T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

ÇOCUKLUK ÇAĞI AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİLERİNDE MİNİMAL REZİDÜEL HASTALIĞIN TANISINDA CD 49f'NİN ÖNEMİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Tuba KURT

KAYSERİ–2013

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

ÇOCUKLUK ÇAĞI AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİLERİNDE MİNİMAL REZİDÜEL HASTALIĞIN TANISINDA CD 49f'NİN ÖNEMİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Tuba KURT

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Türkan PATIROĞLU

Bu Uzmanlık Tezi Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi Tarafından TSU-12-3805 No'lu Proje ile Desteklenmiştir.

KAYSERİ–2013

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında deneyimlerini, bilgilerini, tavsiyelerini esirgemeyen değerli hocam Sn. Prof. Dr. Türkan PATIROĞLU'na,

asistanlık eğitimime bilgi ve deneyimleri ile katkıda bulunan değerli hocalarıma,

desteklerinden dolayı Sn. Yard. Doç. Dr. Ekrem ÜNAL'a,

tezimin çalışılması süresince emeği ve tecrübesiyle yardımcı olan başta Hamza ÖTER ve tüm İmmunoloji Laboratuarı çalışanlarına,

Hematoloji-Onkoloji Kliniğimizde tedavi gören tüm çocuklarımıza,

karşılaştığımız zorlukları, hüzünleri, neşeleri, hastaları, hastalıkları paylaştığımız, birbirimize destek ve moral verdiğimiz dostlarım Duygu EKİNCİ ve Filiz TUBAŞ'a,

her zaman yanımda olan, desteğini esirgemeyen sevgili eşim Ethem'e ve aileme, varlığı ile her şeyin anlamını değiştiren kızıma...

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım…

Dr. Tuba KURT

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ..... **i**

İÇİNDEKİLER ..... **ii**

KISALTMALAR ..... **iv**

TABLO LİSTESİ ..... **vi**

EK TABLO VE ŞEKİLLER ..... **viii**

ÖZET ..... **ix**

ABSTRACT ..... **xi**

1. GİRİŞ VE AMAÇ **1**

2. GENEL BİLGİLER **3**

2.1 AKUT LÖSEMİ 3

2.1.1.Tanım 3

2.1.2.Tarihçe 3

2.1.3.Epidemiyoloji 4

2.1.4.Etyoloji 4

2.1.5.Çevresel risk faktörleri 6

2.1.6.Klinik Bulgular 7

2.1.7.Tanı 9

2.1.8.Sınıflandırma 10

2.1.9.Morfolojik sınıflandırma 10

2.1.10.Histokimyasal Boyama 11

2.1.11.İmmünofenotiplendirme 12

2.1.12.Sitogenetik ve moleküler genetik inceleme 13

2.1.13.Prognostik Faktörler 16

2.1.14.Tedavi 17

2.2. Minimal Rezidüel Hastalık 18

2.2.1.PCR yöntemi ile kromozomal aberasyonların gösterilmesi 22

2.2.2.PCR yöntemi ile klona özgü Ig ve TCR gen yeniden yapılanmalarının gösterilmesi 23
2.2.3.Flow- sitometrik immünfenotiplendirme 24
2.2.4.CD 49f ve ALL 27
3. GEREÇLER VE YÖNTEM 29
3.1.Araştırma Bilgileri 29
3.2. Çalışma Grubunun Seçilmesi 29
3.3. Örneklerin Toplanması 30
3.4.Akım Sitometrisi İle Minimal rezidüel hastalık ve CD 49f Çalışılması 30
3.4.1.Minimal Rezidüel Hastalık Çalışılması 30
3.4.2.CD 49f Çalışılması 31
3.5. İstatistiksel Değerlendirme 31
4. BULGULAR 33
4.1. Çalışma Grubunun Özellikleri 33
5. TARTIŞMA 41
6. SONUÇLAR 47
7. KAYNAKLAR 48
EKLER 59
TEZ ONAY SAYFASI.

KISALTMALAR

ABD : Amerika Birleşik Devletleri

Ag : Antijen

ALL : Akut lenfoblastik lösemi

AML : Akut myeloid lösemi

BAP : Bilimsel araştırma projeleri

BFM : Berlin Frankfurt Münster grubu

BOS : Beyin omurilik sıvısı

CD : Cluster of differentiation

COG : Children's Oncology Group

DNA : Deoksiribonükleik asit

EBV : Epstein-Barr virüs

EFS : Sağ kalım

FAB : French American British

FISH : Fluoresan in situ hibridizasyon

FITC : Fluorescein isothiocyanate

GSC : Glioblastome stem cell

HRG : Yüksek risk grubu

Ig : İmmunglobulin

KİA : Kemik iliği aspirasyonu

KİT : Kemik iliği transplantasyonu

LDH : Laktat dehidrogenaz

MoAb : Monoklonal antikor

MRD : Minimal rezidüel hastalık

MRG : Orta risk grubu

MSS : Merkezi sinir sistemi

MTX : Methotreksat

PC : Phycoerythrincyonin

PCR : Polimeraz zincir reaksiyonu

PE : Phycoerythrin

Ph^+ : Phedelphia kromozomu

RNA : Ribonükleik asit

SD : Standart sapma

SRG : Standart risk grubu

TCR : T-cell reseptör

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Lösemi eğiliminin arttığı durumlar 7

Tablo 2. Lösemide MSS tutulum sınıflaması 10

Tablo 3. FAB'a göre ALL'de morfolojik sınıflama..... 11

Tablo 4. Akut lösemilerde histokimyasal boyanma özellikleri 12

Tablo 5 ALL'de prognostik faktörler 17

Tablo 6: MRD tekniklerinin özellikleri..... 21

Tablo 7. Hastaların tanı anı laboratuvar sonuçları 34

Tablo 8. Sitomorfolojik kriterler ve MRD..... 37

Tablo 9. Olguların tanı anı ve 15. gün CD 49f düzeyleri 38

Tablo 10. MRD'ye göre tanı anı ve 15. gün CD 49f ekspresyonu arasındaki ilişki 39

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Çocukluk çağı ALL hastalarında saptanan özgün genotipik bozuklukların tahmini sıklığı 15

Şekil 2. MRD'ye göre risk sınıflaması 20

Şekil 3. Hastaların dağılımı..... 33

Şekil 4. MRD oranları..... 35

Şekil 5. Risk sınıflaması ve MRD 36

Şekil 6. MRD ve tanı anı CD 49f'nin ilişkisi..... 38

Şekil 7. MRD pozitifliği ve negatifliği durumunda 15. Gün CD 49f..... 39

Şekil 8. 15. Gün MRD ve CD 49f'nin ilişkisi..... 40

EK TABLO VE ŞEKİLLER

Ek tablo 1. Çalışma grubundaki hastaların tanı anındaki klinik ve labaratuvar özellikleri 60

Ek tablo 2: Hastaların tanı anı ve 15. Gün CD 49f değerleri 61

Ek tablo 3: Hastaların MRD sonuçları 61

Ek Şekil 1: MRD % 0,11 62

Ek Şekil 2: MRD % 16,34 63

Ek Şekil 3: CD 49f % 34 64

ÇOCUKLUK ÇAĞI AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİLERİNDE MİNİMAL REZİDÜEL HASTALIĞIN TANISINDA CD 49f'NİN ÖNEMİ

ÖZET

Amaç: Çocukluk çağında en sık görülen malignite olan akut lenfoblastik lösemide (ALL) yeni tedavi rejimleri ile birlikte %95 tam remisyon sağlanmaktadır. Buna rağmen %25-30 hastada relaps izlenmektedir. Prognozu belirleyen en önemli faktör olan minimal rezidüel hastalık (MRD), 10^{-3}-10^{-6} lösemik hücreyi tespit edebilmektedir. Berlin Frankfurt Münster grubu ALL'li çocuklarda 15. gün yapılan kemik iliği aspirasyonlarında MRD < %0.1 oluşunu düşük, >%10 ise yüksek risk olarak tanımlamışlardır. Yapılan çalışmalarda, MRD negatif hastalarda %2, MRD pozitif hastalarda %70-100 relaps olduğu gösterilmiştir.

Yapılan bir çalışmada, normal ve ALL'li hastalarda tanı anı, tedavinin 15 ve 29. günlerinde CD 49f ekspresyonunu değerlendirilmiş, tanı anında orta derecede CD 49f ekspresyonu, 15 ve 29. gün MRD pozitif hastalarda CD 49f ekspresyonu, B hücrelerin gelişiminin tüm evresinde hafif CD 49f ekspresyonu gösterilmiştir.

CD 49f T hücreler, monosit, trombositler, epitelyal ve endotelyal hücreler, prekürsör B lenfoblastlarda eksprese edilen adhezyon molekülüdür. Bu çalışma, CD 49f'nin preB-ALL'li hastalarda MRD tespitinde yararlı olup olmadığını araştırmak amacı ile yapıldı.

Gereç ve yöntemler: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Hematoloji-Onkoloji Bilim Dalında Ocak 2012- Ocak 2013 tarihleri arasında takip edilen Pre-B ALL'li 27 hastada 5 renkli akım hücremetresi kullanılarak tanı anında immünofenotiplendirme yapıldı ve CD 49f ekspresyonu araştırıldı. Tedavinin 15. günü kemik iliği örneklerinde MRD tayini yapıldı ve CD 49f ekspresyonu yinelendi. Normal dağılıma uyan veriler ortalama ile ifade edildi ve ikili karşılaştırmalarda student t testi, normal dağılıma uymayan değişkenlerin karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi uygulandı. İkiden fazla grupların verileri Kruskal-Wallis ve Chi-kare testleri ile karşılaştırıldı.

Bulgular: Çalışma, ortalama yaşları 79.3±58.3 ay olan 10'u kız 17'si erkek, 27 pre-B ALL'li hasta üzerinde yapıldı. BFM risk kriterlerine göre 6 hasta standart, 14 hasta orta, 7 hasta da yüksek risk grubunda yer almakta idi ve tedavileri risk gruplarına göre uygulandı. Bir hastada t(9;22) saptandı. Beş hastada ise 8. gün steroid tedavisine yanıt

alınamadı. On beşinci günde MRD < %0.1 olan hasta sayısı 11 iken 15'inde MRD pozitifliği saptandı ve bu hastaların 10'unda 8. gün steroid cevabının olduğu gözlendi. Tanı anında hastaların CD 49f ekspresyonu ortalama %38.47±22.11 iken 15.günde %5.49±12.60 bulundu. On beşinci gün MRD pozitifliği ile CD 49f ekspresyonu karşılaştırıldığı zaman istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyona rastlanmadı.

Sonuç: CD 49f'nin lösemik hücrelerde yüksek oranda eksprese edildiği, 15. günde bu ekspresyonun azalarak devam ettiği ve 15. gün MRD değeri ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon olmadığı gözlendi. MRD takibinde CD 49f ekspresyonunun kullanılabilmesi için daha fazla sayıda hastayı kapsayan çalışmaların gerekli olduğu kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: Akut lenfoblastik lösemi, minimal rezidüel hastalık, CD 49f

SIGNIFICANCE OF CD 49f in DIAGNOSIS OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE IN CHILDHOOD ACUTE LEUKEMIAS

ABSTRACT

Objective: Complete remission rate of 95% is achieved by novel therapeutic regimens in acute lymphoblastic leukemia (ALL) which is the most commonly seen malignancy in childhood. MRD, the most important factor predicting prognosis, can detect 10^{-3} to 10^{-6} leukemic cells. In the children with ALL, Berlin Frankfurt Münster (BFM) group defined MRD <0.1 % as low and MRD > 10% as high risk factor in the bone marrow aspiration. It was shown that relapse rate was 2% in MRD negative patients whereas 70-100% in MRD positive patients.

In a study which CD 49f expression was evaluated at diagnosis and on the days 15 and 29 after diagnosis, CD 49f expression was shown in MRD positive patients and a mild CD 49f expression throughout all stages in the development of B cells.

CD 49f is an adhesion molecule expressed in T cells, monocytes, thrombocytes, epithelial and endothelial cells and precursor B lymphoblasts. The present study was conducted to evaluate whether CD 49f is useful in the detection of MRD in patients with pre-B cell ALL.

Material and Method: Immunophenotyping and CD 49f expressions by using 5-colors flow cytometer were performed at the time of diagnosis in 27 patients with Pre-B cell ALL who had been followed at Erciyes University, Medicine School, Department Pediatric Oncology & Hematology between January, 2012 and January, 2013. On the day 15 after initiation of the treatment, MRD detection was performed on bone marrow specimens and CD 49f expression was re-evaluated. Data with normal distribution was expressed as mean. Student t test was used in paired comparisons, whereas Mann Whitney U test was used to compare data without normal distribution.

Findings: This study was conducted on 27 patients with Pre-B cell ALL (10 girls, 17 boys; mean age: 79.3±58.3 months). According to BFM risk criteria, 6 patients was in standard risk group, whereas 14 patients in moderate and 7 patients in high risk group. All treatments were given according to risk groups. In one patient, t(9;22) was detected.

On the day 8, five patients didn't response steroid therapy. On the day 15, number of patients with MRD > 0.1% was 11, while MRD positivity was detected in 15 patients. Of the 15 patients with MRD positivity, response to the steroid therapy was detected in 10 patients on the day 8. The mean CD 49f expression was 38.47±22.11% at the time of diagnosis while it was found as 5.49±12.60 on the day 15. No significant correlation was found between MRD positivity and CD 49f expression were compared on the day 15.

Conclusion: It was observed that CD 49f was expressed in leukemic cells at a high rate; expression was persisted on the day 15 with a gradual decrease; and it wasn't correlated to MRD value when compared on the day 15. It was concluded that further studies with larger sample size is needed to use CD 49f for MRD monitoring.

Key words: Acute lymphoblastic leukemia, minimal residual disease, CD 49f

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Lösemiler, hematopoietik öncül hücrelerin neoplastik değişimi sonucu ortaya çıkan klonal hastalıklardır. Lösemik lenfoblastların morfolojik, immunolojik, sitogenetik, ve moleküler genetik özelliklerinin incelenmesi ile akut lenfoblastik lösemi (ALL)'nin biyolojik çeşitliliği gösterilmiştir (1).

Çocukluk çağındaki lösemiler tüm kanserlerin %30-35 ini oluştururken, ülkemizde sıklık %31,3 olarak bildirilmiştir (2). Sıklık batı ülkelerinde 15 yaş altındaki çocuklarda yaklaşık 100.000 de 4 olup, kalıtsal ve çevresel etkenler nedeni ile en düşük Afrika'da olmak üzere dünyanın değişik yerlerinde önemli farklılıklar gösterebilmektedir (3).

Çocukluk çağı ALL'sinde prognostik faktörler lökosit sayısı, tanıdaki yaş, cinsiyet, ırk, organomegali varlığı ve lenfadenopatinin derecesi, mediastinal kitle, tanı sırasındaki hemoglobin seviyesi, tanıdaki trombosit sayısı, French American British'e (FAB) göre morfoloji, sitogenetik, immünofenotipik alt grup, miyeloid seri antijen pozitifliği şeklinde sıralanmaktadır. Serum immünoglobulin seviyeleri, santral sinir sistemi tutulumunun varlığı, nütrisyonel durum, lenfoblastların taşıdığı glukokortikoid reseptör düzeyi ve remisyona girme süresi de diğer prognostik faktörler arasındadır (4).

Bugünkü sitotoksik tedavi protokolleri, sitomorfolojik kriterlere göre %95-98 çocukta tam remisyon sağlamaktadır (5). Buna rağmen %25-30 hastada relaps olmaktadır.

Remisyon değerlendirmesi için, morfolojik kriterler yeterli olmadığından daha duyarlı tekniklere gerek duyulmaktadır.

Minimal rezidüel hastalığın (MRD) tayini ile 10^{-3}-10^{-6} lösemik hücre tespit edilebilmektedir. Flow sitometrik ve moleküler genetik yöntemleri ile MRD tayini yapılabilir (6-9). Yapılan geniş retrospektif çalışmalarda ALL'li çocuklarda MRD'nin prognostik değeri gösterilmesine rağmen, çalışmaların sonuçları tamamen uyumlu değildir. İndüksiyon tedavisi sonunda rezidüel hastalığın yokluğu iyi prognoz lehinedir (10-12). Hastaların yarısında, remisyon indüksiyon sonrası MRD pozitif kalmaktadır.
B-ALL'de MRD tayininde flow sitometri ile immünfenotipleme hızlı, duyarlı ve çoğu vakada uygulanabilirliği kolay bir yöntemdir (13). Normal ve lösemik B hücre prekürsörlerinde bir veya daha fazla antijen ekspresyonunda farklılıklar vardır. Yakın zamanda yapılan gen ekspresyon çalışmalarında integrin α'nın (CD 49f) aşırı ekspresyonu olduğu gösterilmiştir (14). MRD'de saptanan CD 49f'nin kullanılabilirliği tam olarak açıklanamamıştır (15). Bu çalışma, CD 49f ekspresyonunun pre-B ALL'li hastalarda MRD tayininde yararlı olup olmadığını ve flow sitometrik MRD yöntemi ile uyumlu olup olmadığını araştırmak amacı ile yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 AKUT LÖSEMİ

2.1.1.Tanım

Akut lösemi, hematopoetik öncü hücrelerin neoplastik değişimi sonucu hücrelerin farklılaşma ve olgunlaşma yeteneğini kaybetmesi ve kemik iliğini, periferik kanı ve diğer dokuları istila etmesi ile normal kan hücrelerinin yapılamaması ve tutulan organların işlev bozukluğu ile karakterize kemik iliğinin malign hastalığı olarak tanımlanmıştır (16-17). Kelime anlamı 'beyaz kan' olan lösemi, tedavi edilmediğinde ölümle sonuçlanan geniş bir hastalık grubudur (18).

2.1.2.Tarihçe

İlk yazılı kanser olgusunun izlerine İsa'dan önce 1600 yıllarına kadar ulaşılabilmesine rağmen, ilk lösemili olgu 1827 yılında Velpeau tarafından bildirilmiştir. (19-21). Mikroskobun keşfi ve hematopoetik hücrelerin tanımlanmasından sonra 1845 yılında Rudolf Virchow, John Hughes Bennet ve David Craigie tarafından tanımlanan lösemi hücreleri, 1847 yılında Alman patolog Virchow tarafından beyaz küre anlamına gelen 'leukhemia' şeklinde tanımladı (19-21).

Freidreich, 1857 yılında ölümünden 6 hafta önce başvuran 46 yaşındaki erkek hastada saptadığı renksiz hücrelerin lökosit olduğunu saptadı ve olgu tanımında 'akut lösemi' terminolojisini kullandı. Paul Ehrlich, 1877 yılında triasit boyama ile

nükleus, sitoplazma ve diğer hücresel elemanlarını inceleyerek tüm hücrelerin tek bir kök hücreden çoğaldığını öne sürdü. Neagelli ise, 1900 yılında lenfoblastların lenfoid hücre dizisine, miyeloblastların ise miyeloid hücre dizisine ait olduğunu bildirdi (19).

2.1.3.Epidemiyoloji

Birçok gelişmiş ülkede, 15 yaş altındaki çocuklarda kazalardan sonra ikinci sırada ölüm nedeni olan kanser, ülkemizde kayıtların yeterince sağlıklı olmamasından dolayı, dördüncü sırada yer alır. Çocukluk çağı kanserleri içinde ALL sıklık açısından birinci sıradadır. Ülkemizde çocukluk çağı ALL sıklığı % 34,9 olarak bildirilmiş olup, bunu lenfomalar ve merkezi sinir sistemi (MSS) tümörleri izlemektedir (22) ALL, sıklıkla 2-5 yaşları arasında görülmektedir. Amerika Birleşik Devletinde (ABD)'de, on beş yaş altında görülme sıklığı 39,9/1.000.000 olarak bildirmektedir (19, 23).

2.1.4.Etyoloji

Hematopoetik sistemin klonal bozukluğu olan akut löseminin etyolojisi bilinmemektedir; ancak bir hücrede oluşan mutasyonun o hücreden gelişen nesle aktarıldığı bilinmektedir. Olgularının %5 kadarında kalıtsal genetik sendrom sonucu görülmektedir (19,24) Genetik faktörlerin rolü, ailevi olguların bildirilmesi, kardeşlerde özellikle de ikizlerde sıklığının genel topluma göre daha yüksek olması, ALL ile yapısal kromozamal bozukluklar, genetik instabilite sendromları ve diğer genetik hastalıklarla olan ilişkisinden anlaşılmaktadır. Benzer şekilde özellikle transloklasyon saptanan hastaların, saklanmış olan Guthrie kartlarından elde edilen DNA örneklerinde aynı genler olduğu gösterilmiştir (25). Bu durum löseminin başlangıcının intrauterin hayatta başladığına delil sayılmaktadır. Ayrıca karsinojen metabolizması enzimlerindeki detoksifikasyon ve enfeksiyona karşı oluşan bağışıklık cevabında rol alan genlerdeki polimorfizm de lösemi riskini dolaylı olarak artırmaktadır (19).

