

Pediatric Vakalarda Philadelphia Benzeri Akut Lenfoblastik Lösemi

Philadelphia-Like Acute Lymphoblastic Leukemia in Pediatric Cases

Ecem Efendi Erdem (0000-0001-9003-8755), Gülşah Cecener (0000-0002-3820-424X),
Havva Tezcan Ünlü (0000-0002-0910-4258), Melike Sezgin Evim* (0000-0002-4792-269X)

Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye

*Bursa Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Hematoloji ve Onkolojisi Bilim Dalı, Bursa, Türkiye



Öz

Lösemi, hematopoietik hücrelerin malign transformasyonu sonucu gelişen, heterojen neoplastik hastalıklar grubudur. Philadelphia (Ph) benzeri akut lenfoblastik lösemi (ALL), yüksek risk sınıflamasında yer alan ve kötü prognoz gösteren B- hücreli akut lenfoblastik lösemninin (B-ALL) alt grubudur. Gen ekspresyon profili olarak Ph pozitif ALL'ye benzemektedir, ancak bu alt tipte BCR-ABL1 füzyonu mevcut değildir. Hastalık genetik olarak heterojendir. Ayrıca, etnik kökenleri farklı olan Ph benzeri ALL vakalarının genetik değişimleri de farklılık göstermektedir. Ph benzeri ALL vakalarının B-ALL'li hastalar arasından ayırt edilerek sınıflandırılabilmesi etkin tedavi almaları için önemlidir. Son yıllarda, Ph benzeri ALL alt grubuna ait vakaların tanımlanması için, B-ALL vakalarında genetik ve klinik bulgular değerlendirilmesinin yanı sıra, gen ifade farklılıklarının analiz edildiği panellerin tasarlanması gündemdedir.

Abstract

Leukemia is a heterogeneous group of neoplastic diseases that develop as a result of the malignant transformation of hematopoietic cells. Philadelphia (Ph)-like acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a subgroup of B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL), which is included in the high-risk classification and has a poor prognosis. It is similar to Ph-positive ALL in gene expression profile, but this subtype does not have BCR-ABL1 fusion. The disease is genetically heterogeneous. In addition, the genetic changes of Ph-like ALL cases with different ethnic origins also differ. It is important to distinguish and classify Ph-like ALL cases from patients with B-ALL for effective treatment. In recent years, it is on the agenda to design panels in which gene expression differences are analyzed in addition to evaluating genetic and clinical findings in B-ALL cases to identify cases belonging to the Ph-like ALL subgroup.

Anahtar kelimeler

Philadelphia-benzeri, akut lenfoblastik lösemi, pediatrik

Keywords

Philadelphia-like, acute lymphoblastic leukemia, pediatric

Geliş Tarihi/Received : 18.04.2020

Kabul Tarihi/Accepted : 11.12.2020

DOI:10.4274/jcp.2020.0020

Yazışma Adresi (Sorumlu Yazar)/Address for Correspondence:

Ecem Efendi Erdem, Bursa Uludağ
Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji
Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye

Giriş

Lösemi, hematopoietik hücrelerin malign transformasyonu sonucu gelişen, heterojen neoplastik hastalıklar grubudur. Morfolojik yönden hastalığın oluştuğu hücre dizisinin tipine göre (miyeloid ya da lenfoid) ve proliferen olan kan hücresinin genç ya da olgunlaşmış olmasına göre (akut ya da kronik) sınıflandırması yapılmaktadır (1). Lösemiler çocukluk çağı malignitelerinin %25-30'luk bölümünü oluşturmaktadır.

Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) çocukluk çağında en sık görülen malign hastalıktır. Sağlık Bakanlığı verilerine göre yıllık lösemi insidansı 1.5/100.000 olarak belirtilmektedir. En sık 1-4 yaş arasında saptanmaktadır. Kız/Erkek oranı 1/1.2-1.3'tür. Beyaz ırkta, sarı ve siyah ırka göre daha sık saptanmaktadır (2). ALL'nin klinik tablosu kanda ve kemik iliğinde olgunlaşmamış lenfoid seri hücrelerinin birikimi ve lösemik transformasyonu ile karakterizedir (3). ALL'de klinik veriler değerlendirildiğinde; yüksek lökosit sayısı, yüksek periferik blast sayısı, B-hücreli ALL, L3 morfolojik yapı, Ph kromozomu varlığı ve birden fazla indüksiyon ile remisyon tedavisi, sağkalım oranlarını olumsuz etkileyen faktörler olarak gösterilmektedir. Standart riskli (SR) hastalarda uzun süreli sağkalım oranı %70 iken, yüksek riskli (YR) hastalarda bu oran %30 olarak belirlenmektedir. ALL'nin tedavisi remisyon indüksiyonu, konsolidasyon ve rezidüel hastalığı yok etmek için idame tedavisinden oluşmaktadır. Tedavideki hedef, erken dönemde yoğun ve yüksek oranda ilaçlar ile en yüksek oranda lösemik hücre ölümünü sağlayabilmektir. Kemoterapi tedavisi ile genellikle başarılı sonuçlar alınsa da, hastaların yaklaşık %20-40'ında terapötik direnç ortaya çıkmaktadır (4,5). Bu nedenlerden dolayı, hem relaps riski hem de ilaç yanıtları ile ilişkili faktörlerin tanımlanmasına ihtiyaç duyulmaktadır (6).

Lösemi multifaktöriyel bir hastalıktır. Tıbbın temelini oluşturan moleküler alt tiplendirmeler 1970'li yıllarda, lösemi hastalarının prognozunu belirlemek için T hücreli membran belirteçlerinin kullanılmasıyla başlamıştır (7). Lösemi etiyojisinde temel olarak genetik ve çevresel faktörlerin etkili olduğu ifade edilmektedir. Akut lösemnin gelişmesinde genetik faktörlerin önemli bir rolü vardır (1). Translokasyonlar, lösemilerde gözlenen en sık genetik değişikliklerdir ve çocukluk çağı ALL'lerinin %75'inde saptanmaktadır. Bu genetik değişiklikler, hastalığın bazı tiplerinde diagnostik amaçla kullanılacak kadar sık ve spesifik görülebilirler. *BCR-ABL1* füzyon geni [t(9;22)(q34;q11)], kromozom 9 ve 22'nin uzun kolları arasındaki resiprokal translokasyon sonucu oluşur ve Philadelphia kromozomu (Ph) olarak da tanımlanmaktadır. *BCR/ABL1* kimerik/füzyon proteini, pediatrik ALL'nin %3-5'inde ve yetişkin ALL olgularının yaklaşık %25'inde bulunmaktadır ve hastaların klinik tanılarında sonra planlanan tedavi protokollerinde varlığı çok belirleyicidir.

