

Hematopoietik Hücre Nakli Sonrası Minimal Rezidüel Hastalığın (MRH) Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

Klara DALVA

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı Laboratuvarı

GİRİŞ

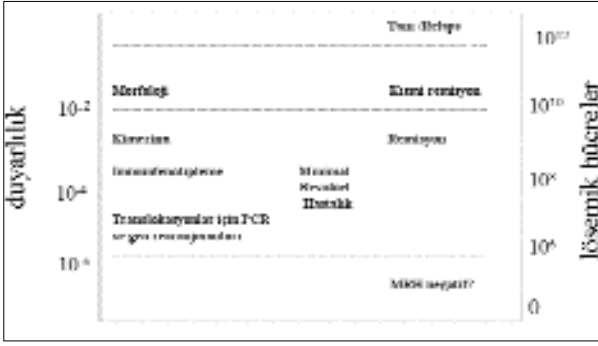
Hematolojik malinitelerin tedavisinde hedef, tümör hücre yükünün olabildiğince azaltılmasıdır. Tedavi başarısının klinik ya da morfolojik verilerle değerlendirilmesi ne yazık ki yeterince duyarlı yöntemler değildir (Şekil 1, Tablo 1). Kemik iliğinde normalde belli oranlarda bulunan öncü(blast) hücrelerin malin olanlardan morfolojik olarak ayrılması ve tedaviye bağlı görülen bazı morfolojik değişiklikler nedeniyle tedavinin başarısını değerlendirecek yöntem arayışlarına gidilmiştir. Son yıllarda çok az sayıda bile olsalar malin hücrelerin gösterilmesi yani Minimal Rezidüel Hastalığın(MRH) saptanması için yapılan pek çok çalışma, akut lösemi, kronik miyelositer lösemi, Hodgkin dışı lenfoma, multipl miyelom, lenfoproliferatif hastalıklar gibi pek çok hematolojik malinite MRH in prognostik değeri olduğunu göstermiştir (Tablo 2). MRH in zamanında tesbit edilmesi, hastalığın sınıflandırılması, risk faktörlerine göre gruplandırılması, hedefe yönelik tedavi protokollerinin uygulanması, zamanında etkili bir tedavi başlatılması imkanlarını verdiğinden rutin çalışmalardaki önemi giderek artmaktadır. MRH, kalitatif yöntemler ile tesbit edilebilir; ancak, kantitatif ölçümler ile lösemik hücre miktarının zaman karşı belirlenmesi çok daha yararlı olmaktadır. Bu amaçla kullanılan yöntemler arasında:

- Tümöre özgü DNA hedeflerinin (ör: İmmunglobulin/T hücre reseptör gen yeniden düzenlenmeleri) saptandığı moleküler teknikler
- Tümöre özgü RNA hedeflerinin(ör: füzyon gen transkriptleri) tesbit edildiği moleküler teknikler
- Akım sitometresinde yapılan immunfenotipleme çalışmaları sıralanabilir.,

MRH tesbiti için kullanılan yöntemlerin:

- Duyarlılığının 10-4-10-6 düzeylerinde olması,
- Aynı hastalığı taşıyan kişilerin tümünde uygulanabilir olması,
- Hastalığa özgün olması,
- Hızlı, ucuz, kolay uygulanabilir ve standardize edilebilir bir yöntem olması,
- Elde edilen sonuçların laboratuvarlar arasındaki tekrarlanabilirliğinin iyi olması,
- Tesbit edilen hedefin miktarının belirlenebilmesi gereklidir.

MRH çalışmalarında çok az sayıdaki tümör hücrelerinin bile tesbit edilmesi sonucunda hastalık biyolojisi ile ilgili yeni yaklaşımlar da ortaya atılmıştır. Örneğin tedavi sonrasında az sayıda t(8;21)/AML-ETO füzyon transkriptlerini taşıyan Akut Miyeloblastik Lösemi(AML) olgularında, gen re-aranjmanı gösteren monoklonal hücreler bulunan çocukluk çağı ALL olgularında hastalığın uzun süre nüks etmediği görülmüştür. Bu, kalan tümör hücrelerinin bir süre çoğalmadan, sessiz bekleyebildikleri görüşünü desteklemektedir ancak hücrelerin tekrar bölünmesi için tetiği çeken mekanizmalar henüz aydınlatılmamıştır. Son zamanlarda yapılan çeşitli çalışmalar lösemi ve lenfomalara eşlik eden translokasyonlara ait füzyon genlerinin sağlıklı bireylerin kan ya da dokularında da bulunabildiğini göstermiştir. Örneğin hassas yöntemler ile t(9;22)/BCR-ABL, t(14;18) BCL2-IgH füzyon gen transkriptlerinin sağlıklı bireylerde varlığı gösterilmiştir. Kullanılan kantitatif yöntemlerin çeşitli modifikasyonlar yapılmaksızın bu genler ile patolojik hücredeki genleri birbirinden ayırt etmesi mümkün değildir. Ancak tümör hücreleri ve sağlıklı hücrelerde aynı anda uygulanan " Southern Blot"



Şekil 1. Minimal rezidüel hastalık (MRH) standart morfolojik tekniklerle belirlenenden (10^2) az lösemik hücrenin varlığını ifade eder. MRH tayini için çeşitli yöntemler kullanılabilir (Mehmet Uzunel, Stockholm 2003)

benzeri teknikler ile sağlıklı hücre ve tümör hücrelerinde bulunan füzyon genleri arasında bazı farklılıklar ortaya koyulabilir.

Çeşitli hematolojik malinitelerde MRH'nin tesbitine yönelik bazı uygulamalar metinde özetlenmeye çalışılmıştır.

2. KULLANILAN YÖNTEMLER

2.1 MRH'nin Moleküler Tekniklerle Saptanması

MRH'nin tesbiti için kullanılan en duyarlı yöntemler polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temeline dayananlardır. PCR temeline dayalı yöntemler ilk

olarak 1980'lerde MRH tesbiti için kullanılmaya başlanmıştır ve kalitatif çalışmalara dayanmaktadır. PCR uygulamalarında, negatif sonuç alınana kadar yapılan bir seri seyreltme işlemi ve yarışmalı PCR teknikleri kullanarak miktar tayini yapmak mümkün olsa da; son yıllarda kullanımı yaygınlaşan "Real-Time PCR" (RT-PCR), "Real Time Quantitative" PCR (RQ-PCR) teknikleri ile miktar tayini çok daha kolay uygulanabilir hale gelmiştir. Semi-kantitatif bir yöntem olan "Nested PCR" ile iki primer seti kullanarak ardışık olarak yapılan PCR ile milyonda bir sıklıkta bulunan bir hücre bile tesbit edilebilirken RQ-PCR ile duyarlılık 10^{-4} - 10^{-5} düzeylerinde bulunmaktadır. MRH tesbitinde kullanılan yöntemlerin ancak az bir kısmının duyarlılığı istenen düzeylerde dir.

2.1.1 MRH'nin Saptanması için Hedefler:

Hematolojik malinitelerde MRH'nin tesbit edilmesi için çeşitli gen dizileri hedef olarak seçilebilir. Üç başlık altında toplanabilen bu hedefler;

- 1) Immunglobulin(Ig) ve T Hücre Reseptör (TCR) genleri (DNA),
- 2) Kromozomal translokasyonlar sonucunda oluşan füzyon gen transkriptleri (RNA) ve kırılmanın olduğu füzyon bölgeleri(DNA),
- 3) Atipik genler veya ekspresyonları atipik olan

Tablo 1. Hematolojik malinitelerde PCR ile MRH tesbiti için seçilen hedeflerin duyarlılığı ve kullanılabilme oranları (VHJ van der Velden ve ark: Leukemia 2003 den tercüme edilerek alınmıştır)

	Ig/TCR gen rearanjmanları Füzyon genleri		Diğer genler		
Duyarlılık	10^{-4} - 10^{-5}	10^{-4} - 10^{-5}	FLT3-ITD 10^{-4} - 10^{-5} (%)	WT-1 10^{-4}	HDX11L2 10^{-4}
B hücreli					
Pro.B_ALL (çocuk)	%95	40-50	<2	V*	<%2
Pro.BALL (erişkin)	%90	35-45	<2	%70-90	V*
B-KLL	>%95	<5	<2	<%2	V*
B hüc. Lenfoma	>%95	25-30	<2	<%2	V*
Multipl miyelom	%95	10-15	<2	<%2	V*
T hücreli					
T ALL (çocuk)	>%95	10-25	<2	V*	%20-35
T ALL (erişkin)	%90	5-10	<2	%75	%20-35
T hüc. Lenfoma	%95	10-15	<2	V*	<%2
Miyeloid seri					
APL	V*	>95	20-30	V*	V*
AML (çocuk)	%5-10	20-40	10-20	%85-100	<%2
AML (erişkin)	%5-10	10-20	15-30	%85-100	V*
KML	V*	>95	<2	V**	V*

V*: yeterli veri henüz yok ya da hasta sayısının sayısı az

**WT-1'li hedef kromozom translokasyonu kronik lenfositik lösemi için spesifik değildir

Tablo 2. Hematolojik malinitelerde MRH tayininin uygulanma alanları (VHJ van der Velden ve ark: Leukemia (2003) den tercüme edilerek alınmıştır)

	MRH Uygulamaları			
	Tedaviye erken yanıtın tespiti	Tedavinin titrasyonu için düzenli takip	HKHN öncesi MHH nin tesbiti	HKHN sonrası MHH tesbiti
Lenfoid maliniteler				
ALL	++	+	++	+
B-KLL	-	+	+	+
B-NHL	-	+	+	+
Multipl Miyelom		+	+	+
Miyeloid maliniteler				
APL	++	++	+	+
AML	++	-	+	+
KML	+	+	+	+

± : MRH tayininin değeri ampirik çalışmaları belirtenmiştir

++ : Klinik yanıt olduğu düşünülse de henüz yeterli sayıda prespektif çalışma yoktur.

- : MRH tesbitinin konvansiyonel sitomorfolojik verilere ek bir yarar yoktur.

+ HKHN: Hematopoietik kök hücre nakli

+ geç dinami veriler yüksek risk ve "intermediyer" risk grubundaki hastalar için yararlı

+ Sadece daha agresif tedavi semaları uygulanan hastalar ve/veya CD20 antikorlu içeren semalar için

+ İmarinin içeren tedavi uygulamalarının takibinde

genler olarak sıralanabilir.