Patogenezde tek bir mutasyondan daha çok ardışık birkaç mutasyon sonrası oluşan mutant hücrenin çoğalması sorumlu tutulmaktadır. Bu teoriler arasında en fazla destek gören Knudson'un iki vuruş "two hits" teorisidir (26). Bu düşünceye göre çocuk henüz anne karnında iken ilk mutasyon oluşur. İkinci mutasyonsa postnatal dönemde çevresel faktörler sonucunda (enfeksiyon, radyasyon, toksin, diyet, immün supresyon, vb) gelişmektedir. Tüm bu mutasyonlar sonucunda; tümör baskılayıcı genlerde fonksiyon

kaybı (delesyon, hipometilasyon veya mutasyon), protoonkogenlerde fonksiyon kazanımı (mutasyon, translokasyon, amplifikasyon) olmaktadır. Apopitoza karşı direnç kazanan tek bir hücrenin çoğalma yeteneğini kaybetmeden farklılaşma özelliğini kaybetmesi sonucu ölümsüz lösemik klon gelişir ve bu sürekli çoğalan hücreler kemik iliği ve organları istila ettiğinde lösemi, klinik olarak saptanacak duruma gelir. Genellikle lösemi kemik iliğinden başlayıp diğer organlara yayılır, ancak nadiren de kemik iliği tutulumu, organ tutulumundan sonra olabilir (ekstramedüller başlangıç) (17).

Hematopoetik hücrelerin malign dönüşümünden, normal proliferasyonun kontrolündeki bozulma, farklılaşmada görülen blok, apopitotik sinyallere direnç geliştirme ve artmış hücresel yenilenme kabiliyeti gibi 4 mekanizma sorumlu tutulmaktadır. *Myc, TAL1, LYL1, LMO2, HOX 11* gibi onkoproteinlerin artmış expresyonu, blast oluşumunda rol alır. Diğer lösemi oluşum mekanizması, kromozomal translokasyonlar ile füzyon genlerin sonucunda aktif kinazların kodlanmasındaki artıştır (örn: *BCR-ABL* füzyonudur). *TEL-AML1, E2A-PBX1 ve MLL* gibi füzyon genlerinin oluşumu diğer lösemi oluşum teorileri arasında yer almaktadır.

Primer onkojenik olayların tek başına lösemiyi tetiklemede yetersiz olduğu, ikincil mutasyonların lösemi gelişimi için gerekli olduğu saptanmıştır. Hematopoetik hücrelerin normal gelişiminde rol alan *FLT-3*, bir tirozin kinaz reseptörü olup, aşırı ekspresyonu ikincil mutasyonlara bir örnektir (17,19,24,27).

Çocukluk çağı lösemilerinde çok sayıda kromozomal anormallikler saptanmıştır. Bu anormallikler bazı morfolojik alt gruplarda daha sık görülmesine rağmen morfolojik alt tipe özgün değildir. Güncel çalışmalara göre çocukluk çağı ALL hastalarında en sık görülen resiprokal translokasyon olan t(12;21) (p13;q22) *TEL* ve *AML* genleri arasında füzyona yol açmakta ve hastaların yaklaşık %25'inde görülmektedir (28). Bu translokasyon karyotip çalışmalarında saptanmamaktadır. İnfant lösemisi hariç ALL'lerin yaklaşık %25'inde hiperdiploidi saptanmaktadır.

Children's Oncology Group (COG) tarafından yapılan olgu kontrollü çalışmada aynı bölgede, yaşıtları ile kıyaslandığında ALL ve AML saptanan çocuklarda Down sendromu, doğumsal kalp hastalığı ve çoklu doğum izlerinin daha sık olduğu bildirilmiştir (29). İngiltere'den yapılan başka bir çalışma ise lösemi ve lenfoma

saptanan çocuklarda, solid tümörlü çocuklara göre daha az sıklıkta doğumsal anomali olduğunu bildirilmiştir. Bu çalışmada, hematopoezde görevli hücrelerin gelişiminin geç evrelerinde olduğu ve bu evrede olan mutasyonların lösemi ve lenfoma oluşturduğu öne sürülmüştür (30).

Down sendromu, Konjential agammaglobulinemi, Nörofibramatozis, Poland sendromu, Shwachman-Diamond sendromu, Ataksi Telenjiektazi, Fanconi aplastik anemisi, Li Fraumeni sendromu, Diamond Blackfan anemisi, Kostmann sendromu ve Bloom sendromu gibi çeşitli genetik hastalıklarda akut lösemi sıklığında artış vardır (16-17). Trizomi 21'de 10 yaşından önce lösemi riski 1/95, Bloom Sendromu'nda 30 yaşından önce lösemi riski 1/8, Fanconi Anemisi'nde 16 yaşından önce lösemi riski 1/12 olarak saptanmıştır (Tablo 1) (16-17).

Lösemili hastalarda ailesel kümelenme bilinen bir gerçektir. Monozigot ikizlerde; hayatın ilk beş yılı içinde ikizlerden birinde lösemi gelişirse, ikinci ikizde de gelişme riski % 20'dir. Lösemili bir hastanın kardeşlerinde de lösemi görülme insidansı genel topluma göre dört kat daha yüksektir (16-17). Bununla beraber ABD, İngiltere ve Kanada'dan bildirilen ve 197 ikizden birinde lösemi saptanan olgunun sadece üçünde (% 1.5) eş zamanlı lösemi bildirilmiş olup bu oran monozigotik ikizlerde % 3.9 'dur (31). Lösemiye yol açan bir mutasyonun ortak paylaşımından farklı olarak bir fetüste lösemik klonun geliştiği ve ortak plasenta dolaşımı ile diğer fetüse yayıldığını destekleyen moleküler bulgular vardır. Moleküler çalışmalar, 3-11 yıl sonra lösemi gelişen ikiz kardeşte uzamış latent dönemin eşlik ettiği in-utero başlangıca işaret etmektedir (32).

2.1.5.Çevresel risk faktörleri

ALL gelişiminde özellikle viral olmak üzere enfeksiyonların da etkileri vardır. ALL ile en yakın ilişkili virüs Epstein-Barr virusu (EBV) olup Burkitt lenfoma/lösemi (ALL-L3) blastlarının genomunda Afrika'da %95, Avrupa ve Kuzey Amerika'da %20 oranında latent membran proteini olmak üzere EBV genomu gösterilmiştir. Afrika tipi Burkitt lenfoma ve lösemide plazmodyum ile EBV etkileşimi üzerinde durulmaktadır (Tablo 1) (17,19,24).

Tablo 1. Lösemi eğiliminin arttığı durumlar (17,19,24)

	Lösemi gelişme riski
1- Radyasyon, elektromanyetik alan	
2- Kimyasal maddeler	
• Benzen ve metabolitleri fenol, hidrokinon, katekol, benzenetriol vb)	
3- İlaçlar	
• Alkilleyici ajanlar ve epipodofilotoksin	
4- Genetik	
• Lösemili çocuğun ikiz kardeşi olma	İlk beş yılda %20
• Lösemili çocuğun kardeşi olma	Toplumdan 4 kat fazla
Kromozom bozuklukları	
• Down sendromu	1/95
• Bloom sendromu	1/8
• Fanconi anemisi	1/12
• Değişik genetik sendromlar (Konjenital agammaglobunemi, Poland sendromu, Shwachman-Diamond, Ataksi telenjiektazi, Li-Fraumeni, Nörofibromatosis, Diamond-Blackfan anemisi, Kostmann, Wiskott- Aldrich sendromu)	
Enfeksiyonlar (özellikle EBV)	

2.1.6.Klinik Bulgular

ALL de klinik bulgular kemik iliğinin ve ekstra medüller organların infiltrasyonuna bağlı gelişmektedir. Lenfoblast infiltrasyonu sonucu kemik iliği yetmezliği bulguları (anemi, kanama ve enfeksiyon) görülürken organ infiltrasyonları sonucu hepatosplenomegali ve lenfadenopati oluşmaktadır. Hastalık bulgu ve belirtilerinde bireysel farklılıklar olabileceği de unutulmamalıdır (16-17). İlk belirti ve bulgular ateş, letarji, aşırı yorgunluk hissi, kemik ağrısı ya da iştahsızlık şeklindedir. Ateş lösemiye veya enfeksiyona bağlı olabilir. Lenfoblastların kemik iliğini işgal etmesi ve normal eritropoezin bozulması sonucu meydana gelen anemide, solukluk, halsizlik, çarpıntı,

nefes darlığı ve ağır durumlarda kalp yetmezliği bulguları gelişir. Lökopeni ve nötropenide enfeksiyonlara ait bulgular, trombositopenide ise peteşi, purpura, ekimoz, mukoza ve iç organ kanamalarına ait belirti ve bulgular saptanır.

Lenfadenopati sıklıkla vardır. Çocukların % 30-60'ında tanı esnasında belirgin hepatomegali ve/veya splenomegali mevcuttur. Hepatomegali yüksek lökosit sayısı ile birliktelik göstermektedir. MSS tutulumunda baş ağrısı, bulantı, kusma gibi kafa içi basıncı artışı bulguları görülebilirken fokal nörolojik bozukluklar da izlenebilir.

Hastalarda önemli bir klinik bulgu da kemik ağrısı, topallama ve yürümeyi reddetmedir. En sık uzun kemiklerde ve sternumda ağrı saptanır. Ağrı lösemik hücrelerin periostu tutmasından, kemik enfarktından ya da kemik iliği mesafesinin artan blast yükü ile genişlemesinden kaynaklanmaktadır (18,33). Belirgin kemik ağrıları olan çocukların çoğunda hematolojik parametrelerin normal değerde olması ve bazı hastalarda periferik kanda lösemik hücre bulunmaması nedeniyle (alösemik lösemi) tanı gecikebilmektedir (16,17). Bu hastalar septik artrit, akut romatizmal ateş veya romatoid artrit gibi yanlış tanılarla izlenebilir.

Beyin omurilik sıvısında (BOS) lenfoblastların bulunması olarak tanımlanan MSS tutulumu, yeni tanı alan ALL'li çocukların % 1.5-10'unda bulunur. Tanı anında yüksek lökosit sayısı ile başvuran ve göreceli olarak daha az rastlanan olgun B hücreli ALL de daha sık görülür. Tanı anında ense sertliği olmaksızın baş ağrısı, kusma, göz dibi ödemi ve letarji gibi kafa içi basıncı artışı bulgularına eşlik eden yaygın ve fokal nörolojik bulgular MSS lösemisi olan çocuklarda görülebilir. Bazen MSS hastalığının diğer bulguları olmaksızın kranial sinir felçleri saptanabilir. Bundan dolayı kranial sinir tutulumu açısından dikkatli nörolojik değerlendirme yapılmalıdır (17,19). MSS lösemisi insidansı kullanılan tanısal kriterlere bağlı olarak son derece değişkendir. Roma Uluslararası Çalışma Grubu, 1986 yılında bir BOS'unda mm^3'te 5'den fazla blast saptanmasını MSS lösemisi olarak tanımlamayı önermiştir (34). Bazı araştırmacılar tanı anında BOS'ta az sayıda blast olmasının daha sonra MSS lösemisi veya MSS relapsı gelişme ihtimalinin düşük olduğunu bildirirken, başka bir çalışmada düşük sayıda blast olan (100'lük büyütme alanında 5'ten az) ve muhtemelen lösemik hücrelerin saçılma olasılığı nedeni ile tanı anındaki ilk lomber ponksiyonu travmatik olan hastalarda MSS relaps riskinin arttığı gösterilmiştir (35).

ALL tedavisinde kullanılan ilaçların çoğunun MSS geçişi yetersiz olduğundan lösemik blastlar, sistemik kemoterapi uygulanmasına rağmen MSS'de kalabilir, hastalığın tekrarına veya tedaviye dirençli klonun ortaya çıkmasına yol açabilmektdir. Lokalize epidural lösemik infiltrasyon, sırt ağrısı, ekstremitelerde zayıflık, paraliziler ve mesane veya barsak inkontinansı ile seyreden spinal kord basısına yol açabilir. Manyetik rezonans görüntüleme, lösemik infiltrasyonu göstermede ve epidural hematom ile lösemik infiltrasyona bağlı vertabra korpus kollapsını ayırmada yardımcıdır.

ALL'de tanı anında belirgin testis tutulumu görülmesi nadirdir ve dikkatli fizik muayene veya ultrasonografi ile saptanabilir. Tanı anında testis biyopsisi yapılan çocukların yaklaşık % 25'inde lösemik blastlar saptanır (36). Gizli testis tutulumu tanı anında lökosit sayısı 25000/mm^3 olan erkek çocuklarda daha sık görülür. Klinik olarak testis relapsı genellikle ağrısız ve tek taraflıdır. Tek taraflı testis relapsında yapılan bilateral testis biyopsisinde, karşı taraf testisde de sıklıkla gizli/sessiz lösemik infiltrasyon saptanır. Testikuler relaps insidansı, kan testis bariyerinin kan beyin bariyerine benzer olması nedeniyle ovarian relapsa göre göreceli olarak daha yüksektir. Bununla beraber son yıllarda metotreksatın (MTX) içinde bulunduğu yüksek doz kemoterapileri içeren yoğun çoklu ilaç rejimlerinin yaygın şekilde kullanılması testis relapslarını belirgin olarak azaltmıştır (19).

2.1.7.Tanı

ALL tanısında kemik iliği aspirasyonu tercih edilen yöntemdir. Kemik iliği tutulumu olmadan ekstra medüller tutulum çok nadir olmakla beraber bu durumlarda tutulan organdan alınan örnekler ile tanıya gidilebilir.

ALL olgularında aşağıdaki tanısal testlerin yapılması önerilmektedir (16,17).

1. Kan sayımı
2. Periferik kan yayması
3. Kemik iliği aspirasyonu
4. Göğüs grafisi
5. Biyokimyasal tetkikler
6. BOS incelemesi
7. Koagülasyon parametreleri

8. Kardiak fonksiyonlar

9. Enfeksiyon profili

10. İmmünolojik inceleme

Tablo 2. Lösemide MSS tutulum sınıflaması

Tanım	Açıklama
MSS-1	BOS ta blast yok
MSS-2	BOS ta < 5/mm^3 blast
MSS-3	BOS ta ≥ 5 blast ve/veya kranial sinir tutulumu

2.1.8.Sınıflandırma

Çocukluk çağı ALL sınıflandırması morfolojik, immünolojik ve sitogenetik özelliklerin bir arada değerlendirilmesi ile yapılmaktadır.

2.1.9.Morfolojik sınıflandırma

Günümüzde ALL'nin morfolojik ayrımında en sık kullanılan ve lenfoblastları hücre boyutu, çekirdek ve sitoplazma görünümü gibi morfolojik özelliklere göre L1, L2 ve L3 olarak alt gruplarına ayıran sınıflama FAB sınıflamasıdır (Tablo 3) (19). Akut lenfoblastik lösemiler içinde %85 oranı ile en sık görülen L1 morfolojisi olup, L2 (%14) ve L3 (%1) morfolojisine göre prognozu en iyi olandır (16,17).

Değişik çalışmalarda aynı ALL olgularının farklı hematologlar tarafından değerlendirmesinde FAB sınıflamasına göre farklı sonuçlar bildirilmektedir. Bunun nedeni de L1 ile L2'nin ayrımındaki kıstasların subjektif olmasıdır. L3 olgusunun tanısında genelde güçlük çekilmez (37).

Tablo 3. FAB'a göre ALL'de morfolojik sınıflama

Lenfoblast	**L1**	**L2**	**L3**
Büyüklük	Küçük	İri, değişken	Büyük
Kromatin	Yoğun	Değişken	İnce
Çekirdek	Düzgün	Düzensiz, çentikli	Düzgün
Çekirdekçik	Yok, küçük	Büyük, belirgin	Belirgin
Sitoplazma	Çok dar	Daha geniş	Geniş
Sitoplazmik bazofili	Hafif, orta	Değişken	Koyu
Sitoplazmik vakuol	Değişken	Değişken	Belirgin

2.1.10.Histokimyasal Boyama

Blastların bazı boyalar ile boyanma özellikleri lösemi tipini belirlemek için faydalıdır. Histobiyokimyasal boyamada, miyeloperoksidaz, sudan siyahı boyası, Periodic-Asid-Schiff, asid fosfataz, nonspesifik esteraz, terminal deoksinükleotidil transferaz, demir boyaları kullanılmaktadır. Bunların farklı kombinasyonlarda pozitif olması lösemi tanısını desteklemektedir (16,17) (Tablo 4).

Tablo 4. Akut lösemilerde histokimyasal boyanma özellikleri

	ALL	**AML**
Nonenzimatik		
Periodic-asid-Schiff	pozitif	negatif
Sudan siyahı	negatif	pozitif
Enzimatik		
Miyeloperoksidaz	negatif	pozitif
Alkalen fosfataz	normal	düşük
Esteraz		
Naftol AS-D kloroasetat	negatif	pozitif
Naftol AS-D asetat	negatif ya da zayıf pozitif	pozitif
Alfa naftil asetat	negatif	negatif
Asit fosfataz	T-ALL'de pozitif	negatif

2.1.11.İmmünofenotiplendirme

Lösemi, klonal bir hastalık olduğu için farklılaşmanın bir evresinde duraksamış hematopoetik hücrelerin anormal çoğalmaları ile ortaya çıkmaktadır. Florokrom işaretli monoklonal antikorlarla hücresel antijenlerin tanımlanması ve miktarının saptanması olarak tanımlanan immunofenotiplendirme, akım sitometrinin en önemli uygulama alanlarından biri olmuştur (38). İmmünolojideki gelişmeler sonucu, 1980'li yılların başlarında, B ve T hücreleri ile ilgili elde edilen yeni bilgiler, akım sitometri ile hücrelerin immunfenotipik olarak tanımlanması ve sınıflandırılması mümkün olmuştur (19,27,38). Lenfositlerin gelişim aşamalarında yüzeylerinde beliren ve kaybolan farklı antijenik yüzey belirleyicilerine farklılaşma kümeleri "Cluster of differentiation" (CD) denir. Bunlar adeta bir etiket gibi o hücrenin hangi gelişim aşamasında olduğu hakkında bilgi verir. Akım sitometrinin devam eden gelişimi sayesinde akut lösemilerin biyolojisinin anlaşılması konusunda hızlı ilerlemeler olmuştur. Akım sitometri, kısa

sürede ve fazla sayıda hücrede çalışma yapmaya olanak vererek objektif sayısal veri elde edilmesini sağlamaktadır. Ayrıca, birçok farklı hücresel parametreleri aynı anda saptayabilir, kaydedebilir (multiparametrik analiz) ve farklı hücre topluluklarını ayırabilir. Çok az sayıdaki lösemik hücrenin, klasik morfolojik yöntemlerden çok daha duyarlı bir şekilde saptanmasına da olanak sağlar. Az sayıdaki hücrenin analizi, sadece löseminin ilk tanısında değil, aynı zamanda tedavi edilen hastalarda, klinik belirtiler ortaya çıkmadan önce relaps veya rezidüel löseminin saptanabilmesinde de önemlidir. Ayrıca akım sitometri rezidüel lösemik hücrelerin toplanıp ileri çalışmalar yapılmasına da olanak sağlar.

