

# *Konferans Özetleri*



# K-1

## HEMATOPOEZ

Klara DALVA

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Hastanesi Hematoloji Bilim Dalı Laboratuvarı Sorumlusu, Ankara

Yunancadaki “Kan yapımı”nın karşılığı olan Hematopoez terimi, kan hücrelerinin kontrollü olarak üretilmelerini sağlayan bir süreç olup; yine her aşaması kontrol altında olan hücre yenilenmesi, çoğalması, farklılaşması ve olgunlaşması evrelerini kapsar. Süreçlerin sonunda kemik iliğinde oluşan fonksiyonel hücreler dolaşıma karışır. Bu hücrelerin ömrünün ne kadar kısa olduğu düşünüldüğünde yaşamımız boyunca sürecin devamlılığının ancak kendini yenileyebilen hücrelerle mümkün olduğu anlaşılabilir. Kendini yenileme kapasitesi olan ve “Hematopoietik Kök Hücre, HKH” olarak tanımlanan bir hücrenin gerektiğinde farklılaşma yoluna girerek bunu sağladığı bilinmektedir.

HKH ler genelde sessiz durumda beklerken ancak 2-3 ayda bir, bölünmek üzere uyanırlar ve bu şekilde kendilerini çeşitli mutasyonlardan da korumuş olurlar. Bu süre ihtiyacın artması durumunda kısalacak ve normalde bir HKH ve bir farklılaşacak progenitor hücre oluşturacak şekilde asimetrik bölünürlerken daha çok progenitor oluşturacak şekilde simetrik bölünme gösterebileceklerdir (Şekil 1). Bölünme ve farklılaşma normalde kemik iliğinde gerçekleşirken aşırı ihtiyaç durumunda HKH ler karaciğer, dalak ve lenf nodlarına göç ederek burada da ekstrameduller hematopoezi başlatabilirler

### Hematopoietik Gelişim

Hematopoez, gelişim sürecinde embriyonik hücrelerin farklı yerlerde yerleşmeleri ile başlar. Sağlıklı bir erişkinde hematopoez Kemik İliğinde (KI) sınırlı iken; fetal gelişim sırasında hematopoezi başlatan ilk hücre adacıkları “yolc sac”ta, takiben aorta gonad mezonefroz (AGM) bölgesinde oluşur (mezoblastik faz) ve fetal karaciğerde (hepatik faz), sonrasında kemik iliğinde devam eder (medullar faz). Fertilizasyonun 9. Gününde “yolc sac” a giden mezodermal hücrelerin bir kısmı ilkel eritroblastları oluştururken bir kısmı da bu kesenin iç çeperini kaplayan ve kan damarlarını oluşturacak olan anjioblastlara dönüşür. Buradaki ilkel eritroblastlar kısa ömürlü ve kararsız olan embriyonik hemoglobini (Hb-Portland1-2, Hb Gower 1-2) sentezler. Fertilizasyondan sonraki 4. Haftanın sonunda AGM bölgesine giden mezodermal hücreler 5. Haftada sayıca artar ve kalıcı erişkin hematopoezini başlatan ilk HKHler burada oluşur. Bazı çalışmalar “yolc sac”ta da HKH ve HKH oluşturan hücrelerin bulunduğunu ileri sürmektedir. “Hepatik faz”, gebeliğin 5-7 haftalarında başlar ve fetal karaciğerde (kc), timüs, dalak, plasentada kolonize olan eritroblast, granulosit, monosit kümelerinin oluştuğu görülür. Bu yerleşim yerlerinde bulunan “niş”ler, gelen HKH lerin gelişimine uygun ortamı sağlar. Bu dönemde hematopoez damar dışında gerçekleşir ve 2. 3 ayda temel olarak sadece kc de devam eder, AGM ve yolc sac taki hematopoez son bulur. Fetal KC deki hematopoez gebeliğin 3.-4. ayında en fazla iken 6. aydan sonra azalır ve doğumdan sonraki ilk 1-2 haftada da devam eder. Bu süreçte gelişen dalak, böbrekler, timus ve lenf düğümleri de sürece destek verir. Timus, fütusta ilk gelişen organdır ve T hücre gelişimi temel olarak burada tamamlanır. Böbrek ve dalakta ise B hücreler oluşabilir. Megakaryositler de hepatik fazda oluşmaya başlar. Dalaktaki granuloipoez zamanla kaybolup sadece lenfosit üretimi devam eder. Bu fazda esas olan HbF olsa da az miktarda erişkin hemoglobini de(HbA) tespit edilebilir. Gebeliğin 5. ayında KI nde hematopoez görülür; HKH ler ve mezenkimal hücreler, kemiğin ortasındaki boşluğa hareket eder. Mezenkimal hücreler, hematopoezi destekleyen ve stromal hücreler olarak adlandırılan yapısal elemanlara dönüşür. Bu dönemde hematopoietik; özellikle de miyeloid aktivite belirgindir. Gebelikte 24. haftanın sonunda hematopoezin merkezi KI olur. Ölçülebilir miktarlarda Eritropoietin (EPO), Granulosit koloni stimule edici faktör (G-CSF), granulosit-makrofaj stimule edici faktör(GM-CSF), HbF ve farklı hücre serilerinin farklı gelişim evrelerindeki hücrelerinin tespit edilmesi mümkün olur.

Erişkinde hematopoietik doku, KI, lenf nodları, dalak, kc ve timusta bulunur. KI de eritroid, miyeloid, megakaryositik ve lenfoid kan hücreleri ve stromal hücreler bulunur. Lenfoid hücreler ilk gelişimlerini KI ve Timusta tamamlarken; süreç lenfositlerin antijenle karşılaştıkları lenf nodları, dalak ve mukozal lenf dokularında devam eder.

### Erişkinde Hematopoietik Doku, Kemik İliği

Kemik iliği, kortikal kemiklerin ortasındaki kaviteelerde bulunan “Kırmızı” ve “Sarı” ilikten oluşur. Kırmızı iliğin hematopoietik aktivitesi yüksek iken; sarı ilik farklılaşmamış mezenkimal hücreler ve makrofajlar, yağ hücrelerinden zengindir. Yaşamın ilk 7 yılında kırmızı ilik hâkim iken yaş ilerledikçe yerini sarı iliğe bırakır(retrogression) ve hematopoz temel olarak sternum, vertebra, skapula, pelvis, kaburgalar, kafatası, uzun kemiklerin proksimal uçlarında bulunan kırmızı ilikte devam eder. İhtiyacın arttığı durumlarda sarı iliğin aktif bir iliğe geri dönüşmesi mümkündür.

Hematopoietik hücrelerin çoğalıp farklılaşabilmeleri için kemik iliğinde kan hücreleri yanı sıra bulunan stromal hücreler ve mikroçevre önemli role sahiptir. KI kavitesindeki mikroçevre, aralarında kan hücreleri, yağ hücrelerini barındıran vasküler

kanallardan (santral ven ve arteriollere direne olan sinusoidler) oluşur. HKHler ve progenitör hücreler, hücre-hücre teması ile destek sağlayan bir stromal hücre ağı tarafından desteklenir. Stromal hücrelerin iki önemli fonksiyonu: gelişen hücrelerin tutunabileceği bir zemin, hücre dışı bir matris, oluşturmak ve hematopoietik büyüme faktörlerini sentezlemektir. Bu matriste fibronektin, kollajen, laminin, trombospondin, tenaskin, proteoglikanlar bulunur. Nişlerdeki HKHleri destekleyen ve kritik önemi olan stromal hücreler: osteoblastlar, endotelial hücreler, mezenkimal kök hücreler, çok miktarda CXCL12 ifade eden retikuler hücreler (CAR), perivaskuler stromal hücreler, glial hücreler ve makrofajlar olarak sıralanabilir. Endotelial hücreler arter, ven ve sinusoidleri döşer ve sinusoidlere giren çıkan elamanların hareketinin kontrolünde rol alır. Yağ hücreleri, ilik hacminin oluşmasına katkı sağlarken HKHleri uyaracak sitokin ve büyüme faktörlerini de salgılar. Makrofajlar, fagositoz yapmaları yanı sıra endotelial hücreler, retikuler adventisyel hücreler ile birlikte hematopoezi düzenleyen sitokinler de salgılar. Retikuler adventisyel hücreler damar sinüslerini kesintili olarak döşeyen hücreler olup, yüzeylerinde CXCL12, nestin ve leptin reseptörleri bulundurulur ve uzun retikuler fibrilleri ile oluşturdukları ağ içinde kan hücrelerini barındırırlar, KI'de oluşan hücresel elemanların endotelial sitoplazmadaki porlardan dolaşıma geçmesini kolaylaştırırlar. Osteoblastlar, kemik yapımında osteoklastlar kemik rezorpsiyonunda rol alırlar, hematopoezin kontrolünde, nişlerde önemli rolleri vardır.

Kan hücreleri ve makrofajlardan oluşan Kırmızı ilik, damar dışı kordonlarda organize olmuştur. Kordonlar, endotelial hücreler ve retikuler adventisyel hücreler ile damar lümeninden ayrılırlar (Şekil 2). HKHler birbiri ile yakın ilişkide bulunan iki farklı nişte bulunabilir. 1. Endosteal niş: HKHler burada N-cadherin pozitif osteoblastlar ile yakın temastadır, 2. Vaskuler niş: Perisinüsoidal ve periarteriolar alanlarda yer alan stromal hücreler ve endotelial hücrelerce oluşturulur (Şekil 3). Endosteal niş özellikle stromal hücre fonksiyonunu etkileyen sitokin ve ekstrasellüler matris proteinleri sentezleyerek etkin olur. Nişlerde bulunan "Osteolineage" hücreler, GCSF aracılı HKH mobilizasyonu için gereklidir ve T,B hücre gelişiminde de rolleri vardır. CAR hücre eksikliği, Stem cell Factor (SCF) ve CXCL12 azalması ile eritroid ve lenfoid hücrelerin çoğalmasında azalmaya sebep olur. Endotelial hücreler ise, E-Selektin ve parakrin büyüme faktörleri salgılayarak HKHlerin çoğalmasında destek olurlar. Makrofajlar, onkostatın-M sentezleyip nestin pozitif hücrelerin CXCL12 ifade ederek HKHdeki CXCR4 reseptörüne bağlanıp KI'de kalmalarını kolaylaştırır. Perivaskuler hücreler ile sinaps yapan sempatik sinirlerden sirkadian adrenalin salınımı SDF1a salınımı ve dolayısıyla HKH mobilizasyonunu sağlar. Sinir sistemi, CD34+ HKHler dopamin ve B2 adrenerjik reseptörler taşıdığından doğrudan HKH üzerine de etkili olur. Görüldüğü gibi HKH nişleri pek çok hücrenin etkileşimi ile kontrol edilmektedir. HKH nişlerindeki bazı değişimler, HKHler üzerinde kalıcı değişiklikler sebep olabilir, örneğin mikroRNA işlenmesinde rolü olan "Dicer" enziminin osteoprogenitör hücrelerdeki kaybı miyelodisplazi ve akut miyeloid lösemiye sebep olabilir.

### **Kan Hücrelerinin Oluşumunun Düzenlenmesi**

Yeni kan hücrelerinin oluşumunun ne şekilde düzenlendiği tam olarak açıklanamamıştır. Tek bir multipotent kök hücre, belli tipteki kan hücrelerinin öncülerine dönüşebilecek birkaç adet koşullanmış öncü hücre (progenitör hücre) oluşturabilir. Multipotent Kök hücrelerin çoğu sessiz durumdadır ve gerekli hücreler çok az sayıdaki aktif kök hücreler tarafından sağlanır, hücrenin bu iki formu arasında geçişler olabilmektedir. Kök hücrenin kendini yenileme ya da farklılaşma yolunda mı devam edeceği rastlantısal olarak belirlenir Bu modele göre farklılaşmayı teşvik eden transkripsiyon faktörleri rastlantısal olarak aktive olmaktadır. Farklı hücre serilerinin oluşmasında seriye özgün proteinlerin (ör: büyüme faktörleri) sentezini sağlayan transkripsiyon molekülleri önem taşır. Bu transkripsiyon molekülleri ve etkili oldukları genlerin ifade edilmesi DNA'daki epigenetik değişikliklerden de etkilenir. CpG dinukleotidlerinin metilasyonu bu faktörleri baskılamak; aktivasyon durumunda CpG adaları unmetile durumdadır. Benzer şekilde Histon modifikasyonu da HKH kendini yenilemesi-farklılaşmasında etkili olur. Bir metil transferaz olan Dnmt3a ve Lsd1 ve Jarid 1b gibi histon demetilazlar HKHnin kendini yenileme genlerini susturup farklılaşmasında önem taşırlar. Büyüme faktörleri ancak HKHyi sessiz tutan faktörler azaldığında etkili olurlar.

