

HEMATOLOJİK MALİGNİTELERDE GENETİK ALGORİTMA KILAVUZU

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI



SÜRÜM 1 – OCAK 2024

İÇİNDEKİLER

Önsöz	I
Kısaltmalar	II
1. Bölüm: Kronik myeloid lösemi	1
2. Bölüm: Myeloproliferatif neoplazmalar	8
3. Bölüm: Myelodisplastik neoplazmalar	17
4. Bölüm: Myelodisplastik/myeloproliferatif neoplazmalar.....	24
5. Bölüm: Akut myeloid lösemi	29
6. Bölüm: Kronik lenfositik lösemi.....	40
7. Bölüm: Akut lenfoblastik lösemi.....	48
8. Bölüm: Multiple myeloma	59
9. Bölüm: Hematolojik malignitelerde yeni nesil dizi analizlerinin kullanımı.....	66

Hematolojik neoplazmalardaki klonal anomalilerin belirlenmesi neoplastik ve/veya premalign bir hastalığın patofizyolojisinin ortaya konması, hastalık tanısı, hastalık prognozunun belirlenmesi ve tedavi seçimi için önemlidir. Lösemilerin birçoğu genetik anomaliler ile ilişkilidir ve bu anomaliler; karakteristik, tekrarlayan ve edinilmiş anomalilerdir. Tedavi kararının verilmesi için de hergün artan sayıda hastalıkta genetik sonucun bilimesi zorunludur. Tanın değeri aynı zamanda hastaların prognozunu değiştirebilecek terapötik seçenekleri de gündeme getirmiştir. Bu nedenle hedefe yönelik tedaviler ne kadar çok kullanılabilir hale gelirse, kapsamlı tanılama gereksinimi o kadar büyük olmayacaktır. Günümüzde tanı açısından bakıldığında artık her bir hastanın karyotip/genotipinin oldukça detaylı bir karakterizasyonu hedeflenmektedir. Bu nedenle tüm genetik tanı yöntemlerinin en efektif şekilde kullanılması, sonuçlarının doğru yorumlanması, Tıbbi Genetikçi ve Hematologlar ile karşılıklı tartışılabilmesi gerekmektedir. Hazırladığımız bu kılavuzda yer alan hastalıkların genetik tanısı ve algoritmasının anlaşılması ve doğru uygulanabilmesi amaçlanmaktadır. Günümüzde genetik tanının gelişimi ve değişimi baş döndürücü bir hızla devam etmektedir. Bu dinamik süreci de takip eden ve sürekli gelişmeye açık olan kılavuzun ilk sürümünü hazırlamış olmaktan çok mutluyuz. Kılavuzun hazırlanmasında görev alan başta “Dr. Sevgi Işık” ve “Uzm.Bio. Gülçin Günden” olmak üzere Eskişehir “Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Öğretim Üyelerine”, desteklerini esirgemeyen “Tıbbi Genetik Derneği Yönetim Kurulu” ve “Türk Hematoloji Derneği Yönetim Kurulu”na, yıllardır örneklerini değerlendirdiğimiz bu sayede edindiğimiz tüm deneyimlerle “Bilime Katkı Sağlayan Tüm Hastalara” teşekkürü bir borç biliriz.

Ocak 2024

Prof.Dr. Beyhan DURAK ARAS

**Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD
Öğretim Üyesi**

KISALTMALAR

AACR	: American Association for Cancer Research
ALL	: Akut lenfoblastik lösemi
AML	: Akut myeloid lösemi
AML-MR	: Myelodisplazi-iliskili AML
APL	: Akut promyelositik lösemi
ASCT	: Otolog kök hücre nakli
ASO-PCR	: Allel-spesifik oligonükleotid polimeraz zincir reaksiyonu
bZIP	: Basic leucine zipper
cDNA	: Complementary DNA
CLL-IPI	: CLL international prognosis index
cMDS	: Childhood MDS
cMDS-LB	: Childhood MDS with low blasts
CNLOH	: Copy neutral loss of heterozygosity
CPT	: Trisodium citrate/pyridoxal 5'-phosphate/Tris
Del	: Delesyon
dPCR	: Dijital PCR
EDTA	: Ethylenediamine tetraacetic acid
ELN	: European LeukemiaNet
ERIC	: European Research Initiative on CLL
ESA	: Ek sitogenetik anomaliler
ET	: Esansiyel trombositoz

FDA	: U.S. Food and Drug Administration
FFPE	: Formalin-fixed paraffin-embedded
FLC	: Free light chain
gDNA	: Genomic DNA
GIPSS	: Genetically Inspired Prognostic Scoring System
HMA	: Hipometilleyici ajanlar
HMR	: Çok yüksek risk mutasyonları
IGHV	: Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region
IMGT/V-QUEST	: International ImMunoGeneTics information system
IMWG	: International Myeloma Working Group
IPSS	: International Prognostic Scoring System
IPSS-M	: Molecular-International Prognostic Scoring System
IPSS-R	: Revised-International Prognostic Scoring System
IS	: International scale
ISS	: Tümör yükü
iFISH	: Interphase FISH
JMML	: Juvenil myelomonositik lösemi
KIT	: Kemik iliği transplantasyonu
Kİ	: Kemik iliği
KLL	: Kronik lenfositik lösemi
KML	: Kronik myeloid lösemi
KMML	: Kronik myelomonositik lösemi

KSA	: Klonal sitogenetik aberasyon
LOH	: Loss of heterozygosity
MDS	: Myelodisplastik neoplazma
MDS/MPN	: Myelodisplastik/myeloproliferatif neoplazma
MDS-F	: Fibrosis MDS
MDS-h	: Hypocellular MDS ²
MDS-IB	: Increased blasts MDS
MDS-LB	: Low blasts MDS
MFC	: Multiparameter flow cytometry
M-IGHV	: Mutated <i>IGHV</i>
MIPSS70	: Mutation-Enhanced International Prognostic Scoring System 70
MM	: Multiple myeloma
MMY	: Major moleküler yanıt
MPN	: Myeloproliferatif neoplazma
MRD	: Minimal rezidüel hastalık
MRI	: Magnetic resonance imaging
mSMART	: Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy
MYSEC-PM	: Myelofibrosis Secondary to PV and ET-Prognostic Model
NCCN	: National Comprehensive Cancer Network
NIH	: National Institutes of Health
OS	: Overall survival
PFS	: Progresyonsuz yaşam süresi

Ph	: Philadelphia kromozomu
PK	: Periferik kan
PMF	: Primer myelofibrozis
PV	: Polistemi vera
RCC	: Refrakter sitopeni
RCM	: Red cell mass
RISS	: Revised International Staging System
RT-PCR	: Real-Time PCR
RT-qPCR	: Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
SA	: Sitogenetik anomali
smbZIP	: Basic leucine zipper (bZIP) monoallelik mutasyonları
T-ALL	: T-hücreli ALL
TCR	: <i>T cell receptor</i>
TKI	: Tyrosine kinase inhibitor
TSY	: Tam sitogenetik yanıt
TTP	: Time to progression
TTT	: Time to treatment
UM-IGHV	: Unmutated <i>IGHV</i> geni
VAF	: Variant allele frequency
VHR	: Çok yüksek riskli karyotip
vPh	: Varyant Ph
YND	: Yeni nesil dizileme

WBPS

: WHO classification-based Prognostic System

WHO

: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation)

KRONİK MYELOİD LÖSEMİ

1. BÖLÜM

Yazarlar:

Gülçin Günden

Beyhan Durak Aras



1. KRONİK MYELOİD LÖSEMİ

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) nün yaptığı myeloid maligniteler sınıflandırmasında kronik myeloid lösemi (KML) , myeloproliferatif neoplazmalar (MPN) grubu içinde yer almaktadır. Bu bölümde MPN grubunda yer alan hematolojik malignitelerden sadece KML'ye yer verilecektir.

Kronik myeloid lösemi, erişkin lösemilerin ~%15'ini oluşturan klonal hematopoetik kök hücre hastalığı olarak tanımlanmaktadır. Kronik myeloid lösemili olguların ortalama tanı yaşı 56 olarak bildirilmektedir. Kronik myeloid lösemide hematopoetik hücrelerin genomunda değişimler meydana gelmekte olup, bu değişimler, granülositlerin kemik iliğinde (Kİ) aşırı çoğalmasına sebep olmakta ve hastalarda splenomegali ve hiperlökositoz gelişmektedir. Sitogenetik seviyede ise, KML Philadelphia (Ph) kromozomunun varlığı ile karakterizedir [1].

1.1 TANI

Kronik myeloid lösemi tanı koymak için dirençli ve açıklanamayan lökositoz (veya nadiren trombositoz) gözlenmesi ve moleküler genetik, floresan in situ hibridizasyon (FISH) veya rutin konvensiyonel sitogenetik ile Ph kromozom aberasyonu tespit edilmesi gerekmektedir [2].

Kronik myeloid lösemi kronik faz, akselere faz ve blast faz olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır.

Kronik Faz

- Akselere ve blast faz özellikleri göstermeyen durum olarak kabul edilmektedir.

Akselere Faz

- Kan veya kemik iliğinde blastların oranı: %15-29 veya; %30 blast olan kan veya kemik iliğinde promiyelositler
- Kanda >%20 bazofil
- Terapiden bağımsız $<100 \times 10^9/L$ dirençli trombositopeni
- Ph pozitif [Ph(+)] hücrelerde [klonal sitogenetik aberasyon (KSA)/Ph(+)] klonal kromozom anomalilerin saptanması olarak tanımlanmaktadır.

Blast faz

- Kemik iliği veya kanda >%30 blast (veya WHO-HAEM5 göre >%20 blast)
- Dalak haricinde ekstramedüller blast proliferasyonunun saptandığı fazdır [3].

1.2 PROGNOSTİK GENETİK FAKTÖRLER VE ANALİZ YÖNTEMLERİ

1.2.1 Prognostik genetik faktörler

1.2.1.1 Kromozomal anomaliler

Philadelphia kromozomu, 9 ve 22. kromozomlar arasındaki dengeli resiprokal translokasyon [t(9;22)] sonucu oluşmakta ve KML hastalarının >%90'ında saptanmaktadır. Bu translokasyon sonucunda, kromozom 22'de lokalize breakpoint cluster region (BCR) ve kromozom 9'daki Abelson (ABL) proto-onkogeni füzyon gen oluşturmaktadır. Oluşan füzyon genin proteini, yüksek tirozin kinaz aktivitesi göstermekte ve tümöröenez sürecini başlatmaktadır [4].

Ayrıca, KML hastaları için Ph kromozomu tanı koydurucu olup, tyrosine kinase inhibitör (TKI) duyarlılığı nedeniyle de iyi prognostik bir belirteç olarak kabul edilmektedir.

Kronik myeloid lösemi hastalarının %5-10'unda Ph kromozomunun varyasyonları (vPh) tespit edilmektedir [5]. Bu vPh kromozomları one ve two step mekanizmalarıyla oluştuğu, bunun sonucunda ise basit ve kompleks yeniden düzenlemelerin meydana geldiği belirtilmektedir [6]. Kompleks yeniden düzenlenmeler, 9 ve 22. kromozomlara ek üçüncü bir kromozomun daha translokasyona dahil olmasıyla meydana gelmektedir. Kompleks yeniden düzenlenmeler içerdiği kromozom sayısına göre; 3'lü, 4'lü ve 5'li – yol olarak isimlendirilmektedir. Genellikle vPh kromozomları kötü prognozla ilişkilendirilmedikleri ve özellikle KML'nin kronik faz evresinde saptandıkları bilinse de, bazı yayınlarda TKI direncine neden oldukları bilinmektedir [5, 7].

Kronik myeloid lösemi hastalarının metafazlarında t(9;22), genellikle tek anomali olarak saptanmasına rağmen, hastaların %15'inde ek sitogenetik aberasyonlar (ESA) saptanmaktadır. Bu aberasyonlar genomik instabilite ve klonal evölüsyonla ilişkilendirildikleri için prognozu olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir. Ek sitogenetik aberasyonlar, en sık blast fazında gözlenmektedir. Özellikle, kronik faz KML hastalarında saptanan ESA'ların blast faz progresyonuna sebep olduğu belirtilmektedir. Bazı KML olgularında Ph negatif [Ph(-)] klonlarda, klonal sitogenetik aberasyonlar (KSA) saptanmaktadır. Klonal sitogenetik aberasyonlar da ESA'lar gibi klonal evölüsyona katkı sağlamakta ve prognozu olumsuz yönde etkilemektedirler. Bu aberasyonların TKI tedavisinden sonra geliştiği ifade edilmekte ve ileri evre KML hastalarında daha sık görüldüğü belirtilmektedir [8, 9].

1.2.1.2 Moleküler anomaliler

Kronik myeloid lösemide, *BCR* ve *ABL1* geninde kırıklar genellikle intronik bölgelerde meydana gelmektedir. *ABL1* gen kırık noktaları, özellikle ekson 1b (upstream) ve 1a (downstream) arasında; *BCR* kırıkları ise genellikle M-BCR bölgesinde olmaktadır. M-BCR, ekson e1 ve e2 arasında ya da e14 ve e15 arasından gerçekleşmektedir. Ayrıca KML'de nadir olarak meydana gelen m-BCR bölge kırığı ekson e1 ve e2; μ -BCR bölge kırığı ise ekson e9 ve e20 arasında olduğu görülmektedir. *BCR::ABL1* arasındaki bu rekombinasyonun, çeşitli hibrid mRNA üretimine sebep olduğu kabul edilmektedir. Örneğin M-BCR bölgesindeki kırık sonucunda b3a2 olarak isimlendirilen e14a2 (ekson 14 BCR ve ekson a2 ABL1) transkripti ve b2a2 olarak isimlendirilen e13a2 (ekson e13 BCR ve ekson a2 BCR) transkripti oluşmaktadır. Bu varyantlar, KML'de tipik p210 proteinini kodlamaktadır. m-BCR kırıkları sonucunda p190 proteinini kodlayan e1a2 transkriptini, u-BCR kırıkları ise p230 proteinini kodlayan e19a2 transkriptini oluşturmaktadır [10].

Bazı KML hastalarında, TKI'lara karşı direnç mekanizması gelişmektedir. Bu direnç mekanizması, *BCR::ABL1* geninde meydana gelen nokta mutasyonlarıyla ilişkilendirilmektedir. Özellikle, *BCR::ABL1* nokta mutasyonları TKI-dirençli KML hastalarının %12-63'ünde görülmektedir. KML hastalarında >90 farklı nokta mutasyonu tanımlanmıştır. Özellikle bu mutasyonlar T315, Y253, E255, M351, G250, F359, ve H396 gibi aminoasit lokalizasyonlarında meydana gelmektedir. Tirozin kinaz inhibitörü tedavisi sırasında yeni oluşan mutasyonlar, tam sitogenetik yanıt (TSY) kaybı; blast faz progresyon süresinin kısalması; kısa progresyonsuz sağkalım ve overall survival (OS) ile ilişkilendirilmektedir [11].

Konvansiyonel sitogenetik, moleküler sitogenetik ve moleküler tetkiklerin kullanılmasına yönelik bazı öneriler tablo 1.1'de yer almaktadır.

Tüm bunlara ek olarak KML hasta grubunda, tanı anında *BCR::ABL1* haricinde, birçok kanser çeşidi ile ilişkili genlerde de mutasyonlar (*ASXL1*, *RUNX1*, *IKZF1*, *TET1/2*, *IDH1/2*, *JAK2*, *DNMT3A/3B*, *EZH2*, *WT1*, *NPM1*, *NRAS*, *KRAS*, *CBL*, *BCOR*, *CREBBP*, *TP53*) saptanabilmektedir. Akselere veya blast

fazda olan KML hastalarında ise *IKZF1* ekson delesyonları ve *ASXL1*, *RUNX1* ve *BCOR* genlerinde mutasyonlar yüksek sıklıkta meydana gelmektedir. Fakat *IDH1/2* gen mutasyonlarının sıklığının düşük olduğu gözlenmiştir. *IKZF1* ve *RUNX1* varyantları hücre farklılaşmasını etkiledikleri için; kronik faz KML'den, blast faz KML'ye progresyonda önemli biyomarkerlar olarak bildirilmektedir. *BCR::ABL1* bağımsız gen mutasyonları, yeni nesil sekanslama (YND) ile myeloid gen mutasyon panelleri kullanılarak saptanabilmektedir.

1.2.2 Analiz yöntemleri

- Konvansiyonel sitogenetik analizlerin mutlaka tanı anında yapılması önerilmektedir. Özellikle tanıda, ESA'ların dışlanması için en az 20 metafaz plağının incelenmesi gerekmektedir.
- Kromozom analizinde vPh tespit edildiği zaman, floresan in situ hibridizasyon (FISH) ve quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) ile *BCR::ABL1* varlığının konfirmasyonu yapılmalıdır.
- *BCR::ABL1* FISH probu ile hızlı sonuç almak için direkt kültür veya yayma preparatlar kullanılabilir. Ayrıca daha güvenilir ve bilgilendirici sinyal paterni değerlendirmek için dual füzyon problemlerinin kullanımı önerilmektedir.
- FISH testi kriptik anomalileri dışlamak için önerilmekte olup, özellikle normal karyotip gözlenen vakalara ve/veya metafaz yetersiz olduğu durumda yapılması gerekmektedir.
- Tanı anında kemik iliği ve kan örneklerinde yapılan FISH analizlerinin yüksek oranda uyumluluk göstermesi sebebi ile analiz için iki numune de kullanılabilir (FISH çalışmalarının, kullanılan proba bağlı olarak %1-5 "yanlış pozitiflik" oranına sahip olduğu unutulmamalıdır).
- KML hastalarında FISH yöntemi ile *BCR::ABL1* tespit edilmezse, KML tanısının hala ekarte edildiği unutulmamalıdır. Bu yüzden RT-qPCR veya diğer myeloproliferatif hastalık (MPH) ile ilişkili mutasyonların değerlendirilmesi önerilmektedir.
- Sitogenetik olarak tedavi yanıtı; TSY alınana kadar 3, 6, ve 12. ay sonunda ve 20≤ metafaz ile değerlendirilmelidir. Fakat tanı anında ESA saptanan vakaların, tedaviye yanıtlarının olumsuz olacağından dolayı daha sık takip edilmeleri önerilmektedir.
- Hastalarda kriptik *BCR::ABL1* mevcutsa, mutlaka FISH ve moleküler yöntemlerle takibi yapılmalıdır. Sitogenetik ile TSY alınan vakaların takibi FISH ile yapılabilir. Fakat tanı anında, kriptik t(9;22) saptanması durumunda, FISH çalışması sonucunda tek füzyon sinyal paterni saptanan vakaların, FISH yöntemi ile takipleri konusunda dikkatli olunmalıdır. RT-qPCR metodu standardize ve International Scale (IS) göre ifade ediliyorsa; daha sonraki yanıt durumu sadece RT-qPCR ile değerlendirilir. Takip için, periferik kan örneklerinin tedavi yanıtının değerlendirilmesinde daha uygun olduğu bildirilmiştir.
- *BCR::ABL1* transkriptlerini saptamak için, RT-qPCR kullanılmaktadır. RT-qPCR, *BCR* ve *ABL1* splice bölgeyi amplifiye etmek için kullanılmaktadır. Ayrıca RT-qPCR, minimal rezidüel hastalığı (MRD) saptamada yüksek sensitivite göstermektedir. İlgili yöntemin, FISH ve sitogenetiğe göre 2 ve 3 log daha duyarlı olduğu belirtilmektedir (1/100.000 nükleus). Ayrıca National Institutes of Health (NIH) Consensus Group, KML hastalarında *BCR::ABL1* transkript düzeylerinin RT-qPCR izlenmesini standart hale getirmek için Uluslararası Ölçeğini (IS) oluşturmuşlardır.
- Analiz öncesindeki en önemli aşama, RNA ekstraksiyonunun kalitesidir. Ulaşılabilmesi durumunda RNA-stabilizasyonu sağlayan tüplerin kullanımı önerilmektedir. Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) tüpleri de rutinde sıklıkla kullanılmaktadır. Ekstraksiyon metoduna bağlı olarak RNA kalitesinin de değişkenlik göstereceği unutulmamalıdır.
- PCR dayalı yöntemlerde yanlış pozitif ve negatif sonuçlar alınabilmektedir. Yanlış-negatif sonuçların düşük-kalite RNA veya reaksiyon başarısızlığından; yanlış-pozitif sonuçların ise kontaminasyon kaynaklı olabileceği unutulmamalıdır. Ayrıca bazı örneklerdeki 0.5-1 log

farklılığı, prosedüre, örnek alınımına ve laboratuvar deneyimine bağlı olarak meydana gelebilmektedir [2, 12].

- *BCR::ABL1* mutasyonlarının saptanmasında direkt sekanslama (Sanger), Pyrosekanslama, mutasyon spesifik RT-qPCR, Liquefied bead array (Luminex) yöntemleri kullanılabilir [13]. Bu mutasyonların analizlerine yönelik öneriler tablo 1.1’de yer almaktadır.
- NOT: DNA ve RNA ölçüm belirsizliği ve yanlışlığı; örnek toplama, lökosit ve RNA preparasyon metodları, komplementer DNA sentezinde heterojenite, enzim, primer, kalibratör materyallerin seçimi ve IS dönüştürme metotları gibi durumlar göz önünde bulundurulmalıdır. Tanı anında hangi numune (Kİ veya periferik kan) kullanıldıysa takip sürecinde de aynı numune tercih edilmelidir [12].
- Hasta takibi sürecinde beklenen yanıtın alınamaması durumunda TKI mutasyonları için analizlerin gerçekleştirilmesi önerilmektedir.

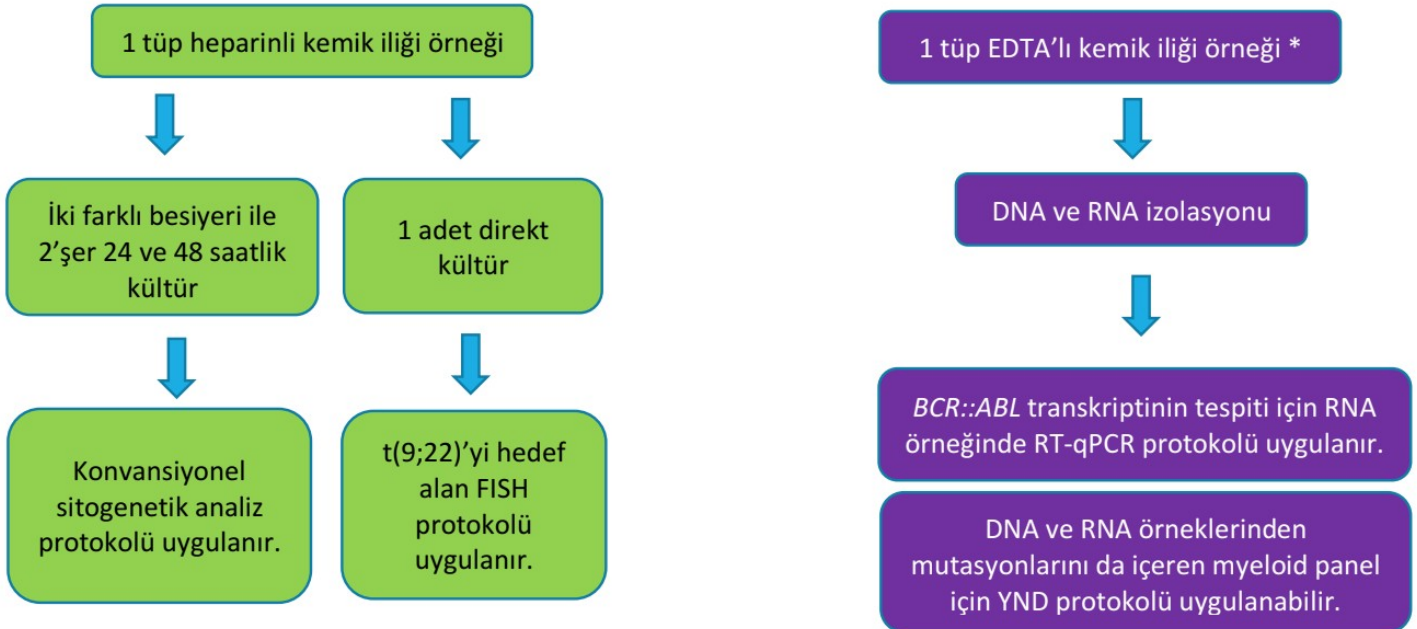
Tablo 1.1: KML tanı ve takibinde kullanılan genetik testlere yönelik öneriler (NCCN)

Test	Öneri
Kemik iliği sitogenetik	<ul style="list-style-type: none">• Tanıda• Yanıt aşamalarına ulaşmada başarısızlık durumunda• Hematolojik yanıt kaybında herhangi bir belirteç• Herhangi bir TSY kaybı veya <i>BCR::ABL1</i> transkriptinde >%1 artış olarak tanımlanan moleküler yanıt varlığında
IS kullanılarak RT-qPCR	<ul style="list-style-type: none">• Tanıda• İlk tedaviden sonra her 3 ayda bir yapılmalı. <i>BCR::ABL1</i> (IS) \leq%1 (MR2.0)² başarısına ulaşıldıktan sonra, 2 yıl süresince her 3 ayda ve daha sonra her 3-6 ay bir• Majör moleküler yanıt (MMY) ile <i>BCR::ABL1</i> transkript seviyesinde 1-log artış varsa, RT-qPCR 1-3 ayda bir tekrarlanmalı
<i>BCR::ABL1</i> kinaz domain mutasyon analizi	<ul style="list-style-type: none">• Kronik fazda• Yanıt aşamalarına ulaşamadığında• Hematolojik yanıt kaybında herhangi bir belirteç• Herhangi bir TSY kaybı belirtisi veya <i>BCR::ABL1</i> transkriptinde >%1 (MR2.0) artış olarak tanımlanan moleküler yanıt varlığında• MMY kaybı ve <i>BCR::ABL1</i> transkript seviyesinde 1-log artışında• Akselere veya blast fazında hastalık progresyonunda

Özet;

- KML'de Ph kromozomu tanısız öneme sahiptir. TKI'lar ile tedavi uygulanır.
- Ph kromozomlarının %5-10 kadarı varyant olarak gözlenmektedir. Prognostik etkileri ise tartışmalıdır.
- Ph kromozomlarına ek olarak sitogenetik anomali saptanabilmektedir ve bu anomaliler prognozu olumsuz etkilemektedir.
- *ABL* ve *BCR* genlerindeki kırıklar farklılık göstermekte olup, p230, p190 ve 210 proteinlerini kodlanmaktadır.
- TKI'ya karşı direnç geliştiren mutasyonlar KML vakalarının %12-63'ünde gözlenebilmektedir.
- *ASXL1*, *RUNX1*, *IKZF1*, *TET1/2*, *IDH1/2*, *JAK2*, *DNMT3A/3B*, *EZH2*, *WT1*, *NPM1*, *NRAS*, *KRAS*, *CBL*, *BCOR*, *CREBBP*, *TP53* gen mutasyonları da KML'de tanımlanmıştır.
- KML'de tanı anında muhakkak konvansiyonel sitogenetik test uygulanmalıdır. Sonuçlar FISH ya da RT-qPCR ile konfirme edilmelidir.
- Konvansiyonel sitogenetik test ile en az 20 metafaz örneği değerlendirilmelidir.
- FISH testi metafaz plağının yetersiz olduğu durumlarda da önerilmektedir. En az 100 hücre değerlendirilmelidir.
- FISH testinde *BCR::ABL1* tespiti için çift füzyon problemleri tercih edilmelidir.
- Konvansiyonel sitogenetik ve FISH testleri için heparinli tüplerde örnekler laboratuvara ulaştırılmalıdır.
- Konvansiyonel sitogenetik için kemik iliği örneklerinden 24-48 saatlik kültürler çalışmalıdır. FISH testi için daha hızlı sonuç almak için direkt kültür ya da yayma preparatları kullanılabilir.
- RT-qPCR yöntemi için kemik iliği ya da periferik kan örnekleri tercih edilebilir. Örnekler EDTA'lı tüpler içerisinde laboratuvara ulaştırılmalıdır.
- Ancak elde edilecek RNA kalitesi için RNA-stabilizasyonu sağlayan tüplerin kullanımı önerilmektedir.
- Tanı anında hangi örnek ile çalışıldıysa takiplerde de aynı çeşit örneklerin kullanımına özen gösterilmelidir.

KML TANILI HASTALARDA GENETİK TANI ALGORİTMASI



* EDTA'lı tüp yerine ulaşılabilmesi durumunda RNA-stabilizasyonu sağlayan tüpler tercih edilmelidir.

