

ORİJİNAL YAZI

## Akut Lösemilerde Minimal Residüel Hastalığın Akım Sitometrisi Yöntemiyle Araştırılması ve Relaps ile Korelasyonu\*

Ülkü OZAN\*\*, Fahir ÖZKALEMKAŞ\*\*, Rıdvan ALİ\*\*, Ferah BUDAK\*\*\*,  
Güher GÖRAL\*\*\*, Vildan ÖZKOCAMAN\*\*, Tülay ÖZÇELİK\*\*, Ahmet TUNALI\*\*

\*\* Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, Bursa.

\*\*\* Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa.

### ÖZET

Morfolojik olarak tam remisyonda kabul edilen akut lösemi olgularında kemik iliğindeki rezidüel lösemik hücrelerin relapsa yol açtığı bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı, minimal residüel hastalık (MRD) tesbitinde akım sitometrisinin kullanımını ve MRD ile hastaliksız yaşam arasındaki korelasyonu değerlendirmektir. Biz önce 89 akut lösemi olgusunda tamdaki immünofenotip sonuçlarını değerlendirdik ve %73'ünde nadir görülen koekspresyonlar saptadık. Daha sonra, halen hayatta olan 16 olgunun başlangıçta ve komplet remisyondaki (KR) koekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı ve 28-40 haftalık takip süresince KR'da kalan 8 olguda anlamlı azalma gözlemlendi. Buna karşın, olguların 3'ünde, remisyondaki koekspresyon düzeylerinin tanıda belirlenene yakın olduğu dikkati çekti ve bunlardan 2'si 19 ve 30 hafta sonrasında nüks ettiler. Bu veriler, rezidüel hastalığın relapsın habercisi olduğunu ve bunu belirlemede akım sitometrisi yönteminin kullanılabilirliğini desteklemektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Minimal residüel hastalık. Akut lösemi. Akım sitometrisi. Prognoz.

### Determination of Minimal Residual Disease in Acute Leukaemia Using Flow Cytometry and It's Correlation with Relapse

#### ABSTRACT

It's known that many acute leukemia patients in morphologic remission would eventually relapse due to the persistence of residual leukemic cells. The aim of this study was to evaluate the use of flow cytometry (FC) to detect minimal residual disease (MRD) and the correlation between MRD and relapse-free survival. We have first evaluated the immunophenotypic outcomes of 89 acute leukemia patients during admission and rarely seen coexpressions (UC) were found in 73% of them. Then the initial levels of UC were compared with the levels during complete remission (CR) in 16 alive cases and a significant decrease was observed in 8 cases who have remained in CR for 28-40 weeks of follow-up. However, in 3 cases, coexpression levels in remission were almost the same with the initial levels and 2 of them relapsed after 19 and 30 weeks. These results confirm that FC would be useful in the assessment of MRD and a gradual increase of leukemic cells would be suggestive for subsequent relapse.

**Key Words:** Minimal residual disease. Acute leukemia. Flow cytometry. Prognosis.

Vücudun çeşitli dokularında bulunan normal ya da neoplastik hücrelerin sitoplazma ve membranlarında kendilerine özgü antijenik yapıya sahip oldukları bilinmektedir. Lökosit antijenleri "Cluster of Differentiation (CD)" olarak adlandırılır ve benzer reaktivasyon paternlerine göre gruplandırılır.

Monoklonal antikorlar, bu antijenlere karşı spesifikite ve afiniteye sahiptirler. Hücrelerce ekspres edilen moleküllerle birleşerek, antijenik yapı ve dolayısıyla hücre tipinin tayininde önemli rol oynarlar. Akım sitometrisi (AS) ile hücrelerden yayılan floresan ışınlar değerlendirilerek hücrenin büyüklüğü, sitoplazmik yapısı ve antijenik özellikleri belirlenebilir. Son iki dekada, lazer ve bilgisayar teknolojisinin ilerlemeleri ile monoklonal antikorların uygulamaya girmesi sonucunda aynı anda birden fazla hücre yüzey molekülü belirlenebilir. Böylece normal dokularda çok nadir görülen antijenik kombinasyonlara (aberran fenotipler) sahip neoplastik hücrelerin kantitatif olarak tayini mümkün hale gelmiştir. Hematolojide AS, özellikle tümör hücrelerinin çok sayıda olduğu ve homojen dağılım gösterdiği akut lösemilerde geniş kullanım alanı bulmuştur. İmmünofenotiplendirmenin morfolojik değerlendirme

Geliş Tarihi: 08.10.2004

Kabul Tarihi: 19.11.2004

\* Çalışma Blood (Journal of the American Society of Hematology) Vol 94, No 10, Supplement 1, 1999'da abstract olarak yayınlanmıştır.