2.1.1.1 İmunoglobulin / T Hücre Reseptör Genleri

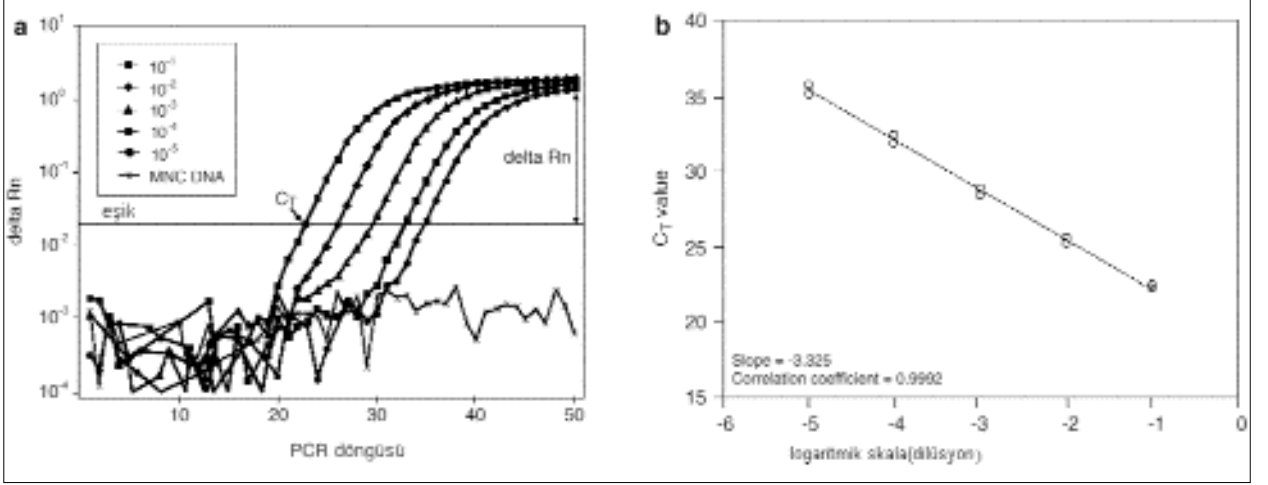
B ve T hücrelerin farklılaşmalarının erken dönemlerinde Ig ve TCR gen komplekslerinde bulunan ve antijen reseptörlerindeki "variable"(V) bölgelerin sentezlenmesi için kullanılan "variable"(V), "diversity" (D)(sadece ağır zincir sentezinde), ve "joining(J) gen segmentlerinde her hücrenin kendisine özgün olacak şekilde yeniden düzenlenmeler (rearrangement) meydana gelir. Bu segmentler, hücrenin evrimi sırasında görülen somatik DNA rekombinasyonları ile bir hücreye özgün olan V-D-J segmentlerini oluşturur. Bunun sonucu olarak da sentezlenen her antijen reseptörünün, sentezlendiği hücreye özgün olması söz konusudur. Bu yapılanma sırasında görülen yeniden düzenlenmeler rastlantısal olarak meydana gelir. Ne kadar çok kombinasyon oluşursa bireyin reseptör repertuarı da o denli geniş olacaktır. B hücrelerinde bu yeniden düzenlenmelere ilave bazı somatik mutasyonlar da görülür. Bu mutasyonların oluşması için B hücrenin antijenle karşılaşarak uyarılması gerekmektedir. Bu durumda V bölgesi içinde meydana gelen nokta mutasyonları sonucu; o hücre klonunda, antijenle uyarıldıktan sonra ek farklılaşmalar görülebilir. Ig'de daha belirgin olmak üzere antijen reseptörlerinin sabit (constant, C) bölgelerinde de bazı farklılaşmalar görülür. Antijenle uyarıldıktan sonra sentezlenen her VH bölgesi farklı bir CH bölgesi ile birleştiğinden o antijene özgün

olan farklı fonksiyona sahip reseptörlerin sentezlenmesi, "isotip switching" söz konusu olur. Ağır zincir "H" 14., kapa hafif zinciri 2. lamba hafif zinciri ise 22. kromozomlar üzerinde bulunan gen lokusları tarafından kodlanmaktadır.

Prensip olarak lenfoid malinitelerdeki bütün hücrelerin aynı klonlardan geldikleri ve o hücreye özgün olan bir antijen reseptör yapısını taşıdıkları kabul edilir. Ig ve TCR de birleşme bölgelerindeki bu farklılıklar lösemik hücrelerin parmak izleri olarak da tanımlanmakta olup; Akut Lenfoblastik Lösemi, Hodgkin dışı Lenfomalar ve Multiple Miyelom olgularında MRH nin tesbit edilmesi için birer hedef gen olarak kullanılmaktadırlar. Bu rearranjmanların tesbiti için "Southern Blotting", Dizi analizi, hasta bireydeki hücreye özgün primerlerin kullanıldığı RT-PCR teknikleri kullanılabilir.

2.1.1.2 Füzyon genleri (DNA):

Bu tür çalışmalar için kırılmanın meydana geldiği her iki bölgeye özgün primerler kullanılarak bir PCR amplifikasyonu yapılmaktadır. Uygulamanın DNA da yapılabilmesi için kırılma yerlerinin birbirlerine 2 kilobazdan(Kb) daha yakın bir alan içinde bulunması gerekir. On dördüncü kromozomda bulunan BCL2 ve 18. kromozomda bulunan IgH genlerinin katıldığı bir translokasyon, t(14;18), Folliküler Lenfomalarda(FL) olgularının %90 dan fazlasında bulunsa da standart PCR teknikleri ile ancak %60-70 olguda tesbit edilebilmektedir. Mantle Cell Lenfomada (MCL) ise t(11;14) olgularının %30-40ında mevcut olup; kırılmalar dar bir alan



Şekil 2a. RT-PCR işlemi sırasında floresanın hangi PCR döngüsünde eşik değerini üstüne çıkacağı başlangıçtaki hedefin miktarına bağlıdır. **2b:** çizilen grafik miktar tayininde kullanılır (VHJ van der Velden ve ark: Leukemia 2003 den alınmıştır)

içinde meydana geldiğinden standart PCR işlemleri ile DNA da bu translokasyonlar kolayca tesbit edilebilmektedir.

Füzyon meydana gelen kırılma alanlarının MRH takibi için iyi bir hedef olmasının nedenleri;

- Onkolojik gelişmelerin doğrudan bir sonucu olup, hastalık süresince değişmemeleri,
- DNA üzerinde tesbit edilebildiklerinden RNA gibi çalışılması zor bir materyali gerektirmemeleri,
- Bir hücre üzerinde ancak bir PCR hedefi bulunduğundan (gen transkriptlerinden farklı) kolayca miktar tesbiti yapılabilmesi,
- Kırılma noktalarının bireysel farklılıklar gösterilmesi nedeniyle kişiye özgü primerler kullanılarak PCR yapılmasına olanak tanınması olarak özetlenebilir.

Bazı kromozomal anomalilerde oluşan translokasyonlar geniş alanlara dağılmış kırılmalar sonucunda meydana geldiğinden ancak atipik gen ekspresyonları (ör: myc geninin aşırı ekspresyonu) ve oluşan füzyon gen transkriptleri ile (ör: MLL-AF4, TEL-AML1,.....) tannabilirler. Yeni teknikler ile geniş alana dağılmış kırılmaların da PCR ile tesbit edilmesi mümkün olmaktadır.

Füzyon gen transkriptlerinin oluştuğu kromozomal anomaliler:

Çeşitli hematolojik malinitelerde kromozomal anomalilerin bir sonucu olarak tümöre özgü füzyon genleri, füzyon gen mRNA transkripsiyonuna sebep olurlar. DNA daki kırılma yerleri genellikle intronlarda meydana geldiğinden kırılma yerleri farklı olsa da aynı mRNA sentezlenir. Bu transkriptler, RNA dan "reverse transcription" ile cDNA

sentezlenmesini takiben MRH tesbiti için birer hedef olarak kullanılabilirler. Kronik Miyelositer Lösemi ve t(9;22) taşıyan ALL olgularındaki BCR-ABL gen transkripti iyi bir örnektir.

2.1.1.3 Atipik Genler ve Gen Ekspresyonları:

Yukarıda sayılmış olan kromozomal anomaliler dışında hematolojik malinitelere eşlik eden pek çok gen anomalisi vardır. AML olgularında görülen ve kötü prognoz habercisi olan FLT3 gen mutasyonları, Wilm's Tümör geninin aşırı ekspresyonu örnek olarak verilebilir. FLT3 geninde görülen, farklı sayıda rasgele tekrarlar ile kendini gösteren FLT3-ITD mutasyonları, farklı intron/eksonda meydana geldiği gibi araya rasgele nukleotidler de girdiğinden bireye özgü mutasyonların oluşması söz konusu olur. FLT3 mutasyonlarının MRH takibi için kullanılması henüz yaygın kabul görmemektedir. "Mantle Cell" Lenfomada (MCL) ise görülen t(11;14) sonucunda hücre döngüsünde rolü olduğu bilinen siklinD1 gen bölgesinin transkripsiyonunda artış meydana gelir: ancak MRH için gen ekspresyonunun ölçülmesi yerine bu translokasyonun tesbit edilmesi tercih edilmektedir.

2.1.2 Kullanılan Teknikler

2.1.2.1 "Real Time" Kantitatif PCR(RQ-PCR): Bu işlem, klasik PCR işlemlerinden sonra uygulanan ve çoğaltılan bir son ürünün görüntülenmesine dayanan tekniklerden farklıdır. PCR işlemleri sırasında kullanılan floresan işaretleyiciler sayesinde her PCR döngüsünü takiben yapılan ölçümlerle ürün-deki floresanta logaritmik bir artışın gözlenmeye

başladığı noktalar belirlenir. Üründeki artış logaritmik bir faza girdiğinde bunun floresan ölçümlerine de aynen yansımaları beklenir ve floresan değerlerinin hızla eşik değerlerinin üstüne çıktığı gözlenir (Şekil 2a). Floresan ölçümler için DNA ya bağlanan ve hedefe spesifik olan floresanla işaretlenmiş problemler kullanılabileceği gibi dsDNA'ya bağlanma özelliği olan SYBER Green I gibi bir boya da kullanılabilir, böylece ürün oluştuğunda syber Green nedeniyle ölçülen floresan miktarı da artar. Bir dizi standartla hazırlanan grafikler aracılığı ile elde edilen floresan değerlerinin miktar ölçümünde kullanılması mümkün olur (Şekil 2b). Tüm PCR çalışmalarında olduğu gibi her çalışmada uygun negatif ve pozitif kontrollerin kullanılması gerekir. Çoğu RQ-PCR sisteminde floresan ölçümlerinin kalite kontrolü için internal bir referans kontrol eklenerek (ör ROX) örnekteki hedef miktarına bağlı görülen floresan değişikliklerinin optik sistemdeki değişkenlerden kaynaklanan floresan değişimlerine göre normalize edilmesi sağlanır (normalize edilmiş floresan = Rn). Kullanılan farklı sistemlere göre bir RQ-PCR işlemi <1 saat- 3 saat içinde tamamlanabilir.