Ph pozitif kromozom yapısına sahip ALL hastalarında p190 kB büyüklüğünde füzyon proteini oluşur ve yüksek tirozin kinaz aktivitesine neden olur. Ph negatif hastalarda ise füzyon proteini bulunmaz. Lösemik lenfoblastların sitogenetik ve moleküler genetik özelliklerinin incelenmesi ile 2009 yılında ALL hastalarında Ph-benzeri ALL alt grubu tanımlanmıştır. Ph benzeri ALL'nin görülme sıklığı; yaş, cinsiyet, etnik yapı ile tanımlanan risk gruplarına göre farklılık göstermektedir (8,9,10). Ph pozitif ALL ile benzer şekilde Ph benzeri ALL hastalarında da yaş arttıkça kötü prognoz görülmektedir (8).

Philadelphia Benzeri Akut Lenfoblastik Lösemi

Lösemik lenfoblastların sitogenetik ve moleküler genetik özelliklerinin incelenmesinin ardından birbirinden bağımsız 2 araştırma grubu, 2009 yılında Ph benzeri ALL'yi tanımlamıştır (9,10). Ph benzeri ALL, yüksek riskli bir B hücresi ALL alt tipidir. Ph pozitif ALL'ninkine benzer bir gen ekspresyon profili ile karakterize edilmekle birlikte, bu alt tipte *BCR-ABL1* füzyonu mevcut değildir (7). Ph benzeri ALL prevalansı; yaşa, cinsiyete, etnik kökene ve Ulusal Kanser Enstitüsü'ne (*National Cancer Institute*, NCI) göre tanımlanmış risk grupları ile belirlenmektedir (9). Bu alt grup, B-ALL'nin SR sınıflamasında yer alan çocukların %10'unda ve NCI'a başvuran çocukların %15'inde görülmektedir ve neredeyse Ph pozitif ALL'den 3-4 kat daha yaygındır. Genel olarak B-ALL grubu içerisinde görülme sıklığı; çocuklarda yaklaşık %12, 16-20 yaş aralığında %21, 40 yaş ve üzeri yetişkinlerde %20 ila %24 oranındadır (11). Minimal rezidüel hastalık (MRD) seviyelerinin değerlendirildiği ilk klinik çalışma olan St. Jude Total XV'de, Ph benzeri ve Ph benzeri olmayan ALL hasta grupları karşılaştırılmıştır. Ph benzeri ALL vakalarında cinsiyetin erkek olması, Down sendromlu olması ve remisyon indüksiyonu sırasında ve/veya sonrasında MRD'nin yüksek seviyesi dikkat çekmektedir. Bu özellikler Ph benzeri ve Ph pozitif vakalar arasındaki farkı oluşturmaktadır. Ph benzeri grup, Ph benzeri olmayan hasta grubuna göre daha yüksek MRD seviyelerine sahip olduğundan bu gruba daha yoğun post-remisyon tedavisi uygulanmaktadır (Ph benzeri MRD seviyesi %60, Ph benzeri olmayan MRD seviyesi %41) (9). Ph pozitif ALL ile benzer şekilde Ph benzeri ALL hastalarında da yaş arttıkça kötü prognoz görülmekte ve bu hastalarda tanı

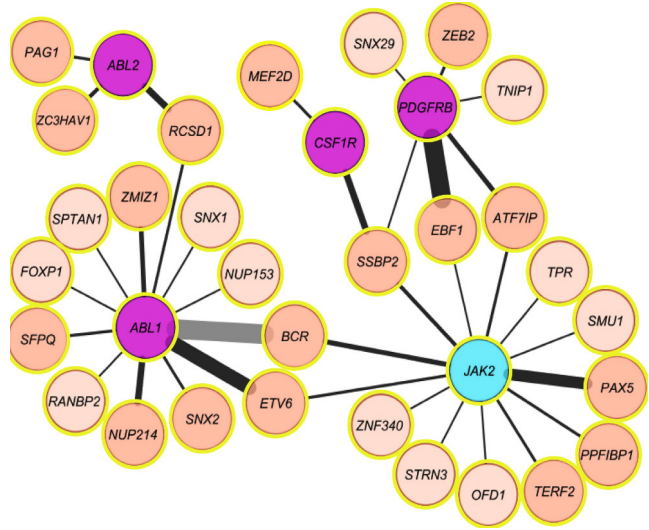
sırasında >100.000/uL başlangıç lökosit değeri tespit edilmektedir (12). Bunun yanında, Ching-Hon Pui ve arkadaşlarının 2017’de yayınlanan çalışmalarında, Ph benzeri ALL hastalarının genomik değişimlerinin diğer yüksek riskli kohortlar için bildirilenlerden farklı olabileceğine dikkat çekmiştir (9).

Ph benzeri ALL’de görülen genetik değişimler mevcut sitokin reseptörü veya kinaz füzyonunun tipine bağlı olarak 5 ayrı alt grupta incelenmektedir (Şekil 1):

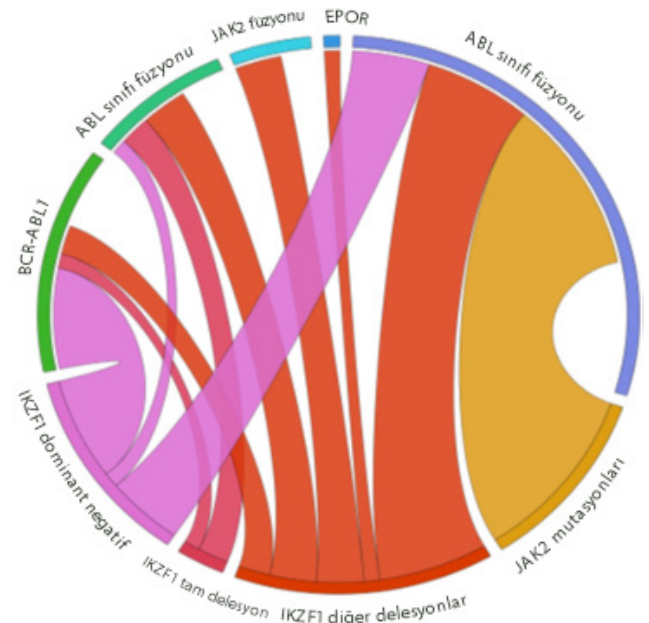
1. *CRLF2*’nin yeniden düzenlenmesi ve *JAK2* mutasyonları,
2. *ABL* sınıfı genlerin yeniden düzenlenmeleri veya mutasyonları,
3. *EPOR* geninin yeniden düzenlenmesi,
4. JAK-STAT/MAPK sinyal yollarını aktive eden delesyonlar veya dizi mutasyonları ve
5. Nadir görülen RAS yolağı (*KRAS*, *NRAS*, *NF1*, *PTPN11*) mutasyonlarıdır (9).