Dr. Ülkü OZAN

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
İç Hastalıkları ABD Hematoloji BD  
Görüle, Bursa

Tel: 0 224 442 84 00/1087

Faks: 0 224 442 80 74

Mobil Tel: 0 532 373 94 79

e-mail: ulkuoz@uludag.edu.tr

ve sitokimyasal testlere eklenmesiyle, akut lösemilerde hücrenin orijini % 95'in üzerinde saptanabilir. Son yıllarda morfolojik olarak tam remisyonda kabul edilen hasta gruplarında, konvansiyonel yöntemlerle saptanamayan az sayıdaki blastın (minimal rezidüel hastalık: MRD) AS'yle belirlenebileceği ortaya çıkmıştır. Böylece her hasta için farklı bir tedavi yaklaşımının belirlenebildiği ve kür elde edilme şansının arttığı görülmüştür. Bu çalışmada, akut miyeloblastik ve lenfoblastik lösemili hastalarda multiparametrik AS ile miyeloid ya da lenfoid antijen koekspresyonu ve asenkronize antijen ekspresyonlarını sayısal yöntemlerle belirlemeye çalışarak, bunların klinik seyir ve sürvi üzerine etkisini incelemeyi amaçladık. Ayrıca morfolojik olarak tam remisyonda olan hastalarda ikinci bir kemik iliği aspirasyonu yaparak ilk tanıda saptanmış olan antijenik parametrelerdeki değişiklikleri irdeledik.

## Gereç ve Yöntem

Çalışmaya, 1995-1998 yılları arasında, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı'na başvuran ve morfolojik, immünofenotipik ve sitokimyasal değerlendirme sonucunda akut miyeloblastik lösemi (AML) ya da akut lenfoblastik lösemi (ALL) tanısı konulan toplam 89 olgu alındı. Olguların kemik iliği örnekleri, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İmmüno- loji Laboratuvarı'nda AS yöntemi ile analiz edildi. Multiparametrik olarak çalışılan AS sonuçları AML ve ALL hasta gruplarında ayrı ayrı değerlendirildi. Blastik popülasyonun % 20 ve daha fazlasında eksprese edilen antijenler pozitif kabul edildi. MRD tespitinde kullanılan atipik antijenik kombinasyonların olabilecek minimum ve maksimum değerleri numerik olarak hesaplandı. Pozitiflik için söz konusu koekspresyonun, blastik popülasyonun en az % 10'unda bulunması esas alındı. Örnek olarak % CD34+ / CD33- kombinasyonunun minimum değeri için % CD34'ten % CD33 değeri çıkarıldı. CD19+ / CD13+ koekspresyonunun minimum değerini hesaplamak için % CD19 ve % CD13 toplamından 100 çıkarıldı. Aynı kombinasyonun maksimum değeri için, bu iki antijenden değeri küçük olanı kabul edildi. CD34- / CD33+ / CD13- kombinasyonunun minimumu, % CD34 ve % CD13 toplamının % CD33'ten çıkarılmasıyla bulundu. CD34+ / CD33- / CD13+ kombinasyonunun pozitif kabul edilebilmesi için de; [% CD13] + [% CD34] - 2 [% CD33] işleminin  $\geq$  % 110 olması gerekliydi<sup>16</sup>. Her hasta için asenkronize ve miyeloid-lenfoid antijen koekspresyonları gözden geçirilerek pozitif olanlar tespit edildi.

İmmünofenotipleme, tanıdaki ve remisyondaki AML ve ALL hastalarından alınan kemik iliği aspiratlarında çift renkli boyama ve tam kan lizisi

tekniki kullanılarak yapıldı. EDTA içine alınan kemik iliği örnekleri vakit geçirilmeden İmmünoloji laboratuvarına ulaştırıldı. DNA-mesh "Coulter" kullanılarak filtre edildi. Hücre sayımı yapıldı. Her tübe  $1-2 \times 10^6$  hücre ayırıldı. Üzerlerine 10  $\mu$ l phycoerythrin (PE) ve fluorescein isothiocyanate (FITC) ile konjuge monoklonal antikorlar (moAb), izotipik kontroller olarak da IgG<sub>1</sub>-FITC, IgG<sub>1</sub>-PE ilave edildi. Kullanılan tüm izotipik kontroller ve monoklonal antikorlar "Coulter" firmasından temin edildi. 15 dakika karanlıkta ve oda ısısında inkübe edildi.

İnkübasyondan sonra immunoprep "Coulter" lize edici reaktifler kullanılarak eritrositler lize edildi, lökositler stabilize edildi ve hücre membranları fiksede edildi. AS'de değerlendirme yapıldı<sup>16</sup>.

Akım sitometrisi ile değerlendirme argon lazerli (488 nm) EPICS XL "Coulter" FC'de yapıldı. FITC ve PE floresan emisyonu 525 ve 575 nm'li filtreden geçirilerek değerlendirildi<sup>16</sup>.

Bu yöntemle, 61'i AML ve 28'i ALL olmak üzere toplam 89 hastanın tanıdaki multiparametrik AS sonuçları değerlendirildikten sonra, MRD'yi ve prognoza etkisini irdelemek için, tam remisyondaki 16 olguya ikinci bir kemik iliği analizi yapılarak, başlangıçtaki ve remisyondaki aberran fenotipler karşılaştırıldı ve olgular takibe alındı. Her olgu için ilk tanı ve tam remisyonda, sayısal olarak hesaplanan antijenik kombinasyonlar arasındaki ilişki gözönüne alınarak, nüks eden olguların özellikleri belirlenmeye çalışıldı.