Multipotent kök hücreler kendilerini yenileyebilirler ancak bu sonsuz değildir ve bu süreçte DNA hasarı da meydana gelebilir; sessiz kalmaları, kendilerini bu hasardan korumalarını sağlar. Belli bir seriye koşullanmış (committed) öncü hücrelerin çoğalma potansiyelleri ise sınırlıdır ve farklılaşmaya yönelmeleri ölçmeleri anlamını taşır; varlıkları multipotent kök hücrelere bağlıdır. Koşullanmış öncü hücreler humoral ve stroma kaynaklı faktörlere yanıt verebilirler, dolaşımdaki hücre sayılarından da etkilenebilirler (ör eritropoez, granulopoezin düzenlenmesinde dolaşımdaki hücre sayıları önemlidir). Bu düzenleyici faktörler, HKHlere yakın yerleşimli hücrelerden kaynaklanır. HKH farklılaşmasında mikroçevre önemlidir. Erişkin insanda bu çevre temel olarak kemik iliğindedir.

### **Farklı Serilere Özgün Hematopoez**

**Miyelopoez** (Eritrosit, granulosit, trombositler gibi miyeloid seri hücrelerin gelişimi), miyeloid progenitör aşamasında büyüme faktörlerince kontrol edilir. Farklılaşma başlayınca kendilerini yenileme kapasiteleri azalırken hücre bölünme kapasiteleri artar ve bazı hematopietik büyüme faktörleri için reseptörler sergilemeye başlarlar. "Stem Cell Factor" (SCF, c-KIT ligandı) ve Interlökin (IL)-3 gibi bazı büyüme faktörleri çeşitli öncü hücrelerde etkili olurken Eritropoietin(EPO), Trombopoietin (TPO), granulosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF) ise sadece belli seri hücrelerinde etkili olur. EPO, öncelikle böbrek interstisyumundan salgınır ve erken eritroid öncülerin gelişiminde önemli rolü vardır; oksijen düzeyine duyarlıdır ve "Hipoxia Inducible Factor", HIF aracılığıyla dokuya taşınan oksijen azaldığında EPO artar. TPO, megakaryositer seri için önemlidir. Kc parankimi, endotelial hücreler ve kemik iliğindeki stromal hücrelerden sekresyonunda etkili olan faktör, dolaşıma trombosit sağlayan megakaryosit

öncüleri ve dolaşımdaki trombositler arasında TPO için olan yarışır. Her ikisinde de TPO reseptörleri bulunur ve trombosit sayısı azalınca artan serbest TPO öncü hücrelerdeki reseptörlere bağlanarak onları uyarır. Trombositlerin dalağın büyümesi sonucunda orada sekestre olması ise gerçek bir trombosit eksikliği olmadığından serbest TPO düzeyinde artış görülmez. G-CSF, makrofaj, endotelial hücre ve fibroblastlardan salınabilir. IL-1, TNF gibi enflamatuvar sitokinler G-CSF artışına ve nötrofil sayısında artışa sebep olur. Her üç sitokin de JAK-STAT, Ras ve AKT yolları ile hücreleri uyarır ve yaklaşık 10 gün içinde öncüler farklılaşmaya yönelerek hücre sayılarında artış sağlar.

Granulositer, Eritroid, Monositler ve Megakaryositer koloniler oluşturabilen birim (CFU-GEMM), tanımlanmış en erken eritroid koloni olan Burst Forming Unit (BFU- E) oluşmasını sağlar. BFU-E, üzüm salkımına benzeyen ve 1-16 koloniden oluşan ve az sayıda EPO reseptörü içeren ve hemoglobin içeriği nedeni ile renkli olarak görülen kümeler oluşturur. BFU-E'ler, IL-3, GM-CSF, TPO, KIT ligand etkisi ile çok sayıda EPO reseptörü bulunan ve EPO ya bağımlı olan CFU-E lere dönüşür. EPO, CFU-E lerin kemik iliğinde tespit edilebilen en genç **eritroid** hücre olan pronormoblastlara farklılaşmasını sağlar. Büyük ve bazofilik sitoplazması olan bu hücreler, EPO etkisi ile içerdikleri çok sayıda polizom (hemoglobin sentez yeri) sebebi ile sitoplazması daha koyu boyanan bazofilik normoblastlara dönüşür. Takiben polizomların azalması ve Hb nin hücrede birikmesi ile karakterize olan polikromatofilik eritroblastlar; onların da farklılaşması ve polizomların kaybı ile artık sitoplazmada bazofilik göstermeyen normoblastlar oluşur. Farklılaşma sürerken çekirdeğin kaybı ile poliribozomdan zengin olan retikulositler; onların dolaşıma katılması ile de olgun eritrositler ortaya çıkar

**CFU-GEMM den nötrofil, monosit, eozinofil, bazofillerin** oluşması GM-CSF ve G-CSF, Makrofaj-CSF(M-CSF), IL-3, IL-5, IL-11, ve Kit-ligand etkisi ile gerçekleşir. Granulosit-monosit kolonileri oluşturabilen birimden(CFU-GM), GM-CSF etkisi ile nötrofil ve makrofajlara farklılaşma sağlanırken; G-CSF nötrofillerin; M-CSF, monositlerin farklılaşmalarını sağlar. Eozinofil gelişimi için GM-CSF, IL-5, IL-3 gerekli iken bazofille farklılaşma için IL-3 ve kit ligandın gerekli olduğu bilinmektedir. Granulopoez olarak adlandırılan sürecin belirlenebilen ilk hücresi, ince yaygın olarak dağılmış kromatin parçacıkları içeren soluk bir çekirdeğe sahip miyeloblastlardır. Hidrolitik ve sindirimsel enzimler içeren azurofilik granüllerin artması ve sitoplazmanın bazofilik rengi bu hücrelerin promiyelosit evresine geçtiklerinin işaretleridir. Promiyelositlerin neutrofilik-eozinofilik-bazofilik miyelositler olarak mı yola devam edecekleri çevresel etkiler ile kontrol altındadır (son görüşler göre bu daha en başından bellidir). Miyelositlerin en önemli özelliği alt tiplerine göre azurofilik granüller yanı sıra içerdikleri özgün granüllerin varlığıdır. Nötrofiller, bakteriyel proteinleri parçalayabilen proteolitik enzimler, hücre duvarına etkili lizozim ve bakterileri öldürebilecek toksik oksijen radikalleri oluşturabilen miyeloperoksidazdan zengindir. Bazofillerin granülleri hasar veya efsiyon alanında yangısal yanıtı kolaylaştıran histamin ve diğer pro-enflamatuvar ajanlardan zengindir. Eozinofillerin granülleri içerdikleri katapsin ve diğer toksik proteinler ile parazitik enfeksiyonlar ile başa çıkmayı kolaylaştırırlar. Miyelositleri takiben oluşan metamiyelositlerin çapı küçülür. Olgunlaşmaya devam eden her alt grubun çekirdeği de kendine özgü bir şekil almaya başlar. Nötrofillerde 2-3 loblu segmentli; eozinofillerde genellikle böbreğe benzer tek loblu; bazofillerde 2 loblu çekirdekler oluşacaktır.

**Monopoezin** son ürünleri monosit ve makrofajlardır. Bu serinin tespit edilebilen en erken hücresi olan monoblastlar, miyeloblastlara benzer ve ayırt edilmeleri genellikle mümkün olmaz. M-CSF etkisi ile promonositlere dönüşürler. Promonositlerin bazofilik sitoplazmaları ve gevşek yapıdaki kromatin ve nukleollerini olan ve ufak bir çıkıntı içermesi ile karakterize büyük bir çekirdekleri bulunur. Granüllü endoplazmik retikulum sayısında artma, golgi kompleksinin büyümesi olgun monositlere dönüşümün işaretleridir. Monositler dolaşıma geçtikten sonra, akciğer, böbrek gibi çeşitli dokulara yönelerek makrofajlara dönüşürler.

**Megakaryopoezin** erken dönemlerinde GM-CSF, IL-3, IL-6, IL-11, Kit ligand ve TPO etkili olurken, Trombositlerin dolaşıma salınması TPO ve IL-11 etkisi ile gerçekleşir. Bu serinin tespit edilebilen en erken hücresi megakaryoblast, çok sayıda nukleol içeren böbrek şeklinde bir çekirdeği olan ve bazofilik sitoplazması bulunan büyük bir hücredir. TPO etkisinde endomitoz denen bir işlem ile megakaryoblastlar bölünmeden DNA'ları replike olur ve poliploid promegakaryositlere dönüşürler. Farklılaşma sürerken oluşan megakaryositler, çok sayıda mitokondri, granüllü endoplazmik retikulum ve trombositlerde görülen granüllerin kaynağı olan büyük golgi cisimcikleri içerir. Megakaryositlerin proplatelet denen sitoplazmik çıkıntıları bulunur. Bu çıkıntılar, sinusoidal endotelial hücreler arasından geçerek taşıdıkları terminal aktin filamentleri ve mikrotübüller aracılığı ile gövdeden ayrılarak sinusoidlerde trombositler olarak dolaşıma katılırlar.

**Lenfopoez** süreci miyelopoezden biraz daha karmaşıktır. Bu gelişim hem progenitörler düzeyinde Kemik iliğinde hem de olgun lenfositler düzeyinde sekonder lenfoid organlarda gerçekleşir. Lenfoid potansiyeli olan erken progenitörler, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15 ve kısmen de IL-4, IL-10 IL-13, IL-14, IL-16 gibi büyüme faktörlerinin etkisi ile T, B, NK hücrelere farklılaşır. Bazı lenfoid progenitörler kemik iliğinde kalarak B hücrelere farklılaşır. Burada Ig ağır zincir gen düzenlenmesi (rearanjman) ve kappa - lambda hafif zincirlerinin salınımı gerçekleşir ve IgM, IgD ifade edebilen naif B hücreler oluşur. Kemik iliğinden çıkan bu hücreler, antijenle karşılaştıklarında hafıza hücrelerine ya da kısa ömürlü plazma hücrelerine dönüşebilirler ancak çoğu lenf nodlarındaki germinal merkeze yönelir. Bir kısmı burada ölür, kaliteli antikor üretebilenler ise yaşar ve diğer tip Ig leri de sentezleyecek bir dönüşüm geçirirler; germinal merkezden çıkarak ya hafıza hücreleri oluşturur ya da kemik iliğine yerleşecek olan plazma hücrelerine dönüşürler.

Lenfoid progenitörlerin bir kısmı, Timusa hareket eder ve T progenitörlere dönüşür ve T hücre reseptör (TCR) genleri düzenlenir. MHC moleküllerince sunulan antijenleri TCR aracılığı ile ve orta düzeyde tanıyabilen T hücreler yaşarken (pozitif seçim);

kuvvetli bağ oluşturan ya da bağ oluşturmayanlar timusta ölür (negatif seçim) ki bu otoimmunitiyi önleyen en önemli adımdır. Timustan çıkan T hücrelerin çoğu TCR alfa-beta ve CD4 ya da CD8 molekülünü taşırlar. Bu hücreler antijenle karşılaştıklarında aktive olur, büyür ve bölünmeye başlarlar. Aktive olan T hücreler ya antijene özgün efektör hücrelere veya hafıza hücrelerine dönüşürler. Timustaki progenitörlerin az bir kısmı ise TCR gama-delta ifade eder ancak yüzeylerinde CD4 ya da CD8 bulunmaz; bu hücreler deri ya da barsaklara yerleşme eğilimindedir.

Doğal Öldürücü Hücreler(NK hücreler), Lenfoid öncülerden IL-15 etkisi ile farklılaşırlar ve çevresel lenfoid dokulara yönelirler. Yüzeylerinde yer alan aktive edici ya da inhibitör reseptörler aracılığı ile virüsle enfekte olmuş ya da normalden farklı yüzey antijenleri bulunan diğer hücreler ile etkileşerek ya da sitokinler aracılığı ile uyarılırlar ve taşıdıkları azurofilik granüllerden salınan ve hedef hücrenin ölümüne sebep olacak mediatörler salgırlarlar.