RQ-PCR çalışmalarında allele özgün olan nukletid dizileri (ASO primerler) veya ASO problemler kullanılarak ya da doğrudan floresanla işaretleyerek çalışma planlanabilir. ASO primerler kullanıldığında primer çiftlerinden birinin (reverse veya forward) tümöre özgün olan diziyeye, diğerinin ise değişime uğramamış olan (wilde-type, germline) dizilere özgün olması söz konusudur. Sadece ASO problemler kullanıldığında ise "germline" sekansa yönelik bir amplifikasyonu takiben tümöre özgün olan gen bölgesine göre dizilmiş işaretli problemler kullanılarak hedef genlerin ölçülür ve analiz edilebilir hale gelmesi sağlanır. SYBER Green ile yapılan doğrudan işaretleme çalışmalarında ise işaretleme prob ya da primerler üzerinden gerçekleşmediği için spesifik olmayan floresan ölçümlerinin aranan hedef gene özgün olduğu ancak PCR ürünlerinin erime noktaları (Tm) analiz edilerek doğrulanabilir. SYBER Green ile yapılan bir amplifikasyonu takiben ASO problemler kullanılarak bir çalışma planlamak da mümkündür.

RNA ile çalışılan tüm yöntemlerde olduğu gibi negatif sonuçların materyalin bozulması nedeniyle ortaya çıkmadığını göstermek için çalışmanın her örnekte bir de kontrol geni amplifiye olacak şekilde planlanması gerekir. Bu amaçla B2MG, G6PDH, abl,.... genleri kullanılabilir.

RQ-PCR yöntemi, otomasyona uygun olması ve miktar tayinleri için daha kolay uygulanabilir ol-

ması nedeniyle MRH tesbiti için nested PCR uygulanan "reverse Transcriptase" PCR (RT-PCR) yönteminden daha yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.1.2.2 Floresan İn-Situ Hibridizasyon (FISH)

Metafaz ya da interfazdaki hücrelerin kullanıldığı bu yöntemde hedef olarak seçilmiş olan kromozomal anomaliye özgün olan floresanla işaretli problemler kullanılarak hibridizasyon işlemi uygulanır. Yıkama işlemlerini takiben floresan ataçmanlı mikroskopta tercihan görüntü analiz sistemleri kullanarak hibridizasyon sonucunda DNA ya bağlanan problemler nedeniyle oluşan floresan sinyaller değerlendirilir. Bu yöntemin 10^3 - 10^4 normal hücre arasındaki bir malin hücreyi tanıyabilecek duyarlılıkta olduğu söylenebilir de değerlendirmeler için eşik değerlerin iyi tesbit edilmesi, üst üste gelen sinyaller nedeniyle yalancı pozitif sonuçlar alınmadığından emin olmak gerekir. Gelişmiş görüntüleme sistemleriyle 3 boyutlu görüntülerin değerlendirilmesi tercih edilmelidir. FISH yöntemi ile çeşitli füzyon genlerinin, delesyonların, sayısal kromozomal anomalilerin takip edilmesi, cinsiyet farkı bulunan bireylerden yapılan kök hücre nakli sonrasında relapsın takibi mümkün olabilmektedir. Örneğin KML olgularında BCR/ABL füzyonunun bulunduğu hücrelerin saptanma duyarlılığı %5 düzeylerinde bulunmuştur. Konvansiyonel sitogenetik yöntemlere göre en önemli avantajları:

Çok sayıda çekirdeğin değerlendirilebilmesi, kriptik bazı anomalilerin saptanmasına olanak tanınmasıdır. FISH analizlerinde duyarlılık üzerinde etkili olan faktörler:

1. Proben kalitesi
2. Çekirdeğin boyutu
3. Kırılma noktasının yeri
4. Translokasyona bağlı bir araya gelen sinyallerin tanımlanması ve kabulü için kullanılan kriterlerdir.

Daha duyarlı ve otomasyona uygun olması nedeni ile MRH tesbiti için FISH yerine RQ-PCR işlemlerinin kullanılması tercih edilse de doğru probun seçilmesi şartı ile bu yöntem, özellikle füzyon genlerinde, kırılmaların hangi noktadan olduğu yönünde ipuçları verebilmekte, hastalık seyri sırasında kromozomal anomalinin doğasında bir değişiklik olup olmadığı (ör: KMLde ikinci bir Ph kromozomunun ortaya çıkması) değerlendirilebilmektedir. Folliküler lenfoma olgularında da RQ-PCR ile %60-70 pozitiflik saptanırken FISH ile bu oran %90 düzeylerinde bulunmuştur.

2.1.2.3 Immunoglobulin/T hücre reseptör gen Yeniden Düzenlenmelerinin (rearanjman) Saptanması

"Southern Blotting" tekniği Ig/TCR gen rearanjmanlarının tesbiti için referans yöntem olarak kabul edilmektedir. Lökositlerden elde edilen DNA, bir dizi restriksiyon enzimi kullanılarak kesilir ve agaroz jel üzerinde elektroforeze tabi tutulur. Naylon bir membrana aktarıldıktan sonra radyoaktif işaretli DNA problemleri kullanılarak aranan DNA hedeflerinin bulunup bulunmadığı otoradyografiyi takiben elde edilen bant görüntülerinden tesbit edilir (Şekil 3). Bu tekniğin, nispeten fazla miktarda DNA gerektirip, zahmetli ve zaman alıcı olsa da hücre topluluklarındaki tüm rearanjmanlar hakkında fikir verebilmek gibi bir üstünlüğü vardır. "Southern Blotting" ile %5 oranından fazla bulunan hücrelerin tesbit edilmesi mümkün olur. Bu tekniği kullanarak farklı bantların görüntülenmesi ile oligoklonalite ya da gen delesyonları (kayıpları) da ortaya koyulabilir. PCR teknikleri kullanıldığında ise çok daha az materyal gerekmesine karşın ancak kullanılan primerlerin özgün olduğu gen rearanjmanlarının varlığı hakkında bilgi alınır. Bu teknikler ile monoklonal ve subklonal rearanjmanlar, birbirinden ayırt edilemez, gen kayıpları belirlenemez. Lösemiden kaynaklanan rearanjmanların poliklonal olanlardan ayrılabilmesi için heterodupleks analizleri ya da Gen tarama analizleri yapılabilir.

Gen taraması analizlerinde: Rearanjmanın inceleneceği gen bölgelerine özgün olan primer çiftlerinden "reverse" olan floresanla işaretli olup; PCR ile hedeflenen bölgelerin çoğaltılmalarını takiben tek zincir haline getirilen çoğalmış DNA ürünleri (amplikon) kapiller bir elektroforez işlemine tabi tutulur. Kullanılan yöntem, diğer görüntüleme yöntemlerine göre çok daha hassas olup büyüklükleri çok yakın olan ürünlerin bile birbirlerinden ayrılmasına fırsat verir. Bu çalışma sonucunda elde edilen histogramlarda tek tek piklerin görülmesi monoklonaliteyi desteklerken; normal bireylerde, çok sayıda pikin normal bir dağılım (Gaussian) gösterecek şekilde bir grafik oluşturdukları gözlenir (şekil A3C2den).

Heterodupleks analizlerinde ise ısı ile denatüre edilen amplikonlar (tam ve takipte alınan örneklerden çoğaltılan) hızla +4°C'ye soğutulularak "duplex" oluşturmaları için ortam yaratılır. Bunu takiben poliakrilamidde yapılan bir elektroforez (PAGE) işlemi ile klonal ise homoduplekslerin poliklonal ise bir yayma şeklinde görülen heteroduplekslerin oluştuğu görülür. Bu çalışmayı gerçekleştirmek için tanı anındaki PCR ürünü ile takipte elde edilen PCR

ürünü 1:1 oranlarında karıştırılarak işlem uygulanır.

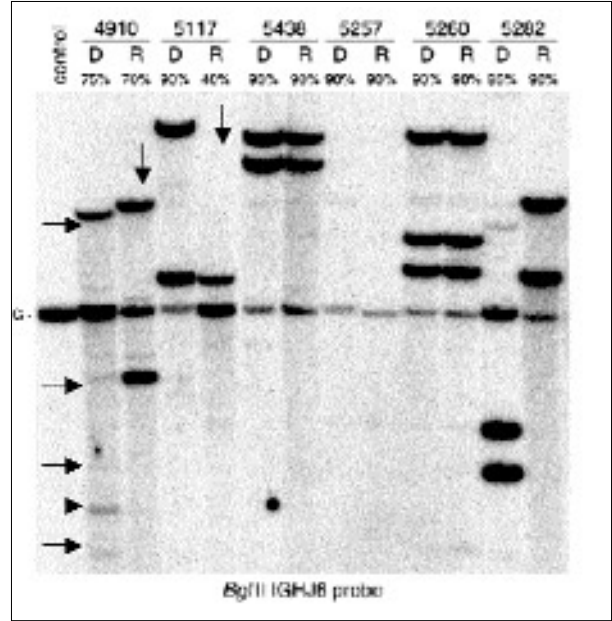
ALL olgularındaki gen rearanjmanlarının genellikle oligoklonal olması nedeniyle (yaklaşık %40) relapsta hangi klonun öne çıkacağı tahmin edilemez. Oligoklonal hedef genlerin monoklonal olanlara göre daha kolay ortadan kalkabildiklerini gösteren çalışmalar mevcuttur. Yapılan çalışmalar orijinal klondan kaynaklanan hücrelerin uzun süre sessiz kalabildiklerini göstermektedir. Bu sessizliğin nedeni henüz açık değildir. Klonal hücrelerin hücre döngüsü dışında kalmaları ve bu hücrelerin immun sistemden kaçışları birer sebep olabilir. Bir hipoteze göre de kemoterapiden kaçan hücreler kemik iliğinde tesbit edilemeyecekleri şekilde, başka bir ortamda sessiz olarak beklemektedir. Kemoterapinin lösemik olduğu belli olan klonu elimine ettiği ancak lösemi-öncesi (preleukaemic) klonları ortadan kaldıramadığı görüşü de vardır. Bu durumda tedavinin kesilmesini takiben "preleukaemic" hücreler yeni bir lösemik klon olarak ortaya çıkabilmektedir.