Betimleyici değerler aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi.

## Bulgular

Çalışmada, 1995-1998 yılları arasında fakültemiz Hematoloji Bilim Dalı'na başvuran ve ilk kez tanı konulan 61'i AML, 28'i ALL olmak üzere toplam 89 hastanın kemik iliği örneklerinin immünofenotip sonuçları değerlendirildi. Daha sonra rezidüel hastalığı araştırmak amacıyla, halen remisyonda ve takibimizde olan akut lösemili hastalara kemik iliği aspirasyonu yapılarak AS yöntemiyle incelendi.

AML olguları 18-75 (ortalama  $47.34 \pm 16.09$ ) yaşları arasında olup, FAB sınıflamasına göre 16'sı M2, 14'ü M3, 12'si M4, 8'i M5, 6'sı M1 ve 5'i M0 idi. ALL olgularının 13'ü erkek ve 15'i kadın, AML olgularının 38'i erkek ve 23'ü kadın idi. ALL olguları 15-44 (ortalama  $28.36 \pm 12.39$ ) yaşları arasındaydı.

Multiparametrik akım sitometrisiyle incelemede, lenfoid, miyeloid ve bağımsız olmak üzere toplam 13 monoklonal antikor kullanıldı. Her markırın, lenfoblastik ve miyeloblastik hasta gruplarındaki görülme sıklığı belirlendi (Tablo I, II).

## Akut Lösemide Minimal Residüel Hastalık

**Tablo I-** İmmünofenotiplendirmede kullanılan anti-korların AML olgularında görülme oranları

CD	Normal Ekspresyon	Pozitif AML Olguları Total*	%
3	T	4/60	6.6
5	T, B altgrup	5/52	9.6
7	T, NK	15/59	25.4
10	Erken B/T	4/56	7.1
19	B	11/61	18
20	B; T altgrup	2/51	3.9
22	B	1/14	7.1
13	Miyeloid	61/61	100
14	Monosit, granülosit	29/61	47.5
33	Miyeloid	52/59	88.1
34	Progenitör	32/59	54.2
45	Tüm lökositlerde	46/46	100
HLA-DR	Progenitör	13/19	68.4
4	T, monosit	1/7	14.2
8	T, NK altgrubu	0/7	0
56	NK	0/7	0

(\*) Antijenin, blastların (AML-M3'de promiyelositlerin) % 20 ve daha fazlasında ekspresyona sahip olması

**Tablo II-** İmmünofenotiplendirmede kullanılan anti-korların ALL olgularında görülme oranları

CD	Pozitif ALL olgusu (%) Total*
3	13/28 (46)
5	16/28 (57)
7	17/28 (60)
10	10/28 (42)
19	13/28 (46)
20	8/28 (28)
22	4/28 (14)
13	20/28 (84)
33	6/28 (21)
14	4/28 (14)
34	12/28 (42)
HLA-DR	2/6
4	3/5
8	3/5

(\*) Antijenin, blastların % 20 ve daha fazlasında ekspresyona edilmesi

AML olgularında lenfoid antijenlerden CD7'nin yaklaşık % 25 ve CD19'un % 18 hastada pozitif olduğu gözlemlendi. ALL olgularında da miyeloid antijenlerden CD13 % 84 gibi yüksek bir oranda pozitif bulunurken, CD33 % 21 ve CD14 % 14 oranında tespit edildi. CD34 pozitifliği AML olgularının yaklaşık % 54 ve ALL olgularının yaklaşık % 42'sinde mevcuttu.

Literatürdeki rezidüel hastalığı tespiti yönelik çalışmalarda belirlenmiş olan aberran antijenik kombinasyonlar her hasta için tek tek gözden geçirildi ve % 10 ya da daha fazla blastik hücrede ekspresyona edilenler pozitif kabul edildi. AML olgularının 49'unda (% 80) aberran antijenik fenotiplerin bulunduğu gözlemlendi. Asenkronize koekspresyon % 68, lenfoid antijen koekspresyonu % 32 olguda tespit edildi.

T-lenfoid antijen pozitifliği yaklaşık % 19, B-lenfoid antijen pozitifliği yaklaşık % 16 oranında tespit edildi. Olguların 21'inde sadece 1, 13'ünde 2, 7'sinde 3, 4'ünde 4, 2'sinde 5 ve 2'sinde 6 farklı atipik fenotip gözlemlendi. En sık görülen antijenik kombinasyonlar:

CD7+/CD33+ (% 11.8), CD7+/CD13+ (% 11.8), CD19+/CD33+ (% 8.4) ve CD19+/CD13+ (% 8.1) idi (Tablo III). Asenkronize koekspresyonlardan da en sık CD33-/CD13+ (%37.7), CD34+/CD33-/CD13+ (%29.5), CD34-/CD33+/CD13- (%21.5) kombinasyonları gözlemlendi (Tablo IV).