Tespit edilebilen en genç lenfoid hücreler lenfoblast olarak adlandırılır ve büyük, tek çekirdekli olan bu hücreler prolenfoblastlara dönüşmeden önce en az 2 kez bölünürler. Prolenfoblastlar, lenfositlere dönüşürken çapları küçülür, çekirdekteki kromatin yoğunlaşır, nukleol görünmez olur. Lenfositlerin bir kısmı timusa yönelirken (T lenfositler); bir kısmı da Kemik iliğinde eğitimine devam eder (B hücreler)

Hematopoiezin çeşitli evrelerinde yer alan hücrelerin tanınmalarını kolaylaştıran karakteristik morfolojik özellikleri olduğu gibi; ifade ettikleri farklı yüzey antijenlerine bağlı olarak değişen immunfenotipik özellikleri de tanımlanmalarında büyük öneme sahiptir. Hücreler gelişimleri sürecinde bazı yüzey antijenlerini kazanırken bazılarını da kaybederler, seriye özgün olduğu bilinenler ise farklı yoğunlukta olsa da gelişim süresi boyunca ifade edilmektedir (ör: CD19 B hücre, CD3 T hücre için karakteristik olan yüzey antijenleridir).

İlginç olarak, Hematopoietik kök hücrelerin ortak(common) miyeloid (CMP), ve ortak lenfoid progenitörlere(CLP) farklılaştıkları ifade edilse de; son yıllarda hücre kültürü ve gen ifadeleri belirlenerek yapılan pek çok çalışma aslında bu hücrelerin unipotent olduklarını ve en başından itibaren hangi hücreye dönüşeceklerinin belli olduğunu ortaya koymaktadır.

### **Hematopoezde Transkripsyon Faktörlerinin Önemi**

Hematopoez sürecinde hangi hücrenin gelişeceğini belirleyen faktörler için tanımlanmış iki model mevcuttur. İlkine göre hücreyi yönlendiren mikroçevresidir. Bu modeli destekleyen bazı veriler mevcuttur; örneğin Notch sinyal yolağının aktive olması T hücre gelişimini uyarırken Notch sinyali yoksa B hücreler gelişir. İkinci model ise bu seçimin rastlantısal geliştiğini ve çevredeki büyüme faktörlerinin ne kadar etkili oldukları ile ilişkili olduğunu öne sürmektedir ve özellikle miyelopoez için geçerlidir.

Her iki modelde de farklılaşmayı yönlendiren bazı genler aktif duruma geçmektedir. Gen ifadesini kontrol eden bazı transkripsyon faktörleri ve DNA ile etkileşime giren bazı proteinlerin önemi gösterilmiştir (şekil 5). Örneğin PAX5 kaybı, B hücre gelişimini engellerken diğer hücre serileri etkilenmez; Notch1 kaybı ise özellikle T hücrelerin gelişimini; C/EBPα granulositopoezi engeller. MLL gibi bazı genler ise erken hematopoietik hücrelerde etkili olduklarından tüm hücre serilerini etkileme özellikleri bulunur. Bazı faktörler ise hücrelerin olgunlaşma döneminde önem kazanır. Örneğin BCL6, antijenle uyarılmış B hücrelerin germinal merkezdeki hücrelere evrilmelerini engelleyen bir transkripsyon faktörüdür.

Çeşitli hematolojik malinitelerde farklılaşmayı kontrol eden bu transkripsyon faktörlerindeki mutasyonlar dikkat çeker. Örneğin PAX5 deki bir mutasyon, erken B hücreli lösemiye sebep olabilirken; BCL6 mutasyonu, germinal merkezdeki B hücrelerden kaynaklanan tümörlere sebep olur. Oluşan mutasyonlar, genellikle büyüme faktörü olmadan da sinyal iletimine ve kontrolsüz hücre çoğalmasına sebep olurlar

### **Özet**

Kan hücrelerinin üretilmesi sürecini tanımlayan hematopoez, ekstresek (Hematopoietik büyüme faktörleri ve mikro çevrede yer alan faktörler) ve intrinsek faktörler (Büyüme faktörü reseptörleri ve hematopoietik transkripsyon faktörleri) arasındaki hassas dengeyle ilişkili bir yol izlemektedir.

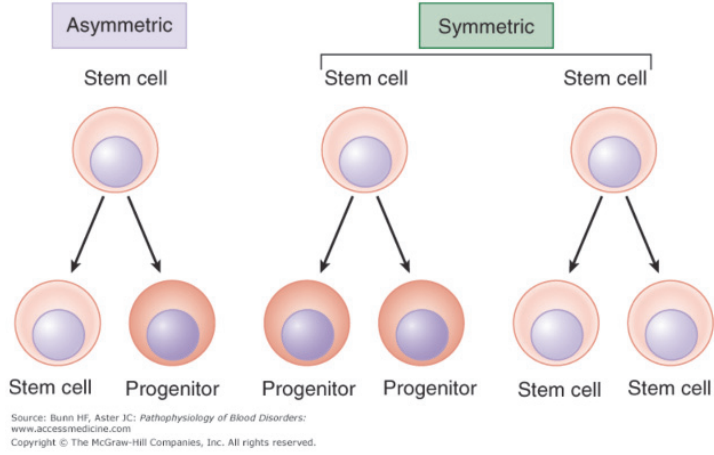
Doğumda ve sonrasında hematopozin merkezi kemik iliğidir, ihtiyaç durumunda ekstra meduller hematopoez görülebilir

Hematopoietik kök hücrelerin varlıklarını sürdürmeleri ve yenilenmeleri, farklılaşmaları özelleşmiş bir mikroçevrede gelişir

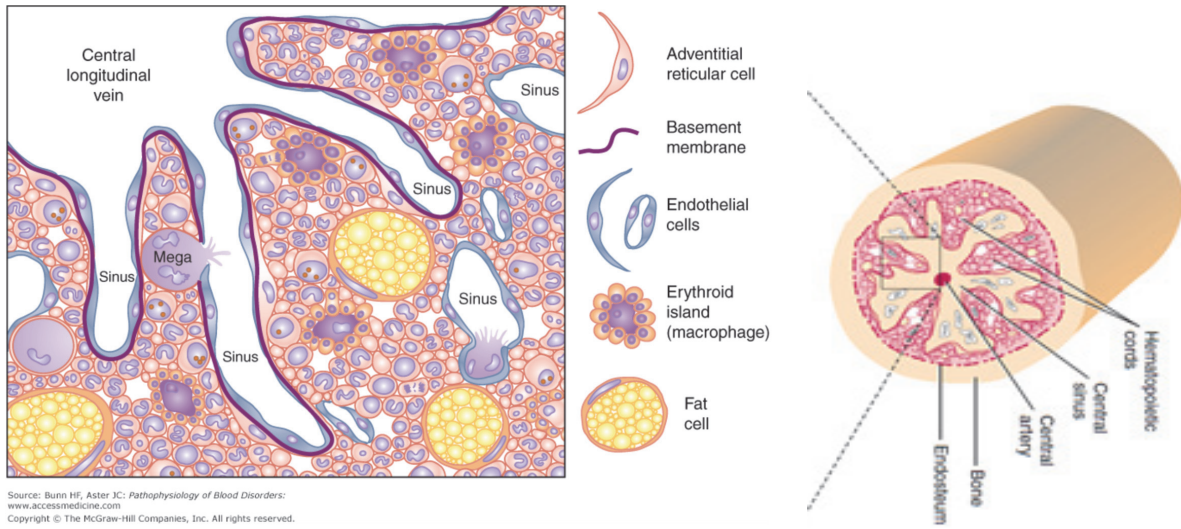
Hücreler olgunlaştıkça morfolojik bazı değişiklikler gösterirler. Özetle: Hücre çapı küçülür, çekirdek küçülür, nukleol kaybolur, nuklear kromatin organize olarak yoğunlaşır, sitoplazmadaki bazofili (mavi renk) azalır. Oluşan hücrelerin fenotipik özellikleri de değişir.

HKH'lerin devamlılığı, çoğalması, farklılaşması ve erken ölümlerinin engellenmesi çeşitli sitokin ve büyüme faktörlerinin kontrolü altındadır. Sitokinler: Interlökinler (IL), Koloni uyarıcı faktörler (CFU), kemokinler, interferon ve diğer faktörleri kapsar. Hücre serilerine özel olanlar ve birbirlerine bağımlı olanlar söz konusudur.

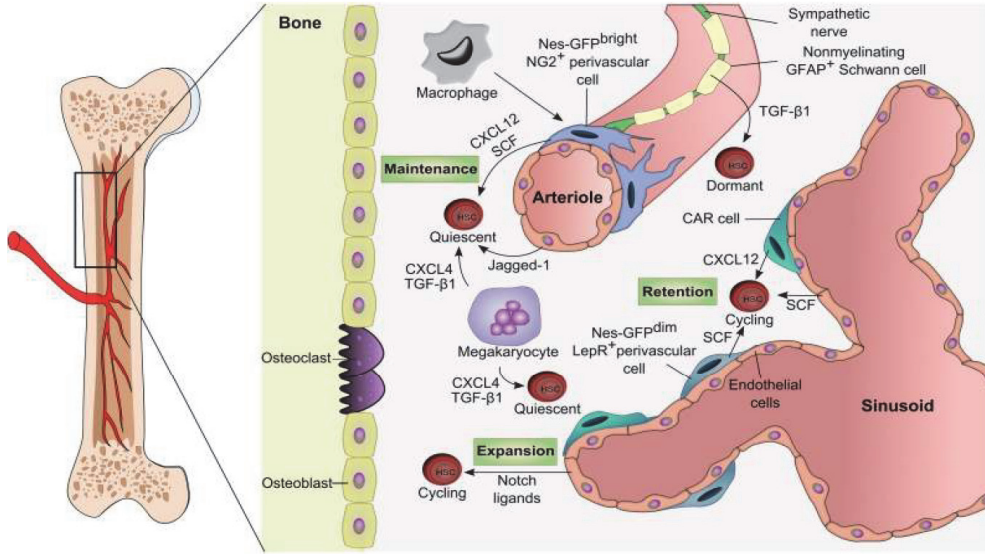
Hematopoezin henüz aydınlanmamış ya da tartışmalı olan çeşitli basamakları mevcuttur; bunların aydınlatılması hematolojik maliniteler ve pek çok diğer hastalıkta hücresel tedaviler, hedeflenmiş tedaviler için umut olacaktır ve bu konuda sürmekte olan pek çok araştırma mevcuttur.



**Şekil 1:** Hematopoietik Kök Hücrenin Simetrik ve Asimetrik Bölünmesi  
**Kaynak:** Bunn H, Aster JC. *Pathophysiology of Blood Disorders*; 2011

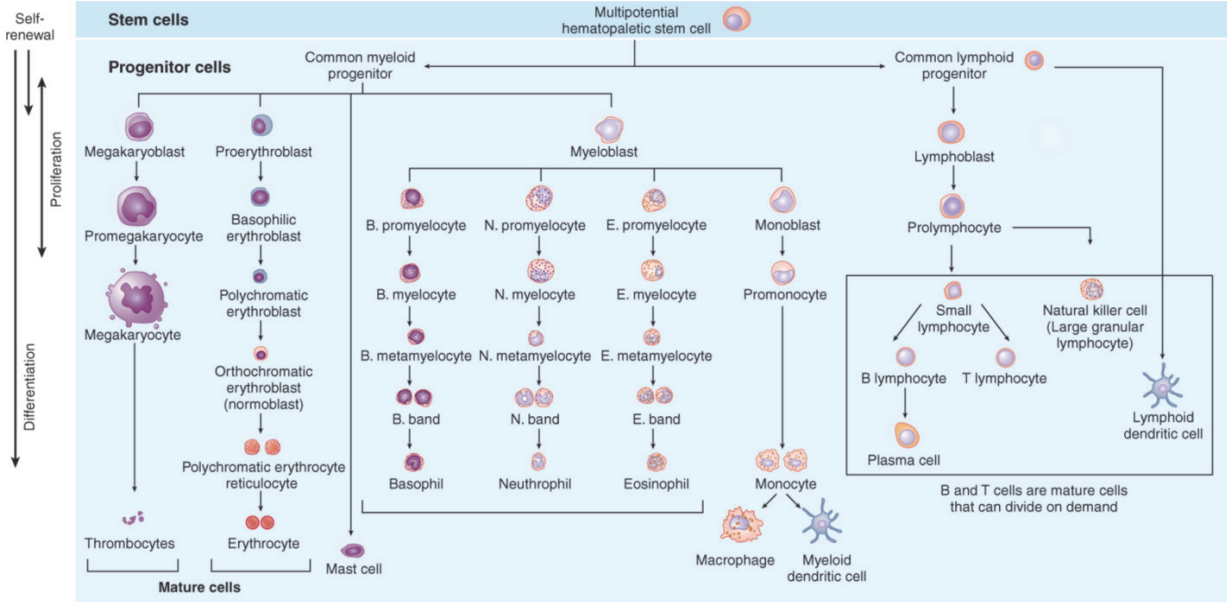


**Şekil 2:** Hematopoietik Kord ve Vasküler Sinüsün Grafik Görünümü  
**Kaynak:** Bunn H, Aster JC. *Pathophysiology of Blood Disorders*; 2011



**The adult bone marrow HSC niche.** The vasculature has emerged as a key structure for the maintenance of HSCs in the bone marrow. Dormant HSCs are found around arterioles where factors such as CXCL12 and SCF secreted by perivascular, endothelial, Schwann, and sympathetic neuronal cells promote their maintenance. Less quiescent or activated HSCs are located near sinusoidal niches which are likely diverse in their influence for self-renewal, proliferation, and differentiation. Hematopoietic cells such as macrophages or megakaryocytes are examples of HSC-derived progeny that can feed back to the niche to influence HSC migration or proliferation. GFAP, glial fibrillary acidic protein; TGF- $\beta$ 1, transforming growth factor beta-1.