Kaynaklar

1. Qian, H., et al., *A review of the therapeutic role of the new third-generation TKI olverembatinib in chronic myeloid leukemia*. *Front Oncol*, 2022. **12**: p. 1036437.
2. Jabbour, E. and H. Kantarjian, *Chronic myeloid leukemia: 2022 update on diagnosis, therapy, and monitoring*. *Am J Hematol*, 2022. **97**(9): p. 1236-1256.
3. Hochhaus, A., et al., *European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia*. *Leukemia*, 2020. **34**(4): p. 966-984.
4. Benchikh, S., et al., *Chronic myeloid leukemia: cytogenetics and molecular biology's part in the comprehension and management of the pathology and treatment evolution*. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 2022. **23**(1): p. 29.
5. Chauffaille Mde, L., A.C. Bandeira, and A.S. da Silva, *Diversity of breakpoints of variant Philadelphia chromosomes in chronic myeloid leukemia in Brazilian patients*. *Rev Bras Hematol Hemoter*, 2015. **37**(1): p. 17-20.
6. Shetty, D., et al., *Evaluation of cytogenetic response in CML patients with variant Philadelphia translocation*. *Asia Pac J Clin Oncol*, 2022. **18**(1): p. 99-108.
7. Bennour, A., et al., *Molecular cytogenetic characterization of variant Philadelphia translocations in chronic myeloid leukemia: genesis and deletion of derivative chromosome 9*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2009. **194**(1): p. 30-7.
8. Krishna Chandran, R., et al., *Impact of Additional Chromosomal Aberrations on the Disease Progression of Chronic Myelogenous Leukemia*. *Front Oncol*, 2019. **9**: p. 88.
9. Işık, S., et al., *The Impact of Cytogenetic Aberrations in the Clonal Evolution of Chronic Myeloid Leukemia: A Single-Center Experience Among 450 Turkish Patients (Cohort Study)*. *Turk J Haematol*, 2022. **39**(4): p. 237-244.
10. Izzo, B., et al., *Monitoring Chronic Myeloid Leukemia: How Molecular Tools May Drive Therapeutic Approaches*. *Front Oncol*, 2019. **9**: p. 833.
11. Tadesse, F., et al., *Spectrum of BCR::ABL1 Mutations and Treatment Outcomes in Ethiopian Imatinib-Resistant Patients With Chronic Myeloid Leukemia*. *JCO Glob Oncol*, 2021. **7**: p. 1187-1193.
12. Arora, R. and R.D. Press, *Measurement of BCR::ABL1 transcripts on the International Scale in the United States: current status and best practices*. *Leuk Lymphoma*, 2017. **58**(1): p. 8-16.
13. Jones, D., et al., *Laboratory practice guidelines for detecting and reporting BCR::ABL1 drug resistance mutations in chronic myelogenous leukemia and acute lymphoblastic leukemia: a report of the Association for Molecular Pathology*. *J Mol Diagn*, 2009. **11**(1): p. 4-11.
14. Soverini, S., Hochhaus, A., Nicolini, F. E., Gruber, F., Lange, T., Saglio, G., ... & Martinelli, G. (2011). *BCR::ABL1 kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet*. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, **118**(5), 1208-1215.

MYELOPROLİFERATİF NEOPLAZMALAR

2. BÖLÜM

Yazarlar:

Gülçin Günden

Oğuz Çilingir



2. MYELOPROLİFERATİF NEOPLAZMALAR

Klasik Philadelphia kromozomu (Ph) negatif myeloproliferatif neoplazmalar (MPN), myeloid hematopoetik kök hücrelerin klonal neoplastik hastalığı olarak tanımlanmaktadır. Primer miyelofibrozis (PMF), esansiyel trombositoz (ET) ve polistemi vera (PV) MPN sınıfında yer almaktadırlar. Özellikle prefibrotik miyelofibrozisin ET ve miyelofibroze progrese olduğu gözlenmiştir. Myeloproliferatif neoplazmalar grubunda yer alan hastalıkların akut myeloid lösemiye transforme olduğu ve konvansiyonel terapiye direnç gösterdiği bilinmektedir [1].

2.1 TANI VE SINIFLANDIRMA

Myeloproliferatif neoplazmalar (MPN)'ların sınıflandırılmasında Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nun son güncellemesinde majör değişiklikler yer almamaktadır. Yeni WHO (5. Baskı) sınıflandırmasına göre MPN sınıflandırması tablo 2.1'de yer almaktadır. [2]

Tablo 2.1: Myeloproliferatif neoplazmalar

Kronik myeloid lösemi
Polistemia vera
Esansiyel trombositoz
Primer miyelofibrozis
Kronik nötrofilik lösemi
Kronik eozinofilik lösemi
Juvenil myelomonositik lösemi
MPN NOS (MPN başka şekilde tanımlanmayan)

Bu bölümde *BCR::ABL1* negatif MPN incelenmiş olup, kronik myeloid lösemiye bölüm 1'de ayrıntılı yer verilmiştir.

BCR::ABL1 negatif MPN sınıflandırması polistemia vera (PV), esansiyel trombositoz (ET) ve primer miyelofibrozis (PMF) arasında ayırım yapmaya dayanır ve bu tanımlar arasındaki ayırım periferik kan bulguları, moleküler veriler ve kemik iliği (Kİ) morfolojik bulgularının birlikte değerlendirilmesini gerektirir. Bu parametrelerin hiçbiri tek başına tanısal bir özgüllüğe sahip değildir [2]. Myeloproliferatif hastalık tanısı için WHO kriterleri tablo 2.2'de yer almaktadır.

Juvenil myelomonositik lösemi (JMML) erken çocukluk döneminde gözlenen hematopoietik kök hücre kaynaklı bir myeloproliferatif neoplazmadır. Vakaların en az %90'unda RAS yolağında bir kontrolsüz aktivasyon söz konusudur. Juvenil myelomonositik lösemi tanısı için *KMT2A* yeniden düzenlenmelerinin ve monozomi 7'nin hariç tutulması gereklidir. Ayrıca RAS yolağını aktive eden gen mutasyonlarının araştırılması gerekmektedir. RAS yolağını aktive eden gen mutasyonları genellikle *PTPN11*, *NRAS*, *KRAS*, *NF1* veya *CBL* genlerinde tespit edilmektedir. *PTPN11* ve *NF1* mutasyonu pozitif vakaların klinik bulguları çok daha agresif seyretmektedir [2, 3].

2.2 PROGNOSTİK GENETİK FAKTÖRLER VE ANALİZ YÖNTEMLERİ

Literatürde, MPN için kromozomal aberasyonların değil, gen mutasyonlarının daha ön planda olduğu görülmektedir. Myeloproliferatif neoplazmalarda sıklıkla saptanan mutasyonlar hastalık için sürücü özellikte olup, prognoza katkısı göz ardı edilemeyecek düzeydedir. Ayrıca ilgili gen mutasyonlarının hastalık alt tiplerine göre sıklığının değiştiği de bilinmektedir [1].

Tablo 2.2: MPN'de diagnostik WHO kriterleri

PV (polistemia vera)	
Majör kriterler	<ol style="list-style-type: none">1. Hemoglobin >16,6 g/dL (erkek) Hemoglobin >16.0 g/dL (kadın) veya, Hematokrit > %49 (erkek) Hematokrit >48 (kadın) veya, Artmış red cell mass (RCM)12. Hipersellüler kemik iliği (eritrosit, granülosit, matür megakaryosit)3. <i>JAK2V617F</i> ya da <i>JAK2</i> ekson 12 mutasyon varlığı
Minör kriterler	Normalin altında serum eritropoetin seviyesi
PV tanısı için 3 majör kriter ve ya ilk 2 majör kriter ve minör kriterin karşılanması gerekmektedir.	
ET (esansiyel trombositoz)	
Majör kriter	<ol style="list-style-type: none">1. Platelet sayısı $\geq 450 \times 10^9/L$2. Kemik iliğinde megakaryosit proliferasyonu3. <i>BCR-ABL+</i> KML, PV PMF, MDS veya diğer myeloid neoplazmalar için WHO kriterlerini karşılamaması4. <i>JAK2</i>, <i>CALR</i> veya <i>MPL</i> mutasyonu
Minör kriter	Klonal marker varlığı veya Reaktif trombositoz kanıtının olmaması
ET tanısı için 4 majör kriterin veya ilk 3 majör kriter ve minör kriterin karşılanması gerekmektedir.	
prePMF (prefibrotik primer myelofibrosis)	
Majör kriterler	<ol style="list-style-type: none">1. Megakaryosit proliferasyonu, retikulin fibrosis >grade 1 olmaksızın, artmış kemik iliği sellüleritesi, granülosit proliferasyonu, sıklıkla azalmış eritropoez2. <i>BCR-ABL+</i> KML, PV PMF, MDS veya diğer myeloid neoplazmalar için WHO kriterlerini karşılamaması3. <i>JAK2</i>, <i>CALR</i> veya <i>MPL</i> mutasyonu varlığı veya bu mutasyonların yokluğunda, başka klonal marker¹ veya minör reaktif kemik iliği retikulin fibrosis yokluğu
Minör kriterler	<ol style="list-style-type: none">1. Komorbid şartı olmayan anemi2. Lökositoz $\geq 11 \times 10^9/L$3. Ele gelen splenomegali4. Laktat dehidrogenaz artışı
prePMF tanısı için tüm majör kriterlerin ve en az 2 minör kriterin karşılanması gerekmektedir.	
¹ Üç majör klonal mutasyonun yokluğunda (triple negatif) en sık eşlik eden mutasyonların (<i>ASXL1</i> , <i>EZH2</i> , <i>TET2</i> , <i>IDH1/IDH2</i> , <i>SRSF2</i> , <i>SF3B1</i>) araştırılması hastalığın klonitesinin tespit edilmesini sağlar.	
Overt PMF (fibrotik primer myelofibrosis)	
Majör kriterler	<ol style="list-style-type: none">1. Retikulin ve/veya kollajen fibrosis grade 2 veya 3'ün eşik ettiği megakaryositik proliferasyon ve atipi varlığı2. <i>BCR-ABL+</i> KML, PV PMF, MDS veya diğer myeloid neoplazmalar için WHO kriterlerini karşılamaması3. <i>JAK2</i>, <i>CALR</i> veya <i>MPL</i> mutasyonu varlığı veya bu mutasyonların yokluğunda, başka klonal marker veya reaktif myelofibrosis varlığı
Minör kriterler	<ol style="list-style-type: none">1. Komorbid şartı olmayan anemi2. Lökositoz $\geq 11 \times 10^9/L$3. Ele gelen splenomegali4. Laktat dehidrogenazın normal değer üzerinde olması5. Lökoeritoblastozis
Overt PMF tanısı için majör kriterlerin tümünün ve en az bir minör kriterin karşılanması gerekmektedir.	

2.2.1 Prognostik genetik faktörler

Janus Kinaz-2 (JAK2) V617F mutasyonları, PV hastalarının büyük bir çoğunluğunda (>%90) ve ET, MF hastalarının %60'ında mevcuttur. *JAK2* geninde ekzon 12'de nadir delesyonlar ve insersiyonlar da görülmektedir. *JAK2* ekzon 12 mutasyonları PV hastalarının %2-3'ünde tespit edilmektedir.

Trombopoietin genindeki (*MPL W515L/K*) aktive edici mutasyonlar MF olan hastaların ~ %5-8 ve ET olan hastaların ~ %1-4'ünde rapor edilmiştir.

Calreticulin geninde (*CALR*) ekzon 9'da saptanan çerçeve kayması mutasyonları ET ve MF hastalarının ~ %20-35'inde (*JAK2-MPL* negatif ET ve MF olan hastaların % 60-80'inde) saptanmıştır. Tip 1 (52 bp delesyonlar) ve Tip 2 (5 bp insersiyonlar) en sık görülen varyantlar olarak belirtilmektedir. *CALR*-Tip 1 mutasyonları MF'de görülürken, *CALR*-Tip 2 mutasyonları ise ET hastalarında gözlenmektedir.

Myelofibrosis (MF)'de genetik faktörler

CALR mutasyonları *JAK2V617F* veya *MPLW515* mutasyonlarından daha iyi bir OS ile ilişkilidir.

MPL mutasyonları tanıda daha yüksek hemoglobin düzeyi ve artmış transfüzyon bağımlılığı ile ilişkilidir. Triple negatif mutasyon durumu (3 driver mutasyon – *JAK2*, *CALR* veya *MPL*) MF hastalarının yaklaşık %10'unda meydana gelmekte ve MF olgularında kötü prognozla ilişkilendirilmektedir.

ASXL1, *EZH2*, *SRSF2*, *TP53*, *IDH1*, *IDH2*, ve *U2AF1* mutasyonları çok yüksek risk (HMR) mutasyonları olarak kabul edilmekte ve kısa OS ve olaysız yaşam süresi ile ilişkilendirilmektedirler. *ASXL1*, *EZH2*, *SRSF2* ve *RAS* mutasyonları yaşam süresi için prediktif özellikte iken, *ASXL1*, *SRSF2*, *IDH1/2* mutasyonları lösemi transformasyonu için prediktiftir.

TET2 ve *TP53* mutasyonları ise en kötü yaşam süresi ve artmış lösemi transformasyon oranı ile ilişkilidir. *U2AF1* mutasyonları ise PMF'de düşük yaşam süresi ile ilişkilidir [4].

Polistemia vera (PV) ve esansiyel trombositoz (ET)'de genetik faktörler

JAK2 ekzon 12 mutasyonu pozitif PV, *JAK2 V617F* mutasyonu pozitif PV'ye göre, tanıda, yüksek hemoglobin seviyesi ve düşük trombosit ve lökosit sayısı ile ilişkilidir. Ancak her iki mutasyon da benzer trombozis, MF'ye veya lösemiye transformasyon ve ölüm oranlarına sahiptirler.

CALR mutasyonu pozitif ET ise *JAK2* mutant ET'den daha genç yaş, erkek cinsiyet, yüksek trombosit sayısı, düşük hemoglobin, düşük lökosit oranı ve düşük trombozis oranı ile karakterizedir. Ancak *MPL* mutasyonu daha fibrotik transformasyon için daha yüksek risk oranı ile ilişkilidir. *CALR* mutasyonlarının OS, myelofibrozis veya lösemik transformasyon üzerinde bir etkisi yoktur.

International Prognostic Scoring System (IPSS), DIPSS ve DIPSS-Plus MF hastalarında risk değerlendirmesinde en sık kullanılan üç prognostik skorlama sistemidir. Mutation-Enhanced International Prognostic Scoring System 70 (MIPSS70), MIPSS70-Plus, ve Genetically Inspired Prognostic Scoring System (GIPSS) gibi sitogenetik ve mutasyon durumlarını değerlendiren prognostik skorlama sistemleri risk sınıflandırmasının iyileştirilmesi için geliştirilmiştir.

IPSS sadece tanı anında kullanılırken, DIPSS dinamik bir modeldir ve hastalık evresinin herhangi bir noktasında kullanılabilir.

PMF'de risk sınıflandırması için MIPSS70 ve MIPSS70 plus 2.0 tercih edilmektedir.

Moleküler testlerin yokluğunda tedavi zamanı DIPSS-Plus kullanılması önerilmektedir. Ayrıca karyotip sonucuna ulaşılamıyorsa DIPSS kullanılması önerilmektedir.

Post PV veya post ET MF durumunda Myelofibrosis Secondary to PV and ET-Prognostic Model (MYSEC-PM) risk sınıflandırılmasının kullanılması önerilmektedir.

DIPSS, platelet sayısı $<100 \times 10^9/L$, RBC transfüzyon ihtiyacı ve kötü prognostik karyotipin dahil edilmesi ile DIPSS-plus geliştirilmiştir. Kötü prognostik etkisi olarak kabul edilen sitogenetik anomaliler kompleks karyotip saptanması veya trizomi 8, delesyon 7, monozomi 7, delesyon 5q, monozomi 5, delesyon 12p, inversiyon 3 veya 11q23 yeniden düzenlenmelerinden bir veya ikisinin saptanması durumu olarak tanımlanmaktadır.

MIPSS70-plus 2.0'de ise HMR mutasyonları arasında yer alan *U2AF1* Q157 mutasyonu içeren, çok yüksek riskli karyotip (VHR) de değerlendirmeye dahil edilmektedir. Çok yüksek risk karyotip olarak tanımlanan anomaliler, tek yada multiple olarak -7, i(17q), inv(3)/3q21, 12p-/12p11.2, 11q-/11q23 ve trizomi 8 ve 9 haricindeki diğer otozomal trizomileri kapsamaktadır.

GIPSS ise hem sitogenetik hem de moleküler anomalileri risk sınıflandırmasına dahil etmektedir. Kötü risk karyotip, VHR karyotip, tip1/like *CALR* mutasyonu yokluğu ve *ASXL1*, *SRSF2* veya *U2AF1* Q157 mutasyon saptanması durumu azalmış sağkalım belirteci olarak kabul edilmektedir.

2.2.2 Analiz yöntemleri

Myeloproliferatif neoplazma şüphesinde başlangıç olarak klinik muayenenin yanı sıra tam kan sayımı, serum LDH düzeyi, karaciğer fonksiyon testleri gibi biyokimyasal testlerin yapılması gerekmektedir.

- Başlangıçta kronik myeloid lösemi tanısını dışlamak için floresan in-situ hibridizasyon (FISH) veya moleküler olarak periferik kan örneğinden t(9;22) analiz edilir. Varyant Ph saptanmasına olanak vermesi açısından FISH testinin spesifitesi RT-PCR'a göre daha iyidir. Yöntem tercihi merkezlerin deneyimlerine ve tercihlerine göre değişkenlik göstermektedir.
- Ayrıca varyant Ph kromozomu ve ek sitogenetik anomalilerin tespit edilebilmesi için konvansiyonel sitogenetik testler de uygulanmalıdır.
- Tüm hastalarda moleküler test açısından ilk önce *JAK2V617F* mutasyonunun analizi önerilmektedir.
- *JAK2V617F* mutasyonunun negatif çıkması durumunda ET ve MF şüphesi olan hastalarda *CALR* ve *MPL* mutasyonları analiz edilmelidir.
- *JAK2V617F* mutasyonunun negatif çıkması durumunda PV şüphesi olan hastalarda ise *JAK2* ekson 12 mutasyonları analiz edilmelidir.
- Bu analizler için PCR'a dayalı yöntemler kullanılabilir.
- Alternatif olarak, *JAK2*, *CALR* ve *MPL*'yi de içeren multigen YND panelleri tüm hastalar için başlangıçta çalışılabilir (Bknz bölüm 9).
- *V617F* mutasyonunun allelik yükünün değerlendirilmesi ve takibi özellikle hastalığın şiddeti (trombotik durum ve sekonder MF progresyon riski) ve fenotipik prezentasyon hakkında bilgi vericidir. İlgili mutasyonun düşük allel yükü olumlu prognostik faktör olarak yorumlanmaktadır. Tedavi seçeneklerine yanıt açısından yol gösterici olmamakla birlikte allel yükü takibinin yapılması miyelo fibrotik transformasyon açısından bilgi verici olduğu düşünülmektedir [4].
- *CALR* mutasyon allel yükü ve hasta fenotipi arasında bir ilişki olduğu gözlenmiştir. Özellikle *CALR* allel yükü, lökosit ve trombosit sayısı, hemoglobin ve laktat dehidrogenaz seviyeleriyle ilişkili bulunmuştur [5].

Tüm bu testlerin uygulanması konusundaki bazı öneriler;

- *JAK2*, *CALR*, ve *MPL* sürücü genlerinin analizi için periferik kan örneği kullanılmalıdır.
- Multi-target ve YND yöntemleri ost-effective olduğu için Sequential single-target assays tercih edilmektedir.
- Tabloda özetlenen genlerin tümör yüklerinin prognostik olarak yararlı olmadığı için raporlanması gerekmektedir. Fakat düşük allel frekansının raporlanması (<%1 *JAK2V617F*) önemlidir. *JAK2V617F* düşük seviyeleri ve MPN fenotipi mevcut ise *CALR* ve *MPL* taraması yapılmalıdır (Tablo 2.3).
- Spesifik *CALR* mutasyonları (Tip 1, 52-bp delesyon; Tip 2, 5-bp insersiyon; Tip-1 benzeri, ve Tip 2-benzeri) PMF'deki prognostik değerlerinden dolayı rutin olarak raporlanmalıdır.
- Rutin taramadaki *JAK246/1* haplotipi veya *TERT* polimorfizmlerinin klinik değeri olmadığı, sadece MPN'ye zayıf bir yakınlıkla ilişkili oldukları unutulmamalıdır.
- *JAK2*, *CALR* ve *MPL* taramalarının dirençli eritrositoz veya trombositozu olan hastalarda planlanması önerilmektedir (Grade 1B).

Tablo 2.3: *JAK2*, *MPL* ve *CALR* mutasyonlarının klinik bulgulara göre sıklığı

Klinik	Varyant	Sıklık
ERİTROSİTOZ	<i>JAK2V617F</i>	%96-97 PV
	<i>JAK2</i> ekzon 12 mutasyonları	~%3 PV
TROMBOSİTOZ	<i>JAK2V617F</i>	%50-60 ET
	<i>CALR</i> ekzon 9 mutasyon	%25-30 ET
	<i>MPL</i> ekzon 10 mutasyon	%3-11 ET
	<i>BCR::ABL1</i> füzyon	KML'yi dışlamak için
ŞÜPHELİ PMF	<i>JAK2V617F</i>	%50-60 PMF
	<i>CALR</i> ekzon 9 mutasyon	%15-35 PMF
	<i>MPL</i> ekzon 10 mutasyon	%6-9 PMF
ŞÜPHELİ KML	<i>BCR::ABL1</i> füzyon	%100 KML

Klinik duruma göre ;

- Ek somatik sürücü varyantların frekanslarının, PMF veya sekonder MF ve/veya diğer MPN veya MDS/MPN blast fazında yüksek olduğu bilinmektedir. National Genomic Test Directories göre en küçük ölçekli panellerde dahi nokta genlerin dahil edilmesi gerekmektedir. Bu genler *KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *JAK2*, *CALR*, *MPL*, *ASXL1*, *CBL*, *CHEK2*, *CSF3R*, *CUX1*, *DNMT3A*, *EZH2*, *IDH1*, *IDH2*, *IKZF1*, *KIT*, *NFE2*, *SF3B1*, *SH2B3*, *SRSF2*, *TET2*, *U2AF1*, *HRAS*, *RUNX1*, *SETBP1*, ve *ZRSR2* olarak belirlenmiştir (multi-panel YND).
 - Driver mutasyonları negatif olup, klinik şüphesi devam eden MPN olgularında; Kİ histolojisi ve klinik özellikler olan hastalarda myeloid panel ve sitogenetik analiz yapılması önerilmektedir [4].
- Sitogenetik testler;
- Myeloid neoplazilerde sitogenetik analizin, Kİ dokusunda yapılması gerekmektedir.
 - Hücre kültürü temelli yöntemlerde anti-koagülan tüpler olarak heparinli tüpler tercih edilmektedir. Numuneler aspirasyon sonrası en geç 24 saat içinde ulaştırılmalı ve Kİ örneği minimum 0.5-1 ml olmalıdır.

- Özellikle eozinofili görülen myeloid neoplazilerde *PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR1* gen yeniden düzenlemeleri veya *PCM1-JAK2* yeniden düzenlenmesini belirlemek için FISH yöntemi (ya da RT-PCR) kullanılabilir.

2.3 MPN'DE TEDAVİ

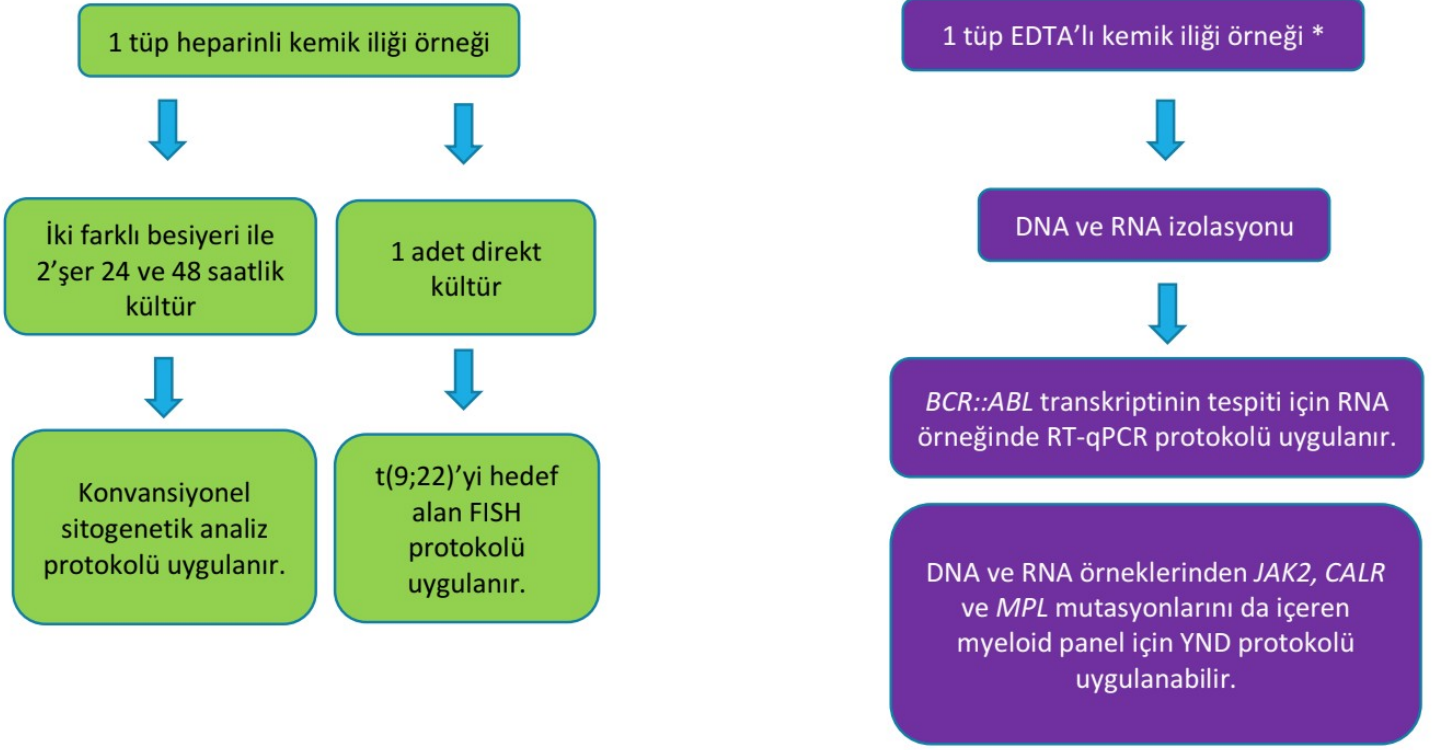
Janus Kinaz-2 mutasyonlarının saptanması durumunda *JAK1* ve *JAK2* inhibitörü olarak etki gösteren ticari ilaçlar tedavide kullanılmaktadır. Yine platelet sayısı $<50 \times 10^9/L$ olan orta ya da yüksek risk MF hastalarında kullanılmak üzere *JAK2*, *FLT3* ve *IRAK1* inhibitörü olan bir ilaç the U.S. Food and Drug Administration (FDA) tarafından onay almıştır.

Tedavi planlamasında, HMR mutasyonlarının saptanması PMF hastalarına allojenik kök hücre transplantasyonu ile ilgili karar vermede etken olabilir [4].

Özet;

- *JAK2V617* mutasyonları PV olgularının %90'ında, ET ve PMF hastalarının %60'ında tespit edilmektedir.
- *JAK2* ekson 12 mutasyonları PV olgularının %2-3'ünde gözlenmektedir.
- *MPL* genindeki mutasyonlar PMF hastalarının %5-8'inde ve ET hastalarının %1-4'ünde saptanmaktadır.
- *CALR* mutasyonları ise ET ve MF hastalarının %20-35'inde gözlenmektedir.
- MF'de *CALR* mutasyonları daha iyi bir OS ile ilişkilidir.
- *JAK2*, *CALR* ve *MPL* gen mutasyonlarının negatif olması (triple negatif) MF'de kötü prognoz ile ilişkilidir.
- *TET2*, *TP53* ve *U2AF1* mutasyonları MF'de kötü prognoz ile ilişkilidir.
- *JAK2* ekson 12 ve *JAK2V617F* mutasyonlarının PV'de MF'ye veya lösemiye dönüşüm ve ölüm oranları ile ilişkileri benzerdir.
- *CALR* mutasyonlarının ET üzerinde OS, MF veya lösemiye dönüşüm açısından etkisi yoktur.
- Prognostik sınıflandırmada IPSS, MIPSS70, MIPSS70-PLUS, GIPSS gibi skorlama sistemleri kullanılmaktadır.
- Tanı anında KML'yi dışlamak için FISH ya da RT-PCR yöntemi ile t(9;22) analiz edilir.
- Varyant Ph veya ek sitogenetik anomalilerin tespitinin yapılabilmesi için tanı anında Kİ örneğinden konvansiyonel sitogenetik testler de önerilmektedir.
- Tüm hastalarda ilk önce *JAK2V617* mutasyonunun analizi gerçekleştirilmelidir.
- *JAK2V617F* mutasyonlarının negatif çıkması durumunda ET ve MF şüphesi olan vakalarda *CALR* ve *MPL* mutasyon analizleri, PV vakalarında ise *JAK2* ekson 12 mutasyon analizleri önerilmektedir.
- Ayrıca vakalarda *KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *JAK2*, *CALR*, *MPL*, *ASXL1*, *CBL*, *CHEK2*, *CSF3R*, *CUX1*, *DNMT3A*, *EZH2*, *IDH1*, *IDH2*, *IKZF1*, *KIT*, *NFE2*, *SF3B1*, *SH2B3*, *SRSF2*, *TET2*, *U2AF1*, *HRAS*, *RUNX1*, *SETBP1*, ve *ZRSR2* genlerini içeren panellerle YND analizlerinin planlanması önerilmektedir.

MPN TANILI HASTALARDA GENETİK TANI ALGORİTMASI



* EDTA'lı tüp yerine ulaşılabilmesi durumunda RNA-stabilizasyonu sağlayan tüpler tercih edilmelidir.