ALL olgularının 16'sında (% 57) atipik antijenik kombinasyonlar mevcuttu. Bunların sadece 2'sinde T ve B lenfoid antijen koekspresyonu saptanırken, diğer bütün hastalarda miyeloid antijen koekspresyonu tespit edildi. Miyeloid antijen koekspresyonlarından en sık CD7+/CD13+ (%35), CD5+/CD13+ (%25), CD3+/CD13+ (% 17.5) ve CD10+/CD13+ (% 10.5) gözlemlendi (Tablo V). Olguların 8'inde 3, 7'sinde 1 ve 4'ünde 2 farklı antijenik kombinasyon tespit edildi.

**Tablo III-** AML olgularında lenfoid antijen koekspresyonları

	Miyeloid	CD34	CD33	CD13	CD14
T-lenfosit	12/61 (% 19.6)				
CD3		0/60 (% 0)	0/60 (% 0)	1/60 (% 1.6)	0/60 (% 0)
CD5		1/52 (% 1.9)	0/52 (% 0)	2/52 (% 3.8)	0/52 (% 0)
CD7		3/59 (% 5)	7/59 (% 11.8)	7/59 (% 11.8)	0/59 (% 0)
B-lenfosit	10/61 (% 16.3)				
CD10		1/56 (% 1.7)	0/56 (% 0)	0/56 (% 0)	0/56 (% 0)
CD19		3/59 (% 5)	5/59 (% 8.4)	5/61 (% 8.1)	1/61 (% 1.6)
CD20		0/51 (% 0)	1/51 (% 1.9)	1/51 (% 1.9)	0/51 (% 0)
CD22		0/14 (% 0)	1/14 (% 7.1)	1/14 (% 7.1)	0/14 (% 0)

Bütün bu değerlendirmelerden sonra, halen tam remisyonda ve takibimizde olan 9'u AML ve 7'si ALL'li toplam 16 olgunun kemik iliği örnekleri AS ile ikinci kez incelendi. Her hasta için tanıya tespit edilen atipik antijenik kombinasyonlar esas alınarak, başlangıçtaki ve remisyondaki immünofenotiplendirme sonuçları karşılaştırıldı. Olguların 8'inde koekspresyonun görüldüğü blast yüzdesinde tedavi sonrası belirgin düşme gözlemlendi. Söz konusu olguların ortalama takip süreleri 32.25±5.18 hafta (28-40 hafta) olup, halen tam remisyonda ve periyodik aralıklarla takibimiz altındadırlar. Buna karşın AML olgularının 3'ünde (FAB-M0, M4 ve M5) remisyondaki değerlerin tanı anında tespit edilene yakın olduğu dikkati çekti. Bu 3 olgudan AML-M5 ve AML-M0 tanılarıyla izlenen 2 tanesi, ikinci kemik iliği analizinden yaklaşık 19 ve 30 hafta sonra morfolojik olarak nüks ettiler, diğeri ise halen tam remisyonda ve takip süresi 40 haftadır (Tablo VI).

Toplam 16 olgudan kalan 5'i düzenli kontrollerine gelmedikleri için değerlendirme dışı bırakıldılar.

**Tablo IV-** AML olgularında asenkronize antijen ekspresyonları

CD34	CD33	CD13	CD14	Sıklık (%)
-	+	-		13/61 (21.3)
+			+	4/61 (6.5)
	-	+		23/61 (37.7)
	-		+	2/61 (3.2)
		-	+	0/61 (0)
+	-	+		18/61 (29.5)

**Tablo V-** ALL olgularında aberran antijen koekspresyonlarının görülme oranları

Atipik Fenotip	Pozitiflik Oranı	%
CD7+ / CD19+	1/28	3.5
CD7+ / CD13+	10/28	35
CD7+ / CD33+	1/28	3.5
CD5+ / CD13+	7/28	25
CD5+ / CD10+	1/28	3.5
CD3+ / CD13+	5/28	17.5
CD3+ / CD14+	1/28	3.5
CD3+ / CD33+	1/28	3.5
CD10+ / CD13+	3/28	10.5
CD19+ / CD13+	2/28	7
CD22+ / CD34+	1/28	3.5