**Şekil 3. Kemik iliğindeki Endosteal ve Vasküler(perisinusoidal ve periartreiyolar) Nişler**  
**Kaynak.** Boulais PE, frenette PS. *Blood* 2015 125(17) 2621-2629

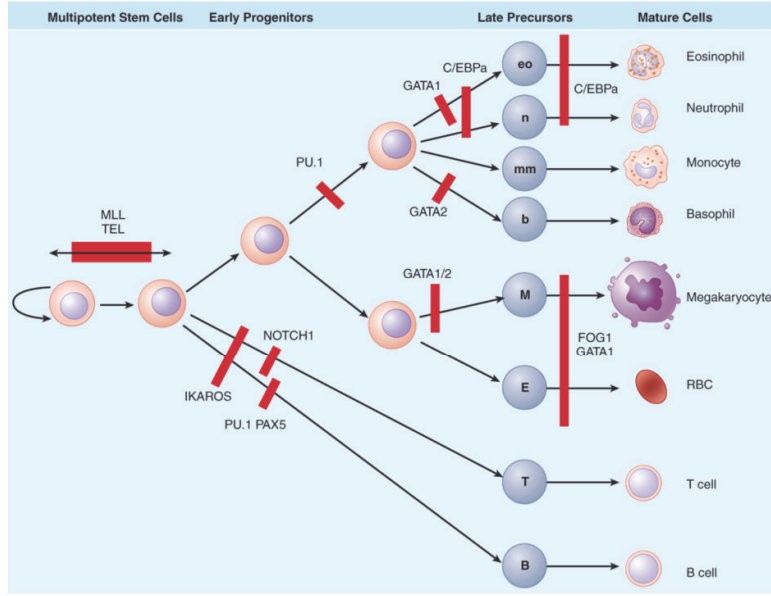


Source: Bunn HF, Aster JC. *Pathophysiology of Blood Disorders*; www.accessmedicine.com  
 Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

The hierarchy of hematopoietic cells. Self-renewal is confined to true multipotent hematopoietic stem cells, which lie at the top of the hierarchy, giving rise to all of the cells of the myeloid and erythroid lineage. Immature myeloid cells and both immature and mature lymphoid cells are capable of cell division.

**Şekil 4: Hematopoietik Hücrelerin Gelişim Evreleri**  
**Kaynak:** Bunn H, Aster JC. *Pathophysiology of Blood Disorders*; 2011





Source: Bunn HF, Aster JC. Pathophysiology of Blood Disorders; www.accessmedicine.com Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

Hematopoietic transcription factors. Deficiencies of the indicated transcription factors block hematopoiesis at junctures indicated by the red lines in 'knockout' mice.

**Şekil 5. Hematopoietik Transkripsyon Faktörleri**  
**Kaynak.** Bunn H, Aster JC. *Pathophysiology of Blood Disorders*; 2011

## K-2

### TAM KAN SAYIMI, OLGULAR İLE VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

**Burcu BARUTÇUOĞLU**

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Biyokimya Bilim Dalı, İzmir

Tam kan sayımı kırmızı kan hücreleri (RBC), alt gruplar ile birlikte beyaz kan hücreleri (WBC) ve trombosit sayımını içeren çok kanallı otomatik cihazlar kullanılarak yapılan bir dizi ölçümdür.

Tam kan sayımının; anemiler, hemoglobinopatiler, kemik iliği yetmezliği, nutrisyonel eksiklikler, trombositopeniler, otoimmün bazı hastalıklar, enfeksiyonlar ve maligniteler gibi birçok önemli hastalıkta; tanı, hastalık izlemi prognoz ve tedavi izleminde, ilaçlara yanıt ve kemoterapi etkinliğini değerlendirmede önemli yeri vardır.

RBC, WBC ve trombosit sayımı dışında; eritrosit indeksleri [Wintrobe indeksleri: ortalama eritrosit hacmi (MCV), ortalama eritrosit hemoglobini (MCH) ve ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (MCHC)], hemoglobin, hematokrit ölçümü, WBC differansiasyonu (nötrofil, eozinofil, lenfosit, bazofil ve monosit), çekirdekli eritrosit (NRBC) sayımı, retikülosit sayımı ve eklenebilecek slide hazırlayıcılar ile periferik yayma da yapılabilmektedir.

Tam kan sayımı ölçümlerinde K2/K3 EDTA'lı kan, ideal örnek olup, çalışma 4 saat içinde tamamlanmalıdır. Çalışma süresi 4 saati geçen örnekler 2-8°C'de saklanmalı, analiz edilmeden önce 15 dak oda sıcaklığında bekletilmeli, 2 dak mixerda döndürdükten sonra çalışılmalıdır.

Çeşitli marka ve model tam kan sayımı cihazlarında temel olarak kullanılan ölçüm yöntemleri başlıca; elektriksel impedans, ışık saçılımı, ve redyofrekans iletkenliktir.

Son yıllarda gelişen teknolojiler ile immatür retikülosit fraksiyonu, retiküle trombositler, immatür granülositler, NRBC, RBC fragmanları, retikülosit hemoglobini gibi yeni tam kan sayım analizörü parametreleri ile çeşitli hastalıklar ile ilgili daha detaylı bilgiler sağlanmaktadır. Örneğin; retikülosit hemoglobin düşüklüğü demirden fakir eritropoez tanısında, RBC fragmanlarının varlığı mikroanjiyopati tanı ve takibinde, immatür retikülosit fraksiyonu anemilerin sınıflandırmasında, retiküle trombositler trombositopeni ayırıcı tanısında, NRBC akut hemoliz, şiddetli hipoksik stres ve hematolojik malignitenin bir sonucu olarak oluşan eritropoietik aktivitedeki aşırı artışların tanısında kullanılır. Ancak günümüzde, yeni tam kan sayım parametrelerinin hasta yararına kullanımı yeteri kadar yaygınlaşmamıştır.

# K-3

## KOAGÜLASYON ve FİBRİNOLİZ İLE İLGİLİ TESTLER

Güneş BAŞOL

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Biyokimya Bilim Dalı, İzmir

### Fizyolojik Hemostaz

Hemostaz, vasküler bir hasar sonrasında pıhtılaşma sistemi tarafından kan kaybının sınırlandırıldığı fizyolojik bir süreçtir. Kan damar duvarının bütünlüğü bozulduğunda, hemostatik cevabın hızlı, lokalize ve iyi düzenlenmiş olması gerekir.

Fizyolojik hemostatik sistem iki temel kısımdan oluşur:

1. Hücresel komponent: trombositleri ve endotel hücrelerini; ayrıca nötrofil ve monositleri içerir.
2. Plazma proteinleri: koagülasyon sistemi, fibrinolitik sistem ve doğal antikoagülan protein sistemlerinden oluşur.

Trombin ile uyarılan fibrin pıhtı oluşumu (koagülasyon sistemi) ve plazmin ile uyarılan pıhtı çözünmesi (fibrinolitik sistem) birbiri ile bağlantılı ve dikkatle düzenlenen yollardır. Bu yollar bir uyum içinde çalıştığı zaman kanamayı durdurmak için önce pıhtı oluşur, ardından pıhtı çözünür ve doku tamiri meydana gelir. Antikoagülan sistemin rolü ise koagülasyon ve fibrinolitik sistemlerdeki enzimlerin aktivitesini sonlandırmak ve böylece uygunsuz pıhtı ya da kanama oluşumunu engellemektir. Bu üç protein sistemi vasküler duvar endoteli ile birlikte hassas bir denge içinde hemostazı sağlar. Bu süreçlerdeki spesifik elemanlardan birinin eksikliği veya disfonksiyonu söz konusu olduğunda anormal kanama veya tromboz görülebilir. Trombin oluşumu azaldığında (ör: FVIII eksikliği) veya pıhtı çözünmesi arttığında (ör: alfa-2-antiplazmin eksikliği) anormal kanama görülebilirken; aşırı trombin oluşumu (ör: kalıtsal trombofili) tromboza neden olabilir.

Fizyolojik hemostaz serin proteazlarına dönüşen çeşitli zimojenlerin aktivasyonunu ve amplifikasyonunu içeren bir sistemdir. In vivo olarak normal pıhtılaşma, yeterli miktarda doku faktörü-TF/FVIIa'nın, FIX'u aktive etmesiyle başlar. Ardından FIXa, FVIIIa'nın varlığında, FX'u aktive eder. FXa ise, FVa varlığında, protrombini trombine aktive eder. Oluşan trombin fibrin pıhtı oluşumunu uyarırken, bir yandan da pozitif feedback ile FV, FVIII ve FXI'i aktive eder. FXI'in aktivasyonu, ilave FIX aktivasyonuna neden olur. Böylece koagülasyon sistemi amplifiye olur.

### Klinik Laboratuvar Hemostaz:

Fizyolojik hemostazın temelini anlamak önemlidir ancak klinik laboratuvar yöntemleri koagülasyon kaskadı hipotezine dayanır. Koagülasyon testleri fizyolojik hemostazı tam olarak göstermese de kanama bozukluklarının tanısında çok faydalıdır. FXI, aPTZ ölçümünde olduğu gibi in vitro koşullarda FXIIa tarafından aktifleşse de, bu yolun normal fizyolojik hemostaza katkıda bulunmadığı düşünülmektedir. Benzer şekilde TF/FVIIa, PZ testinde olduğu gibi suprafizyolojik konsantrasyonlarda TF'nün uygulandığı in vitro koşullarda, direkt olarak FX'u aktive edebilirken, normal fizyolojik koşullarda bu reaksiyon pıhtı oluşumuna belirgin bir katkıda bulunmamaktadır.

### Koagülasyon Bozuklukları için Tarama Testleri:

**Örnek ile ilişkili durumlar:** Koagülasyon testlerinin analizinde kullanılması önerilen antikoagülan %3.2'lik sodyum sitrattır. Sodyum sitrat, kalsiyumu bağlayarak koagülasyon proteinlerinin aktivasyonunu engeller. Tüpün içerisindeki antikoagülan/tam kan oranı 1/9 olmalıdır. Örnekler oda sıcaklığında 1500 g'de en az 15 dakika santrifüj edilmelidir. Kan alındıktan sonra plazmanın PZ için 24 saat içinde; aPTZ için 4 saat içinde test edilmesi gerekir. Soğukta F7 aktive olacağından hemen çalışılmayacak olan plazmalar oda sıcaklığında ve ağzı kapalı bir şekilde saklanmalıdır.

**Aktive Parsiyel Tromboplastin Zamanı (aPTZ):** aPTZ testi uygulanırken negatif yüklü yüzey, fosfolipid ve antikoagülanlı hasta plazması karışımı belirli bir süre inkübe edilir. İnkübasyon sonrasında ortama CaCl eklenecek, pıhtı oluşumu için gereken süre ölçülür. aPTZ, intrinsek sistem ve ortak yoldaki koagülasyon proteinlerini değerlendirmede kullanılır. Reaktiflerin içerisinde reaksiyonun hızını arttıran negatif yüklü yüzey bulunduğu için testin adı "aktive" PTT'dir.

**Protrombin Zamanı (PZ):** PZ testi uygulanırken, doku tromboplastini (rekombinan insan veya izole hayvan doku faktörü), CaCl ve hasta plazması karışımı belirli bir süre inkübe edilir; pıhtı oluşumu için gereken süre ölçülür. PZ, ekstrinsek sistem ve ortak yoldaki koagülasyon proteinlerini değerlendirmede kullanılır. PZ sonuçları saniye, protrombin oranı (normalin %si) ve INR (international normalized ratio) olarak rapor edilir. Protrombin oranı, hasta PZ'nin sağlıklı erişkin popülasyon PZ'lerinin geometrik ortalamasına bölünmesi ile elde edilir. INR ise protrombin oranı üssü ISI (international sensitivity index) değeridir.