Sonuç olarak da relapsta lösemiye özgün olduğu düşünülen bir hedef kaybolmuş, yeni ama belirlenememiş hedefler ortaya çıkmış olabilir, yalnızca negatif sonuçlar alınabilir. Bu nedenle de MRH takipleri için her bireyde en azından 2 adet gen rearanjmanının hedef olarak seçilmesi tercih edilmelidir. Görülen antijen reseptör gen rearanjmanları yaşa ve mevcut olan kromozomal bazı anomalilere göre farklılıklar gösterir. Örneğin TCR gama gen rearanjmanları t(4;11) bulunan preB ALL olgularında seyrek görülürken t(17;19) görülen pre B ALL olgularında hiç görülmemektedir; TCRdelta gen rearanjmanları erişkinlerde genellikle Dδ2- Dδ3 bölgelerinde görülürken çocukluk çağında Vδ2- Vδ3 rearanjmanları ön plana çıkmaktadır. Bu nedenle MRH çalışmaları için hedefin ve kullanılacak olan primerlerin seçilmesi önem taşımaktadır. Hedefin doğru olarak belirlenebilmesi için de öncelikle Southern Blot, Dizi Analizi yöntemleri ile hedefin tanımlanması gerekir. MRH takibi için de bu hedefe yönelik hazırlanmış olan primerlerin (Allel Spesifik Oligonukleotidler, ASO) kullanıldığı RT-PCR çalışmalarına geçilebilir. PCR analizlerinde takip için seçilen gen, Ig ise bu reseptörlerde somatik hipermutasyonların sık görüldüğü ve buna bağlı olarak primerlerin DNA'ya bağlanma özgünlüğünün azalacağı bilinmelidir. Örneğin miyelom olgularında %8 oranında nukleotid mutasyonları görülür. Bu oran KLL de %4, Folliküler lenfomada ise %2 düzeyindedir. ALL ve MCL gibi germinal merkez evresinden önce oluşan B hücre neoplazilerinde so-

Tablo 3. Bazı Hematolojik Malinitelerde MRH tesbiti için seçilebilecek antijen kombinasyonlarından örnekler

Hastalık	Kullanılan Fluorokrom		
	FITC	PE	PerCP, PC5
T ALL	CD4	CD8	CD3
T ALL	CD7	CD5	CD3
T ALL	CD7	CD2	CD3
T ALL	CD7	CD34	CD38
T ALL	Tdt	cCD3	sCD3
B ALL	IgM	CD10	CD19
B ALL	CD19	CD34	CD45
B ALL	CD34	CD22	CD19
B ALL, NHL	kappa	lambda	CD19
AML, BALL	CD10	CD13	CD19
AML, B ALL	CD34	CD38	CD19
AML, B ALL	CD5	CD33	CD20
AML	CD65	CD2	HLA-DR
AML	CD117	CD34	CD45
AML	CD 65	CD11b	CD24
AML	CD15	CD117	CD34
AML	CD15	CD33	CD34
AML	CD34	CD56	CD33
AML	HLA DR	CD33	CD34
AML	CD7	CD13	CD19
AML	CD2	CD14	CD33
AML	CD61	GPA	CD45
AML	CD71	CD11b	
NHL	CD10	CD20	CD19
NHL	CD5	CD19	CD23
NHL	CD22	CD23	CD19
HCL	CD103	CD11c	CD20
Szary Sendromu	CD7	CD4	CD3
MM	CD38	CD138	CD19
MM	CD138	CD56	CD19

T ALL: T hücreli ALL, B ALL: B hücreli ALL
 AML: Akut miyeloblastik lösemi, NHL: Hodgkin dışı lenfoma
 MM: Multipl miyelom, HCL: Tiyosit hücreli lösemi



Şekil 3. Southern Blot analizinde 4910 nolu hasta oligoklonal ve relapsta tanıdan farklı bir bant taşıyor, 5117 no lu hasta tanıda var olan bir işareti relapsta kaybetmiş, 5438 ve 5260 nolu hastalar monoklonal ve tanı, relaps arasında bir fark yok, 5282 nolu hastada ise tanı ve relaps örnekleri tamamen farklı (SZCZEPANSKI et al. BLOOD vol 99 no7 den alınmıştır)

2.2 Akım Sitometresi ile Yapılan İmmunfenotipleme Çalışmaları

Özellikle kemik iliği örneklerinde tedaviden sonraki erken dönemlerde yapılan çok parametrelili immünfenotipleme ile MRH tesbitinin, erken relaps konusunda ipuçları verdiği dair çeşitli çalışmalar vardır. Akut lösemiler, multipl miyelom olguları en çok uygulama alanı bulan malinitelerdir. İmmünfenotipleme çalışmalarında antijen ekspresyonunda görülen 4 tip anomallikten söz edilebilir.

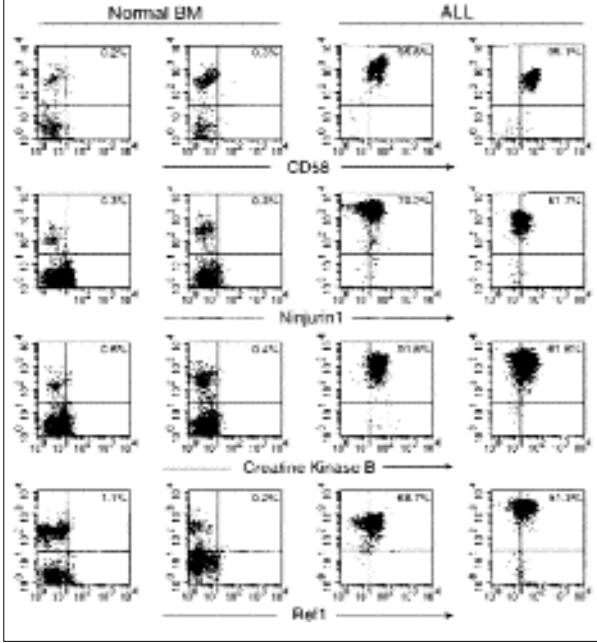
1) Hücre üzerinde kendinden başka bir hücre serisine ait antijenin bulunması (Ör: t(8;21) bulunan AML olgularında sık görülen ve bir B hücre antijeni olan CD19'un miyeloid hücrelerde bulunması, Multipl Miyelomda malin plazma hücrelerinde görülen CD56 ekspresyonu),

2) Aynı hücre üzerinde bulunan antijenlerin birlikteliklerinin normalden farklı bir örnek sergilemesi (ör: T hücrelerde bir antijenin kaybı)

3) Bir antijenin beklenenden farklı miktarda bulunması (normalden zayıf ya da kuvvetli ekspresyonu, ör: Matür granulositlerde zayıf izlenen CD33, AML olgularında miyeloblastlarda kuvvetli eksprese edilir),

4) Ektopik fenotipler, hücrenin yerleşimi ile sergilediği antijenler arasında bir uyumsuzluk vardır (ör: kemik iliğindeki bir B lenfositin Tdt taşıması)

matik mutasyonlar pek görülmezken; germinal merkez ve ondan sonraki evrim aşamalarından kaynaklanan Folliküler Lenfoma (FL), MALT Lenfoma, Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma (DLBCL) gibi neoplazilerde somatik mutasyonların olduğu görülür. Mutasyonlar IgH bölgesinde nadiren olduğundan takipler için bu bölgeye yönelik primerlerin kullanılması tercih edilir. RQ-PCR ile takibe alınan olgularda ise önce dizi analizi yapılarak sonuca göre allele özgün olan oligonukletid (ASO) primerlerin sentezletilip kullanılması gerekir.



Şekil 4: CD58, Ninjurin1, Kreatin Kinaz B, Ref1 gibi proteinlerin normal kemik iliğindeki öncü hücrelerde(CD10+) bulunmazken ALL olgusundaki malin hücrelerde sergilenmektedir (Chenet al, BLOOD vol 97 no7 den alınmıştır)

Akım sitometresinde hücrenin ışık saçılım karakteristiklerinde meydana gelen değişiklikler de önem taşır.

Bu yöntem ile MRH tesbitindeki duyarlılığın genellikle 10^{-4} , 10^{-5} düzeylerinde olduğu söylenmektedir. Bu hassasiyete ulaşmak için uygun antikorların doğru olarak bir araya getirilmesi ve çok sayıda hücrede (ör: 50-500000) değerlendirme yapılması gerekir. İmmunfenotipleme çalışmalarında kullanılan antikor kombinasyonları kadar hazırlama teknikleri de önem taşır. Mümkün olduğunca hücre kaybına yol açmayan yöntemler kullanılmalıdır. Çalışmalar sırasında farklı antijen kombinasyonları kullanarak MRH takibi için kullanılacak bir parametre tesbit edilmeye çalışılır (Tablo 3) (Şekil 3)

ALL olgularında yapılan bir çalışmada tedaviden sonraki 14. günde MRH düzeyi çok düşük olan (< %0.03 lösemik tipte hücre) olgularda, 35. günde MRH oranı düşük saptanan(<%0.05 lösemik tipte hücre) olgularda relapsın MRH oranı yüksek olanlara göre çok daha geç olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle tedavi sonrası erken dönemde yapılacak çalışmaların prognostik değeri olabilir. Relaps görülen olgularda hücrelerin tanı anındakiler ile aynı antijenik özellikleri taşıyabileceği de hatırlanmalıdır. Ayrıca tesbit edilen atipik hücrelerin her zaman relaps habercisi olarak değerlendirilmemesi

gerektiğini de hatırlamakta yarar vardır. Örneğin ALL olgularında tedaviden sonra erken dönemde MRH varlığı relaps lehine yorumlanır, KLL olgularında ise otolog HKHN sonrası MRH relaps lehine iken aynı bulgu allojeneik HKHN için geçerli değildir ve düşük düzeylerde MRH olası bir Graft-versus-leukemia(GVL) etkisinin işareti kabul edilebilir.

2.2 Kimerizm Çalışmaları (Bkz. Engrafman ve Kimerizm Tayin)

Kimerizm çalışmalarında HKHN ni takiben alıcı ve verici hücreleri arasındaki denge incelenerek engrafmanın gerçekleşip gerçekleşmediği , alıcının hematopoietik hücrelerinin mevcut olup olmadığı araştırılır. Bu yöntem ile lösemik hücreler tanınmadığından MRH takibinde kullanılmaz. Dönör kaynaklı hücrelerin malin ya da normal olabilmesi nedeniyle bu çalışmaların anormal olan hücre serisinin hücreleri seçildikten (sort) sonra yapılması yarar sağlar. Özellikle kemik iliğinden alınan örneklerde alıcı kaynaklı stromal hücrelerin varlığı nedeniyle MRH için yalancı pozitif değerlendirmelerin yapılması mümkündür.