Kaynaklar

1. Greenfield, G., M.F. McMullin, and K. Mills, *Molecular pathogenesis of the myeloproliferative neoplasms*. J Hematol Oncol, 2021. **14**(1): p. 103.
2. Khoury, J.D., et al., *The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms*. Leukemia, 2022. **36**(7): p. 1703-1719.
3. Mayerhofer, C., C.M. Niemeyer, and C. Flotho, *Current Treatment of Juvenile Myelomonocytic Leukemia*. J Clin Med, 2021. **10**(14).
4. Gerds, A.T., et al., *Myeloproliferative Neoplasms, Version 3.2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology*. J Natl Compr Canc Netw, 2022. **20**(9): p. 1033-1062.
5. Palumbo, G.A., et al., *The Role of New Technologies in Myeloproliferative Neoplasms*. Front Oncol, 2019. **9**: p. 321.

MYELODİSPLASTİK NEOPLAZMALAR

3. BÖLÜM

Yazarlar:

Sevgi Işık

Beyhan Durak Aras



3. MYELODİSPLASTİK NEOPLAZMALAR

Eski adıyla myelodisplastik sendrom olarak bilinen myelodisplastik neoplazmalar (MDS) kemik iliği kök hücrelerinin normal kan hücrelerine dönüşmemesi ile karakterize bir hastalıktır. Myelodisplastik neoplazmaların akut myeloid lösemi (AML)'ye dönüşüm riski yüksektir ve MDS'de %37 oranında 5 yıllık sağkalım bildirilmektedir [1].

3.1 TANI VE SINIFLANDIRMA

Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün MDS sınıflandırmasında yaptığı en son güncellemesinde (5. baskı) MDS'nin myelodisplastik neoplazmalar olarak isimlendirilmeleri neoplastik yapılara vurgu yapmakta ve myeloproliferatif neoplazmalar (MPN) ile terminolojiyi uyumlu hale getirmektedir. Bu yeni sınıflandırmada MDS genetik anomalilere ve morfolojik özelliklere göre sınıflandırılmaktadır (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: Myelodisplastik neoplazmaların sınıflandırılması ve tanımlayıcı özellikleri

	Blast	Sitogenetik	Mutasyon
Genetik anomaliler tanımlanan MDS			
Düşük blast oranı ve izole 5q delesyonu olan MDS (MDS-5q)	<5% Kİ ve <2% PK	İzole 5q delesyonu, ya da monozomi 7/ delesyon 7q hariç 1 diğer anomali	
Düşük blast oranı ve <i>SF3B1</i> mutant MDS ¹ (MDS- <i>SF3B1</i>)		5q delesyonu, monozomi 7 ya da kompleks karyotip olmaması	<i>SF3B1</i>
Bilallelik <i>TP53</i> inaktive MDS (MDS-bi <i>TP53</i>)	<20% Kİ ve PK	Genellikle kompleks karyotip	2 ya da daha fazla <i>TP53</i> mutasyonu ya da <i>TP53</i> kopya sayısı kaybı veya CNLOH'a sebep olan 1 mutasyon
Morfolojik olarak tanımlanan MDS			
Low blasts MDS (MDS-LB)	<5% Kİ ve <2% PK		
Hypocellular MDS ² (MDS-h)			
Increased blasts MDS (MDS-IB)			
MDS-IB1	5-9% Kİ ya da 2-4% PK		
MDS-IB2	10-19% Kİ ya da 5-19% PK ya da Aurer rod		
Fibrosis MDS (MDS-F)	5-19% Kİ; 2-19% PK		
¹ : ≥%15 halka sideroblastlarının saptanması, <i>SF3B1</i> mutasyonunun yerine geçebilir. Kabul edilebilir ilgili terminoloji: Düşük blast oranı ve halka sideroblastlı MDS. ² : yaşa göre, ≤25% kemik iliği selülaritesi Kİ: kemik iliği, PK: periferik kan, CNLOH: copy neutral loss of heterozygosity			

Sınıflandırmada yapılan yeni güncellemelerde, MDS-5q sınıfında herhangi bir değişiklik yapılmamıştır. *SF3B1* veya *TP53* mutasyonları (çoklu vuruş olmayan) MDS-5q olarak sınıflandırmayı etkilememektedir.

MDS-IB ve AML ayırımının yapılmasında, blast oranının belirlenmesindeki bazı zorluklar ve bir standardizasyon olmadığı için birçok risk söz konusudur. Bu sebeple genetik anomalileri tanımlayarak AML türleri için blast eşik değerleri ortadan kaldırılmıştır ve sadece MDS'yi AML'den ayırmak için %20 blast eşik değeri kabul edilmiştir. Ayrıca MDS-IB2, terapötik değerlendirmeler ve klinik araştırma çalışmalarında AML eşdeğeri olarak kabul edilebileceği belirtilmiştir [1].

Biyolojik olarak childhood MDS (cMDS), yetişkinlerde gözlenenden farklıdır ve patogenezinin daha fazla aydınlatılması gerekmektedir. Sınıflandırmada yapılan güncelleme ile childhood MDS with low blasts (cMDS-LB) terimi refrakter sitopeninin (RCC) yerini almıştır (Tablo 3.2) [1].

Tablo 3.2: Çocukluk çağı myelodisplastik neoplazmalar (MDS)

	Blast
Düşük blast oranı olan çocukluk çağı MDS	<%5 Ki, <%2 PK
Hiposellüler	
Başka şekilde belirlenmeyen (NOS)	
Yüksek blast oranı olan çocukluk çağı MDS	%5-19 Ki, %2-19 PK
Ki: kemik iliği, PK: periferik kan	

Çocukluk çağı MDS'de tanı konulabilmesi için öncelikle enfeksiyonlar, yetersiz beslenme, metabolik hastalıklar, kemik iliği yetmezliği sendromları ve germline patojenik varyantların sebep olduğu, neoplastik olmayan sitopenilerin dışlanması gerekmektedir.

3.2 PROGNOTİK GENETİK FAKTÖRLER VE ANALİZ YÖNTEMLERİ

3.2.1 Prognostik genetik faktörler

Myelodisplastik neoplazmalarda oldukça fazla genetik anomalinin tanımlanması ile bu anomalilerin prognostik etkileri de açığa kavuşturulmuştur. Prognostik sınıflandırmada bu genetik anomaliler de rol almaktadır.

International Prognostic Scoring System (IPSS) tedavi edilmemiş, yetişkin hastaların prognozlarını değerlendirmek için önemli bir standarttır. Revised-IPSS sisteminde de (IPSS-R) sitogenetik veriler, blast oranları ve sitopeniler önemlerini korumaktadırlar. Sitogenetik anomaliler IPSS-R'de 5 prognostik grup altında toplanmaktadır; çok iyi, iyi, orta, kötü, çok kötü (Tablo 3.3) [2].

Tablo 3.3: MDS sitogenetik skorlama sistemi

Prognostik alt grup	Sitogenetik anomaliler
Çok iyi	-Y, del(11q)
İyi	Normal, del(5q), del(12p), del(20q), çift del(5q)
Orta	del(7q), +8, +19, i(17q), herhangi 1 ya da 2 bağımsız klon
Kötü	-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), -7 ve del(7q), kompleks: 3 anomali
Çok kötü	Kompleks:>3 anomali
Del: delesyon, -:monozomi	

Bunların yanı sıra WHO classification-based Prognostic System (WBPS) de kullanılmaktadır. Burada da normal karyotip, izole Y kaybı, izole 5q ya da 20q delesyonu iyi, kromozom 7 anomalileri ve 3'den fazla anomali olarak tanımlanan kompleks karyotip kötü ve diğer sitogenetik anomaliler [t(8;21), inv(16), t(15;17) hariç] orta prognostik faktör olarak sınıflandırılmaktadır [3].

Yeni nesil dizi analizi teknolojinin gelişmesi ile MDS'de moleküler düzeyde çok sayıda anomali tanımlanmış olup, bu anomalilerin de prognostik etkileri açığa kavuşmaya başlamıştır. Molecular-International Prognostic Scoring System (IPSS-M) moleküler düzeyde tanımlanan genetik anomalileri göz önünde bulundurarak bir risk sınıflandırması sunmaktadır (<https://mds-risk-model.com/>). Bu sınıflandırmada yer alan mutasyonlar tablo 3.4'de yer almaktadır [3].

Tablo 3.4: IPSS-M prognostik risk şemasında yer alan gen mutasyonları

Ana etki genleri	Rezidüel genler
<i>TP53^{multi}</i>	<i>BCOR</i>
<i>MLL^{PTD}</i>	<i>BCORL1</i>
<i>FLT3</i>	<i>CEBPA</i>
<i>SF3B1^{5q}</i>	<i>ETNK1</i>
<i>NPM1</i>	<i>GATA2</i>
<i>RUNX1</i>	<i>GNB1</i>
<i>NRAS</i>	<i>IDH1</i>
<i>ETV6</i>	<i>NF1</i>
<i>IDH2</i>	<i>PHF6PPM1D</i>
<i>CBL</i>	<i>PRPF8</i>
<i>U2AF1</i>	<i>PTPN11</i>
<i>SRSF2</i>	<i>SETBP1</i>
<i>DNMT3A</i>	<i>STAG2</i>
<i>ASXL1</i>	<i>WT1</i>
<i>KRAS</i>	
<i>SF3B1^α</i>	
<i>SF3B1^{5q}</i> : <i>SF3B1</i> mutasyonu + 5q delesyonu ya da bir diğer anomali [-7/del(7q) hariç] <i>SF3B1^α</i> : <i>SF3B1</i> mutasyonu fakat <i>BCOR</i> , <i>BCORL1</i> , <i>RUNX1</i> , <i>NRAS</i> , <i>STAG2</i> , <i>SRSF2</i> mutasyonları veya del(5q) negatif	

Myelodisplastik neoplazmalarda sıklıkla saptanan ancak negatif olma durumlarında MDS tanısını dışlamayan bazı somatik mutasyonların meydana geldiği genler ve prognostik etkileri aşağıda listelenmiştir (Bknz bölüm 9) ;

- *TET2* mutasyonları genellikle normal karyotip ile ilişkilidir.
- *DNMT3A* mutasyonları genellikle AML'de gözlenir.
- *ASXL1*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *RUNX1*, *STAG*, *NRAS*, *ETV6*, *GATA2*, *BCOR*, *FLT3*, *WT1*, *NPM1* ve *EZH2* mutasyonları bağımsız olarak kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir.
- *SF3B1* mutasyonları genellikle halka sideroblastlar ile ilişkili olup, bağımsız şekilde iyi prognoz ile ilişkilendirilmektedir.
- *TP53* mutasyonları bağımsız olarak kötü prognoz ile ilişkilendirilmekte olup, sıklıkla kompleks karyotip (%50) ve 5q delesyonlarına (%15-20) eşlik etmektedir. Tedavi direncine ve relapsa neden olabilmektedir.
- *IDH1* ve *IDH2* mutasyonları daha sıklıkla AML'de gözlenir. *IDH2* mutasyonları kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir.

3.2.2 Analiz yöntemleri

- Myelodisplastik neoplazmalarda tekrar eden kromozomal anomalilerin tespit edilebilmesi için tanı anında, tüm kromozomların sayısal ve yapısal olarak değerlendirilmesine imkan sunan konvansiyonel sitogenetik analizlerin yapılması önerilmektedir.
- Konvansiyonel sitogenetiğin başarısız olduğu durumlarda, 5q, 7q, 20q, *TP53* ve 11q delesyonlarının tespit edilebilmesi için FISH testi uygulanabilir.
- Bu testler kemik iliği aspirasyon örneklerinden çalışılmalıdır ve konvansiyonel sitogenetik analizlerin normal olarak raporlanması için en az 20 metafaz plağının değerlendirilmesi gerektiği göz önünde bulundurulmalıdır.
- Konvansiyonel sitogenetik analizler için kemik iliği örnekleri 24 ve 48 saat kültüre edilmelidir. Her yıl bu testler tekrar edilmelidir.
- American Association for Cancer Research (AACR)'e göre tanı anında sitogenetik çalışmaların yanı sıra somatik varyantların araştırılması için myeloid panelin de çalışılması önerilmektedir.
- Fankoni anemi etiyojisi genleri, *RUNX1*, *GATA2* gibi genlerde germline patojenik varyantları taşıyan, risk altındaki hastalar ve aile üyeleri için ise takip olarak altı ayda bir tam kan sayımı önerilir. Yalnızca kan sayımı değerlerinin kötüleşmesi durumunda dahi kemik iliği aspirasyonu, sitogenetik ve myeloid panel önerilmektedir.
- Klonal evolüsyonun takibinin yapılabilmesi için de yıllık somatik, patojenik varyant analizleri de önerilmektedir [4] (Bknz bölüm 9).
- Myelodisplastik neoplazmaların risk sınıflandırılmasında da önemli yere sahip *TP53* gen varyantları mutasyon, delesyon ya da loss of heterozygosity (LOH) tipinde gözlenebilmektedir. Biallelik *TP53* anomalileri çoklu mutasyonlar ya da diğer allelin delesyonu sonucu oluşabilmektedir. Bu sebeple *TP53* gen anomalilerinin saptanması için 4-11 eksonlarını kapsayan bir dizileme çalışması yanı sıra FISH ya da array teknolojileri ile kopya sayısı değişikliklerinin analizlerinin yapılması önerilmektedir. [5]

3.3 MDS'DE TEDAVİ

Myelodisplastik neoplazmalarda tedavi yaklaşımlarından önce risk sınıflandırmasının değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu risk değerlendirmelerinde genetik anomalilerin rolü olduğu için, genetik testlerin hızla sonuçlanması gerekmektedir. Risk değerlendirme sonuçlarına göre kılavuzlarda önerilerin tedavi yöntemleri uygulanmaktadır.

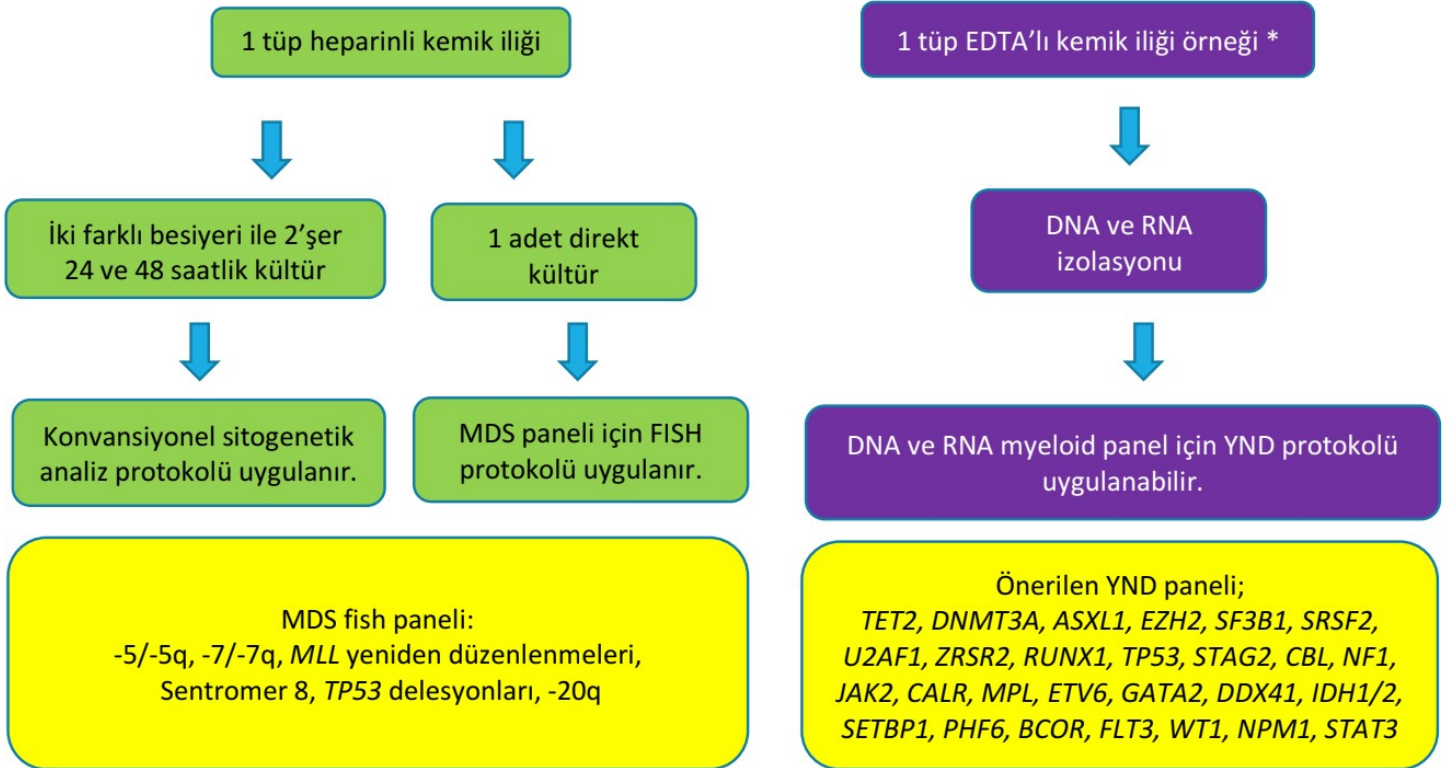
Yapılan genetik analizler sonucunda 5q delesyonu saptandığında lenalidomid isimli etken maddeyi içeren ilaçlar tedavide kullanılmaktadır.

Ayrıca tedavi hedefi olarak *BCL2* inhibitörleri ve *IDH1/2* inhibitörlerinin etkileri üzerindeki çalışmalar devam etmektedir.

Özet;

- MDS genetik anomalilere ve morfolojik özelliklere göre iki farklı şekilde sınıflandırılmaktadır.
- Genetik anomaliler tanımlanan MDS düşük blast oranı ve 5q delesyonu olan, düşük blast oranı ve *SF3B1* mutant MDS ve biallelik *TP53* inaktif MDS olmak üzere üçe ayrılır.
- *SF3B1* ve çoklu vuruş olmayan *TP53* mutasyonları MDS-5q sınıflandırmasını etkilemez.
- MDS ve AML ayrımında %20 blast oranı eşik değer olarak kabul edilmektedir.
- Kromozomal anomaliler MDS risk sınıflandırmasında rol oynamaktadır.
- Bir çok gen mutasyonu MDS risk sınıflandırmasında rol oynamaktadır.
- Tanı anında kemik iliği örneklerinden konvansiyonel sitogenetik analizler yapılmalıdır.
- Ayrıca tanı anında myeloid panel ile somatik varyant analizi yapılmalıdır.

MDS TANILI HASTALARDA GENETİK TANI ALGORİTMASI



Kaynaklar

1. Sekeres, M.A. and J. Taylor, *Diagnosis and Treatment of Myelodysplastic Syndromes: A Review*. *Jama*, 2022. **328**(9): p. 872-880.
2. Greenberg, P.L., et al., *Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes*. *Blood*, 2012. **120**(12): p. 2454-65.
3. DeZern, A.E. and P.L. Greenberg, *Recent Clinical and Molecular Advances for the Classification of Myelodysplastic Neoplasms*. *J Natl Compr Canc Netw*, 2022. **20**(12): p. 1280-1283.
4. Schlegelberger, B., C. Mecucci, and M. Wlodarski, *Review of guidelines for the identification and clinical care of patients with genetic predisposition for hematological malignancies*. *Fam Cancer*, 2021. **20**(4): p. 295-303.
5. Khoury, J.D., et al., *The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms*. *Leukemia*, 2022. **36**(7): p. 1703-1719.

MYELODİSPLASTİK/ MYELOPROLİFERATİF NEOPLAZMALAR

4. BÖLÜM

Yazarlar:

Gülçin Günden

Ebru Erzurumluođlu Gökalp



4. MYELODİSPLASTİK/MYELOPROLİFERATİF NEOPLAZMALAR

Myelodisplastik/myeloproliferatif neoplazmalar (MDS/MPN) kategorisi MDS ve MPN'nin örtüşen patolojik ve moleküler özellikleri ile tanımlanmaktadır. Yeni Dünya Sağlık Örgütü (WHO 5. baskı) sınıflandırmasında kronik myelomonositik lösemi (KMML) tipinde önemli güncellemeler olmuştur [1].

Tablo 4.1'de MDS/MPN grubunun sınıflandırması yer almaktadır.

Tablo 4.1: MDS/MPN grubunun sınıflandırması

Kronik myelomonositik lösemi
Nötrofili olan myelodisplastik/myeloproliferatif neoplazmalar
<i>SF3B1</i> mutasyonu ve trombositozu olan myelodisplastik/myeloproliferatif neoplazmalar
Myelodisplastik/myeloproliferatif neoplazmalar, diğer gruplarda tanımlanmayan

4.1 Kronik myelomonositik lösemi

Kronik myelomonositik lösemi MDS/MPN'nin en yaygın tipi olup, periferik kanda monositoz ve epigenetik regülasyon, splisozom, sinyal iletimleri gibi önemli mekanizmalarda rol alan genlerdeki somatik mutasyonlar ile karakterizedir.

4.1.1 Kronik myelomonositik lösemi'de tanı

Kronik myelomonositik lösemnin tanı kriterleri tablo 4.2'de yer almaktadır [1].

Tablo 4.2: Kronik myelomonositik lösemi tanı kriterleri

Ön koşul kriterleri
1. Kalıcı mutlak ($\geq 0,5 \times 10^9 / L$) ve bağıl ($\geq 10\%$) periferik kan monositozu
2. Blastlar, periferik kan ve kemik iliğindeki hücrelerin $< 20\%$ 'sini oluşturması
3. Kronik miyeloid lösemi veya diğer myeloproliferatif neoplazmaların tanı kriterlerini karşılamaması
4. Tirozin kinaz füzyonları ile myeloid/lenfoid neoplazmaların tanı kriterlerini karşılamaması
Destekleyici kriterler
1. ≥ 1 myeloid soy içeren displazi
2. Klonal sitogenetik veya moleküler anomali saptanması
3. Periferik kan monosit alt kümelerinin anormal bölünmesi
Tanı için gereklilikler
Ön koşul kriterlerinin mevcut olması
Monositoz $\geq 1 \times 10^9 / L$ ise: bir veya daha fazla destekleyici kriter karşılanmalı
Monositoz $\geq 0,5$ ve $< 1 \times 10^9 / L$ ise: destekleyici kriterler 1 ve 2 karşılanmalı
Alt tip kriterleri
Myelodisplastik KMML (MD-KMML): $WBC < 13 \times 10^9 / L$
Myeloproliferatif KMML (MP-KMML): $WBC \geq 13 \times 10^9 / L$
Alt tip kriterleri (blastların ve promonositlerin yüzdesine göre)
KMML-1: Periferik kanda $< 5\%$ ve kemik iliğinde $< 10\%$
KMML-2: Periferik kanda $5-19\%$ ve kemik iliğinde $10-19\%$

Ancak tanıda dikkat edilmesi gereken bazı önemli noktalar aşağıda belirtilmiştir;

1. MPN tanısına sahip bir hastada tanı anında veya daha sonra monositöz gözlenebilir ve bu durum KMML'yi taklit edebilir. Bu durumda vakalarda MPN tanısı olması, KMML tanısını dışlar. Kemik iliğinde MPN bulgularının olması ya da MPN ilişkili mutasyonların (*JAK2*, *CALR*, *MPL*) yüksek oranda saptanması tanının MPN olduğunu destekler niteliktedir.
2. Tirozin kinaz füzyonu saptanan myeloid/lenfoid neoplazmlar için kriterler, eozinofili vakalarında özellikle dışlanmalıdır.
3. Morfolojik displazi, kemik iliğinde hematopoetik kökenli hücrelerin $\geq 10\%$ 'unda bulunmalıdır.
4. Periferik kan monosit alt kümelerinin anormal bölünmesi, bilinen aktif otoimmün hastalıklar ve/veya sistemik inflamatuvar sendromlar yokluğunda artan klasik monositlerin ($>94\%$) saptanmasına dayalıdır.

Ancak hala KMML'nin yeni tanı kriterlerine uymayan, açıklanamayan klonal monositöz bireyleri sınıflandırmak için en uygun yaklaşımın belirlenebilmesi adına ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

4.1.2 Diğer MDS/MPN grupları

Atipik kronik myeloid lösemi terimi yerine yeni güncelleme ile nötrofili olan MDS/MPN kullanılmaktadır. Böylelikle KML ile karışıklık önlenmiş olmaktadır.

Halka sideroblastları ve trombositozu olan MDS/MPN, *SF3B1* mutant olduğunda *SF3B1* mutasyonu olan MDS/MPN olarak yeniden tanımlanmıştır. *SF3B1* wild tip olduğunda ise halka sideroblastları ve trombositozu olan MDS/MPN terimi hala kullanılabilir [1].

4.2 MDS/MPN'de prognostik genetik faktörler ve analiz yöntemleri

Kronik myelomonositik lösemide en sık gözlenen mutasyonlar *TET2*, *SRSF2*, *ASXL1*, *RUNX1*, *NRAS* ve *CBL* gen mutasyonlarıdır. *Janus Kinaz-2* mutasyonları da gözlenebilmekte olup, *JAK2* inhibitörleri ile tedavi uygulanabilir [2].

Myelodisplastik/myeloproliferatif neoplazmalarda en sık gözlenen mutasyonlar ve uygulanabilecek tedavi seçenekleri tablo 4.3'de yer almaktadır [2].

Tablo 4.3: MDS/MPN'de saptanan mutasyonlar ve tedavi seçenekleri

Alt tipi	En sık gözlenen mutasyonlar	Tedavi
Kronik myelomonositik lösemi-1	<i>TET2</i> , <i>SRSF2</i> , <i>ASXL1</i> , <i>RUNX1</i> , <i>NRAS</i> , <i>CBL</i>	HMA
Kronik myelomonositik lösemi-1	<i>TET2</i> , <i>SRSF2</i> , <i>ASXL1</i> , <i>RUNX1</i> , <i>NRAS</i> , <i>CBL</i>	HMA + <i>JAK2</i> inhibitörü ve/veya allojenik KIT
Trombositöz ve <i>SF3B1</i> mutasyonu olan MDS/MPN	<i>SF3B1</i> , <i>JAK2</i> , <i>MPL</i> , <i>CALR</i>	HMA ve/veya lenalidomide veya Luspatercept
Nötrofili olan MDS/MPN	<i>SETBP1</i> , <i>ETNK1</i> , <i>BCR::ABL1</i> negatif	HMA ve/veya <i>JAK2</i> inhibitörleri ve/veya allojenik KIT
MDS/MPN diğer gruplarda tanımlanmayan	<i>TET2</i> , <i>NRAS</i> , <i>RUNX1</i> , <i>CBL</i> , <i>SETBP1</i> , <i>ASXL1</i>	HMA ve/veya allojenik KIT

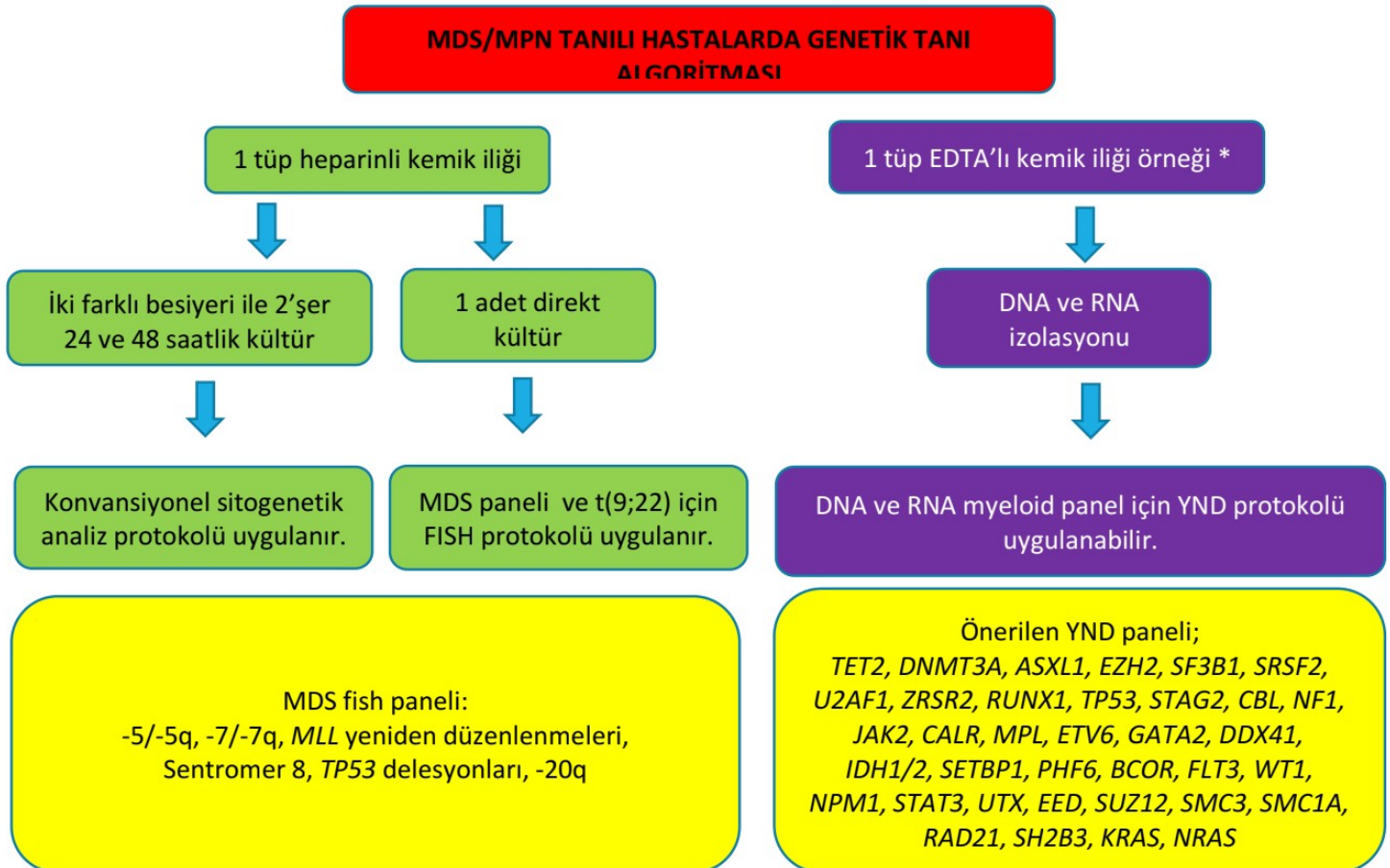
HMA: hipometilleyici ajanlar, KIT: kemik iliği transplantasyonu

Gen mutasyonlarının yanı sıra KMML'de *ETV6::PDGFRB* füzyon geninin oluşmasına sebep olan t(5;12) saptanan vakalara ise tirozin kinaz inhibitörler tedavi verilebilir. Ayrıca MDS/MPN grubunda sık gözlenen kromozomal anomaliler trizomi 8 (+8), Y kromozom kaybı, kromozom 7 aberasyonları (monozomi 7 ve del7q), trizomi 21 (+21) ve kompleks karyotip olarak bilinmektedir. İlgili tanıda izole del(5q) (<%1) ve monozomal karyotipler (~ %10) nadir olarak görülmektedir [3].