INR oral antikoagulan tedavi izleminde kullanılırken, oral antikoagulan kullanmayan bir hastada hemostazın değerlendirilmesinde sn cinsinden PZ değerleri kullanılmalıdır.

**Trombin Zamanı:** Trombin zamanı testi uygulanırken, hasta plazmasına pürifiye eksojen trombin eklenir ve pıhtı oluşumu için gereken süre ölçülür. Fibrinojen fonksiyonunun direkt göstergesidir. Fibrinojen fonksiyonundaki bir defekti ortaya çıkarmak için kullanılabilir. Trombin zamanı, hipofibrinojenemik durumlarda, disfibrinojenemi varlığında veya hasta plazmasında trombin inhibitörünün bulunduğu durumlarda (heparin, heparin benzeri bileşikler, direkt trombin inhibitörleri) uzar.

## K-4

### HEMATOLOJİK HASTALIKLARIN TANI VE İZLEMİNDE MOLEKÜLER TESTLER

Giray BOZKAYA

Sağlık Bilimleri Üniversitesi İzmir Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İzmir

Dinamik bir süreç olan kan hücrelerinin yapım ve yıkımı normalde sıkı bir kontrol altındadır. Kan hücrelerinin yapılmasından sorumlu olan kemik iliğindeki öncül hücrelerin farklılaşma ve çoğalmaları arasındaki dengenin bozulması kanser gelişimine yol açar.

Hematolojik malignitelerin tanısının konulması, tedavi yönteminin seçilmesi, tedaviye yanıtın gösterilmesi ve prognozun belirlenmesinde günümüzde moleküler testlerin kullanımı giderek artmaktadır. Kullanılan bu moleküler testler, PCR temelli testler olup, farklı hastalıklarda farklı moleküler yöntemler uygulanabilmektedir. Bazı hematolojik malignitelerde klasik PCR ve jel elektroforezi ile tanı konabilirken, diğerlerinde Real Time PCR gerekli olmaktadır. Bunlara ek olarak DNA dizi analizi de etkin kullanılmakta olup, artık Yeni Nesil Dizi Analizi giderek yaygınlaşmaya başlamıştır.

Kullanılan yöntemlere en iyi örnek olarak KML hastalarının teşhis ve tedavi takibinde kullanılan yöntemler verilebilir. Real Time PCR yöntemi ile bcr-abl transkript oranının gösterilmesi KML hastalarının teşhisi yanında yapılan tedaviye yanıt da izlenebilmektedir. Dizi analizi yöntemi ile tedavide kullanılan tirozin kinaz inhibitörlerine direnç gelişimi belirlenebilmekte ve bu sayede tedavi için başka bir tirozin kinaz inhibitörüne geçiş yapılabilmektedir. Yeni Nesil Dizi Analizi ise hematolojik malignitelerde artık birden çok genin incelenebilmesine olanak sağlamakta, kullanılacak ilaç tipinden hastalığın prognozuna kadar hasta hakkında bilgiler içeren veriler elde edilebilmektedir.

## K-5

### LABORATUVAR HEMATOLOJİSİNDE KALİTE GÜVENCESİ

Tamer C. İNAL

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Adana

Klinik laboratuvarların tamamında olduğu gibi, hematoloji laboratuvarlarında da, hastaya yararlı sonuç üretebilmek için tüm süreçlerde kalite güvencesinin temin edilmiş olması esastır. Analiz öncesinde oluşabilecek yanlış örnek, yanlış tüp, yanlış antikoagülan, yanlış hasta gibi hata kaynaklarının yanı sıra biyolojik varyasyonların dikkate alınmaması ile ilgili de hatalı sonuçlar elde edilmesi mümkündür. Fizyolojik faktörler ölçümü yapılacak her bir parametre için ayrı ayrı belirlenmeli, teste göre yaş ve cinsiyete uygun referans aralıkları kullanılmalıdır. Analiz sırasında kullanılan yöntem, yöntemin çalışma prensibi, etkilendiği faktörler ve altta yatan diğer patolojilere bağlı oluşabilecek interferanslar da test sonuçlarını etkileyecektir. Örneğin tam kan sayımı için elektriksel impedans, radyofrekans iletkenliği, ışık saçılımı ve sitokimya yöntemleri kullanılabilir. Sistemler bazı sayım ve ölçümleri direkt yapıp bazı diğerlerini ise hesaplama yöntemiyle bulabilmektedir. Bu nedenle bir test sonucundaki yanlış ölçüm diğer hesaplanan testlerde de yanlışlığa yol açabilmektedir. Tüm hataların yaklaşık %70'ini oluşturan preanalitik hataların doğru kurgulanmış bir izlem ile azaltılması mümkündür. Hata kaynaklarının belirlenmesi, en sık tekrarlayan hataların tespiti, bunların analizinin yapılması ve önlemlerinin belirlenmesi aşamaları uygulandığı takdirde hatalar azaltılabilmektedir. Bunu sağlamak için doğru kalite göstergelerinin seçilmesi gerekmektedir. Tüm bu gereksinimler yerine getirildiğinde bile, sonuçların bizzat biyokimya uzmanı tarafından değerlendirilmesi, "klinik tablo-laboratuvar sonucu" ilişkisinin yorumlanması kalite güvencesinin önemli bir bölümünü teşkil etmektedir. Klinisyen-laboratuvar uzmanı iletişiminin geliştirilmesi, hem laboratuvar çalışanlarına hem de klinisyenlere bu konular ile ilgili sürekli eğitimlerin verilmesi, laboratuvar çalışanlarının düzenli ve programlı bir şekilde yetkinlik değerlendirmelerinin yapılması ve laboratuvar işleyişinin bilgisayar kontrollü yapılması ile bu hatalar en aza indirilebilmektedir. Hematoloji laboratuvarlarında uygulanan kalite güvencesi, diğer laboratuvarlardan farklı değildir. Ancak bu sunumda hematoloji laboratuvarlarında sıklıkla kullandığımız tam kan sayımı ve koagülasyon testlerini etkileyebilecek faktörler üzerinde yoğunlaşılacak ve olgu örnekleriyle konu tartışılacaktır.

# K-6

## ANEMİLER: DEMİR EKSİKLİĞİ, MEGALOBLASTİK VE HEMOLİTİK ANEMİLER

Sema GENÇ

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul

Anemi dünyada özellikle gelişmekte olan ülkeleri etkileyen bir halk sağlığı problemidir. Yapılan bir çalışmada; global anemi prevalansının 1.62 milyar insanı etkilediği ( % 24.8 ) ortaya konmuştur. Anemi multifaktöryel olup, tanı için kullanılan cut-off değerleri sadece cins ve yaşa göre değil, etnisite ve fizyolojik duruma göre de değişiklikler gösterir. WHO verilerine göre hemoglobin düzeyinin erkekte 13.0 g/dL, kadında 12.0 g/dL'nin altı anemi olarak tanımlanır.

Çeşitlik kriterlere dayalı anemi sınıflandırmaları vardır. Anemilerin oluşum mekanizmasına göre olan sınıflaması, anemileri kayıp ve yapım azalmasına göre gruplarken, Wintrobe'un ortalama eritrosit hacmi (MCV) göre yapılan sınıflamasında anemiler normositer mikrositer ve makrositer anemiler olarak gruplanır. Diğer bir sınıflama ise retikülosit indeksinin 1.5 'dan düşük veya yüksek olmasına göre yapılan eritrokinetik sınıflandırmadır.

Günümüzde flow cell ve impedans, flow cell ve laser gibi birkaç teknolojiyi birlikte kullanan otomatize kan sayımı cihazları ile konvansiyonel kan sayımı parametreleri dışında, hücre büyüklüğü, iç yapısı, granülerite, çekirdek yapısı ve hücre yüzey yapısı hakkında bilgi sahibi olunmaktadır. Ayrıca çekirdekli eritrositler (NRBC), atipik lenfosit, immatür granülositler gibi tanı değeri yüksek olan hücrelerin kantitatif ölçümleri de gerçekleştirilmektedir. Bu cihazlarla ayrıca anemilerin ayırt edici tanısında ve demir tedavisine yanıtın incelenmesinde retikülosit hemoglobini (Ret-He), % HipoHe, % MikroR gibi 1 yeni kırmızı hücre parametreleri de değerlendirilmektedir.

Dünyada en sık rastlanan nutriyonel hastalık olan demir eksikliği anemisinin endüstrilize olmamış ülkelerde özellikle kadın (%42.3) ve çocuklarda (%39.1) sıklıkla görüldüğü bildirilmektedir. Yaşlılıkta bu oran %45 civarındadır. Demir eksikliğinin anemisinin gelişiminde, bağırsak mukoza hücrelerinde diyetdeki nonhem demiri indirgeyerek enterositlere alınmasını sağlayan divalan metal transporter 1(DMT1), demirin hücre dışına taşınmasını sağlayan ferroportin ve makrofaj ve enterositlerden demirin salınmadan  $Fe^{3+}$  formuna oksitlenip apo-Tf'e bağlanmasını sağlayan hephaestin gibi demir metabolizmasında etkili proteinlerin rolleri vardır. Hepsidin ise, karaciğerde sentezlenen ferroportin'nin hücre membranındaki post-translational ekspresyonunu baskılayarak demirin intestinal absorpsiyonu ve vücuttaki dağılımını regüle eden hormondur. Bu proteinlerin ekspresyonları ve metabolizmanın regülasyonu sistemik düzeyde hipoksi uyarıcı faktör (HIF) ve hücre düzeyinde demir cevap elemanı (IRE) ve demir regülatuar proteinler olarak bilinen IRP-1 ve IRP -2'den oluşur. IRE/IRP etkileşimi ile TfR ve ferritin ekspresyonları kontrol edilir.

İnflamasyon bağlı anemi kronik hastalıklarda ve özellikle yaşlılarda sıklıkla görülen normokrom normositer bir anemidir. Yaşlılık, kanser, romatolojik hastalıklar, kronik infeksiyonlar ve böbrek yetersizliği inflamasyona bağlı aneminin başlıca nedenleridir. Oluşum mekanizmasında, proinflamatuvar sitokinler olan IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 'nin, ferritin, DMT1 ve ferroportin ekspresyonları,  $Fe^{2+}$  iyonun DMT1 ile transmembranal transportu, demirin makrofajlar tarafından alınmasını artırıcı ve bu hücrelerden salınımı bloke edici etkileri önemlidir. IL-6, IL-1 $\beta$  transkripsiyon faktörleri aracılığıyla inflamasyonun etkilerinin gelişen eritroid hücrelerinde görülmesini sağlar. IL-1 $\beta$  ve ciddi enfeksiyonlarda lipopolisakkarit salınımı Toll benzeri reseptörler (TLR-4) üzerinden makrofajlardan IL-6 uyarımını artırarak hepsidin ekspresyonunu uyarır.

İneffektif DNA sentezinin primer sebebinin oluşturduğu megaloblastik anemiler ise özellikle vitamin B12 ve folat eksikliğinde bağlı olarak ortaya çıkar. Bu vitaminlerin alımındaki yetersizlikler, absorpsiyon bozukluğuna sebep olan hastalıklar, metabolizmalarındaki enzim defektleri yetersizliklerine sebep olur. Periferik yaymada makrositoz, ovalositoz, anizositoz, hipersegmente polimorfonükleer hücrelerin bulunması tipiktir.

Sonuç olarak, gelişmiş ülkelerde beslenme koşullarına ve emilim sorunlarına bağlı özellikle yaşlı popülasyonda sıklıkla karşımıza çıkan megaloblastik anemilerin periferik nöropati, Alzheimer tipi demans gibi kişilerin hayat kalitesini etkileyen bulgularla ortaya çıkması, büyüme çağında, süt çocuklarında ve üreme çağındaki kadınlarda sıklıkla karşımıza çıkan demir eksikliği anemisinin erken tanılarının halk sağlığı sorunu olarak ele alınması, tarama testleri ve gıda desteği ile yetersizliklerin ortadan kaldırılması, toplum sağlığı açısından önem taşımaktadır.

