


T.C.  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

LÖSEMİ TANISI VE TİPLENDİRİLMESİNDE KEMİK İLİĞİ  
BİYOPSİSİ VE AKIM SİTOMETRİK İNCELEME

UZMANLIK TEZİ

Dr. Nuru Cihan ARI

Tez Danışmanı: Prof.Dr.  Yavuz ÖZORAN

Trabzon-1998

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa No:

GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	2-22
Hematopoezis	2
Lösemi ve myeloproliferatif hastalıklar	6
Hücre siklusu	15
Akım sitometri	19
MATERYAL ve METOT	23-25
BULGULAR	26-41
TARTIŞMA	42-48
SONUÇLAR VE ÖNERİLER	49
ÖZET	50
İNGİLİZCE ÖZET	51
KAYNAKLAR	52-56

## GİRİŞ

Lenforetiküler ve hematopoetik proliferatif hastalıkların sınıflandırılması patolojide sürekli tartışma konusu olmaktadır.

Klinisyenlerle ortak sınıflandırma kullanılması hastaların yalnızca tanı aşamasında değil bunun yanısıra tedavi protokollerinin saptanması açısından da sorun yaratmaktadır. Bu nedenle geleneksel lösemi sınıflandırılmasında hücre tiplendirilmesini sağlamaya yönelik PAS, Sudan Black, Myeloperoksidaz reaksiyonları her zaman yeterli olmamakta ve standart uygulamalarda sorunlar yaşanmaktadır. Bunun ötesinde adı geçen reaksiyonlar zaman kaybına yol açmaktadır. Değerlendirilmelerinde ise kişiye bağlı yorum açıklığı bulunmaktadır.

Flow cytometry (akım sitometri) yöntemi ile reseptör analizi yapıldığında hızlı kesin sonuç alınmakta, lösemnin hücre bazında sınıflandırma olanağı sağlanmaktadır. Bunun yanısıra S evresine giren hücre sayısı, aneuploidi varlığı ve bu değerlerin yüksekliği agresif klinik davranışı belirleyici olmaktadır.

Yukarıda değinilen nedenlerle kemik iliği aspirasyon biyopsisi yapılan 60 lösemi olgusunu klinik ve patolojik verileriyle kıyaslı olarak akım sitometri yöntemiyle (DNA ve reseptör analizi) değerlendirmeyi amaçladık.

## GENEL BİLGİLER

### HEMATOPOEZİS

Kan hücreleri yaşam süreleri çok kısa olduğundan ve sayılarının sabit tutulması gerektiğinden devamlı olarak üretilirler. Kan hücreleri hematopoetik (Yunanca Haima: kan, poiesis: yapım) organlardaki kök hücrelerinden gelişir.

Kan yapımı ilk olarak intrauterin dönemde 3. haftada vitellüs kesesinin mezoderminde ekstraembrioner olarak başlar. Daha sonra intraembrioner splanknik mezoderimde kan adacıklarının oluşması görülür. Kan adacıklarının periferinde yer alan hücreler yassılaşıp damar endotelini oluştururken orta kısımdaki hücreler kan hücrelerini yaparlar. Kan hücrelerinin gelişmesindeki bu ilk dönem MEZOBLASTİK EVRE adını alır. 6.haftada karaciğerde , 3. ayda dalak ve diğer lenfatik dokularda kan hücreleri oluşmaya başlar. Bu döneme HEPATİK DÖNEM denir. Kemikleşme merkezlerinin gelişmesi ile kemik iliğinde kan yapımı başlar (KEMİK İLİĞİ DÖNEMİ) ve karaciğerde yapım giderek azalır ( 1-5) .

### KAN GELİŞME TEORİLERİ

1- Polifiletik görüş: Eritrosit ve lökositler farklı ana hücrelerden gelişirler. Bu hücreye ana hücre veya kök hücre ( stem-cell ) denir. Ana hücre mitozla bölünerek çoğalabilir veya daha ileri kademe için farklılaşma (Diferansiasyon) gösterebilir. Bu görüşe göre eritrositler sinüzoid endotelindeki eritroblastlardan, granülositler damar dışı myeloblastlardan gelişirler. Myeloblastlar ise stromadaki retiküler hücrelerden gelişirler. Mononükleer lökositler ise lenfoit organ veya bağ dokusundan köken alır.

2- Monofiletik görüş: Bu görüşe göre sinüzoid endotelinin hemopoetik gücü yoktur. Medulla stromasındaki primitif retiküler hücreler hemositoblastı oluştururlar. Tüm kan hücreleri ekstravasküler gelişip, döşemeden geçerek sinüzoid lümenine ulaşırlar. Hemositoblast tüm kan hücrelerini oluşturduğundan kemik iliği dışındaki retiküler hücreler de patolojik koşullarda bu hücreye dönüşerek ekstramedüller hematopoezisi başlatabilir.

Monofiletik görüş (unitariyan görüş) günümüzde daha fazla desteklenmektedir. Az sayıda pluripotansiyel ana hücre kanda dolaşabilir ve gereğinde dokuya geçerek lenf düğümü, karaciğer, dalak,timus gibi organlarda zamanla kayba uğrayan ana hücreyi telafi edebilir ( 1, 2).

Eritrositler, granüositik lökositler, monositler ve trombositler kemik iliğinde yerleşmiş olan ana hücrelerden gelişirler. Bu hücrelerin farklılaşarak olgunlaşmalarına sırası ile eritropoezis, granülopoezis, monositopoezis ve megakaryositopoezis adı verilir. Kemik iliğinde lenfoid organlara giderek farklı tür lenfositleri yapan hücreler de üretilir.

Kan hücreleri olgunlaşarak kana verilmelerine kadar özel farklılaşma ve olgunlaşma aşamalarından geçerler. Bu işlemlerin kesintisiz bir şekilde devam etmesi nedeniyle değişik aşamaların özelliklerini gösteren hücreleri kan veya kemik iliği yayma preparatlarında bir arada görmek mümkündür.

### **ANA HÜCRE BÜYÜME FAKTÖRLERİ VE FARKLILAŞMA**

Hematopoezde temel görevi üstlenen ana hücreler; farklılaşmamış hücreler olarak tanımlanırlar. Bu hücreler devamlı olarak bölünme yeteneğindedirler ve ürettikleri hücreler geriye dönüşemeyecek şekilde farklılaşmış özel hücrelere dönüşürler.

#### **Pluripotent ve multipotent kök hücreleri:**

Bütün kan hücreleri kemik iliğindeki tek bir kök hücrelerinden gelişmektedir. Bu hücreler bütün kan hücre türlerini verdiği için pluripotent kök hücresi olarak adlandırılmıştır.

Pluripotent hücreler çoğalarak tek tür kan hücresini oluşturan ana hücreleri verirler. Bu hücrelerden bir kısmı lenfositlere (lenfoid hücreler) , diğer bir kısmı ise myeloid hücreler serisine farklılaşır. Myeloid hücreler kemik iliğinde gelişerek eritrositler, granüositler, monositler ve megakaryositlere dönüşürler. Her iki hücre serisini veren hücrelere multipotent kök hücresi adı verilir. Gelişimin erken döneminde lenfoid hücreler kemik iliğinden lenf düğümleri dalak ve timusa göç ederek lenfositlere farklılaşır.

#### **Projenitör ve öncül hücreler:**

Çoğalan multipotent kök hücreleri, potensleri azalmış hücrelere dönüşürler. Bu hücrelere uni veya bipotent projenitör hücreler adı verilir. Projenitör hücreler de öncül hücrelere (prekürsör hücreler) veya blastlara farklılaşırlar. Pluripotent ve multipotent kök hücreleri çok az sayıda topluluklar oluşturacak şekilde, belli bir hızda çoğalarak devamlılıklarını sağlarlar.

Özet olarak hematopoez kök hücrelerinden gelişen ve farklılaştıkça potensleri azalan aynı zamanda ve devamlı olarak çeşitli hücrelerin üretilmesi ve bu hücrelerin farklılaşması işlemidir(4).

### **KEMİK İLİĞİ HİSTOLOJİSİ**

Kemik iliği uzun kemiklerin medüller kanallarında ve süngerimsi kemiklerin boşluklarında yerleşmiştir. İki tür kemik iliği vardır. Kan hücreleri

ve kan hücrelerini yapan hücrelerin renklerinden dolayı , bu tür hücrelerden zengin olan kemik iliğine kırmızı veya hematojen kemik iliği ; yağ hücrelerinin sarı renkte görünmesi nedeniyle yağ hücrelerinden zengin olan kemik iliğine de sarı kemik iliği adı verilir. Yeni doğanda bütün kemik iliği kırmızıdır ve kan hücrelerini üretmede aktiftir. Yaş ilerledikçe kemik iliği sarı kemik iliğine dönüşür. Bazı şartlarda ; örneğin ağır kanama veya hipokside sarı kemik iliği tekrar kırmızı, aktif kemik iliğine dönüşür.

### KIRMIZI KEMİK İLİĞİ

Kırmızı kemik iliği stroma, hematopoetik kordonlar ve sinuzoidal kapillerden oluşur. Stroma; uzantıları ile birbirine bağlanan ve fagositik özellik gösteren retikulum hücrelerinin oluşturduğu üç boyutlu boşlukları çok ince retiküler liflerin ağ şeklinde doldurmasıyla oluşur. Bu çatı içinde hematopoetik hücreler ve makrofajlar yerleşir. Sinuzoidler devamlılık gösteren endotel hücreleriyle sınırlandırılır. Endotelin bazı bölgeleri oldukça incelmış olup , bu bölgeler olgunlaşan kan hücrelerinin stromadan sinuzoid içine geçiş yerleridir.

Kırmızı kemik iliğinin temel fonksiyonları kan hücrelerinin üretilmesi ve eritrositlerin makrofajlarda yıkılması sonucu demirin hemoglobinden serbestleştirilerek depolanmasıdır.

### ERİTROSİTLERİN OLGUNLAŞMASI

Olgun bir hücre ; spesifik fonksiyonlarını yerine getirebilme kapasitesine sahip, farklılaşmış hücredir. Olgunlaşmada gerçekleşen işlemler; hemoglobin sentezlenmesi ve nükleussuz , küçük bikonkav şekilli eritrositlerin oluşmasıdır. Hücreler olgunlaşırken; hücre volümünün azalması, çekirdekciğin kaybolması, kromatinin yoğunlaşması, çekirdeğin atılması, poliribozomların azalması(bazofili kaybı)işlemleri gerçekleşir. Eritrositer seride sırasıyla Proeritroblast, Bazofilik eritroblast (Bazofilik normoblast), Polikromatofilik eritroblast(Polikromatofilik Normoblast), Normoblast (Ortokromatik eritroblast), Retikülosit ve Eritrosit oluşumuyla olgunlaşma tamamlanır.

### GRANÜLOSİTLERİN OLGUNLAŞMASI

Granüllü lökosit gelişimi myeloblasttan başlar. Myeloblastlar çok küçük partiküller halinde kromatin içerip, nükleolusları oldukça belirgindir. Myeloblastlar promyelositlere farklılaşır. Promyelosit sentezlemeye başladığı ikinci bir granül türüne göre 3 farklı granülositik seri hücrelerine farklılaşır. Farklılaşan bu hücrelere myelosit adı verilir. Daha sonra metamyelosit ve band formlarına dönüşür.

## LENFOSİT VE MONOSİTLERİN OLGUNLAŞMASI

Lenfosit ve monositlerin öncüllerinin belirlenmesi oldukça güçtür. Çünkü bu tür lökositlerde lökosit türünü belirleyici spesifik granüllerin bulunmaması yanında olgunlaşmaya bağlı nükleus loblanması da olmamaktadır. Bu iki özellik genç hücre ile olgun hücrenin belirlenmesinde önemli kriterlerdir. Lenfositler ve monositlerin ayrımı esas olarak yayma preparatlarında büyüklükleri, nükleusların kromatin yapısı ve nükleusların varlığına göre yapılmaktadır. Lenfositik seri hücreleri farklılaştıkça nükleusun kromatini oldukça yoğunlaşır, nükleusun belirlenmesi güçleşir ve hücrenin çapı küçülür. Bu özelliklere ek olarak lenfosit serilerinin alt grublarının tanımlanması, farklılaşmalar esnasında hücre yüzeylerinde spesifik yüzey reseptörlerinin kazanılmasıyla olur. Bu reseptörler de özel tekniklerle gösterilebilir.

### LENFOSİTLER

Dolaşımdaki lenfositler genelde timus ve periferik lenfoid organlardan ( dalak, lenf düğümleri, tonsillalar) kaynaklanırlar. Son zamanlarda bütün öncül hücrelerin kemik iliğinden kaynaklandığına inanılmaktadır. Nispeten az farklılaşmış olan öncül hücrelerin bir kısmı timusa giderek T lenfositlere özgü karakterlerini kazanırlar. T lenfositler sonradan periferik lenfoid organların spesifik bölgelerinde odaklanırlar. Diğer öncül hücreler ise kemik iliğinde kalarak B lenfositleri verecek hücrelere farklılaşırlar. Bu hücreler periferik lenfoid organlara göç ederek B lenfositlerine farklılaşma odaklarını oluştururlar.

Lenfositik seri hücrelerin en belirlenebilen hücresi lenfoblast adını alır. Oldukça büyük hücreler olup 2-3 kez bölünerek prolenfositleri verir. T ve B lenfositlerin özelliğini yansıtan yüzey antijenleri prolenfosit aşamasında kazanılmamıştır.

### MONOSİTLER

Bu seriye ait ilk belirlenebilen hücre monoblasttır. Monoblastlar yapısal olarak myeloblastları andırırlar. Bu nedenle myeloblasta benzer olarak yönlendirilmiş öncül hücrelerdir. Monoblastlar farklılaşarak promonositleri verirler. Promonosit iki kez bölünerek monositlere farklılaşır. Monosit sitoplazmasında çok küçük çaplı azurofilik granüller gözlenir. Olgun monositler kana geçerek burada 8 saat kadar kalırlar. Sonra bağ dokusuna geçerek makrofajlara dönüşürler ve burada aylarca görev yaparlar.

### TROMBOSİTLER

Erişkinlerde trombositler olgun megakaryositlerin sitoplazmasının parçalara ayrılması ile kırmızı kemik iliğinde üretilir. Megakaryositler kemik iliğindeki megakaryoblastların farklılaşmasıyla gelişir(4, 5).

## LÖSEMİ VE MYELOPROLİFERATİF HASTALIKLAR

Kemik iliği ana hücrelerinden köken alan malign neoplastik hücrelerin kemik iliğini ve genellikle de periferik kanı tutması ( lökositöz ) ile nitelenen bir hastalıktır. Kemik iliğinden sonra; karaciğer, dalak, lenf düğümü başta olmak üzere diğer iç organları infiltre eder. Yalnızca kemik iliğini tutup periferde lökopeni yapabilir.

Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ' nde lösemi görülme sıklığı 100.000' de olmak üzere tüm lösemilerde 9.5, ALL'de 1.5 , AML' de 2.2, KLL' de 2.6, KML'de ise 1.3'tür. Erkeklerde lösemi sıklığı 100.000' de 12.5 iken kadınlarda 100.000'de 7.3 oranında görülmektedir (6).

### SINIFLANDIRMA

Geleneksel olarak lösemiler köken aldıkları kemik iliği hücresine göre sınıflandırılırlar. Lenfositik, myelositik -myelojenöz- lösemi klinik gidişlerine göre akut ve kronik olarak gruplandırılırlar. Buna göre akut lenfositik lösemi (ALL), kronik lenfositik lösemi (KLL), akut myelositik (myeloblastik) lösemi ( AML) , kronik myelositik lösemi (KML) tipleri vardır. Tümünde kemik iliğinin lösemik hücrelerle infiltre olması sonucunda eritroid, granülositik ve trombositik seri hücreler ortadan kalktığı için hastalarda anemi, infeksiyon ve kanama görülür. Teorik olarak bu sınıflandırma yapılmakla birlikte kronik lösemiler klinik ve yapısal nitelikleri açısından benzerlik göstermekte, ayrıca bazı hastalıkların zemininde gelişebilmektedirler (6-9).

Kronik myelojenöz lösemiler birbirleri ile ilişkili, birbirlerine dönüşüm gösterebilen ve klonal multipotent myeloid ana hücre neoplastik proliferasyonunu gösteren hastalıklarla (Polisitemia vera, esansiyel trombositemi, myeloid metaplazi) bağlantılıdır. Polisitemia verada eritroid öncül hücrelerinin (prekürsörler) hakimiyeti, kronik myeloid lösemide ise granülositik seri hakimdir. Polisitemia veralı bir hasta zamanla myeloid metaplazi ile myelofibroze dönüşebilir. Kronik myeloid lösemiler lenfoid olanlardan ayrı tutulmalıdır. Çünkü; kronik lenfoid lösemiler; kronik lenfoid lösemi ve saçsı hücreli ( hairy cell ) lösemi içerir ve lenfoid hücre neoplastik proliferasyonu sıklıkla da B hücre kökenlidir. Non-Hodgkin lenfoma ile de ilişkilidirler. Diferansiye küçük hücreli lenfositik lenfoma ve kronik lenfositik lösemi arasında klinik ve yapısal açıdan bağlantı bulunmaktadır.



## AKUT LÖSEMİLER

Tüm akut lösemiler hematopoetik ana hücrelerin neoplastik monoklonal proliferasyonu ile oluşur.

### PATOFİZYOLOJİ

Morfolojik ve hücre kinetik çalışmaları akut lösemilerde lösemik ana hücrenin farklanmasında bir bloklanma olduğunu ve lösemik blastların uzamış yaşam süresine (generation zamanı) sahip olduğunu göstermiştir. Böylece akut lösemilerde lösemik blastların birikimi transforme olmuş ana hücrelerin klonal artışı ve bu hücrelerin fonksiyonel olgun hücrelere dönüşmemesi sonucudur. Blastların kemik iliğinde birikimi normal hematopoetik ana hücreleri baskılar (süpresyon). Bu olayda hem fiziksel yer değişim hem de sebebi iyi anlaşılamayan mekanizmalar rol oynar. Normal hematopoetik ana hücrelerin baskılanması iki önemli klinik uygulamaya sahiptir.

1-Ana klinik bulgular normal eritrosit, lökosit ve trombositlerin eksikliğinden kaynaklanır.

2-Tedavide amaç normal ana hücreleri ortaya çıkarmak için lösemik klon grubunu (popülasyonu) azaltmaktır. Bazı lösemi tiplerine uygulanan diğer bir tedavi yaklaşımı lösemik blastların farklanmasını uyarmaktır.

Pluripotent hematopoetik ana hücrelerin farklanması sırasında lösemik transformasyon herhangi bir evreyi etkileyebilir. Lenfoid serinin tutulumu ALL'ye, myeloid öncü hücrelerin tutulumu ise AML'ye yol açar (8,9).

## AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİLER

ALL primer olarak çocukların ve genç erişkinlerin hastalığıdır. ABD 'de çocukluk çağı lösemilerinin % 80 'ini teşkil eder. ALL erişkinlerde çok daha az sıklıkla görülür. Çocukluk çağı ALL 'leri yaklaşık 4 yaşlarında pik yapar, beyazlarda 2 kat daha sıktır ve erkeklerde biraz daha fazla oranda görülür.

### MORFOLOJİ:

ALL morfolojik ve immunolojik kriterlere dayanılarak alt gruplara ayrılabilir. L1, L2 ve L3 olarak isimlendirilen alt gruplar akut lösemilerin FAB sınıflandırılmasında tanımlanmıştır (Tablo 1). ALL'li çocukların %85'inde L1 subtipi hakimdir.%15'inden daha azında L2 subtipi (bu tip erişkinlerde daha sık) görülür. ALL-L3 genellikle Burkitt lenfomanın lösemik fazına denk düşer ve çocuklardaki lenfoblastik lösemilerin yaklaşık %1-2'sini oluşturur (10,11).