3. ÖRNEK SEÇİMİ

MRH tesbiti için perifer kan örneğinin kullanılması daha pratik olsa da kemik iliği yerine perifer kan örneğinin kullanılmasına dair yapılan çalışma sayısı fazla değildir. B-ALL ve T-ALL olgularında yapılan geniş bir çalışmada T ALL de kan ile Kİ sonuçları yakın bulunurken B-ALL de KI örneklerinde anlamlı fark bulunmuştur. AML olgularında ise tiplerine göre farklılıklar görülmekte olup; genelde Kİ örneklerinin kullanılması ile alınan sonuçlar daha duyarlı bulunmuştur . AML M3 için perifer kan örneğinin yeterli olduğuna dair çalışmalar vardır.

Löseminin kemik iliğinde homojen bir dağılım göstermemesi nedeniyle hatalı negatif sonuçlar alınması da söz konusu olabilmektedir.

4. ÖRNEKLEME ZAMANI

Tanı anında yapılan çalışmalar ile MRH takibinde kullanılacak parametrenin seçilmesi gerekir. Bundan sonra uygulanan tedavi seçeneklerine göre bir yol izlenmelidir. Örneğin erişkinlerdeki ALL olgularında tedaviye yanıtın çocukluk dönemindeki yanıtlardan geç olduğu bilinmektedir. Bu nedenle tedavi sonrası erken dönemde MRH tesbitini tek bir ölçümle değil de seri ölçümlerle yapmak gerekir.

Özellikle ALL nedeniyle HKHN uygulanacak olgularda nakil öncesinde MRH bulunmasının nakil-

den sonraki erken relapsın bir habercisi olduğunu gösteren çalışmalar vardır. HKHN sonrasında MRH bulunduğu halde Graft versus lösemi(GVL) etkisi ile remisyonda kalan, GVHH etkisi ile relapsa gitmeyen olgular vardır.

T hücre uzaklaştırılarak yapılan nakillerde MRH bulunan olgulardaki relaps riskinin yüksek olduğu da bilinmektedir.

HKHN den sonra yapılan çalışmalarda MRH bulunmaması iyi prognostik bir faktör olarak kabul edilse de MRH varlığının yorumlanması bu kadar kolay değildir. Bulunan MRH miktarından bağımsız olarak bazı hastalar MRH a rağmen remisyonda kalabilmektedir. ALL olgularında MRH tesbiti ile relaps arasında geçen sürenin 1-5.5 ay arasında değiştiğine dair yayınlar vardır. KML içinde relapsdan aylar önce MRH bulunduğunu gösteren çalışmalar vardır.

KML ve BCR-ABL pozitifliği olan ALL olgularında DLI veya immun baskılamasının hızla azaltılması ile GVHH uyarılarak moleküler remisyona sağlanması mümkün olabilmektedir. Merkezimizde ablatif allojeneik HKHN nakli sonrasında KML olgularında 3 aydan sonra takibe başlamakta ve negatifleşinceye kadar takip etmekteyiz. Zaman içinde progresyon olan ve negatifleşme göstermeyen olgularda ise kimerizm sonuçları ve GVHH bulunmasına göre takip aralıklarını sıklaştırmaktayız. Nakil sonrası DLI veya imatinib verilen olgularda ise aylık takibi yapılmaktadır.

5. MRH'ın ÇEŞİTLİ HEMATOLOJİK MALİNİTELERDEKİ KLİNİK ÖNEMİ

5.1 Kronik Miyelositer Lösemi (KML): Son yıllarda yaygın olarak kullanılan imatinib mesilat tedavisini takiben pek çok yeni tanı KML olgusunda tam bir klinik remisyona (CCR) sağlanabilmektedir. Klinik remisyonda olan bu olgularda MRH tesbiti için geliştirilmiş RQ-PCR teknikleri gerek perifer gerekse kemik iliğinden alınan hücre örneklerinde başarı ile uygulanabilmekte, karşılaştırılabilir sonuçlar alınmaktadır. Oysa KML dışında kalan hematolojik malinitelerin hemen hepsi için kemik iliğinden alınan örneklerin üstünlüğü yapılan klinik çalışmalarla da doğrulanmıştır. Çalışmalar sırasında elde edilen değerler, bir internal kontrol genine göre normalize edilerek raporlanır. HKHN uygulanan olgularda yapılan seri ölçümlerde negatif sonuçlar alınması, 6. aya kadar MRH bulunmaması relaps riskinin düşük olacağını göstermektedir. Ardarda alınan üç örnekte BCR-ABL/ kontrol(abl) oranı > %0.02 olan olgularda moleküler relaps bulunduğu kabul edilir. Moleküler relaps anında ya-

pılan DLI uygulamalarının klinik relapsta yapılara üstünlüğü gösterilmiştir. Tüm RQ-PCR çalışmalarında olduğu gibi BCR/ABL tesbiti için yapılan çalışmalarda da ek bir işlem uygulanmazsa tesbit edilen rearanjmanın tanı anındaki hücre klonundaki ile aynı olup olmadığı belirlenemez.

BCR/ABL'nin FISH yöntemi ile tesbit edilmesi de mümkündür. Burada özgünlüğü arttırmak için hem Ph kromozomunu hem de bu hücrelerdeki derivatif 9. kromozomu saptayacak şekilde geliştirilen probler kullanılarak(ekstra sinyal problemleri) yalnızca pozitifliklerin oranı azaltılabilir. BCR/ABL taşıdığı gösterilemeyen hücre klonlarında yeni klonal anomalilerin meydana gelmesi mümkündür. Bu füzyon geninde mutasyonlar oluşmasının ya da BCR/ABL ekspresyonundaki artışın ilaç direncine eşlik ettiğini gösteren çalışmalar vardır.

5.2 Akut Miyeloid Lösemi(AML)

AML olgularında MRH düzeyi, en önemli prognostik faktör olup; hastadaki sitogenetik bulgular ve remisyona ulaşmak için uygulanan tedavi sayısı bunu izler. Buna karşın AML olguları arasında, APL dışındakilerde, MRH takibi için kullanılacak parametreler kısıtlıdır. PCR ile takip edilebilen hastaların %40 oranında olduğu düşünülmektedir (tablo1,tablo3). Bu olgularda multiparametrik immunfenotipleme çalışmaları ile bir hedef bulma şansı daha yüksektir (%70-80)(tablo3). AML olgularında %15-20 oranlarında fenotipik değişiklikler görülebilirse de bu uzun süreli klonal evrimde gerçekleştiğinden erken dönemde yapılan çalışmalarda sorun yaratmaz. AML olgularında ALL olgularında da olduğu gibi indüksiyon tedavisinden hemen sonra, erken dönemde kemik iliği örneklerinde yapılan MRH araştırmalarının hastaları risk gruplarına göre sınıflandırmak için kullanılacağı bildirilmektedir.

Akut Promiyelositik Lösemi (APL) ve t(15;17): APLde PML-RARa füzyon geninin oluşması ile sonlanan resiprokal bir translokasyonun varlığı tipik olup; olguların yaklaşık %95 inde bu kromozomal anomali gösterilebilir. MRH nin konsolidasyon tedavisinin sonuna kadar tesbit edilebilir düzeylerde kalması erken relaps habercisi kabul edilir. Bu durumda HPKH nakli gibi daha etkili tedavi yöntemlerine geçme kararı erkenden verilebilir. Geç dönem takiplerinin ise 3 aylık aralarla yapılması MRH tesbiti için yeterli bulunmuştur. Tedavinin hematolojik değil de moleküler relaps durumunda uygulanması da hasta yaşam süresinin uzamasını sağlamaktadır.

t(8;21) görülen AML olguları: AML olgularında

Tablo 4. AML de MRH takibinde kullanılan yöntemler (John A LiuYin,David Grimwade : LThe Lancet,vol 360 July13 2002 den tercüme edilerek alınmıştır)

AML de MRH Takibinde Kullanılan Yöntemler				
	Kullanılabilirlik oranı(%)	Duyarlılık	Avantaj	Dezavantaj
Morfoloji	100	5×10^{-2}	Yalın	Hassas değil
Sitogenetik	60	$1-5 \times 10^{-2}$	Spesifik marker, genel bir tarama	Hassas değil Rezolusyon düşük, proliferasyon gerektirir
FISH	40-60	10^{-2}	Spesifik marker, interfazda kullanım	Hassasiyeti az, "background" fazla
Multiparametrik FCM	70-80	$10^{-2} - 10^{-4}$	Hızlı, daha sensitif kantitatif	Yalancı pozitiflik, LAP+ hücre ile aynı fenotipte normal hücre az, fenotip değişebilir
Moleküler: RT-PCR Füzyon geni:	30-40	$10^{-1} - 10^{-4}$	Çok hassas Kantitatif İsomasyona uygun hızlı Tekrarlanabilir	Kontaminasyon nedeniyle yalancı pozitiflik, RNA yıkımına bağlı hassasiyet azalıyor mRNA ekspresyonu az olabilir. Reverse transkripsiyon yetersiz olabilir
Diğer hedefler?	80-90		Standardizasyon mümkün	

sık görülen bu translokasyon, AML1-ETO füzyon geninin oluşması ile karakterizedir. Kemoterapi ya da HPKH naklini takiben hastalar uzun süre remisyonunda kalsalar bile RT-PCR teknikleri ile bu füzyon geninin varlığı gösterilebilmektedir. Pozitif reaksiyonların sessiz durumdaki kök hücrelerden, monosit, B hücrelerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenle MRH takibindeki değeri tartışmalıdır. Ancak RQ-PCR çalışmalarında füzyon geninde progresif bir artış gözlenmesi yaklaşan bir relapsın habercisi olabilir.

Inv 16, t(16;16) görülen AML olguları: Bu anormali genellikle AML nin FAB sınıflamasına göre M4 Eo tipi ile birlikte görülmekte olup, CBFb-MYH11 füzyon geni ile sonuçlanır. Bu füzyon geninin RQ-PCR çalışmaları ile tesbiti, bir eşik değerinin kullanılması şartı ile MRH takibi için yararlı olmaktadır.

Diğer moleküler hedefleri taşıyan AML olguları: Yukarıda sayılan translokasyonlar AML olgularının ancak %30-40'ında saptanabilmektedir. Buna karşın AML olgularında tesbit edilmiş 70'e yakın füzyon geni söz konusudur. Bunların MRH için kullanımına dair yeterli veri yoktur. Yararlı olabilecek diğer iki parametreden biri AML olgularının yaklaşık %90'ında ekspresyonu artan Wilm's Tümör geni(WT1)'in tesbiti iken bir diğeri de özellikle AML M3v tipinde sıkça görülen FLT3 mutasyonlarının belirlenmesidir. Ancak FLT3 mutasyonlarının MRH takibi için uygun bir parametre olamayacağı yönünde çeşitli veriler vardır.