IKZF1 geni; lenfoid transkripsiyon faktörü İkaros’u kodlamaktadır. İkaros’taki değişiklikler, tirozin kinaz ile aktive olan Ph benzeri vakalarında sıklıkla görülmektedir. Deneysel modellerdeki moleküler çalışmalar, İkaros’un Ph pozitif hücrelerinde hücre siklusunu durdurduğunu ve lösemi regresyonuna aracılık eden bir tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğünü belirtmektedir (12). Ph benzeri hastalarda, Ph pozitif ALL hasta gruplarındaki genetik değişimlere benzer şekilde *IKZF1* değişikliklerinin görüldüğü belirtilmektedir. *IKZF1*’deki delesyonların ve mutasyonların, Ph pozitif ve Ph benzeri B-ALL’de görülme oranı sırasıyla %70 ve %40’dır (13). Ph pozitif ALL’de en sık görülen *IKZF1* değişimleri ekzon 4 ve 7’de görülen delesyonlardır. Delesyonlar ve mutasyonlar da dahil olmak üzere *IKZF1* değişiklikleri; *ABL/JAK* sınıfı füzyon vakalarının %50-100’ünde, *EPOR*’un yeniden düzenlendiği hastaların yaklaşık %78’inde ve *CRLF2*-yeniden düzenlenmiş hastaların ise %40-70’inde görülmektedir (Şekil 2). Günümüzde, çeşitli *IKZF1* delesyon tipleri arasındaki patobiyolojik farklar yeterince bilinmemektedir, ancak *IKZF1* delesyonlarının tüm tipleri kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Ph benzeri ALL tanısı almış 15 çocuğun dahil edildiği bir araştırmada; hastalara ait transkriptom analizleri ve tüm genom dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. 15 hastada da sitokin reseptörü, tirozin kinaz genlerinin düzenini bozan ALL kromozomal yeniden düzenlemeleri veya dizi

mutasyonları belirlenmiştir (14). Ayrıca kinaz aktive edici bazı sınıflar da tanımlanmıştır. Bunlar: JAK/STAT sinyalizasyonunu aktive eden değişimler (*CRLF2*, *JAK2*, *EPOR*), *ABL* sınıfı füzyonları (*ABL1*, *ABL2*, *CSF1R*, *PDGFRα*, *PDGFRβ*) ve RAS sinyal yolu mutasyonları (*KRAS*, *NRAS*, *NF1*, *PTPN11*)’dır. En büyük tirozin kinaz aktivasyon lezyonları, JAK/



Şekil 1. B hücreli ALL’de ABL ve JAK2 sınıfı tirozin kinaz aktive edici füzyonlar (12).



Şekil 2. Tirozin kinaz füzyonuna sahip hastalarda; *IKZF1* delesyonları sık görülürken, *CRLF2*’nin yeniden düzenlendiği hastalar çoğunlukla JAK2 mutasyonlarına sahiptir (12).

STAT sinyal yolunun aktifleşmesi sonucu oluşmaktadır (9). Sitokin reseptörlerinin ve *JAK* ailesi üyelerinin rolü, B-ALL çalışmalarında büyük öneme sahiptir. *JAK* ailesi,

JAK-*STAT* sinyal yolağı ile ilişkili reseptör olmayan dört tirozin kinazı (*JAK1*, *JAK2*, *JAK3*, *TYK2*) kodlamaktadır. Kodlanan tirozin kinazlarda meydana gelen mutasyonlar, yüksek riskli çocukluk çağı B-ALL vakalarının yaklaşık %10'unda görülmektedir (12).

CRLF2'deki değişimler (Xp22.3 / Yp11.3); çocukluk çağı B-ALL vakalarının %8'inde, yüksek riskli B-ALL vakalarının ise %15'inde görülmektedir. Ph benzeri ALL hasta grubunun yaklaşık %50'sinde *CRLF2* yeniden düzenlenmesinin söz konusu olduğu tespit edilmiştir. Genel olarak, *CRLF2*'nin aşırı ekspresyonuna neden olan birkaç genetik düzenlenme vardır. Bu düzenlenmeler 3 yolla gerçekleşmektedir (Şekil 3) (12,14):

1. *P2RY8-CRLF2* füzyonuna neden olan cinsiyet kromozomlarının psödoozomal bölgesinin fokal interstisyel delesyonu,

2. *CRLF2*'nin, immünoglobülinin ağır zincir arttırıcı bölgesine translokasyonu (*IGH-CRLF2*) veya,

3. *CRLF2*'yi aktifleştiren F232C nokta mutasyonudur (15).

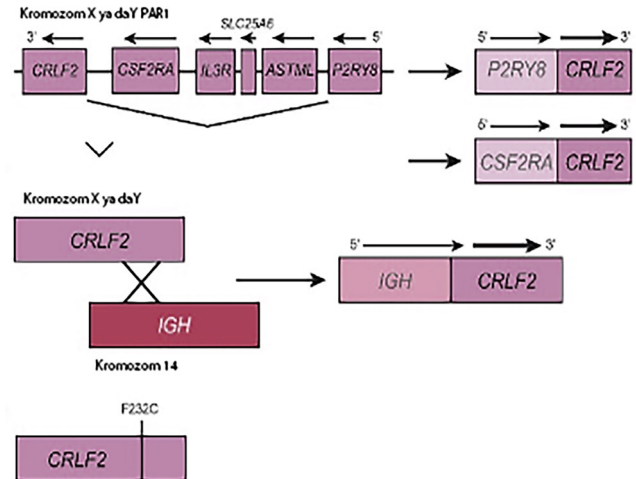
IGH-CRLF2 translokasyonu, lösemi patogenezinin erken dönemlerinde ve relaps vakalarında görülmektedir. *P2RY8-CRLF2* translokasyonu ise hastalık gelişimi sırasında gerçekleşmektedir. *P2RY8-CRLF2*, genellikle subklonaldir ve relaps görülen hastaların 1/3 veya yarısında tanımlanamaz. *CRLF2* ekspresyonu, *IGH-CRLF2* füzyonuna sahip hastalarda *P2RY8-CRLF2*'li hastalara göre 10 ila 100 kat daha yüksektir. Prognostik etki olarak, *IGH-CRLF2* füzyonlu ALL hastalarının relaps riski *P2RY8-CRLF2*'li hastalara göre iki kat daha yüksek olduğu ifade edilmektedir. Yüksek *CRLF2* ekspresyon seviyesi, genetik düzenlenmeler ile birlikte değilse kötü prognoz işareti olarak görülmemektedir. Özellikle Hispanik etnik kökene sahip hastalarda yüksek *CRLF2* ekspresyon seviyesine sık rastlanmaktadır (16).