Morfolojik özelliklere ek olarak lösemik lenfoblastlar (myeloblastların aksine) peroksidaz pozitif granül içermezler. Ancak geniş PAS pozitif materyal birikimi içerirler. Terminal deoksitransferaz(TdT) boyaması ALL'yi AML'den

ayırmak için kullanılır. Bu DNA polimeraz enzimi ALL'lerin %95'inde AML'ilerin ise %5'inde pozitifdir. TdT negatif ALL'ler tipik olarak L3 görünümündedir(12-14). Tablo 1' de FAB sınıflandırılmasına göre ALL alt gruplarının morfolojik özellikleri verilmiştir.

Alt gruplar	L1	L2	L3
Hücre boyutu	Çoğunluğu küçük	Büyük değişken	Büyük homojen
Nükleus şekli	Çoğunluğu düzgün	Düzensiz yarık ve çentikler sıktır	Düzensiz, oval, yuvarlak
Nükleolus	Görülmez veya küçük belirsiz	Genellikle görülür, sıklıkla büyüktür	Genellikle belirgin
Sitoplazma	Az	Değişken, sıklıkla bol	Orta düzeyde bol
Sitoplazmik bazofili düzeyi	Hafif-orta	Değişken	Kuvvetli
Sitoplazmik vakuolizasyon	Değişken	Değişken	Sıklıkla belirgin

Tablo 1: FAB sınıflandırılmasına göre ALL subtipleri.

\* İmmunolojik alt tipler lösemik lenfoblast kökenine ve diferensiasyon evresine göre değişir. İmmunofenotipleme prognoz açısından önemlidir.

\* ALL lerin % 80 'i B hücre kökenli , blastiktir ve blastların çoğu yüzeylerinde Ig eksprese etmez.

\* Santral sinir sistemi bulguları: Meningeal yayılıma bağlı olarak baş ağrısı, kusma, sinir tutulumları görülebilir. Bu bulgular çocuklarda ve ALL'de sıktır.

\* B hücreli ALL' li hastalar pan B hücre antijeni olan CD19 eksprese eder. B hücre prekürsörü olan bazı hastalarda bu antijen tek belirleyicidir.

\* T hücreli ALL' li hastalarda erken intratimik maturasyon evresinde duraklama söz konusudur. Lenfoblastik lenfomla ilişkilidir fakat matür periferik T hücre fenotipi eksprese eden yetişkinlerdeki T hücreli lösemi/lenfoma ve Sezary Sendromu gibi T hücre kökenli neoplazmlardan farklıdır. Lenfoblastik lenfoma gibi T hücreli ALL sıklıkla belirgin mediastinal timik kitle oluşturur.

\* L3 yapısındaki matür B hücreli ALL dışında yapısal ve immünolojik tiplere bağdaşmamaktadır.

## KARYOTİPİK DEĞİŞİKLİKLER

ALL 'li hastaların %90 'ında sayısal ve yapısal kromozom değişiklikleri görülmektedir. Hiperdiploidi prognozun iyi olduğunu , pre-B-hücreli ALL gibi fenotip olarak iyi prognoz beklentisi olsa bile translokasyonlar prognozu olumsuz etkiler. Bu nedenle karyotipik bilgi tedavi tipini seçmede önemlidir.

### PROGNOZ

ALL tedavisinde önemli ilerlemeler saptanmıştır. Merkezi sinir sistemini tutan lösemilerde proflaktik lösemik hücre öldürülmesini de içeren modern kemoterapi ALL' li çocukların %90 ' ını tam remisyona sokmakta ve üçte ikisini tümüyle iyileştirmektedir. Prognoz yaş, immünofenotip, sitogenetik değişiklikler içeren bir dizi olaydan etkilenmektedir. 2-10 yaş arasında pre B fenotipi ve 51-60 kromozomdaki hiperdiploidi en iyi prognozu belirler. Matür B veya T fenotipindeki hastalıklar daha kötü prognozludur. Tüm gruplardaki translokasyon prognozu olumsuz yönde etkiler. Allojenik kemik iliği transplantasyonu kötü prognozlu grup için ümit oluşturur(8,9,15).

## AKUT MYELOBLASTİK LÖSEMİ (AML)

15-39 yaş arasındaki yetişkinleri tutar. Çocukluk çağı lösemilerinin %25'ini oluşturur. Myeloid hücre diferensiasyonu kompleksitesini yansıtan olağanüstü heterojen bir gruptur.

### MORFOLOJİ

Wright-Giemza boyasıyla kolaylıkla lenfoblastlardan ayrılan myeloblastların gösterilmesiyle tanınır. Myeloblastlar ; ince kromatinli 3-5 çekirdekçikli , azurofilik ve myeloperoksidaz pozitif granüllü sitoplazmaya sahip hücrelerdir. Kırmızı boyanan çubuk benzeri Auer cisimcikleri AML'li olguların yaklaşık %60'ında bulunur ve sıklıkla premyelositik tipde görülür.

### SINIFLANDIRMA

AML farklı orjinlidir. Bazıları multipotent ana hücrelerden köken alır ki eritroid ve granülositik prekürsörlerin her ikisinde birden sitogenetik anomaliler bulunmasına karşın kan ve kemik iliğinde myeloblastlar baskındır. Diğer yandan granülosit-monosit prekürsörlerinin tutulması myelomonositik hastalığa yol açar. Yeniden düzenlenmiş FAB sınıflandırmasına göre AML 8 kategoriye ayrılır. Böylece M0-M3 olarak maturasyon derecesini ve M4-M7 olarak hakim lösemik ana hücre farklılaşma dizisi belirtilebilir(16-18). Bu heterojen lösemi grubuna bazı araştırmacılar yapısal ekspresyon çeşitliliğini vurgulamak için genel akut nonspesifik lösemi adını vermişlerdir.

## KROMOZOM ANOMALİLERİ

Özel yüksek rezolusyonlu bantlama teknikleriyle lösemilerin %90'ında kromozom anomalisi saptanmıştır. %50-70 oranında karyotip değişiklikleri bulunur. Kromozom anomalileri diğer klinik prognostik faktörlerden bağımsız olarak prognozu etkiler. Akut promyelositik lösemide(M3) translokasyon karakteristiktir (19).

## MYELODİPLASTİK SENDROMLAR

Bu terim klonal ana hücre bozukluklarını içine alan bir grubu kapsar. Bu sendromlar inefektif hematopoez ve artmış AML riski ile karakterizedir. Bu sendromlu hastalarda kemik iliği kısmen veya tümüyle mutant pluripotent ana hücrelerin klonal öncülleriyle tutulmuştur. Bu hücrelerin eritrosit, granülosit ve trombositlere farklanma kapasitesi mevcuttur. Ancak bu hücreler hem etkisiz hem de hatalıdır.

Sonuç olarak kemik iliği genellikle hipersellüler veya normosellülerdir. Ancak periferial kan pansitopeniktir. Anormal ana hücre klonu genetik olarak unstabildir. Mutasyonlara eğilimli olup, akut lösemi gelişimine neden olabilir(20).

## MORFOLOJİ

Myelodisplastik sendromlar (MDS) her üç seriyi etkileyen displastik farklanma ile karakterizedir. Sitolojik özellikler; megaloblastoid eritroid öncü hücreleri , hipogranüler myeloid öncü hücreleri, kemik iliğinde artmış oranda blast, mikromegakaryosit, agranüler trombosit, tek veya bilobüle nötrofilleri içerir.

Myelodisplastik sendromlar kemik iliği ve periferik kandaki spesifik morfolojik özelliklere göre 5 gruba ayrılır. AML'nin myelodisplastik sendromdan ayrımı klinik ve morfolojik olarak zordur. Kemik iliği myeloblast içeriyorsa AML tanısı verilir. Sitogenetik çalışmalarda vakaların 2/3'ünde kromozomal anomali tesbit edilmiştir. En sık görülen anomalilerden bazıları del(5q);+8;-7,der(11q);-5,der(12p); ve -Y'dir (21, 22).

MDS yaşlı insanları(60-70 yaş) etkiler. Vakaların yaklaşık %50'si asemptomatiktir ve rastlantısal olarak tesbit edilir. %10-40'ı AML'ye transforme olur. Ortalama yaşam süresi 9-29 ay arasında değişir.

## KRONİK MYELOİD LÖSEMİ (KML)

Lösemi vakalarının %15-20'sini kapsar. 25-60 yaş arasında görülür. 4 ve 5. dekatta pik yapar.

## FİZYOPATOLOJİ:

KML pluripotent (çok yönlü) ana hücrelerin klonal artışı ve neoplastik farklanması sonucu gelişir. Esas olarak tüm hematopoetik seri (myeloid, eritroid, megakaryositik, B lenfositik, bazı vakalarda T lenfositik) etkilenmesine rağmen granülositer öncü hücreler baskın hücre derivesidir. KML dört kronik myeloproliferatif hastalıktan birisidir. Diğer grup hastalıklardan ayrı bir sitogenetik ve moleküler anomali ile ayrılır. Vakaların %90'undan fazlasında bölünen öncü ana hücrelerde Ph kromozomu tesbit edilir t(9; 22) (q34; q11). Bu translokasyon bcr-c-abl füzyon geninin oluşumuna neden olur. Bu gen güçlü tirozin kinaz aktivitesine sahip 210 kd füzyon proteini sentezler. Bcr-c-abl geni KML patogeneğinde kritik bir olaydır. Bazı araştırmacılar bcr-c-abl mRNA ve proteinini KML için esas olarak görürler. Ph kromozomu negatif olan ender KML vakalarında da bcr-c-abl varlığı gösterilmiştir. KML'de myeloid kök hücrelerinin artışının nedeni bu hücrelerin çoğalmayı düzenleyen fizyolojik uyarılara yanıt vermemeleridir (23).

KML yavaş progresyon gösterir. Tedavisiz 3 yıl yaşam mümkündür. Değişken ve önceden kestirilemeyen bir süre sonunda hastaların yaklaşık %50'si hızlanmış bir döneme girerler. Bu dönemde tedaviye gittikçe artan yanıtızsızlık, anemi ve trombositopenide artma, ek sitogenetik anormallikler ve sonuçta akut lösemiye benzer bir tablo ortaya çıkar(Blast krizi). Geriye kalan %50 hastada blast krizi hızlanmış bir ara dönem olmadan birden gelişir (24).

## KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ (KLL)

KLL muhtemelen tüm lösemiler içinde en yavaş seyirli olanıdır. Avrupa ve ABD'deki tüm lösemilerin yaklaşık %25'ini oluşturur ve tipik olarak 50 yaş üzerinde(ortalama yaş 60) ve erkeklerde kadınlara oranla 2 kat fazladır.

### PATOFİZYOLOJİ

KLL ile küçük lenfositik lenfoma birlikteliği çok sıktır. Diğer birçok lenfoid malignensilerde olduğu gibi KLL B hücrelerin neoplastik hastalığıdır. KLL'deki transforme B hücrelerinin karakteristik özellikleri:

\* Bunlar pan B hücre antijeni(CD19,CD20) eksprese ederler fakat TdT veya early B hücre antijeni (CD10) ekspresyonu içermezler. Böylece bunların fenotipi çoğu ALL vakalarında görülen lenfoblastlardan farklıdır ve CD5(normal B hücrelerinin çok az kısmında eksprese edilen T hücre ile ilişkili antijen) eksprese ederler.

\* Bunlar yüzey Ig (IgM ve IgD) eksprese ederler fakat hücrelerdeki immunglobülin sayısı oldukça düşüktür. İmmunfleuresansda sIg negatif

görülebilmektedir. Bunlar ya lamda veya kappa hafif zincirleri eksprese ederler ki bu monoklonalitenin göstergesidir.

\* Bunlar uzun yaşamlıdır fakat invivo olarak antikor üreten plazma hücrelerine farklanma kabiliyeti yoktur.

KLL'nin moleküler patolojisi çok az olarak bilinmektedir. bcl-2'nin yeniden düzenlenmesi vakaların %10-15'inde ortaya çıkar ve bcl-1 gen mutasyonu %5'den daha azdır. Çünkü bcl-2'nin fazla salgılanması apoptozisi önler. Programlı hücre ölümündeki yetmezlik en azından bazı vakalardaki B hücre yığılmasıyla açıklanabilir.

#### KROMOZOMAL ANOMALİLER

KLL'li hastaların yaklaşık %50'sinde karyotipik anomaliler mevcuttur. Trizomi 12 çok sık olup hastaların 1/3'ünde görülür. Sitogenetik anomalili vakaların %25-40'ında 13q anomalisi görülür. Daha az sıklıkla kromozom 14 ve 6'da anomaliler vardır. Trizomi 12'li hastalarda prognoz kötü iken 13q anomalileri klinik gidişe etkisiz görünmektedir. Sitogenetik anomalili hastalar genellikle erken tedavi gerektirir ve belirgin olarak survey daha kısadır.

#### KLİNİK ÖZELLİKLER

KLL'li hastalar sıklıkla asemptomatiktir. Semptomlar varsa nonspesifiktir (halsizlik, ağırlık kaybı ve anoreksia şeklinde). Generalize LAP ve HSM vakaların %50-60'ında mevcuttur. Total lökosit sayısı artabilir. Hafif artış veya mm<sup>3</sup>' de 200.000'e kadar ulaşabilir. Tüm vakalarda lenfositler küçüktür, matür lenfositlere benzerler. Lenfositlerin yalnızca küçük bir kısmında tek geniş çekirdek ve çekirdekçik bulunur. Mürekkep lekesi(smudge) hücreler (crushed çekirdekli lenfositler) sıklıkla periferik yaymada görülür. Çünkü lösemik B hücrelerin antijenik stimülasyon cevabında zayıflık vardır. Böyle hastalarda sıklıkla hipogamaglobulinemi ve bakteriyel enfeksiyonlara eğilimde artış vardır. Paradoksal olarak hastaların %10-15'inde eritrositlere karşı gelişen otoantikörler veya plateletler sonucunda otoimmünhemolitik anemi veya trombositopeni gelişir. İlginç olarak CD5(+) bir kısım B hücreleri çeşitli otoimmün hastalıklardaki otoantikörlerin kaynağı olarak suçlanmaktadır. Muhtemelen bazı vakalarda neoplastik CD 5(+) B hücreler otoantikör sekrete etme yeteneğini korur.

KLL'de prognoz ve seyir fazlasıyla değişkendir ve primer olarak klinik evreyle bağımlıdır. Ortalama survey 4-6 yıldır. Sitogenetik değişikliklerin prognostik önemi, klinik evreyle bağımsız olması henüz tam olarak tesbit edilemedi. KML'nin aksine blast kriziyle seyreden akut lösemiye dönüşüm sık değildir (8,9).

## HAİRY CELL LÖSEMİ

Kronik B hücreli lösemnin ayrı fakat nadir formudur. Lösemik hücrelerin görünümünden dolayı bu adı alır. Kıl benzeri çıkıntılar rutin yaymalarda görülebildiği gibi faz kontrastlı mikroskoplarda da görülebilir. Hairy cell lösemi için karakteristik sitokimyasal özellik tartrat rezistant asit fosfataz (TRAP) ile neoplastik B hücrelerin boyanmasıdır. Hairy hücreler pan B hücre işaretleyicileri (CD19-20) ve monosit ilişkili antijeni CD11c eksprese ederler. Ek olarak plasma hücre ilişkili antijen 1(PCA-1) lösemik hücrelerde bulunur.

HCL ileri yaştaki erkeklerde daha çok görülür. Kemik iliği, karaciğer, dalak tutulumu ile klinik bulgu verir. Splenomegali bazen çok masif olabilir ve tek klinik bulgu olarak ortaya çıkabilir. Hepatomegali ve lenfadenopati daha az sıklıktadır. Vakaların %50'sinde kemik iliği yetersizliği ve dalak sekestrasyonuna bağlı olarak pansitopeni oluşur. Vakaların 2/3'ünde splenektomi faydalıdır. İnterferon alfa ve yeni kemoteropatik ajanlar ile uzun süren remisyonlar ve hatta kür elde edilebilir(25-27).

### TÜM LÖSEMİLERDE MORFOLOJİ

Morfolojik özellikler 2 şekilde görülür.

1-Lösemilerin sitolojik özellikleri periferik yayma ve kemik iliği aspirasyonunda görülür.

2-Lösemik hücrelerin infiltrasyonuna bağlı doku değişiklikleri. Çeşitli lösemi tiplerinde oluşan doku değişiklikleri genellikle benzerdir ve iki bölümde incelenebilir. Primer değişiklikler; beyaz hücrelerin anormal şekilde çoğalarak birikmesi, sekonder değişiklikler ise bu hücre kitlelerinin dokuda yaptığı yıkım ve enfeksiyona karşı etkisiz olmalarının yarattığı sonuçlardır.

Lösemik hücrelerin her organ veya dokuyu infiltre edebilmelerine rağmen en çarpıcı değişiklikler kemik iliği, dalak, lenf nodları ve karaciğerde olur. İleri hastalıkta kemik iliği diffüz olarak beyaz küre kitleleri ile kaplandığından çamursu, kırmızı kahverenginden gri beyaza değişen bir görünüm alır. Bazen bu infiltrasyonlar yağlı ilik mesafesine de ilerler, süngersi ve kortikal kemik dokusuna baskı yaparak eritebilir.

KML ve hairy cell lösemide masif splenomegali olaya eşlik eder. KML' de daha karakteristik olduğu gibi masif splenomegalide doku içinde bazı soluk enfarkt alanları görülebilir. Minimal büyümüş dalaklarda histolojik görünüm genelde korunmuş normal parankim içinde fokal lösemik infiltrasyonlar şeklindedir. Lenfositik lösemilerde başlıca tutulum beyaz pulpadadır. Daha şiddetli tutulumda infiltrasyon daha diffüz olur ve normal dalak yapısı harabolur.

Myelositik lösemilerde splenomegali lenfositik lösemilere göre daha belirginken aşırı lenf nodu büyümesi lenfositik formlar için daha karakteristiktir. Yine de tüm lösemi tiplerinde bir miktar lenf nodu tutulumu görülür. Tutulan lenf nodları tek tek lastik sertliğinde ve homojendir. Kesit yüzeyi yumuşak ve gri beyazdır. Histolojik incelemede ileri derecede tutulan nodüllerin neoplastik hücrelerle diffüz olarak kaplandığı gözlenir. Kapsül invazyonu ve perinodal yayılım olabilir. KLL'deki histolojik görünüm küçük hücreli lenfositik lenfoma ile aynıdır.

Karaciğer büyüklüğü lenfositik lösemilerde myelositik olanlara göre biraz daha belirgindir. Histolojik olarak tutulumun portal alanlarda yoğunlaşması tipik iken myelojenöz lösemilerde infiltrasyonlar daha belirsiz sınırlıdır ve lobülün her bölümündeki sinuzoidlerde yer alabilirler. Bu ana tutulum alanlarına ek olarak böbrek, adrenal, tiroid, myokard, testis gibi diğer organ ve dokularda da infiltrasyon olabilir. Özellikle SSS'nin tutulması önemlidir. Bu durum sıklıkla ALL'de ortaya çıkar. Dişeti tutulumu özellikle monositik lösemide (AML-M5) karakteristiktir. Bu durumdaki hastalarda gingival kenarlarda şişlik ve hipertrofi olur, sıklıkla sekonder enfeksiyonlarla birlikte. DİK(Dissemine İntravasküler Koagülasyon) en fazla akut premyelositik lösemide(AML-M3) görülür. İnfeksiyonlar özellikle akut lösemilerde belirgin bir özelliktir. Özellikle ağız boşluğu, deri, akciğer, böbrek, mesane ve kolonda, sıklıkla da mantar, psödomonas ve parazitler gibi fırsatçı enfeksiyonlar görülür.