5.3 Folliküler Lenfoma (FL)

FL ogularının yaklaşık %80-90'ında bulunan t(14;18) sonucu oluşan IgH/BCL2 nin MRH takibi için iyi bir parametre olduğu düşünülse de RQ-PCR ile ancak olguların %65-75'inde pozitiflik gösterilebilmektedir. Normal bireylerin yaklaşık %30-40'ında bu translokasyonu taşıyan ancak malin olmayan hücreler saptanmıştır. Çok hassas (10⁻⁶, 10⁻⁷) yöntemler ile yalancı pozitifliklere sebep olan bu durumlarda, orijinal FL hücre klonu ile karşılaştırmalı çalışmalar yapılması gerekir. RT-PCR işleminde jel görüntüleme sistemleri ile farklı karakterdeki ürünler tanınabilse de RQ-PCR ile bu mümkün olmaz. FL de PCR pozitifliği olsa da hastanın uzun süre remisyonunda kalması mümkündür. Bu nedenle t(14;18)'in FL'de MRH takibi için kullanılmasına temkinli yaklaşılmalıdır. MRH tesbiti için kemik iliği materyalinin kullanılması önerilmektedir.

5.4 Öncü B hücreli Lenfoblastik Lösemiler (preB ALL)

Özellikle çocukluk çağı pre B-ALL olgularında MRH takibi için genellikle hastaya özgün IgH anti-jen resptör gen rearanjmanları kullanılmaktadır. Tanı ve relaps anında alınan örneklerde standart bir IgH PCR işemini takiben "Southern Blot", takiben de sekans analizleri yapılarak hastaya özgün allel spesifik prob/primer yapımında kullanılır. Hastaya özgü primerlerin kullanılması ile duyarlılığın 103 kez artması mümkündür. Hasta klonuna

spesifik primerlerin kullanıldığı çalışmaların uygulanması hayli zor ve zaman alıcı olup; rutin çalışmalara uygun değildir. Bu gen rearanjmanları B hücreli lenfomalarda da MRH tesbiti için kullanılmaktadır. Bireye özgün IgH primerlerinin kullanılması ile RQ-PCR işleminin birleştirilmesi gen rearanjmanlarının tesbit edilmesine bir standardizasyon getirilmesini kolaylaştıracaktır. Son zamanlarda yapılan cDNA array çalışmalarının sonucunda ALL olgularında ekspresyonunda anormallikler olan çeşitli proteinler ortaya koyulmuştur. CD58, kreatin kinaz B, ninjurin 1, calpastatin birer örnek olup; bunlara yönelik monoklonal antikorlarla yapılan immun fenotiplemenin kemik iliğindeki normal B öncü hücreler ile malin B hücreleri ayırmada etkili olduğu gösterilmiştir (şekil 3).

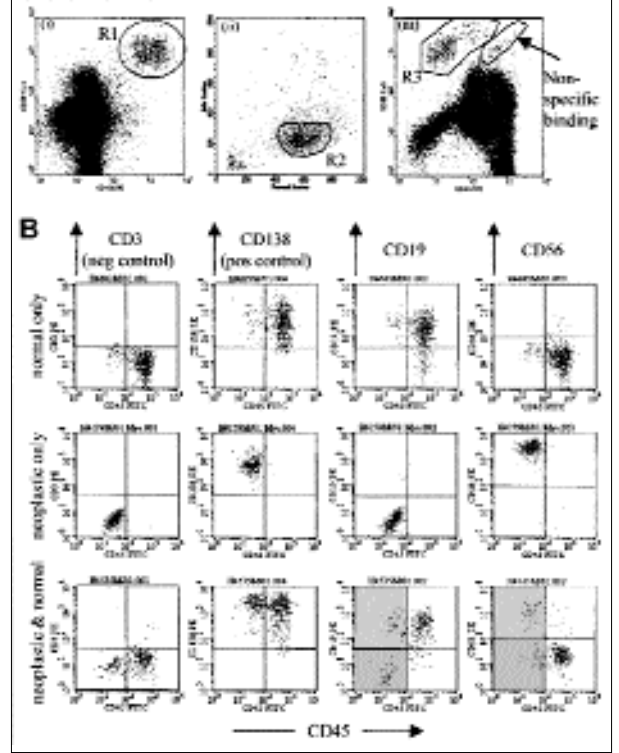
5.5 Multipl Miyelom (MM)

MM olgularında MRH takibinde morfolojik değerlendirme, paraprotein düzeylerinin ölçülmesi, yukarıda özetlenen antijen reseptör gen rearanjmanlarının tesbiti, kullanılabilir. Mevcut olan paraproteinlerin immunfiksasyon ile plazma ve idrarda gösterilememesi, kemik iliğinde plazma hücre oranının %5'in altında bulunması tam remisyon göstergesi olarak kabul edilmektedir. Bu kriterlerin yeterli olmadığı düşünülmektedir. Antijen reseptör gen rearanjmanlarının olguların ancak %60-70'inde gösterilebilmesi, duyarlılığı 10^{-6} olsa bile bu yöntemin kullanımını kısıtlayabilmektedir. MM olgularında akım sitometresi kullanarak plazma hücrelerinde aberan antijen ekspresyonlarının gösterilmesi de MRH tesbitinde kullanılabilir. En sık kullanılan parametre plazma hücrelerinde CD56 varlığının gösterilmesidir (şekil 4). Çok sayıda hücrede ölçüm yapıp doğru bir analiz tekniği seçilmesi ile moleküler sonuçlar ile karşılaştırılabilecek veriler elde edilebilmektedir. MM olgularında allojeneik HKHN'ni takiben yapılan MRH ölçümlerinin relaps riski hakkında yol gösterici olduğunu gösteren çalışmalar vardır.

6. SONUÇ

MRH analizi lösemik hastaların takibinde kullanılan önemli bir parametredir. Bağımsız bir prognostik faktör olduğunu gösteren çalışmalar vardır. Alınan sonuçların klinik uygulamalara nasıl yansıtılmasının değerlendirilmesinde öne çıkan faktörler:

- Hasta popülasyonu (Ör:erişkin ALL de HKHN sonrası MRH negatifliği daha geç, ALL ve BCR-ABL pozitif ALL de MRH pozitifliğinin anlamı farklı)
- Uygulanan HKHN hazırlama protokolü ve



Şekil 5. MM olgularında MRH tesbit edilmesi için yapılan çalışmada malin plazma hücrelerinin aberan CD56 sergilemeleri, CD45 ekspresyonunun zayıf olması CD19 ekspresyonu izlenmemesi ya da zayıf olması tanınmalarını sağlıyor (gölgeli alanlar). En üst sırada görülen plazma hücreleri normal KI örneğine aittir (Andy C. Rawstron, BLOOD vol.100 (9) dan alınmıştır)

hücre kaynağı (ör:T hücre azaltılmışta relaps riski fazla, perifer kandan hücre toplandığında MRH daha düşük)

- Kullanılan yöntemin duyarlılığı (MRH için en az 10^{-4} olması istenir)
- Kantitatif olup olmadığı (kantitatif olanlar seçilmelidir, böylece relaps habercisi olan eşik değerleri belirlenebilir, zamanında girişimde bulunulabilir)
- Örneklem zamanı ve sıklığıdır (Seri ölçümler yapılmalıdır, HKHN sonrası erken dönemde 3 aylık aralarla yapılması önerilir).

Klinisyenlerin istedikleri testler ve yorumu hakkında bilgi sahibi olmaları, eldeki sonuçlara gereksiz anlamlar yüklememeleri önemlidir. Hastaların da uygulanan testler ve sonuçlarının anlamı konusunda bilgilendirilmesi gerekir.

Moleküler hassas yöntemlerle MRH tesbit edilse bile bunun tedaviyi nasıl etkileyeceği ya da erken tedavi uygulamalarının hasta yaşamını ne ölçüde uzatacağı konuları pek çok hematolojik malinite için henüz tartışılmaktadır. Yapılan moleküler çalışmalar için uluslararası kabul gören protokollerin uygulanması veri analizi ve raporlama ile ilgi-

li standartların tanımlanması gereklidir. Örneğin KML de MRH tesbitinin standardizasyonunda bir hayli yol alınmıştır.

İyileşme sağlamak için MRH'nın tamamen yok edilmesi gerekemeyebilir. Lösemik klonların henüz tam olarak belirlenemeyen homeostatik mekanizmalarla çoğalmaya başladıklarını destekleyen pek çok görüş vardır. Belki de dikkatimizi MRH yanı sıra bu mekanizmalar üzerine yoğunlaştırmamız gerekecektir.