CRLF2 yeniden düzenlenmeleri, çoğunlukla lökomogeneze yol açan *STAT5* yolağının aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Son dönemde gerçekleştirilen moleküler çalışmalar ile, PI3K/mTOR sinyal yolağı da lökomogenez sürecine dahil edilmiştir (9,12). *CRLF2* yeniden düzenlenmenin görüldüğü çocukluk ve ergenlik çağı vakalarının

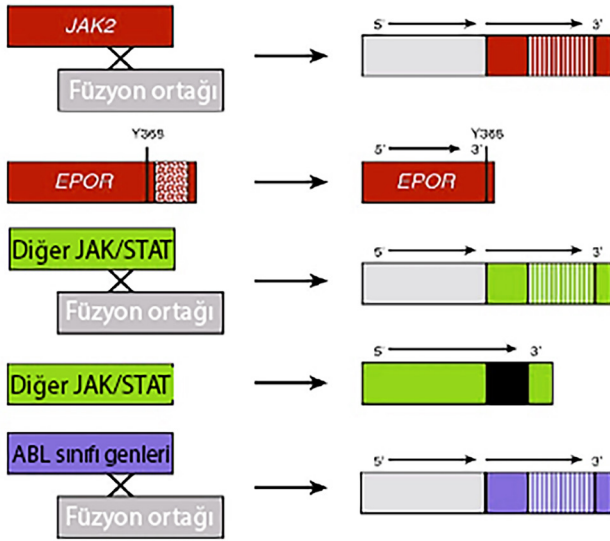
yaklaşık yarısında, Janus Kinaz genlerinden *JAK1* ve *JAK2*'nin aynı zamanda aktive olacağı mutasyonlar görülmüştür ve bu durum *JAK*-*STAT* sinyalizasyonunun aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Düzenlenmenin görüldüğü vakaların yaklaşık %40'ı *JAK2* mutasyonlarını barındırmaktadır. En sık görülen mutasyon psödokinaz bölgesinde bulunan R683G nokta mutasyonudur (9,12). Yapılan çalışmalarda, lökomogenez sürecinde; *JAK2* ve *ABL* kinaz sınıfı genlerini içeren ve füzyon oluşumunu aktive eden tirozin kinazın oluştuğunu, ayrıca bu füzyon proteinlerinin Ph benzeri gruplara özel olduğu belirlenmiştir. *ABL* sınıfı ve *JAK2* füzyon proteinleri, pediatrik ve yetişkin Ph benzeri vakaların %18.25'inde görülmektedir. Füzyon proteinlerinin subselüler konumunun araştırılması ile birçok *JAK2* füzyonu hücresel düzeyde incelenmiş ve bu proteinlerin çoğunun (*PAX-JAK2* füzyon proteini hariç) sitoplazmik olduğu görülmüştür (13).

Ph benzeri ALL'nin %13'ünü içeren ikinci ana alt grup, *ABL1*, *ABL2*, *PDGFRβ* ve *CSF1R* gibi *ABL* sınıfı genlerin yeniden düzenlenmesini içermektedir. *JAK2* ve *EPOR* düzenlenmelerinin birlikte görülme oranı, Ph benzeri ALL'li hastalarda %11'dir. Tek başına *EPOR* düzenlenmeleri ise Ph benzeri ALL'nin ~%4'ünde tanımlanmıştır (Şekil 4) (11).

Translokasyonlar sonucu oluşan "füzyon" genlerinden sentezlenen yeni proteinlerin hastalık seyrine etkisinin belirlenmesi yeni tedavi prensiplerinin geliştirilmesi açısından yol göstericidir. Hastalığın tanısı ve tedavisinden sonra spesifik kromozomal düzensizliklerin kalitatif ve kantitatif olarak



Şekil 3. Ph benzeri ALL'de *CRLF2* düzenlenmeleri (27).



Şekil 4. Ph benzeri ALL'de ABL sınıfı kinaz füzyonları ve diğer JAK sinyal yolu değişimleri (27).

saptanması; hastalığın seyri, terapötik ilaca verilen yanıtın değerlendirilmesi ve MRD takibi bakımından büyük önem taşımaktadır (9,17).

Ph benzeri ALL, gen ekspresyon profillerinin analiz edildiği çalışmalar ile tanımlanabilmektedir. Ayrıca bu alt grup, ekspresyon profili olarak Ph pozitif alt gruba benzer gen ifade profilleri göstermektedir. Ph benzeri hastaların kemoterapi süreçleri kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir. Tanı amaçlı gerçekleştirilen sitogenetik testler sonucu Ph benzeri ALL hastaları kimerik proteini bulunmadığı için Ph negatif grup olarak tanı almaktadır. Bu nedenle, Ph benzeri hasta grubuna Ph negatif tanısı almış hastaların klasik tedavi protokolleri uygulanmaktadır. Gerçekleştirilen araştırmalar ışığında, ABL sınıfı füzyonları görülen Ph benzeri ALL vakalarının tedavilerine ABL inhibitörlerinin eklenmesi ile remisyon sağlandığı belirtilmiştir. Ph benzeri hasta grubunda çoğunlukla ABL1 sınıfı ve JAK-STAT sinyal yolağı değişiklikleri görülse de, ABL sınıfı veya JAK inhibitörleri tarafından inhibe edilemeyen birkaç kinaz değişiklikleri de vardır (örn; *BLNK*, *NTRK3* ve *TYK2*). Gelecekteki çalışmalar, bu kinazları hedefleyebilecek inhibitörlerin geliştirilmesine yönelik olacaktır. Ph benzeri ALL'nin tedavi protokollerine, Ph pozitif hastaların tedavisi için kullanılan tirozin kinaz inhibitörlerinin (TKI) eklenmesi hasta grubunun etkin tedavi almasını sağlayabilmektedir (9).

Tirozin kinaz aktive edici lezyonları olan hastaların çoğunluğu induksiyon kemoterapisine zayıf yanıt vermektedir. Pediatrik çalışmalarda bu hastalara kök hücre transplantasyonu ile kombine edilmiş yoğun kemoterapi uygulandığı ve beş yıllık olaysız sağkalm oranlarının ABL sınıfı füzyonlarda %50-89, *JAK2/EPOR/CRFL2* değişimlerinin görüldüğü vakalarda %67'nin altında olduğu bildirilmiştir (Şekil 3) (9).

Ph benzeri ALL'li hastaların tanısının konması oldukça güç olduğundan, son yıllarda yapılan çalışmalar çeşitli ayırt edici tanı yöntemlerinin geliştirilmesine odaklanmıştır. 2016 yılında, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2008 yayımını revize ederek bu hasta grubunun tanısal güçlüğüne dikkat çekmiştir. Günümüzde, farklı pediatrik çalışma grupları ve merkezleri klinik çalışmaların coğrafi yapısına, hastaların etnik kökenine, test edilecek hasta sayısına, tanı laboratuvarlarındaki genom/transkriptom dizileme altyapısının kullanılabilirliğine ve klinik hedefe dayanarak Ph benzeri ALL'nin teşhisi ve karakterize edilmesi için farklı stratejiler geliştirmektedir. Tanı yöntemlerini uygularken dikkat edilmesi gereken en önemli parametreler; moleküler karakterizasyonun dikkate alınması ve hedeflenen terapiye potansiyel olarak uygun olan moleküler lezyonların tanımlanabilmesidir (9).