ALL'nin hangi seriye ait hücreden kaynaklandığını gösteren immunofenotip çalışmaları ile hastalık, klinik ve biyolojik özellikleri farklı iki ana kısma ayrılır; öncül B ALL (B-ALL) ve öncül T ALL (T-ALL). B-ALL, CD 19, CD 20, CD 22, CD 24 ve CD 79a (sitoplazmik) gibi bir çok farklı özgül antijenlerin eksprese edilmesi ile karakterizedir. B-ALL'nin büyük bir kısmı "common" akut lenfoblastik lösemi antijen (CALLA) eksprese eder ve CD 10 monoklonal antikorları ile işaretlenir. Lösemik blastlar tarafından sıklıkla eksprese edilen diğer antijenler, CD 34, HLA DR ve terminal deoksinukleotidil transferaz gibi erken evre B hücre öncülerinde sıklıkla görülen belirteçlerdir. B-ALL, hücrede immünglobulin (Ig) ekspresyon şekline bağlı olarak, (a) erken pre-B, (b) pre-B, (c) geçiş "transizyonel" pre-B, (d) olgun B hücreli olarak sınıflandırılabilir. Erken pre-B (veya pro-B) ALL' de Ig ekspresyonu yoktur, pre-B ALL de ise Ig hafif zinciri ekspresyonu olmaksızın sitoplazmik μ zinciri eksprese edilmektedir. Geçiş "tranzisyonel" pre-B-ALL'de ise Ig hafif zinciri ekspresyonu veya kısıtlaması olmaksızın, μ zincirlerinde sitoplazmik ve hücre yüzeyinde eksprese edilmektedir. CD 34 ve Tdt ekpresyonu yokluğu gibi olgun B hücrelerinin diğer özellikleri ile birlikte hafif zincir kısıtlamalı tam IgM yüzey ekspresyonu gösterebilir (39). B-ALL'li çoğu vakada, bir veya birkaç miyeloid antijen ekspresyonu (sıklıkla CD 13 ve CD 33, daha az CD 11b, CD 15, vb) görülebilir.

2.1.12.Sitogenetik ve moleküler genetik inceleme

Günümüzde genetik alanındaki yeni gelişmelerin kullanılması ile ALL'de % 90'ın üzerindeki hastada kromozomal bozukluklar tespit edilmektedir. Sitogenetik bozukluklar açısından yapısal ve sayısal olmak üzere iki büyük sınıf kromozom

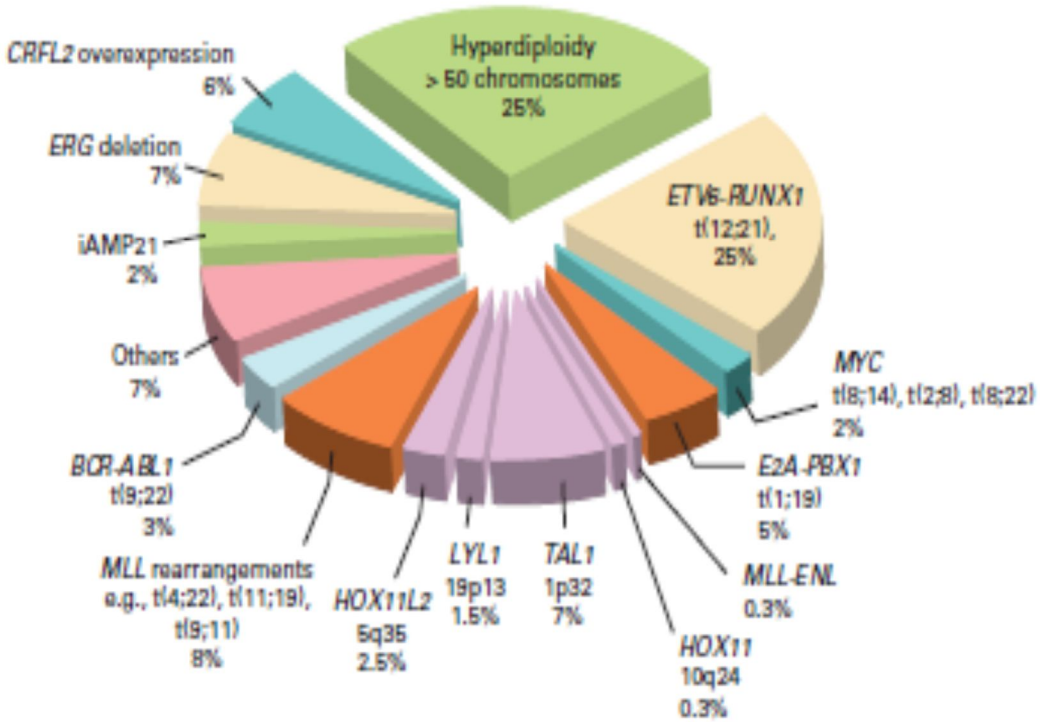
bozukluğu vardır. Yapısal bozukluklarda kromozomal materyalin kaybı ve eklenmesi ile DNA'nin fark edilebilir kaybı veya kazanımı olmaksızın dengeli değişim görülür. Dengeli yer değiştirmeler iki veya daha fazla kromozom arasında (translokasyon) ya da bir kromozomun farklı parçaları arasında (inversiyon) genetik materyalin karşılıklı değişimi seklinde olmaktadır. Kayıplar, kromozomun kısmi (delesyon) veya tam kaybı (monozomi) seklinde de kendini gösterebilir. Kazanımlar ise kromozomlara bir parça (duplikasyon) veya tüm kromozomun (trizomi, tetrazomi) eklenmesi seklinde olabilir. Tanımlanamayan anormal kromozomlar hastalığa özgü belirteç olarak işaretlenir. Klasik sitogenetik inceleme (karyotipik analiz) ile elde edilen bilgiler lösemi tetiğini çeken genlerin tanımlanmasını ve lokalizasyonu hakkında bilgi sağlar. Bununla beraber klasik sitogenetik inceleme yüksek kaliteli metafaz preparatları oluşturmasına bağlıdır. Kemik iliği veya periferik kandan elde edilen hücrelerin düşük mitotik oranları veya kültürde kolaylıkla çoğalamamasından dolayı önemli ölçüde zorlukları vardır. Tüm bunların yapılması son derece yoğun emek ve iş gücü gerektirir. Ayrıca, klasik karyotipik inceleme tüm sitogenetik bozuklukları ve gen değişikliklerini ortaya çıkarmadığı için moleküler sitogenetik çalışmalarla genetik bozuklukların fluoresan in situ hibridizasyon (FISH) ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi daha duyarlı yöntemlerin kullanımı yaygınlaşmıştır (Şekil 1) (40).

Özellikle akım sitometresi kullanımı ile hücrelerin DNA miktarı tespit edilebilmekte ve hücrenin hangi fazda olduğu belirlenebilmektedir. Bu yöntemle belirlenen ve 50'den fazla kromozoma sahip hücrelerin bulunduğu hiperdiploidik ALL vakalarında prognozun daha iyi olduğu bildirilmektedir. Hipodiploidi yani 46'dan az kromozoma sahip ALL vakalarında ise prognoz kötüdür (40,41). Yapısal kromozom anomalileri ALL'de sık olarak bulunmakta ve olguların yaklaşık % 40'ında translokasyon tespit edilmektedir. ALL'de % 3–5 oranında saptanan ve Philadelphia kromozomu olarak bilinen *t(9;22)* ile *t(4;11*) iki önemli prognostik faktör olarak kabul edilmektedir. Bu iki translokasyon kötü prognostik kriterlerdendir.

Sayısal değişiklikler açısından, hiperdiploidi, ALL'de en sık görülen kromozomal bozukluktur ve prekürsör B hücreli ALL vakalarının % 40'ından daha fazlasında mevcuttur. Yüksek hiperdiploidi (51-56 kromozom), ALL vakalarının yaklaşık % 27'sinde görülür ve özellikle antimetabolite dayalı tedaviye iyi cevap ile ilişkili olup bu vakaların % 85'inden fazlasında olaysız sağ kalım (EFS) elde edildiği görülmüştür

(16,40). Bu karyotip genellikle diğer iyi risk özellikleri ile ilişkilidir. Yüksek hiperdiploidili grup içerisinde kromozom sayısı 56 ve 67 arasında olanlar, 51–55 arasında olan altgruptan daha iyidir ve 5 yıllık EFS değeri bu gruplarda sırasıyla % 86 ve % 72 bulunmuştur. Bu genler 4, 6, 10, 14, 17, 17, 18, 21 ve X kromozomunu ilgilendirir. Dört, 6, 10 ve 17. kromozomların trizomisi varsa prognoz iyidir. Trizomi-5 ise, çocukluk çağı ALL'sinde nadir bir bozukluk olup kötü prognoz ile ilişkilidir (Şekil 1) (16,42).

DNA mikroarray ölçüm teknolojisindeki son ilerlemeler, löseminin sınıfına özgü gen ekspresyon görünüşünün ortaya çıkmasını sağlamıştır. Bu teknik, daha etkin tedavi protokolleri kullanımı ve daha yoğun tedavilerden fayda görüp görülmeyeceğini tahmin etmede faydalı olabilmektedir. Bu moleküler genetik yaklaşım, lösemi oluşumunun genetik yönüne ışık tutmakla kalmayıp aynı zamanda hastaya özgül gen yapısını ortaya koyarak kişiye özel tedavi yaklaşımları geliştirilmesinin önünü açacaktır (16,17).



Şekil 1. Çocukluk çağı ALL hastalarında saptanan özgün genotipik bozuklukların tahmini sıklığı (1)

2.1.13.Prognostik Faktörler

Geniş hasta sayısına sahip çok merkezli randomize klinik çalışmalardan elde edilen retrospektif incelemeler sonucu, farklı tedavi gruplarındaki hastaların tanımlanmasını sağlayan birçok önemli prognostik faktör ortaya konulmuştur (Tablo 5). Hastada saptanan riske göre uygulanan tedavi sayesinde relaps riski daha yüksek çocuklar, daha yoğun olarak tedavi edilip, relaps riski daha düşük olan hastalar, kranial radyasyon, antrasiklinler gibi daha toksik kemoterapilerin azaltıldığı veya tamamen kaldırıldığı protokollerle tedavi edilmişlerdir (43,44). ALL heterojen bir hastalık olduğundan dolayı, aynı tedavi ile hastalar, farklı prognoza sahip olabilmektedirler. Tanı anında değişik klinik ve laboratuar bulguları prognozla ilişkili olabilmektedir. Bir prognostik faktörün göreceli önemi, farklı tedavi protokolleri arasında değişmektedir.

Klasik olarak olumsuz risk faktörleri, erkek cinsiyet, organomegali ve mediastinal kitle varlığı, kemik iliği dışı tutulumlar ve lenfadenopatinin derecesi, siyah ırk, tanı anındaki normale yakın hemoglobin seviyesi, L3 tipi FAB morfolojisi, olumsuz sitogenetik ve immünofenotipik alt grup, miyeloid seri antijen pozitifliği şeklinde sıralanmaktadır. Ayrıca MSS tutulumunun varlığı, beslenme durumu, lenfoblastların taşıdığı glukokortikoid reseptör düzeyi ve remisyona girme süresi de diğer prognostik faktörlerdendir.

Tanı anındaki lösemik hücre yükü ve relaps riski arasında doğru bir ilişki gösterilerek, başlangıç lökosit sayısının önemi vurgulamaktadır. Lökosit sayısı ile organ tutulumu arasında ilişki saptansa da çoğu çalışmaya göre bunun ilave prognostik bir önemi yoktur.

Prognozun genel olarak kızlarda erkeklere göre daha iyi olduğu bilinmektedir. Erkeklerdeki olumsuz prognozun nedeni olarak testis nüksleri ve ileri yaş, T-immünolojisi ve lökosit sayısı gibi yüksek risk faktörlerinin daha sık olması gösterilmiştir. Bunlara rağmen güncel tedavi protokolleri ile erkeklerde olumsuz prognoz ortadan kaldırılmıştır (19).

İlk tanı yaşı önemli bir prognostik faktördür. Diğer yaş gruplarına göre bir yaşından küçük süt çocukları en kötü prognoza sahip iken, 2-6 yas grubu en iyi prognoza sahiptir. Bir yaş altındaki ALL grubunda yüksek blast yükü, *t(4;11)* pozitifliği ve CD 10

negatifliği gibi belli biyolojik özellikler taşıdığından dolayı klinik seyir kötü yöndedir. Adölesanlar, çocuklarla karşılaştırıldığında daha kötü prognoza sahiptir (45,46).

Çoklu hücum tedavisine veya bir haftalık steroid monoterapisine yanıt, periferik kanda mutlak lösemik blast sayısı ya da 7 veya 14.günde kemik iliğindeki blastların yüzdesi, son yapılan birçok çalışmada prognozun önemli bir göstergesi olarak tanımlanmaktadır. İyi sitogenetik özellikleri olan, tanı anında düşük lökosit sayısı ve kortikosteroidlere hızlı erken cevabı olanlar gibi iyi ya da standart risk olarak adlandırılan grupta yer almasına rağmen uzun süreli takipte relaps izlenen hastaların çoğunda MRD izlemi yapılmasını gerekli kılmıştır.

Tablo 5 ALL'de prognostik faktörler (2-12)

Faktör	İyi prognoz	Kötü prognoz
Yaş	1-6 yaş	< 1 yaş
Lökosit sayısı (/mm^3)	<20	>100
Steroid tedavisine yanıt	İyi yanıt	Yavaş yanıt
Hücum tedavisine yanıt	M1 kemik iliği	M2,M3 kemik iliği
Kromozom sayısı	>50	<45
DNA indeksi	≥1.16	≤1.16
Kromozomal translokasyon	*t(12;21)*	*t(9;22), t(4;11)*
5 yıllık EFS	>%80	%10-60

2.1.14.Tedavi

ALL'de tedaviye yanıt ve sağkalım oranları 1960'lı yılların başlarında %10 düzeyine ulaşmaz iken, bugün çoklu kemoterapi ile hastaların yaklaşık olarak %80-90'inde tam şifa sağlanabilmektedir. Modern tedavi protokolleri nüks beklenilen hastaları daha yoğun tedavi etmeyi, düşük risk grubundaki hastaları ise tedavinin geç yan etkilerinden korumayı amaçlamaktadır. Son zamanlarda löseminin özellikleri, risk faktörleri yanında

ilaç metabolizmasına etki eden enzimlerin (timidilat sentaz, glutatyon transferaz, multidrug rezistans, sitokrom p-450 gibi) genetik polimorfizminin de prognozu etkilediği gösterilmiştir (47). ALL tedavisi genel olarak belli kalıplar içinde geliştirilse de hastanın genetik ve MRD özelliklerine göre kişiye özel biçime sokulmaya çalışılmaktadır.

ALL tedavisinde amaç:

1. Klinik ve hematolojik remisyon sağlamak

2. Remisyonun devamlılığını sistemik kemoterapi ve MSS ışınlaması ile sürdürmek

3. Hastalık ve tedavi komplikasyonları ile baş etmektir.

Klinik olarak hiçbir bulgunun kalmaması, karaciğer-dalak büyüklüğü ve lenfadenopati gibi fizik muayene bulgularının olmaması klinik remisyon olarak tanımlanır.

Labaratuar remisyonu tanımı için, hematolojik olarak normal kan tablosuna sahip olunmalı (nötrofil sayısı mm^3'de 500 den fazla, trombosit sayısı mm^3'de 75000 den fazla, Hb 12 g/dL'den fazla) ve periferik kan yaymasında blast olmamalıdır. Kemik iliğinde blast sayısı %5'den az olmalıdır.

Akut lenfoblastik lösemilerde tedavi esas olarak kemoterapi, kemik iliği nakli ve destek tedavi yaklaşımlarından oluşmaktadır.

Sistemik kemoterapi

Tedavi protokolleri merkezler arasında farklılık gösterse de aynı ana başlıkları içermektedir. Genel olarak bütün tedavi protokolleri, hücum tedavisi, pekiştirme, idame ve MSS profilaksisini içermektedir

KEMİK İLİĞİ TRANSPLANTASYONU (KİT):

Periferik kan veya göbek kordon kanından elde edilen kök hücreler kullanılmaktadır. Morbidite ve mortalitesi yüksek olduğundan bilinen diğer tedavi yöntemlerine yanıtsız hastalarda uygulanılmaktadır. Genellikle *t(9;22)* pozitif, indüksiyon sonrasında M2-M3 kemik iliği, hipodiploidi ve steroide yanıtsız ve erken nüks saptanan olgulara önerilmektedir (48).

2.2. Minimal Rezidüel Hastalık

Remisyon saptandıktan sonra hastaların %20-30'unda relaps izlenmektedir. Nüksler en sık kemik iliğinden, daha nadir olarak MSS, testis ve diğer organlardan

kaynaklanmaktadır. Nükslere en sık yoğun tedavi bitiminden sonraki ilk 6 ay ve tüm tedavi sonrasındaki ilk yılda rastlanmaktadır. Kemoterapi alırken veya tanıdan sonraki ilk18-24 ay içindeki nüksler prognoz açısından daha kötüdür.

ALL'li hastaların risk grubu belirlenmesinde kullanılan parametrelere rağmen, yapılan bir çalışmada relapsların üçte ikisinin prognozu iyi olan standart ve orta risk gruplarında olduğu görülmüştür (49). Lösemide uygulanan yoğun kemoterapi rejimleri ve radyoterapi tedavisinin yeterli etki gösteremediği ve bu yüzden hastalığın kısa süre içinde tekrarlamasına neden olan bir grup hücrenin varlığı, lösemi tedavisi sonrası relapsa yol açan en önemli neden olarak gösterilmektedir.

Tedavi cevabın değerlendirilmesinde kullanılan standart yöntemlerden sitomorfolojik kriterler, %1-5 lösemik hücreyi saptayabilmesinden dolayı değerlendirme için yeterli değildir. Bu nedenle tedavinin etkinliği ve tedavi stratejisinin yönetimi için daha duyarlı tekniklere ihtiyaç duyulmuştur. Morfoloji ile saptanamayacak kadar düşük sayıda blastik hücre varlığı anlamına gelen MRD, laboratuvar bazında çeşitli şekillerde gösterilebilir. ALL'de hastalıksız yaşam süresi rezidüel hastalığın kontrol altında tutulmasına bağlıdır. Bu nedenle MRD çalışmaları önem kazanmaktadır (19).

Bireyselleştirilmiş tedavi protokolleri için, hastaya özgü risk faktörlerinin belirlenmesi gerekmektedir. Lösemi çok heterojen bir hastalıktır ve hastalıkla başa çıkabilmek için farklı hastalar, farklı tedavi protokollerine ihtiyaç duyarlar, ancak çoğu hasta pratikte aynı tedavi protokolleri ile tedavi edilmektedir. Örneğin beş haftalık indüksiyon tedavisi bazı hastalarda çok etkin olurken, bazıları için aynı tedavi protokolü ile etkin bir şekilde tedavi edilemezler. MRD düzeylerinin belirlenmesi, hastaya ihtiyacı olduğu kadar tedavi verilmesini sağlar, bir başka deyişle hastanın bireysel nüks riskini belirler (49).

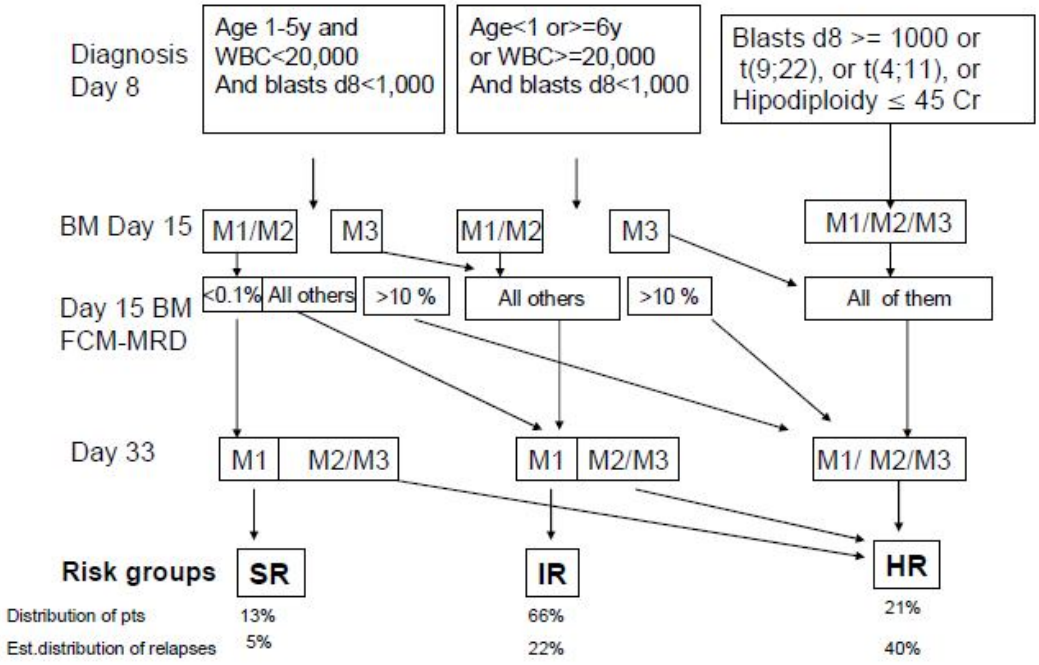
Minimal rezidüel hastalık bakılmasının tedavi yanıtının değerlendirilmesinde ve relaps açısından yüksek riskli yada düşük riskli grupları saptamada daha güvenilir olduğu ve klinik sonuçlar açısından yaş, immünfenotip, cinsiyet, lökosit sayısı gibi diğer prognostik göstergelerden daha iyi bir gösterge olduğu belirtilmiştir (50-52). Bu yüzden ALL tedavisinde MRD'nin önemli bir prognostik faktör olduğu düşünülmektedir (53-55). Bu çalışmaların sonucunda MRD bakılması, giderek rutin tedavi protokollerinde risk sınıflamasına dahil edilebileceği yönündedir (56-57).