**Tablo VI-** Tanı ve remisyondaki aberran fenotiplerin karşılaştırılması ve prognozla ilişkisi

Olgu	Tanı	Analiz zamanı	Markırlar (%)				Aberran fenotip(% min-max)			Prognoz	Takip süresi*
			CD19	CD13	CD34		CD19+/CD13+	CD19+/CD34+			
1	FAB-L1		93.4	46.5	41.2		39.7-46.3	34.6-41.2		Remisyon	28 hafta
		T	1.5	8.5	17		0-1.5	0-1.5			
		R									
2	FAB-L3		89.5	78.7	55.3	46.7	44.8-55.3	36.2-46.7	34-55.3	Remisyon	34 hafta
		T	16.7	0.3	38.5	19.4	0-16.7	0-16.7	0-0.3		
		R									
3	FAB-M4		51.7	71.9	31.5	63.7	23.6-51.7	15.4-51.7	32.2-63.7	Remisyon	30 hafta
		T	2.8	57.9	46	8.1	0-2.8	0-2.8	0-8.1		
		R									
4	FAB-L2		79.5	93	95.2		74.7-79.5	72.5-79.5	88.2-93	Remisyon	30 hafta
		T	6.3	28.7	32.9		0-6.3	0-6.3	0-28.7		
		R									
5	FAB-L2		74.5	93	58.8	37.6	51.8-58.8	67.5-74.5	12.1-37.6	Remisyon	28 hafta
		T	16	1.8	18	(-)	0-1.8	0-1.8	0		
		R									
6	FAB-M1		18.1	8.3	17.8		18.3-59.1	38.8-59.1		Remisyon	40 hafta
		T	79.7	59.2	40.9		0-8.3	0-18.1			
		R									
7	FAB-L2		95.1	47.5			42.6-47.5			Remisyon	28 hafta
		T	35.9	61			0-35.9				
		R									
8	FAB-L2		96.9	98.7	64.7		61.6-64.7	63.4-64.7		Remisyon	40 hafta
		T	88.5	87.5	18.6		7.1-18.6	6.1-18.6			
		R									
9**	FAB-M4		58.9	36.2			22.7-58.9			Remisyon	40 hafta
		T	78.7	60.8			17.9-39.2				
		R									
10**	FAB-M0		90	90.5	50.9		39.6-41.4	80.5-90	40.9-50.9	Relaps	30 hafta
		T	5	51.2	7.8		43.4-51.2	0-5	0-5		
		R									
11**	FAB-M5		75.2	35.4			39.8-64.6			Relaps	19 hafta
		T	73.9	44.6			29.3-55.4				
		R									

(\*) İkinci kemik iliği analizinden sonraki takip süresi

(\*\*) Remisyonda atipik antijenik kombinasyonun yüksek bulunduğu hastalar

T: Tanı

R: Tam Remisyon

### Tartışma

Akut lösemili olgularda, tedavi sonrası kemik iliğinde kalan lösemik hücrelerin zamanla çoğalarak relapsa neden olduğu bilinmektedir<sup>1</sup>. Morfolojik olarak tam remisyonda kabul edilen bu hastalarda kür şansı için, rezidüel hastalığın AS ve PCR gibi sensitivitesi yüksek yöntemlerle tespit edilebilecek eşik değerinin altına indirilmesi gereklidir<sup>1,2,3,4,11,14</sup>.

Rezidüel blastların, normal kemik iliği progenitör hücrelerinden ayırımı için aberran antijenik kombinasyonların incelenmesi gerekir. Birçok araştırmacı bu amaçla, normal kemik iliği hücreleri ile akut lösemi olgularındaki blastların antijenik yapısını 2 veya 3 renkli AS yöntemi ile karşılaştırmışlardır. Bu yolla belirlenen ve normal kemik iliğinde çok az ( $< 1 \times 10^{-3}$ ) ya da hiç bulunmayan atipik antijen kombinasyonları, MRD tespitinde güvenilir bir şekilde kullanılmaktadır. Bunlar başlıca 4 temele dayanmaktadır; AML'de lenfoid ve ALL'de miyeloid antijen koekspresyonları, asenkronize antijen koekspresyonları, belli bir antijenin aşırı ekspresyonu ya da aberran ışık saçılım özelliklerinin görülmesi<sup>3,6-10,13,17,19,20,21</sup>. Macedo ve arkadaşları, 13 sağlıklı gönüllüden alınan kemik iliği örneklerini 3 renkli AS ile değerlendirerek, CD34+ hücrelerin CD3, CD20, CD22, CD14, CD65 ve CD56 eksprese etmediklerini tespit etmiş ve bunların CD34 ile kombinasyonlarının MRD çalışmalarında kullanılabilirliğini bildirmişlerdir<sup>20</sup>.

Çalışmamızda, 61 AML olgusunun % 25'inde CD7, % 9.6'sında CD5, % 18'inde CD19, % 7.1'inde CD10 ve CD22'nin eksprese olduğunu bulduk. Reading ve arkadaşları, 272 erişkin AML olgusunda 22 monoklonal antikor içeren panel ile yaptıkları flow sitometrik çalışmada, lenfoid antijenlerden CD4'ün % 67, CD7'nin % 26, CD2'nin % 12, CD5'in % 10, CD19 ve CD22'nin % 10 olguda pozitif olduğunu göstermişlerdir<sup>16</sup>. Bu veriler bizim sonuçlarımızla uyumludur.