KAYNAKLAR

- Barrios et al. Chimerism status is a useful predictor of relapse after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia *Haematologica*.2003; 88:801-810.
- Campana et al. Determination of minimal residual disease in leukemia patients. *British Journal of Hematology* 2003;121. 823-838.
- Cotteret S et al. Fluorescent Insitu hybridization on Flow-sorted cells as a tool for evaluating minimal residual disease or chimerism after allogeneic bone marrow transplantation. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)*1998, 34:216-222.
- Mehmet Uzunel. The Methodology and Significance of minimal residual Disease detection after Allogeneic Stem Cell Transplantation Karolinska University Press Stockholm 2003 pp:8-30.
- Paietta E. Assessing minimal residual disease (MRD) in leukemia: a changing definition and concept. *Bone Marrow Transplantation* .2002; 29:459-465.
- Rita M Brazier, Margaret A Shipp Andrew L Feldman, Virginia Espina, Mary winters, Elaine S Jaffe,manuel F Petricoin III and Lance A Liotta .*Molecular Diagnostics ASH education book Hematology* 2003.
- VHJ van der Velden, A Hochhaus et al.Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real time quantitative PCR:principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003; 17.1013-1034
- A Hochhaus et al. Detection and quantification of residual disease in chronic myelogenous leukemia . *Leukemia* 2000; 14, 998-1005.
- Jordi Estave. Different Clinical value of minimal residual disease after autologous and allogeneic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia *Blood* 2002; 99(5)1873-74.
- Mehmet Uzunel et al: Kinetics of minimal residual disease and chimerism in patients with chronic myeloid leukemia after nonmyeloablative conditioning and allogeneic stem cell transplantation.*Blood* 2003; 101:469-472.
- Radich et al. The significance of bcr-abl molecular detection in chronic myeloid leukemia patients "late" 18 months or more after transplantation *Blood* 2001; 98:1701-1707.
- Chen Jiann Shih et al .Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia *Blood* 2001; 97:2115-2120.
- Charlotte Nyvold et al. Precise quantification of Minimal residual disease at day 29 allows identification of children with lymphoblastic leukemia and an excellent outcome . *Blood*, 2002; 99: 1253-58.
- Germano G et al. Clonality profile in relapsed precursor- B-ALL by gene scan and sequencing analysis. Consequences on minimal residual disease monitoring *Leukemia* 2003; 17:1573-1582.
- Marja J Willemse et al. Detection of minimal residual disease identifies differences in treatment response between T-ALL and precursor B-ALL. *Blood* 2002; 99: 4386-93.
- Maria-Belen Vidriales et al .Minimal residual disease in adolescent (older than 14 years) and adult lymphoblastic leukemias: early immunophenotypic evaluation has high clinical value. *Blood* 2003; 101: 4695-4700.
- Marinella Vetroni et al. Expression of CC58 in normal, regenerating and leukemic bone marrow B cells: implications for the detection of minimal residual disease in acute lymphocytic leukemia . *Haematologica* 2003; 88: 1245-51.
- Mehmet Uzunel et al. Minimal residual disease detection after allogeneic stem cell transplantation is correlated to relapse in patients with acute lymphoblastic leukemia . *British Journal of Hematology* 2003; 122:788-794 .
- Mehmet Uzunel et al. The significance of graft-versus host disease and pretransplantation minimal residual disease status to outcome after allogeneic stem cell transplantation in patients with acute lymphoblastic leukemia *Blood* 2001; 98: 1982-84.
- Scrideli CA et al. PCR detection of clonal IgH and TCR Gene rearrangements at the end of induction as non-remission criterion in children with ALL: Comparison with standard morphologic analysis and risk group classification. *Med Pediatr Oncol* 2003; 41:10-16.
- Szczepanski T et al .Comparative analysis of Ig and TCR gene rearrangements at diagnosis and at relapse of childhood precursor-B-ALL provides improved strategies for selection of stable PCR targets for monitoring of minimal residual disease *Blood* 2002; 99: 2315-2323.
- VHJ van derVelden et al. Age related patterns of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in precursor -B-ALL: implications for detection of minimal residual disease *Leukemia*,2003; 17:1834-1844.
- Buonomici S et al. Real-time quantitation of minimal residual disease in inv(16)-positive acute myeloid leukemia may indicate risk for clinical relapse and may identify patients in a curable state. *Blood* 2002; 99: 443-449.
- Campana et al. Detection of Minimal Residual disease in acute leukemia by flow cytometry *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)*1999;38:139-152Gallagher RE et al. Quantitative real time Rt-PCR analysis of PML-RARalpha

- mRNA in acute promyelocytic leukemia :assessment of prognostic significance in adultpatients from intergroup protocol 0129. *Blood* 2003; 101:2521-28.
25. Elmaagach et al. Detection of AML 1/ETO fusion transcripts in patients with t(8;21) acute myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplantation or peripheral blood progenitor cell transplantation *Blood* 1997; 90: 3230-31.
 26. Guerrasio et al. Assesment of minimal residual disease (MRD)in CBFbeta/MYH11-positive acute myeloid leukemias by qualitative and quantitative RT-PCR amplification of fusion transcripts *Leukemia* 2002; 16:1176-1181.
 27. Jeffrey E Rubnitz. MRD in AML :it's time to face the FACS *Blood* 2003;101: 3341.
 28. Jesus F San Miguel et al. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification *Blood* 2001; 98: 1746-51.
 29. Kerbauy D.M.Bahia et al. The singular value of CD34and CD117 expression for minimal residual disease detection in AML . *Leukemia Research* 2003; 27: 1069-70.
 30. Lo coco F et al. The importance of molecular monitoring in acute promyelocytic leukemia . Best practice & research *Clinical Hematology* 2003; 16: 503-520.
 31. Mattsson J et al. Leukemia lineage-specific chimerism analysis is a sensitive predictor of relapse in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after allogeneic stem cell transplantation *Leukemia* 2001; 15:1976-85.
 32. Tobal K et al. Molecular quantitation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia with t(8;21) can identify patients in durable remission and predict clinical relaps *Blood* 2000; 95:815-819.
 33. Yin JA et al. Minimal residual disease evaluation in acute myeloid leukemia. *Lancet* 2002; 360:160-162.
 34. Hirt C et al. Minimal residual disease (MRD) in follicular lymphoma in the era of immunotherapy with rituximab *Seminars in cancer biology*. 2003; 13:223-231.
 35. Marco Ladetto et al. High rate of clinical and molecular remisisions in follicular lymphoma patients receiving high-dose sequential chemotherapy and autografting at diagnosis: a multicenter, prospective study by Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO). *Blood* 2002; 100:1559-65.
 36. Andy C. Rawstron et al. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantatation. *Blood* 2002; 100: 3095-3100.
 37. Paolo Corradini et al. Molecular remission after myeloablative allogeneic stem cell transplantattion predicts a better relaps free survival in patients with multiple myeloma. *Blood* 2003; 102: 1927-29.
 38. Rajkumar et al. Methods for estimation of bon marrow plasma cell involvement in myeloma: Predictive value for responce and survival in patients undergoing autologous stem cell transplantataion . *American Journal of Hematology* 2001; 68:269-275.
 39. Akiko Yashima et al. Quantitative assesment of contaminating tumor cells in autologous peripheral blood stem cells of non-Hodgkin lymphomas using immunoglobulin heavy chain gene allele -specific oligonucleotide real-time quantitative-polymerase chain reaction. *Leukemia Research* 2003; 27:925-934.
 40. Ariela Noy et al. Clonotypic polimerase chain reaction confirms minimal residual disease in CLL nodular PR: results from a sequential treatment CLL protocol. *Blood* 2001; 97:1929-1936.
 41. Leal E et al. Detection and monitoring of clonality in peripheral blood and bone marrow of patients with B₂ cell lymphoproliferative disorders *Hematological Oncology* 2003; 21:25-31.
 42. Sausville JE et al Minimal residual disease detection in hairy cell leukemia *Am J Clin Pathol* 2003; 119:213-217.

EKLER

BLOOD, 15 JUNE 2003 - VOLUME 101, NUMBER 12

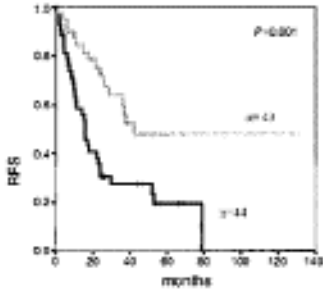


Figure 1. Relapse-free survival in adolescent and adult patients with ALL according to immunophenotypic MRD level at day +35 of induction therapy. Median RFS of 42 months for patients with low MRD levels (< 0.05%; n = 43; gray line) versus 16 months for patients with high MRD levels (> 0.05%; n = 44; black line) (P = .001).

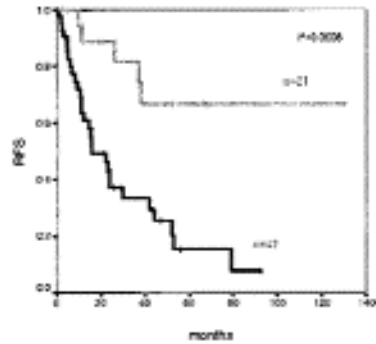


Figure 2. Relapse-free survival in adolescent and adult patients with ALL according to immunophenotypic MRD level at day +14 of induction therapy. Median RFS not reached for patients with low MRD levels (< 0.5%; n = 21; gray line) versus 16 months for patients with high MRD levels (> 0.5%; n = 42; black line) (P = .0008).

VIDRIALES et al BLOOD, 15 JUNE 2003 - VOLUME 101, NUMBER

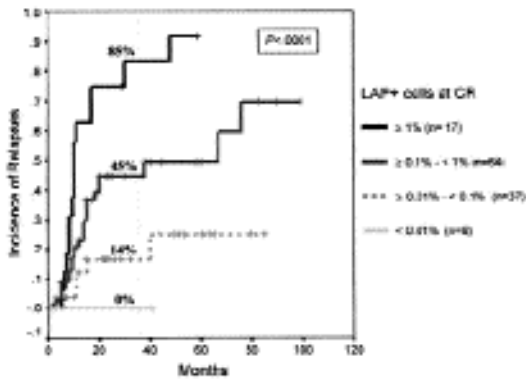


Figure 1. Relapse rates in the 4 AML risk categories according to number of LAP+ cells in the first BM in mCR. High risk (MRD: greater than 10^{-2} LAP+ cells); intermediate risk (MRD: 10^{-3} to 10^{-2} LAP+ cells); low risk (MRD: fewer than 10^{-3} LAP+ cells); and very low risk (fewer than 10^{-4} LAP+ cells; none have had relapses).

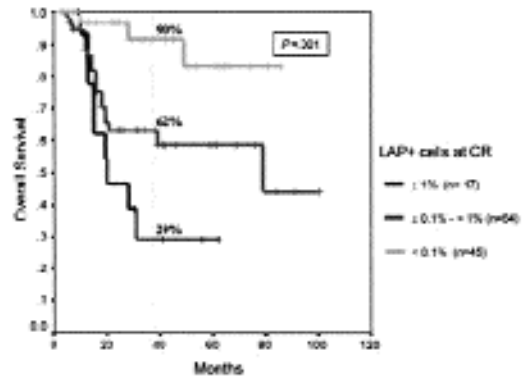


Figure 2. Overall survival of patients with AML according to MRD levels. High risk (MRD: greater than 10^{-2} LAP+ cells); intermediate risk (MRD: 10^{-3} to 10^{-2} LAP+ cells); low risk (MRD: fewer than 10^{-3} LAP+ cells); and very low risk (fewer than 10^{-4} LAP+ cells).

SAN MIGUEL et al BLOOD, 15 SEPTEMBER 2001 - VOLUME 98, NUMBER 6

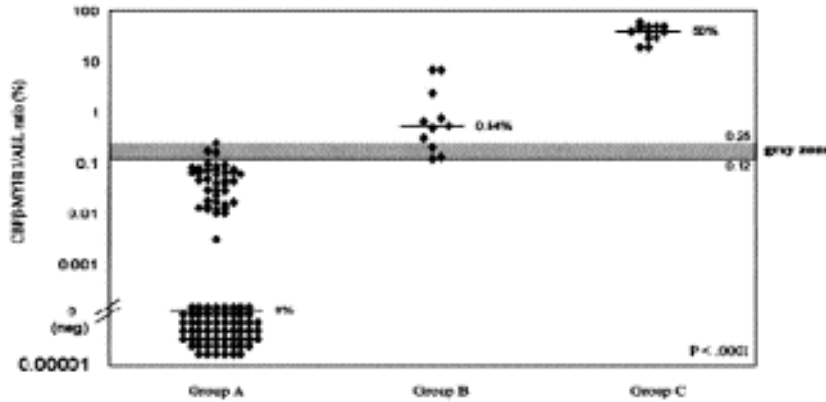


Figure 5. CBF β -MYH11/ABL ratios, as evaluated by real-time RT-PCR. One hundred twenty-five samples were taken from 21 patients with inv(16) AML during or after treatment in the absence of subsequent relapse (Group A), at any time during follow-up before relapse (Group B), or at the time of diagnosis or relapse (Group C). Differences among the 3 groups were all highly significant ($P < .0001$), as determined by the Kruskal-Wallis test. When values were lower than 0.12%, no subsequent relapse was recorded, but when values were greater than 0.25%, relapse always occurred. Values fell within the intermediate gray zone for 6 samples. Median values of each group (—).