Kromozom anomalilerinin analizlerine imkan veren konvansiyonel sitogenetik çalışmalar için heparinli tüpte, kemik iliği örnekleri ile çalışılmalı ve örnekler 24-48 saat kültür edilmelidir. Gen mutasyonları için ise RT-PCR ya da YND temelli gen panelleri önerilmektedir. Moleküler çalışmalar için ise örneklerin EDTA'lı tüpte laboratuvara ulaştırılması gerekmektedir. Gen panellerinde bulunması gereken genler tablo 4.4'de yer almaktadır [4].

Tablo 4.4: KMML'de analiz edilmesi önerilen gen mutasyonları

Hüresel görevleri	İlişkili genler ve görülme sıklıkları
Epigenetik regülatör genlerinin mutasyonları	<i>TET2</i> (~%60), <i>DNMT3A</i> , <i>IDH1</i> , ve <i>IDH2</i>
Kromatin regülasyonu ve histon modifikasyon mutasyonları	<i>ASXL1</i> (~%40), <i>EZH2</i> , <i>UTX</i> , <i>EED</i> , ve <i>SUZ12</i>
Splicing mekanizma mutasyonlar	<i>SF3B1</i> , <i>SRSF2</i> (~%50), <i>U2AF1</i> , ve <i>ZRSR2</i>
Kohesin kompleks mutasyonları	<i>STAG2</i> , <i>BCOR</i> , <i>SMC3</i> , <i>SMC1A</i> , ve <i>RAD21</i>
DNA hasar yanıt genlerinin mutasyonları	<i>TP53</i> (~1%) ve <i>PHF6</i>
Sinyal transdüksiyon ve hüresel/reseptör tirozin kinaz yollarında mutasyonlar	<i>JAK2</i> , <i>SH2B3</i> (<i>LNK</i>), <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> (<i>RAS</i> ~%30), <i>CBL</i> (~%10–15), <i>FLT3</i> , ve <i>NPM1</i>
Diğerleri	<i>RUNX1</i> (<i>TF</i>) ve <i>SETBP1</i> (~%15)



Kaynaklar

1. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. 2022;36(7):1703-19
2. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Myelodisplastik syndromes, Version 1.2023
3. Rack KA, van den Berg E, Haferlach C, Beverloo HB, Costa D, Espinet B, et al. European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms. *Leukemia*. 2019;33(8):1851-67.
4. Patnaik MM, Tefferi A. Cytogenetic and molecular abnormalities in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood Cancer J*. 2016;6(2):e393.

AKUT MYELOİD LÖSEMİ

5. BÖLÜM

Yazarlar:

Sevgi Işık

Beyhan Durak Aras



5. AKUT MYELOİD LÖSEMİ

Akut myeloid lösemi (AML), myeloid, megakaryositik, eritroid ve monositik hücreleri oluşturacak olan öncül hücrelerde meydana gelen hematolojik bir malignitedir. Olgunlaşmamış hücrelerin birikimi kemik iliğinde başlamakta ve periferik kanda hızla sürmektedir. Bazen lenf nodları, dalak, karaciğer, testisler ve santral sinir sistemi gibi diğer bölgelere yayılmaktadır [1]. AML insidansı yaşla birlikte artmakta olup, AML tanısı alan hastaların %60'ı tanı anında 60 yaş üzerindedir. Üç ve beş yıllık sağkalım oranının ileri yaş hastalarında %5-8 arasında olduğu bildirilmektedir [2].

5.1 TANI VE SINIFLANDIRMA

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) akut myeloid lösemi sınıflandırılmasını yakın zamanda güncellemiştir. Bu güncellemeye ihtiyaç duyulmasına sebep olan nedenler; tekrarlayan genetik anomalilerin tanı, prognoz ve AML'ye yatkınlık açısından klinik önemlerinin büyük ölçüde ortaya koyulmuş olması, minimal rezidüel hastalığın (MRD) takibinin yapılmasındaki teknolojik gelişmeler, bunların sonuçlarının terapötik yanıt ve hastalık risk değerlendirilmesindeki etkileri, yeni terapötik hedeflerin geliştirilmesidir.

Dünya Sağlık Örgütünün AML sınıflandırmasında yaptığı en son güncellemesine (WHO 5. baskı) göre en önemli yenilikler;

- AML hücre farklılaşmasına göre tanımlanan AML'den, genetik anomaliler ile tanımlanan AML'yi ayırması (Tablo 5.1),
- Daha önce AML NOS (AML Not Otherwise Specified) olarak tanımlanan ve karışıklığa sebep olan sınıflandırmayı kaldırması,
- *BCR::ABL1* füzyonu pozitif AML ve *CEBPA* mutasyonu pozitif AML haricinde, genetik anomaliler ile tanımlanan AML türleri için %20 blast oranı gerekliliğinin ortadan kaldırılmasıdır [3].

Aşağıdaki tabloda (Tablo 5.1) yer alan, tanısal öneme sahip genetik anomalilerden bir kaç hakkında önemli bilgiler:

- *KMT2A*, *MECOM*, *NUP98* gen yeniden düzenlenmelerinin kriptik olabileceği konvansiyonel sitogenetik analizler esnasında göz önünde bulundurulmalıdır. Floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi yardımcı test olarak kullanılabilir.
- *MLL*'nin 80'den fazla partnerinin tanımlanmış olması sebebiyle, daha önce t(9;11) olarak tanımlanan sınıfın *MLL* gen yeniden düzenlenmeleri olarak sınıflandırılmasına ihtiyaç duyulmuştur. Zorunlu tutulmamakla birlikte, prognostik bilgi sağlayacağı ve hastalık takibini etkileyeceği için *MLL* geninin partnerin tanımlanması önerilmektedir.
- Mutasyonlar açısından sınıflandırılan AML'de ise *NPM1* ve *CEBPA* mutasyonları göz önünde bulundurulmalıdır.
- *NPM1* mutasyonu pozitif AML'de blast oranından bağımsız olarak tanı konabilir.
- *CEBPA* mutasyonu pozitif AML'de ise tek ya da çift allel mutasyon pozitif olabilir. Genin basic leucine zipper (bZIP) monoallelik mutasyonları (smbZIP) pediatrik ve 70 yaşına kadar olan yetişkinlerde iyi prognoz ile ilişkilendirilmiştir.
- *RUNX1* mutasyonlarının ise ayrı bir grup olarak sınıflandırılması için yeterli özgüllükte veri bulunmamaktadır.

Yapılan bir diğer güncelleme ise daha önce miyelodisplazi ilişkili değişikliklere sahip AML olarak tanımlanan AML alt grubunun, myelodisplazi-ilişkili AML (AML-MR) olarak yeniden tanımlanmasıdır. Bu AML tipi için karakteristik özellikler;

- Myeloid immünofenotipte \geq %20 blast oranı,
- MDS ilişkili sitogenetik ve moleküler anomalilerin bulunması,
- MDS, MDS/MPN öyküsü olması veya *de novo* gelişmesidir.

Tablo 5.1: Akut myeloid lösemi WHO sınıflandırması

AKUT MYELOİD LÖSEMİ	
Genetik anomaliler ile tanımlanan AML	Farklılaşma ile tanımlanan AML
<i>PML::RARA</i> füzyonu pozitif akut promyelositik lösemi	Minimal farklılaşma gösteren akut myeloid lösemi
<i>RUNX1::RUNX1T1</i> füzyonu pozitif akut myeloid lösemi	Maturasyon göstermeyen akut myeloid lösemi
<i>CBFB::MYH11</i> füzyonu pozitif akut myeloid lösemi	Maturasyon gösteren akut myeloid lösemi
<i>DEK::NUP214</i> füzyonu pozitif akut myeloid lösemi	Akut bazofilik lösemi
<i>RBM15::MRTFA</i> füzyonu pozitif akut myeloid lösemi	Akut myelomonositik lösemi
<i>BCR::ABL1</i> füzyonu pozitif akut myeloid lösemi	Akut monositik lösemi
<i>KMT2A</i> yeniden düzenlenmesi pozitif akut myeloid lösemi	Akut eritroid lösemi
<i>MECOM</i> yeniden düzenlenmesi pozitif akut myeloid lösemi	Akut megakaryoblastik lösemi
<i>NUP98</i> yeniden düzenlenmesi pozitif akut myeloid lösemi	
<i>NPM1</i> mutasyonu pozitif akut myeloid lösemi	
<i>CEBPA</i> mutasyonu pozitif akut myeloid lösemi	
Myelodisplazi-ilişkili akut myeloid lösemi (AML-MR)	
Diğer genetik anomalilerin tespit edildiği akut myeloid lösemi	

Yeni WHO güncellemesine göre artık sadece morfolojinin tek başına tanıda kullanılması kabul edilmemektedir. Sitogenetik kriterler güncellenmiş ve 8 genlik (*SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *ASXL1*, *EZH2*, *BCOR*, *STAG2*) bir gen paneli tanımlanmıştır. Tanımlanan mutasyonların yaklaşık %95'ten fazlası MDS, MDS/MPN sonrası gelişen AML'de tespit edilmektedir. AML-MR tanısının konulması için diagnostik öneme sahip genetik anomaliler tablo 5.2'de yer almaktadır.

Tablo 5.2: AML-MR'de diagnostik genetik anomaliler

Sitogenetik anomaliler
Kompleks karyotip (\geq 3 anomali)
5q delesyonu ya da 5q delesyonu ile sonuçlanan dengesiz translokasyonlar
11q delesyonu
12p delesyonu ya da 12p delesyonu ile sonuçlanan dengesiz translokasyonlar
Monozomi 13 ya da 13q delesyonu
17p delesyonu ya da 17p delesyonu ile sonuçlanan dengesiz translokasyonlar
İzokromozom 17q
İdic(X)(q13)
Somatik gen mutasyonları
<i>ASXL1</i> , <i>BCOR</i> , <i>EZH2</i> , <i>SF3B1</i> , <i>SRSF2</i> , <i>STAG2</i> , <i>U2AF1</i> , <i>ZRSR2</i>

Diğer genetik değişikliklere sahip AML'de ise şu an nadir görülen genetik füzyonlar yer almaktadır.

5.1.1 Farklılaşma ile tanımlanan AML

Bu AML sınıfı genetik anomali tanımlanmayan grupları içermektedir. Tanı konulması için gerekli olan kriterler tablo 5.3'de yer almaktadır.

Tablo 5.3: Farklılaşma ile tanımlanan AML'de diagnostik kriterler

Tip	Tanı kriteri*
Minimal farklılaşma olan AML	MPO ve SBB için sitokimyasal olarak blastların negatif olması (<%3)
	CD13, CD33, CD117 gibi iki ya da daha fazla myeloid ilişkili antijenlerin ekspresyonu
Olgunlaşma olmayan AML	MPO ve SBB için immünofenotip ya da sitokimyasal olarak \geq %3 blast oranı, ya da sitokimyasal olarak NSE negatif olması
	Olgun granülosit hücreleri çekirdekli kemik iliği hücrelerinin <%10'nu oluşturmalı
	MPO, CD13, CD33, CD117 gibi en az iki myeloid antijenin ekspresyonunun olması
Olgunlaşma olan AML	MPO (immunofenotipleme ya da sitokimyasal olarak) ve SBB (sitokimyasal olarak) \geq %3 blast pozitif olması
	Çekirdekli kemik iliği hücrelerinin \geq %10'unun olgun granülosit hücreler içermesi
	Kemik iliği hücrelerinin <%20'sinin monosit hücre içermesi
	MPO, CD13, CD33, CD117 gibi en az iki myeloid antijenin ekspresyonunun olması
Akut basofilik lösemi	Toluidine blue boyamada metachromasia'lı blast, olgunlaşmış/olgunlaşmamış basofiller
	Blastların sitokimyasal olarak MPO, ABB, NSE negatif olması
	Güçlü CD117 ekspresyonunun olmaması (mast hücreli lösemiye dışlamak için)
Akut myelomonositik lösemi	Monositlerin ve prekürsörlerinin \geq %20 olması
	Olgun granülosit hücrelerin \geq %20 olması
	MPO (immunofenotipleme ya da immünohistokimyasal olarak) \geq %3 blast pozitif olması
Akut monositik lösemi	Monositlerin ve/veya prekürsörlerinin \geq %80 olması
	Olgun granulosit hücrelerin <%20 olması
	En az iki monosit markerlerinin (CD11c, CD14, CD36,CD64) pozitif olması ya da sitokimyasal olarak NSE pozitif olması
Akut eritroid lösemi	Olgunlaşmamış eritroid hücrelerin (proeritroblast) \geq %30 olması
	Kemik iliğinin eritrosit baskın olması (genellikle \geq %80)
Akut megakaryoblastik lösemi	Blastların en az bir ya da daha fazla trombosit glikoproteinlerini (CD41, CD61, CD42b) eksprese etmesi
*ortak tanı kriterleri	
Kemik iliği ya da kanda \geq %20 blast bulunması (akut eritrosit lösemi hariç)	
Tanımlanmış genetik anomalilerin tespit edilmemiş olması	
Mix fenotipli AML olmaması (minimal farklılaşma gösteren AML için)	
Sitotoksik terapi sonrası myeloid neoplazm kriterlerinin karşılanmaması	
Myeloproliferatif neoplazma öyküsünün olmaması	
MPO: myeloperoksidaz, NSE: nonspesifik esteraz, SBB: Sudan Black B.	

5.2 PROGNOSTİK GENETİK FAKTÖRLER VE ANALİZ YÖNTEMLERİ

5.2.1 Prognostik genetik faktörler

Akut myeloid lösemisinin genetik açıdan oldukça heterojen olması, tekrarlayan genetik anomalilerin risk grubu açısından sınıflandırılması ve sürekli güncellenmesi ihtiyacını beraberinde getirmektedir.

- European LeukemiaNet (ELN)'nin son güncellemesinde yapılan en önemli değişikliklerden birisi *FLT3*-ITD allel yükünün artık sınıflandırmada göz önünde bulundurulmamasıdır. *FLT3*-ITD mutasyonları kötü prognostik etkisi olan bir genetik anomalinin eşlik etmediği durumlarda orta prognostik risk sınıfında yer almaktadır.
- Yapılan diğer önemli değişikliklerden birisi de myelodisplazi-ilişkili AML gen mutasyonlarının kötü prognostik risk grubunda sınıflandırılmasıdır. Artık sadece *ASXL1* ve/veya *RUNX1* gen mutasyonları değil *ASXL1*, *BCOR*, *EZH2*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1*, ve *ZRSR2* genlerinin en az birinde patojenik varyant saptanması myelodisplazi ile ilişkilendirilmesi için yeterli kabul edilmektedir.
- *NPM1* gen mutasyonu "iyi prognostik risk" grubunda yer almaktadır. Fakat *NPM1* gen mutasyonuna kötü prognostik etkisi olduğu bilinen sitogenetik bir anomalinin eşlik etmesi durumunda, *NPM1* gen mutasyonu "kötü prognostik risk" sınıfına dahil edilmelidir.
- *CEBPA* geninin *basic leucine zipper* bölgesini etkileyen *in-frame* mutasyonlar, biallelik ya da monoallelik olmasına bakılmaksızın iyi prognostik risk grubunda sınıflandırılır.
- Daha önce sadece t(3;3) veya inv(3) ile ilişkilendirilen MECOM yeniden düzenlenmesi artık t(3q26.2;v) olarak tanımlanmakta ve kötü risk grubunda yer almaktadır. Ayrıca t(8;16)(p11.2;p13.3) (*KAT6A::CREBBP* gen füzyonu) da kötü prognostik risk grubunda yer almaktadır.
- Hiperdiploid karyotipler ise artık kompleks karyotip ve kötü prognostik risk grubunda yer almamaktadır [4].

European LeukemiaNet (ELN)'nin AML'de saptanan genetik anomalileri prognostik riskleri açısından güncel sınıflandırması tablo 5.4'te yer almaktadır.

Tablo 5.4'de yer alan genetik anomaliler ile ilgili bazı ayrıntılara yer vermemiz gerekirse;

- İyi prognostik risk grubunda bulunan t(8;21)'e *KIT* ya da *FLT3* mutasyonlarının eşlik etmesi bu anomalinin risk kategorisini değiştirmemektedir.
- Kötü risk grubunda yer alan *KMT2A* yeniden düzenlenmeleri *KMT2A* parsiyel tandem duplikasyonlarını içermemektedir.
- Kompleks karyotip ise diğer risk grubunda bulunmayan, birbirinden bağımsız en az üç anomalinin varlığı olarak kabul edilmekte ve hiperdiploid karyotipler bunun dışında kalmaktadır.
- Monozomal karyotip, X ve Y kromozomları hariç, iki veya daha fazla farklı monozomi varlığı ya da en az bir yapısal anomali ile tek bir otozomal monozomi (core-binding AML hariç) varlığı olarak tanımlanmaktadır.
- *ASXL1*, *BCOR*, *EZH2*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1* ve/veya *ZRSR2* mutasyonları iyi prognostik bir belirteç ile birlikte tespit edilmesi durumunda kötü prognostik marker olarak düşünülmemektedir.
- *TP53* geninde mutasyonların mono/bi allelik olmasına bakılmaksızın, %10'luk allel frekansına sahip bir varyant saptanması durumunda bu mutasyonlar kompleks karyotip ya da monozomal karyotip ile ilişkilendirilmektedir.

- *IDH1/IDH2* ya da *DNMT3A* gibi mutasyonlar için ise ayrı ELN prognostik grup oluşturulması için yeterli veri bulunmamakla birlikte, *IDH* genlerinin tedavi hedef olmasının prognozu etkileyebileceği göz önünde bulundurulmalıdır.
- Ayrıca bu risk sınıflandırılmasının yoğun tedavi gören hasta verilerine dayanarak geliştirildiği ve daha az yoğun tedavi verilen hastalar için değişiklikler gerekebileceği de göz önünde bulundurulmalıdır [4].
- Akut promyelositik lösemi (APL) ise t(15;17)(q24;q21) translokasyonu ile karakterize olup, hastaların %95'inde bu translokasyon gözlenmektedir.
- APL hastaları lökosit sayısına göre düşük, orta ve yüksek risk sınıfına ayrılır.
- *FLT3*, *WT1*, *NRAS*, *KRAS*, *ARID* ve *PML* genlerinde mutasyonlar *PML::RARA* füzyonuna eşlik edebilir. *Fms like tyrosine kinase 3 (FMLT3)* en sık mutasyon gözlenen genidir.
- *PML* ve *RARA* genlerindeki mutasyonlar daha çok relapsta gözlenir [5].

Tablo 5.4: Tanıda saptanan genetik anomalilerin ELN'ye göre risk sınıflandırması

Risk kategorisi	Genetik anomali
İyi	t(8;21)(q22;q22.1)/ <i>RUNX1::RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) veya t(16;16)(p13.1;q22)/ <i>CBFB::MYH11</i> Mutant <i>NPM1</i> (<i>FLT3</i> -ITD yokluğunda) bZIP in-frame mutant <i>CEBPA</i>
Orta	Mutant <i>NPM1</i> ile <i>FLT3</i> -ITD Wild-type <i>NPM1</i> ile <i>FLT3</i> -ITD (kötü riskli genetik anomali yokluğunda) t(9;11)(p21.3;q23.3)/ <i>MLLT3::KMT2A</i> İyi ya da kötü olarak risk sınıflandırması yapılmamış sitogenetik ve/veya moleküler anomaliler
Kötü	t(6;9)(p23.3;q34.1)/ <i>DEK::NUP214</i> t(v;11q23.3)/ <i>KMT2A</i> -yeniden düzenlenmeleri t(9;22)(q34.1;q11.2)/ <i>BCR::ABL1</i> t(8;16)(p11.2;p13.3)/ <i>KAT6A::CREBBP</i> inv(3)(q21.3q26.2) veya t(3;3)(q21.3;q26.2)/ <i>GATA2</i> , <i>MECOM(EVI1)</i> t(3q26.2;v)/ <i>MECOM(EVI1)</i> -yeniden düzenlenmeleri -5 veya del(5q); -7; -17/abn(17p) Kompleks karyotip, monozomal karyotip Mutant <i>ASXL1</i> , <i>BCOR</i> , <i>EZH2</i> , <i>RUNX1</i> , <i>SF3B1</i> , <i>SRSF2</i> , <i>STAG2</i> , <i>U2AF1</i> , ve/veya <i>ZRSR2</i> Mutant <i>TP53</i>

5.2.2 Analiz yöntemleri

Akut myeloid lösemi sınıflandırmasında oldukça önemi olan genetik anomalilerin büyük kısmının tanımlanmasında kullanılan ve tüm kromozomların sayısal ve yapısal olarak değerlendirilmesine imkan sunan konvansiyonel sitogenetik, AML değerlendirilmesinde yapılması zorunlu olan bir testtir. Ancak konvansiyonel sitogenetiğin başarısız olduğu durumlarda, t(8;21), inv(16), *MLL*, *MECOM* gen yeniden düzenlenmeleri veya 5q, 7q, 17p gibi delesyonların saptanmasında FISH testi uygulanabilir [4].

Moleküler yöntemlerle ise tanısal, prognostik ve tedavi hedefi olduğu bilinen tüm anomalilerin analizlerinin gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu testler ticari olarak oluşturulmuş gen panelleri veya

aynı anda mutasyonları ve yeniden düzenlenmeleri saptayabilecek platformlar tarafından gerçekleştirilebilir.

ELN'nin tanıda ve risk sınıflandırmasında yapılması gereken çalışma önerileri tablo 5.5'de yer almaktadır.

Tablo 5.5: AML'de tanı anında ELN tarafından önerilen testler

Tanısal testler		Ek testler
Tam kan sayımı ve differansiyel sayım (en az ikibin hücre sayılmalı)		
Kemik iliği aspirasyonu		
Kemik iliği trefin biyopsisi		-Geriatrik değerlendirme (isteğe bağlı)
Flow sitometri ile immunofenotipleme		
Genetik analizler	Sonuçlanması için önerilen süre	-biyokimya ve pıhtılaşma testleri -Hepatit A,B,C, HIV1 testi, CMV, EBV, HSV, VZV -Serum gebelik testi -Allojenik HCT için uygunluk değerlendirmesi -göğüs röntgeni, 12-lead elektrokardiyogram, ekokardiyogram ya da MUGA (endikasyon varsa) -bilgisayarlı tomografi (endikasyon varsa) -Lumbar ponksiyon (endikasyon varsa) -oosit ve sperm kriyoprezervasyon bilgisi -biyobanka
Sitogenetik ^{1,2} (kemik iliği tercihen)	5-7 gün	
Tanı koymak ve tedavi hedefi belirlemek için gen mutasyonlarının taranması (kemik iliği ya da periferik kan)	3-5 gün	
<i>FLT3, IDH1, IDH2</i>	3-5 gün	
<i>NPM1</i>	3-5 gün	
<i>CEBPA, DDX41, TP53; ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1, ZRSR2</i>	1.kür döngüsü	
Gen yeniden düzenlenmelerinin taranması	3-5 gün	
<i>PML::RARA, CBFβ::MYH11, RUNX1::RUNX1T1, KMT2A</i> yeniden düzenlenmeleri, <i>BCR::ABL1</i> , diğer füzyon genleri (eğer mümkünse)	3-5 gün	
Tanıda analiz edilmesi önerilmesi genler		
<i>ANKRD26, BCORL1, BRAF, CBL, CSF3R, DNMT3A, ETV6, GATA2, JAK2, KIT, KRAS, NRAS, NF1, PHF6, PPM1D, PTPN11, RAD21, SETBP1, TET2, WT1</i>		
Medikal öykü		
Demografik ve medikal öykü		
Detaylı aile öyküsü		
Hasta kanama öyküsü		
Kororbidite analizi		
¹ AML'de sitogenetik analizler için 24-48 saat kültür örnekleri tercih edilir. t(15;17) analizi için 48 saat kültür önerilmektedir. ² konvansiyonel sitogenetik sonuçlarının normal olarak değerlendirilebilmesi için en az 20 metafaz plağının değerlendirilmesi gerekmektedir.		

5.3 AML'de MRD

AML'de minimal rezidüel hastalık (MRD) değerlendirilmesi;

- Derin bir remisyon durumu oluşturmak için kantitatif bir metot sağlamak,
- Remisyon sonrası relaps riskinin belirlenmesi ve erken müdahaleyi sağlamak için olası nüksü belirlemek,
- Akselere ilaç testi ve onayı için bir son nokta belirlemek için kullanılmasını sağlamak amacıyla yapılmaktadır.

Şu anda MRD analizi için en kapsamlı iki metot kullanılmaktadır; multiparameter flow cytometry (MFC-MRD) ve qPCR (moleküler MRD). Yeni nesil dizileme (YND) ve dijital PCR (dPCR) yöntemleri de MRD analizleri için kullanılmak için geliştirilmektedirler (Tablo 5.6) [4].

Tablo 5.6: MRD analiz yöntemleri

	Metot	Hedef	Sensitivite	AML %	süre	Problemler
Uygulanmakta	MFC	Lösemi ilişkili fenotip ya da normalden farklılaşma	$10^{-3} - 10^{-4}$	85-90	2	Daha az sensitivite, daha subjektif analiz
Uygulanmakta	RT-qPCR	Sağlam veriler: <i>NPM1</i> , <i>CBFB::MYH11</i> , <i>RUNX1::RUNX1T1</i> Daha düşük doğrulukta veriler: <i>KMT2A::MLL3</i> , <i>DEK::NUP214</i> , <i>BCR::ABL1</i> , <i>WT1</i>	$10^{-4} - 10^{-5}$	40-50	3-5	Sınırlı uygulanabilirlik
Araştırılmakta	YND	Herhangi mutasyon	$10^{-2} - 10^{-4}$	~100	5-10	Daha az sensitivite, pahalı, teknik olarak zor
Araştırılmakta	dPCR	Spesifik hedef mutasyonlar	$10^{-3} - 10^{-4}$	~70	3-5	Her mutasyon için gerekli spesifik test, sınırlı sensitivite

Minimal rezidüel hastalık analizlerinde, spesifik mutasyonlar için bir eşik değeri yoktur. Klonal hematopoez ve germline mutasyonları haricinde varyant allel frekansı $\geq \%0,1$ olarak kabul edilmektedir. Ayrıca *DNMT3A*, *TET2* ve *AXSL1* gibi malign öncesi klonal hematopoez ile uyumlu yaygın gen mutasyonları hariç tutulmalıdır. Çünkü hangi mutasyonların gerçekten rezidüel AML'nin göstergesi olduğunu ve klonal hematopoez olmadığını belirlemek için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

5.4 AML'DE TEDAVİ

AML'de tekrarlayan genetik anomalilerin tanımlanması ile tedavi hedefleri artmakta ve son yıllarda hem başlangıç hem de nüks refrakter AML hastaları için yeni ilaçların the U.S. Food and Drug Administration (FDA) onayı almış olması bu hasta grubunun tedavisi için oldukça umut vericidir. Tedavi

seçeneklerinin artması ile birlikte klinisyenlerin süreci yönetmeleri de zorlaşmaktadır. İndüksiyon tedavisi seçiminde yaklaşım oldukça önemlidir. Tedavi öncesi sitogenetik ve mutasyon profili burada önemli bir rol oynamakta ve terapi sonucu tahminini güçlendirmektedir.