#### LÖSEMİ VE LENFOMALARIN ETYOLOJİ VE PATOGENEZİ

Diğer kanser türlerinde olduğu gibi lösemi ve lenfomalarının nedeni olarak da bazı çevresel etkenler öne sürülmüştür. Bunlar arasında iyonize edici radyasyon ve kimyasal ajanlar iyi bilinmektedir. Mesleki, tedavi amacıyla veya kazaen radyasyona maruz kalma (KLL dışında) bazı lösemilerin riskini artırmaktadır. Alkilleyici ajanlarla tedaviyi takiben lösemi ve lenfomalarda artış olduğu kanıtlanmıştır. Radyasyon ve kemoterapi birlikte uygulanırsa (Hodgkin Hastalığı tedavisindeki gibi) risk daha da artmaktadır.

HTLV-1 virüsü erişkin akut T hücreli lösemi, EBV ise Burkitt's lenfoma ile ilişkilidir. Son çalışmalar HTLV-1 ve HTLV-2'nin mikozis fungoidesde etken olabileceğini göstermektedir.

Son olarak yüksek rezolüsyonlu bandlama yöntemleriyle saptanan karyotipik anormallikler, özellikle de translokasyonlar lösemi ve lenfomaların büyük kısmında görülmektedir (8,9).



## HÜCRE ÇOĞALMASI

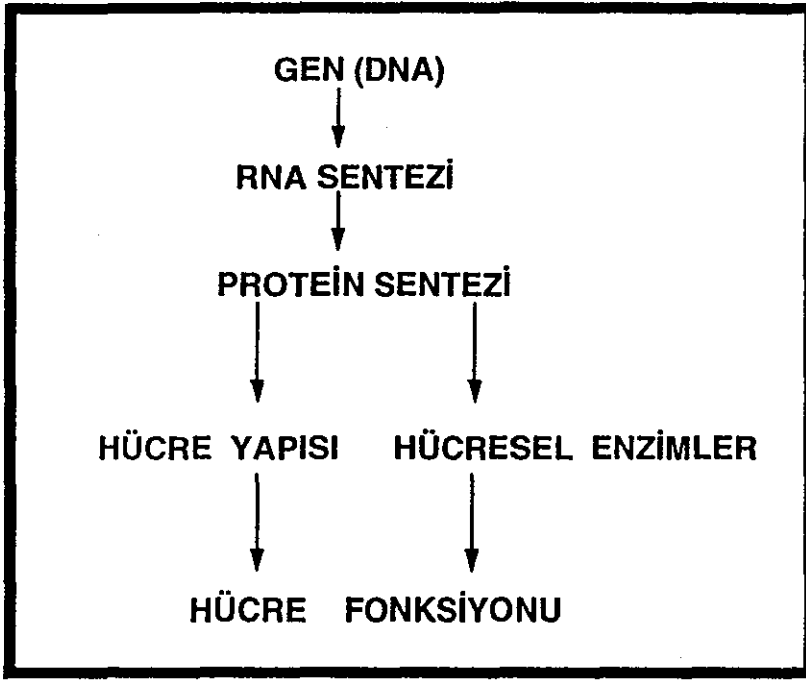
Tüm canlı organizmaların büyüme ve gelişmesi kendilerini oluşturan hücrelerin büyüme, proliferasyon ve differansiyasyonu ile sağlanır. Çok hücreli diploid organizmalarda tüm hücreler ovumun fertilizasyonu ile oluşan zigotdan köken alır (28). Hücrelerin yapısal ve fonksiyonel özellikleri nukleus içine yerleşmiş DNA (deoksiribonükleik asit) tarafından tayin ve kontrol edildiği için , bölünme sonucunda ortaya çıkan hücrelerin ana hücre DNA' sının aynısına sahip olmaları gereklidir . Hücre siklusunun bir dizi evresi, DNA replikasyon ve duplikasyonu ile hücrenin aynı özellikler taşıyan iki yeni hücreye bölünmesini sağlar . İnsan organizmasındaki hücreler arasında bölünme yeteneği farklılıklar göstermektedir. Kemik iliğinin hematopoeziste rol alan hücreleri, derinin germinal tabakası ve barsak epitel hücreleri gibi hücreler sürekli olarak yenilenirken, hepatositler gibi bazı hücre grupları ancak hücre kaybı gibi bazı özel koşullar altında ve gerektiğinde çoğalırlar . Kas hücre tipleri yıllarca hiç bölünme göstermezken , matür nöronlar hayat boyu hemen hiç bölünmezler (29,30).

Yapılan çalışmalar , insan hücrelerinin tipine göre siklus sürelerinin 8 saat ile 100 gün arasında değiştiğini ortaya koymaktadır. Hücre sikluslarındaki bu süre farklılıkları ileride söz edeceğimiz G1 fazının uzunluğuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir (29).

Hücrenin bölünmesi "hücre siklusu" adı verilen bir dizi aşamanın sonucunda gerçekleştirilen oldukça komplike bir olaydır.

## HÜCRE SIKLUSU

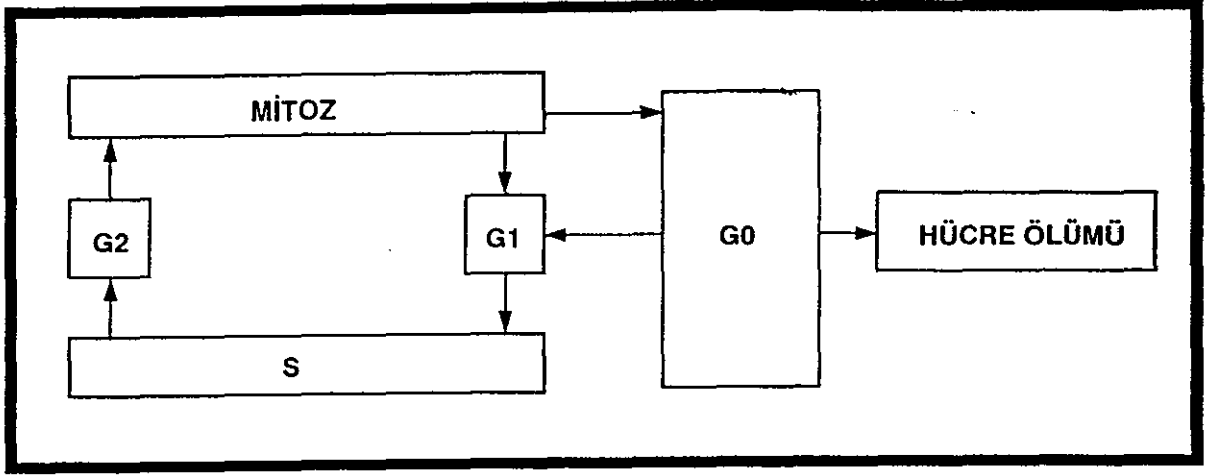
Bir hücre siklusu kabaca hücrenin mitoz hazırlanacağı interfaz (IF) dönemi ile mitoz bölünmenin gerçekleştiği ve iki IF arası dönem olmak üzere ikiye ayrılabilir . Işık mikroskopisi ile nükleer bölünmenin sağlandığı mitoz ve sitoplazmik bölünmenin gerçekleştiği sitokinezis aşamaları görülebilmekle beraber , IF sırasında hücrede oluşan değişikliklerin hiçbiri izlenemez . IF dönemi hücrenin büyüme fazı olup , RNA sentezinin yapıldığı dönemdir. Bu , hücrenin fonksiyonu için gerekli sellüler proteinlerin sentezi için şarttır (şekil 1) (29,30).



Şekil 1: Hücre fonksiyonlarının genetik kontrolü

Aktif olarak bölünen hücredeki nukleusun kendi kromozomal DNA' sını replike etmesi zorunlu olduğundan bu hücre komponenti devamlı olarak IF de sentezlenmektedir . Böylece genetik bilginin duplikasyonu, ekspresyonu sağlanmış olur. IF döneminde hücrelerin biyokimyasında ve membranlarının antijenik yapılarında da önemli değişiklikler ortaya çıkar. Bu süreç sonunda hücre mitoz bölünmeye hazır duruma gelir. Yüksek ökaryotlarda hücre siklusunun %90' ını kaplayan IF dönemi 16-24 saat sürerken mitoz 1-2 saat içinde tamamlanabilmektedir (29).

Ökaryotik organizmaların somatik hücrelerinde hücre siklusunun toplam 5 dönemi vardır. Bunlar GO (postmitotik istirahat fazı, G=gap), G1(proliferasyon fazı), G2(premitotik faz), S (sentez fazı) ve M (mitoz fazı) dönemleridir. Genetik bilginin replikasyonu S fazında yapılırken G1 ve G2 fazlarında RNA ve protein sentezi, M fazında ise nükleer bölünme ve sitokinezis olayları gerçekleşir. Böylece sürekli bölünen hücrelerde G1, S, G2 ve M fazı sırasıyla tekrarlanır. IF' ı oluşturan G1, S ve G2 fazları tüm hücre siklusunun %90' ından fazlasını içerir. Hücre siklusu ortalama 16 saat sürmekte ve bunun 7-8 saatini S, 3 saatini G1, 4 saatini G2 ve 1-2 saatini ise M fazı oluşturmaktadır (29,31). Bununla beraber G1 ve M fazlarının oldukça değişkenlik gösterdiği ve kanserli hücrelerde daha uzun sürdüğü bilinmektedir(29). Hücre siklusunun evreleri şekil 2' de özetlenmektedir.



Şekil 2 : Hücre siklusu

GO: Prolifere olmayan, siklus dışı hücreler

G1: RNA ve protein sentezinin başladığı dönem

S: DNA sentezinin başladığı, RNA sentezinin sürdüğü , hücrelerin protein içeriğinin en fazla olduğu dönem

G2:DNA sentezinin tamamlandığı dönem, RNA ve protein sentezi G1' deki kadardır.

M: Somatik hücre bölünmesi

Postmitotik istirahat fazı (GO fazı) : Bu faz hücrelerin dinlenme fazıdır. Memelilerin replike olmayan somatik hücrelerinde  $2N$  kadar kromozom vardır ve DNA içeriği sabittir. GO fazında; aktivitesi geçici veya sürekli durdurulan hücreler, bir anlamda sikludan çekilir, metabolizmalarını değiştirir ve büyümelerini durdururlar. Bu hücreler fonksiyonlarını tamamladıktan sonra ölür veya tam olarak aydınlatılamayan tetik mekanizmalar ile bölünme uyarısı alırlarsa hücre siklusuna girerler(29).

Proliferasyon Fazı (G1 fazı) : Bu faz DNA sentezinin hemen önündeki evredir. Hücreler için G1 fazı proliferasyona geçişte hücreleri DNA sentezine hazırlar . Büyüme uyarısının verildiği GO/G1 fazında DNA sentezi ve hücre bölünmesine yol açan bir dizi olay meydana gelir. Bu fazda hücre bölünme yönünden çevreden aldığı stimulus ile mRNA sentezini başlatır. DNA sentezi ve hücre bölünmesinin uyarılmasında, hücrede ortaya çıkan değişim ve dönüşümün sağlanmasında büyüme faktörlerinin büyük önemi vardır (29,31). Büyüme faktörlerinin bağlanması ile aktive olan hücre reseptörleri yaklaşık 10 saat sonra

hücrede biyokimyasal ve fizyolojik değişim sürecini başlatırlar (29). G1 fazını , aktif DNA sentezi ve kromozomal duplikasyonun gerçekleştiği S fazı izler.

**Sentez Fazı (S fazı):** Aktif DNA sentez ve replikasyonunun gerçekleştiği bu dönemde hücrelerin DNA içeriği  $2n-4n$  arası artış gösterir(içerik  $2n'$  den fazla,  $4n'$  den azdır). Yaklaşık 7-8 saat süren S fazı hücrenin tüm DNA' sı replike olana dek devam eder . DNA içeriğinin  $4N$  olması ile S fazı sonlanır ve bunu kısa bir G2 fazı izler (29,31).

**Premitotik faz (G2 fazı):** Sentez ve M fazları arasında gerçekleşen bu kısa dönemde hücrenin DNA içeriği tetraploiddir(29,31). G2 fazında histon proteinleri hariç (bu proteinler S fazında sentezlenir) protein ve RNA sentezi devam eder.

**Mitoz fazı (M fazı):** Ökaryotik hücreler, M fazında kromozomlarını ikiye ayırırlar. Bu dönemde önce nükleer bölünme ve bunu takiben sitokinezis meydana gelir. Sitokinezisin tamamlanması ile diploid bir ana hücreden iki diploid yavru hücre meydana gelir (29). Bu yavru hücrelerin her biri IF' ın S fazında DNA replikasyonu ile oluşan , birbirinin ve ana DNA molekülünün tamamen aynısı olan 2 DNA' dan birini alır ve kalıtım yükü olarak birbirinin aynısı olurlar (32). Mitoz bölünmenin tamamlanmasından sonra hücreler hücre siklusundan çıkarak  $G_0$  veya G1 fazlarından birine geri döner ( 29).

Hücre siklusunun mitoz evresi oldukça karmaşık olup kabaca profaz , metafaz, anafaz ve telofaz olmak üzere 4 aşamada gerçekleşir (30).

## PLOİDİ

Mayoz bölünme sonucu gametlerdeki kromozom sayısının yarıya düşmesi haploidi olarak tanımlanır( $n$ ). İnsanda haploid kromozom sayısı 23' dür. Haploid sayıdaki kromozomların tam katlarına euploidi ismi verilir. Eğer bu tam kat;  $2n$  ise diploidik,  $3n$  ise triploidik,  $4n$  ise tetraploidit sayıda kromozomu tanımlar. Normal insan diploidik kromozom sayısına sahiptir( $2n=46$ ). Eğer herhangi bir nedenle haploid sayıda kromozomun tam katları dışında bir kromozom sayısı mevcut ise buna aneuploidi ismi verilir. Aneuploidi hipo veya hiperploidi biçiminde ortaya çıkabilir. Hiperploidi' de  $2n$  kromozom sayısından fazla , hipoploidi' de ise daha az sayıda kromozom vardır. Eğer birden fazla aneuploidi mevcutsa bu durumda multiploidi veya poliploidi' den söz edilir. Bu durumda birden fazla DNA stem-line mevcuttur . Nükleer ploidi varlığı kromozom sayıları yanında indirekt olarak nükleusun DNA içeriğini de yansıtır (33).

## AKIM SİTOMETRİ

Binaltıyüzlü yıllarda mikroskopun keşfi ile başlayan ve Robert Hook' un hücrelerin varlığını göstermesi ile hızlanan süreç içinde hücrelerin biyokimyasal ve fiziksel özellikleri mikroskopik olarak önemli ölçüde saptanabilmiş ve bu yöntem uzun yıllar konvansiyonel patolojinin en önemli tanı aracı olagelmıştır. Son yıllarda , klasik tanı yöntemleri yanında Akım sitometri (FCM) yöntemi de prelinik ve klinik tıp bilimlerinde önemli ve ileri bir tanı yöntemi olarak yerini almaya başlamıştır. Bu yöntem , monoklonal antikor üretimi ve sitokimyasal boyama yöntemlerindeki hızlı ilerleme ve florokrom kimyasındaki gelişmelerle paralel olarak daha da önemli olmaya aday bir tanı yöntemidir (34).

FCM temel olarak hücrelerin büyüklüğüne, vizkozitesine ve granülaritesine bağlı olarak tek hücre düzeyinde araştırma olanakları sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntemle hücrelerin fiziksel ve biyolojik özelliklerinin kantitatif ölçümü , objektif ve doğru olarak yapılabilmektedir (34).

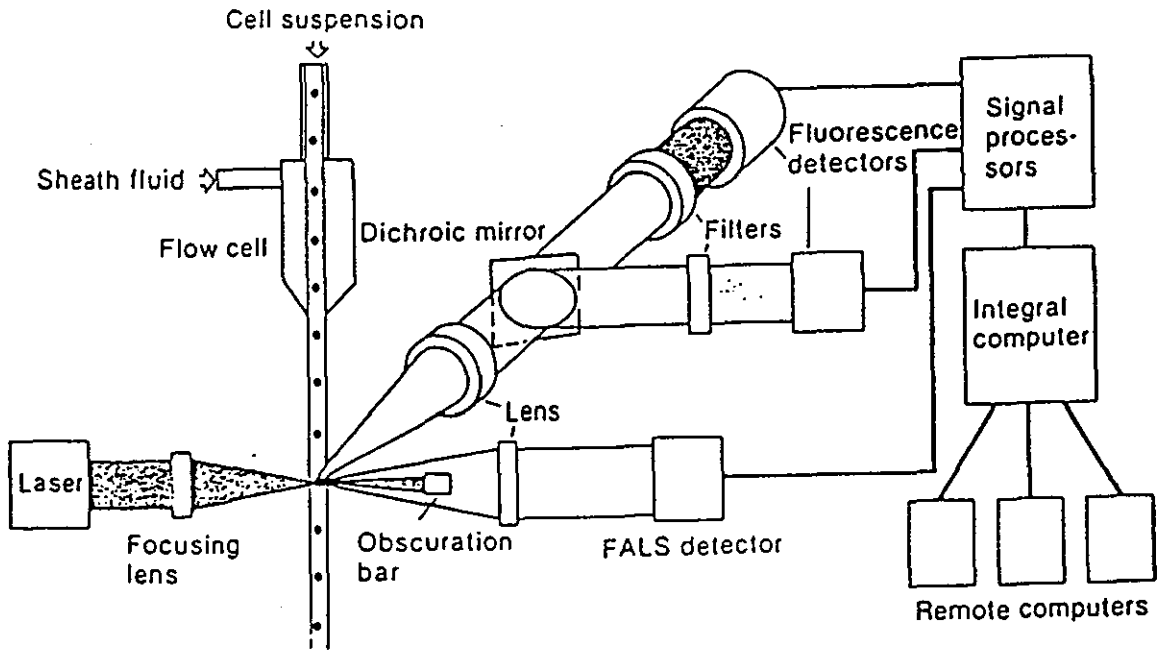
### FCM' NİN ÇALIŞMA PRENSİPLERİ

FCM; tek tek hücrelerin veya diğer biyolojik partiküllerin (mikroorganizmalar vb), cihaz içine bir sıvı içerisinde ve tek sıra halinde alınarak fiziksel ve kimyasal özelliklerinin ölçüldüğü ileri bir tanı yöntemidir (35-38). Her partikülün vermiş olduğu floresanın şiddeti daha sonra analiz edilmek üzere bir bilgisayara kaydedilir. Partiküllerin ışık yolunda meydana getirdikleri sapmalardan yararlanarak ve ışık yolundan geçiş sürelerini ölçerek partiküllerin büyüklüğü ve optik bazı özellikleri hakkında bilgi edinilebilir. Böylece kısa bir sürede çok sayıda hücrenin birkaç özelliğinin birden incelenmesi mümkündür(50).

Bu kompleks sistem, birçok farklı sistemin birleşimi ile ortaya çıkan oldukça karmaşık bir yapıya sahiptir. FCM sistemini oluşturan alt sistemlerin başlıcaları şunlardır (35-38);

- 1) Hücre veya diğer biyolojik partikülleri toplayan ve taşıyan sistem
- 2) Akım sestime (Sheath Fluid) ve Akım Kabini (Flow Chamber)
- 3) Işık kaynağı olarak kullanılan Lazer Sistemi
- 4) Sferik ve çapraz Silindir Filtreler
- 5) Odaklama Aynaları
- 6) Optik ve Elektriksel Sinyal Detektörleri
- 7) Verilerin toplandığı , ve analiz edildiği Bilgisayar Sistemi
- 8) "Cell sorting" sistemi

FCM çalışmasının ilk aşamasında ; özel yöntemlerle taze veya parafine gömülü dokulardan hazırlanan ve nükleik asitlere bağlanan ve bağlandıkları yerde floresan veren florokrom boyalarla işaretlenen örneklerin, "Sheath Fluid" içinden geçirilerek "Flow Chamber" a ulaşmaları sağlanır. Bu geçiş sırasında hücreler tek sıra halinde olup, geçiş sırasında lazer ışığı altında uyarılarak görünür hale gelirler(35-38).Lazer kaynağı olarak genellikle Argon iyonu kullanılır. Bu şekilde , hücreye bağlı florokromun lazer ışınları ile aktifleşmesi, ışığın yoğunluğuna bağlı olarak hücrenin boyutu, iç yapısı, yüzey morfolojisi ve hücrelerin canlılığı hakkında bilgi edinme olanağını yaratır (şekil-3) Böylece bir kaç dakikalık süre içinde 10.000-1.000.000 hücrenin herbirinin özellikleri teker teker belirlenebilir(35-40).