Ph benzeri ALL'nin patolojik tanısı ve alt sınıflandırmasında kullanılan yöntemler avantaj ve dezavantajları yönünden ele alındığında 6 alt başlık altında değerlendirilebilmektedir (Şekil 5).

1. Sitogenetik

Geleneksel karyotipleme yöntemi, kromozomal anomalilerin belirlenmesinde ve bilinmeyen veya beklenmeyen yeniden düzenlenmelerin tespitinde kullanılmaktadır. Sitogenetik yöntemler ile Ph benzeri ALL vakalarında görülen *ETV6-RUNX1* ve *CRLF2*'nin interstisyel delesyonlarının belirlenemeyecek olması, yöntemin sınırlayıcı yönünü oluşturmaktadır (18). Ayrıca, Ph benzeri alt grupta görülen çok sayıda gen ifade değişikliklerinin sitogenetik analizler ile ayırt edilebilmesi mümkün olmadığından bu yöntem ciddi sınırlamaya sahiptir.

2. Floresan in Situ Hibridizasyon (FISH)

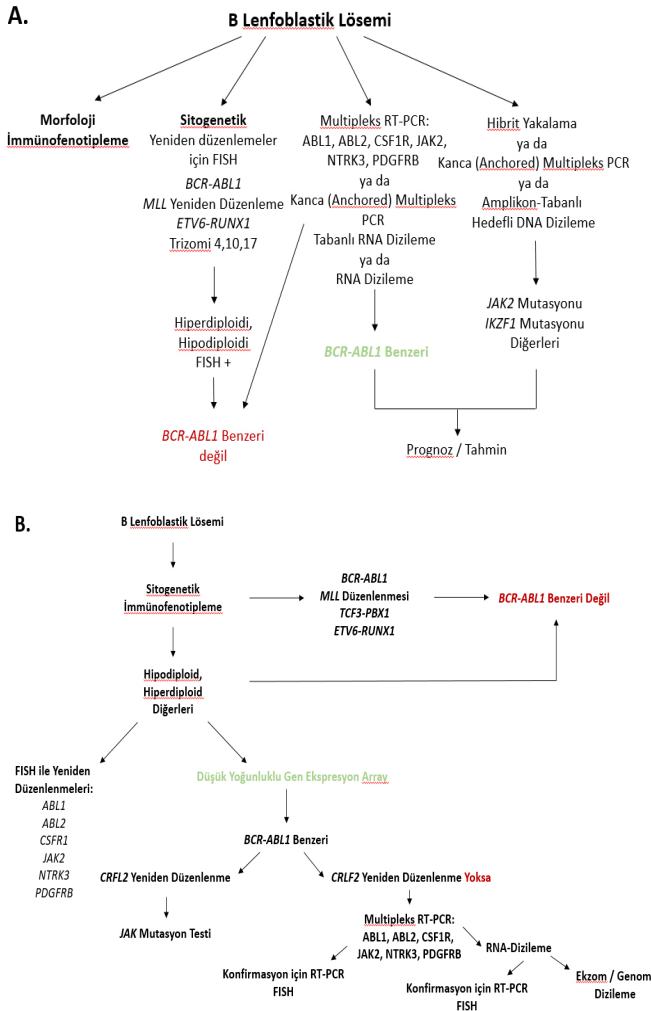
FISH yöntemi, çalışılacak gen probleminin önceden belirlenmesi koşuluyla geleneksel karyotiplemeden daha yüksek hız ve çözünürlükte kromozomal

anomalilerin tanımlanmasını sağlamaktadır. Ph benzeri hastaların tanısında spesifik FISH panelleri kullanılmaktadır ancak analizin pozitif bulgusu sonucunda tespit edilen translokasyonları tanımlamak için ek füzyon problemlerine veya ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) gibi ek testlere ihtiyaç duyulmaktadır. Birkaç genin [örn; inv (9) *PAX5-JAK2* füzyonu, del(X)(p22p22)/del(Y)(p11p11) sonucu oluşan *P2RY8-CRLF2* füzyonu gibi] yeniden düzenlenme bulgularını eş zamanlı olarak bu metodoloji ile tespit etmek mümkün değildir. Ancak, CLIA onaylı laboratuvarlar (Clinical Laboratory Improvement Amendments, CLIA, klinik denemeler ve temel araştırmalar hariç, Amerika Birleşik Devletleri'nde insanlar üzerinde yapılan tüm klinik

laboratuvar testlerine uygulanan ABD federal mevzuat standartlarıdır.); Ph benzeri ALL vakalarının tanı ve karakterizasyon basamaklarında kullanılmak üzere çok yönlü FISH testlerini önermektedir (18).

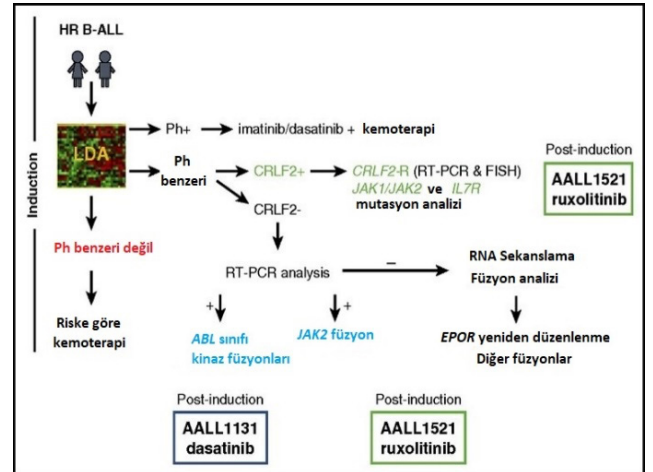
3. Akım (Flow) Sitometri Yöntemi

Akış sitometri, B-ALL tanısı için yaygın olarak kullanılan, hızlı ve uygulama kolaylığı olan bir yöntemdir. Akım sitometri yönteminde süspansiyon halindeki hücre ya da partiküller lazer ışığı ile aydınlatılan bir bölmeden geçirilir; hücrelerin lazer önünden geçerken verdikleri sinyaller göz önüne alınarak analiz gerçekleştirilir. Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrenin büyüklüğü, granülarite gibi fiziksel özellikleri olabileceği gibi; hücreye bağlanan çeşitli florokromlar da olabilmektedir. Deney sonucunda hücre ya da partikülün immunfenotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli ve canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi elde edilmektedir. Akış sitometri yönteminde periferik kan örneği, kemik iliği aspirasyon materyali ve biyopsileri, ince iğne aspirasyon materyalleri ve tüm vücut sıvılarından hücrelerin analizi gerçekleştirilebilmektedir. Akut lösemilerin %95'i temel antikörlerin kullanıldığı bir panel ile tanımlanmaktadır. Ph benzeri ALL tanısında akım sitometri yönteminden faydalanılabilir. Bu vakalarda da B-ALL alt tiplerindeki gibi CD19⁺ ve CD10⁺ varlığı görülmektedir. Yüksek *CRLF2* ekspresyon seviyeleri; *JAK2/JAK1* ve *IL7R* genlerindeki mutasyonlar da dahil olmak üzere, JAK-STAT sinyal yolundaki



Şekil 5. Ph benzeri ALL'de Kullanılan Tanı Algoritmaları.