AML'de saptanan genetik anomalileri hedefleyen tedavi seçeneklerini özetlemek gerekirse;

- *FLT3* mutant, yoğun kemoterapiye uygun AML'de, başlangıç tedavisine *FLT3* inhibitörleri tedaviye eklenir.
- Yoğun kemoterapiye yanıt vermeyen ya da relaps olan *FLT3* mutant hastalarda hastalık progresyonu boyunca bir diğer *FLT3* inhibitör tedavisi verilir. Bu inhibitör yoğun kemoterapiye uygun olmayan, *FLT3* mutant AML'de kurtarma tedavisi olarak da verilebilir.
- Yoğun kemoterapiye uygun olmayan, *IDH1* veya *IDH2* mutant AML'de kurtarma tedavisi olarak *IDH* inhibitör tedavisi verilebilir.
- Yoğun kemoterapiye uygun olmayan, *IDH1* mutant AML'de, başlangıç tedavisinde hastanın durumuna göre *IDH1* inhibitörü monoterapi olarak da verilebilir.

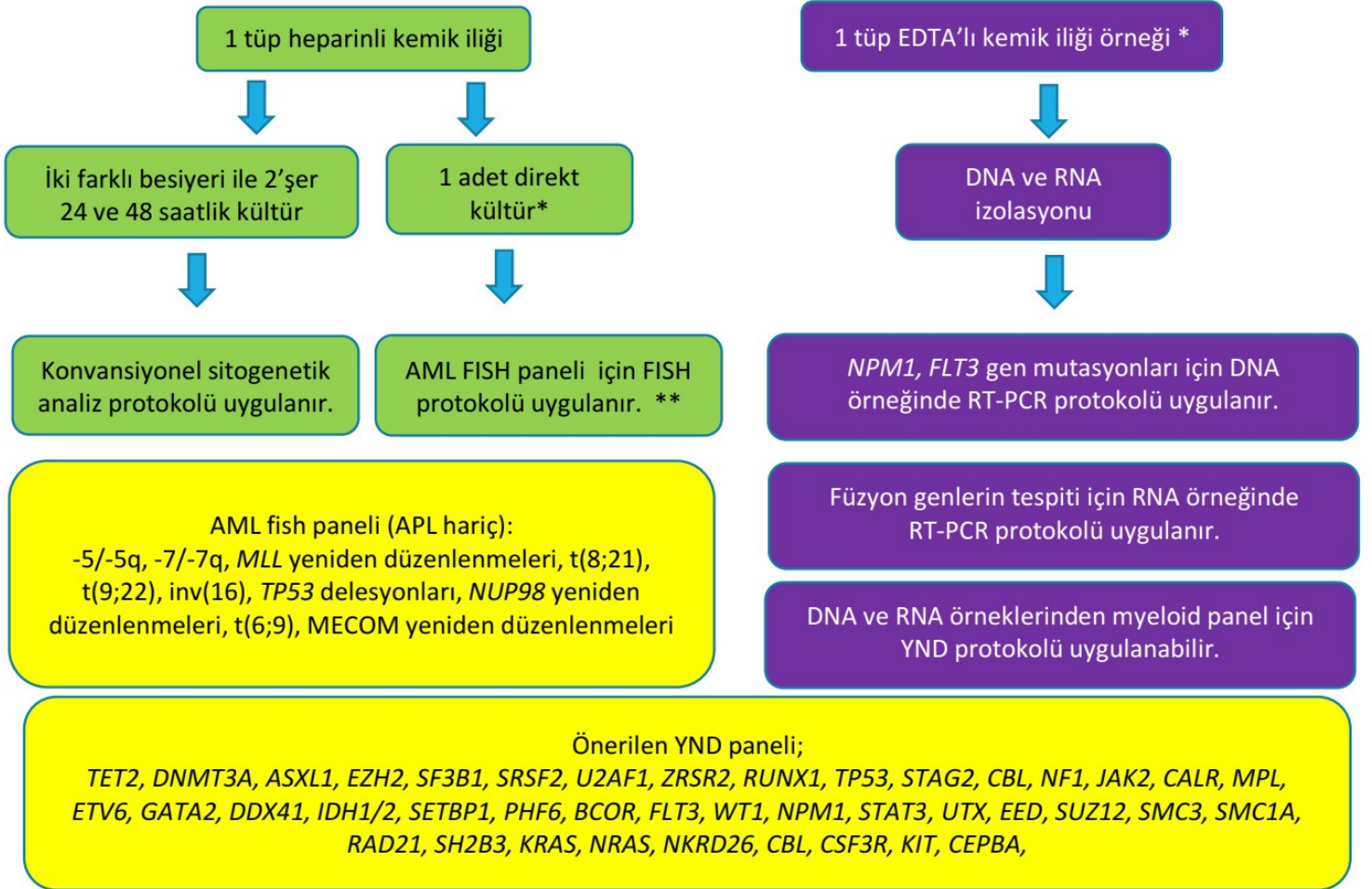
AML'de saptanan genetik anomalilerin tedavi yanıtları üzerinde birçok çalışma devam etmekte olup, yakın tarihte, AML'de tedavi önerilerinin hızla gelişeceği ön görülmektedir. Ancak tedavi seçeneklerinin belirlenebilmesi için genetik analizlerin 3-5 gün içerisinde sonuçlandırılması gerektiği muhakkak göz önünde bulundurulmalıdır.

Özet;

- Yeni tanı AML'de genetik anomaliler ile tanımlanan AML'de sınıflandırmada rol oynayan *PML::RARA*, *RUNX1::RUNX1T1*, *CBFBMTH11*, *DEK::NUP214*, *RBM15::TRTFA* füzyonları, *BCR::ABL*, *KMT2A*, *MECOM*, *NUP98* yeniden düzenlenmeleri ve *NPM1* ve *CEBPA* mutasyonlarının analizleri gerçekleştirilmelidir.
- *KMT2A*, *MECOM*, *NUP98* yeniden düzenlenmeleri kriptomik olabileceği için FISH yöntemi ile analiz edilmesi gerekmektedir.
- AML-MR tanısı için artık sadece morfoloji yeterli değildir.
- AML-MR tanısı için kompleks karyotip, 5q, 11q, 12p, 17p, 13q delesyoları, izokromozom 17 ya da idic(X) kromozom anomalilerinin tespit edilmesi gerekmektedir.
- AML-MR tanısı için ayrıca moleküler olarak *ASXL1*, *BCOR*, *EZH2*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1* ve *ZRSR2* gen mutasyonları saptanmalıdır.
- *FLT3-ITD* mutasyonları kötü prognostik etkisi olduğu bilinen bir anomalinin eşlik etmediği durumlarda orta prognostik risk grubunda yer almaktadır.
- *NPM1* gen mutasyonları kötü prognostik etkisi olduğu bilinen bir anomalinin eşlik etmesi durumunda kötü risk grubunda yer almaktadır.
- t(8;21)'e *KIT* ya da *FLT3* mutasyonlarının eşlik etmesi bu anomalinin risk grubunu değiştirmemektedir.
- Kötü risk grubunda yer alan *KMT2A* yeniden düzenlenmeleri parsiyel tandem duplikasyonları içermemektedir.
- *ASXL1*, *BCOR*, *EZH2*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1* ve/veya *ZRSF2* mutasyonları iyi prognostik bir belirteç ile birlikte tespit edildiğinde kötü risk grubunda kabul edilmemektedirler.
- AML sınıflandırmasında rol oynayan genetik anomalilerin yanı sıra prognostik etkisi bilinen, tablo 4'te yer alan genetik anomalilere yönelik de genetik testlerin yapılması gerekmektedir.

- *TP53* mutasyonları %10'luk allel frekansı ile saptandığında kompleks karyotip veya monozomal karyotip ile ilişkilendirilmektedir.
- AML'de tanı ve risk sınıflandırılması için yapılması gereken testler konusunda ELN'nin önerileri tablo 5'te yer almaktadır.
- Konvansiyonel sitogenetik analizlerinde kemik iliği örnekleri 24-48 saat kültüre edilmelidir.
- t(15;17) analizleri için 48 saatlik kültürlerde sitogenetik analizlerin yapılması tercih edilmelidir.
- Konvansiyonel sitogenetik testlerin normal olarak değerlendirilebilmesi için en az 20 metafaz plağının analizlerinin gerçekleştirilmesi gerekmektedir.
- Füzyon genlerin tespit edilmesi için RT-PCR yöntemi kullanılabilir.
- Diagnostik ve prognostik önemi olan gen mutasyonları için YND temelli yöntemler kullanılabilir.
- Tüm genetik testlerin en geç 5 gün içinde sonuçlanması gerekmektedir.

AML TANILI HASTALARDA GENETİK TANI ALGORİTMASI



*Konvansiyonel sitogenetik (KS) analizlerin 3-5 gün içerisinde sonuçlanması gerekliliği sebebiyle, KS'ye eş zamanlı olarak FISH çalışmaları gerçekleştirilebilir.

**FISH analizleri için direkt kültür ile çalışılmasına rağmen t(15;17) için 48 saatlik kültürlerde analiz yapılması önerilmektedir.

Kaynaklar

1. Prada-Arismendy J, Arroyave JC, Röthlisberger S. Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia. *Blood Rev.* 2017;31(1):63-76.
2. Alibhai SM, Leach M, Minden MD, Brandwein J. Outcomes and quality of care in acute myeloid leukemia over 40 years. *Cancer.* 2009;115(13):2903-11.
3. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia.* 2022;36(7):1703-19.
4. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood.* 2022;140(12):1345-77.
5. Jimenez JJ, Chale RS, Abad AC, Schally AV. Acute promyelocytic leukemia (APL): a review of the literature. *Oncotarget.* 2020;11(11):992-1003.

KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ

6. BÖLÜM

Yazarlar:

Sevgi Işık

Beyhan Durak Aras



6. KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ

Kronik lenfositik lösemi (KLL) batı ülkelerinde en sık gözlenen lösemi tipi olup, yıllık insidansı 4,2/100.000' dir. Ortalama tanı yaşı 72'dir. Toplumdaki demografik değişiklikler nedeniyle önümüzdeki on yıllarda KLL'nin prevalansı ve mortalitesinin daha da artması beklenmektedir. Ayrıca, daha sık kan testi yapılması nedeniyle erken evre KLL ve minimal semptomları olan genç hastaların oranının da gittikçe arttığı belirtilmektedir [1].

6.1 TANI

- Periferik kanda $5 \times 10^9/L$ monoklonal B lenfositlerin olması ve B hücrelerin klonitesinin flow sitometri ile doğrulanması gerekmektedir.
- Periferik kanda flow sitometri ile hücre yüzey markerları kullanılarak yapılan immünofenotipleme tanı için yeterli olup, genellikle kemik iliği biyopsisi gerekmemektedir.

6.2 EVRELEME

- Hastaların takibini yapmak için rutinde kullanılan iki evreleme sistemi vardır: Rai ve Binet.
- Rai evreleme sistemi hastaları üç risk grubunda toplar: düşük risk (Rai evre 0), orta risk (Rai evre I-II) ve yüksek risk (Rai evre III-IV) [2].
- Binet evreleme sistemi de hastaları Grup A, Grup B ve Grup C olmak üzere üç prognostik gruba ayırır [3].

Her iki evreleme sistemi de muayene bulgularına (lenf nodu tutulumu, dalak ve/veya karaciğer büyümesi) ve kan parametrelerine (anemi ya da trombositopeni) dayanmaktadır. KLL tanısında prognostik önemi bilinen genetik belirteçlerin tanımlanması sonucu yeni bir sınıflandırmaya ihtiyaç duyulmuştur. *IGHV* mutasyon durumu, serum $\beta 2$ mikroglobulin, 17. kromozom kısa kol delesyonları [del(17p)] ya da *TP53* aberasyonları gibi prognostik faktörlerden hastalık prognozunun belirlenmesinde faydalanılmaktadır. Prognozu ön görmek için yapılan sınıflandırmalardan birisi olan CLL international prognosis index (CLL-IPI) klinik evre, yaş, *IGHV* mutasyon durumu, serum $\beta 2$ mikroglobulin ve del(17p) ve/veya *TP53* mutasyon durumunu değerlendiren bir skorlama yapmaktadır [4].

6.3 PROGNOTİK GENETİK FAKTÖRLER VE ANALİZ YÖNTEMLERİ

Kronik lenfositik lösemi'de myeloid neoplazilerin aksine genellikle sayısal kromozom anomalileri saptanmaktadır. Ancak son zamanlarda tekrar eden gen mutasyonları da tespit edilmiş olup, prognostik önemleri tanımlanmaya başlamıştır. Bu bölümde KLL'de rutin uygulamalarda bakılması önerilen genetik anomalilerin önemleri ve analiz etme yöntemleri hakkında bilgi verilecektir.

National Comprehensive Cancer Network (NCCN) tarafından rutinde değerlendirilmesi gereken prognostik faktörler *IGHV* gen mutasyonları, delesyon 13q, trizomi 12, delesyon 11q, delesyon 17p ve *TP53* mutasyonlarıdır (Şekil 6.1) [5].

6.3.1 Prognostik genetik faktörler

6.3.1.1 *IGHV* (Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region) mutasyonları

IGHV mutasyon durumu yaşam süresini öngörmek için oldukça önemli ve bağımsız bir prognostik faktör olarak kabul edilmektedir. Germline gen dizisi ile %98 ya da daha fazla benzerlik göstermesi durumunda *IGHV* geni mutasyonsuz olarak kabul edilmektedir. *IGHV* geninin unmutated olması (UM-*IGHV*), mutated-*IGHV* (M-*IGHV*)'ye göre daha kısa yaşam süresi ile ilişkilendirilmekte ve kötü prognostik biyobelirteç olarak kabul edilmektedir. Ayrıca VH3-21 gen dizisi (subset #2) de kısa tedaviye başlama süresi ve yaşam süresi ile ilişkilidir [6].

Günümüzde ayrıca *IGHV* mutasyon durumu kemoimmunoterapiye yanıt için önemli bir biyobelirteç olarak kabul edilmektedir. Mutant *IGHV* hastaları kemoimmunoterapiden daha fazla faydalanabilmektedirler [7].

TP53 ve <i>IGHV</i> gen mutasyonları		
	İyi prognosis	Kötü prognosis
TP53	Wild tip	mutant
<i>IGHV</i>	>%2 mutasyon	<%2 mutasyon

FISH testleri			Kompleks karyotip
İyi	Orta prognosis	Kötü	Kötü prognosis
İzole del(13q)	Normal Trizomi 12	Del(17p) Del(11q)	≥3 bağımsız kromozomal anomali (1'den fazla hücrede)

Şekil 6.1. KLL'de prognostik genetik faktörler

3.1.1.1 *IGHV* mutasyon analizleri için laboratuvar uygulama önerileri

- Analizler öncelikle periferik kan olmak üzere kemik iliği örneklerinden de elde edilen lenfosit hücrelerinde gerçekleştirilebilir.
- Örneklerin ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) veya trisodium citrate/pyridoxal 5'-phosphate/Tris (CPT) tüpleri içerisinde olması gerekmektedir.
- Periferik kan örneklerinden en az 3 mL, kemik iliği örneklerinden ise en az 1 mL olması *IGHV* testleri için yeterlidir [8].
- Hem cDNA hem de gDNA örnekleri ile çalışılabilir.
- Örneklerin monoklonalite göstermesi gerekmektedir.
- Konvansiyonel dizileme yapılmalıdır.
- Elde edilen dizinin germline *IGHV* dizisi ile homolojisi tespit edilmelidir.
- Farklılık >%2 ise mutant olarak kabul edilmelidir.

Klinikte *IGHV* mutasyonlarının önemleri daha iyi anlaşıldıkça, European Research Initiative on CLL (ERIC) *IGHV* analizleri için bir konsensus geliştirilmiştir. Bu analizler için hem complementary DNA (cDNA) hem de genomic DNA (gDNA) kullanılabilen olup, cDNA fonksiyonel yeniden düzenlenmenin tanımlanmasında gDNA'dan avantajlıdır. Çünkü gDNA analiz edilirken ikinci allelde oluşan ve saptanabilen, transkripsiyonu gerçekleştirilmeyen ya da fonksiyonel ürün vermeyen *IGH* geninin yeniden düzenlenmeleri nedeniyle iki yeniden düzenlenme oluştuğunda ekstra bir dizileme reaksiyonuna ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak gDNA'nın kullanılması durumunda da ters transkripsiyon basamağına ihtiyaç duyulmaz. Saklanan örnekler için ise gDNA kullanılması önerilmektedir. Analizler için ERIC farklı primer grupları oluşturmuştur [9]. Bu primer gruplarından lider primerlerin *IGHV* geninin tüm dizinin amplifikasyonuna imkan vermesi sebebiyle lider primerlerin kullanılması önerilmektedir. Amplifikasyon için multipleks PCR yöntemi önerilmekte olup, birden fazla yeniden düzenlenme tespit edildiğinde her bir 5' primer için ayrı ayrı PCR reaksiyonu yapılmalıdır. GeneScan ya da PAGE elektroforez kullanılarak *IGH* yeniden düzenlenmeleri gösterilmelidir. Agaroz jel elektroforez ise gDNA'nın klonalitesinin yanlış yorumlanmasına sebep olabileceği için kesinlikle önerilmemektedir. Forward ve reverse primerler ile konvansiyonel dizileme işlemi gerçekleştirilir. Nükleotid dizisinin

analizi IMGT/V-QUEST [the international ImMunoGeneTics information system (www.imgt.org)] üzerinden yapılır ve germline *IGHV* dizisi ile gösterdiği homoloji analiz edilir. IMGT/V-QUEST NCBI tarafından onaylanan diziye referans almaktadır [10].

6.3.1.2 Kromozomal anomaliler

Daha önce tedavi almamış KLL hastalarının %80'inde FISH ile kromozomal anomali saptanmaktadır. Tanı anında en sık gözlenen anomaliler 13. kromozom uzun kol delesyonu [del(13q), %55], 11. kromozom uzun kol delesyonu [del(11q), %18], trizomi 12 (%16) ve 17. kromozom kısa kol delesyonları [del(17p), %7]'dir. Delesyon 13q izole olarak saptandığında iyi prognoz ile ilişkilendirilmekte olup, ortalama yaşam süresi 133 aydır. Daha sonra 79 ay ortalama yaşam süresi ile ilişkili olan del(11q) genellikle lenfadenopati ve hastalık progresyonu ile ilişkilendirilmektedir. Tedavi alan hastalarda daha sık gözlenen, *TP53* genini de içeren kromozom 17p delesyonları (diğer allelinde de *TP53* mutasyonu gözlenir) kısa ortalama yaşam süresi (32 ay) ve kemoterapiye kötü yanıt ile ilişkilendirilmektedir [11]. Konvansiyonel sitogenetik ile saptanan kompleks karyotip (bir hücrede ≥ 3 bağımsız hastalık ilişkili kromozomal anomali) del(17p) ya da *TP53* mutasyonlarından daha kötü bir prognoz için belirteç olarak kabul edilebilir. Yüksek kompleks karyotip (≥ 5 bağımsız kromozomal anomali) klinik evre, *IGHV* mutasyonu, *TP53* aberasyonlarından bağımsız olarak kötü prognostik bir faktör olarak kabul edilmektedir. Oysaki düşük kompleks karyotip (3 bağımsız kromozomal anomali) ve orta kompleks karyotip (4 bağımsız kromozomal anomali) sadece *TP53* aberasyonları ile birlikte gözleniyor ise kötü prognostik faktör olarak kabul edilmektedir

6.3.1.2.1 Kromozomal anomaliler için laboratuvar uygulama önerileri

Interphase FISH (iFISH) konvansiyonel sitogenetiğe göre daha düşük orandaki anomalileri saptayabildiği için KLL hastalarında konvansiyonel sitogenetik çalışma yapılması zorunlu değildir. Kültür için;

- Periferik kan örnekleri kemik iliğinden daha başarılıdır.
- KLL hücreleri *in vitro* olarak düşük bir proliferasyon hızı gösterdiği için biri 24 saat olmak üzere en az iki kültür yapılmalıdır.
- Oligonüklotid DSP30 ve interlökin-2 ile stimule edilmiş üç günlük kültür yapılması gerekmektedir.
- KLL FISH paneli [del(13q), del(17p), tirozmi 12, del(11q)] uygulanmalıdır . Ayrıca European Cytogeneticists Association 6q21 veya 6q23 bölgeleri için de FISH çalışmalarını önermektedir.
- Mantle cell lenfoma ile ayırıcı tanıda FISH oldukça yardımcı bir yöntemdir. Atipik hücre morfolojisi olan veya yüzey marker skoru 3/5 veya daha düşük olgularda muhakkak t(11;14) veya *IGH* break apart prob ile FISH çalışılması gerekmektedir.

6.3.1.3 *TP53* gen mutasyonları

TP53 aberasyonları kemoterapi direnci ile ilişkili kötü prognostik marker olarak kabul edilmektedir. Diğer sitogenetik anomalilere göre del(17p) daha kısa yaşam süresi ile ilişkili olup, *TP53*'ün diğer allelinin genellikle (%90) mutant olduğu bilinmektedir. Ancak tedavi almamış KLL hastalarının %5'inde del(17p) gözlenmeksizin *TP53* mutasyonları saptanmaktadır ve prognostik etkileri del(17p) ile benzerdir.

6.3.1.3.1. TP53 mutasyon analizleri için laboratuvar uygulama önerileri

İlk tedaviye başlamadan ve sonraki her tedavi kürünün başlangıcında TP53 mutasyonları analiz edilmelidir.

- İlk tercih edilen materyal periferik kan olmalıdır. Kansere hücre fraksiyonuna göre kemik iliği ya da lenf nodu biyopsileri alternatif olabilir.
- Periferik kan ya da kemik iliği EDTA ya da heparin gibi antikoagülan içeren tüplerde toplanmalı ve lenfosit fraksiyonunu arttırmak için santrifüjleme ile mononükleer hücre ayrımı yapılmalıdır.
- Solid doku materyali için taze/dondurulmuş örnekler tercih edilmelidir. Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) örneklere ise alternatif bir numuneye ulaşılmadığı durumlarda başvurulmalıdır.
- Minimum 4-10 eksonları dizilenmelidir. Mutasyon görülme sıklığı daha düşük olsa da 2, 3 ve 11. eksonların da dizilenmesi önerilmektedir.
- ERIC TP53 mutasyonları için Sanger dizileme sonuçlarının analizleri için GLASS isimli, web tabanlı bir araç geliştirmiştir ve ücretsiz kullanım olanağı sunmaktadır. (<http://www.ericll.org/guidance-toolstp53/>).
- Tespit edilen varyantların hem the IARC TP53 database (<http://p53.iarc.fr/TP53GeneVariations.aspx>) hem de the TP53 website (UMD database; <http://p53.fr/>) veritabanlarında kontrol edilmesi önerilmektedir.

FFPE materyali yüksek oranda bozulmuş DNA örneği içerdiği için dizilemede daha kısa ampliconların kullanımı gerekir. Sabitleme esnasında çapraz bağlanmaların oluşması sebebiyle bozulmamış DNA miktarı azalır. Ayrıca DNA kimyasal olarak modifikasyona uğrayabilir. Bu sebeple FFPE örneklerinde tespit edilen bir varyant analizinde oldukça dikkatli olunmalı ve PCR ile konfirmasyonu yapılmalıdır.

Eğer örneklerde %60-70'den daha az bir lenfosit içeriği söz konusu ise Sanger dizileme ile yanlış negatif sonuç verilebileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu durumun önüne geçmek için CD19+ hücrelerin seçimi yapılmalıdır. Bir başka seçenek ise çok daha yüksek hassasiyete sahip, düşük variant allele frequency (VAF) sahip mutasyonların tespit edilmesini sağlayan YND yöntemi kullanmaktır. Ancak mutasyon analizlerinde YND bazı teknik sınırlılığa sahiptir. Minör klonlardaki mutasyonların klinik önemleri tartışma konusudur. Sanger dizileme ile saptanamayan mutasyonların varlığına dayalı olarak terapötik kararlar vermek için kesin veriler henüz bulunmamaktadır.

TP53 mutasyonlarının analizleri için ERIC TP53 Network'u oluşturmuş olup, örnek seçiminden verilerin analizlerinde faydalanılabilecek veritabanlarına kadar ayrıntılı bilgiler <http://www.ericll.org/> adresinde bulunmaktadır [12].

6.3.1.4 Diğer gen mutasyonları

Kronik lenfositik lösemilerde en sık gözlenen, prognostik önemleri ortaya koyulmuş, tekrar eden diğer gen mutasyonları ise NOTCH1, SF3B1 ve BIRC3 mutasyonlarıdır. Bu gen mutasyonları yeni tanı KLL'lerin %4-15'inde gözlenirken, fludarabine dirençli KLL hastalarında bu oran %15-25'e kadar çıkmaktadır. Sitogenetik anomaliler ile bu gen mutasyonlarının birlikte değerlendirilmesi sonucunda prognostik etkileri açısından 4 grup oluşturulmuştur; yüksek risk (TP53 ve/veya BIRC3 anomalileri), orta risk [NOTCH1 ve/veya SF3B1 mutasyonları ve/veya del(11q)], düşük risk (trizomi 12 ve tüm genlerin wild tip olması) ve çok düşük risk (izole delesyon 13q). Bu 4 grubun 10 yıllık yaşam oranları sırasıyla %29, %37, %57, %69'dur [5]. NOTCH1, SF3B1 ve BIRC3 genlerdeki mutasyonları henüz kılavuzlarca zorunlu tutulmayan, ancak sayılı merkezlerde analizleri yapılmakta olan genetik anomalilerdir.

Tüm bu gen mutasyonlarının yanı sıra, prognostik önemi ortaya koyulmaya başlanan başka gen mutasyonları da tanımlanmıştır. İleride kılavuzlarda yer alma potansiyeli olan gen mutasyonları tablo 6.1'de yer almaktadır.

Tablo 6.1. KLL'de driver mutasyonlar

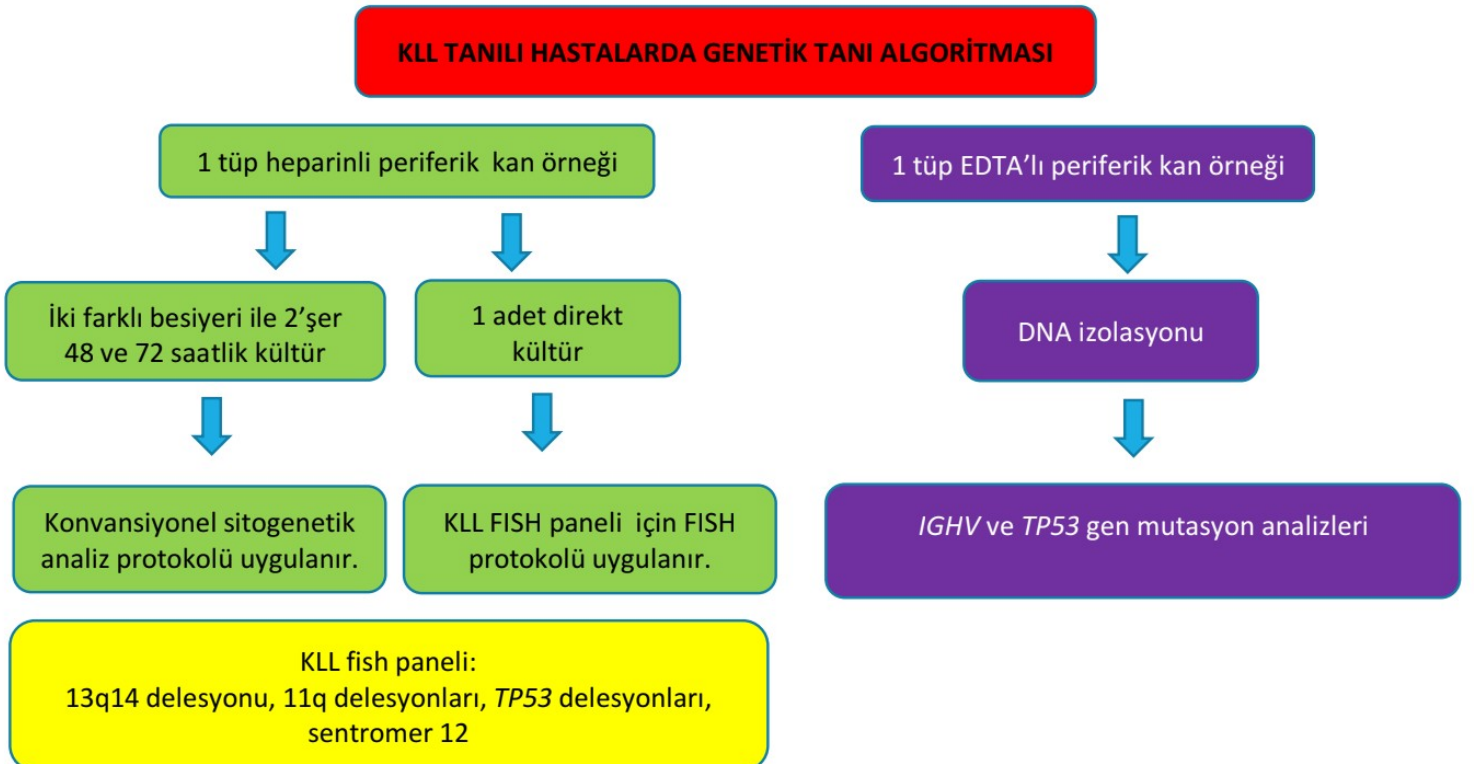
	Gen	Sıklık (%)	Prognostik önemi
Notch sinyal yolağı	<i>NOTCH1</i>	~22	Kısa OS, PFS, TTT Kemoimmüno refrakterliği
	<i>NOTCH1 3'UTR</i>	2-4	Kısa OS ve PFS, TTT Kemoimmüno refrakterliği
	<i>FBXW7</i>	~6	Bilinmiyor
RNA ve ribozomal süreç yolları	<i>SF3B1</i>	13	Kısa TTT ve PFS
	<i>XPO1</i>	7,5	Kısa PFS
	<i>RPS15</i>	~4,3	Kısa PFS
	<i>DDX3X</i>	~5	Bilinmiyor
	<i>MED12</i>	~5,2	Bilinmiyor
DNA hasarı ve hücre döngüsü kontrolü	<i>TP53</i>	~10,6	Kısa Os, Kemoimmüno refrakterliği
	<i>ATM</i>	~11	Kısa TTT
	<i>POT1</i>	~5-8	Kısa OS
Kromatin modifikasyonu	<i>CHD2</i>	~5,3	Bilinmiyor
	<i>SETD2</i>	3-4	Kısa PFS ve OS
	<i>IKZF3</i>	2	Kısa TTT ve OS
Enflamatuvar yolak	<i>BIRC3</i>	4	Kısa OS
	<i>MYD88</i>	3	Bilinmiyor
MAPK-ERK yolağı	<i>BRAF</i>	~4	Kısa OS
	<i>KRAS</i>	~6,2	Kısa TTT
	<i>NRAS</i>	~2,4	Kısa TTT, Kemoimmüno refrakterliği
MYC ilişkili yolak	<i>MGA</i>	<5	RS için artmış risk, Kemoimmüno refrakterliği
B-hücre sinyal yolağı	<i>ERG2</i>	<1	Kısa OS
	<i>BCOR</i>	2-3	Bilinmiyor
	<i>PAX5</i>	23	Bilinmiyor
OS: overall survival, PFS: progresyonsuz yaşam süresi, TTT: time to treatment, Rs: Richter sendromu			

Özetle KLL hastalarında prognozu ön görmek ve optimum tedavi seçenekleri için FISH ile del(17p), del(11q), del(13q) trizomi 12 değerlendirilmeli, *IGHV* ve *TP53* gen mutasyonlarının analizleri yapılmalıdır.