BUONAMICI et al BLOOD, 15 JANUARY 2002 • VOLUME 99, NUMBER 2

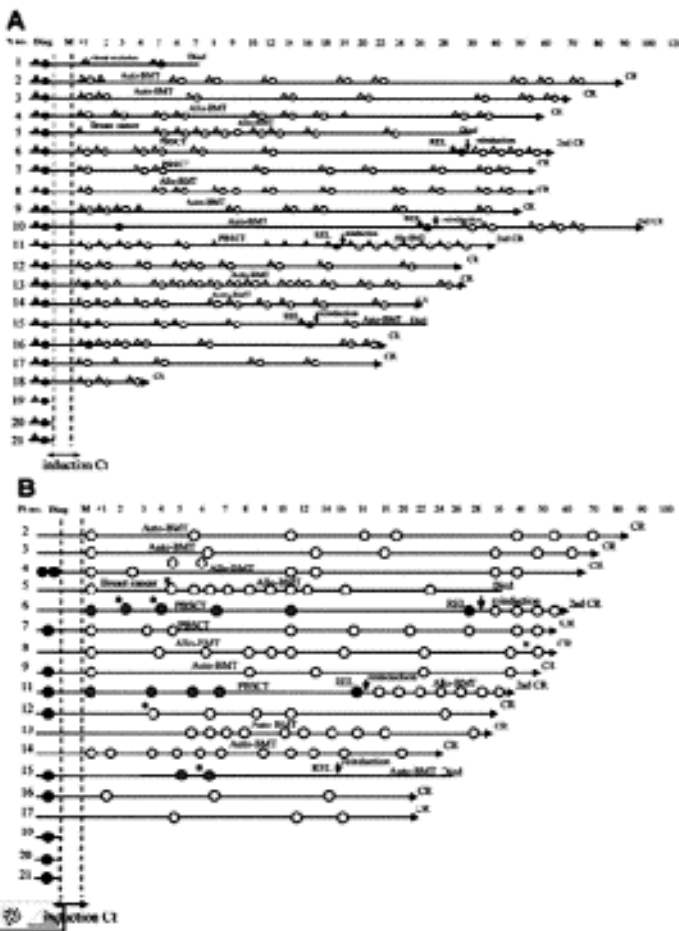


Figure 4. Schematic representations of karyotypic and qualitative RT-PCR and real-time RT-PCR follow-up of patients with inv(16) AML. (A) Karyotypic and qualitative RT-PCR follow-up of 21 patients: karyotypic analysis negative (Δ) or positive (\blacktriangle) for inv(16); molecular analysis negative (\square) or positive (\bullet) for CBF β -MYH11. (B) Real-time RT-PCR of 18 patients (patients 1, 10, 18 had insufficient material for analysis): samples taken at diagnosis or at the moment or relapse (\bullet); samples taken at any time during or after treatment before relapse (\square); samples taken during follow-up when no subsequent relapse was recorded (\circ). *Samples that fell in the gray zone with CBF β -MYH11/ABL ratios between 0.12% and 0.25%. Auto-BMT indicates autologous bone marrow transplantation; allo-BMT, allogeneic bone marrow transplantation; and PBCT, autologous transplantation with peripheral blood stem cells.

BUONAMICI et al BLOOD, 15 JANUARY 2002 • VOLUME 99, NUMBER 2

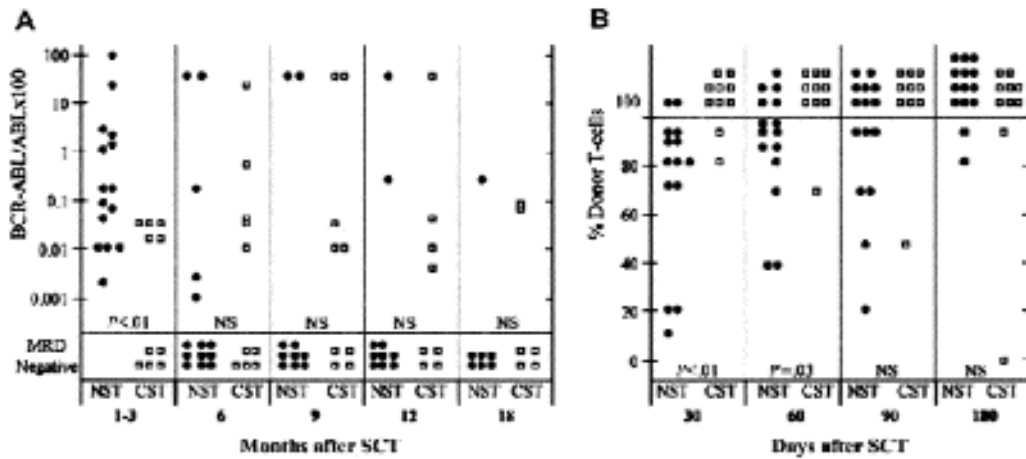


Figure 1. The incidence and level of MRD and T-cell chimerism after SCT. MRD levels (A) and T-cell chimerism engraftment (B) are shown for both patient groups at different time points after SCT. ● represents NST (nonmyeloablative) patients; □, CST (conventional stem cell transplantation patients). Differences in levels between the 2 patient groups are calculated at each time point using the Mann-Whitney U test. NS indicates not significant.

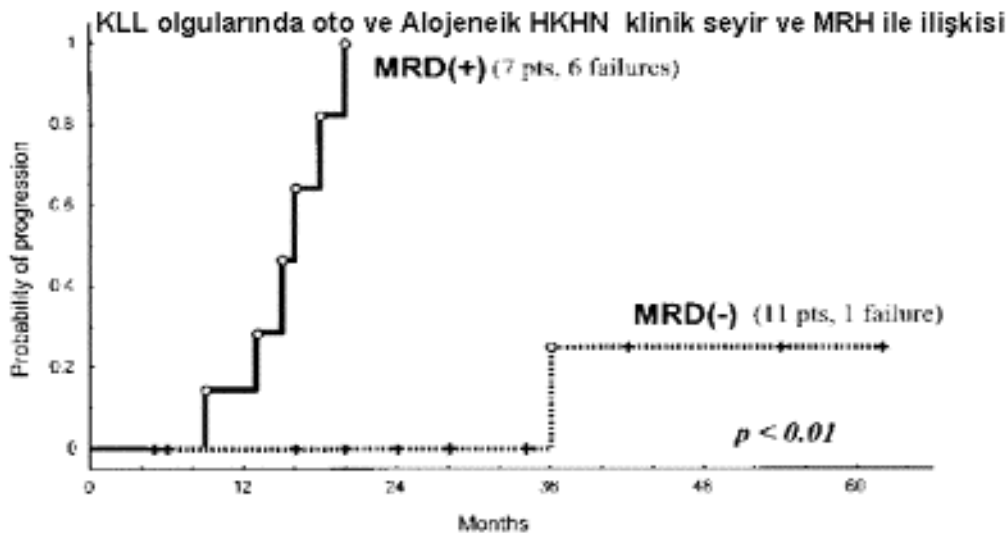


Figure 1. Clinical outcome and MRD response. Patients in CR but are MRD⁻ have a higher risk of progression than those in CR with no detectable MRD (log-rank test; $P < .01$).

Jordi Esteve, Neus Villamor, Dolores Colomer, and Emili Montserrat BLOOD, 1 MARCH 2002 • VOLUME 99, NUMBER 5

Correspondence: Jordi Esteve, Hematology Department, Hospital Clinic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain; e-mail: j.esteve@clinic.ub.es

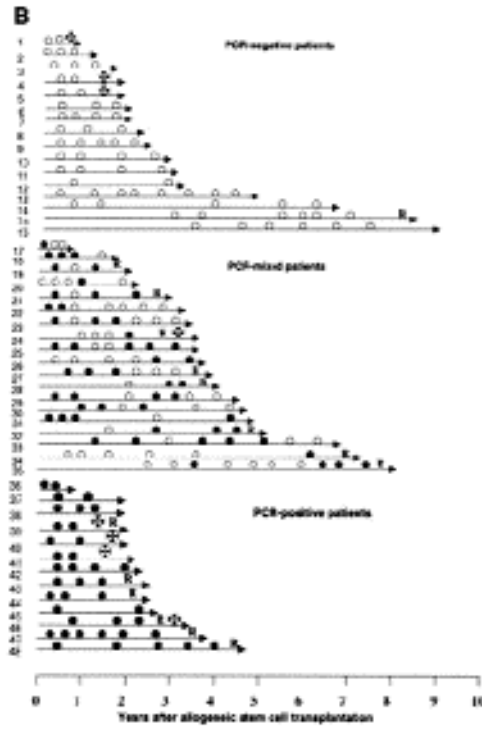
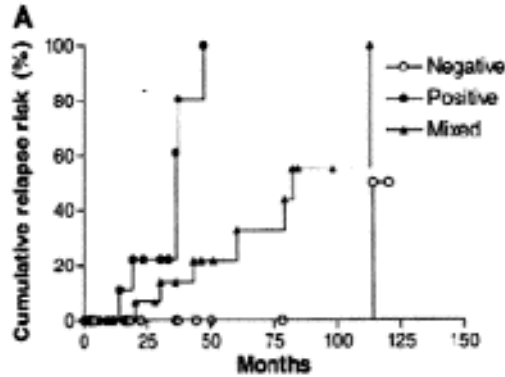


Figure 1. Molecular monitoring of residual myeloma cells after allogeneic stem cell transplantation. (A) Cumulative relapse risk according to molecular status. ○ represents PCR-negative patients; ×, PCR-mixed patients; and ●, PCR-positive patients. (B) Molecular follow-up. Unique patient numbers are on the left. ● indicates PCR-positive; ○, PCR-negative; R, relapse; and e, death. CORRADINI et al BLOOD, 1 SEPTEMBER 2003 - VOLUME 102, NUMBER 5



PCR ile negatif, pozitif, karma sonuçlar alınan MM olgularında kümülatif relaps riskleri (Corradini ve ark. BLOOD vol 102 no5 den alınmıştır)