A: Geniş tabanlı Ph benzeri ALL tanı algoritması, **B:** Aşamalı Ph benzeri ALL tanı algoritması (18).



Şekil 6. Çocuk Onkoloji Grubu tarafından kullanılan güncel Ph-benzeri ALL genetik test algoritması (27).

genetik değişimlerle ilişkilidir. Bu sayede Ph benzeri ALL'de lenfoblastların yüzeyinde *CRLF2*'nin fazla ekspresyonu akım sitometri yöntemi *CRLF2*'ye karşı geliştirilmiş antikolar kullanılarak gösterildiğinde hızlı tanı sağlar. Her yöntemde olduğu gibi akım sitometrisinden yararlanırken de tanı için standardize edilmiş yöntemlerin tercih edilmesi, cihazın optimum koşullara uygun olması, periyodik kontrollerin düzenli yapılıyor olması ve cihaz kalibrasyonu testin güvenilirliği açısından önemlidir (18,19).

CRLF2 antibodies are commercially available and have been incorporated into panels in many flow cytometry laboratories

CRLF2 antibodies are commercially available and have been incorporated into panels in many flow cytometry laboratories

4. Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

RT-PCR; RNA moleküllerinin retrovirüslerden izole edilen revers transkriptaz enzimi yardımıyla komplementer DNA (cDNA) sentezini gerçekleştirmesi sonucu, gen ekspresyon analizlerinin yapılabildiği cDNA'nın çoğaltımını ve ürünlerini tek bir tüpte belirlemeyi mümkün kılan hızlı, hassas ve füzyon partnerlerinin varlığını tanımlayabilmek için kullanılan multipleks özellikte bir yöntemdir. Bu metodoloji ile reaksiyon başına 30 veya 50 gen probu kullanılarak geniş bir translokasyon aralığı testi gerçekleştirilir ancak yeni oluşan füzyonlar RT-PCR yöntemi ile tespit edilememektedir. CLIA sertifikalı laboratuvarın bazılarında Ph benzeri ALL'nin tanı ve karakterizasyonu için multipleks RT-PCR panelleri kullanılmaktadır (18,20,21).

5. Dizileme Teknolojileri

Ph benzeri ALL'de genomik düzenlenmelerin ve klinik sonuçlar ile yapılacak korelasyonların tespiti için dizileme teknolojilerinin çalışmalara dahil edilmesi önem taşımaktadır. Ph benzeri ALL hastalarının tanısında kullanılan Yeni Nesil Dizileme (*Next Generation Sequencing*, NGS) yöntemleri birçok avantaj ve dezavantaja sahiptir. Yeni oluşan füzyonların belirlenebilmesi, sekonder mutasyonların analiz edilebilmesi, daha hassas ve duyarlı sonuçların elde edilebiliyor olması sistemin dikkat çeken avantajlarını oluştururken, NGS tabanlı bazı yöntemlerde yeni füzyon partnerlerinin tanımlanamaması, yüksek

maliyet, tanı sürelerinin uzun olması ve altın kural sayılan temel yöntemler ile doğrulanma gerekliliği bu yöntemin dezavantajı olarak görülmektedir. Kullanılan yöntemler; Hibrit yakalama (*Capture*)-bazlı hedefli NGS, Kanca (*Anchored*) multipleks PCR-bazlı hedefli NGS, Tüm ekzom dizileme, Tüm transkriptom dizileme ve Tüm genom dizileme yöntemleridir (18).

6. Gen Ekspresyon Profilleri

Mikroarray'ler (mikroçipler ve mikrodizilimler) birçok biyolojik sistemde olduğu gibi, hematolojide de yüksek çıktılı gen ifade analizleri için rutin olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntem ile aynı anda birçok genin ifadesini değerlendirmek mümkündür. Çok sayıda oligonükleotidin lamlar ya da naylon membranlar üzerine noktalması ile mikroarrayler oluşturulmaktadır. Kullanım alanları, gen ifade profillerinin araştırılması, mutasyon taraması ve analizi, genotipleme çalışmaları, genlerin ve klonların haritalanması, mikrodelesyon ve kromozomal aberasyonların tespiti olarak sıralanabilir. Hastalık tanısında kullanılan mikroarray platformlarının en önemli avantajları; aynı anda birçok gen ile ilgili bilgi alınması, hızlı sonuç elde edilmesi, deney sürecinin kısa olması, güvenilir olması ve sistemin optimizasyonu sonrasında diğer yöntemlere göre daha ucuz olmasıdır. Mikroarray'ler hematolojik malignitelerin moleküler tanısının doğru olarak yapılmasında yaygın olarak kullanılmaya aday gösterilmektedir. Ayrıca mikroarray analizleri tümör gelişiminde hangi genlerin ve biyolojik süreçlerin sorumlu olabileceğini göstermektedir. Gen ekspresyon analizi, Ph benzeri ALL'nin tanısında "altın standart" olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle Ph benzeri tanısında kullanılacak en doğru ve geçerli yöntem olarak görülmektedir. Mikroarray uygulamaları, günümüzde yaygın olarak Illumina, Agilent ve Affymetrix platformlarında gerçekleştirilir. Bu alt grubun tanımlanmasında ticari olarak kullanılan mikroarrayler Affymetrix platformlarıdır. Yöntem; mRNA ekstraksiyonu ve ardından gen ekspresyon analizini içermektedir. Affymetrix platformları ile yüksek uyum gösteren Taqman tabanlı 8 veya 15 gen içeren düşük yoğunluklu dizi platformları (Taqman Low-Density Array/TLDA) yıllardır gerçekleştirilen çalışmalar doğrultusunda geliştirilmiştir. Ph benzeri ALL teşhisinde kullanılan bu yöntem Klinik Laboratuvar İyileştirme Değişiklikleri onayı olmayan

laboratuvarlarda uygulanamamaktadır. Bu metodoloji genel olarak, hematolojik malignitelerin ön bilgi olmadan sınıflandırılmasında, yeni alt grupların belirlenmesinde, hastalığın tanısının doğru olarak yapılmasında, tedaviye cevabın ve relapsın önceden belirlenmesinde ve en önemlisi tedavi için yeni hedeflerin bulunmasında mikroarray platformları büyük önem taşımaktadır (18,22).