San Miguel ve arkadaşları, 35 monoklonal antikor kullanarak 3 renkli AS ile değerlendirdikleri 53 de novo AML olgusunun % 83'ünde asenkronize, % 30'unda lenfoid antijen koekspresyonu ve % 34'ünde aberran ışık saçılım paterni tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada, lenfoid antijenlerden CD2'nin % 17, CD7'nin % 9, CD19'un % 4, CD22 ve CD5'in % 2 oranında eksprese olduğu görülmüştür<sup>5</sup>. Smith ve arkadaşları 54 AML olgusunda tanıda %85,2 oranında aberran fenotip saptamışlardır<sup>15</sup>. Reading ve arkadaşları, 272 AML olgusunda sayısal olarak hesapladıkları aberran antijenik kombinasyonları hastaların % 85'inde pozitif bulmuş ve bunlardan T-lenfoid antijen koekspresyonunun % 38, B-lenfoid antijen koekspresyonunun % 13 ve NK markırlarının % 21 olguda saptandığını bildirmişlerdir<sup>16</sup>. Aynı çalışma-

da, en sık gözlenen atipik antijenik yapıların asenkronize koekspresyonlar olduğu ve olguların % 70'inde gösterildiği belirtilmiştir<sup>16</sup>. Biz bu çalışmada, 61 AML olgusunun 49'unda (% 80) aberran antijenik fenotip bulduk. Bunların % 68.8'inde asenkronize koekspresyon ve % 32.7'sinde lenfoid antijen koekspresyonu tespit ettik. Bu sonuçlar literatür ile uyumludur. Macedo ve arkadaşları, 40 AML vakasının toplam 85'inde aberran antijenik yapı saptamışlar, bunların 15'inde lenfoid antijen koekspresyonu, 25'inde asenkronize antijen koekspresyonu, 7'sinde aşırı ekspresyon ve 13'ünde de aberran ışık saçılım özellikleri gözlendiğini bildirmişlerdir<sup>17</sup>.

Syrjala ve arkadaşları, 27 AML ve 8 ALL olgusunu kapsayan değerlendirmelerinde, % 15 oranında CD19+/CD13+ ve/veya CD19+/CD33+ kombinasyonuna sahip olgu olduğunu bildirmişlerdir<sup>12</sup>. Campana ve arkadaşları, B-ALL hastalarında 2 ve 3 renkli AS ile yaptıkları çalışmada, % 35 olguda blastik hücrelerin % 80 ve fazlasında miyeloid antijen koekspresyonu tespit etmişlerdir. Aynı araştırmacılar, ALL olgularının % 5.2'sinde CD3+/CD33+, % 10.9'unda CD7+/CD33+ ve AML vakalarının yaklaşık % 25'inde CD7+/CD13+ kombinasyonu bulunduğunu bildirmişlerdir<sup>19</sup>. Çalışmamızda, AML olgularının % 11.8'inde CD7+/CD33+ ve CD7+/CD13+ koekspresyonu ile yaklaşık % 8'inde CD19+/CD13+ ve CD19+/CD33+ koekspresyonu mevcuttu. Asenkronize koekspresyonlardan en sık görülenler: CD13+/CD33- (% 37.7), CD34+/CD33-/CD13+ (% 29.5) ve

CD34-/CD33+/CD13- (% 21.3) idi. ALL olgularımızın da % 35'inde CD7+/CD13+, % 25'inde CD5+/CD13+, % 17.5'inde CD3+/CD13+, % 10.5'inde CD10+/CD13+ ve % 7 olguda CD19+/CD13+ kombinasyonu saptadık.

Birçok çalışmada aberran antijenik yapıların, hastalığın seyri boyunca genellikle sabit kaldığı ve bu nedenle tanı anındaki atipik kombinasyonlar esas alınarak rezidüel hastalığın monitörize edilebileceği gösterilmiştir. Reading ve arkadaşları, 272 AML olgusunu tanıdan itibaren periyodik aralarla AS ile izlemişler ve tanıdaki aberran fenotiplerin relapsta da gözlendiğini rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada, rezidüel hastalık tespit edilen olgularda remisyon süresi ortalama 6 ay iken, rezidüel hastalık taşımayan olguların 15 ay geçmesine rağmen remisyonda kaldıkları bildirilmiştir<sup>16</sup>. Macedo ve arkadaşları, 16 AML olgusunda yaptıkları çalışmada, toplam 20 relapsta başlangıçtaki lösemik fenotipin değişmeden kaldığını göstermişlerdir<sup>18</sup>. Campana ve arkadaşları 26 relapstan ikisinde tanıdaki fenotipik yapıya göre değişiklik olduğunu bildirmişlerdir<sup>23</sup>. Campana ve arkadaşlarının çalışmasında, nükseden 8 AML olgusunda aberran fenotipik özellikler değişmeden kalmıştır. Syrjala ve arkadaşları, remisyonda olan 27'si AML, 8'i ALL toplam 35 hastalık bir seride, tanıdaki fenotipe sahip blastların % 0.2 ve üzerinde olduğu olgularda