# K-7

## HEMOGLOBİNOPATİLER VE TALASEMİLER

Abdullah ARPACI

Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Hatay

Dünya da en yaygın kalıtsal hastalık olan hemoglobinopatilerin tarihçesi 1800'li yıllara dayanmaktadır. Von Jaksch 1889 yılında anemisi, splenomegalisi ve lökositozu olan çocuğu "anemia infantum pseudo-leukemia" olarak tanımlamıştır. Bu klinik durumun lösemiye bağlı olmadığı tespit edilerek "von Jaksch anemisi" olarak tanımlanmıştır. 1910 yılında Herrick tarafından Orak Hücreli Anemi tanımlanmış, talasemi terimini ise 1932 yılında Whipple ve Bardford yayınlarında kullanmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), Herediter Hastalıklar Programı başkanı Bernadette Model ve ekibi 1980'li yıllarda veri toplamaya başlamış, Afrika, Amerika, Avrupa, Orta Doğu Bölgesi, Güney Doğu Asya Bölgesi ve Batı Pasifik bölgesi olmak üzere 6 bölgeden veri toplamışlardır. Hemoglobin bozukluklarının dünya genelinde %5 sıklıkta olduğunu, özellikle Afrika'da daha sık görüldüğünü göstermişlerdir.

Hemoglobinopatiler ülkemizde en sık görülen kalıtsal kan hastalıkları arasında yer almakta olup ülkemizin özellikle güney ve batısında önemli bir sağlık sorunudur. Ülkemizde en sık görülen anormal hemoglobinleri HbS, HbE, HbD, HbC ve HbO Arab oluşturmaktadır. Hemoglobin S (Orak hücre), beta globin zincirinde 6. pozisyondaki glutamik asidin valinle yer değiştirmesiyle ( $\beta 6$  Glu→Val) ortaya çıkmaktadır. Anormal Hemoglobinler içinde de Türkiye'de en sık görülen hemoglobin tipi HbS'tir. Hemoglobin S, beta globin zincirinde 6. pozisyondaki glutamik asidin valinle yer değiştirmesiyle ( $\beta 6$  Glu→Val) ortaya çıkmaktadır. Anormal Hemoglobinler içinde Türkiye'de en sık görülen hemoglobin tipi HbS'tir. Türkiye genelinde sıklık %0,37-0,6 arasında iken, özellikle Çukurova bölgesinde bazı yörelerde bu sıklık %3-44 arasında saptanmıştır. Orak hücre hemoglobinini genetik olarak homozigot durumda taşıyan hastalar için orak hücre anemisi terimi kullanılır.

Türkiye'de beta talasemi taşıyıcı sıklığı %2,1 olup yaklaşık 1.300.000 taşıyıcı ve 4500 civarında hasta bulunmaktadır. Taşıyıcı sıklığı göz önünde bulundurulduğunda, her yıl 300-400 hasta çocuğun dünyaya gelmesi beklenmekte olup bu durum aileleri ve toplumu maddi-manevi zarara uğratmaktadır. Çukurova, Akdeniz kıyı şeridi, Ege ve Marmara bölgelerinde talasemi taşıyıcılığı çok daha sık görülmekte olup bazı yerleşim bölgelerinde taşıyıcılık %10'ları geçmektedir. Otozomal resesif kalıtılan  $\beta$ -talasemide, her gün artmakla birlikte 400' ün üzerinde genetik mutasyon saptanmıştır. Bu mutasyonlar; beta globin proteininin sentezlenememesine ( $\beta^0$ ) ve ağır klinik tabloya neden olmaktadır. Bazıları ise kusurlu protein sentezi( $\beta^+$ ) yaparak nisbeten daha hafif klinik tablo oluşturmaktadır. Diğer mutasyonlar da talasemik hemoglobinler olarak adlandırılan anormal hemoglobinleri oluşturmaktadır (HbE, HbD-Los Angeles, HbC, HbO-Arab gibi).

Alfa talasemiler,  $\alpha$ -globin zinciri sentezinde azalmayla karakterizedir. En sık görülen kusur delesyoneldir, non-delesyonel kusurlar da tanımlanmıştır.  $\alpha$  globin genini ilgilendiren 500'ü aşkın mutasyon yayınlanmıştır.

Hemoglobinopatiler ve talasemilerin tanısında; Tam kan sayımı, Hemoglobin elektroforezi (selüloz, agar, kapiller) HPLC (Yüksek performanslı sıvı kromatografi) gibi analitik yöntemler yanında, PCR(Polimeraz zincir reaksiyonu), DNA dizileme gibi moleküler yöntemler kullanılmaktadır.

**Anahtar Kelimer:** Hemoglobinopati, Orak hücre, Talasemi

### Kaynakça

- 1- Hemoglobinopati Tanı Rehberi. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Kurumu, 2016, Ankara.
- 2- Cao A, Galanello R. Beta-thalassemia. Genetics in Medicine. 2010;12(2):61-76.
- 3- Arpacı A, Çoker C, Habif S, Telci A, Tuncel P. Elektorforez Kurs Kitabı. İstanbul: Türk Klinik Biyokimya Derneği, 2008, İstanbul.
- 4- Polat G, Çürük MA, Yüregir GT, Aksoy K. Deletional alpha thalassemias in Çukurova. Ann Med Sci 1999; 8: 22-25.
- 5- Kaya Z. Tam Kan Sayım Çıktılarının yorumlanması. Dicle Medical Jorunal, 2013; 40(3):521-528.



# K-8

## TROMBOFİLİ TANI VE İZLEMİNDE LABORATUVAR

Murat ÖRMEN

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir

Pıhtılaşma eğiliminin olduğu, tromboemboli riskinin arttığı durum “trombofili” olarak tanımlanır. Kalıtsal ve edinsel durumlar trombofiliye neden olabilir. Trombofilinin tanı, tedavi ve izleminde kullanılan çok sayıda laboratuvar parametreleri mevcuttur. Konunun genişliği nedeniyle kapsam, kalıtsal trombofili ve bazı edinsel trombofili tanı/izlemindeki laboratuvar parametreleri ile sınırlandırılmıştır.

Kalıtsal trombofili sonucu gelişen venöz tromboemboli (VTE)’ye yaklaşım ile ilgili farklılıklar olmakla birlikte Türk Hematoloji Derneği’nin “Edinsel kanama bozuklukları ve kalıtsal trombofili tanı ve tedavi kılavuzunda” izlenmesi önerilen yol şu şekilde tanımlanmıştır:

İlk VTE atağını takiben kalıtsal trombofili etkenlerinin taranması önerilmemektedir.

Ancak; hasta aşağıda belirtilen durumlardan birini taşıyorsa kalıtsal trombofili taraması önerilir.

- İlk idyopatik tromboz atağını <40 yaş geçiren hastalar
- Tekrarlayan idyopatik/minör tetikleyici etkene bağlı VTE
- “Tromboza eğilimli aile”: hastanın kendisi dışında  $\geq 2$  semptomatik tekrarlayan VTE geçirmiş birinci derece akraba ve/veya hastanın ailesinde tekrarlayan idyopatik VTE hikayesi bulunması
- Purpura fulminans varlığında (özellikle PC, PS eksikliği yönünden değerlendirilmeli)
- Venöz tromboz riski taşıyan gebe kadınlar

Kalıtsal trombofilili hastaların asemptomatik yakınlarında VTE gelişme riskinin düşük olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Bu nedenle tromboza eğilimi olmayan ailelerde tarama yapılması önerilmez. “Tromboza eğilimli ailelerde” ise yüksek riskli trombofilik defektler (antitrombin, protein C, protein S eksiklikleri) ile ilgili parametrelerin taraması yapılmalıdır.

Trombofili tanısının konmasında sıklıkla kullanılan parametrelerin özellikleri aşağıda tanımlanmıştır

**Aktive protein C direnci (APC-D):** En yaygın kalıtsal trombofili nedenidir. Faktör V’i kodlayan genin 506. pozisyonunda glutamin ile arjininin yer değiştirmesi faktör V Leiden mutasyonu olarak tanımlanmıştır. Faktör Va’nın APC ile inaktivasyonuna direnç sonucu tromboza eğilim meydana gelir. APC-D, aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT) bazlı yöntemlerle APC’li ve APC eklenmeden ölçümler yapılarak oluşturulan oranlamaya bakılarak saptanır. Ancak APC-D, mutasyondan bağımsız da oluşabileceğinden pozitif ya da sınırda olgulara DNA analizi yapılmalıdır.

**Protrombin gen mutasyonu:** Protrombin G20210A mutasyonu hem arteriyel hem de venöz trombozlarla eşlik etmektedir. Tanı moleküler genetik analiz yöntemleri ile konur.

**Antitrombin III:** Aktive pıhtılaşma faktörlerinin en güçlü inhibitörüdür. Trombofilik hastaların taranmasında ilk tercih antitrombinin fonksiyonel ölçümüdür. Antitrombin antijen ölçümü eksikliğin tiplendirilmesinde kullanılır.

**Protein C:** Eksikliği hem kalıtsal hem de kazanılmış trombofili nedenleri arasında yer almaktadır. Tip II protein C eksikliğinde fonksiyonel ölçüm düşük iken kantitatif ölçüm normaldir. Bu nedenle tarama amaçlı ilk tercih fonksiyonel ölçüm olmalıdır.

**Protein S:** Protein S’in %65’i C4b bağlayıcı protein ile kompleks, %35’i serbest haldedir. Serbest form APC’nin kofaktörü olarak görev yapar. Protein S eksikliği nadir görülür ve trombofili riski orta derecededir. Eksikliği düşünülen hastalarda fonksiyonel protein S ölçümü ve serbest Protein S’in birlikte ölçümü tanısallık gücü artırmada katkı sağlar. Total Protein S ölçümü rutin amaçlı kullanılmamalıdır.

**Antifosfolipid antikorlar:** Akkiz trombofili nedenlerinden bir tanesidir. “Antifosfolipid Antikor” tanısı için lupus antikoagulan (LA) ya da antikardiyolipin antikor (AKLA) testlerinden birinin pozitif olması gereklidir. LA için aPTT, kaolin pıhtılaşma zamanı, dilüe Russel viper venom zamanı (DRVVT)tarama testleridir. Karıştırma (mixing) çalışmasıyla fosfolipid bağımlı pıhtılaşma testi düzelmezse doğrulama testleri yapılmalıdır. Doğrulama testleri yüksek konsantrasyonda fosfolipid ya da heksagonal lipid varlığında antikorların nötralizasyonu prensibine dayalıdır. AKLA ölçümünde immunolojik yöntemler kullanılır.

Sonuç olarak; trombofili hastalarının tanısının konması, asemptomatik hastaların yakalanması ve tedavilerinin düzenlenmesinde laboratuvarın önemi büyüktür. Gerek uygun örnek alım koşullarının sağlanması, gerekse uygun yöntemin seçilmesi açısından klinik biyokimyacılar büyük görev düşmektedir.

# K-9 / K-10

## MYELODİSPLASTİK SENDROM VE MYELOPROLİFERATİF HASTALIKLARIN TANI VE İZLEMİNDE LABORATUVAR AKUT VE KRONİK LÖSEMİLERİN TANI VE İZLEMİNDE LABORATUVAR

İrfan YAVAŞOĞLU

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, Aydın

Hematolojik hastalıkların değerlendirmesinde klinik, morfoloji, immunfenotip, sitogenetik ve moleküler genetik çalışmaları temeldir, bu sebeple laboratuvar önemli bir yere sahiptir. Laboratuvar da tam kan sayım, koagülasyon değerlendirmesi ile morfolojik inceleme tanısaldır. Bunu yanında akım sitometri hem tanıda hem de minimal kalıntı hastalığını takibinde önemli yere sahiptir. Tabiki genetik tanının yeri yadsınmaz. Dünya sağlık örgütü 2001, 2008 sınıflamasından sonra 2016 yılında lenfoid ve myeloid neoplazmların sınıflamasını güncelledi (tablo1). Bu sınıflama genetik değerlendirme çok daha önemli hale geldi.