Özet;

- Hasta takibi için iki evreleme sistemi kullanılmaktadır; Rai ve Binet
- Prognostik önemi olan genetik anomalilerin başında *IGHV* mutasyonları, *TP53* mutasyonları, trizomi 13, del(17p), del(11q) ve del(13q) gelmektedir.
- *IGHV* mutasyonları dizilendikten sonra germline gen dizisi ile karşılaştırılır (benzerlik eşik değeri oranı: %98). Eğer %2'den daha fazla farklılık saptanır ise *IGHV* mutant olarak kabul edilir.
- *TP53* mutasyonları için ekson min. ekson 4-10 dizilenmelidir.
- FISH testi ile del(13q), del(11q), del(17p) ve trizomi 12 anomalilerine yönelik analiz uygulanır.
- Genetik analizler için periferik kan örneği kullanılır.
- *NOTCH1*, *SF3B1* ve *BIRC3* mutasyonları henüz zorunlu olmayan, bazı merkezlerde analizleri yapılmakta olan, kötü prognostik belirteç olarak kabul edilen genetik anomalilerdir.

KLL TANILI HASTALARDA GENETİK TANI ALGORİTMASI



Kaynaklar

1. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol* 2019;94:1266-1287.
2. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975;46:219-234.
3. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, Belabbes S, Gremy F. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981;48:198-206.
4. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 2016;17:779-790.
5. Wierda WG, Brown J, Abramson JS, Awan F, Bilgrami SF, Bociek G, Brander D, Chanan-Khan AA, Coutre SE, Davis RS, Eradat H, Fletcher CD, Gaballa S, Ghobadi A, Hamid MS, Hernandez-Ilizaliturri F, Hill B, Kaesberg P, Kamdar M, Kaplan LD, Khan N, Kipps TJ, Ma S, Mato A, Mosse C, Schuster S, Siddiqi T, Stephens DM, Ujjani C, Wagner-Johnston N, Woyach JA, Ye JC, Dwyer MA, Sundar H. NCCN Guidelines® Insights: Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma, Version 3.2022. *J Natl Compr Canc Netw* 2022;20:622-634.
6. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman SM, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1840-1847.
7. Thompson PA, Tam CS, O'Brien SM, Wierda WG, Stingo F, Plunkett W, Smith SC, Kantarjian HM, Freireich EJ, Keating MJ. Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab treatment achieves long-term disease-free survival in IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2016;127:303-309.
8. Crombie J, Davids MS. IGHV mutational status testing in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 2017;92:1393-1397.
9. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Stilgenbauer S, Stevenson F, Davi F, Rosenquist R. ERIC recommendations on IGHV gene mutational status analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2007;21:1-3.
10. Rosenquist R, Ghia P, Hadzidimitriou A, Sutton LA, Agathangelidis A, Baliakas P, Darzentas N, Giudicelli V, Lefranc MP, Langerak AW, Belessi C, Davi F, Stamatopoulos K. Immunoglobulin gene sequence analysis in chronic lymphocytic leukemia: updated ERIC recommendations. *Leukemia* 2017;31:1477-1481.
11. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000;343:1910-1916.
12. Malcikova J, Tausch E, Rossi D, Sutton LA, Soussi T, Zenz T, Kater AP, Niemann CU, Gonzalez D, Davi F, Gonzalez Diaz M, Moreno C, Gaidano G, Stamatopoulos K, Rosenquist R, Stilgenbauer S, Ghia P, Pospisilova S. ERIC recommendations for TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia-update on methodological approaches and results interpretation. *Leukemia* 2018;32:1070-1080.

AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ

7. BÖLÜM

Yazarlar:

Gülçin Günden

Beyhan Durak Aras



7. AKUT LENFBLASTİK LÖSEMİ

Akut lenfoblastik lösemi (ALL) kemik iliği (Kİ), kan ve ekstramedüller bölgelerde lenfoid projenitör hücrelerin proliferasyonu ve malign transformasyonu ile karakterize lösemi tipidir. İlgili tanının %80'inin çocuklarda meydana gelmesi nedeniyle, çocukluk çağı lösemisi olarak da bilinmektedir. Erişkin hastalarda ise görülme sıklığının ve tedaviye yanıt oranının düşük olduğu bildirilmektedir. Bu yüzden ALL, erişkin hastalarda "yıkıcı" hastalık olarak tanımlanmaktadır [1].

7.1 TANI VE SINIFLANDIRMA

Dünya Sağlık Örgütü'nün son yaptığı güncellemede (WHO 5. Baskı) B-hücreli lenfoid proliferasyon ve lenfomaların sınıflandırmasında önemli değişiklikler yer almaktadır. Bu grup içerisinde yer alan B hücreli ALL sınıflandırması tablo 7.1'de yer almaktadır [2].

Tablo 7.1: B-hücreli lenfoid proliferasyonların sınıflandırması

Prekürsör B-hücre neoplazmaları	
B-hücreli lenfoblastik lösemi/lenfoma (B-ALL)	
WHO sınıflandırması (5.baskı)	WHO sınıflandırması (4. Baskı)
B-lenfoblastik lösemi/lenfoma, NOS	(Aynı)
Yüksek hiperdiploidi saptanan B-lenfoblastik lösemi/lenfoma	Hiperdiploidi olan B-lenfoblastik lösemi/lenfoma
Hipodiploidi saptanan B-lenfoblastik lösemi/lenfoma	(Aynı)
iAMP21 saptanan B-lenfoblastik lösemi/lenfoma	(Aynı)
<i>BCR::ABL1</i> füzyonu saptanan B-lenfoblastik lösemi/lenfoma	t(9;22)(q34;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> saptanan B-lenfoblastik lösemi/lenfoma
<i>BCR::ABL1</i> -like bulguları saptanan B-lenfoblastik lösemi/lenfoma	B-lenfoblastik lösemi/lenfoma, <i>BCR-ABL1</i> -like
<i>KMT2A</i> yeniden düzenlenmeleri saptanan B-lenfoblastik lösemi/lenfoma	t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> -yeniden düzenlenmeleri saptanan B-lenfoblastik lösemi/lenfoma
<i>ETV6::RUNX1</i> füzyonu saptanan B-lenfoblastik lösemi/lenfoma	t(12;21)(p13.2;q22.1); <i>ETV6-RUNX1</i> saptanan B-lenfoblastik lösemi/lenfoma
<i>ETV6::RUNX1</i> -like bulguları saptanan B-lenfoblastik lösemi/lenfoma	<i>Daha önce yer almamaktaydı</i>
<i>TCF3::PBX1</i> füzyonu saptanan B-lenfoblastik lösemi/lenfoma	t(1;19)(q23;p13.3); <i>TCF3::PBX1</i> saptanan B-lenfoblastik lösemi/lenfoma
<i>IGH::IL3</i> füzyonu saptanan B-lenfoblastik lösemi/lenfoma	t(5;14)(q31.1;q32.2); <i>IGH::IL3</i> saptanan B-lenfoblastik lösemi/lenfoma
<i>TCF::HLF</i> füzyonu saptanan B-lenfoblastik lösemi/lenfoma	<i>Daha önce yer almamaktaydı</i>
Diğer genetik anomaliler saptanan B-lenfoblastik lösemi/lenfoma	(Aynı)

Sınıflandırmada yapılan değişiklikler, farklı tekniklerin de uygulanmasına izin vermek amacıyla daha çok terminolojide yapılan değişiklikleri içerir ve sitogenetik anomalilerden çok moleküler mekanizmalara odaklanılmaktadır. Kullanılan metodlardaki ilerlemeler aracılığıyla sınıflandırmaya yeni bir sınıf eklenmiştir; *ETV6::RUNX1*-like B-ALL [2].

Ayrıca gen ekspresyonu ve dizileme çalışmaları, farklı klinik özellikler sağlayan yeni genetik anomalilerin tanımlanmasına yol açmıştır. Mevcut sınıflandırmada diğer genetik anomaliler B-ALL sınıfına dahil edilmektedirler. Bu anomaliler arasında *DUX4*, *MEF2D*, *ZNF384* VE *NUTM1* yeniden düzenlenmeleri, *IGH::MYC* füzyonu, *PAX5alt* ve *PAX5* p.P80R yer almaktadır. İlginç şekilde *ZNF384* ve *DUX4* yeniden düzenlenmeleri saptanan veya *PAX5* p.80R pozitif B-ALL olgularında, tanıda ya da tedaviyi takiben monositik farklılaşma gösterebilir. Bu da minimal rezidüel hastalık (MRD) değerlendirilmesinde önemli bir etkiye sahiptir [2].

Tablo 7.2: B-ALL’de sitogenetik ve moleküler prognostik risk sınıflandırması

Risk grubu	Sitogenetik ve moleküler anomaliler
Standart risk	<ul style="list-style-type: none"> • Hiperdiploidi (51-65 kromozom) <ul style="list-style-type: none"> ○ Kromozom 4, 7 ve 10 iyi prognoz ile ilişkilendirilmektedir. • t(12;21)(p13;q22): <i>ETV6::RUNX1</i>* • t(1;19)(q23;p13.3): <i>TCF3::PBX1</i> • <i>DUX4</i> yeniden düzenlenmeleri • <i>PAX5</i> P80R • t(9;22)(q34;q11.2): <i>BCR::ABL</i>** <i>IKZF1</i> plus*** yokluğunda ya da KML dışında
Kötü risk	<ul style="list-style-type: none"> • Hipodiploidi (<44 kromozom)**** • <i>TP53</i> mutasyonu • <i>KMT2A</i> yeniden düzenlenmeleri [t(9;11) ve diğerleri] • <i>IGH</i> yeniden düzenlenmesi (IG::IL3) • <i>HLF</i> yeniden düzenlenmesi • <i>ZNF384</i> yeniden düzenlenmesi • <i>MEF2D</i> yeniden düzenlenmesi • <i>MYC</i> yeniden düzenlenmesi • <i>BCR::ABL</i>-like ALL <ul style="list-style-type: none"> ○ JAK-STAT (<i>CRLF2r</i>, <i>EPORr</i>, <i>JAK1/2/3r</i>, <i>TYK2r</i>, <i>SH2B3</i>, <i>IL7R</i>, <i>JAK1/2/3</i> mutasyonları) ○ ABL sınıfı (<i>ABL1</i>, <i>ABL2</i>, <i>PDGFRA</i>, <i>PDGFRB</i>, <i>FGFR</i> yeniden düzenlenmeleri) ○ DiğER (<i>NTRKr</i>, <i>FLT3r</i>, <i>LYNr</i>, <i>PTK2Br</i>) • <i>PAX5alt</i> • t(9;22)(q34;q11.2): <i>BCR::ABL1</i> + <i>IKZF1</i> plus ve/veya KML öyküsü • İntrakromozomal kromozom 21 amplifikasyonu (iAMP21) • <i>IKZF1</i> anomalileri • Kompleks karyotip (5 veya daha fazla kromozomal anomaliler)

*t(12;21) kriptik bir translokasyon olup, FISH veya PCR ile tespit edilebilir.
** Periferik kan örneğinde, granülosit hücrelerinde interfaz FISH testi (iFISH) *de novo* blast faz KML’den ayırım yapılabilmesi için önemlidir.
*** *IKZF1*plus : ERG delesyonu olmadan *IKZF1* delesyonuna ilave olarak *CDKN2A*, *CDKN2B*, *PAX5* veya *PAR1* genlerinden en az birinin delesyonunun eşlik etmesi (*CDKN2B* geni için homozigot delesyon olmalıdır).
**** Gerçek hipodiploidi ile maskelenmiş hipodiploidi ayırımına dikkat edilmelidir.

7.2 B-ALL’de Prognostik Genetik Faktörler ve Analiz Yöntemleri

7.2.1 Prognostik genetik faktörler

Akut lenfoblastik lösemi gelişmesinde etkili olan genetik mekanizmalar, hücre büyüme ve farklılaşmasını regüle eden genler ile ilişkilendirilmektedir. Akut lenfoblastik lösemide, genlerin normal fonksiyonlarını kaybetmesine sebep olan genomik değişimler meydana gelmektedir. Bu değişimlerin, hastalık tanısı, sınıflandırması ve tedavinin belirlenmesinde yardımcı olduğu bilinmektedir.

B-ALL’de sitogenetik ve moleküler prognostik risk sınıflandırması Tablo 7.2’de yer almaktadır.

7.2.1.1 Hipodiploid karyotip

- ALL’de hipodiploidi bir veya daha fazla kromozomun kaybı ile ilişkilendirilmektedir.
- Hipodiploidi, pediatrik ve yetişkin ALL’lerin <%7’inde görülmektedir.
- Hipodiploid hastaların %80’inde kromozom sayısı 45 olarak belirlenmiştir. Genellikle disentrik kromozomlar gözlenmekte ve bu olguların tipik hipodiploidi kadar kötü klinik tablo göstermediği bildirilmiştir.
- 3 alt sınıfı vardır;
Hipodiploidiye yakın karyotip (24–31 kromozom)
Düşük hipodiploid karyotip (32–39 kromozom)
Yüksek hipodiploid karyotip (40–44 kromozom)
- Hipodiploidiye yakın (24-31 kromozom) metafazlarda X/Y, 8, 10, 14, 18, ve 21 dizomileri görülmektedir.
- Hipodiploidiye yakın karyotipe eşlik eden mutasyonlar tanımlanmıştır (Tablo7.3).

Tablo 7.3: Hipodiploide yakın karyotipli ALL’de gözlenen mutasyonlar

Genler		Sıklık
RAS yolağı mutasyonları		
	<i>NRAS</i>	%15
	<i>FLT3</i>	%98
	<i>KRAS</i>	%3
	<i>PTPN11</i>	%1
Reseptör tirozinkinaz mutasyonları		%70.6
<i>CDKN2A/B</i> , <i>RB1</i> , <i>PAX5</i> ve <i>CREBBP</i>		%31
<i>NF1</i>		>%44
<i>PAG1</i>		%10
<i>EP300</i> ve <i>EZH2</i>		<%5

- Düşük hipodiploid karyotipin (32–39 kromozom) pediatrik hastaların %0.5’inde ve yetişkinlerin ~%4’ünde gözlemlendiği; görülme sıklığının ise yaşa bağlı olarak arttığı ifade edilmektedir.
- Bu alt tipde X/Y, 1, 5, 6, 8, 10, 11, 14, 18, 19, 21, ve 22. kromozomların dizomileri görülmektedir.
- Düşük hipodiploidide saptanan genlerdeki mutasyonlar Tablo 4’de özetlenmiştir.
- *TP53*’de genellikle ekzon 5-8’de missense mutasyonlar meydana gelmektedir.

- Düşük diploid karyotip kötü prognostik etkiye sahip olup, özellikle kısa tedavi yanıtı, kısa olaysız sağkalım ve kısa OS ile ilişkilendirilmektedir.

Tablo 7.4: Düşük hipodiploid karyotipli ALL’de gözlenen mutasyonlar

Genler	Sıklık
<i>TP53</i>	%91.2
<i>RB1</i>	%41.2
<i>IKZF2</i>	%52.9
<i>CDKN2A/2B</i>	%20
<i>CREBBP</i>	%60

- Maskelenmiş hipodiploid ALL, hipodiploid genomun reduplikasyonu ile oluşmaktadır.
- Maskelenmiş hipodiploid karyotiplerini tanımlamak için bazı özel durumlar belirlenmiştir.
- İlk olarak, çift düşük-hiperdiploid karyotipler 1, 8, 10, 11, 18, 19, 21, ve 22 kromozomlarının tetrazomilerini; çift haploidiye yakın karyotipler ise 14, 18, 21, ve X/Y kromozomların tetrazomilerini içermektedir.
- Bazı hastalarda, 50’den fazla kromozoma sahip karyotipler hiperdiploid olarak tanımlansa da, maskelenmiş hipodiploididen ayırımının yapılması gerekmektedir. Bu ayırımın doğru yapılmasının, prognoz kararını etkileyeceği unutulmamalıdır.
- Özellikle bu maskelenmiş hipodiploidiyi tanımlamada, SNP+aCGH kullanımının daha uygun olacağı vurgulanmaktadır [3].

7.2.1.2 Hiperdiploid karyotip

- Akut lenfoblastik lösemide, hiperdiploidi iki alt gruba ayrılmaktadır.
Yüksek hiperdiploid karyotip (51-65 kromozom)
Düşük hiperdiploid karyotip (47-50 kromozom)
- Yüksek hiperdiploid karyotip pediatrik ALL’lerin >%30’unu yetişkinlerin ise %10’unu oluşturmaktadır.
- Hiperdiploid ALL olan hastalarda genellikle X, 4, 6, 10, 14, 17, 18, ve 21 numaralı kromozomlarda artış olduğu gözlenmektedir.
- Yüksek hiperdiploidi, iyi prognostik faktörler ile ilişkilendirilmektedir.
- +4, +10 ve +17 çok düşük relaps riski ile ilişkilidir.
- Yüksek hiperdiploidi vakalarında, histon modifikasyonu (*CREBBP*, *WHSC1*, *SUV420H1*, *SETD2*, ve *EZH2*) ve RTK-RAS yolağı (*FLT3*, *NRAS*, *KRAS*, ve *PTPN11*) ile ilişkili genlerde yüksek sıklıkta mutasyon saptanmıştır. Bu veriler, yüksek hiperdiploid pediatrik ALL hastaları için yeni hedeflenmiş terapilerin geliştirilebileceğini göstermektedir [3].

7.2.1.3 KMT2A yeniden düzenlenmeleri

- *Histon lizin [K]-metil transferaz 2A (KMT2A)* gen yeniden düzenlenmeleri, pediatrik hastaların %5’inde ve yetişkinlerin %10’unda görülmektedir.
- *KMT2A* yeniden düzenlenmeleri kötü prognozla ilişkilendirilmektedir.
- *KMT2A* >90 partner gen ile *KMT2A::?* füzyon genlerini oluşturmaktadır. Özellikle, *KMT2A::AFF1*, *KMT2A::MLLT3*, *KMT2A::MLLT1* füzyon genleri sıklıkla meydana gelmektedir.
- *KMT2A* yeniden düzenlenmelerinin topoizomerez II inhibitör tedavilerinden sonra geliştiği de gözlenmiştir.

- İlgili gen yeniden düzenlenmeleri olan olgularda, tirozin kinaz/PI3K/RAS sinyal yolları genlerinde de mutasyonlar gelişebilmektedir [3].

7.2.1.4 ETV6::RUNX1-Yeniden Düzenlemeleri ve ETV6::RUNX1-like ALL

- *ETV6::RUNX1* füzyonu, pediatrik prekürsör-B fenotip ALL'lerin ~%25'inde saptanmaktadır.
- Bu yüzden, ilgili hasta grubunda en yaygın genetik değişim olarak kabul edilmektedir.
- *ETV6::RUNX1* füzyonu lökomogenez sürecinde "ilk vuruş" olarak kabul edilmekte olup, tam lösemik transformasyon için sekonder genetik aberasyonların meydana gelmesi gerekmektedir.
- Bu sekonder aberasyonlar ise *ETV6*, *PAX5*, *ATF7IP* gibi genlerdeki farklı genetik değişimleri içermektedir.
- Bu belirtilen genlerin B-hücre matürasyonu ile ilişkili olduğu bilinmektedir.
- *ETV6::RUNX1* füzyonuna, en sık normal aleldeki 12p delesyonları eşlik etmektedir.
- Ayrıca *KMT2A* aberasyonları, 6q ve 9p delesyonları, bazı kromozomların trizomileri (kromozom 21, 4, 10 ve 16), ekstra *RUNX1* kopyası ve derivatif 21. kromozom gibi diğer genetik değişimlerinde eşlik edebildiği bildirilmiştir.
- Bu diğer genetik değişimler genellikle relaps hastalarında saptanmakta ve bu nedenle kötü prognostik kabul edilmektedir.
- *ETV6::RUNX1-like* ALL pediatrik B-ALL'lerin %2-3'ünü oluşturmaktadır.
- Ayrıca, *ETV6::RUNX1-like* alt tipinin >%80'si pediatrik vakalarda görülmektedir.
- Bu vakalarda, en sık *ETV6* füzyonları (*IKZF1::ETV6* ve *ETV6::ELMO1*); *TCF3::FLI1*, *ARPP21* delesyonları, *FUS::ERG* ve *IKZF1* yeniden düzenlenmeleri meydana gelmektedir.
- *ETV6::RUNX1-like* vakalarında olumlu prognostik tablo olsa da; *ETV6::RUNX1*'e sahip vakalara göre kötü prognoz göstermektedir. Bu yüzden, ilgili alt tipe daha yoğun terapi önerilmektedir [3].

7.2.1.5 iAMP21

- iAMP21, kromozom 21'in intrakromozomal amplifikasyonu olarak tanımlanmaktadır.
- iAMP21 kötü prognozla ilişkilendirilmektedir.
- Kırık-füzyon-köprü mekanizmasıyla oluşan bu amplifikasyon bölgesi, *RUNX1* genini içermektedir.
- iAMP21'e olarak sekonder aberasyonlar gelişebilmektedir.
- Sekonder sitogenetik aberasyonlar ise kromozom X, 10, veya 14'ün artışı; monozomi 7/delesyon 7q; *ATM* ve *KMT2A* genleri içeren 11q delesyonları; *ETV6* ve *RB1* genlerinin delesyonlarıdır.
- iAMP21-ALL'nin >%60'sında RAS yolağı ile ilişkili genlerde mutasyonlar ve %20'sinde *P2RY8::CRLF2* gen füzyonu meydana geldiği gözlenmiştir.
- Robertsonian tipi translokasyonun (örn: t(15;21)(q10;q10)) ve ring kromozomunun disentrik doğası, iAMP21'in gelişebilme riskini arttırmaktadır.
- iAMP21 anomalisine sahip vakaların, düşük-yoğunluk dozaj ile tedavi edildiği zaman kötü prognoz gösterdiği belirtilmektedir [3].

7.2.1.6 BCR::ABL1 ALL

- Ph kromozomu pediatrik ALL'lerin %3-4'ünde görülmekte olup; yaşa bağlı olarak ilgili anomalinin görülme sıklığı artmaktadır.

- Pediatrik ALL vakalarında, oluşan proteinin 190 kD olduğu ve kötü prognosis (5 yıllık OS: <%10) ile ilişkilendirildiği bilinmektedir.
- Ph(+) olgularda, %80 *IKZF1*, %50 *PAX5*, ve %14 *EBF1* genlerinin delesyonları bu anomaliye eşlik etmektedir.
- Ayrıca *CDKN2A/B* gen delesyonlarının da %50 oranında meydana geldiği bildirilmiştir.
- *IKZF1* ve *CDKN2A/B* genlerinin delesyonları da prognozu kötü olarak etkilemektedir [3].

7.2.1.7 BCR::ABL1-like ALL

- *BCR::ABL1*-like B-ALL'nin alt grubu olarak kötü prognosis ile ilişkilendirilmektedir.
- Çocukluk çağı ALL'nin ~%15'ini oluşturmaktadır.
- Ph(-) ALL'nin alt grubunda olmasına rağmen, Ph(+) ALL alt grubuna benzer gen ekspresyon profili göstermektedir.
- Ph-like ALL hastalarının ~%40'ında *IKZF1* mutasyonu görülmektedir.
- *BCR::ABL1*-like imzanın varlığı, kötü prognosisla ilişkilendirilmektedir.
- Bu imza, tirozin kinaz yollarını aktive eden genlerin füzyonlarını ve mutasyonlarını içermektedir.
- Bu gen füzyonları ve mutasyonları; ABL-sınıf yeniden düzenlenmeleri (*ABL1*, *ABL2*, *PDGFRA*, *PDGFRb*, *FGFR*), JAK-STAT yeniden düzenleme ve/veya mutasyonları (*CRLF2*, *EPOR*, *JAK1*, *JAK2*, *JAK3*, *TYK2*, *SH2B3*, *IL7R*); *FLT3*, *NTRK3*, *LYN*, ve *PTK2B* genlerindeki diğer yeniden düzenlenmeleridir.
- *BCR::ABL1*-like ALL'deki genetik profilendirme çalışmalarında, özellikle sitokin reseptör veya kinaz-aktive eden değişimlerin meydana geldiği gözlenmiştir.
- İlgili değişimlere yönelik tasarlanan ABL sınıfı tirozin kinaz inhibitörleri (TKI) veya *JAK* küçük molekül inhibitörlerinin önemi göz ardı edilemeyecek niteliktedir [3].

7.2.1.8 t(1;19) ve t(17;19)

- t(1;19) translokasyonu pediatrik B-ALL olgularının >%6'sında gözlenmektedir.
- Bu yeniden düzenlenmenin genellikle dengesiz olduğu ve *PBX1* distalinin duplikasyonu ile sonuçlandığı bilinmektedir.
- Ayrıca bu translokasyon, homeobox gen *PBX1*'in C-ter bölgesi ile *TCF3*'ün transaktivasyon domainin füzyonuna neden olmaktadır.
- *TCF3*, erken lenfoid gelişimi için gerekli transkripsiyon faktörlerini kodlamaktadır.
- *PBX1* ise lenfoid prekürsörlerin gelişmesi için gerekli homeodomain ailesini kodlamaktadır.
- *TCF3*-*PBX1* füzyon protein, HOX proteinlerine bağlanmaktadır. Bu yüzden, HOX ile regüle edilen gen ekspresyonun bozulmakta ve hematopoietik farklılaşmayı etkileyebilmektedir.
- t(17;19) translokasyonunda *TCF3*'ün C-ter ile *HLF*'nin dimerizasyon bölgesi ile füzyon yapmaktadır.
- Oluşan füzyon genin, *LMO2* ve *BCL2* gibi genlerin anormal ekspresyonuna sebep olduğu bilinmektedir.
- *TCF3::HLF* genellikle erişkin ALL'de görülmekte ve kötü prognosis ile ilişkilendirilmektedir [4].
- t(17;19)(q22;p13) sonucu oluşan *TCF3::HLF* füzyon geni pediatrik ALL'nin nadir alt tipini (%1) tanımlamak için kullanılmakta ve kötü prognosisla ilişkilendirilmektedir.
- *TCF3::PBX1* füzyon geni ise pediatrik ALL'lerin ~%5'ini oluşturmakta ve orta prognostik bir belirteç olarak kabul görmektedir [3].

7.2.2 Kromozomal anomaliler için laboratuvar uygulama önerileri

- Akut lösemilerde kromozomal anomaliler için örnek Kİ dokusudur.
- Eğer blast oranı yüksek ise periferik kan örneği de analizler için uygundur.
- Hücre kültürü temelli yöntemlerde anti-coagülan tüpler olarak heparinli tercih edilmektedir.
- Aspirasyon sonrası Kİ örneği kısa sürede laboratuvara ulaştırılmalıdır ve Kİ örneği en az 1 ml olmalıdır.
- Kromozom analizi için 24 ve 48 saatlik kültürler hazırlanmalıdır.
- ALL örneklerinde yüksek kolsemid konsantrasyonu veya uzun süreli muamelesi metafaz plakları elde etme oranını düşürmektedir.
- ALL'de *in vitro* hücre ölümü önemli bir durum olduğu için ilgili tanının pratiğinde çoklu kültürler önerilmektedir.
- B-ALL'de konvansiyonel sitogenetik altın standart kabul edilmektedir. Ancak, füzyon genlerin saptanmasında FISH ve RT-PCR kullanılması önerilmektedir.
- FISH paneli;
Kromozom 4, 10 ve 17 sentromerlerini,
t(12;21), t(9;22), t(1;19), t(17;19), *MLL*, *ABL1*, *ABL2*, *PDGFRB*, *CDKN2A* ve t(X:14)'ü hedef almalıdır.
- Kromozom 4, 10, 17'nin hedeflenmesi hiperdiploidinin belirlenmesi amacıyla önerilmektedir.
- t(12;21)'in tespiti için çift renkli, çift füzyon FISH probu kullanılmalıdır. Bu test iAMP21'in tespit edilmesine olanak sağlar.
- Translokasyonlar sonucunda oluşan füzyon gen transkriptleri PCR yöntemleri ile de analiz edilebilir.
- Mutasyon saptanan genlerin analizleri için ise YND platfortmları önerilmektedir.