İndüksiyon tedavisinden sonra MRD yokluğu, düşük riski gösterirken, MRD pozitifliği, blast sayısı, immünfenotip, kromozom aberasyonu, steroid cevabı gibi klasik diğer

klinik risk faktörlerinden bağımsız en güçlü prognostik faktördür. MRD negatif olan hastaların sadece %2-10'unda relaps olduğu gözlenirken, MRD pozitifliğinde %70-100 oranında relaps olduğu gözlenmiştir. Allojenik kök hücre transplantasyonu öncesi MRD pozitifliği posttransplant relaps riski ile birliktedir. Tedavinin ilk 3 ve 5. ayında MRD ölçümleri yapılmış, indüksiyon tedavisi sonunda $>10^{-2}$ rezidüel hücre bulunmasının, relaps riskini yaklaşık on kat artırıdığı bulunmuştur. Tedavinin 12-15. haftalarından sonra yaklaşık 10^{-3} rezidüel hücrenin tespit edilmesi ise, iyi ve kötü risk grubundaki hastaların belirlenmesinde yararlı bulunmuştur (10,50,51). MRD saptanan olgularda, erken dönemde tedavi stratejileri değiştirilebilir ya da hasta erken dönemde kemik iliği nakli için yönlendirilebilmektedir. İyi bir moleküler cevap varlığında ise, hastaya daha hafif bir kemoterapi rejimi sunulacak, dolayısı ile geç dönem yan etki potansiyeli azalacaktır.

Kullanılan tekniklerin duyarlılıkları farklı olup, 1.000.000 normal hücrede bir malign hücre (10^{-6}) saptanabilmektedir (58).

MRD'ye göre ALL IC BFM'nin yeni risk sınıflaması şekil 2'de gösterilmiştir.



M1: Kemik iliğinde <%5 blast M2: ≥%5-<25 blast M3: ≥%25 blast

Şekil 2: ALL IC BFM protokolünde MRD'ye göre risk sınıflaması (59)

Kullanılan MRD yöntemleri şu özelliklere sahip olmalıdır:

1. Hassasiyeti en az 10^{-3}, tercihen 10^{-4} olmalıdır.
2. İlgili tedavi protokolündeki hastaların çoğunda uygulanabilmelidir.
3. Tekrarlanabilir olmalıdır.
4. İnternal kalite kontrolü ve laboratuvarlar arası standardizasyonu mümkün olmalıdır.

MRD tespitinde üç tip teknik kullanılmaktadır:

1.PCR yöntemi ile kromozomal aberasyonların gösterilmesi

2.PCR yöntemi ile klona özgü Ig ve T cell reseptör (TCR) gen yeniden yapılanmalarının gösterilmesi

3.Flow-sitometrik immunfenotiplendirme (tablo 6)

Tablo 6: MRD tekniklerinin özellikleri (60)

	Akım sitometrisi	PCR	PCR
	İmmünfenotiplendirme	Ig/TCR gen düzenlenmesi	Füzyon genlerinin incelenmesi
Uygulanabilirlik			
Pre-B ALL			
İnfant	Bilinmiyor	%70-80	%60-65(MLL)
Çocuk	%70-95	>%95	%30-40
Erişkin	%70-85	>%90	%40-45
T ALL	>%95	>%95	%10-20
Çocuk	%95(yaklaşık)	>%90	%10
Erişkin			
Hassasiyet	10^{-3}-10^{-4}	10^{-4}-10^{-5}	10^{-4}-10^{-5}
Avantaj	-Hızlı (1-2 gün) -Oldukça hastaya özgü -Normal hücre hakkında bilgi -Nispeten tekniği kolay -Tek hücre analizi -Hücrelerin canlılığı ölçülür.	-Yüksek oranda DNA stabilitesi -Tamamen hastaya özgü -Hücre başına nispeten sabit DNA miktarı	-Sabit hedef -Önceden hazırlık -- Gerekmez -Nispeten basit -Nispeten hızlı(2-3 gün)
Dezavantaj	-Normal hücre zemini -İmmünfenotipik kaymalar -Subklonlar -Oldukça yüksek hassasiyet gerektirir (yaklaşık $5x10^6$ hücre)	-Laboratuvar yoğunluğu ve zaman kaybı -Normal hücre zemini -Oldukça karışık -subklon oluşması	-RNA değişkenliği -Değişken ekspresyon düzeyleri -Kontaminasyon riski yüksek (hastaya özgü değil tümöre özgü)

2.2.1. Lösemik klona özgü kromozomal aberasyonların takibi

Lösemi-spesifik füzyon genleri veya transkriptler MRD tespiti için ideal hedeflerdir. Çünkü bunlar normal hücrelerde bulunmaz ve oldukça spesifiktirler. Rekurren kromozom translokasyonları prekürsör B-ALL'li hastaların %30-40'ında (BCR-ABL, E2A-PBX1, MLL-AF4, TEL-AML1) ve T-ALL'lerin %10-20'sinde (SIL-TAL1, CALM-A10) olması nedeniyle kısıtlılık vardır. ALL'li hastaların MRD tespitinde klinikte rutin uygulanan bu metod, philadelphia kromozomunda ($(Ph)^+$ALL) BCR-ABL transkripsiyonunun kantitatif tespiti için oldukça kısıtlıdır. Bu genetik aberasyon yetişkin hastaların %25'inde, çocuk hastaların %5'inde kromozom 9 ve 22 arasında resiprokal translokasyonla oluşur ve kötü prognozla ilgilidir.

RT-PCR'ın avantajı, Ph^+ ALL'lerde 10^{-6}'nın üzerinde duyarlılığı olmasındandır. Teknikteki zorluklar, tümör yükündeki değişiklikler veya her lösemik hücrenin transkript sayısı veya her ikisinin kombinasyonu nedeniyle, transkript sayısının tespitinde azalma veya çoğalmadan ortaya çıkmaktadır. DNA bazlı tekniklerle karşılaştırıldığında MRD seviyesindeki küçük değişiklikleri yorumlamak oldukça zordur. Örneğin kalitesi, daha az hücreye uygun olması nedeniyle ve uzun transport süresi RNA'nın azalması yöntemin dezavantajıdır. RNA çıkarılmasında, cDNA sentezinde, genlerin düzenlenmesinde veya PCR analizindeki değişikliklerin standardizasyonundaki eksiklikler, sonuçların yanlış yorumlanmasına yol açabilir. Ph^+ ALL için en yüksek duyarlılığı olmasına rağmen RNA bazlı logaritmik tekniklerle, kros kontaminasyondan dolayı yanlış pozitif sonuçlar elde edilebilir.

DNA'daki füzyon gen hedefleri hastaların az bir kısmı için uygulanabilir ve T-ALL'deki SIL-TAL1 delesyonu gibi, geniş breakpoint bölgeleri ve/veya potansiyel füzyon paternlerinin yüksek sayılarından dolayı kolay hedefler değillerdir. Özellikle infant ALL'si için Ig/TCR gen rearanjmanları, birçok durumda oligoklonaldır ve stabil değildir. MLL gen rearanjmanları, hastaya özel MRD hedefi olarak üstündür (61).

DNA amplifikasyonu, Tal-1 delesyonu, Ig-cMyc füzyonu gibi, küçük bir alandaki breakpoint dizisinde, sadece kromozom aberasyonları için kulanılmaktadır. Bütün füzyon transkriptleri MRD takibi için belirteç olarak kullanılmaktadır. Tekniğin duyarlılığı RNA çalışmalarının miktarına ve transkript ekspresyonunun seviyesine bağlıdır. Bu belirteçlerin en belirgin avantajı lökomogenezle ilgisi olmasıdır. Özellikle kemoterapi ve hastalık sırasında ekpresyon seviyelerindeki farklılıklar dışlanmalıdır.

Bazı genlerin ekspresyonu, genetik anormalliklerle birlikte tanımlanan ALL ile ilişkilidir. MRD tespiti için BCR-ABL, MLL-AFF1, TCF3-PBX1 ve ETV6-RUNX1 kullanılmaktadır (19). Rekürren anormallikler yetişkin ve çocuk lösemili vakaların %40'ında bulunmaktadır (19). Hiperdiploidi ALL vakalarındaki bazı belirleyicilerin aşırı üretimi, CD 86, CD 97, CD 123'ü içeren, ETV6-RUNX1 vakalarında CD 44 ve CD 72'nin daha az üretimi, her iki genetik subtipte CD 200'ün aşırı üretimi vardır. TCF3-PBX1'li vakalarda mRNA'da PBX1'in aşırı üretimi olmasına rağmen, bu vakalarda akım sitometride PBX1 üretimi dikkate değer değildir. Yakın dönemde IGHα-CRLF2 ve P2RY8-CRLF2 gibi, CRLF2'yi kapsayan füzyon genleri tanımlanmıştır.

BCL2'nin aşırı üretimi, lösemik hücrelerin yaşam süresinin uzaması ile ilgiliyken, bu molekül spesifik inhibitörlerin hedefidir (8,37,62). HSBP1 (heat shock protein 27), CD 86 (B7.2) ve CD 304 (neuropilin-1) aşırı üretimi ise ilaç direnci ve AML hücrelerinde hastalığın progresyonu ile ilgilidir (51,63).

2.2.2.PCR yöntemi ile klona özgü Ig ve TCR gen yeniden yapılanmalarının gösterilmesi

Erken B ve T hücre gelişimi sırasında Ig ve TCR genleri, değişken (variability), farklılık (Diversity) ve birleşme (Joining) elementleri tarafından yeniden düzenlenir. Kavşak bölgeleri özel hücreler için spesifiktir. Genetik parmakizi, PCR ile malign lenfoid klonun tespitinde kullanılmaktadır. Bu nedenle, her bir hasta için, kullanılan MRD analiz tekniklerinde, klonal Ig/TCR gen yeniden yapılanmalarının sıralanması ve karakterizasyonu gerekmektedir. Bu metod tüm ALL'li hastalarda uygulanabilir ve rutinde duyarlılığı 10^{-4}-10^{-5}'e ulaşmaktadır. Bu tekniğin kullanımı 1990'ların erken dönemlerine dayanmaktadır. Semikantitatif yaklaşımla, PCR ürünlerinin hibridizasyonu veya boyanamaması veya elektroforezde ethidium bromid ile boyama gibi post PCR, PCR ürünlerinin tahmini yapılır. Bu çok adımlı yaklaşım her PCR değerlendirilmesine yoğun dikkat gerektirmektedir. Real time kalitatif PCR (RQ-PCR) tekniklerinin ana avantajı, uzun transport süresine rağmen oldukça stabil analitik örneklerde DNA kullanılmasıdır. Bu metod prekürsör B-ALL ve T-ALL'de geniş bir aralıkta kullanılmaktadır. Flow-sitometrik MRD değerlendirmesine göre 0.5 ile 1 kat daha yüksek duyarlılığı vardır (64-66).

Buna rağmen klonal Ig/TCR yeniden yapılanmalarının onkojenik işlevleri ile bağlantılı olmadığına dair görüşler de vardır. Ig/TCR genlerinin devamlı yeniden yapılanmaları nedeniyle lösemik blastlar teknikten kaçabilir. Bu nedenle özellikle ALL'de saptanamayabilir. Oligoklonal hedef genlerinin ve tercihen de son-dönem rearanjmanda, V-D birleşme yerine daha stabil olan D-J birleşme yerinin kullanımı ile blastların gözden kaçışı engellenebilir. Bu nedenle en az iki bağımsız hedef çalışılması önerilmektedir.

2.2.3.Flow- sitometrik immünfenotiplendirme

Lösemik hücrelerin normal hücrelerden ayırımı için gerekli yöntemlerden biri anormal durumdaki hücre belirleyicilerinin ekspresyonudur. Bu anormal hücre belirleyicileri en iyi çok renkli akım sitometreleri ile belirlenir. Bu yöntem iki faktörden etkilenir; birincisi lösemik hücreler ile normal hücreler arasındaki immünfenotipik farklılığın derecesi, diğeri ise çalışma örneğindeki hücre sayısıdır. Bu yöntem ALL'de 10000 normal hücre arasında bir lösemik hücreyi saptayabilecek immünfenotipik özelliklere sahiptir. İdeal şartlarda (10^7 ve daha fazla hücre varlığında) akım sitometrinin duyarlılığı PCR ile benzerdir. Ancak klinik örneklere analiz sırasında, her bir belirteç için çalışılan hücre sayısı genellikle 10^6'dan daha azdır (19).

Her hasta için, tanıda veya relaps anında lösemi ilişkili immünfenotipler belirlenmelidir. Bu kombinasyonların MRD çalışmalarında kullanımında, B hücre öncülleri olarak tanımlananan CD 19, CD 10 ve CD 34 (veya anti-TdT)' yi kapsamalıdır. Lösemik hücreleri normal hücrelerden ayırımında kullanılan bu immünfenotipler sadece lösemik hücrelerde eksprese edilmelidir (67).

Bir çok çalışmada aberan antijenik yapıların, hastalığın seyri boyunca genellikle sabit kaldığı ve bu nedenle tanı anındaki atipik kombinasyonlar esas alınarak rezidüel hastalığın monitörize edilebileceği gösterilmiştir. Macedo ve arkadaşları, 13 sağlıklı gönüllüden alınan kemik iliği örneklerini üç renkli akım sitometri ile değerlendirerek, CD 34+ hücrelerin CD 3, CD 20, CD 22, CD 14, CD 65 ve CD 56 eksprese etmediklerini tespit etmiş ve bunların CD 34 ile kombinasyonlarının MRD çalışmalarında kullanılabileceğini bildirmişlerdir (68).

MRD çalışması temel olarak B-ALL'li hastalarda CD 19 eksprese eden hücreler üzerinden yapılır. Jmili ve ark.'(69)nın MRD ile ilgili çalışmalarında dört temel aberan fenotip tanımlamışlardır (69).

1. Asenkronize antijen (Ag) ekspresyonu
2. Antijenlerin aşırı ekspresyonu
3. Anormal ışık saçılımı
4. Çapraz kökenli Ag ekspresyonu

B-ALL'de, lösemik hücrelerde eksprese edilen yüksek veya az miktarda anormal birkaç molekülün normal hücrelerden ayrımı yapılmalıdır. Örneğin, myeloid seri ile ilgili CD 13, CD 15, CD 33 ve CD 65 ve matür B hücreler ile igili CD 21 üretimi ile CD 19, CD 10, TdT ve CD 34' ün daha az veya daha çok olması ve CD 38 ve CD 45'in daha az üretimi B-ALL'de belirleyicidir (19).

Normal durumlarda kemik iliğinde bulunan B hücre öncülleri genellikle, remisyon indüksiyonunun ilk 2-3 haftasında kemoterapiye aşırı hassasiyetlerinden dolayı saptanmazlar. Bundan dolayı hastalarda tedavi cevabının anlaşılması için immatür B hücre belirleyicilerinden yararlanılır. Bu belirleyiciler normal ve lösemik hücrelerin ayırımında kolaylık sağlar. Lösemide, hücre belirleyicileri asenkronize veya anormal ekspresyonu gözlenir. B-ALL'de lösemi immünfenotipi %95 oranında belirlenebilir.

Lösemi ile ilgili immünfenotipler farklı kategorilerde gruplandırılabilir:

1. Özellikle T-ALL'de faydalanılabilen, normal dokular haricindeki immatür fenotiplerin görünümü; erken T hücre gelişimi timusda gerçekleşir ve bu nedenle kemik iliğinde veya kanda T-prekürsörleri (TdT^+ ve/veya CD 34^+) bulunur.
2. Benign hematogonlarda üretilen belirteçler lösemi ile ilgili immünfenotipi temsil edebilir, fakat benign hematogonlara göre ekpresyondaki kalitatif (CD 66c, CD 13, CD 33, NG-2, CD 21 üretimi) veya kantitatif (CD 10, CD 38, CD 45'in daha az üretimi ve CD 58'in aşırı üretimi) farklılıklarla ayırım yapılabilir. Bu bilgiler ışığında flow-sitometri ile MRD monitörizasyonu duyarlı bir şekilde yapılabilir.
3. Lösemilerde görülen kromozomal translokasyondan kaynaklanan spesifik füzyon proteinleri, MRD için ilgi çekici hedeflerdir. Ancak bu proteinlere karşı

üretilen antikorlar olmasına rağmen, rutin olarak tanıda kullanılabilir antikor yoktur. Hücre lizatlarında bulunan BCR-ABL proteinlerinin flow sitometri ile tespitinin %1 kadar duyarlılığı vardır, tanı ve lösemi sınıflaması için bu yaklaşım uygulanmaya çalışılmaktadır, fakat MRD monitörizasyonunun duyarlılığı için veriler sınırlıdır (70).

MRD çalışmaları için flow sitometri ile, CD 58, CD 38, CD 13 ve CD 34 gibi çok sayıda belirteç kullanılmaktadır (71-74). Primer genlerin flow sitometri ile doğrulanması için, takibi de kapsayan kriterler sağlanmalıdır. ALL'li vakaların en az %25 inde veya ALL'nin bir genetik subtipinin, vakaların %40'ında ekspresyonu, normal hücrelerdeki maksimum değerinden en az 3 kat lösemik hücrelerde aşırı üretimi veya yine normal hücrelerdeki minimum değerinin en az 3 kat daha az lösemik hücrelerde üretimi, belirli antikor konjugatlarının akım sitometri için uygun olması gereklidir.

CD 58'in MRD belirteci olarak uygun olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir. İkiyüz yetmiş B-ALL'li vakada yapılan bir çalışmada bu belirteçlerin genetik anormalliklerle birlikte olabileceği gösterilmiştir.

Akım sitometrisinin hassasiyeti %0.1 kadardır. Az sayıda hücre varlığında MRD pozitifliğini belirleyememesinden dolayı moleküler metodlara göre duyarlılığı daha azdır. Akım sitometrinin ana avantajı bir gün kadar kısa sürede hızlı cevap alınmasıdır. Bu da özellikle tedavi yönetiminde hızlı düzenleme açısından faydalıdır. Yine aynı örnekte lösemik olmayan hematopoetik hücrelerin durumunu da belirlenmesine yardımcıdır. MRD değerlendirilmesinde altı veya daha fazla hücre belirteci kullanıldığında hücrelerde biyolojik önemli moleküllerin üretimi tespit edilebilir (19). Yalnız, lösemik lenfoblastlar ve malign olmayan lenfoid prekürsörler arasında, rejenerasyon sırasındaki farklı fazlarda ve kemoterapi sonrasında benzerlikler olması nedeniyle yanlış pozitif sonuçlar elde edilmesine neden olabilmektedir (75-76). Doğru sonuç için yeterli sayıda mononükleer hücre (100000/mm^3) gereklidir. Bu kadar hücrenin elde edilebilmesi için de ya 2 mL kemik iliği veya 5-10 mL periferik kan örneği incelenmelidir.

2.2.4.CD 49f ve ALL

CD 49f T hücreleri, monositler, trombositler, epitelyal ve endotelyal hücreler, perinöral hücreler ve plasentanın trofoblastlarında eksprese edilir. CD 49f'nin prekürsör B lenfoblastlarda aşırı eksprese edildiği yakın dönemde bazı yayınlarda bildirilmiştir. İndüksiyon sonrası 19 ve 46. günlerde CD 49f'nin aşırı üretimi gösterilmiştir (14).

Adezyon molekülleri hücreler arası matriks ve diğer hücreler arasında adezyonu sağlayan ligant veya reseptörden oluşan heterojen bir gruptur. Heterodimer alfa ve beta alt grupları vardır. Molekülün fonksiyonel aktivitesi için her iki alt ünite de gereklidir, ancak bağlanma özgüllüğünün α alt ünitesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. β1 integrinler ise özellikle lökositlerin endotel hücrelerine ve hücre dışı matrixe bağlanmasında görev alırlar. Hücre adezyonun önemi, immun ve inflamatuvar olaylar, tümör hüclerinin büyümesi, metastazı ve yara iyileşmesi gibi birçok fizyolojik ve patolojik olayda rol almasıdır. Bunların aktivitesi ile invaziv ve metastatik potansiyel tümör hücreleri düzenlenebilir.