En basit anlamda iyi yorumlanmış tam kan ve çevresel kan yayması tanı için en önemli adımdır. Burada tespit edilen eosinofili, kronik myeloid lösemi, eosinofilik lösemi için, monositöz ise kronik myelomonositör lösemi için uyarıcı olabilir. Blast içinde görülen auer cisimi tanıyı akut myeloblastik lösemi, fagot cisimi ise bir adım daha ileri giderek promyelositik tip konusunda tanısaldır. Sık kullandığımız NCCN kılavuzunda Whright-giemsma boyaması ile morfolojik değerlendirme ilk sıradadır. Buna göre kemik iliği örneğinde %10 üzerinde görülen displazi myelodisplastik sendroma (MDS) işaret etmekte iken, %20 üzerinde blastik hücre görülmesi akut lösemi tanısı koydurmaktadır. MDS tanı kriterleri tablo 2 de ifade edilmiştir. Bunun yanında demir boyaması ile ring sideroblastlar ayırt edilirken, sudan black ile akut myeloblastik lösemi, PAS ise akut lenfoblastik lösemi tanısını desteklemektedir. Lenfosit sayısının 5000 mm<sup>3</sup> üzerinde olması durumunda klonalite tespit edilmesi kronik lenfositik lösemi tanısı için önemlidir. Tam kan sayımının sık yapılması yeni bir kavramı ortaya çıkarmıştır. Lökosit sayısının 5000 mm<sup>3</sup> altında olması (ancak normal değerlerin üstünde) klonalite tespit edilmesi durumunda monoklonal B lenfositöz kavramı(MLB:*monoclonal B-cell lymphocytosis*) oluşmuştur. Toplumda %12 oranında olabileceği şeklinde yayınlar vardır. Yüksek riskli formunun 2016 WHO KLL öncesi durum olduğunu kesin olarak ifade edilmiştir.

**Tablo 1.** WHO 2016 göre myeloid neoplazmlar ve akut lösemiler

<b>Myeloproliferatif neoplazmlar (MPN)</b>	<b>Akut myeloid lösemi (AML) ve ilişkili neoplazmlar</b>
Kronik myeloid lösemi ABL-BCR +	Tekrarlayan genetik anomaliler ile AML
Kronik nötrofilik lösemi	t(8,21) ile AML, RUNX1-RUNX1T1
Polisitemia vera	inv(16) yada T(16,16) ile AML, CBFβ-MYH11
Primer myelofibrozis	PML-RARA ile AML
Prefibrotik-erken evre	t(9,11) ile AML, MLLT3-KMT2A
Belirgin dönem	t(6,9) ile AML, DEK-NUP214
Esansiyel trombositemia	inv(3) ile AML, GATA2, MECOM
Kronik eosinofilik lösemi(spesifik olmayan-NOS)	t(1,22) ile AML(megakaryoblastik), RBM15-MLK1
MPN-sınıflandırılmayan	<i>Önerilen kavram: BCR-ABL1 ile AML</i>
Sistemik mastositozis	Mutasyon NPM1 ile AML
<b>Myelodisplastik sendromlar (MDS)</b>	Biallelik mutasyon CEBPA ile AML
Tek seri ile MDS	<i>Önerilen kavram: mutasyon RUNX1 ile AML</i>
Ring sideroblast ile MDS (MDS-RS)	Myelodisplazi ilişkili değişiklikler ile AML
Tek seri ile MDS-RS	Tedavi ilişkili myeloid neoplazmlar
Çoklu seri ile MDS-RS	AML (NOS)
Çoklu seri ile MDS	Minimal farklılaşma ile AML
Blast artışı ile MDS	Olgunlaşma olmadan AML
İzole 5q sendromu ile MDS	Olgunlaşma ile AML
MDS sınıflanamayan	Akut myelomonositik lösemi
<i>Öneriler kavram: çocukluk çağı refrakter sitopenisi</i>	
<b>MDS-MPN</b>	Akut monoblastik-monositik lösemi
kronik myelomonositik lösemi (KMML)	Saf eritroid lösemi
Atipik KML (BCR-ABL1-)	Akut megakaryoblastik lösemi
Juvenil myelomonositik lösemi	Akut Bazofilik lösemi
Ring sideroblast-trombositöz ile MDS-MPN	Myelofibrozis ile akut panmyelozis
sınıflanmayan MDS-MPN	Myeloid sarkom

<b>Myeloproliferatif neoplazmlar (MPN)</b>	<b>Akut myeloid lösemi (AML) ve ilişkili neoplazmlar</b>
<b>Blastik plazmasitoid dentritik hücreli neoplazm</b>	<b>B lenfoblastik lösemi/lenfoma</b>
<b>Belirlenmeyen akut lösemiler</b>	B lenfoblastik lösemi/lenfoma, NOS
akut farklılaşmamış lösemiler	Tekrarlayan genetik anomaliler ile B lenfoblastik lösemi/lenfoma
t(9,22), BCR, ABL1 ile Miks fenotipli akut lösemiler (MPAL)	T(9,22), BCR, ABL1 ile B lenfoblastik lösemi/lenfoma
t(v,11q23.3), KMT2A düzenlenmesi ile MPAL	- T(v,11q), KMT2 düzenlenmesi ile B lenfoblastik lösemi/lenfoma
MPAL, B/myeloid, NOS	T(12,21) ETV6-RUNX1 ile B lenfoblastik lösemi/lenfoma
MPAL, T/myeloid, NOS	hiperdiploidi ile B lenfoblastik lösemi/lenfoma
<b>T- lenfoblastik lösemi / lenfoma</b>	hipodiploidi ile B lenfoblastik lösemi/lenfoma
Önerilen kavram: erken T hücre prekürsör lenfoblastik lösemi	t(5,14) IL3-IGH ile B lenfoblastik lösemi/lenfoma
Önerilen kavram: NK hücreli lenfoblastik lösemi/lenfoma	T(1,19) TCF3-PBX1 ile B lenfoblastik lösemi/lenfoma
	Önerilen kavram: BCR-ABL1 benzeri B lenfoblastik lösemi/lenfoma
	Önerilen kavram: iAMP21 ile B lenfoblastik lösemi/lenfoma

Akut ve kronik lösemi, myeloproliferatif neoplazmlar, MDS tanısında, tam kan sayımı periferik (Çevresel) yayma, kemik iliği aspirasyonu, biyopsisi (aspirasyon ile partikül-hücre çekilememesi durumunda), (mümkünse özel boyaların yapılması) immünofenotipleme, konvansiyonel sitogenetik, moleküler genetik yapılması gereklidir. Tanı ve takipte tüm bu parametrelerin birlikte kullanılması gerekir.

**Tablo 2. MDS tanı kriterleri**

Ad	Displastik köken	Sitopeniler*	İlk eritroid elemanların %'si olarak ring sideroblastlar	Kİ ve PK blastlar	Konvansiyonel karyotik analize göre sitogenetik
Tek dizide displazinin olduğu MDS (MDS-SLD)	1	1 veya 2	<%15/<%5†	Kİ<%5, PK<%1, Auer cisimciği yok	herhangi biri, izole delesyon (5q) ile MDS tüm kriterlerini yerine getirmediğe
Çoklu dizide displazinin olduğu MDS (MDS-MLD)	2 veya 3	1-3	<%15/<%5†	Kİ<%5, PK<%1, Auer cisimciği yok	herhangi biri, izole delesyon (5q) ile MDS tüm kriterlerini yerine getirmediğe
<b>Ring sideroblastlı MDS (MDS-RS)</b>					
Tek dizide displazinin olduğu MDS-RS (MDS-RS-SLD)	1	1 veya 2	≥%15/≥%5†	Kİ<%5, PK<%1, Auer cisimciği yok	herhangi biri, izole delesyon (5q) ile MDS tüm kriterlerini yerine getirmediğe
Çoklu dizide displazinin olduğu MDS-RS (MDS-RS-MLD)	2 veya 3	1-3	≥%15/≥%5†	Kİ<%5, PK<%1, Auer cisimciği yok	herhangi biri, izole delesyon (5q) ile MDS tüm kriterlerini yerine getirmediğe
İzole delesyon (5q) ile MDS	1-3	1-2	yok veya herhangi biri	Kİ<%5, PK<%1, Auer cisimciği yok	tek başına del(5q) veya -7 veya del (7q) dışındaki 1 ek anormallik ile
<b>Artmış blast sayılı MDS (MDS-EB)</b>					
MDS-EB-1	0-3	1-3	yok veya herhangi biri	Kİ%5-9 veya PK%2-4, Auer cisimciği yok	herhangi biri
MDS-EB-2	0-3	1-3	yok veya herhangi biri	Kİ %10-19 veya PK %5-19 veya Auer cisimciği	herhangi biri
<b>MDS, sınıflandırılmamış (MDS-U)</b>					
%1 kan blastı ile	1-3	1-3	yok veya herhangi biri	Kİ<%5, PK – 1, †Auer cisimciği yok	herhangi biri
tek dizide displazi ve pansitopeni ile	1	3	yok veya herhangi biri	Kİ<%5, PK<%1, Auer cisimciği yok	herhangi biri
tanımlanan sitogenetik anormalliğe dayalı	0	1-3	<%15§	Kİ<%5, PK<%1, Auer cisimciği yok	MDS-tanımlanan anormallik
Çocukluğun refrakter sitopenisi	1-3	1-3	yok	Kİ<%5, PK<%2	herhangi biri

### **Kaynaklar**

- 1- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2391-405.
- 2- Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2375-90.
- 3- NCCN version, 2018

## **Myelodisplastik Sendromların Tanı ve İzleminde Laboratuvar**

Miyelodisplastik Sendrom (MDS) miyeloid, eritroid, megakaryositik hücre serisinde displazi ve değişen yüzdelerde blast hücreleri ile karakterize, artmış akut miyeloid lösemiye dönüşüm riski taşıyan miyeloid neoplazmaların heterojen bir grubudur. MDS 'de tanı periferik kanda sitopeni kadar kemik iliğinde displazinin ve immatür hücre artışının gösterilmesi ve diğer olası nedenlerin dışlanması ile konur. Özellikle açıklanamayan monositöz ve/veya sitopenilerde, eritrositlerde makrositöz varlığında, normal hemoglobin düzeylerinde bile ya da çevre kanında displazi bulgularının varlığında MDS'e yönelik ileri incelemeler yapılmalıdır.

MDS'li hastalarda anemi inefektif eritropoez sonucudur. Eritropoetin düzeyleri normal ya da artmıştır. Anemi sıklıkla retikülosit indeksinin azaldığı makrositik karakterdedir. Bu nedenle ileri yaşlarda vitamin B12 ve folat eksikliği gibi diğer makrositik anemi nedenlerinin dışlanması gereklidir. Tam kan sayımında makrositik veya normositik anemi, anizositöz, hastaların yarısında lökopeni ve trombositopeni görülür. Hastaların yarısında tanı anında pansitopeni vardır. Nadiren trombositöz de tanımlanmıştır

Primer MDS hastalarının % 40-60 'ında, tedavi ilişkili MDS (t-MDS) hastaların % 80'den fazlasında anormal karyotip tespit edilir. Bu nedenle sitogenetik analiz hastalığın tanısı ve prognozunda önemli bir yer tutmaktadır. En yaygın anormallik Trizomi 8'dir. Diğer yaygın anormallikler; monozomi 5 ya da 7, Y kromozom kaybı, 5, 7, 11, 13 ve 20. kromozomların uzun kollarının delesyonudur.

MDS tanısı ve prognozu öncelikle morfoloji ve sitogenetik verilere dayansada son on yılda hızla ilerleyen multiparametrik analiz yöntemleri ve monoklonal antikorlar ile birlikte flow sitometri yöntemi, MDS tanısı ve takibinde vazgeçilmez bir tanı aracı olarak yerini almıştır. MDS tanısında kullanılan immünofenotipik analiz yöntemi; displazi ile ilişkili patern tanıma yöntemidir. Multiparametrik flow sitometri analizi ile miyeloid hücre ( nötrofil, monosit, eritroid) serisine ait displastik değişiklikler ölçülür ve immatür progenitor hücreler (miyeloid ve B-Lenfoit) değerlendirilir.

DSÖ sınıflaması miyeloid neoplazmlar ve miyelodisplaziye yaklaşımda en iyi tanı aracıdır. Prognoz tayini için karyotipik özellikler ve sitopeniler temel alınarak geliştirilen uluslararası prognoz skorlama sistemi (IPSS) kullanılmaktadır. Mevcut tüm prognoz sistemleri içerisinde, prognozu en iyi tahmin edebilecek sistem halen oluşturulamamıştır. Son zamanlarda geliştirilen miyeloid ve monositik anormalliklere dayanan flow sitometri tabanlı flow sitometri skorlama sistemi ( FCSS), MDS tanısı ve prognozunda , özellikle transplantasyon sonrası ve tedaviye yanıtın takibinde giderek artan bir öneme sahiptir.