7.3 T-Akut Lenfoblastik Lösemi

T-hücreli ALL (T-ALL) pediatrik ALL hastalarının %15'ini ve erişkin hastaların ise %25'ini oluşturmaktadır. İlgili lösemi tipinin ALL'nin agresif tipi olarak kabul edilmesine rağmen, özellikle minimal rezidüel hastalığa (MRD) yönelik geliştirilen yöntemlerle önemli gelişmeler sağlandığı görülmektedir.

7.3.1 Prognostik Genetik Faktörler Ve Analiz Yöntemleri

7.3.1.1 Prognostik genetik faktörler

T-ALL'nin genetik alt yapısının onkogenler ve onkosüpresörlerde gerçekleşen değişimler sonucu olduğu gözlenmiştir. Bu onkogenler ve onkosüpresörler bazı önemli hücresel süreçlerdeki etkilerinden dolayı, lösemnin gelişmesi ve/veya progresyonu ile ilişkilendirilmektedir. Söz konusu genetik alt yapıda driver onkogenik kanıt sunan anomaliler tip A ve B olarak gruplandırılmaktadır. Tip A anomalileri, T-hücre gelişimi, matürasyonu ve farklılaşma; ve hematopoezde önemli transkripsiyon faktörleri kodlayan onkogenlerin upregülasyonunu içermektedir. Tip B anomalileri ise epigenetik faktörler, tirozin kinazlar, sinyal yolak proteinleri ve ribozomal proteinler gibi farklı protein ailelerini kodlayan genlerdeki anomalileri ifade etmektedir [5].

Kromozomal aberasyonlar, T-ALL hastalarının %50-70'inde tespit edilebilmektedirler. En yaygın sitogenetik aberasyonların, onkogenik transkripsiyon faktörlerinin aberan ekspresyonuna sebep olan translokasyonları içerdiği görülmektedir. Ayrıca bu onkogenler baz alınarak, T-ALL'nin moleküler alt grupları oluşturulmaktadır. Delesyon 9p (%65-70) ve 6q (%20-30) gibi kopya sayısı değişimlerinin yanı sıra diğer non-subgrup-spesifik tekrarlayan aberasyonlar görülmektedir (www.mll.com).

T-ALL'nin, aktive edici *NOTCH1* mutasyonları ile *TLX1 (HOX11)*, *TLX3 (HOX11L2)*, *LYL1*, *TAL1* ve *KMT2A* transkripsiyon faktörlerinin yeniden düzenlemeleriyle karakterize olduğu görülmektedir. T-ALL vakalarının %50'sinden daha fazlasında *NOTCH1* mutasyonları, %10-15'inde ise *NOTCH1* aktivasyonuna sebep olan *FBXWY* mutasyonları gözlenmektedir. İlgili gen mutasyonları olumlu prognoz ve düşük MRD seviyeleriyle ilişkili bulunmuştur. T-ALL'de tanımlanan mutasyonlarının hastalık prognozuna etkilerinin net olmamasından dolayı, risk sınıflanmasında yer almadığı ifade edilmiştir <https://siope.eu/ESCP/members>.

7.3.1.2 Kromozomal anomaliler için laboratuvar uygulama önerileri

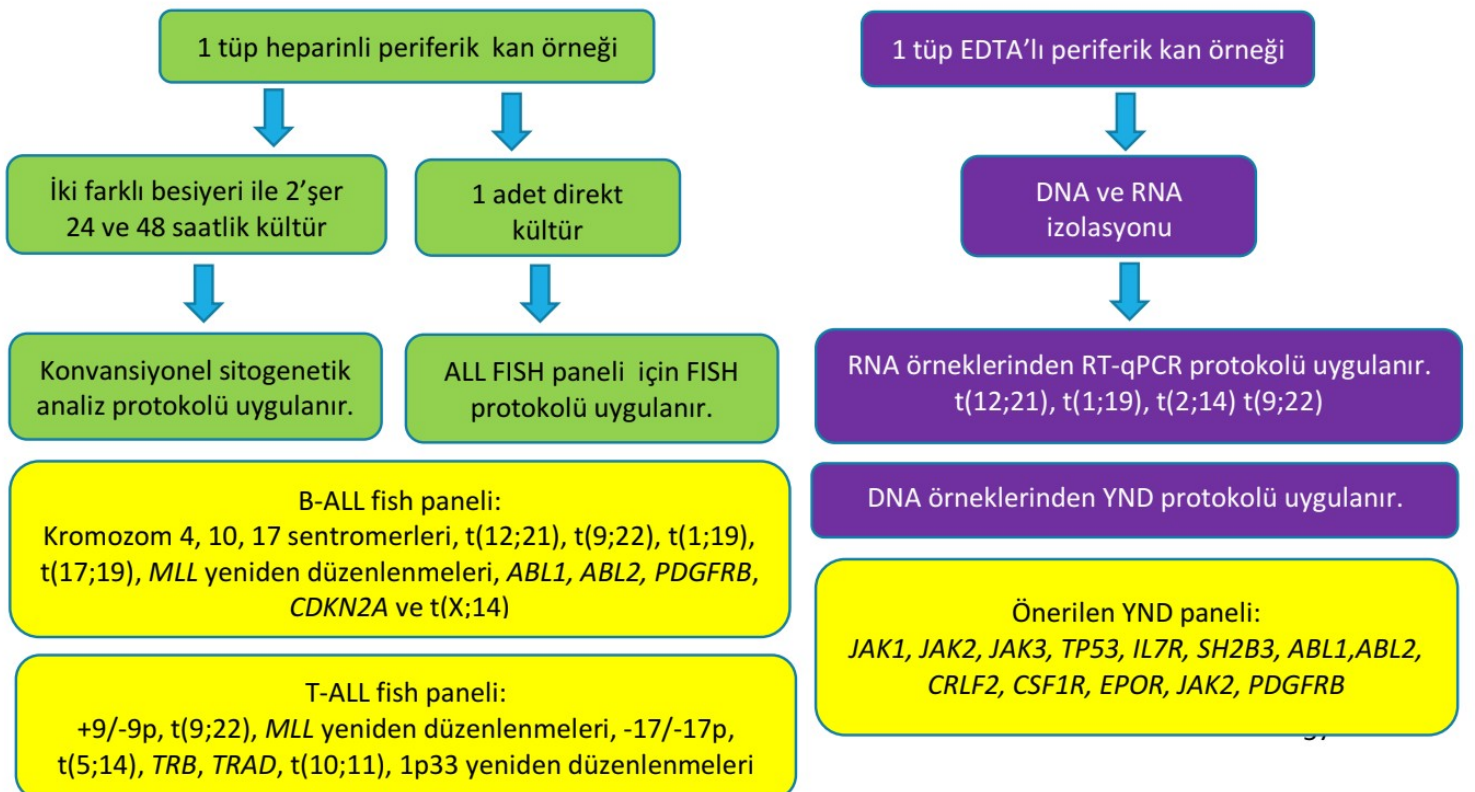
- B-ALL'de olduğu gibi kromozom anomalilerin tespiti için Kİ örneği tercih edilmelidir.
- Heparinli tüpler içerisinde, en kısa sürede örneklerin laboratuvara ulaştırılması gerekmektedir.
- 24 ve 48 saatlik kültürler ile çalışılması önerilmektedir.
- T-ALL FISH panelinin aşağıdaki anomalileri hedeflemesi önerilmektedir <https://www.mayocliniclabs.com/test-catalog/overview/609567>.
 - +9/9p-, *CDKN2A::D9Z1*
 - t(9;22) ve *ABL1* amplifikasyonu, *ABL1::BCR*
 - 11q23 yeniden düzenlenme, *MLL (KMT2A)* break-apart
 - -17/17p-, *TP53::D17Z1*
 - t(5;14), *TLX3::BCL11B*
 - 7q34 yeniden düzenlenme, *TRB* break-apart
 - 14q11.2 yeniden düzenlenme, *TRAD* break-apart
 - t(10;11), *MLLT10::PICALM*
 - 1p33 yeniden düzenlenme, *TAL1/STIL*
- t(9;22)'yi hedefleyen prob çift füzyon, çift renkli olmalıdır ve eğer ekstra bir *ABL* sinyali saptanır ise *ABL* break apart prob ile FISH testi çalışılmalıdır. Böylelikle *ABL* yeniden düzenlenmesi ile trizomi arasındaki ayırım yapılabilir.
- *MLL* break apart prob ile yapılan FISH çalışmasının pozitif sonuçlanması durumunda, partnerin belirlenmesi için aşağıdaki anomalilere yönelik FISH testi çalışılmalıdır.
 - t(11;19)(q23;p13.3) *MLL::MLLT1*
 - t(6;11)(q27;q23) *MLLT4(AFDN)::MLL*
 - t(4;11)(q21;q23) *AFF1::MLL*
 - t(9;11)(p22;q23) *MLLT3::MLL*
 - t(10;11)(p12;q23) *MLLT10::MLL*
 - t(11;19)(q23;p13.1) *MLL::ELL*
- *TRB* break apart prob ile yapılan FISH çalışmasının pozitif sonuçlanması durumunda, partnerin belirlenmesi için aşağıdaki anomalilere yönelik FISH testi çalışılmalıdır.
 - t(7;10)(q34;q24) *TRB::TLX1*
 - t(7;11)(q34;p15) *TRB::LMO1*
 - t(7;11)(q34;p13) *TRB::LMO2*
 - t(6;7)(q23;q34) *MYB::TRB*

Gen mutasyonları ve füzyon genler için ise YND yöntemleri kullanılmaktadır.

Özet;

- Dünya sağlık örgütü sitogenetik yöntemlerin dışında metotların kullanımına imkan sunulması amacıyla terminolojide değişiklikler yapmıştır.
- Sınıflandırmaya *ETV6::RUNX1*-like B-ALL sınıfı eklenmiştir.
- Birçok yeni anomaliler tanımlanmaya başlamıştır. (örn: *DUX4*, *MEF2D*, *ZNF384* VE *NUTM1* yeniden düzenlenmeleri, *IGH::MYC* füzyonu, *PAX5alt* ve *PAX5 p.P80R*)
- B-ALL'de standart risk ile ilişkilendirilen genetik anomaliler; Hiperdiploidi (51-65 kromozom), *t(12;21)(p13;q22): ETV6::RUNX1*, *t(1;19)(q23;p13.3): TCF3::PBX1*, *DUX4* yeniden düzenlenmeleri, *PAX5 P80R*, *t(9;22)(q34;q11.2): BCR::ABL*, *IKZF1* plus
- B-ALL'de kötü prognostik risk ile ilişkilendirilen genetik anomaliler ; Hipodiploidi (<44 kromozom), *TP53* mutasyonu, *KMT2A* yeniden düzenlenmeleri [*t(9;11)* ve diğerleri], *IGH* yeniden düzenlenmesi (*IG::IL3*), *HLF* yeniden düzenlenmesi, *ZNF384* yeniden düzenlenmesi, *MEF2D* yeniden düzenlenmesi, *MYC* yeniden düzenlenmesi, *BCR::ABL1*-like ALL [*JAK-STAT (CRLF2r, EPORr, JAK1/2/3r, TYK2r, SH2B3, IL7R, JAK1/2/3* mutasyonları) *ABL* sınıfı (*ABL1, ABL2, PDGFRA, PDGFRB, FGFR* yeniden düzenlenmeleri) diğer (*NTRKr, FLT3r, LYNr, PTK2Br*)], *PAX5alt*, *t(9;22)(q34;q11.2): BCR::ABL1 + IKZF1* plus ve/veya KML öyküsü, intrakromozomal kromozom 21 amplifikasyonu (*iAMP21*), *KZF1* anomalileri, kompleks karyotip (5 veya daha fazla kromozomal anomaliler)
- *t(12;21)* kriptik bir translokasyon olup, FISH veya PCR ile tespit edilebilir.
- T-ALL'de FISH paneli; *+9/9p-*, *CDKN2A::D9Z1*, *t(9;22)* ve *ABL1* amplifikasyonu, *ABL1::BCR*, *11q23* yeniden düzenlenme, *MLL (KMT2A)* break-apart, *-17/17p-*, *TP53::D17Z1*, *t(5;14)*, *TLX3::BCL11B*, *7q34* yeniden düzenlenme, *TRB* break-apart, *14q11.2* yeniden düzenlenme, *TRAD* break-apart, *t(10;11)*, *MLLT10::PICALM*, *1p33* yeniden düzenlenme, *TAL1/STIL*
- T-ALL'nin, aktive edici *NOTCH1* mutasyonları ile *TLX1 (HOX11)*, *TLX3 (HOX11L2)*, *LYL1*, *TAL1* ve *KMT2A* transkripsiyon faktörlerinin yeniden düzenlenmeleriyle karakterize olduğu görülmektedir.

ALL TANILI HASTALARDA GENETİK TANI ALGORİTMASI



Kaynaklar

1. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J* 2017;7:e577.
2. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IBO, Berti E, Bhagat G, Borges AM, Boyer D, Calaminici M, Chadburn A, Chan JKC, Cheuk W, Chng WJ, Choi JK, Chuang SS, Coupland SE, Czader M, Dave SS, de Jong D, Du MQ, Elenitoba-Johnson KS, Ferry J, Geyer J, Gratzinger D, Guitart J, Gujral S, Harris M, Harrison CJ, Hartmann S, Hochhaus A, Jansen PM, Karube K, Kempf W, Khoury J, Kimura H, Klapper W, Kovach AE, Kumar S, Lazar AJ, Lazzi S, Leoncini L, Leung N, Leventaki V, Li XQ, Lim MS, Liu WP, Louissaint A, Jr., Marcogliese A, Medeiros LJ, Michal M, Miranda RN, Mitteldorf C, Montes-Moreno S, Morice W, Nardi V, Naresh KN, Natkunam Y, Ng SB, Oschlies I, Ott G, Parrens M, Pulitzer M, Rajkumar SV, Rawstron AC, Rech K, Rosenwald A, Said J, Sarkozy C, Sayed S, Saygin C, Schuh A, Sewell W, Siebert R, Sohani AR, Tooze R, Traverse-Glehen A, Vega F, Vergier B, Wechalekar AD, Wood B, Xerri L, Xiao W. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia* 2022;36:1720-1748.
3. Lejman M, Chałupnik A, Chilimoniuk Z, Dobosz M. Genetic Biomarkers and Their Clinical Implications in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *Int J Mol Sci* 2022;23.
4. Mullighan CG. Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest* 2012;122:3407-3415.
5. Bardelli V, Arniani S, Pierini V, Di Giacomo D, Pierini T, Gorello P, Mecucci C, La Starza R. T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Biomarkers and Their Clinical Usefulness. *Genes (Basel)* 2021;12.

MULTIPLE MYELOMA

8. BÖLÜM

Yazarlar:

Sevgi Işık

Sevilhan Artan



8. MULTİPLE MYELOMA

Multiple myeloma (MM), klinik heterojenite gösteren ve tedavi edilemeyen plazma hücre malignitesi olarak tanımlanmaktadır. Multiple myelomanın tüm hematolojik malignitelerin %10'unu oluşturduğu ve erişkin dönemde (medyan yaş=65) görüldüğü ifade edilmektedir [1].

8.1 TANI VE SINIFLANDIRMA

International Myeloma Working Group (IMWG)'na göre multiple myeloma tanısı için aşağıdaki iki kriterin karşılanması gerekmektedir;

- Klonal kemik iliği plazma hücreleri \geq 10 veya biyopsi ile kanıtlanmış kemik veya ekstramedüller plazmasitom,
- Aşağıdaki miyelomu tanımlayan olaylardan herhangi biri veya daha fazlasının saptanması
 - Altta yatan plazma hücresi proliferatif bozukluğuna atfedilebilecek son organ hasarının kanıtı, özellikle: kalsemi, böbrek yetmezliği, anemi, kemik lezyonları
 - Klonal kemik iliği plazma hücresi yüzdesi \geq 60
 - Free light chain (FLC) oranı \geq 100 (serbest hafif zincir seviyesi \geq 100 mg/L olmalıdır)
 - Magnetic resonance imaging (MRI) çalışmalarında >1 fokal lezyon (en az 5 mm boyutunda)

8.2 PROGNOSTİK GENETİK FAKTÖRLER VE ANALİZ YÖNTEMLERİ

8.2.1 Prognostik genetik faktörler

Multiple myeloma tek bir hastalık olarak kabul edilse de, aslında sitogenetik açıdan farklı plazma hücre malignitelerinin birikimidir (Tablo 8.1) [1].

Tablo 8.1: MM'da primer moleküler sitogenetik sınıflandırma

Alt tip	Gen/kromozom	Görülme sıklığı (%)
Hiperdiploid MM	1, 13 ve 21. kromozomlar hariç, tek sayı olarak nitelendirilen (1, 3, 5 vb.) kromozomları içeren tekrarlayan trizomiler	45
IgH translokasyonu pozitif MM		40
t(11;14)(q13;q32)	<i>CCND1</i>	20
t(6;14)(p21;q32)	<i>CCND3</i>	5
t(4;14)(p16;q32)	<i>NSD2</i>	10
t(14;16)(q32;q23)	<i>C-MAF</i>	4
t(14;20)(q32;q11)	<i>MAFB</i>	<1
Diğer IgH translokasyonları, diğer sitogenetik anomaliler ya da normal karyotip		5

- Trizomiler ve IgH translokasyonları primer sitogenetik anomaliler olarak kabul edilmektedir.
- Hastalık seyri boyunca 1q artışı, del(1p), del(13) ve *MYC* translokasyonlarının dahil olduğu ikincil anomaliler ortaya çıkar.
- Tespit edilen anomaliler hastalık fazı ile ilişkilidir (Tablo 8.2).

- Bir hastada 400'den fazla mutasyon gelişmektedir ve en sık mutasyona uğrayan genler immünoglobulin ağır ve hafif zincir genleri, *NRAS*, *KRAS* ve *BRAF* genleridir [1].

Tablo 8.2: Sitogenetik anomaliler ile klinik bulgular ve prognoz arasındaki ilişki

Sitogenetik anomali	Anomalinin saptandığı klinik evre	
	Smoldering Multiple Myeloma	Multiple Myeloma
Trizomiler	Ortalama-risk, Ortalama TTP 3 yıl	İyi prognoz, Standart-risk, Medyan OS 7-10 yıl, Lenalidomid bazlı tedaviye mükemmel yanıt
t(11;14)(q13;q32)	Ortalama-risk, Ortalama TTP 5 yıl	İyi prognoz, Standart-risk, Medyan OS 7-10 yıl
t(6;14)(p21;q32)	Standart-risk Ortalama TTP 5 yıl	İyi prognoz, Standart riskli MM, Medyan OS 7-10 yıl
t(4;14)(p16;q32)	Yüksek-risk Ortalama TTP 2 yıl	Ortalama-risk, Medyan OS 5 yıl, Bortezomid bazlı başlangıç terapiye ihtiyaç, Erken ASCT, ardından bortezomib bazlı konsolidasyon tedavisi
t(14;16)(q32;q23)	Standart-risk Ortalama TTP 5 yıl	Yüksek-risk, Medyan OS 3 yıl, Yüksek düzeyde FLC ile ilişkilidir ve %25'i ilk MDE olarak akut böbrek yetmezliği ile ortaya çıkar
t(14;20)(q32;q11)	Standart-risk Ortalama TTP 5 yıl	Yüksek-risk, Medyan OS 3 yıl,
1q21 artışı	Yüksek-risk Ortalama TTP 2 yıl	Orta-risk, Medyan OS 5 yıl,
Del(17p)	Yüksek-risk Ortalama TTP 2 yıl	Yüksek-risk, Medyan OS 3 yıl,
Trizomiler ve bir IgH translokasyonu	Standart-risk Ortalama TTP 5 yıl	Yüksek riskli IgH translokasyonları ve del 17p tarafından sağlanan olumsuz prognozu iyileştirebilir
İzole monozomi 13 veya izole monozomi 14	Standart-risk Ortalama TTP 5 yıl	Prognostik etkisi net değil
Normal	Düşük-risk Ortalama TTP 7-10 yıl	İyi prognoz, Muhtemelen düşük tümör oranını yansıtmakta, Medyan OS >7-10 yıl
TTP: time to progression, OS: overall survival, ASCT: Otolog kök hücre nakli		

Revised International Staging System (RISS); tümör yükü (ISS) ve hastalık biyolojisini göz önünde bulundurarak bir prognostik indeks oluşturmuştur (Tablo 8.3) [2].

Tablo 8.3: MM’da standart risk faktörleri ve RISS

ISS evre	
I	Serum β_2 -mikroglobulin < 3.5 mg/L, serum albümin \geq 3.5 g/dL
II	ISS evre I veya III değil
III	Serum β_2 -mikroglobulin \geq 5.5 mg/L
Sitogenetik anomali (SA)	
Yüksek risk	del(17p) ve/veya translokasyon t(4;14) ve/veya translokasyon t(14;16) varlığı
Standart risk	Yüksek risk SA bulunmaması
LDH	
Normal	Serum LDH < normalin üst sınırı
Yüksek	Serum LDH > normalin üst sınırı
RISS evre	
I	iFISH ve normal LDH’ye göre ISS aşama I ve standart riskli SA
II	RISS evre I ve III değil
III	ISS evre III ve iFISH ile yüksek riskli SA veya yüksek LDH

RISS’de yaygın görülen 3 tip SA belirteç olarak kullanılırken Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) ek ayrıntılara da yer vermektedir (tablo 8.4).

Tablo 8.4: Mayo Clinic Risk sınıflandırması (mSMART)

Risk Grup	Anomali saptanan yeni tanı hastaların yüzdesi
Standart Risk	%60
Trizomiler t(11;14) t(6;14)	
Yüksek risk	%40
t(4;14) t(14;16) t(14;20) del(17p) 1q artışı Duble – Hit myeloma : Herhangi 2 yüksek risk faktörü + Triple – hit myeloma: Herhangi 3 ya da daha fazla yüksek risk faktörü +	

Multiple miyelomda saptanan gen mutasyonlarından *KRAS* mutasyonlarının, prognostik etkisinin nötral olduğu, *NRAS* mutasyonlarının ise kötü prognozla ilişkilendirildiği bilinmektedir. *TP53*, *ATR*, *ATM*, *ZFH4* ve *BRAF* gen mutasyonlarının sağkalım üzerinde olumsuz etkileri bulunurken, *EGR1*, *IRF4* ve *TRAF3* gen mutasyonlarının iyi prognozla ilişkisi gözlenmiştir. Son olarak *FAM46C* gen mutasyonlarının prognostik etkisi olmadığı bildirilmiştir [3].

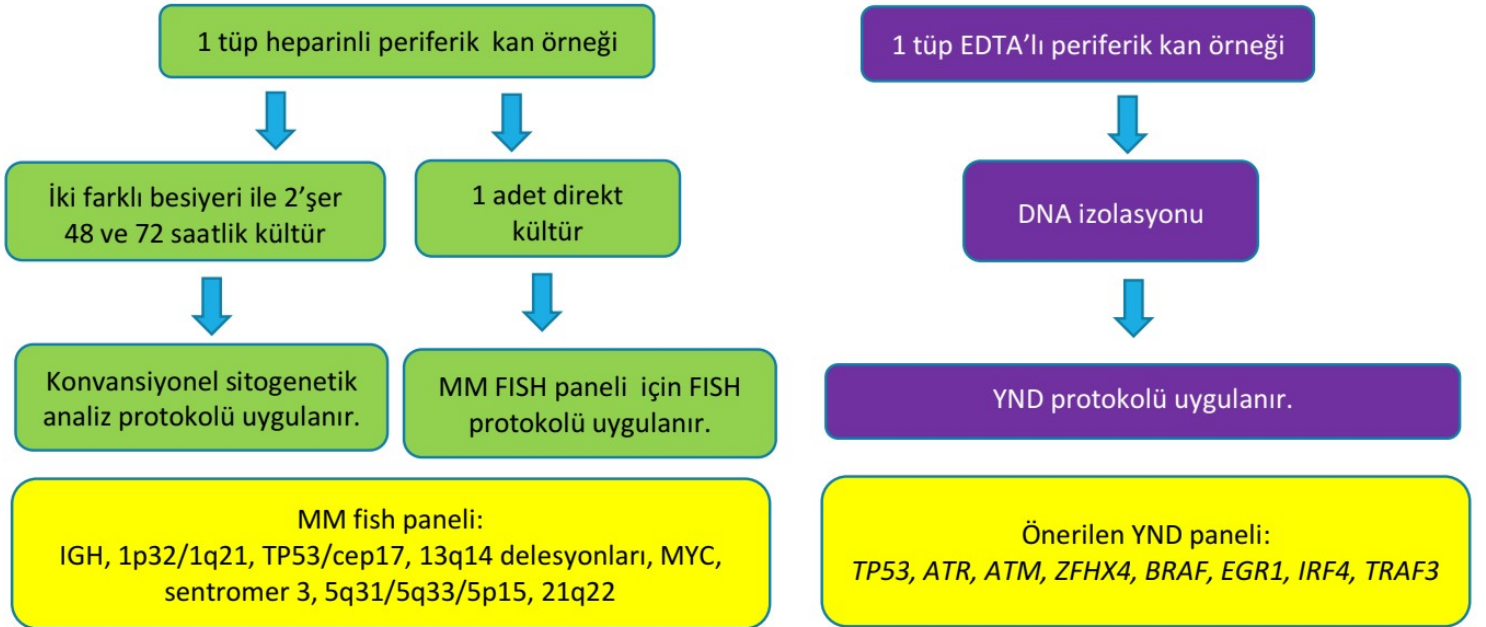
8.2.2 Analiz yöntemleri:

- Multiple miyelomda konvansiyonel ve moleküler sitogenetik analizler kemik iliğinden (Kİ) veya doku spesifik çalışılmalıdır.
- Kİ örneğinin ilk aspirat olması ve heparinli tüp içerisinde uygun zamanda gönderilmesi tercih edilmektedir.
- MM'da klonal aberasyon saptama oranı %20-50 olması nedeniyle;
 - Plazma hücrelerinin saflaştırılması ve spesifik olarak tanımlanması için CD138+ antikorları kullanılması gerekmektedir.
 - CD138+ plazma hücrelerinin pozitif seleksiyonu için manyetik-boncuk sistemleri tercih edilmektedir.
- MM olgularına çalışılması önerilen FISH paneli;
 - IGH breakapart prob
 - 1p32/1q21 lokus spesifik prob
 - P53/cep17 lokus spesifik prob
 - 13q14/13q34 lokus spesifik prob
 - MYC BA prob
 - Kopya sayılarını belirlemek için 3, 5, 7 ve 21 numaralı kromozomları hedef alan problemleri içermelidir.
- Yukarıda klinik önemi bilinen problemlerin eşik değeri, laboratuvara göre ve antikor ile saflaştırma yapıp yapılmamasına göre belirlenmelidir (antikor ile saflaştırma yapıldığında önerilen eşik değerleri: füzyon ve breakapart problemler için %10, sayısal anomaliler tespit etmede kullanılan problemler için ise %20).
- Deneyimli personeller tarafından en az 200 nükleus değerlendirilmelidir.
- Konvansiyonel sitogenetik analiz için özellikle uzun süreli kültür (48-72 saat) yapılmalıdır. Ayrıca 12-O-tetradekanoylforbol-13-asetat ve sitokinler (interlökin 6 ve granülosit-makrofaj koloni-stimüle edici faktör) gibi stimüle edici faktörler kullanılmalıdır.
- Raporlarda plazma hücrelerin oranı, kullanılan yöntem ve elde sonuçlar açıkça ifade edilmelidir [4].
- Gen mutasyonlarının analizi için ise YND tabanlı sistemler kullanılabilir.

Özet;

- Multiple myeloma sitogenetik açıdan farklı plazma hücrelerinin birikimidir.
- Hiperdiploid karyotip (1, 13 ve 21.kromozomlar hariç) %45 oranında saptanır.
- *IGH* translokasyonlarının görülme sıklığı %40'dır.
- %5 oranında da diğer sitogenetik anomaliler saptanır.
- Trizomiler ve *IGH* translokasyonları primer anomaliler olarak kabul edilmektedir.
- 1q artışı, del(1p) ve *MYC* translokasyonları ise ikincil anomaliler arasında yer almaktadır.
- Saptanan sitogenetik anomaliler hastalık fazı ile ilişkilidir.
- Hastalık risk sınıflandırmasında sitogenetik anomalilerden faydalanılmaktadır.
- ISS'de del(17p), t(4;14) ve t(4;16) yüksek risk olarak değerlendirilir.
- mSMART'a göre trizomiler, t(11;14) ve t(6;14) standart risk;t(4;14), t(14;16), t(14;20), del(17p), 1q artışı, double-hit myeloma ve triple-hit myeloma yüksek risk grubunda yer almaktadır.
- Sitogenetik analizler için heparinli tüpe alınmış kemik iliği örneği tercih edilmelidir.
- CD138+ plazma hücrelerinin izole edilmesi gerekmektedir.
- FISH çalışmalarında eşik değerleri CD138+ hücrelerin izole edilip edilememesine göre değişkenlik göstermektedir.
- Konvansiyonel sitogenetik analiz için 48-72 saatlik kültürler tercih edilmelidir.
- MM'da sık gözlenen mutasyonlar için YND analizleri yapılabilir.