Lamininler, kan damarı bazal membranında yüksek oranda eksprese edilir ve anjiogenezde rol alırlar. A6β1 ve α6β4 integrinler endotelyal hücrelerde lamininler için major reseptörlerdir fakat tümör anjiogenezinde CD 49f'nin kesin rolü tam olarak bilinmemektedir. Normal meme dokusu ile memenin invaziv duktal karsinomu karşılaştırıldığında, duktal karsinomun damarlarında CD 49f'nin ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. İn vivo ve ex vivo çalışmalar, endotelyal hücrelerde α6 integrin ekspresyonunun negatif bir anjiogenez düzenleyicisi olarak görev yaptığını göstermektedir (77).

Kanser kök hücrelerinin tümör yönetimi, metastaz ve ilaç direnci için önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Bu nedenle, kanser kök hücrelerinin, ileriye dönük olarak tanımlanması ve hedeflenmesi yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi açısından kritik önemi vardır. Yakın dönemde yapılan bir çalışmada, glioblastome kök hücre (GSC) örneklerinde α6 integrin kullanılarak perivasküler mikroçevre incelenmiş ve CD 49f'nin GSC'ler ile birlikte eksprese edildiği gösterilmiştir. Yine GSC'lerde CD 49f'nin hedeflenmesi ile, yenilenme, proliferasyon ve tümör oluşum kapasitesinin inhibisyonu

sağlanmıştır. CD 49f'nin GSC'ler açısından belirteç olmakla birlikte, integrin α6'nın inhibisyonu ile de glioblastom tedavisinde önemli yeri olabileceği düşünülmüştür (78).

İntegrinlerin kemik iliğinde de önemli rolleri vardır. Antikor inhibisyonuyla yapılan invitro çalışmalarda, CD 49d/CD 29 ve CD 11a/CD 18'in her ikisinde de hematopoetik kök hücre ve progenitör hücrelerin adezyonunda ve subendotelyal migrasyonda önemli rolü olduğu gösterilmiştir (15,79).

3. GEREÇLER VE YÖNTEM

3.1.Araştırma Bilgileri

ALL tanısı almış olan olgularda tanı anında ve tedavinin 15. gününde alınan MRD ve CD 49f seviyesinin MRD takibindeki önemini ve hasta takibindeki etkisini araştıran bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Onkoloji Bilim Dalında yapılan prospektif bir çalışmadır.

Çalışma Erciyes Üniversitesi BAP tarafından TSU-12-3805 proje kodu ile desteklenmiş olup Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulunun onayı (Etik kurul karar no: 2011/347, Karar tarihi: 07.06.2011) alınarak gerçekleştirilmiştir.

3.2. Çalışma Grubunun Seçilmesi

Çalışmaya Ocak 2012- Ocak 2013 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Onkoloji Bilim Dalı tarafından takip ve tedavisi yapılmakta olan ALL'li olgular dahil edildi. Çalışma grubuna ALL tanısı konulmuş ve TRALL BFM 2000 protokolü ile tedavi edilen 27 olgu alındı.

Tedavi protokolü indüksiyon ve idame tedavisi olmak üzere 2 ana bölümden oluşmaktadır. İndüksiyon tedavisi ilk 6 aylık bölümü kapsamakta, sırası ile protokol 1, protokol M ve protokol 2 bölümlerinden oluşmaktadır. Protokol 1'de tedavide; prednizolon, vinkristin, daunorubisin, L-ASP, sitarabin, 6-MP, siklofosfamid kullanılmakta, intratekal MTX verilmektedir. Protokol M; 6-MP, 4 kez verilen yüksek doz MTX (1 veya 5 gr/m^2) ve intratekal MTX'ten oluşmaktadır. Protokol 2'de

dekzametazon, sitarabin, vinkristin, doksorubisin, L-ASP, siklofosfamid, 6-tioguanin kullanılmaktadır. Tedavi, idame tedavisinde haftalık kullanılan MTX ve günlük kullanılan 6-MP ile 2 yıla tamamlanmaktadır.

Hastalardan tanı anında ve tedavinin 15. gününde alınan kemik iliği örneklerinde MRD ve CD 49f düzeyleri çalışıldı ve tedavi risk grubu, cinsiyeti, yaşı, tanı anındaki lökosit sayısı, MSS tutulumu, tedaviye yanıt, relaps, sağ kalım ile ilişkisi olup olmadığı araştırıldı.

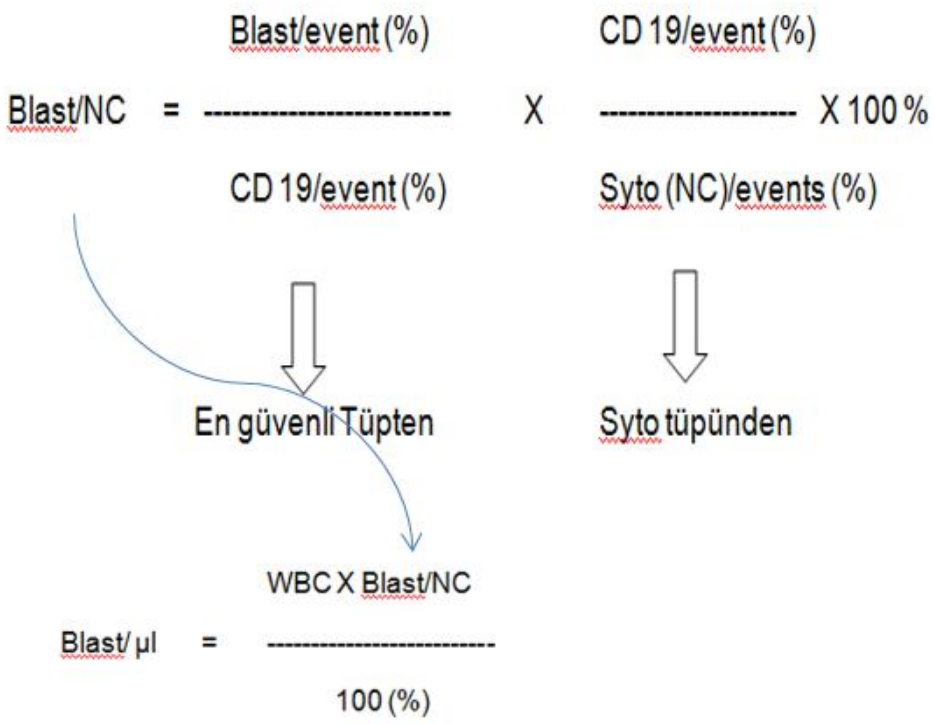
3.3. Örneklerin Toplanması

Çalışma grubundaki olgulardan tanı anında ve 15. günde kemik iliğinden EDTA'lı tüplere 2 ml örnek alındı. Alınan numuneler bekletilmeden oda ısısında immünoloji laboratuvarına ulaştırıldı.

3.4.Akım Sitometrisi İle Minimal rezidüel hastalık ve CD 49f Çalışılması

3.4.1.Minimal Rezidüel Hastalık Çalışılması

Çalışma öncesinde kemik iliğindeki çekirdekli hücreler çalışıldı. Kemik iliğnden kan sayımı yapıldı. DNA-mesh coulter kullanılarak filtre edildi. Her tüpe 100 µL kan konuldu. Birinci tüpe 5'er µL Syto16 FITC, CD 10 PE (phycoerythrin), CD 45 PC5 (phycoerythrincyanin), CD 19 PC7, ikinci tüpe CD 10 fluorescein isothiocyanate (FITC), CD 34 PE, CD 20 PC5, CD 19 PC7, üçüncü tüpe CD 10 FITC, CD 22 PE, CD 58 PC5, CD 19 PC7 monoklonal antikorları (moAb) eklenerek 10 dakika karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyondan sonra immunoprep "Coulter" lize edici reaktifler kullanılarak eritrositler lize edildi, lökositler stabilize edildi ve hücre membranları fikse edildi. Her tüpe 2 mL isoflow eklenerek iki kez 5 dakika 1200 devirde yıkama yapıldı. Pelletlere dökülerek her tüpe 1 mL isoflow eklendi ve Beckman Coulter FC500 cihazında çalışıldı. Her örnek için 300000 hücre sayıldı. CXP yazılımı kullanılarak veriler analiz edildi. 10^{-3} ve üzerindeki değerler MRD için pozitif kabul edildi. MRD hesabı aşağıdaki formül ile yapıldı (80).



3.4.2.CD 49f Çalışılması

Filtre edilen kan örneğinden 100 µL alınarak üzerine 5'er µL CD 19 PC7, CD 10 FITC ve CD 49f PE moAb'ları eklendi ve 10 dakika karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyondan sonra immunoprep "Coulter" lize edici reaktifler kullanılarak eritrositler lize edildi, lökositler stabilize edildi ve hücre membranları fikse edildi. İki mL isoflow eklenerek iki kez 5 dakika 1200 devirde yıkama yapıldı. Pellet dökülerek tüpe 1 mL isoflow eklendi ve Beckman Coulter FC500 cihazında çalışıldı. CXP yazılımı kullanılarak analiz edildi.

3.5. İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin normal dağılıma uyup uymadığını anlamak için Shapiro Wilk testi uygulandı. Normal dağılıma uyan veriler ortalama ± standart sapma, normal dağılıma uymayan veriler ortanca (minimum-maksimum) ile ifade edildi. Normal dağılıma uyan değişkenlerin ikili karşılaştırmalarında Student t testi, normal dağılıma uymayan değişkenlerin ikili karşılaştırmalarında Mann-Whitney U testi uygulandı. İkiden fazla

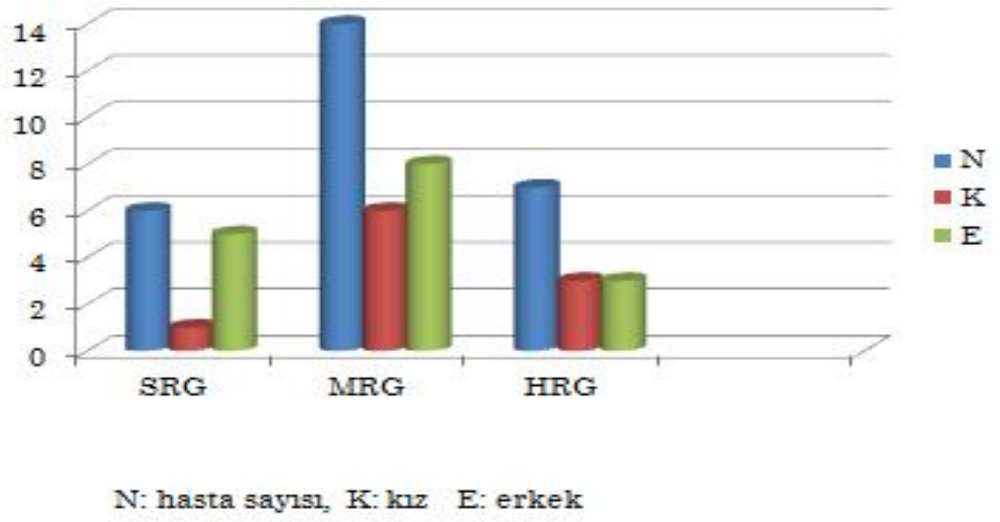
gruplara ait verileri karşılaştırmak amacıyla Kruskal-Wallis testi ve Chi-kare testi uygulandı.

İstatistiksel değerlendirme için veriler "Scientific Package for Social Sciences" (SPSS 15.0) programına yüklenerek çözümlemeler bu program üzerinden yapıldı. P değeri <0.05 anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Grubunun Özellikleri

Çalışmaya Ocak 2012 – Ocak 2013 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Onkoloji Bilim Dalı tarafından ALL tanısı alan ve TRALL BFM protokolü ile tedavi edilen, yaşları 14 ay – 16 yıl (ortalama 6,6±4,8 yıl) arasında değişen 10'u (%37) kız, 17'i (%63) erkek toplam 27 hasta dahil edildi.



Şekil 3. Hastaların dağılımı

Çalışmada değerlendirilen 27 hasta B ALL idi. TR-ALL BFM tedavi protokolü risk sınıflamasına göre 6 (%22,2) hasta standart risk grubunda, 14 (%51,9) hasta orta risk grubunda, 7 (%25,9) hasta yüksek risk grubunda idi (şekil 3).

Standart risk ve MR grubunda olan hastalarda MSS tutulumu yokken, HR grubunda olan 1 (%3,7) hastada MSS tutulumu vardı.

Çalışma grubundaki hastaların tanı zamanında bakılan lökosit dağılımı 1720/mm^3 - 215600/mm^3 (ortanca 6090/mm^3), mutlak nötrofil sayısı dağılımı 30/mm^3 - 8500/mm^3 (ortanca 730/mm^3) idi.

Hemoglobin dağılımı 1,4 gr/dl- 11,2 gr/dl (ortanca 6,7 gr/dl), trombosit dağılımı 8000/mm^3 - 818000/mm^3 (ortanca 78000/mm^3) idi. Hastaların takip süresi ortalama 6,9 ay (1-13 ay) idi (Tablo7)

Tablo 7. Hastaların tanı anı laboratuvar sonuçları

Ortanca (min-max)	Tanı zamanı (n=27)
Lökosit (/mm^3)	**6090 (1720-215000)**
Mutlak nötrofil(/mm^3)	**730 (30-8500)**
Hb (gr/dL)	**6,7 (1,4-11,2)**
Trombosit (/mm^3)	**78000(8000-818000)**

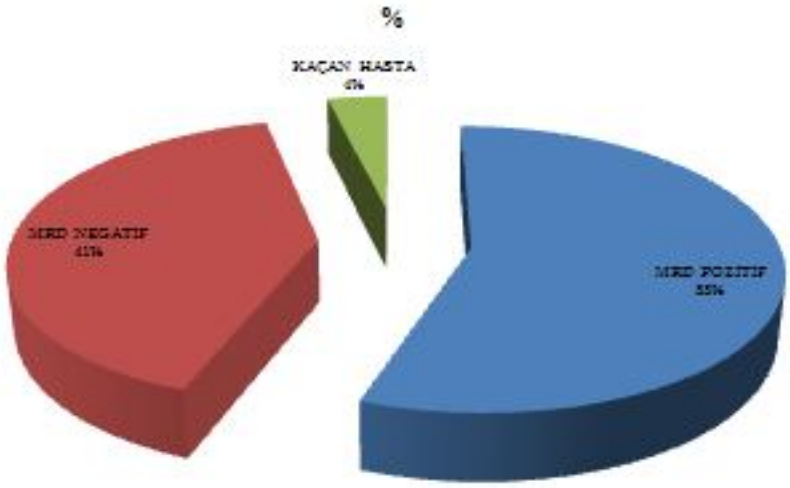
Çalışma grubunda yüksek risk grubunda olan 1 (%3,7) hastada medüller relaps saptandı ve hastaya relaps BFM protokolü uygulandı.

Çalışma grubunda MRD pozitif 3 (%11,1) hasta sepsisten dolayı öldü.

Hastaların 1' inde (%3,7) Ph^+ kromozomu tespit edildi.

Sekizinci gün değerlendirilen periferik yaymada 22 (%81,5) hastada steroid cevabı varken, 5 (%18,5) hastada steroid cevabı yoktu. İndüksiyon tedavisinin sonunda hastaların 23 (%85,2)'ünde remisyon sağlandı, 4 (%14,8) hastada remisyon sağlanmadı. Remisyona girmeyen 1 (%3,7) hastaya babasından allojenik KİT yapıldı. 1 hastaya da allojenik KİT planlandı.

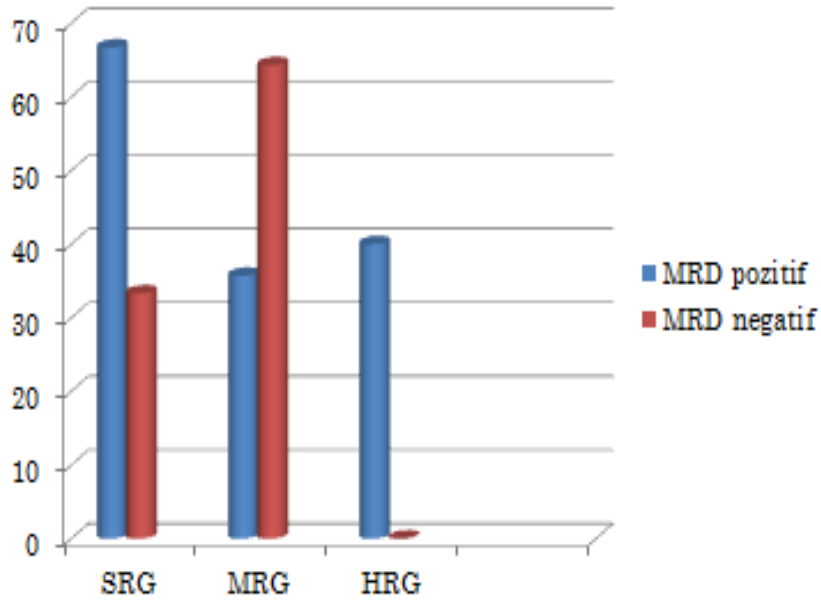
MRD pozitif hasta sayısı 15 (%55,6) iken, negatif hasta sayısı 11 (%40,7) idi. 1 (%3,7) hastada numune yatersizliğinden dolayı MRD çalışılamadı. MRD pozitif 10 hasta (%66,7) erkek, 5 (%33,3) hasta kız idi. Aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (*p*=0.68) (şekil 4).



Şekil 4. MRD oranları

MRD pozitif hastaların ortalama yaşı 5.6 yıl (14ay-16 yıl), beyaz küre değerleri ortalama 30358/mm3 (1720-215600), hemoglobin değeri ortalama 8,9 gr/dL (3,7-13,5), trombosit sayısı ortalama 221466/mm3 (17000-818000) iken, MRD negatif olan hastaların ortalama yaşı 8,3 yıl (21ay-16 yıl), beyaz küre sayısı ortalama 42082/mm3 (2530-185000), hemoglobin değeri ortalama 6,8 gr/dL (1,4-11,2), trombosit sayısı 106000/mm3 (8000-512000) idi.

Standart risk grubunda takip edilen hastaların 4 (%26,7)'ünde, orta risk grubundaki hastaların 5 (%33,3)'inde ve yüksek risk grubundaki hastaların 6 (%40)'sında MRD pozitif saptandı. Yüksek risk grubunda MRD negatif hasta yoktu. Aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi (p=0.02) (şekil 5).



Şekil 5. Risk sınıflaması ve MRD

Sekizinci gün periferik yaymasında remisyon sağlanan 11 (%73,3) hastada MRD pozitif iken, remisyon sağlanmayan 4 (%26,7) hastada MRD pozitif idi. Aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0.11). MRD negatif 11 hastada sekizinci gün periferik yayma değerlendirmesinde remisyon mevcuttu (%50).

Onbeşinci gün kemik iliği değerlendirmesinde remisyon sağlanan 11 hastada MRD negatifken, 10 hastada MRD pozitifti. Remisyon sağlanamayan hastalarda MRD pozitifti (%33,3). İstatistiksel olarak anlamlı değil idi (p=0.053).

Otuzüçüncü gün kemik iliği değerlendirmesinde remisyon sağlanan 25 hastanın 14'ünde MRD pozitifliği saptandı. Remisyon olmayan 1 hastadan numune eksikliğinden dolayı, 1 hastada da indüksiyon tedavisi sırasında öldüğü için MRD çalışılamadı. İstatistiksel olarak otuzüçüncü günde farklılık olmadığı için değerlendirme yapılamadı. Otuzüçüncü gün değerlendirilen kemik iliği değerlendirilmesinde 25 (%92,6) hastada remisyon varken, 1 (%3,7) hastada remisyon yok idi. Bir (%3,7) hastaya değerlendirme öncesinde sepsis nedeniyle öldüğü için kemik iliği aspirasyonu yapılamadı (tablo 8).

Tablo 8. Sitomorfolojik kriterler ve MRD

	MRD pozitif n (%)	MRD negatif n(%)	*p*
8. gün py			
Remisyon +	11 (73.3)	11 (100.0)	0.11
Remisyon -	4 (26.7)	0 (0.0)	0.11
15. gün KİA			
Remisyon +	10 (66.7)	11 (100.0)	0.53
Remisyon -	5 (33.3)	0 (100.0)	0.53

MRD'si pozitif olan 12(%52.2) hasta remisyona girmişken, 3 hasta remisyona girmedi. MRD pozitif hasta ile remisyon arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0.238).

Takip süresi içinde relaps olan 1 (%6,7) hastanın MRD'si pozitif idi, ancak MRD pozitif olan 14 (%93,3) hastada relaps yok idi. İstatistiksel olarak anlamlı değil idi (p=1.0).