Ph benzeri ALL grubunun tanımlanabilmesi ve etkin tedavi protokollerinin başlatılabilmesi için güncel çalışmalarda önerilere yer verilmektedir. Harvey ve arkadaşları (2020) Ph benzeri ALL vakalarında görülen yeniden düzenlenmelerin tanımlandığı ayrıntılı moleküler analizler devam ederken, lösemi tanısı sonrası (7-10 gün içerisinde) rutin FISH testi füzyonların belirlenmesini ve indüksiyon kemoterapinin erken dönemlerinde JAK veya ABL/PDGFR inhibitörlerinin eklenmesini erken terapötik müdahale için önermektedir. Ek olarak, RT-PCR yöntemi ile tespit edilen füzyonların, indellerin ve nokta mutasyonlarının Sanger dizi analizi ile konfirmasyonunun sağlanmasını vurgulamaktadır. Tüm genom dizileme; Ph benzeri ALL'yi karakterize etmek için en yararlı yöntemlerden biridir. Ancak yüksek maliyet ve test sonucunun uzun süren analiz

basamakları nedeni ile tercih edilmemektedir. Ph benzeri ALL'de sadece araştırmalar için tüm genom dizileme kullanılmaktadır (23).

Ph benzeri ALL hastaları, Ph benzeri olmayan vakalara kıyasla yüksek indüksiyon başarısızlığı oranı, indüksiyon sonrası yüksek MRD pozitifliği ve yüksek relaps oranları ile geleneksel kemoterapiye zayıf yanıt vermektedir (24). Ph benzeri ALL grubunun aldığı etkin tedavi hala Dünya genelinde standart tedavi değildir ve ilgili grup çok heterojendir. Bu nedenle tedavi algoritmalarında tam olarak nerede oldukları bilinmemektedir. Potansiyel tedavilerle doğru hastaları eşleştirmek için, Ph benzeri alt tipinin dahi sınıflandırılmaya ihtiyacı vardır (7,9).

Lösemide tedavi yanıtı ve prognoz direkt ilişkilidir. MRD; ALL'de tedavi yanıtının belirlenmesinde en duyarlı yöntem olarak bilinmektedir. MRD ile, remisyon indüksiyonunun herhangi bir aşamasında $\geq 10^{-2}$ blastı olan hastalar için relaps riski çok yüksek yorumu yapılabilmektedir ve hedefe yönelik tedavilerin konvansiyonel tedavilere eklenmesi gerekmektedir. Ancak $< 10^{-2}$ blastı olan hastalarda sağkalımı arttırmak için tedavi yoğunluğunun artırılması, tedavi süresinin uzatılması ve/veya transplantasyon seçenekleri hâlâ tartışmalıdır (25,26).

Tablo 1. Ph benzeri ALL'de tanımlanan kinaz füzyonları [28]

Kinaz Geni	Tirozin Kinaz İnhibitörü	Füzyon Partnerleri	Hasta	Genler
sayı				
<i>ABL1</i>	Dasatinib	6	14	<i>ETV6, NUP214, RCSD1, RANBP2, SNX2, ZMIZ1</i>
<i>ABL2</i>	Dasatinib	3	7	<i>PAG1, RCSD1, ZC3HAV1</i>
<i>CSF1R</i>	Dasatinib	1	4	<i>SSBP2</i>
<i>PDGFRB</i>	Dasatinib	4	11	<i>EBF1, SSBP2, TNIP1, ZEB2</i>
<i>CRLF2</i>	JAK2 inhibitörü	2	30	<i>IGH, P2RY8</i>
<i>JAK2</i>	JAK2 inhibitörü	10	19	<i>ATF7IP, BCR, EBF1, ETV6, PAX5, PPFIBP1, SSBP2, STRN3, TERF2, TPR</i>
<i>EPOR</i>	JAK2 inhibitörü	2	9	<i>IGH, IGK</i>
<i>DGKH</i>	Bilinmiyor	1	1	<i>ZFAND3</i>
<i>IL2RB</i>	JAK1 inhibitörü, JAK3 inhibitörü ya da ikisi birden	1	1	<i>MYH9</i>
<i>NTRK3</i>	Krizotinib	1	1	<i>ETV6</i>
<i>PTK2B</i>	FAK inhibitörü	2	1	<i>KDM6A, STAG2</i>
<i>TSLP</i>	JAK2 inhibitörü	1	1	<i>IQGAP2</i>
<i>TYK2</i>	TYK2 inhibitörü	1	1	<i>MYB</i>

Tedavi sürecinde ALL hastalarına uygulanan ilk tedavi protokolü indüksiyon tedavisidir. Genetik değişimlerine göre tedaviye eklenecek ilaçların belirlenmesi ve uygulanması gereken basamak konsolidasyon tedavi basamağıdır. Bu basamağa kadar Ph benzeri ALL'li hastaların teşhis edilmesi gerekmektedir. Ph benzeri alt grubun diğer hasta gruplarına göre yaşam oranları oldukça düşük olduğundan, klasik tedaviye yeni ilaçların eklenmesi gerekliliği doğmaktadır (5). Tanı yöntemleri sonucunda Ph benzeri ALL tanısı almış vakalarda saptanan mutasyona göre tedaviye Tablo 1'deki ilaçların eklenmesinin yaşam sürelerine olumlu etkisi olduğu bildirilmektedir. Bunların yanı sıra tedavide yeni ilaçlarla ilgili çalışmalar da devam etmektedir (27,28).

Ph benzeri hastalara uygulanan risk odaklı terapi (yoğun kemoterapi protokolleri ve allojenik kemik iliği nakli) olumsuz prognostik durumu ortadan kaldırmaktadır. Ching-Hon Pui ve ark.'larının 2015 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada, transplantasyona gerek kalmadan hastaların büyük çoğunluğunda *ABL* tirozin kinaz inhibitörleri ve potansiyel olarak *JAK* inhibitörleri ile inhibe edilmeye uygun genomik değişikliklerin olduğu belirlenmiştir (10).

BCR-JAK2 translokasyonuna [t(9;22)(p24; q11.2)] sahip ksenograft fare modellerine uygulanan, *JAK2* inhibitörü olan Ruxolitinib'in tümör oluşumunu azalttığı gösterilmiştir. Aynı zamanda *CRLF2*'nin yeniden düzenlendiği ve *JAK2* mutasyonlu lösemik hücrelerin in vitro tedavisinde umut verici sonuçlar elde edilmiştir (12).