Şekil 3 : FCM düzenineğin şematik görünümü

FCM sisteminde; "Forward Angle Light Scatter" (FALS), "Right Angle Light Scatter" (RALS), yeşil floresan ve kırmızı floresan olmak üzere başlıca dört farklı fotodedektör vardır(41). FALS önden saçılımı sağlar ve hücrenin boyutu hakkında bilgi verir RALS ise yandan saçılımı sağlayarak granülariteyi gösteren. FCM' de elde edilen FALS/RALS histogramı ile hücre süspansiyonundaki farklı popülasyonların birbirinden ayırımı mümkün olabilmektedir(42).

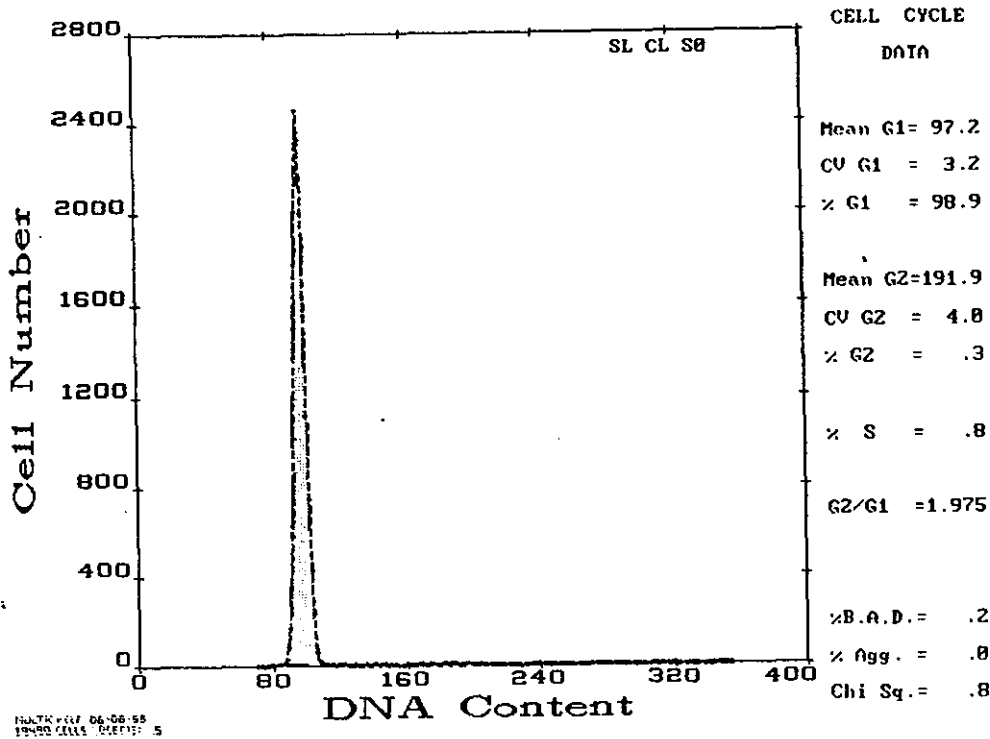
FCM ile prognostik olarak hücre süspansiyonlarında hücrelerin DNA içeriği ve proliferatif aktivitelerinin tayini yapılabilmektedir. DNA' ya spesifik

olan boyaların kullanılması ile yapılan DNA analizi sonucu , uzun ve pahalı olan konvansiyonel yöntemler ile gözden kaçabilen aneuploidik küçük hücre grupları bile saptanır hale gelmektedir.

DNA analizi ile G0 ve G1 fazında bulunan hücrelerin ortalama DNA içeriği ve hücre siklusunda her fazda bulunan hücreler ile birbirlerine oranı tesbit edilebilir(35-38).

DNA'ya bağlanan boyanın miktarı ve dolayısı ile fotodedektörlerce algılanan ışığın yoğunluğu hücrenin DNA içeriği hakkında doğru orantılı olarak bilgi verir. Böylece bir hücre populasyonunda DNA' da ortaya çıkan bir kayıp veya ilave(aneuploidi) tesbit edilebilir hale gelir (43). DNA içeriğinde ortaya çıkan anormallikler, tümörün kromozomol anormalliklerinin yanı sıra herhangi bir nedenle oluşan kromozom sayısındaki değişiklikleri de yansıtır. Ancak bu teknik ile total DNA miktarı ölçülebildiğinden , toplam DNA miktarında değişikliğe neden olmayan "translokasyon " gibi anormallikler saptanamaz (35,44).

Hücreler G2 ve M fazına ulaştıklarında DNA içeriği tam iki katına çıkar( $4n$ ) ve G2/M fazındaki hücreler G0/G1 pikinden daha uzakta ve histogramın sağında yer alırlar. Siklusun S fazındaki hücreler ise  $2n'$  den fazla  $4n'$  den ise daha az sayıda DNA içeriğine sahip hücreler olup DNA histogramunda söz konusu iki hücre grubu arasında izlenirler(38). Aşağıda normal bir DNA histogram örneği gösterilmektedir(Histogram 1).



Histogram 1: Normal bir DNA histogramı.

DNA histogramlarında y eksenini hücre nükleusu (hücre sayılarını), x eksenini ise artmakta olan floresanı (DNA miktarını) temsil etmektedir (38).

Histogramlarda DNA içeriğinin yayılımını hücre popülasyonunu yansıtan pik çevresinde bir miktar değişkenlik gösterir. Bu değişkenlik; boyama yöntemine, cihaza ait hatalara veya DNA boyası hücre DNA' sına bağlanırken hücreler arasında ortaya çıkan farklılıklar gibi nedenlere bağlı olabilir ve "coefficient of variation" (CV) olarak ifade edilir. Yani CV değeri FCM analizinin kalitesinin bir belirtisidir ve bu değer ne kadar düşük olursa çalışmanın o kadar güvenilir olduğunu gösterir(35).

Araştırılan popülasyonun DNA içeriği ve ploidisinin değerlendirilmesinde kullanılan kriter DNA indeksi (Dİ)' dir. Dİ değeri örnekteki G0/G1 pik ortalamasının, diploid referans hücre G0/G1 pik ortalamasına bölümü ile elde edilen bir değerdir. Diploid bir popülasyonda Dİ=1 olmalıdır. Malign hücreler sıklıkla normal diploid DNA içeriğinden sapmıştır. Aneuploidik hücre popülasyonları, DNA histogramlarında diploidik pikin dışında ekstra pikler olarak görülürler. Ekstra pik, diploidik pikin solunda ise (Dİ<1) hipoploidi, sağında ise Dİ>1 hiperploidiyi işaret eder. Bazen DNA histogramlarında birden fazla aneuploidik pik görülebilir(poliploidi) (35).

Hücre siklusunun G0/G1, S, G2/M fazlarındaki hücre fonksiyonları DNA dağılımına göre matematiksel olarak belirlenir. Bu amaçla en sık kullanılan parametreler, hücrelerin proliferatif aktivitesini gösteren S Faz fraksiyonu ve Proliferatif İndeks (Pİ)' dir. Bu iki parametre aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanır.

$$\text{S Faz Fraksiyonu} = \frac{S}{G0/G1+G2/M} \times 100$$

$$\text{Proliferatif İndeks} = \frac{S+G2/M}{G0/G1+S+G2/M} \times 100$$

Aneuploidi ile birlikte yüksek faz fraksiyonu gösteren tümörler ile bu tümörlerin sağ kalımları arasında korelasyon olup böyle tümörlerde sağ kalım kısa olmaktadır(35,45).

FCM ile periferik kan, kemik iliği, tüm vücut sıvıları, taze dokular ve parafinize edilmiş arşiv materyalleri çalışma grupları oluşturabilir.



## MATERYAL-METOT

Çalışmada KTÜ Tıp Fakültesi Dahiliye Anabilim Dalı tarafından takip ve tedavisi yapılan toplam 60 lösemi olgusu değerlendirilmeye alınmıştır. Bu olguların yaş, cins dağılımı, klinik ve laboratuvar verileri ile kemik iliği aspirasyon ve biyopsileri yapılmıştır. Kemik iliği aspirasyonları Wright- Giemza ile boyanarak değerlendirilmiş , kemik iliği biyopsileri %1' lik asetik asit (9 kısım)+formaldehit(1 kısım) ile dekalsifikasyon sonrası formalin tesbitte bırakılmıştır. Daha sonra rutin parafin tekniğine göre izlenip kızaklı mikrotom ile 5-6 mikron kalınlığında kesitler alınmıştır. Biyopsilerin ışık mikroskobunda değerlendirilmesi Hematoksilen Eozin (HE) ve periodik Asid Schiff(PAS), Gümüşleme histokimyasal reaksiyonlarıyla yapılmıştır(46). Gümüşleme reaksiyonu ile fibrozis 3 derece üzerinden değerlendirildi. 1. derecede retiküler liflerde hafif artış, 2. derecede belirgin artış ve kollagen oluşumu, 3. derecede ise kemik iliği hücrelerinin yerini alacak şekilde ileri fibrozis olmak üzere değerlendirme yapıldı.

Kemik iliği aspirasyonları hücre doku hazırlama yöntemlerine göre izlenerek akım sitometri aletiyle DNA analizi ve reseptör analizi çalışılmıştır.

### AKIM SİTOMETRİ ÇALIŞMASI

Hastalardan kemik iliği aspirasyon sonucunda alınan örnekler EDTA K<sub>3</sub> Vacutainer steril tüplere aktarıldı. Karışım sağlanarak pıhtılaşma önledi.

Çalışmada kullanılacak antikolar belirlendi (İzotipikkontroller, CD<sub>3</sub>/CD<sub>4</sub>, CD<sub>7</sub>/CD<sub>13</sub>, EO<sub>20</sub>/CD<sub>33</sub>, CD<sub>22</sub>/ HLADR, CD<sub>10</sub>/CD<sub>19</sub> ve CD<sub>5</sub>)(Tablo 3).

Beş mililitre kapasiteli plastik tüplere monoklonal antikor örneklerinden 20 mikrolitre konuldu. Üzerine kemik iliği aspirasyon örneklerinden 50 mikrolitre eklendi. Mikserde karışım sağlanarak 20 dakika inkübe edildi. Sonunda Coulter Multi Q Prep cihazı kullanılarak İmmunoprep A (Formik asit - Stabilizör olarak), İmmunoprep B (Sodyum Karbonat, sodyum klorür, sodyum sülfat-stabilizör olarak), İmmunoprep C (Paraformaldehit, Buffer olarak), solüsyonlarından otomatik olarak geçirildi. Daha sonra oda ısısında 20 dakika inkübe edildi. Bu süre sonunda hazır olan örnekler Coulter Epics Elite ESP-Flow-Cytometry cihazından geçirilerek en az 5 bin hücre sayımı sonucunda analizleri yapıldı.

Parametreler	Monoklonal Antikor katalog No
İzotipik kontrol	IgG1, FITC/IgG2a,PE (İmmunotech)
CD <sub>3</sub> /CD <sub>14</sub>	ImmunoTech (Kat. No:1874)
CD <sub>7</sub> /CD <sub>13</sub>	ImmunoTech (Kat. No:0585)
CD <sub>20</sub> /CD <sub>33</sub>	ImmunoTech (Kat. No: 1455)
CD <sub>22</sub> /HLADR	ImmunoTech (Kat. No: 1136)
CD <sub>10</sub> /CD <sub>19</sub>	ImmunoTech (Kat. No: 0471)
CD <sub>5</sub>	ImmunoTech (Kat No: 1179)

Tablo 3: Akım sitometri çalışmasında kullanılan antikorlar ve katalog numaraları.

### İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin istatistiksel analizinde epi info 5.0 versiyon epidemiyoloji paket programı ve statgraf 5.0 versiyon istatistik paket programı kullanıldı. Niteliksel verilerde Ki-kare testi uygulandı. 2x2 düzenlerde beklenen değer 5' in altında olduğunda Fisher' in kesin ki-kare testi, gözlenen değer 25' in altında olduğunda Yates düzeltmesi yapıldı.

Yaşları yönünden gruplar karşılaştırılırken veriler bağımsız ve parametrik varsayımları yerine getirmediğinden Mann Whitney U testi kullanıldı.

## HEMATOPOETİK HÜCRELERE AİT CD ANTİJENLERİ

- CD2 : T hücreler, timositler, NK hücreler
- CD3 : Matür T hücreler, timositler
- CD4 : T helper/Inducer hücreler, monosit ve makrofajlar
- CD5 : Timosit, T hücre, B hücre subset
- CD7 : T hücre
- CD8 : T sitotoksik/T supresör hücre
- CD10(CALLA) : Lenfoid projenitör hücreler, granülositler
- CD13 : Myeloid monosit, granülosit ve makrofajlar
- CD15 : Granülosit, monositler
- CD19 : Pan B hücre
- CD20 : Pan B hücre
- CD21 : Matür B hücreler, folliküler dendritik hücreler
- CD22 : Matür B hücreler, Hairy cell lösemi hücreleri
- CD25 : Aktive T hücreleri, B hücreleri ve makrofajlar
- CD33 : Myeloid projenitör hücreler, monositler
- CD34 : Hemapoetik öncül hücreler
- CD45 : Pan lökosit
- HLADR : Aktive T hücreleri

## BULGULAR

Çalışmada 60 lösemi olgusu değerlendirilmeye alınmış ve yaş-cins dağılımı, lösemi tipi Tablo 4' de özetlenmiştir.

Lösemi tipi	Cinsiyet K/E	Yaş ort. ± SD
AML(n=30)	15K/15E	44±21.2
ALL(n=10)	5K / 5E	38.2±14.6
KML(n=7)	5K/ 2E	68 ±12.5
KLL(n=11)	3K/ 8E	61.6±8.9
Hairy cell lösemi(n=1)	1E	51
Bifenotipik lösemi(n=1)	1E	35

Tablo 4: Lösemi tiplerine göre cinsiyet dağılımı ve yaş ortalamaları.

Cinsiyet açısından akut ve kronik lösemi tipleri arasında fark olmadığı görülmüştür ( $p > 0.05$ ).

Akut lösemiler (AML ve ALL) ortalama 38 yaş olmak üzere daha genç yaşta görülürken , kronik lösemiler KML' de ortalama 68 yaş, KLL' de ise 61 yaş olmak üzere daha ileri yaşlarda görülmektedir.

Kemik iliği aspirasyon ve biyopsileri kıyaslı olarak incelenmiş ve çalışmada lösemi olgularının lenfositik ve myelositik ayrımı yapılmıştır.

Çalışmaya dahil edilen 60 lösemi olgusunun tamamında kemik iliği hipersellüler görünümde olup atipik mononükleer hücrelerle infiltrate idi.

Akut lösemili 40 olgunun (Resim1-6) 10 tanesi ALL(Resim 1-3) bulunmuştur. ALL' li olgularda kemik iliği diffüz olarak yağ dokusunu ortadan kaldıracak ve kemik spiküllerini deforme edecek boyutta atipik mononükleer hücre infiltrasyonu göstermekteydi (Resim 1). İleri ışık mikroskopik büyütmelerinde ALL' li olgularda geniş eozinofilik ya da şeffaf sitoplazma ve nispeten üniform atipik ve hiperkromatik çekirdek yapısı dikkat çekti (Resim 2). ALL' li olgularda kemik iliğindeki diğer bir yapısal değişiklik gümüşleme reaksiyonlarında belirginleşen hafif derecede fibrozisdi(Resim 3).