MM TANILI HASTALARDA GENETİK TANI ALGORİTMASI



Kaynaklar

1. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2022 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol* 2022;97:1086-1107.
2. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, Richardson P, Caltagirone S, Lahuerta JJ, Facon T, Bringhen S, Gay F, Attal M, Passera R, Spencer A, Offidani M, Kumar S, Musto P, Lonial S, Petrucci MT, Orłowski RZ, Zamagni E, Morgan G, Dimopoulos MA, Durie BG, Anderson KC, Sonneveld P, San Miguel J, Cavo M, Rajkumar SV, Moreau P. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol* 2015;33:2863-2869.
3. Cardona-Benavides JJ, de Ramón C, Gutiérrez NC. Genetic Abnormalities in Multiple Myeloma: Prognostic and Therapeutic Implications. *Cells* 2021;10.
4. Kishimoto RK, de Freitas SL, Ratis CA, Borri D, Sitnik R, Velloso ED. Validation of interphase fluorescence in situ hybridization (iFISH) for multiple myeloma using CD138 positive cells. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2016;38:113-120.

HEMATOLOJİK MALİGNİTELERDE YENİ NESİL DİZİ ANALİZLERİNİN KULLANIMI

9. BÖLÜM

Yazarlar:

Sinem Kocagil

Ezgi Susam



9. HEMATOLOJİK MALİGNİTELERDE YENİ NESİL DİZİ (YND) ANALİZLERİNİN KULLANIMI

YND veya ikinci nesil dizi analizleri, birinci nesil dizi analizlerine alternatif olarak ortaya çıkmış yöntemlerdir. Bu yöntem ile hızlı ve efektif bir şekilde yüksek hacimli veri analizinin yapılması sağlanmaktadır. Bu yöntem temel prensip olarak dört basamaktan oluşmaktadır. Kütüphane hazırlığı olarak adlandırılan ilk kısım, DNA'nın rastgele fragmanlara ayrılarak incelenmek istenen bölgenin işaretleyiciler/barkodlar yardımıyla tespit edilmesidir. İkinci kısım incelenecek fragmanların amplifikasyonu ve eş zamanlı olarak dizilenmesi işlemidir. Üçüncü kısım ise dizileme sonrası ham verinin oluşturulması, bunu takiben çeşitli biyoinformatik algoritmalar aracılığı ile referans dizi üzerine hastaya ait dizinin haritalanması ve hastaya ait varyantların referans genoma kıyasla tespit edilip belirlenmesidir. Dördüncü ve son basamakta ise veri analizi yer almaktadır. Veri analizi için saptanan varyantların mutlaka Tıbbi Genetik uzmanları, biyolog, moleküler biyolog, biyoinformatik uzmanları gibi ilgili alandaki uzmanlar tarafından değerlendirilmesi ve klinik öneminin yorumlanması/raporlanması gerekmektedir[1].

YND, 2000'li yılların başından itibaren öncelikli olarak germline varyantların tanısında olmak üzere rutinde kullanılmış ve halen kullanılmaktadır. Hematolojik malignitelerde de sıklıkla hastalık ilişkili prognostik, teröpatik ve tanısal belirteç olarak kullanılan tek nükleotid değişimleri, in/del varyantlar, füzyon genler ve kopya sayısı değişimlerini saptamak için YND analizlerine başvurulmaktadır. Somatik ve germline varyantların analizlerinde farklı biyoinformatik algoritmalarının/pipelineların kullanılması ve her basamakta kalite skorlarının değerlendirilmesi oldukça önemlidir. Analiz sonucunda yorumlanmak üzere tespit edilen varyantların okuma derinliği, amplikonların okunma yönü ve genotip kalitesi dikkat edilmesi gereken durumlardır[2]. Tümör dokusunun heterojenitesi ve klonalite ihtimali göz önünde bulundurulduğunda YND'de tüm somatik varyantlar için artmış okuma derinliğine (>1000x) ulaşılmış olması oldukça önemlidir. Variant allele frequency (VAF) saptanan varyanta ait okuma derinliğinin ilgili noktanın toplam okuma derinliğine oranı olup bu değer germline varyantlar için genellikle diploid genomun zigosite (heterozigot - %50, homozigot - %100) göstergesidir; ancak somatik analizlerde tümör heterojenitesine bağlı olarak değişkenlik gösterebileceği akılda tutulmalıdır. Çalışmalar sonucunda VAF değeri %40-60 arasında saptanan varyantların, konstitüsyonel bir değişim olması ihtimali nedeniyle germline varyantın tespit edilebilmesi için farklı dokulardan çalışılacak ek genetik tetkiklerle doğrulama yapılması önerilmektedir [3].

YND sayesinde tek bir gen, hastalık özelinde oluşturulmuş paneller aracılığıyla eş zamanlı olarak çok sayıda gen, tüm ekzom veya tüm genom gibi incelemeler yapmak mümkündür. YND hematolojik malignite hastalarında, sıklıkla hastalık özelinde oluşturulmuş çok sayıda genin yer aldığı paneller aracılığı ile uygulanmaktadır. Somatik varyantların değerlendirilmesi için rutinde sıkça kullanılan qPCR, Sanger dizi analizi gibi yöntemler ile YND'nin karşılaştırılması Tablo 1'de yer verilmiştir [4].

Tablo 9.1: Sanger sekans, qPCR ve YND kullanım alanları, avantajları ve dezavantajları

Metod	Avantajları	Dezavantajları	Uygulama alanı
qPCR	<ul style="list-style-type: none"> Basit iş akışı ve yöntem Uygun fiyat/performans 	<ul style="list-style-type: none"> Gen, belli bir gen bölgesine veya füzyonlara spesifik İncelenmek istenen nokta mutasyonu, gen füzyonu vb. dışında keşif gücü yok 	<ul style="list-style-type: none"> Özgün bir gen veya gen bölgesine spesifik
Sanger	<ul style="list-style-type: none"> Basit iş akışı ve yöntem Uygun fiyat/performans 	<ul style="list-style-type: none"> Gen, belli bir gen bölgesine spesifik 	<ul style="list-style-type: none"> Özgün bir gen veya gen bölgesine spesifik
YND	<ul style="list-style-type: none"> Yüksek sensivite Keşif, yeni varyant saptama gücü var Düşük DNA konsantrasyonlarıyla yüksek hacimli veri Varyant çözünürlüğü yüksek 	<ul style="list-style-type: none"> Yüksek hacimli verinin işlenmesi için biyoinformatik ihtiyacı Varyantların klasifikasyonu ve yorumlanması Sarf malzemesi fiyatları yüksek olması nedeni ile az örnek sayıları için fiyat performans uygunluğu düşük Raporlanma süresi uzun 	<ul style="list-style-type: none"> Hedeflenmiş çok sayıda gen eş zamanlı olarak incelenebilir

Tablo 9.2: Kanserde sekans varyantlarının yorumlanması ve raporlanması

Tier I: Yüksek klinik önemi olan varyantlar <i>Teröpatik, prognostik ve tanısal belirteçler</i>	Tier II: Potansiyel klinik öneme sahip varyantlar <i>Teröpatik, prognostik ve tanısal belirteçler</i>	Tier III: Klinik önemi bilinmeyen varyantlar	Tier IV: Benign ve olası benign varyantlar
Düzey A: FDA tarafından onaylanmış ve profesyonel kılavuzlara girmiş tedaviler	Düzey C: FFPE tarafından farklı tümör tiplerinde kullanımı onaylanmış tedaviler veya araştırma amaçlı yapılan tedavi çalışmaları Çok sayıda küçük ölçekli çalışma sonucunda oluşan çeşitli konsensus	Genel popülasyonda / spesifik bir alt gruba ait popülasyon veritabanında, pankanser veya tümör spesifik varyant veritabanlarında yer almayan varyantlar Yayımlanmış ikna edici kanıt içeriği olmayan	Genel popülasyonda/ spesifik bir alt gruba ait popülasyon veritabanında (1000 genome, GnomAD vb) saptanan varyantlar Kanserle ilişkilendirilmiş yayınlanmış kanıt bulunmayan varyantlar

	lar doğrultusunda		
Düzyey B: Geniş ölçekli çalışmalarda ve alanında uzmanlar tarafından oluşturulmuş konsensüslerde yer alan tedaviler	Düzyey D: Preklinik çalışmalarda ve ortak bir konsensüs olmadan birkaç olgu sunumunda yer alan		

Somatik varyantlar için hastalarda saptanan varyantlar hastanın klinik bulguları ve histopatolojik tanısı dahilinde yorumlanmalı, güncel varyant klasifikasyon önerilerinden faydalanılmalıdır (Tablo 2). American College of Medical Genetics, American Society of Clinical Oncology, College of American Pathologists'in ortak konsensüsü olarak 2017 yılında yayınlanan "Kanserde Sekans Varyantlarının Yorumlanması ve Raporlanması" somatik varyantların raporlanmasında en sık başvurulan kılavuzdur. Bu kılavuzun önerileriyle saptanan somatik varyantların kanıt düzeyleri (Düzyey A, B, C, D) doğrultusunda, dört kategori (*Tier I, II, III, IV*) altında incelenmesi önerilmiştir. AMP/ACMG kanserde sekans varyantları raporlanma kriterlerine Tablo 2'de yer verilmiştir.

Tier I olarak adlandırılan ilk kategori yüksek klinik önemi olan teröpatik, prognostik ve tanısall belirteçlerin dahil olduğu Düzyey A ve B kanıtlarını karşılayan varyantları içermektedir. Tier II olarak adlandırılan potansiyel klinik öneme sahip varyantlar ise Düzyey C ve B kanıtlarını karşılayan varyantları içermektedir. Tier III varyantlar, klinik önemi bilinmeyen varyantlar olarak sınıflandırılmaktadır. Tier IV varyantlar ise benign ve olası benign varyantlar olup genel popülasyon veritabanlarında yer alan ve kanserle ilişkilendirilmiş yayınlanmış kanıt bulunmayan varyantlardır[3,5].

Saptanan somatik varyantların yorumlanması ve klasifikasyonu için çeşitli veritabanlarında yararlanılmaktadır. Bu veritabanları ve detayları ile ilgili bilgiler Tablo 3'de özetlenmiştir.

Tablo 9.3: Somatik sekans varyantlarının analizinde kullanılan güncel veritabanları

<i>Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC)</i> https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic
<i>My Cancer Genome</i> https://www.mycancergenome.org/
<i>Personalized cancer therapy, MD Anderson Cancer Center</i> https://pct.mdanderson.org
<i>cBioPortal, Memorial Sloan Kettering Cancer Center</i> http://www.cbioportal.org
<i>International Cancer Genome Consortium</i>

https://dcc.icgc.org
Pediatric Cancer Genome Project (St. Jude Children's Research Hospital–Washington University) https://permalinks.stjude.cloud/permalinks/pcgp
OnkoKB™ MSK's Precision Oncology Knowledge Base https://www.oncokb.org/
Varsome The Human Genomics Community https://varsome.com/
Franklin by Genoox https://franklin.genoox.com/clinical-db/home

Tier I ve II varyantlar, klinik önemi bilinen değişimler olması nedeniyle raporlarda mutlaka yer verilmesi gereken değişimlerdir. Tier III değişimler klinik önemi bilinmeyen değişimler olduğu belirtilerek rapora ilave edilebilir, Tier IV değişimlerin ise germline olduğundan şüpheleniliyorsa (VAF \geq %50) konfirmasyon testlerinin yapılması sonrası ek bir başlık altında raporlanması gerekmektedir.

Raporlama sürecinde dikkat edilmesi önerilen noktalar arasında, incelenen dokudaki tümör dokusunun yüzdesinin ve histopatolojik tanının bilinmesi gerekliliğidir. Saptanmış olan varyantların COSMIC veritabanı gibi veritabanlarında daha önce bildirilip bildirilmediği, saptanan varyantın allel frekansı ve saptanan varyantın tanı özelinde güncel kılavuzlarca varyant klasifikasyonuna (Tier I, II, III) raporda yer verilmelidir. Kanıt düzeyleri doğrultusunda mevcut olan teröpatik hedefler, prognostik veya tanısal belirteçler de hasta/hastalık özelinde belirtilmelidir.

Minimal Rezidüal Hastalık Takibi ve YND

Minimal rezidüal hastalık takibinin YND analizi ile yapılması son yıllarda geniş hasta kohortlarında gerçekleştirilmeye başlanmıştır. Eş zamanlı çok sayıda genin değerlendirilebilir olması, yeni varyantlara özgün primer hazırlığı gerektirmemesi ve küçük klonlarda yer alan düşük frekanslı (VAF \geq 0.1%) somatik mutasyonları tespit edebilir olması nedeniyle YND'ler MRD takibinde geliştirilebilir bir yöntem olarak qPCR ve MFC'ye alternatif olabileceği düşünülmektedir [6].

9.1 Akut Miyeloid Lösemi

Akut miyeloid lösemi tanılı hastalarda prognostik ve terapötik etki taşıyan mutasyonların tanımlanması ile birlikte, tüm AML vakaları için moleküler profillemeye yapılması tanısal analizlerin standart bir parçası haline gelmiştir. Tablo 4'de yer alan *FLT3*, *IDH1*, *IDH2*, *NPM1* genlerindeki özgün mutasyonların 3-5 iş günü içerisinde sonuç verilecek şekilde tanı anında periferik kan/kemik iliği örneklerinde değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu genetik aberasyonların ilk basamak tedavi planlamasında önemli olmasından ve hastalığın hızlı aksiyon alınması gereken bir hastalık olmasından dolayı, tanı anında sıklıkla teröpatik hedef olan genlerdeki varyantların değerlendirilmesi için hızlı ve basit teknikler olarak fragman analizi, qPCR vb konvansiyonel yöntemlere başvurulmaktadır [7].

Tablo 9.4: Konvansiyonel yöntemler ile değerlendirilen genler ve saptanan varyantlar

Gen	Varyant
<i>FLT3</i>	ITD, TKD mutasyonları
<i>NPM1</i>	Ekzon 12 çerçeve kayması mutasyonlar
<i>IDH1</i>	Yanlış anlamı: R132 kodon

IDH2	Yanlış anlamlı: R140, R172
------	----------------------------

WHO 2022 AML klasifikasyonunda prognostik ve tanısal belirteçler olarak yer alan *CEPBA*, *DDX41*, *TP53*, *ASXL1*, *BCOR*, *EZH2*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1* ve/veya *ZRSR2* genlerinin mutasyonlarının ilk tedavi kür döngüsü sırasında sonuçlanacak şekilde değerlendirilmesi önerilmektedir. YND panelleri ile yapılacak çalışmalarda bu süre zarfında raporlamanın yapılmasına dikkat edilmelidir [8]. Bu genlere ilave olarak AML olgularında *NKRD26*, *BCORL1*, *BRAF*, *CBL*, *CSF3R*, *DNMT3A*, *ETV6*, *GATA2*, *JAK2*, *KIT*, *KRAS*, *NRAS*, *NF1*, *PHF6*, *PPM1D*, *PTPN11*, *RAD21*, *SETBP1*, *TET2*, *WT1* genlerinin dizilenmesi de önerilmektedir; ancak bu genlerin aksiyon alınabilir tedavi hedefleri olmaması, hastalığın ileriki takibi (MRD) açısından değerlendirilebilir olmasından dolayı ikinci basamakta planlama yapılabilmektedir. Bu hasta grubu için özellikle YND çalışmaları için kısıtlılık olarak sayılabilecek durumlar, analizlerin standartizasyonunun sağlanmasında yaşanan zorluklar ve sonuçlanma (numune kabul-raporlama) sürelerinin hızlı olması gerekliliğidir [9,10].

9.2 Miyelodisplastik Neoplazmalar

Miyelodisplastik neoplazmalar, YND'nin hastalığın tanısal amaçlı ve prognostik skorlama açısından rutin klinik uygulamalarında en sık başvuru alan miyeloid neoplaziler arasında yer almaktadır. NCCN kılavuzlarında yer alan Miyelodisplastik sendromlarda rutinde incelenmesi önerilen ve klinik önemi olan somatik mutasyonların eşlik ettiği genler Tablo 9.5'de özetlenmiştir [11].

Tablo 9.5: Miyelodisplastik neoplazmalarda incelenmesi önerilen genler ve bu genlerde sık izlenen mutasyonlar

Gen	Sık izlenen değişimler	Mutasyon görülme sıklığı
<i>TET2</i>	Erken dur kodonu, çerçeve kayması ve kırılma bölgesi mutasyonları 1134-1444. veya 1842-1921. kodonlardaki yanlış anlamlı mutasyonlar	%20-25
<i>DNMT3A</i>	Erken dur kodonu, çerçeve kayması ve kırılma bölgesi mutasyonları S770, M880, R882, W893, P904, A910, G543, R635, A741, R736, H739 kodonlardaki yanlış anlamlı mutasyonlar	%12-18
<i>ASXL1</i>	Erken dur kodonu, çerçeve kayması	%15-25
<i>EZH2</i>	Erken dur kodonu, çerçeve kayması	%5-10
<i>SF3B1</i>	E622, Y623, R625, N626, H662, T663, K666, K700E, I704, G740, G742, D781 kodonlardaki yanlış anlamlı mutasyonlar	%20-30
<i>SRSF2</i>	Yanlış anlamlı mutasyonlar, P95 kodonunun çerçeve içi delesyonları	%10-15
<i>U2AF1</i>	S34 ve Q157'deki yanlış anlamlı mutasyonlar	%8-12
<i>ZRSR2</i>	Erken dur kodonu, çerçeve kayması mutasyonları	%5-10
<i>RUNX1</i>	Erken dur kodonu, çerçeve kayması mutasyonları	%10-15
<i>TP53</i>	Erken dur kodonu, çerçeve kayması ve kırılma bölgesi mutasyonları Yanlış anlamlı mutasyonlar: P47S ve P72R kodonlar	%8-12
<i>STAG2</i>	Erken dur kodonu, çerçeve kayması ve kırılma bölgesi mutasyonları	%5-10
<i>NRAS</i>	Yanlış anlamlı mutasyonlar: G12, G13, Q61 kodonu	%5-10
<i>CBL</i>	366-420. kodonlardan herhangi birindeki yanlış anlamlı mutasyonlar	< %5
<i>NF1</i>	Erken dur kodonu, çerçeve kayması ve kırılma bölgesi mutasyonları	< %5

--	--	--

9.3 Miyeloproliferatif Neoplaziler

KML hastalarında YND, TKI direnci gelişen hastalarda düşük seviyeli *BCR-ABL1* kinaz domain mutasyonlarının saptanabilmesi, ilave olarak yeni tanı, akselere faz ve blastik faz hastalarında *ASXL1*, *RUNX1*, *IKZF1*, *TET1/2*, *IDH1/2*, *JAK2*, *DNMT3A/3B*, *EZH2*, *WT1*, *NPM1*, *NRAS*, *KRAS*, *CBL*, *BCOR*, *CREBBP*, *TP53* genlerindeki mutasyonların değerlendirilebilmesi için kullanılmaktadır[12].

Philedelphia kromozomu negatif MPN'ler olarak adlandırılan polisitemia vera, primer miyelofibroz ve essansiyel trombositoz, kronik nötrofilik lösemi, kronik eozinofilik lösemi, juvenil myelomonositik lösemi, MPN NOS (MPN başka şekilde tanımlanmayan) spesifik driver gen mutasyonlarına (*JAK V617F* mutasyonu, *CALR*, *MPL*, *JAK2* ekzon 12 mutasyonları) bağlı olarak klonal disregülasyonla karakterize hastalıklardır. Son yıllarda miyeloproliferatif hastalık şüphesi olan olguların primer tanı sürecinde yukarıda bahsedilen driver gen mutasyonlarına konvansiyonel moleküler yöntemlere alternatif olarak yeni nesil dizi analizi yöntemleri aracılığı ile bakılması önerilmektedir. Kılavuzda ikinci bölümde detaylı olarak anlatıldığı üzere son yıllarda PMF hastalarında, *ASXL1*, *EZH2*, *SRSF2*, *U2AF1* (157. kodon), *RAS*, *IDH1/2*, *TP53*, *DNMT3A*, *CBL* genlerinin onkogenik mutasyonlarının moleküler risk skorlaması amacıyla tanı anında incelenmesi özellikle *JAK2*, *CALR*, *MPL* genlerinde klonal mutasyon saptanmayan olgularda tanı anında ilgili genlerin yer aldığı YND panellerinin çalışılması gerekmektedir. PV hastalarında *ASXL1*, *SRSF2*, *IDH1/2*, *RUNX1*, *SRSF2* genlerinin, esansiyel trombositoz hastalarında ise *SH2B3*, *IDH2*, *U2AF1*, *SRSF2*, *SF3B1*, *EZH2*, *TP53*, *RUNX1* genlerinin dizi analizi ile değerlendirilmesi NCCN kılavuzlarında önerilmektedir[13].

9.4 Multiple Myeloma

MM tanılı olgularda, *TP53* geni başta olmak üzere, *ATR*, *ATM*, *ZFHX4*, *BRAF*, *EGR1*, *IRF4* ve *TRAF3* genlerinde saptanan mutasyonların prognostik değeri olduğu ve bu genlerin yer aldığı panellerin YND ile risk klasifikasyonu açısından incelenmesi önerilmektedir [14].

MM'de YND'in kullanım alanları arasında MRD takibi ön plana çıkmaktadır. NCCN kılavuzunda yeni tanı hastalarda, özellikle CD138 plazma hücrelerinin seleksiyonu sonrası, gelecekte MRD takibi yapılabilmesi için klonalite tayininde YND analizleri önerilmektedir [15]. IMWG yakın zamanda, başta sıklıkla kullanılan valide edilmiş bir platform olması nedeniyle *LymphoSIGHT* platformu (*Sequentia/Adaptative*) olmak üzere, benzer ticari seçenekler de dahil olacak şekilde, minimum duyarlılığı $<10^{-5}$ olan YND temelli platformlarında *IGH-VDJH*, *IGH-DJH*, ve *IGK* bölgelerinin sekanslanması ve *IGH* rearanjmanlarının tespit edilerek MRD takibinde kullanılmasını önermiş, özgün klonal değişimlerin saptanmadığı durumlar için YND-MRD negatifliği teriminin kullanılmasını öne sürmüşlerdir [16,17].

9.5 Kronik Lenfositik Lösemi

KLL tanılı olgularda YND, *TP53* geni başta olmak üzere *NOTCH1*, *SF3B1* ve *BIRC3* genlerinin dahil olduğu panel çalışmaları risk sınıflandırılması için kullanılabilir. ERIC önerileri doğrultusunda MRD takibinin en az 1×10^{-4} duyarlılığa sahip yöntemlerle değerlendirilmesi önerilmektedir[18,19]. NCCN'de, KLL'de MRD takibi için allel-spesifik oligonükleotid polimeraz zincir reaksiyonu (ASO-PCR) ve MRD Flow gibi valide yöntemlere ilave olarak, tedavi öncesi dominant *IGH* klonalitesinin tayin edilmesi sonrası standardize edilmiş ve diğer yöntemlere göre artmış bir

duyarlılığa (1×10^{-6}) sahip YND analizlerinin de kullanılabileceği bildirilmiştir [20,21].

9.6 Akut Lenfoblastik Lösemi

ALL tanılı olgularda YND, moleküler karakterizasyon ve risk sınıflandırılması açısından *IL7R*, *SH2B3*, *JAK1*, *JAK3*, *JAK2* genlerinin nokta mutasyonları ve *ABL1*, *ABL2*, *CRLF2*, *CSF1R*, *EPOR*, *JAK2*, ve *PDGFRB* genlerinin dahil olduğu nadir RNA füzyon transkriptlerinin değerlendirilmesi için kullanılmaktadır. Hipodiploid ALL olgularının germline *TP53* patojenik mutasyonlara bağlı ortaya çıkma olasılığının olduğu unutulmamalıdır. Bu hasta grubunda aile öyküsü değerlendirilmesi sonucunda genetik danışmanlık eşliğinde *TP53* geni dizi analizleri önerilmelidir.

ALL'de de artmış bir duyarlılığa (1×10^{-6}) sahip olması nedeniyle de YND kullanımı MRD takibinde son yıllarda ön plana çıkmıştır. Özellikle klonal *IGH* ve *T cell receptor (TCR)* rearanjmanlarının ve yukarıda bahsedilen diğer füzyon transkriptlerinin MRD takibinde ALL olgularında değerlendirilmesini öneren çalışmalar mevcuttur [22,23].

Kaynaklar

1. Kanzi, A. M., San, J. E., Chimukangara, B., Wilkinson, E., Fish, M., Ramsuran, V., & De Oliveira, T. (2020). Next generation sequencing and bioinformatics analysis of family genetic inheritance. *Frontiers in Genetics*, *11*, 544162.
2. Merker, J. D., Valouev, A., & Gotlib, J. (2012). Next-generation sequencing in hematologic malignancies: what will be the dividends?. *Therapeutic advances in hematology*, *3*(6), 333-339.
3. Li, M. M., Datto, M., Duncavage, E. J., Kulkarni, S., Lindeman, N. I., Roy, S., ... & Nikiforova, M. N. (2017). Standards and guidelines for the interpretation and reporting of sequence variants in cancer: a joint consensus recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *The Journal of molecular diagnostics*, *19*(1), 4-23.
4. Bacher, U., Shumilov, E., Flach, J., Porret, N., Joncourt, R., Wiedemann, G., ... & Pabst, T. (2018). Challenges in the introduction of next-generation sequencing (YND) for diagnostics of myeloid malignancies into clinical routine use. *Blood cancer journal*, *8*(11), 113.
5. Richards S., Aziz N., Bale S., Bick D., Das S., Gastier-Foster J., Grody W.W., Hegde M., Lyon E., Spector E., Voelkerding K., Rehm H.L. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;*17*:405–423.
6. Levine, R. L., & Valk, P. J. (2019). Next-generation sequencing in the diagnosis and minimal residual disease assessment of acute myeloid leukemia. *Haematologica*, *104*(5), 868.
7. Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R. P., Borowitz, M. J., Calvo, K. R., Kvasnicka, H. M., ... & Tefferi, A. (2022). International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *140*(11), 1200-1228.
8. Döhner, H., Wei, A. H., Appelbaum, F. R., Craddock, C., DiNardo, C. D., Dombret, H., ... & Löwenberg, B. (2022). Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *140*(12), 1345-1377.
9. Fuchs, O., KostECKA, A., Provaznikova, D., Krasna, B., Brezinova, J., Filkukova, J., ... & Cermak, J. (2009). Nature of frequent deletions in CEBPA. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, *43*(3), 260-263.
10. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Acute Myeloid Leukemia, Version 4.2023
11. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Myelodisplastik syndromes, Version 1.2023
12. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Chronic Myeloid Leukemia, Version 1.2024
13. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Myeloproliferative Neoplasms, Version 3.2022
14. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Multiple Myeloma, Version 3.2023

15. Dimopoulos, M. A., Moreau, P., Terpos, E., Mateos, M. V., Zweegman, S., Cook, G., ... & Mey, U. (2021). Multiple myeloma: EHA-ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, *32*(3), 309-322.
16. Kumar, S., Paiva, B., Anderson, K. C., Durie, B., Landgren, O., Moreau, P., ... & Avet-Loiseau, H. (2016). International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *The lancet oncology*, *17*(8), e328-e346.
17. Bolli, N., Genuardi, E., Ziccheddu, B., Martello, M., Oliva, S., & Terragna, C. (2020). Next-generation sequencing for clinical management of multiple myeloma: ready for prime time?. *Frontiers in Oncology*, *10*, 189.
18. Agathangelidis, A., Chatzidimitriou, A., Chatzikonstantinou, T., Tresoldi, C., Davis, Z., Giudicelli, V., ... & ERIC, the European Research Initiative on CLL. (2022). Immunoglobulin gene sequence analysis in chronic lymphocytic leukemia: the 2022 update of the recommendations by ERIC, the European Research Initiative on CLL. *Leukemia*, *36*(8), 1961-1968.
19. Rawstron, A. C., Fazi, C., Agathangelidis, A., Villamor, N., Letestu, R., Nomdedeu, J., ... & Ghia, P. (2016). A complementary role of multiparameter flow cytometry and high-throughput sequencing for minimal residual disease detection in chronic lymphocytic leukemia: an European Research Initiative on CLL study. *Leukemia*, *30*(4), 929-936.
20. Thompson, P. A., Srivastava, J., Peterson, C., Strati, P., Jorgensen, J. L., Hether, T., ... & Wierda, W. G. (2019). Minimal residual disease undetectable by next-generation sequencing predicts improved outcome in CLL after chemoimmunotherapy. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *134*(22), 1951-1959.
21. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma, Version 3.2022
22. Roberts, K. G., Li, Y., Payne-Turner, D., Harvey, R. C., Yang, Y. L., Pei, D., ... & Mullighan, C. G. (2014). Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *New England journal of medicine*, *371*(11), 1005-1015.

NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Acute Lymphoblastic Leukemia, Version 2.2023