İndüksiyon tedavisi sırasında ölen 3 (%20) hastanın MRD'si pozitifti ve istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0.23).

MRD pozitif 1 (%6,7) hastada Ph^{+} idi ve takipte bu hastaya KİT yapıldı. Ancak istatistiksel olarak anlamlı değil idi (p=1.0).

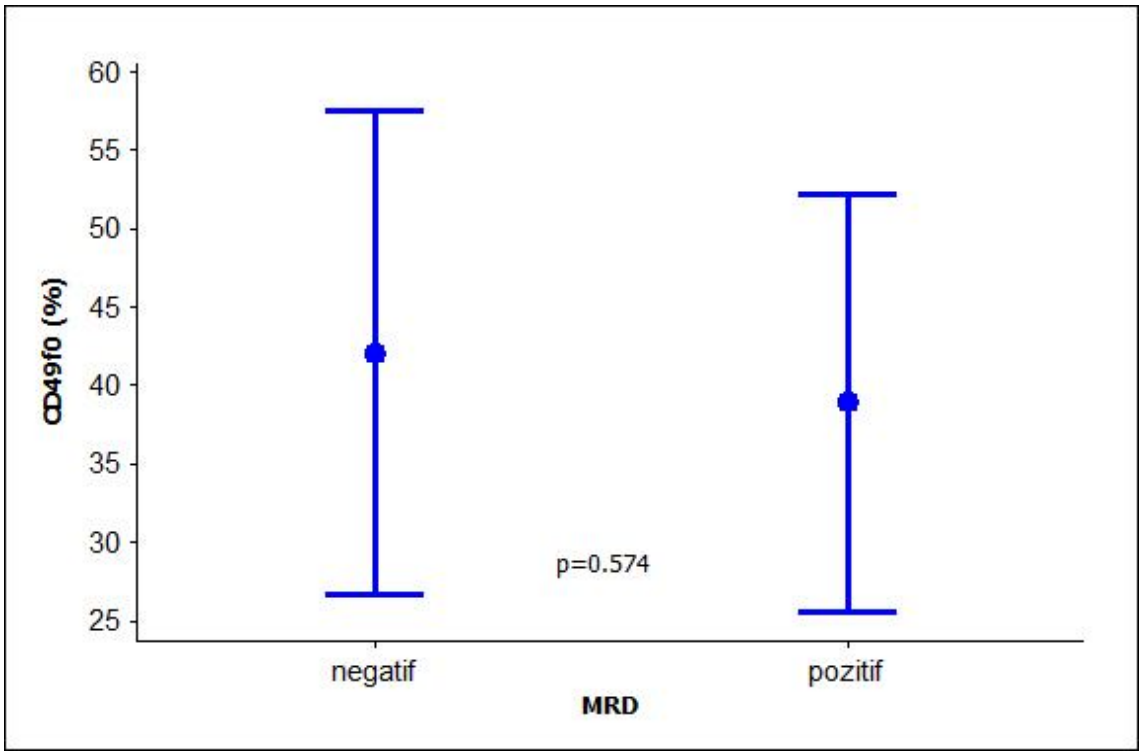
Tanı zamanında ve 15. gün alınan CD 49f seviyeleri sırası ile 38,47 ± 22,11 ve 5,49±12,6 idi. Lösemik blastların CD 49f ekspresyonu açısından aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi (p=0.000) (tablo 9).

Tablo 9. Olguların tanı anı ve 15. gün CD 49f düzeyleri

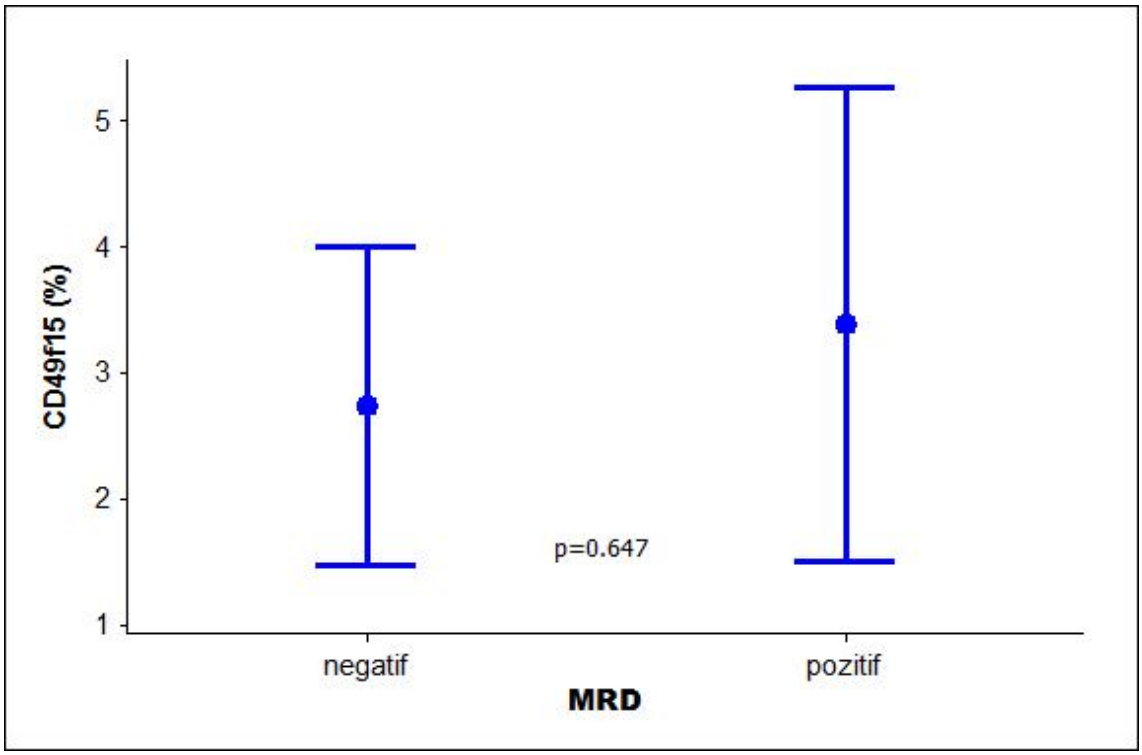
	Tanı zamanı (N:26)	15. gün (N:26)	P
CD 49f (%) Ortalama±SD	38,47 ± 22,11	5,49±12,6	0.000

Spearman testinde, 15. gün ölçülen CD 49f düzeyi ve MRD arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi (*p*=548). Onbeşinci gün MRD pozitif olan hastalarda tanı anında bakılan CD 49f ekspresyonu arasında anlamlı ilişki saptanmadı (*p*=0.574).

MRD pozitif hastaların tanı anı CD 49f değeri ortalama 38,93±24,0 iken, negatif hastaların CD 49f değeri ortalama 43,8±24,5 idi. Onbeşinci gün CD 49f değeri, MRD pozitif hasta grubunda ortalama 7,8±17,0 , MRD negatif hasta grubunda ortalama 2,8±2,0 idi (şekil 6 ve 7) (tablo 10).



Şekil 6. MRD ve tanı anı CD 49f'in ilişkisi

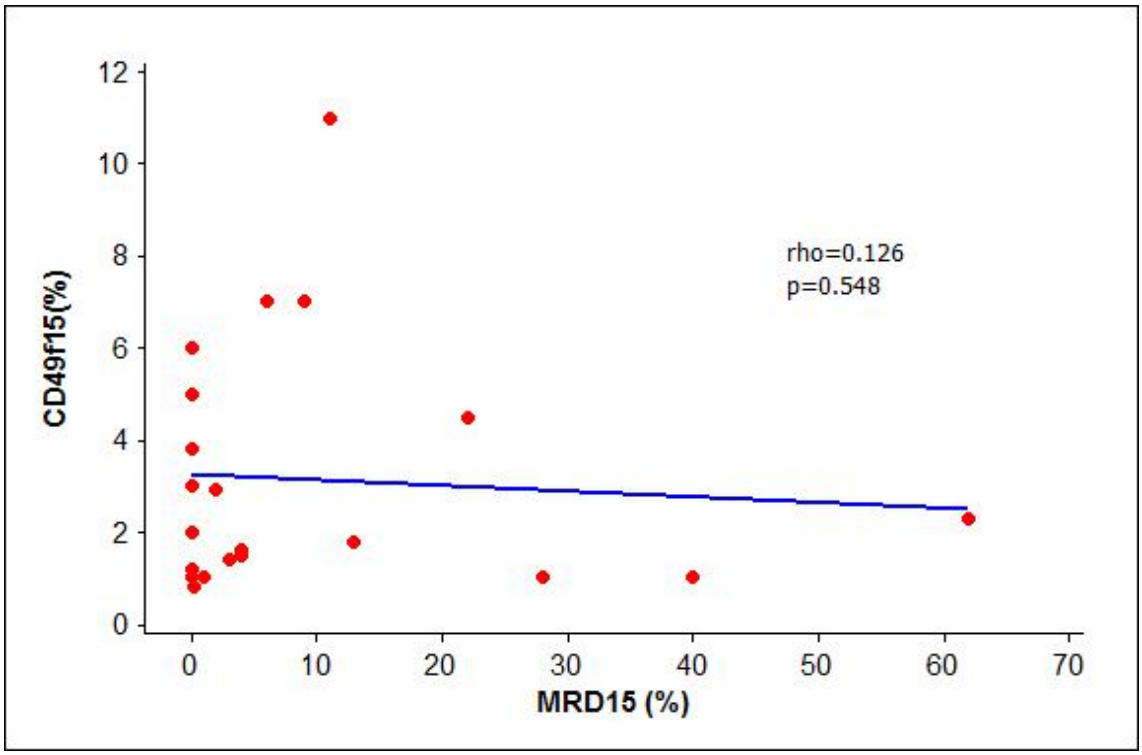


Şekil 7. MRD pozitifliği ve negatifliği durumunda 15. Gün CD 49f

Tablo 10. MRD'ye göre tanı anı ve 15. gün CD 49f ekspresyonu arasındaki ilişki

	CD 49f	**15.gün CD 49f**
MRD(+)(ortalama)	38.9(4.4-88.5) (n:15)	7.8(1-66) (n:14)
MRD(-)(ortalama)	43.8(5-79.2) (n:11)	2.8(0.8-6) (n:11)
p	0.574	0.647

15. gün CD 49f ve MRD değerleri karşılaştırıldığında korelasyon bulunmadı (*p*=0.548)(şekil 8).



Şekil 8. 15. Gün MRD ve CD 49f'in ilişkisi

5. TARTIŞMA

Çocukluk çağının en sık malign hastalığı olan ALL tedavisinde bugün çoklu kemoterapi ile hastaların yaklaşık %80-90'ında şifa sağlanabilmektedir. Randomize kontrollü klinik çalışmalar, yoğun kemoterapi kombinasyonları, MSS profilaksisi, risk gruplarının belirlenip tedavi yoğunluğunun düzenlenmesi sonucu son 50 yılda sağkalım oranlarında belirgin iyileşmeler görülmüştür. ALL hastalarında prognozu etkileyen çeşitli faktörler bildirilmiştir. Bu faktörlerden en çok üzerinde durulanlar hastanın yaşı, cinsiyeti, tanı sırasındaki lökosit sayısı ve steroid cevabıdır (16-17).

Akut lenfoblastik lösemi, en sık 3-6 yaş arasında görülür. Ocak 2012-Ocak 2013 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Onkoloji Bilim Dalı tarafından IC BFM 2002 protokolü ile tedavi edilen 27 hastanın değerlendirilmesinde, çalışma grubumuzda ortalama yaş 14 ay-16 yıl (ortalama 6,6±4,8 yıl) idi. Ülkemizde Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesinde TR ALL-2000 protokolü alan 142 hastanın değerlendirildiği Hazar ve ark.'nın (81) yaptıkları çalışmada ortalama yaş 5,9±4,3 (min:1 ay- maks: 17) yıl olarak bulunmuş olup bizim çalışmamızla benzerdir.

Gelişmiş ülkelerde yapılan çalışmalarda erkek/kız oranı 1.2-2 civarındadır (16,17). Çalışmamızda ise erkek/kız oranı 1.7 olarak bulundu. Çalışmamızda erkeklerin oranı %63 iken, Avrupa çalışmasında bu oran %56.5, Bajel ve ark.'nın (82) Hindistan'da BFM-95 protokolü alan 307 hasta ile yaptığı çalışmada ise bu oran %60,9 olarak bulunmuş olup çalışma grubumuza benzerdir.

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 akım sitometri yöntemi ile karşılaştırmışlardır. Bu yolla belirlenen ve normal kemik iliğinde çok az ($<1x10^{-3}$) ya da hiç bulunmayan atipik antijen kombinasyonları, MRD tayininde 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 görülmesidir (83-89).

Macedo ve ark. (68) ları, 13 sağlıklı gönüllüden alınan kemik iliği örneklerini 3 renkli akım sitometri ile değerlendirerek, CD 34+ hücrelerin CD3, CD 20, CD 22, CD 14, CD 65 ve CD 56 eksprese etmediklerini tespit etmiş ve bunların CD 34 ile kombinasyonlarının MRD çalışmalarında kullanılabileceğini bildirmişlerdir (68).

Bugünkü sitotoksik tedavi protokolleri, sitomorfolojik kriterlere göre %95-98 çocukta tam remisyonu sağlamaktadır (45,90,91). Buna rağmen %25-30 hastada relaps olmaktadır. Sitomorfolojik kriterler, %1-5 lösemik hücreyi tespit edebilmesi nedeniyle remisyon durumu için yeterli değerlendirmeyi sağlamamaktadır. Tedavi protokollerinin sınıflandırılması ve tedavi etkinliğini değerlendirmek için daha duyarlı tekniklere gerek duyulmaktadır.

Moleküler ve hücresel biyolojik ilerlemeler sonucu lösemiye özgül DNA veya RNA ya da lösemi ile ilişkili antijenleri saptaması ile MRD kavramı ortaya çıkmış ve morfolojik veya karyotipik incelemeden daha fazla duyarlılık seviyesine ulaşılmıştır (58). MRD ölçümünde en sık kullanılan iki yöntem, akım sitometri ile anormal immunofenotip eksprese eden hücrelerin saptanması ve *BCR-ABL*, *TEL-AML1*, klona özgü Ig ve TCR gen yeniden düzenlemesi gibi değişik genetik enstrümanlar ile lösemi ilişkili moleküler hedeflerin niceliksel olarak saptanması ve belirli dönemlerde izlenmesi prensibine dayanır (58,92). Bu iki metodun duyarlılığı farklıdır. Akım sitometri kandaki ya da kemik iliğindeki lösemik hücrelerin % 0.01'i gibi az bir miktarını bile rutin olarak saptayabilir. PCR'a dayalı ölçümler ise genellikle 10^4-10^6 normal hücrede bir lösemi hücresini saptar ve akım sitometrik yönteme göre daha hassastır. Ancak maliyet ve uygulanabilirlik açısından akım sitometri daha kullanışlı gözükmektedir (58,92).

Bu çalışmada çocukluk çağı ALL olgularında, MRD tayininde ve hastalığın risk grubunun belirlenmesinde, akım sitometri ile tanı anı ve 15. gün CD 49f ekspresyonunun 15. gün MRD ile karşılaştırılarak kullanılabilirliği değerlendirildi ve 15. gün CD 49f ve MRD arasında benzerlik görülmedi. Ancak tanı anı ve 15. gün CD 49f ekspresyonunda anlamlı düşme mevcut idi. Bu da lösemik hücre sayısında azalmayla birlikte CD 49f ekspresyonunda azalmayı gösteriyordu.

Coustan-smith E ve ark. (55) yaptığı bir çalışmada, indüksiyon sonrası tam remisyon sağlanan 165 çocuk ALL olgusu akım sitometri ile MRD açısından değerlendirildiğinde tam remisyon esnasında kemik iliğinde ≥%1 blast izlenen olgularda %72±21, ≥%0.1-<%1 blast izlenenlerde %43±%21, MRD negatif olgularda (blast oranı <%0.001) ise %10±%3 oranında nüks izlenmiştir. Bizim çalışmamızda MRD pozitif olan 15 hastanın 1'inde relaps vardı ve 3 hasta da remisyona girmedi. Ancak takip süresi kısa olduğu için hastaların relaps değerlendirilmesi açısından erken olabileceği düşünüldü.

Bazı prognostik faktörlerin önemi, uygulanan tedavi protokolüne göre değişebilmekle birlikte, hiçbir koşulda değerini kaybetmemektedir. Bunlar yaş, lökosit sayısı, steroid cevabıdır. BFM grubuna göre 1-6 yaş, NCI kriterlerine göre 1-10 yaş üzeri, lökosit sayısının BFM grubunda 20000 /µL ve NCI kriterlerine göre 50000 /µL üzerinde olması yüksek risk kriteri olarak kabul edilmektedir. Çalışmamızda 15. gün MRD ve bu parametreler birlikte değerlendirildiğinde MRD pozitif ve negatif hastalar arasında yaş ve beyaz küre yüksekliği arasında anlamlı faklılık yoktu. Sekizinci gün steroid cevabı açısından değerlendirilen periferik yaymalarda 1000'in altında blast sayısı olmasına rağmen 11 hastanın 15. gün MRD leri 10^{-3} ve üzerindeydi. MRD pozitif ve negatif hastaların tanı anındaki değerleri birbirine benzer iken, MRD pozitif olan hastaların Hb değeri normale yakın idi.

Atmış sekiz çocuk ALL hastasının değerlendirildiği bir çalışmada tedavinin 15. gününde kemik iliğinde <%0.01 blast izlenen hastalarda hastalıksız yaşam diğerlerine göre anlamlı olarak daha yüksek saptanmıştır (93). Bizim çalışmamızda 15. gün KİA değerlendirmesinde remisyon sağlanan (<%5 blast) 21 hastanın 10'unda ve remisyon sağlanamayan 5 hastanın hepsinde MRD pozitifliği vardı. İstatistiksel olarak anlamlı değildi. Ancak relapslar, SRG ve MRG olarak takip edilen hastaların büyük bir kısmında olmaktadır.

Tedavi süresi boyunca, rezidüel lösemik hücrelerin immünolojik olarak belirlenmesi, yüksek relaps insidansı ile önemli derecede ilişkilidir ve bu parametre; lökosit sayısı, yaş ve spesifik sitogenetik anomaliler gibi iyi bilinen prognostik faktörlerden sonra önemli bir relaps parametresi olarak kalmaktadır. Ek olarak indüksiyon tedavisinin sonunda rezidüel hastalığın varlığı, Ph kromozomu ve MLL gen düzenlemeleri gibi istenmeyen genetik anormalliklerle korele iken, MRD negatifliği hiperdiploidi ve TEL geni anormallikleri ile koreledir (56,94). Bizim çalışmamızda da Ph^+ kromozomu olan bir hastada MRD pozitifliği mevcut idi ve tedaviye yanıt olmaması nedeniyle hastaya KİT yapıldı.

Borowitz ve ark'nın (95) yaptığı bir çalışmada, tanı ve relaps sırasındaki antijen ekspresyonunda, fenotipte bir değişikliğin olup olmadığı araştırılmış ve relapstaki lösemik blastlarda, fenotipik açıdan değişiklikler olduğunu göstermişlerdir (95). Gaipa ve ark'nın (96) yaptığı çalışmada, antijen ekspresyonundaki fenotipik değişikliklerin indüksiyon tedavisinin 15. günü kadar erken olabileceğini ve bunun ilaç tedavisi ile ilişkili olduğunu ileri sürmüşlerdir . Bizim çalışmamızda da tanı anındaki CD 49f'deki yükseklik ve 15. günde anlamlı azalma lösemik hücrelerdeki CD 49f ekspresyonunu gösteriyordu (p=0.00).

Campana ve ark'nın (67) 37 ALL hastasında yaptıkları bir çalışmada MRD pozitif 15 hastanın tümünde ve MRD negatif 22 hastanın 7'sinde relaps görülürken, Van Dongen ve ark (97) yaptığı 28 vakalık bir çalışmada MRD pozitif 12 hastanın 11'inde, MRD negatif 16 hastanın 1'inde relaps izlenmiştir (67,97). Bizim çalışmamızda takip süresince 1 hastada relaps vardı ve bu hastanın 15. gün MRD'si pozitifti. Takip süremizin kısa olmasından dolayı diğer MRD pozitif hastaların relaps açısından değerlendirilmesi için erken olduğunu düşündük. MRD, diğer parametrelerden bağımsız prognostik bir belirteçtir.