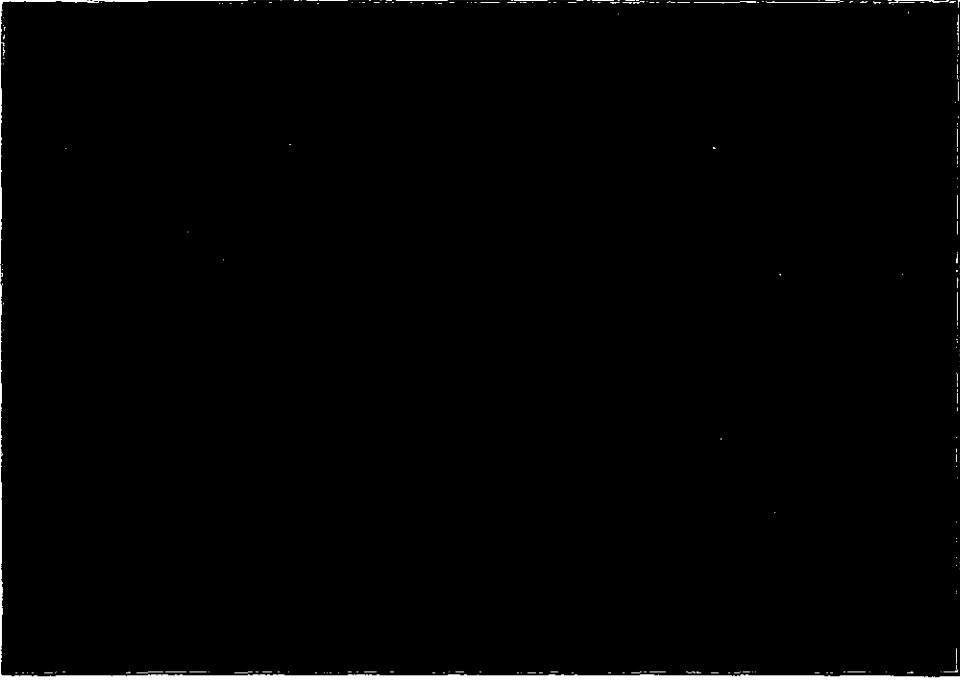




**Resim 1: ALL' li olguda kemik iliğinde diffüz atipik mononükleer hücre infiltrasyonu görülmekte (HEx200).**

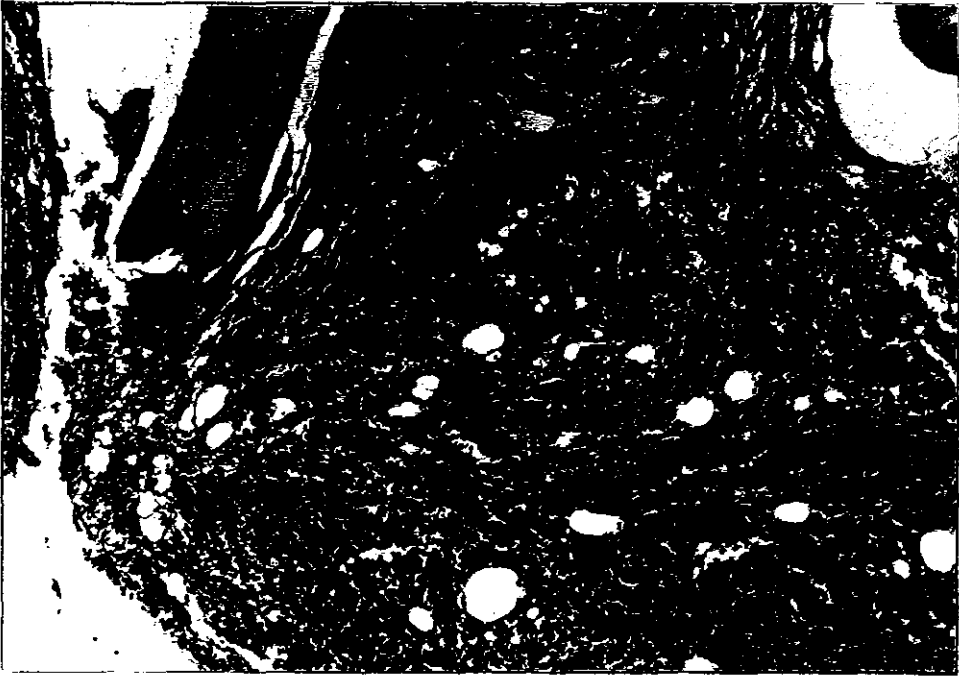


**Resim 2: ALL' li başka bir olguda atipik mononükleer hücre infiltrasyonu gösteren kemik iliği biyopsisi (HEx800).**

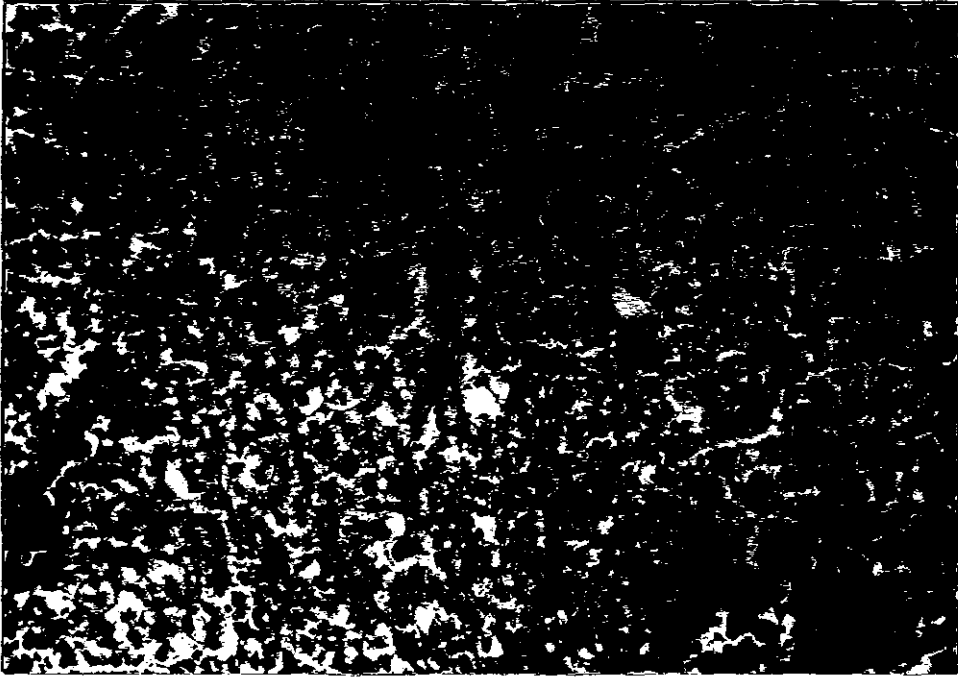


Resim 3: ALL'de kemik iliği biyopsisinde hafif derecede fibrozis şeklinde retiküler liflerde artış görülmekte (Gümüşleme x400).

Akut lösemi olgularınının 30 tanesi akut myeloid lösemi idi(Resim 4-6). AML' li olgularda kemik iliği diffüz olarak atipik hücrelerle infiltre bulundu (Resim 4). Yağ dokusunun büyük ölçüde ortadan kalktığı kemiklerde inceltme ve düzensiz dağılım görüldü(Resim 5). Gümüşleme reaksiyonunda AML' de retiküler liflerde orta derecede (2.derece) artış olduğu görüldü (Resim 6).



Resim 4: AML' li bir olguda kemik iliği biyopsisi (HEx200).



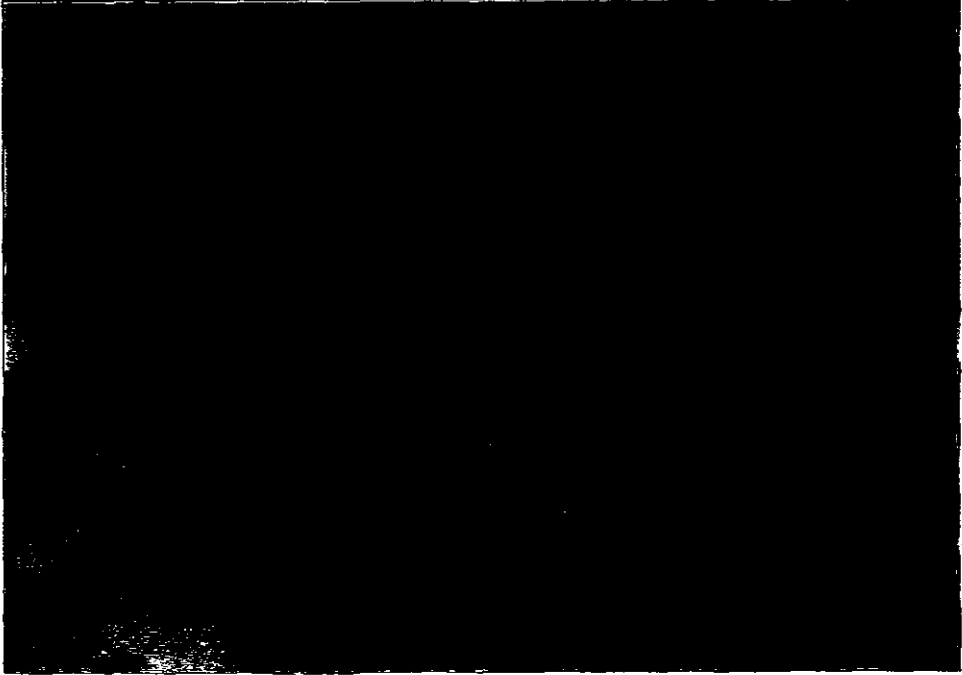
**Resim 5:** Aynı olguda kemik iliği biyopsisinde atipik mononükleer hücre infiltrasyonu (HEx400).



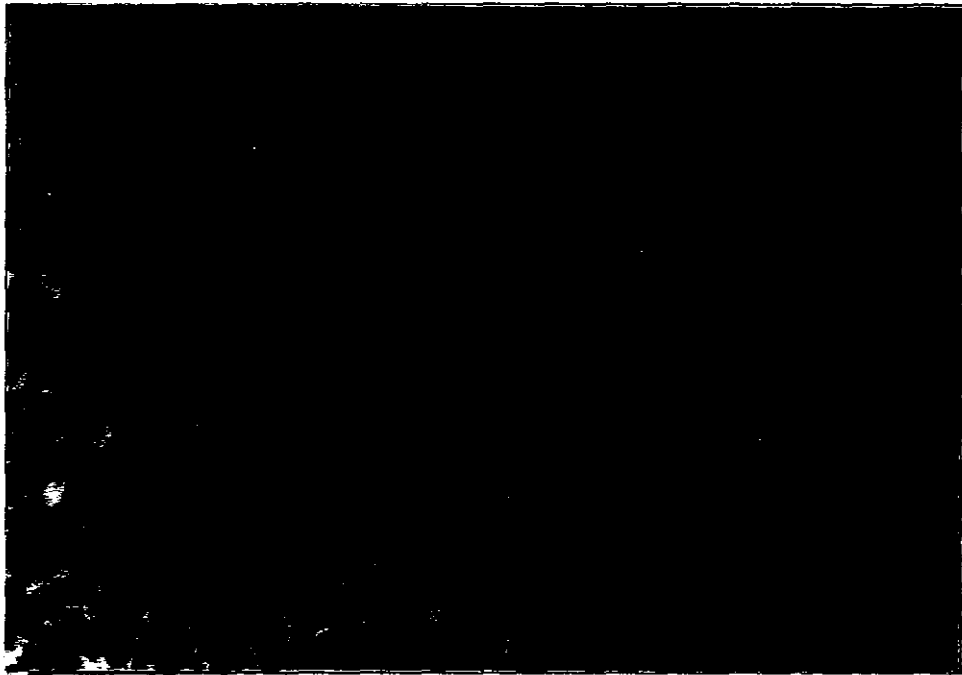
**Resim 6:** AML' li bir olguda kemik iliği biyopsisinde retiküler liflerde artış görülmekte(Gümüşleme reaksiyonux400).



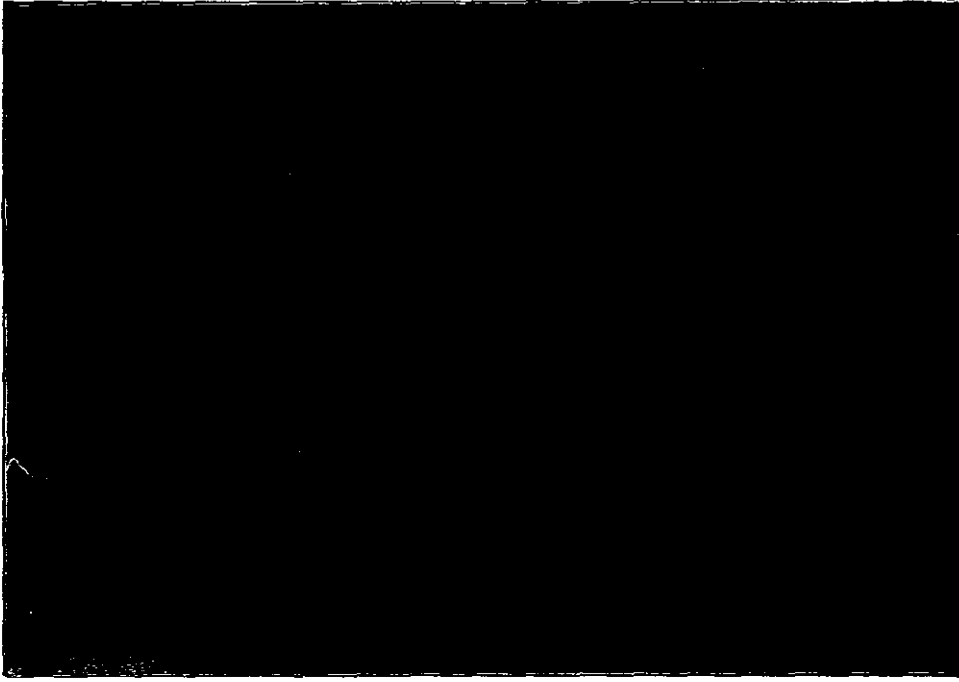
Kronik lösemili 18 olgunun (Resim 7-12) 11 tanesi KLL tanısı aldı(Resim 7-9) KLL' li olgularda diffüz olarak kemik iliğinin tutulumu ve yağ dokusunun azalması görüldü (Resim 7). Bu olgularda PAS pozitif reaksiyon izlendi (Resim 8). Gümüşleme reaksiyonunda hafif derecede (1.derece) artış görüldü (Resim 9).



Resim 7: KLL'li bir olguda kemik iliği tutulumu (HEx400).

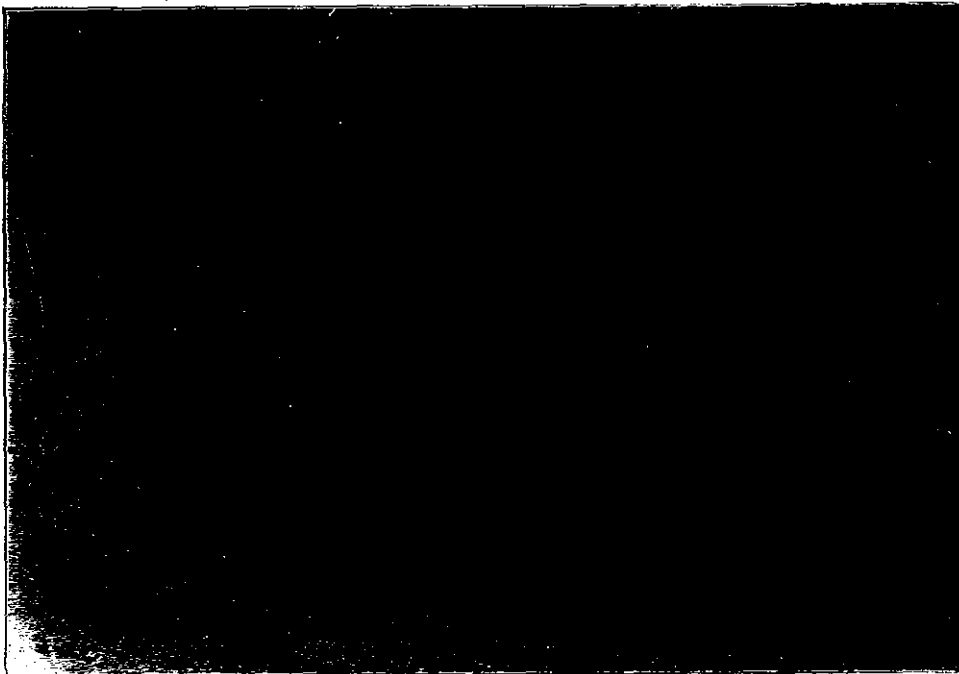


Resim 8: KLL' de PAS pozitif boyanan atipik mononükleer hücreler görülmekte(PASx800).

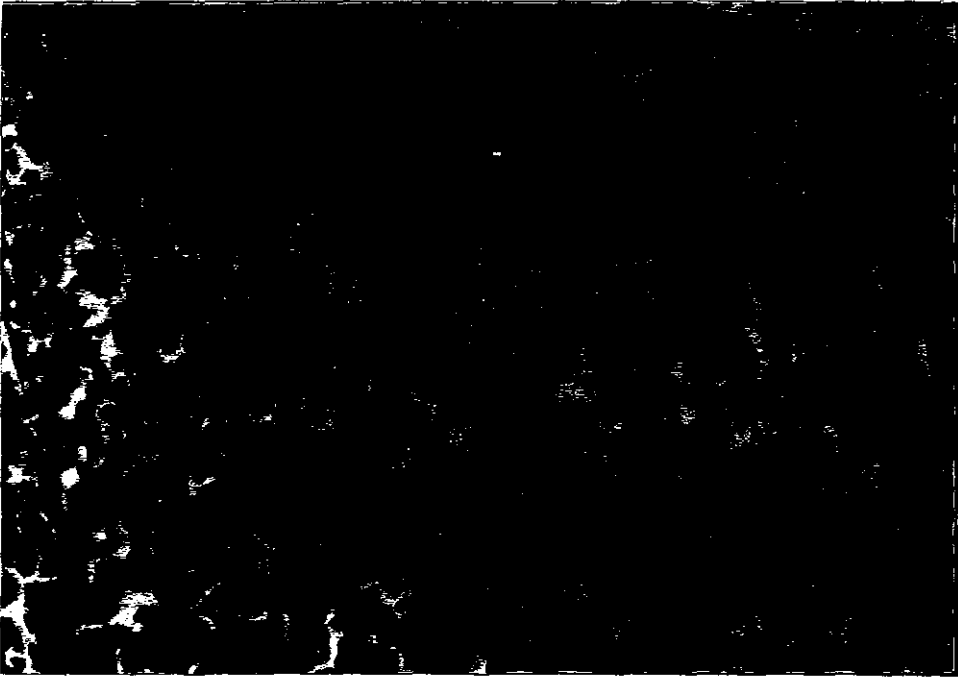


**Resim 9:** KLL' de retiküler liflerde artış şeklinde fibrozis görülmekte (Gümüşleme reaksiyonux800).

KML' li 7 olguda kemik iliğinin diffüz tutulum gösterdiği yağ dokusunun ortadan kalktığı ve kemik spiküllerinin incelendiği görüldü (Resim 10) ileri büyütmede belirgin hücresel atipi izlendi(Resim 11). Gümüşleme reaksiyonunda hafif derecede retiküler lif artışı görüldü (Resim 12).



**Resim 10:** KML' li bir olguda diffüz tutulum gösteren lösemik infiltrasyon (HEX80).



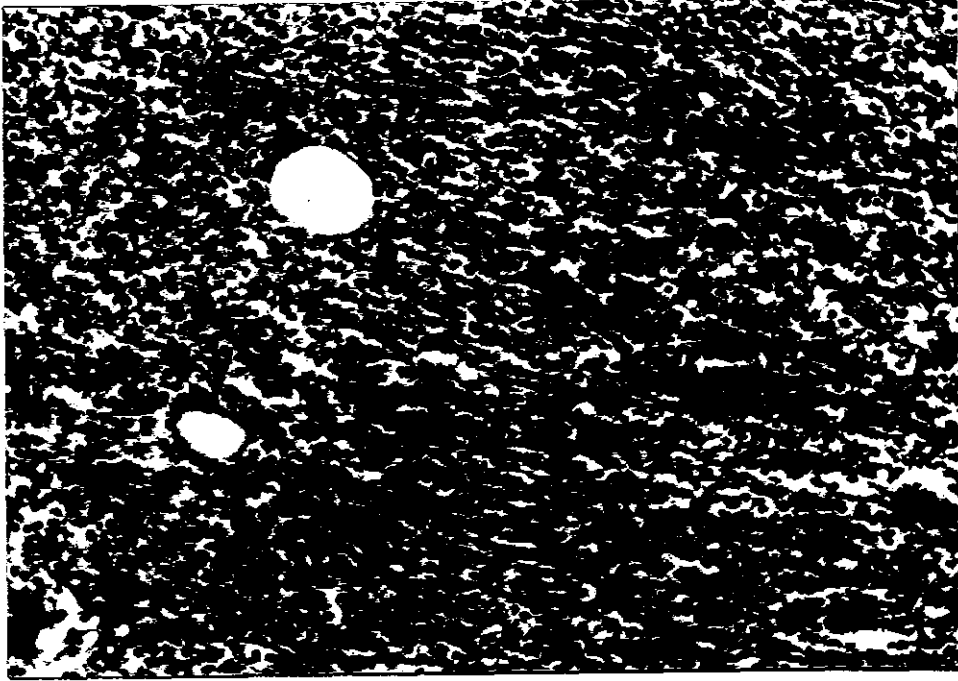
Resim 11: KML' de atipik mononükleer hücre infiltrasyonu gösteren kemik iliği (HEx400).



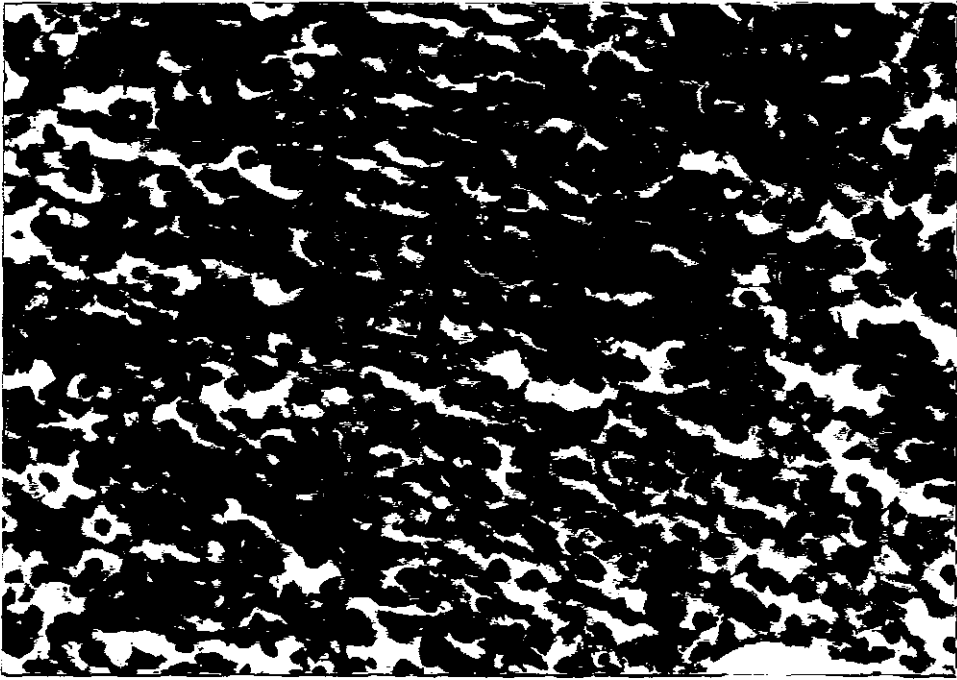
Resim 12: KML' de atipik mononükleer hücreler arasında retiküler liflerde kabalaşma (Gümüşleme reaksiyonux800).