prognoz daha kötü seyrettiğini bildirmişlerdir<sup>12</sup>. Campana ve arkadaşları, morfolojik olarak tam remisyonda olan 46 AML olgusunun % 12'sinde rezidüel hastalık bulmuşlar ve bunların 1-6 ay içinde nüks ettiklerini belirlemişlerdir<sup>19</sup>. Diğer olguların ise halen remisyonda oldukları bildirilmiştir. Orfao ve arkadaşları, 47 ALL olgusunda belli periyotlarla yaptıkları flow sitometrik incelemelerde, rezidüel hücrelerdeki artışın relapsın habercisi olduğunu göstermişler ve bu yöntemin % 92 sensitivite ve % 75 spesifisiteye sahip olduğunu bildirmişlerdir<sup>22</sup>. San Miguel ve arkadaşları, 53 AML olgusunda remiyon induksiyon ve konsolidasyon tedavilerinden sonra kemik iliğindeki rezidüel hücreleri kantitatif olarak belirlemişlerdir. Bu çalışmada, remiyon induksiyon tedavisi sonrasında rezidüel blast sayısı  $5 \times 10^{-3}$  ve üzerinde olanlarda relaps oranı 17 ay içinde % 67 iken, bu eşik değerinin altındakilerde % 20 tespit edilmiştir. Konsolidasyon tedavisi sonrasında kemik iliğinde  $2 \times 10^{-3}$  lösemik blast bulunan olgularda 16 aylık takipte relaps % 69 oranında görülürken, bu değer altındakilerde % 32 olgunun nüks ettiği bildirilmiştir<sup>5</sup>.

Reading ve ark, 1. tam remisyondaki 16 AML olgusunda 3 renkli AS ile yaptıkları çalışmada  $\geq 2 \times 10^{-3}$  rezidüel hücreye sahip 6 olgunun tamamının  $< 2 \times 10^{-3}$  rezidüel hücreye sahip 10 hastanın ise sadece bir tanesinin nüks ettiğini bildirmişlerdir<sup>16</sup>. Sievers ve ark, morfolojik olarak remisyonda olan 35 AML'li çocuk olguyu periyodik olarak izlemişler ve rezidüel hastalık tespit ettikleri 14 hastanın 13'ünde tanıdan ortalama 153 gün (48 – 863), rezidüel hastalık olmayan 11 olgunun 9'unda ise ortalama 413 gün (321 – 794) sonra nüks görüldüğünü saptamışlardır. Aynı çalışmada rezidüel hastalık olan grupta relaps riskinin, olmayan gruba göre 2.8 kat daha yüksek bulunduğu bildirilmiştir<sup>11</sup>.

Bizim çalışmamızda, morfolojik olarak tam remisyonda olan 9 AML ve 7 ALL olgusunun kemik iliği örneklerini multiparametrik AS ile değerlendirerek tanıdaki başlangıç değerleriyle karşılaştırılmıştır. Olguların 8'inde (6'sı ALL, 2'si AML) koekspressiyonun saptandığı blast oranında tanıdaki değerlere göre belirgin düşme olduğunu tespit edilmiştir. Bunun aksine 3 olguda (FAB-M0, M4 ve M5) aberran antijenik kombinasyonu ekspresyen eden blast oranı başlangıçtaki verilere yakın bulunmuştur. Bu 3 olgudan 2'si, ikinci kemik iliği analizinden 19 ve 30 hafta sonra nüks ettiler, üçüncü olgu ise halen tam remisyondadır ve takip süresi 40 haftadır. Diğer hastalar ise halen remisyonda olarak takip edilmektedir. Söz konusu 8 olgunun ortalama takip süresi  $32.25 \pm 5.18$  haftadır (28-40 hafta). Toplam 16 olgudan 5'i düzenli kontrollere gelmedikleri için değerlendirme dışı bırakıldılar. Bu veriler literatürle uyumlu olup, rezidüel hastalığın morfolojik relapsın habercisi olduğunu desteklemektedir.

Bulgular topluca değerlendirildiğinde; morfolojik remisyondaki akut lösemili olgularda, hastanın tedaviye cevabını incelememizi sağlayan ve olası bir morfolojik relapsın önceden tahminine olanak veren MRD'yi AS ile monitörize etmek mümkündür. Böylece, rezidüel hastalık saptanan ve lösemik hücrelerin sayıca artış gösterdiği olgularda daha etkili tedavi şemaları gündeme gelerek, prognoz olumlu yönde etkilenebilir. Bunun için, olguların AS ile periyodik olarak izlenmeleri gerektiği ve özellikle remiyon-indüksiyon ile konsolidasyon tedavileri sonrasında MRD ölçülmesinin yararlı olacağını düşünülmektedir. Periyodik takip için en uygun zaman aralıklarının belirlenmesine ihtiyaç vardır. Ayrıca, morfolojik relaps olasılığının yüksek olduğu ve daha etkili tedavi seçeneklerinin denemesi gerektiği olguların tespit edilmesi amacıyla, kemoterapi sonrası MRD eşik değerlerinin saptanmasının yararlı olacağını düşünmekteyiz. Sonuç olarak; hem periyodik takip aralıklarının, hem de MRD eşik düzeylerinin belirlenebilmesi için, geniş hasta serilerinde, 2 veya 3 renkli multiparametrik FC yöntemi ile yapılacak çok merkezli çalışmalara ihtiyaç olduğu söylenebilir.