Şahin A. ve ark (98) yaptığı çalışmada, kemik iliğinin düzenlemesinde görevli integrin grubundan olan CD 49f ve CD 49d değerlendirilmiş ve hematopoetik kök hücrelerin hedefe ulaşmasında kısa dönem etkisi olan CD 49d'nin aksine CD 49f'nin kısa ve uzun dönemde etkisinin olduğu düşünülmüştür. Ancak fetal karaciğer hücrelerinde yapılan deneylerde, hem hematopoetik kök hücreleri hem de progenitör hücrelerin hedefe ulaşmasında önemli olan CD 49d'nin aksine, CD 49f sadece hematopoetik progenitör

hücrelerin hedefe ulaşmasında etkili olduğu gösterilmiştir. Farelerin; CD 49f'ye yönelik antikorlarla bloke edilmiş kemik iliği kökenli hematopoetik kök ve progenitör hücrelerin transplante edildiği bir çalışmada kemik iliği hedeflenmesi etkilenmemiştir. Ek olarak; insan ve primat kemik iliğinden elde edilen hematopoetik kök ve progenitör hücrelerdeki CD 49f'nin aktivitesinin bloke edilmesi, fakat periferik kan veya kord kanından mobilize edilememesi artmış kemik iliği hedefelenmesiyle sonuçlandı. CD 49f'nin rolünün tam olarak anlaşılabilmesi için ek araştırmalar gerekse de bu çalışmalar CD 49f'nin bu hücrelerin kaynağına bağlı olarak belirli hematopoetik progenitör hücrelerin alt gruplarının kemik iliğine ulaşmasını regüle ettiğini göstermektedir (99-102).

İntegrin α'nın embriyonik delesyonunun deride ciddi büllöz lezyonlara, serebral malformasyonlara, neonatal ölüme, farelerdeki integrin α eksikliğinde hematopoezde spesifik değişikliklere yol açabileceğini göstermiştir (99).

Pre B-ALL'li 141 çocuk ve B-ALL/Non hodgkin lenfomalı 21 çocukta; β1 integrinler (CD 49c, CD 49d, CD 49e, CD 49f), β2 integrinler (CD 11a, CD 11b, CD 11c) ve CD 54'ü içeren adezyon moleküllerinin ekspresyon paternini inceleyen bir araştırmada; CD 11a, CD 49f ve CD 44 ekspresyonlarının sıklığı, CD 34(–) preB-ALL'ye göre CD 34(+) preB-ALL'de önemli derecede artmıştır. PreB-ALL'de CD 11a' nın ekspreyonu CD 11b ve CD 54'ünki ile pozitif olarak korele iken CD 49c ve CD 49f'de pozitif olarak koreledir. Adezyon moleküllerinin ekspresyonu B hücre serisinin fenotipine bağlı olduğu ve bu moleküllerden bazılarının ekspresyonu klinik öneme sahip olduğu bilinmektedir (79).

Çalışmamızda tanı anında lösemik hücrelerin yüksek oranda CD 49f eksprese ettiğini (ortalama: 38.4 ±22.1) ve 15. günde (ortalama:5.4±12.6) istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmakla birlikte bu ekspresyonun devam ettiğini tespit ettik. Ancak CD 49f ekspresyonundaki azalmayla, MRD tayini ve risk sınıflaması arasında bir ilişkiye rastlanmadı.

DiGiuseppe ve ark.'nın (103) 10 normal ve 15 ALL hastasında yaptığı çalışmada, CD 19(+) B hücrelerde CD 49f hafif yüksek veya saptanamamışken, 15 hastanın 11'inde tanı anında orta derecede CD 49f ekspresyonunun arttığı gösterildi. Ancak B hücre

gelişiminin tüm evrelerinde CD 49f pozitif olduğu ve immünfenotipik özellikler ile (CD 34 pozitifliği, CD45 negatifliği) CD 49f arasında ilişki kurulamadığı gösterildi. Postindüksiyon 15. gün ve 29. gün MRD pozitif olan hastaların tümünde CD 49f ekspresyonu tespit edildi. Bizim çalışmamızda da CD 49f ekspresyonu ve diğer immünfenotipik özellikler arasında ilişki yoktu. 15. gün MRD ve CD 49f ekspresyonu arasında ilişki kurulamadı. Çalışmamızda 15. Gün MRD pozitif veya negatif tüm hastalarda CD 49f ekspresyonu, tanı anına göre azalmakla birlikte devam etti. Bu da lösemik hücrelerin azalmasıyla birlikte CD 49f ekspresyonunun azalmasını gösterebilir. Ancak DiGiuseppe'nin yaptığı çalışmada, normal B hücrelerde de CD 49f ekspresyonu gösterildiği gibi, bizim çalışmamızdaki CD 49f ekspresyonu normal B hücrelerin üretimiyle de ilgili olabilir.

Sonuç olarak, morfolojik remisyondaki akut lösemili olgularda, hastanın tedaviye cevabının değerlendirilmesinde ve olası bir relapsın önceden tahmin edilmesine olanak veren MRD'yi akım sitometri ile monitörize etmek mümkündür. Böylece rezidüel hastalık saptanan ve lösemik hücrelerin sayıca artış gösterdiği olgularda daha etkili tedavi şemaları gündeme gelmektedir. Periyodik takip için en uygun zaman aralıklarının belirlenmesine çalışılırken, MRD tayininde yeni belirteçler gündeme gelmektedir. MRD tespitinde kullanılabilirliği yeni gündeme gelen CD 49f için çalışmalar devam etmektedir. Bu çalışmada CD 49f'nin lösemik hücrelerde yüksek oranda eksprese edilmesine rağmen 15. günde de az miktarda eksprese edildiği gösterildi. Bu ekspresyon 15. gün MRD ile karşılaştırıldığında, minimal rezidüel hastalık tayini için anlamlı değildir. Sonuç olarak daha fazla sayıda hastanın tedavisi boyunca CD 49f'nin tekrarlanan ölçümleri, MRD yönünden daha aydınlatıcı olabilir.

6. SONUÇLAR

1. MRD pozitif hasta sayısı 15 (%55,6), negatif hasta sayısı 11 (%40,7) idi.

2. MRD pozitif hastaların 4 (%26,7)'ü SR, 5 (%33,3)'i MR, 6 (%40)'sı HR grubunda idi. Yüksek risk grubunda MRD negatif hasta saptanmadı.

3. Sitomorfolojik kriterlere göre yapılan risk sınıflaması ile MRD arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0.02).

4. Sekizinci gün steroid cevabı olan 11 (%73,3) hastada MRD pozitif iken, steroid cevabı olmayan 4 (%26,7) hastada MRD pozitif idi.

5. Onbeşinci gün KİA değerlendirmesinde remisyon sağlanan 11 hastanın MRD'si negatif, 10 hastanınki pozitif idi. Remisyon sağlanamayan 5 hastanın MRD'si pozitif idi.

6. Tanı anı ve 15. gün CD 49f seviyeleri sırası ile 38,47±22,11 ve 5,49±12,6 idi.

7. Lösemik blastların CD 49f'yi yüksek oranda eksprese ettiği saptandı.

8. CD 49f ekspresyonunun 15. günde azalarak devam ettiği saptandı.

9. Onbeşinci gün MRD ve CD 49f karşılaştırıldığında istatistiksel olarak korelasyon saptanmadı (p=0.548).

7. KAYNAKLAR

1. Baruchel A, Leblanc T, Schaison G. Pathology of acute lymphoblastic leukemias. In:pediatric Hematology.2nd ed. Lilleyman JS,Hann IM, Blanchete VS, eds. London: Churcill Livingstone; 1999. pp. 5337-63.
2. Kutluk T,Yeşilipek A. Turkish naitonal pediatric canser registry 2002-2008 (Turkish Pediatric Oncology Group and Turkish Pediatric Hematology Society) Pediatric Blood Cancer 2009; 53: 851.
3. Borowitz MJ, Chan JKC. B lymphoblastic leukemia/lymphoma not otherwise specified. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL eds. WHO Classification of tumours of hematopeietic and lymphoid Tissues.4th ed. Lyon, France: IARC; 2008. pp. 158-66.
4. Silverman BL, Sallan SE. Acute lymphoblastic leukemia. In: Nathan DG, Orkin SH, Ginsburg D, Look TA, Eds. Hematology of infancy and childhood, 6th ed, Philadelphia, WB Saunders Co, 2003; pp. 1135-66.
5. Childhood ALL Collaborative Group. Duration and intensity of maintenance chemotherapy in acute lymphoblastic leukaemia: overview of 42 trials involving 12000 randomised children. Lancet 1996; 347:1783–88.
6. Campana D, Pui C-H. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. Blood 1995; 85: 1416–34.
7. Van Dongen JJM, Szczepa´nski T, de Bruijn MAC, et al. Detection of minimal residual disease in acute leukemia patients. Cytokines Mol Ther 1996; 2: 121–33.
8. Davis MM, Björkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. Nature 1988; 334: 395–402.
9. Beishuizen A, Hahlen K, Hagemeijer A, et al. Multiple rearranged immunoglobulin genes in childhood acute lymphoblastic leukemia of precursor B-cell origin. Leukemia 1991; 5: 657–67.

10. Brisco MJ, Condon J, Hughes E, et al. Outcome prediction in childhood acute lymphoblastic leukaemia by molecular quantification of residual disease at the end of induction. Lancet 1994; 343: 196–200.
11. Cavé H, Guidal C, Rohrlich P, et al. Prospective monitoring and quantitation of residual blasts in childhood acute lymphoblastic leukemia by polymerase chain reaction study of δ and γ T-cell receptor genes. Blood 1994; 83: 1892–902.
12. Steenbergen EJ, Verhagen OJ, Van Leeuwen EF, et al. Prolonge persistence of PCR-detectable minimal residual disease after diagnosis of first relapse predicts poor outcome in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 1995; 9: 1726–34.
13. DiGiuseppe JA. Acute lymphoblastic leukemia: Diagnosis and detection of minimal residual disease following therapy. Clin Lab Med 2007; 27: 533–49.
14. Flotho C, Coustan-Smith E, Pei D, et al. Genes contributing to minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: Prognostic significance of CASP8AP2. Blood 2006; 108: 1050–57.
15. Reuss-Borst MA, Klein G, Waller HD, et al. Differential expression of adhesion molecules in acute leukemia. Leukemia 1995; 9: 869–74.
16. Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. J Clin Oncol. 2011; 29: 551-65.
17. Celkan T. Akut lenfoblastik lösemi. In: Özkan A (ed), Pediatrik Onkoloji, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2009, pp. 451-62.
18. Silverman BL, Acute lymphoblastic leukemia. In: Orkin SH, Fisher DE, Look TA, Lux SE, Ginsburg D, Nathan DG (eds), Oncology of infancy and childhood, WB Saunders Co, Philadelphia, 2009, pp. 297-330.
19. Pui CH. Childhood leukemias (3rd ed), Cambrige University Press, New York, 2012.
20. Piller G. Leukaemia - a brief historical review from ancient times to 1950. Br J Haematol 2001; 112 :282-92.
21. Goldman JM, Daley GQ. Chronic myeloid leukemia: a brief history. In Melo JV, Goldman JM, Daley GQ (eds), Myeloproliferative Disorders, Springer, New York: 2007, pp. 1-13.

22. Kutluk T. Cocukluk cağı kanserlerin epidemiolojisi. Klinik Gelişim 2007; 20: 5-12.

23. Horner MJ, Ries LA, Krapcho M, et al. SEER cancer statistics review, 1975-2006. Bethasda MD, National Cancer Institute, 2009.

24. Taylor GM, Birch JM. The hereditary basis of human leukemia. In: Henderson ES, Lister TA, Greaves MF (eds), Leukemia, Saunders, Philadelphia, 1996, pp. 210-45.

25. Gale KB, Ford AM, Repp R, et al. Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 13950-4.

26. Knudson AG. Hereditary cancer: two hits revisited. J Cancer Res Clin Oncol 1996; 122: 135-40.

27. Redner A. Leukemias. In: P. Lanzkowsky (ed). Manual of Peadiatric Hematology and Oncology (5^{th} ed). Elsevier Academic Press, San Diego, 2011, pp. 518-66.

28. Shurtleff SA, Buijs A, Behm FG, et al. TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. Leukemia 1995; 9: 1985-9.

29. Mertens AC, Wen W, Davies SM,et al. Congenital abnormalities in children with acute leukemia: a report from the Children's Cancer Group. J Pediatr 1998; 133: 617-23.

30. Narod SA, Hawkins MM, Robertson CM, Stiller CA. Congenital anomalies and childhood cancer in Great Britain. Am J Hum Genet 1997; 60: 474-85.

31. Buckley JD, Buckley CM, Breslow NE, et al. Concordance for childhood cancer in twins. Med Pediatr Oncol 1996; 26: 223-9.

32. Ford AM, Pombo-de-Oliveira MS, McCarthy KP, et al. Monoclonal origin of concordant T-cell malignancy in identical twins. Blood 1997; 89: 281-5.

33. Lösemiler. Katkı Pediatri dergisi, 2004; 26: 337-484.

34. Mastrangelo R, Poplack D, Bleyer A, et al. Report and recommendations of the Rome workshop concerning poor-prognosis acute lymphoblastic leukemia in

children: biologic bases for staging, stratification, and treatment. Med Pediatr Oncol 1986; 14: 191-4.

35. Mahmoud HH, Rivera GK, Hancock ML, et al. Low leukocyte counts with blast cells in cerebrospinal fluid of children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 1993; 329: 314-9.

36. Kim TH, Hargreaves HK, Chan WC, et al. Sequential testicular biopsies in childhood acute lymphocytic leukemia. Cancer 1986; 57: 1038-41.

37. Dick FR, Armitage JO, Burns CP. Diagnostic concurrence in the subclassification of adult acute leukemia using French-American-British criteria. Cancer 1982; 49: 916-20.

38. Riley RS, Massey D, Jackson-Cook C, Idowu M, Romagnoli G. Immunophenotypic analysis of acute lymphocytic leukemia. Hematol Oncol Clin North Am 2002; 16: 245-99.

39. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). Leukemia 1995; 9: 1783-6.

40. Paimonid SC, Pui C-H, Hancock ML et al. Heterogeneity of hyperdiploid (51–67) childhood acute lymphoblastic leukaemia. Leukaemia 1996; 10: 213–24.

41. Patıroglu T. A relationship between aneuploidy and prognosis in children with acute lymphoblastic leukemia. UHOD 2001; 11: 148-53.

42. Heerema NA, Sather NH, Sensel MG et al. Prognostic impact of trisomies 10, and 5 among children with acute lymphoblastic leukaemia and high hyperdiploidy (>50 chromosomes). J Clin Oncol 2000; 18: 1876–87.

43. Rivera GK, Pinkel D, Simone JV, Hancock ML, Crist WM. Treatment of acute lymphoblastic leukaemia: 30 years' experience at St. Jude Children's Research Hospital. N Engl J Med 1993; 329: 1289–95.

44. Gaynon PS, Steinherz PG, Bleyer WA et al. Improved therapy for children with acute lymphoblastic leukemia and unfavorable presenting features: a follow-up report of the Children's Cancer Group Study CCG-106. J Clin Oncol 1993; 11: 2234–42.

45. Reiter A, Schrappe M, Ludwig W-D et al. Chemotherapy in 998 unselected childhood ALL patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL BFM ’86. Blood 1994; 84: 3122–33.

46. Akcakus M, Patiroglu T, Deniz K ve ark. Congenital acute lymphoblastic leukemia: report of a case with leukemia cutis. Clin Pediatr (Phila) 2004; 43: 487-90.

47. Marie JP, Zittoun R, Sikic BI. Multidrug resistance (MDR 1) gene expression in adult acute leukemias: correlations with treatment outcome and in vitro drug sensitivity. Blood 1991; 78: 586-92.

48. Tallen G, Ratei R, Mann G, et al. Long-term outcome in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia after time-point and site-of-relapse stratification and intensified short-course multidrug chemotherapy: results of trial ALL-REZ BFM 90. J Clin Oncol 2010; 28: 2339-47.

49. Anak SS, Aydoğan G. Pediatric Hematoloji (1.Baskı) İstanbul Tıp Kitabevi,Türkiye 2011.

50. Cave H, Bosch J, Suciu S, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer- Childhood Leukemia Cooperative Group. N Engl J Med 1998; 339: 591-8.

51. Van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer Er, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia in childhood. Lancet 1998; 352:1731-8.

52. Mortuza YF, Papaioannou M, Moreira MI, et al. Minimal residual disease tests provide an independent predictor of clinical outcome in adult acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol 2002; 20: 1094-104.

53. Biondi A, Valsecchi MG, Seriu T, et al. Molecular detection of minimal residual disease is a strong predictive factor of relapse in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia with medium risk features. A case control study of the International BFM study group. Leukemia 2000; 14: 1939-43.

54. Bjorklund E, Mazur J, Soderhall S, et al. Flow cytometric follow-up of minimal residual disease in bone marro gives prognostic information in children with acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 2003; 17: 138-48.

55. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock MI, et al. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 2000; 96: 2691-6.

56. Coustan-Smith E, Behm FG, Sanchez J, et al. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. Lancet 1998; 351: 550-4.

57. Jacquy C, Delepaut B, van Daele S, et al. A prospective study of minimal residual disease in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia: MRD level at the end of induction is a strong predictive factor of relapse. Br J Haematol 1997; 98: 140.

58. Szczepansky T, Orfao A, van der Velden VH, et al. Minimal residual disease in leukaemia patients. Lancet 2001; 2: 409-17.

59. A Randomized Trial of the I-BFM-SG for the Management of Childhood non-B Acute Lymphoblastic Leukemia. ALL IC BFM 2009.

60. Brüggemann M, Schrauder A, Raff T, et al. Standardized MRD quantification in European ALL trials: proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18–20 September 2008. Leukemia.2010; 24: 521–35.

61. Van der Velden VH, Corral L, Valsechi MG, et al. Prognostic significance of minimal residual disease in infants with acute lymphoblastic leukemia treated within the Interfant-99 protocol. Leukemia. 2009; 23: 1073-9.

62. Schrappe M, Beck J, Brandeis WE, et al. Treatment of acute lymphoblastic leukemia in childhood and adolescence: results of the multicenter therapy study ALL-BFM 81. Clin Pediatr 1987; 199: 133-50.

63. Wassmann B, Pfeifer H, Goekbuget N, et al. Alternating versus concurrent schedules of imatinib and chemotherapy as front-line therapy for Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph_ ALL). Blood. 2006; 108: 1469–77.

64. Gaipa G, Cazzaniga G, Panzer-Grumayer RE, et al. Time point-dependent concordance of flow cytometry and RQ-PCR in the MRD detection in childhood ALL. Hematol. 2012; 97.

65. Malec M, van der Velden VHJ, Bjorklund E, et al. Analysis of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: comparison between RQ-PCR analysis of Ig/TcR gene rearrangements and multicolor flow cytometric immunophenotyping. Leukemia. 2004 ;18: 1630–6.

66. Neale GA, Coustan-Smith E, Stow P, et al. Comparative analysis of flow cytometry and polymerase chain reaction for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. 2004; 18: 934–8.

67. Coustan-Smith E, Campana D. İmmunologic minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia: A comparative approach to molecular testing. Clin Haematol 2010; 23: 347-58.

68. Macedo A, Orfao A, Ciudad J, et al. Phenotypic analysis of CD 34 subpopulations in normal human bone marrow and its application for the detection of minimal residual disease. Leukemia 1995; 9: 1896-901.

69. Jmili NM, Jacob MC, Yacoub S et al. Flow cytometric evaluation of minimal residual disease in in acute lymphoblastic leukaemia type B. The poen Leuk J 2010; 3: 47-54.

70. Weerkamp F, Dekking E, Ng YY, et al. Flow cytometric immunobead assay for the detection of BCR-ABL fusion proteins in leukemia patients. Leukemia. 2009; 23: 1106–7.

71. Basso G, Veltroni M, Valsecchi MG, et al. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. J Clin Oncol. 2009; 27: 5168-74.

72. Lucio P, Gaipa G, van Lochem EG, et al. BIOMED-I concerted action report: flow cytometric immunophenotyping of precursor B-ALL with standardized triple-stainings. BIOMED-1 Concerted Action Investigation of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia: International Standardization and Clinical Evaluation. Leukemia. 2001; 15 : 1185-92.

73. Chen JS, Coustan-Smith E, Suzuki T, et al. Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2001; 97 : 2115-20.

74. Coustan-Smith E, Sancho J, Behm FG, et al. Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2002; 100: 52-8.

75. Dworzak MN, Froschl G, Printz D, et al. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2002; 99: 1952–8.

76. Campana D. Role of minimal residual disease monitoring in adult and pediatric acute lymphoblastic leukemia. Hematol Oncol Clin North Am. 2009; 23: 1083–98.