60 lösemi olgusundan bir tanesi Hairy cell lösemi tanısı alan 51, yaşında dalak büyüklüğü gösteren bir erkek hasta idi. Bu hastaya ait kemik iliği biyopsisinde kemik iliğinde şeffaf sitoplazmalı atipik hücre infiltrasyonu görüldü(Resim 13-14). Gümüşleme reaksiyonunda ilik dokusunda orta derecede (2.derece) fibrozis izlendi(Resim 15).

Olgulardan bir tanesi ise myeloid ve lenfositik özellikler taşıyan akut bifenotipik lösemi tanısı alan 35 yaşında erkek hasta idi.



**Resim 13:** Hairy cell lösemi tanısı alan olguda şeffaf sitoplazmalı atipik mononükleer hücre infiltrasyonu görülmekte (HEx200).



Resim 14: Resim 13' deki alanın daha büyük büyütmedeki görüntüsü (HEx400).



Resim 15:Aynı olguda kemik iliği biyopsisinde retiküler lif artışı görülmekte (Gümüşleme reaksiyonux400).

Histokimyasal reaksiyonlardan PAS reaksiyonu açısından akut ve kronik lenfositik lösemiler büyük ölçüde pozitif sonuç verirken akut ve kronik myelositik lösemiler genelde negatif bulundu (Tablo 5).

	ALL	%	KLL	%	AML	%	KML	%
PAS(+)	9	90	7	64	6	20	0	0
PAS(-)	1	10	4	36	24	80	7	100

Tablo 5: Lösemi tiplerine göre PAS reaksiyonu sonuçları.

İstatiksel olarak PAS reaksiyonunun lenfositik lösemilerde anlamlı olarak pozitif sonuç verdiği saptandı ( $P < 0,005$ ).

Ayrıca Hairy cell lösemili olguda PAS reaksiyonu negatif iken bifenotipik lösemi tanısı alan olguda yer yer hafif pozitiflik saptandı.

Gümüşleme reaksiyonunda fibrozisin varlığı ve derecesi değerlendirildi (Tablo 6 ve 7).

	ALL	%	KLL	%	AML	%	KML	%
Fibrozis(+)	8	80	9	82	12	40	4	36
Fibrozis(-)	2	20	2	18	18	60	3	64

Tablo 6: Lösemi tiplerine göre fibrozis varlığı.

Fibrozis derecesi	Olgu sayısı	%
+	23	70
++	6	18
+++	4	12
Toplam	33	100

Tablo 7: Fibrozis gösteren lösemili olgularda fibrozis derecesine göre olgu sayısı.

Fibrozis açısından lösemi tipleri arasında istatistiksel açıdan farklılık gözlenmedi ( $P > 0,05$ ).

Ayrıca Hairy cell lösemide ++, bifenotipik lösemide ise + olmak üzere fibrozis varlığı saptandı.

## AKIM SİTOMETRİ SONUÇLARI

Olguların tümünde kemik iliği aspirasyonları akım sitometri incelenmesine alındığında DNA analiz ve reseptör analiz verileri elde edildi. DNA analizinde lösemi tiplerine göre aneuploidi varlığı Tablo 8' de özetlenmiştir.

	Aneuploidi		Diploidi	
	n	%	n	%
AML (n=30)	16	53.0	14	47.0
ALL (n=10)	5	50.0	5	50.0
KML (n=7)	2	28.5	5	71.5
KLL (n=11)	1	9.0	10	91.0
Hairy cell L. (n=1)	-	-	1	100.0
Bifenotipik L. (n=1)	1	100.0	-	-
<b>Toplam (n=60)</b>	<b>25</b>	<b>41.6</b>	<b>35</b>	<b>58.4</b>

**Tablo 8 : Lösemi tiplerine göre aneuploidi ve diploidi oranları.**

Bu verilerle lösemi tipleri arasında (AML-ALL ve KML-KLL) aneuploidi açısından belirgin bir farklılık görülmedi ( $P > 0,05$ ).

Aneuploidi açısından lösemiler akut ve kronik , lenfositik ve myelositik olmak üzere tekrar alt gruplara ayrılarak karşılaştırma yapıldı ve sonuçları Tablo 9 ve 10'da özetlendi.

	Aneuploidi		Diploidi	
	n	%	n	%
Akut (n=40)	21	52.5	19	47.5
Kronik (n=18)	3	16.6	15	83.4

**Tablo 9: Akut ve kronik lösemilerde aneuploidi görülme sıklığı.**

	Aneuploidi		Diploidi	
	n	%	n	%
Lenfositik (n=21)	6	28,5	15	71,5
Myelositik (n=37)	18	48,6	19	51,4

**Tablo 10: Lenfositik ve myelositik lösemilerde aneuploidi görülme sıklığı.**

Tüm bu değerlere göre aneuploidi açısından lenfositik ve myelositik lösemiler arasında belirgin bir farklılık olmadığı ( $P > 0,05$ ) buna karşın akut lösemilerde kronik lösemilere göre kaydadeğer ölçüde daha fazla aneuploidi varlığı saptandı ( $P < 0,05$ ). Aneuploidinin tipi açısından tüm olgulardan 3 tanesinde hipodiploidik aneuploidi (Histogram 2) saptandı. Bu 3 olgu da ALL tanısı almıştı. Diğer olgulardaki aneuploidi tipi hiperdiploidi şeklinde idi (Histogram 3).

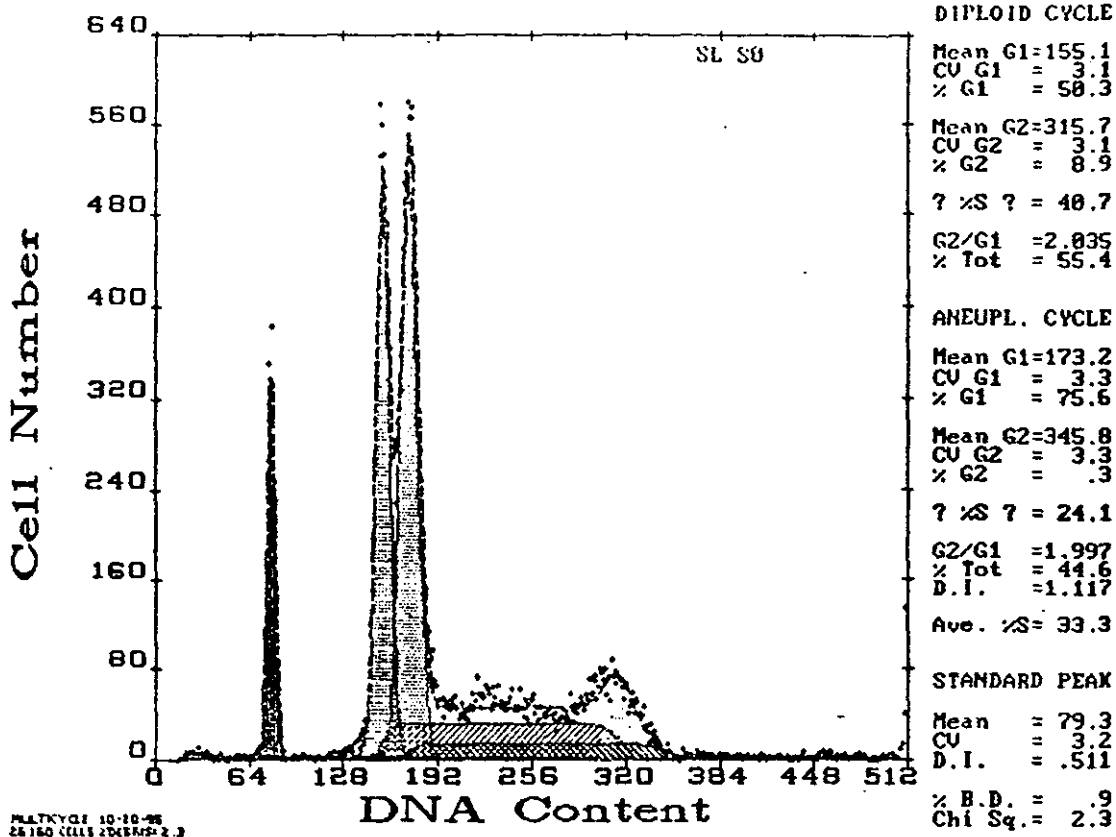
AML' li olgularda FAB klasifikasyonuna göre alt tiplendirme yapılmış ve bunlardaki aneuploidi görülme sıklığı Tablo 11' de özetlenmiştir.

	n	Aneuploidi	
		n	%
M1	2	-	0
M2	9	7	77
M3	11	4	36
M4	7	4	57
M6	1	1	100
Toplam	30	16	53

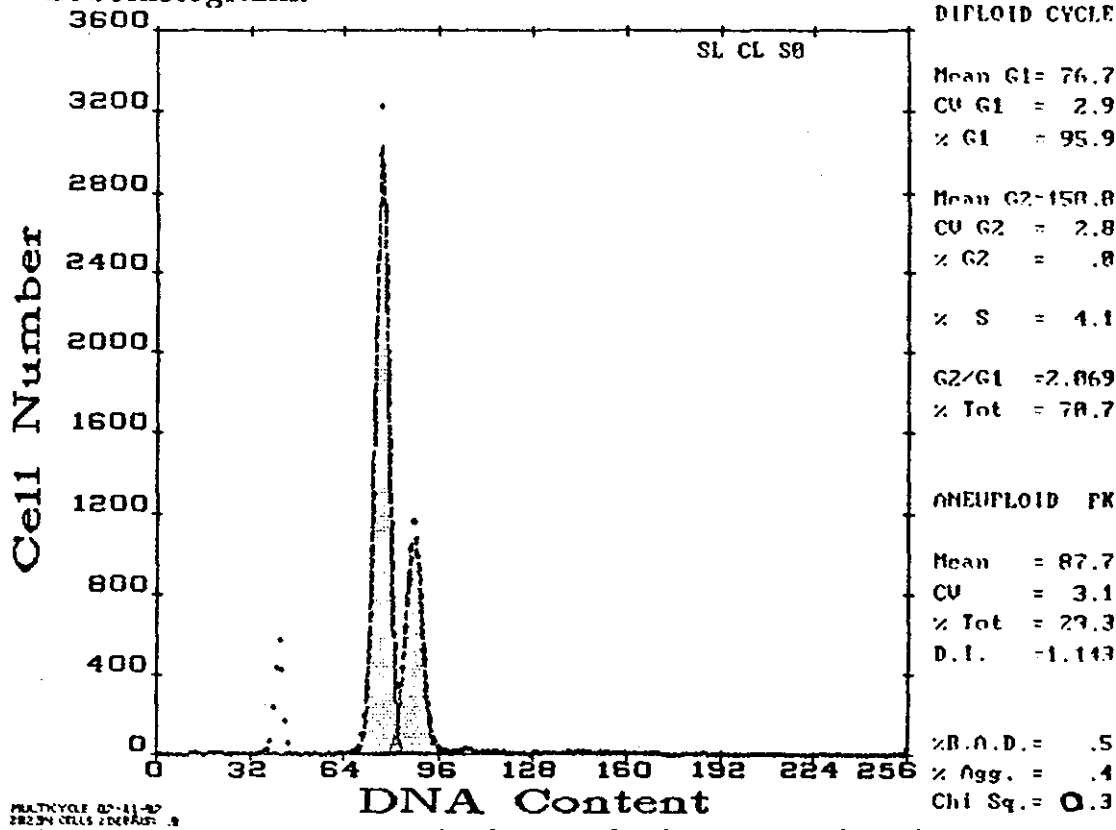
\*M0, M5 ve M7' de vaka bulunmamaktadır.

**Tablo 11 : FAB Klasifikasyonuna göre AML subtiplerinde aneuploidi sıklığı .**





Histogram 2: Hipodiploid aneuploidi gösteren bir olguya ait DNA histogramı.



Histogram 3: Hiperdiploid aneuploidi gösteren bir olguya ait DNA histogramı.

DNA analizinde ayrıca S faz değerlerine bakıldı. Elde edilen veriler Tablo 12'de özetlendi.

Lösemi tipi	n	Ortalama S fazı (%) ± SD
AML	30	12.33±7.20
ALL	10	10.05±8.72
KML	7	9.50 ±2.52
KLL	11	7.59±3.23
HCL	1	5
Bifenotipik Lösemi	1	21
<b>Toplam</b>	<b>60</b>	<b>10.70±6.70</b>

**Tablo12:Lösemi tiplerine göre ortalama S fazı değerleri**

Lösemi tipleri ile S fazı değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı ( $P > 0,05$ ). Yine lösemi alt tiplerinde aneuploidik olanlarla S fazı yüksekliği arasında da önemli bir ilişki saptanmadı( $P > 0,05$ ) ancak tüm lösemi olguları birlikte değerlendirildiğinde aneuploidik olanlarla S fazı değerinin büyüklüğü arasında pozitif ilişki bulundu( $P < 0,05$ ).

Akım sitometrik inceleme ile ayrıca reseptör analizi yapılarak lösemik hücrelerin lenfositik (T/B lenfosit) veya myelositik orjini hakkında bilgi edinildi. Lösemi tiplerine göre reseptör pozitiflikleri Tablo 13 'de belirtilmektedir.

	AML(n=30)		ALL(n=10)		KML(n=7)		KLL(n=11)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
CD3	1	3.3	5	50.0	1	14.2	0	0.0
CD5	1	3.3	5	50.0	0	0.0	8	72.7
CD7	0	0.0	5	50.0	0	0.0	1	9.1
CD10	0	0.0	2	20.0	0	0.0	0	0.0
CD13	29	96.7	1	10.0	7	100.0	1	9.1
CD14	2	6.6	0	0.0	0	0.0	0	0.0
CD19	0	0.0	3	30.0	0	0.0	10	90.9
CD20	1	3.3	1	10.0	0	0.0	5	45.4
CD22	1	3.3	2	20.0	0	0.0	5	45.4
CD33	28	93.4	0	0.0	6	85.8	0	0.0
HLADR	15	50.0	0	0.0	4	57.1	6	54.5

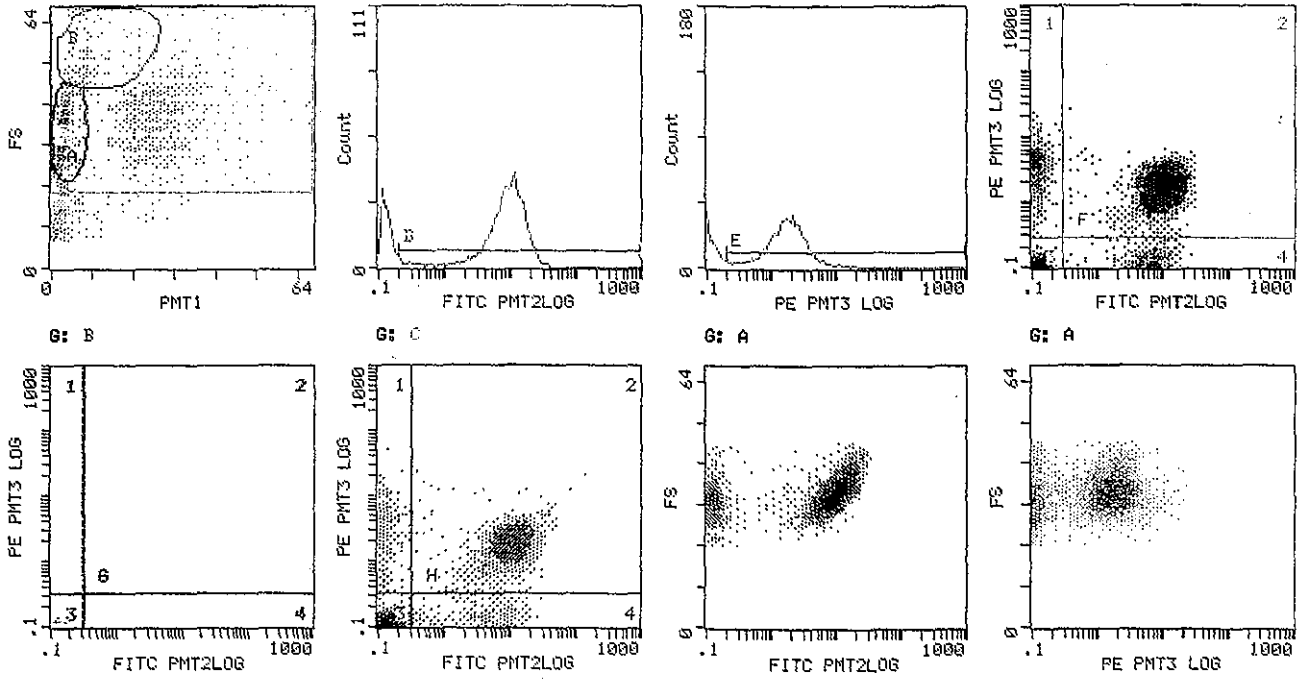
**Tablo 10: Lösemi tiplerine göre reseptör pozitifliği**

Lenfoid reseptörler için %20, myeloid reseptörler için %30' un üzerindeki değerler pozitif kabul edildi.

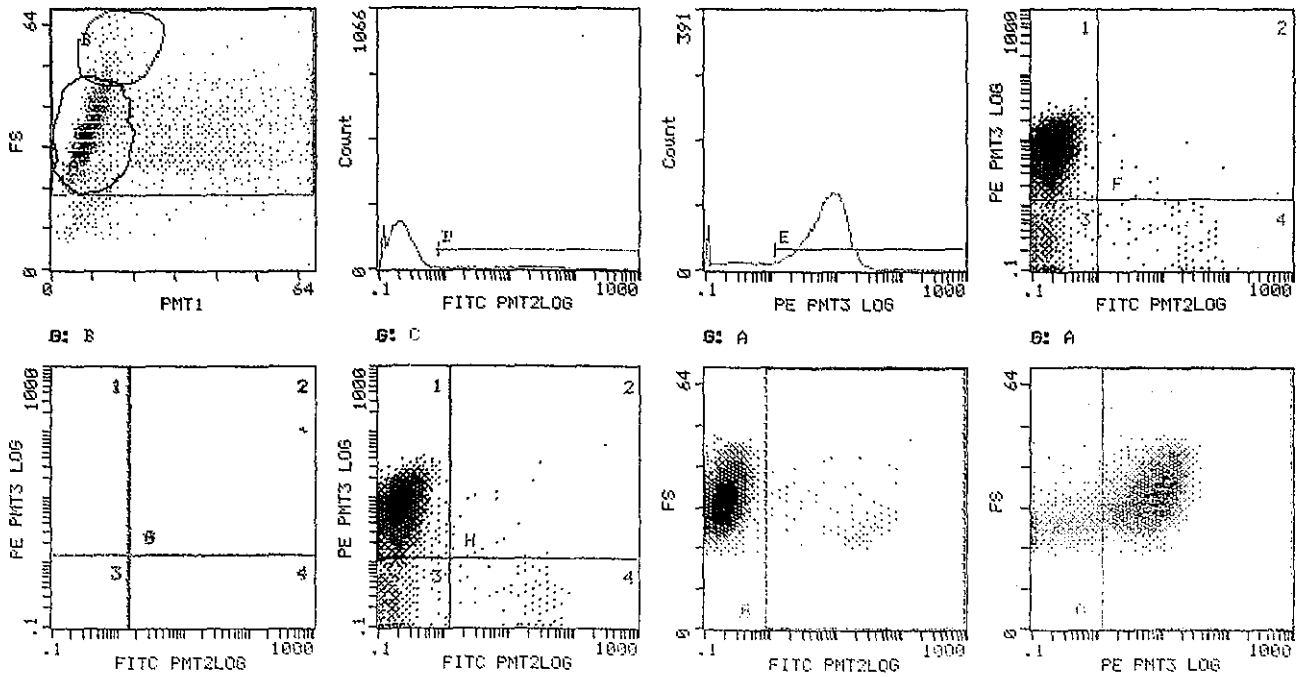
Hairy cell lösemide CD9 ve CD25 pozitif, Bifenotipik lösemide ise hem lenfoid hem de myeloid reseptörler pozitif (CD13, CD19, CD33, CD45) bulundu.