# K-9 / K-10

## MYELODİSPLASTİK SENDROMLARIN TANI VE İZLEMİNDE LABORATUVAR

### AKUT VE KRONİK LÖSEMİLERİN TANI VE İZLEMİNDE LABORATUVAR

**Meltem KİLERCİK**

Acıbadem Labmed Hematoloji Hizmetleri Koordinatörü, İstanbul

Miyelodisplastik Sendrom (MDS) miyeloid, eritroid, megakaryositik hücre serisinde displazi ve değişen yüzdelerde blast hücreleri ile karakterize, artmış akut miyeloid lösemiye dönüşüm riski taşıyan miyeloid neoplazmaların heterojen bir grubudur. MDS 'de tanı periferik kanda sitopeni kadar kemik iliğinde displazinin ve immatür hücre artışının gösterilmesi ve diğer olası nedenlerin dışlanması ile konulur. Özellikle açıklanamayan monositöz ve/veya sitopenilerde, eritrositlerde makrositöz varlığında, normal hemogloblin düzeylerinde bile ya da çevre kanında displazi bulgularının varlığında MDS'e yönelik ileri incelemeler yapılmalıdır.

MDS'li hastalarda anemi inefektif eritropoez sonucudur. Eritropoetin düzeyleri normal ya da artmıştır. Anemi sıklıkla retikülosit indeksinin azaldığı makrositik karakterdedir. Bu nedenle ileri yaşlarda vitamin B12 ve folat eksikliği gibi diğer makrositik anemi nedenlerinin dışlanması gereklidir. Tam kan sayımında makrositik veya normositik anemi, anizositoz, hastaların yarısında lökopeni ve trombositopeni görülür. Hastaların yarısında tanı anında pansitopeni vardır. Nadiren trombositöz de tanımlanmıştır

Primer MDS hastalarının % 40-60 'ında, tedavi ilişkili MDS (t-MDS) hastaların % 80'den fazlasında anormal karyotip tespit edilir. Bu nedenle sitogenetik analiz hastalığın tanısı ve prognozunda önemli bir yer tutmaktadır. En yaygın anormallik Trizomi 8'dir. Diğer yaygın anormallikler; monozomi 5 ya da 7, Y kromozom kaybı, 5, 7, 11, 13 ve 20. kromozomların uzun kollarının delesyonudur.

MDS tanısı ve prognozu öncelikle morfoloji ve sitogenetik verilere dayansada son on yılda hızla ilerleyen multiparametrik analiz yöntemleri ve monoklonal antikorlar ile birlikte flow sitometri yöntemi, MDS tanısı ve takibinde vazgeçilmez bir tanı aracı olarak yerini almıştır. MDS tanısında kullanılan immünofenotipik analiz yöntemi; displazi ile ilişkili patern tanıma yöntemidir. Multiparametrik flow sitometri analizi ile miyeloid hücre ( nötrofil, monosit, eritroid) serisine ait displastik değişiklikler ölçülür ve immatür progenitör hücreler (miyeloid ve B-Lenfoit) değerlendirilir.

DSÖ sınıflaması miyeloid neoplazmlar ve miyelodisplaziye yaklaşımda en iyi tanı aracıdır. Prognoz tayini için karyotipik özellikler ve sitopeniler temel alınarak geliştirilen uluslararası prognoz skorlama sistemi (IPSS) kullanılmaktadır. Mevcut tüm prognoz sistemleri içerisinde, prognozu en iyi tahmin edebilecek sistem halen oluşturulamamıştır. Son zamanlarda geliştirilen miyeloid ve monositik anormalliklere dayanan flow sitometri tabanlı flow sitometri skorlama sistemi ( FCSS), MDS tanısı ve prognozunda , özellikle transplantasyon sonrası ve tedaviye yanıtın takibinde giderek artan bir öneme sahiptir.

# K-11

## HEMATOLOJİDE KÖK HÜCRE UYGULAMALARI VE LABORATUVAR

### Ercüment OVALI

Acıbadem Labcell Hücre Laboratuvarı Direktörü, İstanbul

Hematopoetik kök hücre nakli kemik iliği ve kan kanserleri, lenfatik sistem bozuklukları, immünolojik ve metabolik hastalıklar olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan bir tedavi yöntemidir. Temel mekanizması alıcıdan toplanan hematopoetik kök hücrelerin, hazırlık rejiminin ardından vericiye nakil edilmesidir. Nakil otolog olabileceği gibi allojeneik olarak da yapılabilmektedir.

Her ne kadar etkili bir tedavi yöntemi olarak kullanımı gün geçtikçe artsa da, özellikle allojeneik hematopoetik kök hücre naklinin birtakım ciddi komplikasyonları bulunmaktadır. Bunların başında Engraftman yetersizliği, ilaç toksisitesi, bakteriyel, fungal veya virüs enfeksiyonları, relaps ve Graft-versus-host hastalığı (GVHD) gelmektedir. Bu komplikasyonlar hasta sağ kalımı üzerine direkt olarak etkili olduğu için oldukça önemlidir. Tüm bunların üstesinden gelebilmek adına yeni nesil nakil metodları üzerinde birçok çalışma yapılmakta, elde edilen olumlu veriler ışığında kullanımları yaygınlaşmaya başlamaktadır. Graft mühendisliği nakil ürünü çeşitli şekillerde manipüle edilerek bu komplikasyonların önüne geçilmesi amaçlanmaktadır.

En ciddi komplikasyonlardan biri olan ve hematopoetik kök hücre naklinde en önemli mortalite ve morbidite sebebi olan GVHD'nin ortaya çıkmasındaki temel sebep alloreaktivitedir. Alloreaktivitenin ortaya çıkmasından sorumlu olan hücreler kök hücreler ile birlikte nakil edilen T hücreleridir. Fakat burada sorulması gereken önemli soru tüm T hücrelerinin buna neden olup olmadığıdır. T hücreler farklı alt gruplara sahip olup her biri farklı etkilerin ortaya çıkmasını sağlamaktadır. TCR gama delta hücreleri antijen sunumuna ihtiyaç duymayan ve tümöre karşı etkili olan hücre grubu iken TCR alfa beta hücreleri ise iki farklı grubu olan CD45 Ra ve CD45 Ro ile farklı etkilere sahiptir. CD45 Ra hücreleri GVHD'nin oluşmasındaki temel sebep iken CD45 Ro hücreleri ise donör hafızasına sahip olup güçlü bir anti enfeksiyöz etkiye sahiptir.

Tüm bu bilgiler ışığında nakil ürününden TCR-alfa/beta hücrelerinin deplese edilmesi (azaltılması) ile alloreaktiviteye çözüm bulabileceğimizi, CD45Ra hücrelerini deplese ederek ise aynı şekilde hem alloreaktiviteyi önleyebileceğimizi hem de geride kalan CD45Ro hücreleri sayesinde nakil sonrası oluşan viral enfeksiyonlarının üstesinden gelebileceğimizi görmekteyiz. Bu şekilde yapılan manipülasyonlar relaps ve dirence karşı da avantaj sağlamaktadır.

Bunların yanı sıra sadece CD34+ hücrelerin seçilerek nakilde kullanılması da başka bir seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır. Fakat viral enfeksiyonların ortaya çıkma ihtimalini arttırmamasından dolayı T-hücre depleksiyonuna göre daha az tercih edilmektedir. Ayrıca toplam sağ kalımda T-hücre deplese edilmiş ürün naklinin daha başarılı olduğu yapılan uygulamalar ile gösterilmiştir.

Hücrelerin manyetik olarak işaretlenmesi ve seçilmesi temeline dayanan yöntemler ile nakil ürünleri üzerinde tüm bu manipülasyonlar rahatlıkla yapılabilmektedir. İstenilen hücre grubu deplese edilebilmekte ya da seçilebilmektedir. Böylece alloreaktiviteye sebep olan antijen sunan hücre, B-hücre, naif T-hücrelerinin nakil ürünündeki miktarı azaltılabilmektedir.

Ayrıca viral enfeksiyonlara karşı CD45Ro hücrelerinin yanı sıra, viral antijenlere spesifik T hücreleri üretmek CMV, EBV, ADV ve BK spesifik T lenfositlerin hazırlanması mümkündür. Günümüzde yayınlanan klavuzlar incelendiğinde, CMV ve EBV spesifik T- hücrelerin ikinci basamak, ADV ve BK spesifik T hücrelerin ise birinci basamak tedavi olarak tercih edildiği görülmektedir.

Son yıllarda kronik GVHD tedavisinde donör kaynaklı regülatuar T-hücrelerin seçilmesi ve çoğaltılmasının ardından hastaya infuzyonunun son derece etkin klinik veriler sunduğu dikkat çekmektedir.

Sonuç olarak geçmişte kemik nakli ile başlayan hematopoetik kök hücre nakli, günümüzde spesifik hücrelerin seçilimi, çoğaltılması ve hatta genetik olarak modifiye edilmesi esasına dayalı, graft mühendisliğinin aktif olarak uygulandığı bir hale gelmiştir. Buna bağlı olarak ise hematopoetik kök hücre nakli etkin, güvenli ve konforlu bir karakter kazanmıştır.

# K-12

## HEMATOLOJİDE KÖK HÜCRE UYGULAMALARI VE LABORATUVAR

Klara DALVA

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Hastanesi Hematoloji Bilim Dalı Laboratuvarı Sorumlusu, Ankara

Hematopoietik Kök Hücre Nakli (HKHN), malin olan ya da olmayan çeşitli hematolojik hastalıklar, immun yetmezlikler, bazı otoimmün hastalıkların tedavisinde, başarıyla kullanılmakta olan bir tedavi yöntemidir. Hastalığın özelliklerine göre bu nakiller, kişinin kendi hücrelerinden (oto) ya da başka bir vericiden (allogeneik) yapılabilir. HKHN akraba olan tam uyumlu vericiler (matched related), akraba olmayan uyumlu (match unrelated, MUD), ya da yarı yarıya uyumlu olan birinci derece akrabalarından (Haploidentik) yapılabilir. Bu tedavi yönteminin hazırlama rejiminden, hastalığın doğasından uyumun düzeyinden ve kişisel özelliklerden kaynaklanan ve ölümcül olabilen ağır yan etkileri söz konusu olabilmektedir.

Başarılı bir nakil ile, nakledilen hücrelerin alıcı kemik iliğine tutunarak sağlıklı bir hematopoez başlatması ve gelişen tolerans yardımı ile immun sistemi baskılayan ilaç kullanımı gerekmeden sağlıklı bir yaşamın devam ettirilmesidir.

HKHN öncesinde alıcı ile verici arasındaki uyumun değerlendirilmesinde kullanılan çeşitli laboratuvar yöntemleri yanı sıra HKHN nin önemli komplikasyonlarından biri olan Graft vs Host Hastalığının(GVHH) öngörülmesi için kullanılabilecek çeşitli testler mevcuttur. Doku uyumunun belirlenmesinde en önemli faktör, Büyük Doku Uyum (MHC) gen bölgesinden kodlanan HLA Antijenlerinin uyumudur. HLA molekülleri yanı sıra kan hücreleri dışında da ifade edilen minör doku uyum antijenleri, Doğal öldürücü hücrelerde ifade edilen “Killer Immunglobulin Like Receptor”, KIR ve ligandları arasındaki ilişki, HLA moleküllerinin ifadesini kontrol eden gen bölgelerindeki polimorfizmler, özellikle enflamatuvar yanıtın kontrolünde rolü olan sitokinlerdeki polimorfizmin nakil başarısında etkili olduklarını gösteren çok sayıda çalışma meta analizler mevcuttur. HKHN’ni takip eden belli zaman aralıklarında ölçülebilen biyobelirteçlerin GVHHnin erken dönemde öngörülmesini sağladığı bilinmektedir ve yaygın olarak kullanılsa da takip algoritmaları arasında yerini almaya başlamıştır.

HKHN sonrasında GVHH nin baskılanması, toleransın gelişimini sağlamak için kullanılan çeşitli medikal ve hücresel tedavi seçenekleri mevcuttur. Bu ürünlerin aranan kriterleri sağlayıp sağlamadığını, fonksiyonel özelliklerini saflıklarını kontrol etmek için kullanılan çeşitli laboratuvar tekniklerinin kullanılması kritik öneme sahiptir.

HKHN başarısı ve nüksün öngörülmesini sağlayan bir diğer uygulama da minimal kalıntı hastalık tespittir. İmmunfenotipleme, moleküler teknikler ile hasta hücre işaretleri üzerinden minimal kalıntı hastalık tespiti yapılabildiği gibi, kimerizm düzeylerinin değerlendirilmesi de önemli katkılar sağlamaktadır.

HKHN nin başarısında nakil öncesinde ve sonrasında uygulanan çeşitli laboratuvar yöntemleri büyük öneme sahiptir. Bu yöntemlerin zamanında, ehil ellerde, standartlara uygun olarak uygulanması ve elde edilen verilerin doğru işlenerek en yararlı şekilde sunulması vazgeçilmez bir öneme sahiptir.