doç. Dr. Emin Murat CANGER	Ağız, Diş ve Çene Radyolojisi	E.Ü. Diş Hek. Fak.	E ☒	K ☐	E ☐ H ☒
Doç. Dr. Cihangir BIÇER	Anest. ve Rean.	E.Ü. Tıp Fak...	E ☒	K ☐	E ☐ H ☒
Doç. Dr. Fatih KARDAŞ	Çocuk Sağ. ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak...	E ☒	K ☐	E ☐ H ☒
Doç. Dr. Serpil TAHERİ	Tıbbi Biyoloji	E.Ü. Tıp Fak...	E ☐	K ☒	E ☐ H ☒
Doç. Dr. Zafer SEZER	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒	K ☐	E ☐ H ☒
Yard.Doç.Dr. Gökmen ZARARSIZ	Biyoistatistik	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒	K ☐	E ☐ H ☒
Av. Serhat ÜSTÜNEL	Avukat	Hukuk Müşaviri	E ☒	K ☐	E ☐ H ☒
Ecz. Şükran TERZİ	Eczacı	Serbest Eczacı	E ☐	K ☒	E ☐ H ☒
Sevtap Koçer	Sivil Üye	Serbest	E ☐	K ☒	E ☐ H ☒

*: Toplantıda Bulunma

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU (2011 - KAEK-80)

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Akut lösemilerde blastik hücrelerin akım sitometre ile karakterizasyonu, ilişkili molekül ve enzimlerin tanımlanması		
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU				
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	ERCIYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU		
	AÇIK ADRES	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı/Melikgazi/KAYSERİ		
	TELEFON	0 352 437 49 10 - 11		
	FAKS	0 352 437 52 85		
	E-POSTA	sukriye@erciyes.edu.tr		
BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI / ADI / SOYADI	Prof.Dr.Yavuz Köker		
	KOORDİNATÖR SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	İmmünoloji		
	KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı Kayseri		
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ ADI SOYADI			
	DESTEKLEYİCİ			
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐	
		FAZ 2	☐	
		FAZ 3	☐	
FAZ 4		☐		
Gözlemsel ilaç çalışması		☐		
Tıbbi cihaz klinik araştırması		☐		
In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		☐		
İlaç dışı klinik araştırma		☒		
Diğer ise belirtiniz	Bireysel Araştırma Projesi			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEKMERKEZ ☒	ÇOKMERKEZ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

Akut lösemilerin akım sitometri ile subtiplendirilmesi ve blastlarda MPO aktivitesinin araştırılması

ORJİNALLİK RAPORU

% 16	% 16	% 4	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 8
2	acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 2
3	www.fisheriessciences.com İnternet Kaynağı	% 2
4	acikerisim.kku.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
5	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	% 1
6	acikerisim.ybu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
7	www.slideserve.com İnternet Kaynağı	<% 1
8	anatoliahealthcare.com İnternet Kaynağı	<% 1
9	Mary Theresa Sylvia, Jhansi Rani, Debdatta Basu, Rakhee Kar, Biswajit Dubashi.	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Rana ERBAY SIR

Uyruğu: T.C.

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2004
Ön lisans	Erciyes Üniversitesi Halil Bayraktar SHMYO Tıbbi Laboratuvar	2000
Lise	Kayseri Lisesi	1998

İŞ DENEYİMLERİ

YIL	Kurum	GÖREV
2005-2022	Erciyes üniversitesi Merkez laboratuvarı	Biyolog

Yabancı dil:İngilizce