Reseptör analiziyle lenfoid ve myeloid lösemi ayrımı yapılabildiği gibi T ve B tip lösemi ayrımı da yapılabilmektedir. Bu teknik sayesinde ALL' li olgulardan 6 tanesinin T , 4 tanesinin ise B lenfosit kökenli olduğu saptandı.

Akım sitometrik reseptör çalışmasına ait örnekler bir sonraki sayfada sunulmuştur.



**Reseptör Örneği 1: KLL'li bir olguda akım sitometrik reseptör analiz örneği (x eksenindeki F4 alanı CD 20 , y eksenindeki F1 alanı CD5, her iki eksen arasındaki F2 alanı CD5+CD20 varlığını göstermektedir).**



**Reseptör Örneği 1: AML'li bir olguda akım sitometrik reseptör analiz örneği(x eksenindeki F4 alanı CD 20 , y eksenindeki F1 alanı CD33 varlığını göstermektedir).**

## TARTIŞMA

Lösemi tanı ve sınıflandırılması periferik kan, kemik iliği aspirasyonu ve kemik iliği biyopsilerinde PAS, Sudan Black, myeloperoksidaz histokimyasal ve enzim reaksiyonlarıyla yapılmaktadır(46). Akım sitometri ile bundan farklı olarak lenfoid ve myeloid hücre ayrımının ötesinde hücre tipini alt grublara ayırarak saptamak mümkündür. Böylelikle lösemilerin sınıflandırılması diğer yöntemlere kıyasla daha hızlı ve kesin yapılabilmektedir(47).

Çalışmada lösemi tipleri açısından cinsiyet ayrımı olmadığı kaynak verileriyle uyumlu bulunmuştur(48-50). Akut lösemilerin daha genç yaşlarda kronik lösemilerin ise ileri yaşlarda görülüyor olması kaynak verileriyle uyumlu bir diğer bulgudur(6-9). Kemik iliği biyopsilerinde tüm olgularda hipersellüler ilik dokusu bulunmaktaydı. Kaynaklarda ise çok az oranda hiposellüler olmak üzere genelde hipersellüler görünümde kemik iliği mevcuttur(7). Bu farkı çalışmamızdaki sayının fazla olmamasıyla açıklayabiliriz.

PAS reaksiyonu lenfoid lösemilerde pozitif oluşu kaynak verileriyle paralel olarak çalışmada görüldü. PAS pozitif reaksiyon myeloid lösemilerin M6 tipinde de pozitif olarak saptanmaktadır(8,9). Bu seride de aynı sonuç gözlenmiştir. Fibrozisin hem akut hem de kronik ve lenfoid myeloid lösemi ayrımı göstermeksizin görülebildiği bildirilmektedir. Gümüşleme reaksiyonunda benzer sonuçlar bu çalışmada gözlenmiştir(51).

Akım sitometri; süspansiyon halinde bulunan hücrelerin veya hücre çekirdeklerinin floresan bir ışık kaynağı önünden geçerken verdikleri sinyallerin ölçülmesi ilkesine dayanan bir tekniktir. Malign hastalıklarda hücre yüzey antijenlerinin değişimini anlayabilmek için normal hematopoetik hücre olgunlaşması ve farklılaşmasını çok iyi bilmek gerekir. Tüm gelişmelere rağmen kanser hücrelerini normal eşdeğerinden ayırdeden bir hücre işaretleyicisi bulunamamıştır. Akım sitometri ile immünofenotiplendirme ve DNA analizi yapılarak klasik tanı yöntemleri olan morfoloji ve histokimyasal inceleme verilerini daha detaylandırabiliriz. FCM ile incelenen hücrenin hangi seriden kaynaklandığını, monoklonalite gösterip göstermediğini, prognostik değere sahip olup olmadığı gösterilebilir. Monoklonalite her zaman o populasyonun neoplastik olduğunu göstermez. Ancak monoklonalite , membran veya sitoplazmada yapısal

ve fonksiyonel anomalilerle birlikte ise malignite lehine alınabilir ki tek başına tanı değeri taşımasa bile önemli parametrelerdir(47-52).

DNA analizi ise hücrelerin total DNA içeriğini, hücre siklusunun hangi döneminde olduğunu , apoptosis varlığını incelemeye olanak verir. DNA' ya ilişkin bazı parametreler de prognostik öneme sahip olup malign benign tümörlerin ayırımında histopatolojik tanı yöntemlerine objektif bir yardım sağlayabilir (49-51).

Akım sitometri ile son yıllarda kromozom analizleri ve kromozom sorting gibi oldukça hassas çalışmalar yapılabilmektedir. Yine hücrelerin çeşitli sitotoksik ajanlara karşı duyarlılığını, hücre içerisine ve dışına doğru ilaç, kalsiyum mobilizasyonu gibi çalışmaları yapabilmek mümkündür.

Akım sitometrinin lösemi tanısına yaptığı en büyük katkı yapısal ve histokimyasal olarak tanımlanamayan lösemilerin tiplendirilmesini sağlamak olmuştur. M1 yapısındaki birçok olgunun gerçekte ALL veya ALL görünümündekilerin ise gerçekte AML olduğu , birçok lösemi olgusunda da lenfoid ve myeloid antijenlerin birlikte bulunabildiği (bifenotipik lösemi) bu teknik sayesinde gösterilebilmiştir(53). Bizim olgularımızdan bir tanesi de hem lenfoid hem de myeloid reseptör pozitifliği gösteren bifenotipik lösemi idi. Akım sitometri; PAS ve myeloperoksidaz negatif olmasına rağmen myeloid antijenlere (CD13 ve CD 33 gibi) sahip olduğu için AML-M0 tanımının ortaya çıkmasına olanak vermiştir(54). Ancak bizim serimizde AML-M0 bulunmamaktadır.

Hematolojik hastalıklarda çeşitli antikorlardan yararlanarak her hastalık için gerekli olan panel oluşturulabilir. Ancak her zaman şüphelenilen hastalık ile tesbit edilen aynı olmayabilir. Akut lösemi söz konusu ise ön planda akım sitometride myeloperoksidaz ve terminal deoksitidil transferaz (TdT) gibi çok temel sitoplazmik özellikleri incelemek, bunlardan yola çıkarak AML veya ALL paneline yönelmek daha ekonomik olacaktır. Ancak bu tip yaklaşım zamanın kıymetli olduğu durumlar için elverişli değildir. Ayrıca TdT' nin AML olgularında da % 20-40 pozitif olabileceğini unutmamak gerekir. Akım sitometride incelemeler; her antikor için teker teker ve bir tip floresan(FITC, PE, vb.) kullanılarak yapılabileceği gibi aynı anda 2 veya 3 farklı floresan işaretleyiciyi bir arada incelemek mümkündür. Hücrelerin üzerinde birden çok antijenin varlığını inceleyebilmek akım sitometrinin immünfloresan mikroskop inceleme yöntemine olan üstünlüklerinden birini oluşturur( 50 ).

DNA analiz verilerine göre lenfositik ve myelositik lösemiler arasında aneuploidi açısından fark olmadığı, buna karşın akut lösemilerde belirgin ölçüde aneuploidi yüksekliği bulunduğu dikkat çekmiştir. ALL' de iyi prognoz belirleyici

olduğu bildirilen hiperdiploidik aneuploidi bizim olgularımızda %20 oranında görülmektedir( 49 ). Ayrıca çalışmada 3 olguda hipodiploid aneuploidi saptandı ve bu olguların tümü ALL idi.

Kaynaklarda AML olgularında aneuploidinin kromozom anomalileriyle birlikte bulunması durumunda kötü prognozu gösterdiği bildirilmektedir. Bu nedenle kaynaklarda lösemiler için tüm bu çalışmalara ek olarak genetik değerlendirmenin önemi vurgulanmaktadır(55 ).

Akut lösemilerde (ALL ve AML) ortalama %52,5 oranında aneuploidi saptandı. Literatür verilerinde ise bu oran ortalama %40 civarındaydı(49-51 ).

AML' li olgularda kaynak verilerine göre FAB klasifikasyonuna göre M1 ve M2 deki aneuploidi oranı M3 ve M4' e göre daha düşüktür (51). Ancak bizim olgularımız sayı olarak az olduğundan karşılaştırma yapılamadı.

AML' de aneuploidinin prognostik önemi yaşa bağlıdır. Çocuklarda aneuploidi varlığı kötü prognozu gösterirken erişkinlerde daha iyi prognoza sahiptir( 55 ). Bizim olgularımızın tümü erişkin yaş grubuna sahiptir.

Yapılan bir çok çalışmada ; S faz fraksiyonu, tümörün klinik davranışı hakkında fikir verebilmektedir. S faz fraksiyon yüzdesi tümör proliferasyonunun direkt bir göstergesidir. Aneuploidi yanısıra yüksek S faz fraksiyonu gösteren tümörler ile bu tümörlerin sağ kalımları arasında direkt bir ilişki bulunmakta ve bu tümörlerde sağkalım kısa olmaktadır(56). S fazı eşik değeri lösemiler için  $2.5 \pm 0.5$  'dir. S fazı değeri eğer % 15 'in üzerinde ise prognoz çok daha kötü olmaktadır ( 57 ). Bizim olgularımızdan bir tanesi dışında tüm olgularda yüksek S faz değeri saptandı. Bu tek olgu ise AML(M3) idi.

Tüm akut lösemiler genelde akım sitometri incelemesi için ideal hastalıklardır. Çünkü incelenen tümör oldukça homojen, çok sayıda hücrelerden oluşmaktadır.

İmmünofenotiplendirmenin yapısal değerlendirmeye üstün olduğu ve prognostik değerinin en yaygın kabul gördüğü hastalık ALL denilebilir. En kaba yöntem ile B-ALL (yüzey immünglobulin pozitif ) ve T-ALL birbirinden ayrılabilir. Bizim ALL' li olgularımızdan 4 tanesi B-ALL, 6 tanesi ise T-ALL idi.

Greaves ve ark. tarafından önemli bir gelişme ortak ALL antijenine karşı CD10(CALLA) monoklonal antikorunun geliştirilmesi olmuştur. Önceleri sadece neoplaziye mahsus bir antijen olduğu düşünülürken daha sonra normal kemik iliği ve diğer lenfoproliferatif hastalıklarda da rastlanılmıştır. CALLA(+) ALL' ler diğerlerine oranla daha iyi prognoza sahiptirler. B hücre gelişiminin değişik aşamalarını bize gösteren antijen-antikorların keşfi hem normal fizyolojiyi anlamamızı hem de lösemilerin alt gruplara ayırmamızı sağlamıştır(58,59).

Normal B lenfosit gelişiminde HLA-DR, CD9, CD10, CD20, CD22 sırayla hücre yüzeyinde belirirler. Bu antijenlerden HLA-DR ve CD19 lenfosit yüzeyinde en devamlı sebat edenlerdendir. ALL' lerin çoğunda HLADR, CD19, CD20, ayrıca CD34 ve CD20 gözükmetedir. Bu nedenle ALL panelinde bu antikörlerin mutlaka bulunması gerekir(61,62).

B hücre gelişiminin en erken göstergesi HLA-DR, tdt, CD34 ve CD19' dur. Buna CD7 eşlik eder veya etmeyebilir. Bu grup daha çok çocuklarda görülen t(4,11) ile birlikte giden oldukça kötü seyirli lösemi tipidir. Bunların çoğunda relapsta monositler bifenotipik özellikler görülmekte ve prognozu kötüleştirilmektedir.

B hücre gelişiminin daha geç aşamalarında CD34 kaybolmakta , CD10 yoğunluğu azalmakta, CD20 ve/veya CD22 ortaya çıkmaktadır. Sitoplazmik ağır zincir bu geç aşamada görülmeye başlar ve pre B-ALL tanımına yol açar. Bu dönemde membranda yüzey immunglobuline(Ig) rastlanılmaz. Pre-B denilmesinin esas nedeni B yönünden yönlendirilmiş olmalarına rağmen yüzey Ig taşımamalarıdır. Pre B ALL' ler B öncül ALL'lerin %10-15' ini oluşturur ve sıklıkla t(1,19) ile birlikte görülürler(61,62).

Ig ağır zincir düzenlenmesi sırasındaki bir etkisiz gelişme hücrelerin farklılaşmada daha ileri gitmelerine engel olmaktadır. Eğer bir lenfosit hafif zincir gen düzenlenmesini tamamlayabilir (lambda veya kappa) ve yüzeyinde tam immunglobulin taşımaya başlayabilirse olgun B lenfosit için temel tanısal kriterlere sahip olmuş demektir.

Hematopoezde genellikle rastlanılan bir özellik CD34 antijen taşıyan hücrelerin olgunlaşma ile bu niteliklerini yitirmeleridir. Öncül B ALL olgularının % 50-60' sında CD34 pozitifliği bildirilmektedir. Bu özelliğin varlığı olmayanlara oranla daha iyi bir prognostik değer taşır.

CD45 antijeni tüm hematopoetik hücrelerde yaygın olarak bulunur. Önceleri patolojik örneklerde lenfoma ayırıcı tanısı için kullanılırken son yıllarda akım sitometride önemli bir yer kazanmıştır. Öncelikle akut lösemilerin % 95' ine yakın bir kısmında gating (kapı açma) olarak adlandırılan ilk tanı çalışması CD45-CD14 kombinasyonu şeklinde sıklıkla kullanılmaktadır. Eğer lösemik blastlar ile normal lenfositler birlikte bulunuyorlarsa CD45 antijeni floresan yoğunluğunda bimodal dağılım verebilir. Blastlar genellikle birçok antijenlerde olduğu gibi CD45' i de zayıf gösterirken , normal lenfositlerde parlak boyanma gözlenir. Böylece blastları normal lenfositlerden ayrı kapı açarak değerlendirebiliriz. Daha nadir görülen CD45 negatif öncül B ALL' ler genellikle belirgin lökositoz gösterirler ve tedaviye cevapları kötüdür. Dolayısıyla CD45 negatif B-ALL' ler kötü prognostik bir grubu oluşturur(61,62).



ALL' lerde tüm antijenik yapılanma normal lenfopoez ile karşılaştırılmayacak şekilde bozulmuştur. Birlikte bulunmaması gereken antijenler birlikte ve hatta farklı yoğunlukta bulunurlar. Örneğin CD10 aynı lösemi tipinde bile farklı olgularda farklı yoğunlukta gözlenebilir.

B hücreli ALL (Burkitt lösemisi) en farklılaşmış hücre tipine sahip olması nedeniyle yüzeyinde immünglobulin taşır. TdT genellikle negatiftir. Ayrıca HLA DR, CD19, CD20, CD22 ve CD24 gibi B hücre işaretleyicileri ile CD21 pozitifdir. Pre B ALL' lere oranla CD10 daha zayıf yoğunlukta ve daha az sıklıkla pozitiflik gösterir(63).

T hücreli ALL' ler tüm ALL' lerin %15-20'sini oluşturur. Genellikle belirgin lökositoz , mediastinal kitle ile sıklıkla erkeklerde ortaya çıkar. Olguların hemen tümünde CD7, CD5 ve CD2 pozitifdir. CD3 ise T-ALL ve lenfoblastik lenfomada akım sitometri ile olguların üçte birinde gösterilebilmiştir. Ancak sitoplazmik CD3' e bakılırsa bu rakam % 95' e yükselir. Bu nedenle sitoplazmik CD3 hem farklılaşmayı göstermesi hem de tanısal açıdan önemli bir antijendir(63).

CD7' nin AML' lerin % 5-10' unda görülebileceği düşünüldüğünde CD3 kadar önemli olmadığı anlaşılır. Benzer olarak beraberinde başka T hücre işareti taşımayan tekbaşına CD2 ve CD7 varlığı T-ALL tanısı koydurmamalıdır. Diğer T hücre antijenleri CD1, CD4, CD8 ise çok önemli değildir. Çünkü bunlar genellikle CD2, CD5 ve CD7 ile birlikte bulunurlar(62).

B hücre antijenlerinden CD10 erişkin T-ALL' lerin % 40' ında pozitif olabilir. Yine HLA-DR de %10-40' da pozitif olabilir. T-ALL' de TdT kuvvetli pozitifdir. CD34 ise %10-20 pozitifdir. Oysa B-öncül ALL' de CD34 pozitifliği çok daha fazladır(% 50-60). Diğer myeloid antijenlerinden CD11b, CD11c ve CD15' de T-ALL' de % 20-60 bulunabilir.

Görüldüğü üzere T-ALL olgularında görülen blastlar normal timik gelişim basamaklarını yansıtmamaktadır. Lösemide örneklerin akım sitometride incelenmesinde blast dışında normal lenfositlerin örneğe karışması (periferik örneklerde daha fazladır) tanının yanlışlıkla T-ALL olmasına yol açabilir. Bunu önlemek için homojen populasyon analizine gayret edilmelidir.

Lenfoblastik lenfoma ile T-ALL'nin sadece immünfenotiplendirme ile ayrılması çok güçtür.

Lenfoma durumunda CD1, CD4 ve CD8 pozitifliğine T-ALL' deki kadar sık rastlanılmaz. Lenfoblastik lenfomayı diğer NHL' den ayıran en önemli özellik TdT pozitifliğidir.

İmmünfenotiplendirmenin AML' de kullanımı ya ALL' den ayırdetmek veya FAB ile ilişkisini araştırmak içindir. Ancak yapısal özellikler ve histokimya

AML' de bu ikinci alanda çok daha tanısal önem taşır. İmmünfenotiplendirmenin en yol gösterici olduğu durumlar AML-MO ve AML-M1 gibi indiferansiye olarak tanınması oldukça zor olan subtiplerin varlığıdır. En çok kullanılan antikolar; CD13 ve CD33' tür. CD33; AML' lerin % 85-90' da pozitifdir(59,61). Bizim AML'li olgularımızda da benzer olarak %93 oranında CD33 pozitifliği saptandı.

CD13 ve CD33 myeloid hastalıklara özgül işaretleyicilerdir ve lenfoid lösemide görüldüğünde bifenotipliği gösterir. Diferansiasyonun daha erken dönemlerine eş değer olan AML- MO ve M1 tipi AML' de CD33 tek başına görülebilir. AML- M7' de ise CD13 diğer AML' lere oranla daha zayıf pozitiflik gösterebilir(61).