77. Mitchel G. and Ad`ele De A., et al. Genetic ablation of the alpha 6-integrin subunit in Tie1Cre mice enhances tumour angiogenesis. J Pathol 2010; 220: 370–81.

78. Corsini NS and Villalba MA. Integrin Alpha 6: Anchors Away for Glioma Stem Cells. J stem 2010; 6: 403-4.

79. Hara J, Matsuda Y, Fujisaki H, et al. Expression of adhesion molecules in childhood B-lineage-cell neoplasms. Int J Hematol 2000; 72: 69.

80. Dworzak NM, Giuseppe JA et al. Standardization of flow cytometric minimal residuel disease evaluation in acute lymphoblastic leukemia: multicentric assessment is feaseible. Clin Cytom B. 2008; 74: 331-40.

81. Hazar V, Karasu GT, Uygun V ve ark. Childhood acute lymphoblastic leukemia in Turkey: factors influencing treatment and outcome: a single center experience. J Pediatr Hematol Oncol 2010; 32: 317-22.

82. Bajel A, George B, Mathews V, et al. Treatment of children with acute lymphoblastic leukemia in India using a BFM protocol. Pediatr Blood Cancer 2008; 51: 621-5.

83. 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.

84. Macedo A, Orfao A, Gonzalez M, et al. Immunological detection of blast cell subpopulations in acute myeloblastic leukemia at diagnosis: implications for minimal residual disease studies. Leukemia 1995; 9: 993-8.

85. Jennings CD, Foon KA. Recent advances in flow cytometry: Application to the diagnosis of hematologic malignancy. Blood 1997; 90: 2863-92.

86. 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.

87. Macedo A, Orfao A, Vidriales MB, et al. Characterization of aberran phenotypes in acute myeloblastic leukemia. Ann Hematol 1995; 0: 189-94.

88. Campana D, Coustan-Smith E, Behm FG. The definition of remission in acute leukemia with immunologic techniques. Bone Marrow Transplant 1991; 8: 429-37.

89. 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.

90. AJP Veerman, K Hahlen and WA Kamps et al. High cure rate with a moderately intensive treatment regimen in non-high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia: results of protocol ALL. VI from the Dutch Childhood leukemia Study Group, J Clin Oncol 1996; 14: 911-8.

91. ALL Childhood, Collaborative Group. Duration and intensity of maintance chemoterapy in avute lymphoblastic leukemia: overwiew of 42 trials involving 12000 randomised children, Lancet 1996; 347: 1783-6.

92. Fišer K, Sieger T, Schumich A, et al. Detection and monitoring of normal and leukemic cell populations with hierarchical clustering of flow cytometry data. Clin Cytom A. 2012; 81: 25-34.

93. Panzer- Grumayer ER, Schneider M, Panzer S, et al. Rapid molecular predicts a goodoutcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 2000; 95: 790-4.

94. San Miguel J.F., Ciudad J., Vidriales M.B et al. Immunophenotypical detection of minimal residual disease in acute leukemia.. Hematol Oncol . 1999; 32: 175-85.

95. Borowitz MJ, Pullen DJ, Winick N et al. Comparison of diagnostic and relaps flow cytometry phenotypes in childhood acute lymphoblastic leukaemia: implications for residual disease detection: a report from the childrens oncolgy group. Clin Cytom B 2005; 68B: 18-24.

96. Gaipe G, Basso G, Maglia O, et al. Drug-induced immunphenotypic modulation in childhood ALL:implications for minimal residual disease detection. Leukemia 2005; 19: 49-56.

97. Van Dongen JJ, Breit TM, Adriaansen HJ et al. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by immunological marker analysis and polymerase chain reaction. Leukemia 1992; 6 (1 suppl.): 47-59.

98. Sahin AO and Buitenhuis M. Molecular mechanisms underlying adhesion and migration of hematopoietic stem cells. Cell adhes commun. 2012; 6: 39-48.

99. Qian H, Tryggvason K, Jacobsen SE, Ekblom M. Contribution of alpha6 integrins to hematopoietic stem and progenitor cell homing to bone marrow and collaboration with alpha4 integrins. Blood 2006; 107: 3503-10.

100. Katayama Y, Hidalgo A, Peired A, Frenette PS. Integrin alpha4beta7 and its counterreceptor MAdCAM-1 contribute to hematopoietic progenitor recruitment into bone marrow following transplantation. Blood 2004; 104: 2020-6.

101. Qian H, Georges-Labouesse E, Nystrom A, et al. Distinct roles of integrins alpha6 and alpha4 in homing of fetal liver hematopoietic stem and progenitor cells. Blood 2007; 110: 2399-407.

102. Bonig H, Priestley GV, Wohlfahrt M, Kiem HP, Papayannopoulou T. Blockade of alpha6-integrin reveals diversity in homing patterns among human, baboon, and murine cells. Stem Cells 2009; 18: 839-44.

103. DiGiuseppe JA, Fuller SG, Borowitz MJ. Overexpression of CD 49f in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia: Potential usefulness in minimal residual disease detection. Cytom B 2009; 76: 150-5.

EKLER

Ek tablo 1: Çalışma grubundaki hastaların tanı anındaki klinik ve laboratuvar özellikleri

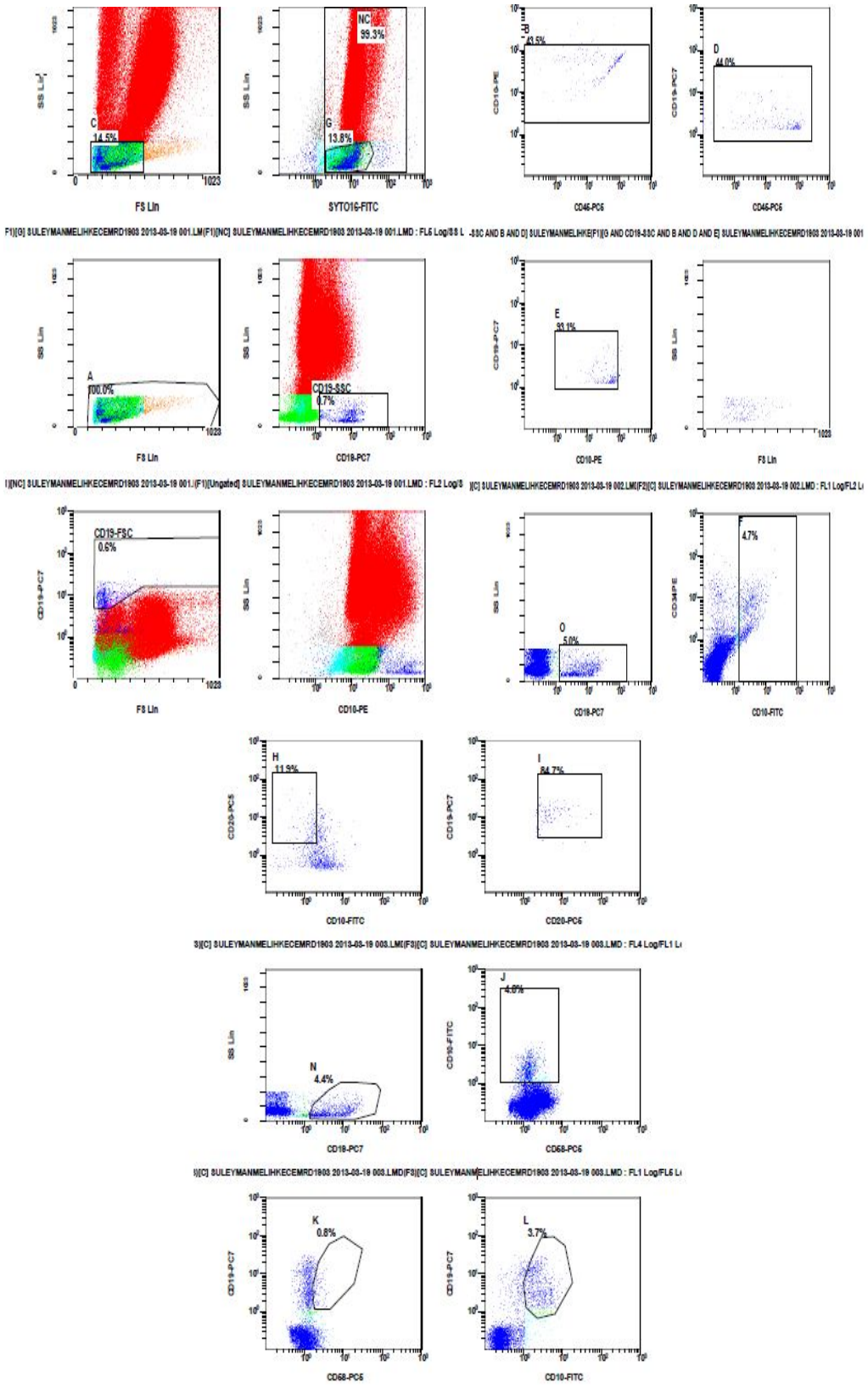
Hasta No	Cinsiyet	yaş (ay)	Lökosit (/mm^3)	MNS (/mm^3)	Hemoglobin (gr/dl)	Trombosit (/mm^3)	8.gün MNS/mm^3	33.gün remisyon	Risk grubu	SSS tutulumu	translokasyon	relaps
1	Erkek	27	4140	630	11.4	27000	0	0	MRG	-	-	-
2	Erkek	60	4170	1160	8.4	378000	147	+	SRG	-	-	-
3	Erkek	36	25620	750	8.1	17	156	+	MRG	-	-	-
4	Kız	114	4960	3690	13.5	636	900	+	MRG	-	-	-
5	Kız	96	108000	6550	8.3	92	120	+	MRG	-	-	-
6	Erkek	152	2540	940	11	132	0	+	MRG	-	-	-
7	Kız	54	2710	340	9.6	61	4000	+	HRG	-	-	-
8	Erkek	48	5500	300	11.2	30	0	+	SRG	-	-	-
9	Erkek	14	6090	1260	9.2	818	278	+	HRG	-	-	-
10	Erkek	21	12990	4270	13.1	512	95	+	SRG	-	-	-
11	Kız	168	4260	280	10.9	134	0	+	MRG	-	-	-
12	Kız	132	215600	85000	5.1	388	>1000	+	HRG	-	+(PH)	
13	Kız	94	25000	11000	6.5	111	>1000	+	HRG	+	-	+
14	Erkek	17	6900	720	5.8	481	0	+	SRG	-	-	-
15	Erkek	32	4840	250	7.7	140	>1000	+	HRG	-	-	-
16	Erkek	132	2810	-	6.7	10	0	+	MRG	-	-	-
17	Erkek	84	18050	250	3.3	62	550	+	HRG	-	-	-
18	Kız	60	2530	-	1.4	97	0	+	SRG	-	-	-
19	Kız	32	31000	-	4.8	21	200	+	MRG	-	-	-
20	Kız	48	185000	-	6.8	8	0	+	MRG	-	-	-
21	Erkek	18	7250	50	8.1	16	2133	-	HRG	-	-	-
22	Kız	60	3070	400	12.6	32	0	+	MRG	-	-	-
23	Erkek	192	42000	730	8.1	78	268	+	MRG	-	-	-
24	Erkek	192	127000	6100	12.6	80	287	+	MRG	-	-	-
25	Erkek	183	2780	190	6.7	38	128	+	MRG	-	-	-
26	Kız	22	69000	5180	3.1	44	620	+	MRG	-	-	-
27	Erkek	55	1720	30	3.7	61	400	+	SRG	-	-	-

Ek Tablo 2:Hastaların tanı anı ve 15.Gün CD 49f değerleri

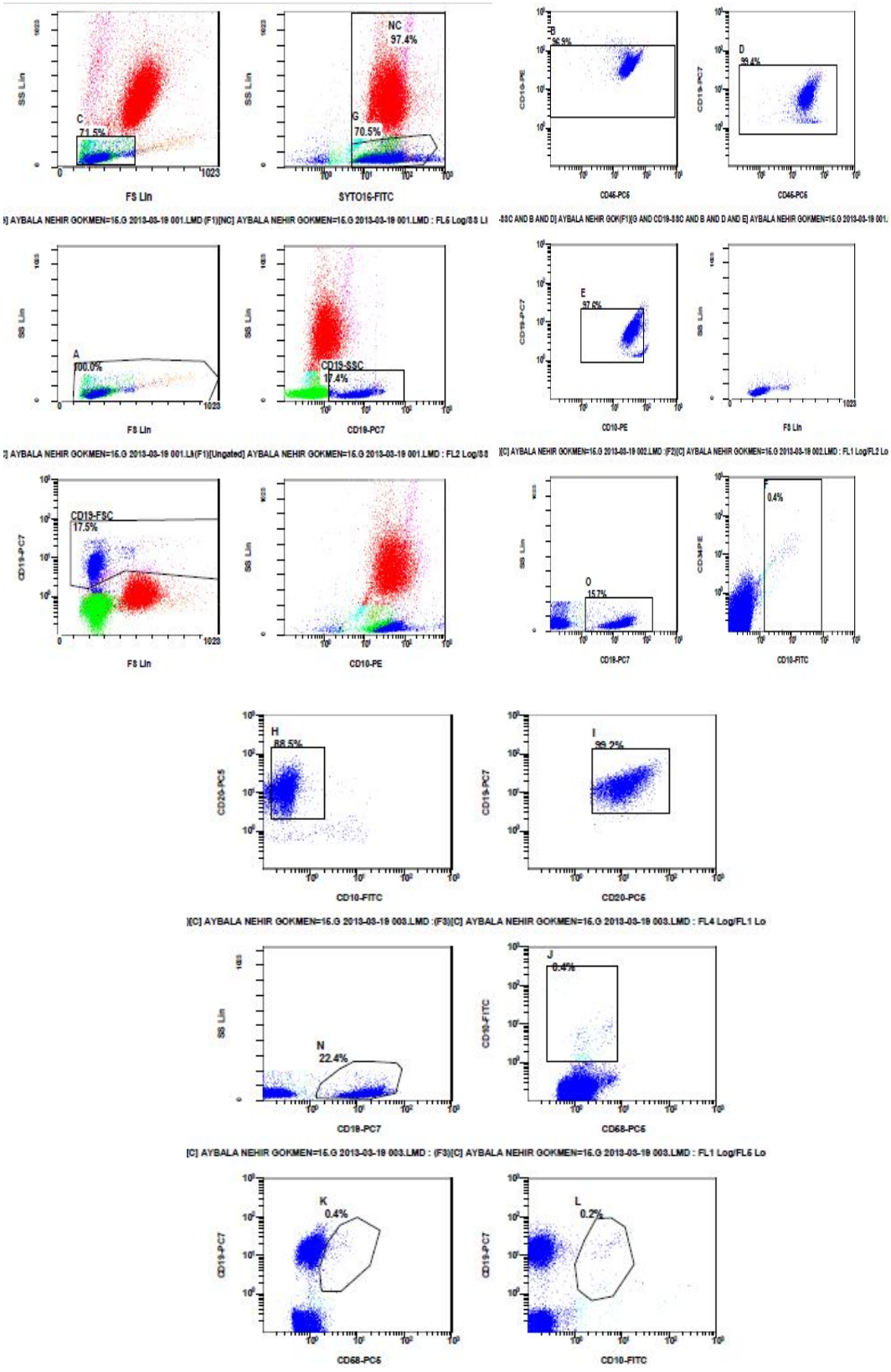
Hasta No	Tanı anı CD 49f	15.Gün CD 49f
1	38.4	2.3
2	4.4	1.0
3	41	11
4	49	1.5
5	62.5	1.0
6	41	6.0
7	11.1	7.0
8	26	1.8
9	52.5	1.6
10	8.0	2.0
11	57.7	3.8
12	44	1.0
13	22.5	2.92
14	73	66
15	88.5	-
16	30.9	1.2
17	49.8	4.5
18	33	0.8
19	79.2	3.0
20	56	6.0
21	22	1.0
22	57	1.0
23	5	5.0
24	11.8	1.4
25	74.5	2.0
26	35	1.0
27	15	7.0

Ek tablo3: Hastaların MRD değerleri

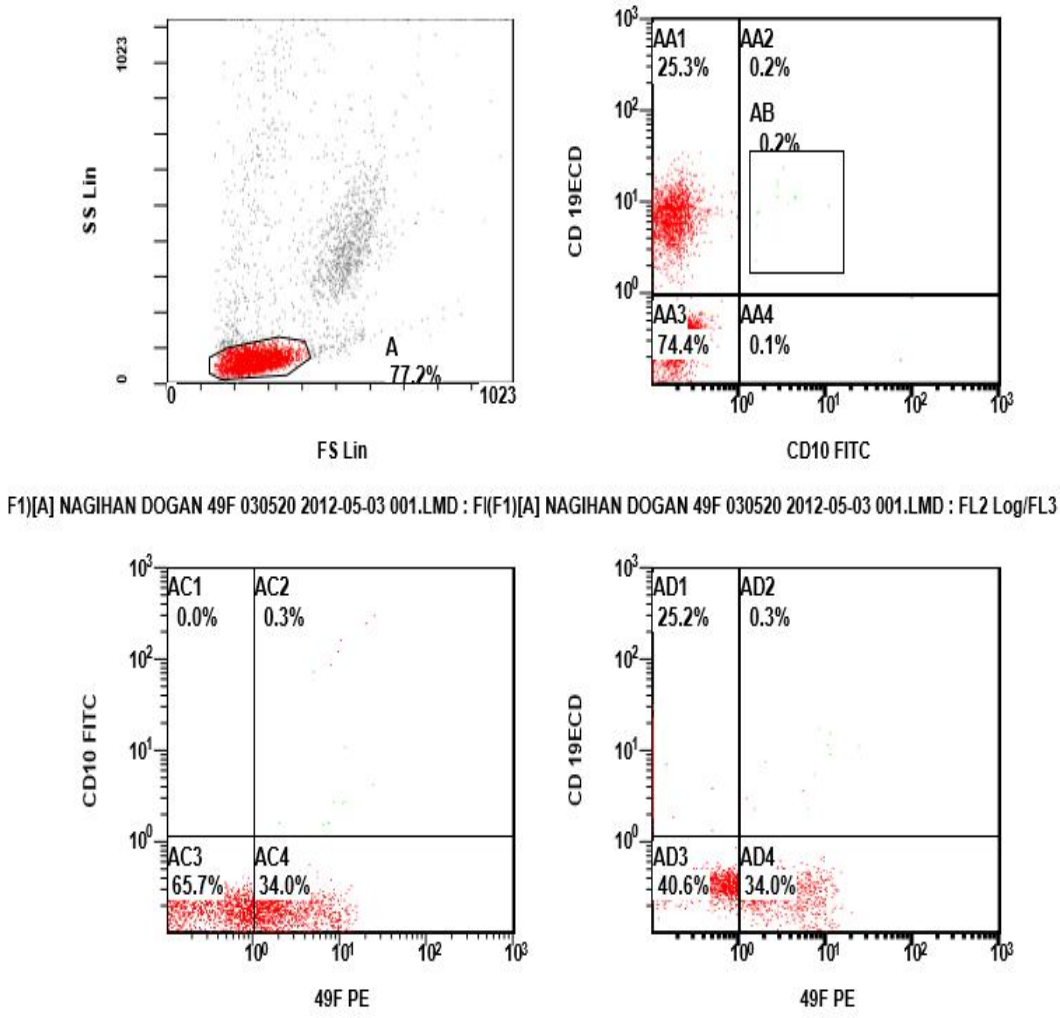
Hasta No	15.Gün MRD
1	62.0
2	1.0
3	11.0
4	4.0
5	0.08
6	0.1
7	6.0
8	13
9	4.0
10	0.1
11	0.02
12	40
13	2
14	78
15	18
16	0.06
17	22
18	0.16
19	0.01
20	0.02
21	-
22	28
23	0.1
24	3.0
25	0.01
26	0.02
27	9.0



Ek Şekil 1: MRD %0.11



Ek Şekil 2: MRD % 16,34



Ek Şekil 11:CD 49f %34

TC.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr. Tuba KURT'a ait **"Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemilerinde Minimal Rezidüel Hastalık Tanısında CD 49f'nin Önemi"** adlı çalışma, jürimiz tarafından **Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı**'nda Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 01.07.2013

İmza:

Üye : Prof Dr Türkan PATIROĞLU .....

Üye : Prof.Dr. Duran ARSLAN .....

Üye : Yard.Doç.Dr. Ebrem ÜNAL .....

Üye : ....