Sonuç olarak; Ph benzeri ALL hastalarının sıklığı pediatrik vakalarda %9, adolesanlarda %25 oranındadır. Tanı, gen ekspresyon profilleri ile konulmaktadır ve hastalık genetik olarak heterojendir. Vakalarda *BCR-ABL1* füzyon proteini bulunmamaktadır. Aynı zamanda bu alt grupta *IKZF1* delesyonları yüksek oranlarda görülmektedir. Ph benzeri ALL vakalarında görülen bir diğer genetik değişim ise *CRLF2* geni yeniden düzenlenmesidir. *CRFL2* geninin yeniden düzenlenmesi, vakaların %50'sinde görülmektedir. Bu değişime ek olarak vakalarda *ABL1*, *ABL2*, *JAK2*, *IL7R*, *FLT3* mutasyonları, *EPOR* yeniden düzenlenmeleri de görülebilmektedir. Ph benzeri alt grubunun ayırt edici moleküler analizler kullanılarak tanımlanması, tanı ve tedavi için belirleyicidir. Etkin tedavi protokolleri için genetik değişimler mutlak değerlendirilmelidir. Ph benzeri alt gruba ait

hastaların gen ifadelerinin belirlenmesi ile tedavilerine kemoterapik ilaçların ilave edilmesi sağlanarak, etkin tedavi protokollerinin geliştirilmesi ve kötü prognozun öngörülerek yaşam süresinin ve kalitesinin artırılması mümkün olabilmektedir.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Yazarlar tarafından finansal destek almadıkları bildirilmiştir.

Kaynaklar

1. Ching-Hon Pui, Jun J. Yang, Stephen P. Hunger et. al.(2015), Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration, August/24, Journal Of Clinical Oncology.
2. Arceci RJ, Hann IM, Smith OP. Pediatric Hematology 3th ed Malden, Massachusetts Blackwell, 2006 pp 450-81.
3. Pui CH. Acute lymphoblastic leukemia in children. Curr. Opin. Oncol. 2000;12: 3-12.
4. Chessels JM, Bailey C, Richards SM. Intensification of treatment and survival in all children with lymphoblastic leukemia: results of UK Medical Research Council trial UKALL X. Medical Research Council Working Party on Childhood Leukemia. Lancet 1995; 345: 143-8.
5. Schorin MA, Blattner S, Gelber RD, Tarbell NJ, Donnelly M, Dalton V, Cohen HJ, Sallan SE. Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Cancer Institute/Children's Hospital Acute Lymphoblastic Leukemia Consortium Protocol 85-01. J. Clin. Oncol. 1994; 12: 740-7.
6. Cosma G, Crofts F, Taioli E, Toniolo P, Garte S. Relationship between genotype and function of the human CYP1A1 gene. J. Toxicol. Environ. Health 1993; 40: 309-16.
7. Wells J, Jain N, Konopleva M (2017) Philadelphia Chromosome-Like Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress in a New Cancer Subtype. Clin Adv Hematol Oncol 15(7):554-61.
8. Ching-Hon Pui, Kathryn G. Roberts, Jun J. Yang, Charles G. Mullighan; Philadelphia Chromosome-like Acute Lymphoblastic Leukemia, Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia, Vol. 17, No. 8, 464-70. 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.
9. Pui CH, Roberts KG, Yang JJ et al (2017) Philadelphia Chromosome-like Acute Lymphoblastic Leukemia. Clin Lymphoma Myeloma Leukemia 17(8):464-70.
10. Pui CH, Yang JJ, Hunger SP et al (2015) Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration. J Clin Oncol 2015 Sep 20;33(27):2938-48.
11. Tran TH, Loh ML (2016) Ph-like acute lymphoblastic leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program (1):561-6.
12. Boer JM, Den Boer ML (2017) BCR-ABL1-like acute lymphoblastic leukaemia: From bench to bedside. Eur J Cancer 82:203-18.
13. Woo JS, Alberti MO, Tirado CA (2014) Childhood B-acute lymphoblastic leukemia: a genetic update. Exp Hematol Oncol 13;3:16.
14. Roberts KG, Payne-Turner Y. Li, D., Harvey R.C., et al (2015) Targetable Kinase-Activating Lesions in Ph-like Acute Lymphoblastic Leukemia. N Engl J Med 11; 371(11):1005-15.
15. Eric S. Schafer, Judith Margolin, David G. Poplack, and Karen R. Rabin. (2015) Molecular Genetics of Acute Lymphoblastic

- Leukemia. The molecular basis of cancer. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders, Print book: English: Edition 4.
16. Frisch A, Ofra Y. (2019). How I diagnose and manage Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia, Vol. 104 No. 11 (2019): November, 2019 <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.207506>.
 17. Nordgren A, Schoumans J, Söderhall S, et al. (2001) Interphase fluorescence in situ hybridization and spectral karyotyping reveals hidden genetic aberrations in children with acute lymphoblastic leukaemia and a normal banded karyotype. *Br J Haematol.* 2001 Sep;114(4):786-93.
 18. Siegele BJ, Nardi V (2018) Laboratory testing in BCR-ABL1-like (Philadelphia-like) B-lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Am J Hematol* 93(7):971-7.
 19. Dalva K. Hematoloji'de Akım Sitometri Kullanımı. Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi, Temel Moleküler Hematoloji Kursu. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji.
 20. Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve Uygulama Alanları Araş.Gör.Burcu Okutucu* Yrd. Doç.Dr. Sacide Pehlivan.
 21. Sayitoğlu-Aydın M. Hematoloji'de Real Time Pcr. Moleküler Hematoloji Ve Sitogenetik Alt Komitesi, Temel Moleküler Hematoloji Kursu. İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul.
 22. Cemaliye Boylu Akyerli. Hematoloji'de Mikroarray Kullanımı. Temel Moleküler Hematoloji Kursu, 12-13 Mart 2005. Ankara.
 23. Harvey R.C., Tasian S.K (2020) Clinical diagnostics and treatment strategies for Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia Affiliations. *Blood Adv.* 2020 Jan 14;4(1):218-28. doi: 10.1182/bloodadvances.2019000163.
 24. Prescott K., Jacobs M., Stock W., Wynne J. (2020) New Approaches to Treating Challenging Subtypes of ALL in AYA Patients Current. *Hematologic Malignancy Reports* <https://doi.org/10.1007/s11899-020-00597-y>. 2020 Sep 12.
 25. Cazzaniga G, d'Aniello E, Corral L et al. (2003) Results of minimal residual disease (MRD) evaluation and MRD based treatment stratification in childhood ALL. *Best Pract Res Clin Haematol* 2003; 15:623-38.
 26. Flohr T, Schrauder A, Cazzaniga G et al. (2008) Minimal residual disease-directed risk stratification using realtime quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2008; 31.
 27. Tasian SK, Loh LM, Hunger SP (2017) Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 130:2064-72.
 28. Roberts KG, Li Y, Payne-Turner D et al (2014) Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 371(11):1005-15.