PreB-ALL' lerde gözlenen ve monositer bir işaretleyici olmasının yanısıra diferansiye hematopoetik kök hücrelerde de rastlanan HLA-DR; AML' de sıklıkla pozitif bulunur. Bizim AML'li olgularımızda da %50 oranında pozitif idi. En önemli istisna akut promyelositer lösemi (AML-M3' de) HLA-DR' nin negatif olmasıdır. Ancak az oranda M3 de pozitif olurken yine az oranda M1 ve M2' de negatif bulunabilir. M3' de CD13 ve CD33 pozitifliği çok sık gözlenen bir olgudur. Monositer lösemiler olan AML- M4 ve M5' de panmyeloid CD13, CD33 ve CD15 ile HLA-DR pozitifdir. AML-M6 için spesifik bir işaretleyici bulunmamaktadır. AML- M7 gibi tanısı çok zor olan subtipde trombosit glikoprotein IIb/IIIa veya IIIa' ya karşı antikolar yardımcı olabilir. Bu amaçla CD41 ve CD61' in yanı sıra Faktör VIII ilişkin antijen aktivitesi de kullanılabilir. M7 tanısı koyarken monositer lösemilerde daha sık rastladığımız yalancı pozitiflik konusunda dikkatli olmak gerekir. M7' de bu antijenlerin daha kuvvetli pozitiflik göstermesi beklenir(54).

Panmyeloid özelliği olmayan antijenler de AML' de gözlenebilir. Bunlardan CD34' e % 30-40 rastlanır ve CD34 pozitiflerde prognoz negatiflere oranla daha kötüdür( 54,59,60). Lenfoid işaretleyicilerden CD7 tüm AML' lerde ancak en fazla AML-M7' de görülebilir. CD45 ortak lökosit antijeni olduğu için tüm AML' lerde gözlenir.

İmmünfenotiplendirmenin gelişmesi ile birden fazla hücre serisine ait gelişim gösterebilen lösemiler tanımlanmıştır. Malign transformasyon sırasında tuhaf gen ekspresyonu veya normal farklılaşmadaki seriye özgül işaretleyicilerin birlikte ekspresyonu bu karmaşık tablonun gelişmesine yol açmaktadır. Prognostik önemi tartışmalıdır. Tamamen çok standart olmaması görülme sıklığının % 1-50 arasında değişmesine yol açmıştır.

Bifenotipik lösemi tanımını alabilmesi için hücrelerin en az % 20-30'un da lenfoid veya myeloid antijenlerin birlikte bulunması gerekir. Karışık hücre

popülasyonlarının incelenmesi durumunda bu kriter yanlışlıkla karşılanabilir(53,59).

Bifenotipi tanımı için en çok kullanılan antikörler AML' de CD2, CD19 ve CD20 ile ALL' de CD11b, CD13, CD14,CD15 ve /veya CD33' ün gösterilmesidir(53).

CD34 pozitif lösemilerde bifenotipliğin daha sık görülmesi , diferansiyasyonda geriye doğru gidişi göstermektedir. Bu olgularda Philadelphia kromozomu yanısıra kromozom anomalilerine daha sık rastlanılmaktadır(62).

KML' nin blastik krizinde olguların 1/3' ünde lenfoid antijenler (TdT HLA-DR, CD34, CD19 ve CD10, nadiren T işaretleyicileri), 2/3' ünde myeloid antijenler (HLA-DR,CD34,CD13, CD33) pozitif bulunur. Kronik faz KML için diagnostik bir akım sitometri bulgusu yoktur(63).

Akut lösemilerde akım sitometrinin rolü şu başlıklarda toplanabilir;

- 1- Lenfoblastik ve myeloblastik lösemnin ayırılması.
- 2- Pre B ALL, T-ALL ve B-ALL gibi alt gruplarının tanımlanması.
- 3- M7 (Megakaryositer lösemi) ve MO' un tanımlanması.
- 4- Bifenotipik lösemnin tanımlanması.

Lösemilerin FAB'a göre sınıflandırılması morfolojik differansiyasyona yönelik bir sınıflamadır. Akım sitometri ile FAB ile pek ilişkisi olmayan alt gruplar tanımlanabilir. İmmünfenotiplendirmenin esas rol oynadığı MIC sınıflaması (immünfenotiplendirme-sitogenetik ve molekül yöntemler) daha detaylı bir sınıflamadır(64,65).

Akut Lösemilerin immünfenotipik analizi için temel bir panel şöyle oluşturabilir;

B serisi: CD19, K, lambda

T serisi: CD5,CD7

T ve B serisi:CD10,TdT

Myelomonositer seri:CD13,CD33

Blast : CD34, HLA-DR

Bu panel ile akut lösemilerin % 95' den fazlası tanımlanabilir(61).

Yukarıda da belirtildiği gibi literatür verilerinde lösemiler için çok fazla sayıda reseptör analizi yapılmaktadır. Böylece lösemi tiplendirilmesi çok daha ayrıntılı olarak yapılabilmekte, tedavinin yönlendirilmesi ve prognoz tayininde faydalı bilgiler sağlanabilmektedir. Bizim çalışmamızda kısıtlı teknik ve ekonomik sebeplerden dolayı akım sitometride incelenen reseptör sayısı sınırlı tutuldu. İleriki çalışmalar ve rutin incelemelerde bu sayı artırılarak daha geniş değerlendirme yapma imkanı doğacaktır.

## SONUÇLAR VE ÖNERİLER

60 lösemi olgusu üzerinde yaptığımız çalışmada kemik iliği biyopsisi ve akım sitometrik inceleme sonuçları değerlendirildiğinde aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

**Sonuç 1:** Kemik iliği biyopsisi ile lösemik tutulumun olup olmadığı saptanırken, PAS pozitifliği ve fibrozis varlığı değerlendirilebilir. Kemik iliği biyopsisi değerlendirilmesi yanısıra akım sitometrik inceleme ile lösemi alt tiplendirilmesi yapılabilmektedir.

**Sonuç 2:** Lösemilerde akım sitometri ile DNA analizi yapılarak hastalığın davranış biçimi ve buna bağlı tedavi şemasının saptanması gerekir.

**Sonuç 3:** Lösemi olguları takip edilerek DNA verilerine göre aneuploidi ve S faz yüksekliği ile prognoz ve remisyon ilişkisi ortaya konabilir.

**Sonuç 4:** Reseptör analiz paneli genişletilerek lösemilerde daha ayrıntılı alt tiplendirme yapılması çalışmanın devamı olarak düşünülebilir.

**Sonuç 5:** Lösemi tanı ve tiplendirilmesinde klinik, patolojik, akım sitometri ve genetik çalışmaların bir bütün olarak yapılması gerekmektedir.

## ÖZET

Çalışmada kemik iliği aspirasyonu ve biyopsisi ile akım sitometrik değerlendirme yapılan 60 lösemi olgusu incelenmiştir. Yapısal olarak Wright , Hematoksilen Eozin, gümüşleme ve PAS reaksiyonları, akım sitometri çalışması olarak da DNA ve reseptör analizleri yapılmıştır. Lenfoid ve myeloid lösemiler açısından PAS reaksiyonu anlamlı bulunmuştur. Gümüşleme reaksiyonu ile retiküler liflerdeki artışa bakılarak fibrozis derecesi saptanmıştır.

Akım sitometrik analizde çoğalma evresine giren hücre sayısı (S fazı) ve aneuploidi yüksekliği açısından lösemiler karşılaştırılmış ve akut lösemilerin bir niteliği olarak ortaya çıkmıştır. Akım sitometrik reseptör analiz tekniği ile lösemilerde öncelikle lenfoid ve myeloid olmak üzere diğer alt tiplendirmeler yapılabilmektedir. Yine bu teknik sayesinde lösemilerde tedaviye cevap ve prognoz hakkında ileri yorum yapılabilmektedir.

Akım sitometrik analiz tekniğinin hızlı ve güvenilir olması nedeniyle lösemi tanı ve tiplendirilmesinde kullanılması gerektiği kanısına varılmıştır.

## SUMMARY

In this study; bone marrow biopsy and needle aspirates of 60 leukemic cases were evaluated by flow cytometry. Wright, Haematoxylin-eosin, reticulin stain and PAS were used for histopathologic examination while DNA and receptor analyses used for flow cytometric evaluation. PAS was found as a significant differentiated criteria between myeloid and lymphoid leukemias. Fibrosis grading was revealed by reticulin stain.

Proliferative phase (S phase) was significantly higher in acute leukemias than chronic leukemias. Myeloid/lymphoid leukemia differentiation and subtyping were obtained by receptor analyses. Subsequently flow cytometric evaluation of leukemic patients for their prognosis and chemotherapeutic responses were found satisfactory.

This study revealed that; flow cytometry technic was a rapid and reliable for leukemia diagnosis and classification.

## KAYNAKLAR:

- 1-Erbengi T: Histoloji' 1. Birinci baskı. Beta Basım Dağıtım. No:21.İstanbul,1984. s.210-214.
- 2-Kurt E. Johnson: Histology and Embriyology. 1th ed . Harwal Publishing Company, Media, Pennsylvania. 1984.
- 3-Lennert K. and Hübner K. Pathology of the Bone Marrow. 1 th ed. Gustav Fischer Verlag Stuttgart New York , 1984. pp:33-53
- 4-L. Carlos Junqueira José Carneiro Robert O. Kelley : Temel Histoloji(Çev. Y. Aytekin) Barış Kitabevi İstanbul . 1993, s. 296-311.
- 5-Bloom W. and Fawcett D: A Textbook of Histology. Tenth ed., Saunders Company, Toronto. 1975. pp:209-232.
- 6-Craig E Litz: Blood and Bone Marrow. In Ivan Damjanov and James Linder(Ed.) Anderson's Pathology, St. Louis, C.V. Mosby Co.,10 th ed. 1996 pp 1063-1114
- 7-Rosai J: Bone Marrow. İn Ackerman' s Surgical Pathology, 8 th ed. New York. Mosby, 1996, pp.1797-1915.
- 8-Cotran R.S, Kumar V, Robbins S: Diseases of White Cells, Lymph Nodes, and Spleen. In Pathologic Basis of Disease. 5 th ed. W.B Saunders Philadelphia, 1994 pp.629-672.
- 9- Uğur Çevikbaş: Temel Patoloji . Orjinal 5. baskı. W.B Saunders . Philadelphia 1992. Çeviri 2.baskı . Nobel-Yüce, 1995 s.333-384.
- 10- Bennett JM, Catovsky D,Daniel MT et al: The morphologic classification of acute Lymphoblastic leukemia : concordance among observers and clinical correlations , Br J Haematol 47:553,1981.
- 11- Burns CP, Armitage JO , Frey AL, et al, Analysis of the psesenting features of adult acute leukemias: The French American British Classification. Cancer 47: 2460-2469,1981
- 12- Vogler L ,Crist WM, Bockman DE et al: Pre-B leukemia: a new phenotype of childhood lymphoblastic leukemia, N Engl J Med 298:872, 1978.
- 13- Pui CH, Behm FG, Crrist WM: Clinical and biologic relevance of immunologic marker ştudies in childhood acute lymphoblastic leukemia, Blood 82:343, 1993.
- 14- Vogler LB, Crist WM, Sarrif AM et al: An analysis of clinical and laboratory features of acute lymphocytic leukemias with emphasis on 35 children with pre-B leukemia. Blood 58:135 , 1981.

- 15- Le Beau MM: The role of cytogenetics in the diagnosis and classification of hematopoietic neoplasms, In Knowles DM (Ed), Neoplastic hematopathology, Baltimore, Williams and Wilkins. 1993
- 16-Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT et al: Proposals for the classification of the acute leukemias, French-American-British (FAB) co-operative group, Br J Haematol 33:451, 1976.
- 17-Litz CE, Brunning RD: Acute myeloid leukemias. In DM Knowles (ed): Neoplastic hematopathology, Baltimore, Williams and Wilkins. 1992.
- 18-Cheson BD, Cassilith PA, Head D et al: Report of the National Cancer Institute sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia, J Clin Oncol 8:813, 1990.
- 19-Yunis JJ, Brunning RD: Prognostic significance of chromosomal abnormalities in acute leukemias and myelodysplastic syndromes, Clinics Haematol 15:597, 1986.
- 20-Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT et al: Proposals for the classification of the chronic (mature) B-cell Lymphoid Leukemias. J. Clin Pathol 42: 567-584. 1989.
- 21-List AF- Garewal HS, Sandberg AA: The myelodysplastic syndromes: Biology and implications for management, J Clin Oncol 8:1424, 1990.
- 22-Noel P: Management of patients with myelodysplastic syndromes, Mayo Clinic Proc 66:485, 1991.
- 23-Kurzrock R, Gutterman JR, Talpaz M: The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias, N Engl J Med 319:990, 1988.
- 24-Kantarjian HM- Deisseroth A, Kurzrock R et al: Chronic myelogenous leukemia: a concise update, Blood 3:691, 1979.
- 25-Paoletti M, Bitter MA, Vardiman JW: Hairy cell leukemia-morphologic cytochemical and immunologic features, Clin in Lab Med 8:179, 1988.
- 26-Bouroncle BA: Leukemic reticuloendotheliosis (hairy cell leukemia), Blood 53:412, 1993.
- 27-Jansen J, Le Blen TW, Kersey JH. The Phenotype of the neoplastic cells of hairy cell leukemia studied With monoclonal antibodies. Blood 59: 609-614, 1982
- 28-Sadler TW : Longman's Medical Embryology. 6 th ed., Baltimore. Williams and Wilkins. , 1990, pp.242-245.
- 29-Sandberg AA: The chromosomes and the cell cycle. In Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases, Koss LG (ed), vol.1, 4th ed., Philadelphia. JB Lippincott Company, 1992, pp.154-192.
- 30-Guyton AC: Hücre fonksiyonlarının genetik kontrolü, protein sentezi ve hücre çoğalması. Fiziyojji, cilt 1, 5. baskıdan Türkçeye çevrilmiş 1. baskı, Ankara. Güven Kitabevi Yayınları, 1977, s.43-85.



- 31-Papale GE, Farguhar MG: cell Biology. In Pathophysiology: The biologic principles of disease, Samly AH, Smith LH, Wynaarden JB (eds). 2nd ed., Philadelphia. JB Saunders Company, 1985, pp.1-52.
- 32-Bloom W, Fawcett DW: cell Cycle. A text book of histologh. 11th ed., Philadelphia. WB Saunders Company, 1986, pp.679-708.
- 33-Koss LG: General Pathology and Cytology of Neoplasm or Tumors. In Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases, Koss LG (ed). vol: 1, 4 th ed., Philadelphia JB Lippincott Company, 1992, pp.118-153.
- 34-Norman A: Flow cytometry. Med phys 7:609, 1980.
- 35-Koss LG: Flow Cytometry. In Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases, Koss LG (ed), vol. 2, 4 th ed., Philadelphia. JB Lippincott Company, 1992, pp.1613-1657.
- 36- Riley SR, Mahin EJ: Flow cytometry. Clinical applications. ASCP National Meeting Fall. Washington DC. 3-15, 1989.
- 37-Lovett EJ, Schnitzer B, Keren DF, et al: Application of flow cytometry to diagnostic pathology. Lab invest 50: 115, 1984.
- 38-Coon JS, Landay AL, Weinstein RS: Biology of disease. Advanced in flow cytometry for diagnostic pathology . Lab invest 57: 453, 1987.
- 39- Coulter WH: High-speed automatic blood cell analyser. Proc Nat Electron Conf 12:1034, 1956.
- 40-Fuller TA: The physics of surgical laser . Laser Surg med 1: 5, 1980.
- 41- Cram LS, Bartholdi MF, Wheelles LL, et al: Morphological Analyses by Scanning Flow Cytometry. In Flow Cytometry: Instrumentation and Data Analyses, van Dilla MA, Dean PN, Laerum OD, Melamed MR (eds), London. Academic Press, 1983, pp.164-194.
- 42- Pinkel D, Stovel R: Flow Chambers and Sample Handling. In flow Cytometry: Instrumentation and Data Analyses, van Dilla MA, Dean PN, Laerum OD, Melamed MR (eds), London. Academic press, 1983, pp.78-129.
- 43- Fried J: Flow cytofluorometric analysis of cell cycle distributions using propidium iodide. J Cell Biol 71:172, 1976.
- 44- Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW: Application of DNA flow cytometry to parafin embedded archival material for the study of aneuploidy and its clinical significance. Cytometry 6:327, 1985.
- 45- Kallioniemi OP: Aneuploid DNA content and high S-phase fraction of tumour cells are related to poor prognosis in patients with primary breast cancer. Eur J Cancer Clin Oncol 23: 277, 1987.
- 46-Lee G. Luna, HT: Manuel of Histologic Staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. Third ed. Mc Graw-Hill Book Company. 1968.

- 47-Macey MG:Flow-cytometric analysis of lymphocytes, leukemias and lymphomas. Br J Biomed Sci.50(4):334-49. 1993
- 48-Smets LA,Homan-Blok J et al:Prognostic implication of hyperdiploidy as based on DNA Flow-cytometric measurement in childhood acute Lympholastic Leukemia a multicenter study. Leukemia 1(3):163-66,1987.
- 49- Hiddemann W, Wormann B,Ritter J: Frequency and Clinical Significance of DNA aneuploidy in acute leukemia. Annals N York Acad of Sciences.468: 227-240, 1986.
- 50-Hiddemann W, Wormann B, Springefeld R: Analysis of cellular DNA content in acute leukemias by flow-cytometry. J Cancer Res Clin Oncol 116(5):507-512, 1990.
- 51-Manoharan A, Horsley R, Pitney WR: The reticulin Content of bone marrow in acute leukemia in adults. Br. J Haematol 43: 185-190, 1979.
- 52-Lawrence W, Diamond MD, Bharat N. Nathwani MD end Henry Rappoport MD. Flow cytometry in the diagnosis and classification of malignant lymphoma and leukemia . Cancer 50: 1122-35. 1982.
- 53-Sulak LE, Clare CN, Morale BA, Hansen KL, Montiel MM. Biphenotypic acute leukemia in adults. Am J Clin Pathol 94:54-58,1990.
- 54-Callea V, Morabito F, Martino B.Diagnostic and prognostic relevance of the Immünphenotype in acute myelositic Leukemia Tumori 77: 28-31, 1991,
- 55-Barlogie B, Stass S, Dixon D: DNA aneuploidy in adult acute leukemia . Cancer Genet Cytogenet 28(2):213-228, 1987.
- 56-Look AT, Melvin SL,Williams DL: Aneuploidy and percentage of S phase cells determined by flow cytometry correlate with cell phenotype in childhood acute leukemia. Blood 60(4):959-967, 1982.
- 57-RSG. Holdrinet, A. Pennings. A.M Drenthe. Schonk . Flow Cytometric Determination of the S-phase Compartment in Adult Acute Leukemia. Acta Haematol. 70: 369-378, 1983.
- 58-Miller DR, leikin S Albo V, Sather H, Hammond D, Prognostic importance of morphology (FAB classification ) in Childhood acute Lympholastic Leukemia (ALL). Br. J. Haematol. 48: 199-206, 1981.
- 59-Kaplan SS,penchansky L, Stolc V, Contis L, Krause JR, Immunophenotyping in the Classification of acute Leukemia in adults. Interpretation of multiple lineage reactivity. Cancer, 63: 1520-1527, 1989.
- 60-Campos L.French M, Guyatat D, Myeloid Differentiation antigens identify leukemic cell subpopulations with different cell cycle characteristics. Leukemia 4: 60-62. 1990.
- 61-Lang OH, Michael A: Flow Cytometry:Clinical and research applications in hematologic malignencies. Hematol/ Oncol Clin North Am 8:703-723, 1994.
- 62-Ricardo IO:Flow Cytometric analysis of lymphomas and acute leukemias. Annals N York Acad of Sciences. 1993:308-325

63- Keren D.F.,Hanson C.A. Hurtibise P.E : Flow Cytometry and clinical diagnosis. ASCP Press , 1995, pp 198-226.

64-Sherrie L.Perkins M.D. PHD., and Carl R. Kjeeldsberg MD immunophenotyping of lymphomas and leukemias in paraffin embedded tissues. American Journal of Clinical Pathol. 99 (4) : 362-373, 1993.

65-Thomas Traweek , MD. Immunophenotypic analysis. of acute. Leukemia. American's of Clin Pathol. 99 (4) : 504-510, 1993.