## Kaynaklar

- Jennings CD, Foon KA. Flow cytometry: Recent advances in diagnosis and monitoring of leukemia. *Cancer Invest* 1997;15: 384-99.
- Kinney MC, Lukens JN. Classification and differentiation of the acute leukemias. In: Richard Lee G, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM (eds.). *Wintrobe's Clinical Hematology*. 10 th edition. Baltimore: Mass Co Publishing; 1999. 2209-32.
- Campana D. Applications of cytometry to study acute leukemia: in vitro determination of drug sensitivity and detection of minimal residual disease. *Cytometry* 1994;18: 68-74.
- Campana D. Determination of minimal residual disease in leukaemia patients. *Br J Haematol* 2003. 121:823-38.
- San Miguel JF, Martinez A, Macedo A, Vidrales MB, Lopez-Berges C, Gonzalez M, Caballero D, Garcia-Marcos MA, Ramos F, Fernandez-Calvo J, Calmuntia MJ, Diaz-Mediavilla J, Orfao A. Immunophenotyping investigation of minimal residual disease is a useful approach for predicting in acute myeloid leukemia patients. *Blood* 1997;90: 2465-70.
- Macedo A, Orfao A, Gonzalez M, Vidrales MB, Lopez-Berges MC, Martinez A, San Miguel JF. Immunological detection of blast cell subpopulations in acute myeloblastic leukemia at diagnosis: implications for minimal residual disease studies. *Leukemia* 1995; 9: 993-8.
- Wang JC, Beauregard P, Soamboonsrup P, Neame PB. Monoclonal antibodies in the management of acute leukemia. *Am J Hematol* 1995;50: 188-99.
- Seshadri R. Detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* 1995; 86: 2452.
- Morley A. Measurement of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1996;10: 920-2.
- Jennings CD, Foon KA. Recent advances in flow cytometry: Application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood* 1997; 90: 2863-92.
- Sievers EL, Lange BJ, Buckley JD, Smith FO, Wells DA, Daigneault-Creech CA, Shults KE, Bernstein ID, Loken MR.

## Akut Lösemide Minimal Residüel Hastalık

- Prediction of relapse of pediatric acute myeloid leukemia by use of multidimensional flow cytometry. *J Natl Cancer Inst* 1996;88: 1483-8.
12. Syrjala M, Anttila VJ, Ruutu T, Jansson SE. Flow cytometric detection of residual disease in acute leukemia by assaying blasts co-expressing myeloid and lymphatic antigens. *Leukemia* 1994; 8: 1564-70.
  13. Lavabre-Bertrand T, George F, Brunet C, Sampol J. Quantitative immune phenotyping: a new dimension for the monitoring of hemopoietic malignancies. *Nouv Rev Fr Hematol* 1994;36: 373-82.
  14. Porwit-MacDonald A, Ivory K, Wilkinson S, Wheatley K, Wong L, Janossy G. Bcl-2 protein expression in normal human bone marrow precursors and acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 1995; 9: 1191-8.
  15. Coustan-Smith E, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Razzouk BI, Pui CH, Pounds S, Andreansky M, Behm FG, Raimondi SC, Shurtleff SA, Downing JR, Campana D. Clinical significance of residual disease during treatment in childhood acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2003; 123: 243-52.
  16. Reading CL, Estey EH, Huh YO, Claxton DF, Sanchez G, Terstappen LW, O'Brien MC, Baron S, Deisseroth AB. Expression of unusual immunophenotype combinations in acute myelogenous leukemia. *Blood* 1993; 81: 3083-90.
  17. Macedo A, Orfao A, Vidrales MB, Lopez-Berges MC, Valverde B, Gonzalez M, Caballero MD, Ramos F, Martinez M, Fernandez-Calvo J. Characterization of aberrant phenotypes in acute myeloblastic leukemia. *Ann Hematol* 1995; 0: 189-94.
  18. Macedo A, San Miguel JF, Vidrales MB, Lopez-Berges MC, Garcia-Marcos MA, Gonzalez M, Landolfi C, Orfao A. Phenotypic changes in acute myeloid leukaemia: implications in the detection of minimal residual disease. *J Clin Pathol* 1996; 49: 15-8.
  19. Campana D, Coustan-Smith E, Behm FG. The definition of remission in acute leukemia with immunologic techniques. *Bone Marrow Transplant* 1991; 8: 429-37.
  20. Macedo A, Orfao A, Ciudad J, Gonzalez M, Vidrales B, Lopez-Berges MC, Martinez A, Landolfi C, Canizo C, San Miguel JF. Phenotypic analysis of CD34 subpopulations in normal human bone marrow and its application for the detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1995; 9: 1896-901.
  21. Bradstok K, Bianchi A, Makrynikola V, Filshie R, Gottlieb D. Long-term survival and proliferation of precursor-B acute lymphoblastic leukemia cells on human bone marrow stroma. *Leukemia* 1996; 10: 813-20.
  22. Orfao A, Ciudad J, Lopez-Berges MC, Lopez A, Vidrales B, Caballero MD, Valverde B, Gonzalez M, San Miguel JF. Acute lymphoblastic leukemia (ALL): detection of minimal residual disease (MRD) at flow cytometry. *Leuk Lymphoma* 1994; 13: 87-90.
  23. Campana D, Pui C-H: Detection of minimal residual disease in acute leukemia: Methodologic advances and clinical significance. *Blood* 1995; 85: 1416-34.