



**T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
ANKARA ŞEHİR HASTANESİ SAĞLIK UYGULAMA VE
ARAŞTIRMA MERKEZİ**

**AKIM SİTOMETRİK B HÜCRELİ LENFOBLASTİK
LÖSEMİ MRD PANEL ANTİKORLARININ HEMATOGEN-
BLAST AYRIMINA YÖNELİK RÖLATİF FLORESAN
EKSPRESYON SEVİYELERİ VE MRD POZİTİFLİĞİ SINIR
DEĞERLERİNİN BELİRLENMESİ**

Dr. Uğurcan EKER

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ANKARA, 2021



**T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
ANKARA ŞEHİR HASTANESİ SAĞLIK UYGULAMA VE
ARAŞTIRMA MERKEZİ**

**AKIM SİTOMETRİK B HÜCRELİ LENFOBLASTİK
LÖSEMİ MRD PANEL ANTİKORLARININ HEMATOGEN-
BLAST AYRIMINA YÖNELİK RÖLATİF FLORESAN
EKSPRESYON SEVİYELERİ VE MRD POZİTİFLİĞİ SINIR
DEĞERLERİNİN BELİRLENMESİ**

Dr. Uğurcan EKER

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Fatma Meriç YILMAZ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ANKARA, 2021

TEŞEKKÜR

Asistanlık sürecimde engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, klinik biyokimyada beni yepyeni bir dünyayla tanıştıran mesleğimi daha çok sevmemi sağlayan, tez hazırlık sürecinde her zaman sabır ve anlayışla yardımcı olan tez danışmanım değerli hocam sayın Prof. Dr. Fatma Meriç YILMAZ' a

Uzmanlık eğitimi boyunca bilgi ve deneyimleri ile mesleğimde daha donanımlı ve özgüvenli yetişmemi sağlayan sayın hocalarım, Prof. Dr. Özcan EREL, Prof. Dr. Gülsen YILMAZ, Prof. Dr. Cemile BİÇER, Doç. Dr. Turan TURHAN, Doç. Dr. Canan TOPÇUOĞLU, Doç. Dr. Sevilay SEZER, Doç. Dr. Ceylan BAL, Doç. Dr. Serpil ERDOĞAN, Doç. Dr. Salim NEŞELİOĞLU ve Doç. Dr. Merve ERGİN 'e

Asistanlık sürem boyunca mesleki bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım tüm uzmanlarımıza,

Birlikte çalışmaktan çok keyif aldığım, 4 yıl boyunca pek çok güzel anı biriktirdiğimiz sevgili arkadaşlarım, eşkıdemlilerim Dr. Arzu SAKALLI NURAL ve Dr. Ortaç ATEŞ' e

Beraber çalışma fırsatı bulduğum tüm asistan arkadaşlarıma,

Beni yetiştirip bugünlere gelmemi sağlayan annem Neslihan EKER ve babam Aygün EKER' e; en iyi arkadaşım canım kardeşim Ece EKER' e

Sevgisiyle hayatıma neşe ve anlam katan, hayat arkadaşım sevgili eşim Ece EKER' e

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	v
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
ÖZET.....	x
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Lösemi	3
2.1.1. Lösemi Tanım ve Sınıflandırılması.....	3
2.1.2. Lösemi Etiyolojisi.....	3
2.1.3. Lösemi Epidemiyolojisi.....	4
2.2. Akut Lenfoblastik Lösemi.....	5
2.2.1. ALL Sınıflandırması.....	5
2.2.1.1. Morfolojik ve sitokimyasal sınıflandırma (FAB sınıflaması).....	5
2.2.1.2. İmmünofenotipik sınıflandırma (EGIL sınıflaması).....	5
2.2.1.3. WHO sınıflandırması	8
2.2.2. ALL Klinik Özellikleri.....	10
2.2.3. ALL Laboratuvar Bulguları.....	10
2.3. Akım Sitometri.....	11
2.3.1. Akım Sitometri Çalışma Prensipleri.....	13
2.3.1.1. Akış sistemi.....	13
2.3.1.2. Optik sistem.....	15
2.3.1.3. Elektronik sistem.....	17
2.3.1.4. Veri görüntüleme ve analiz.....	18
2.3.2. Akım Sitometri Uygulamaları.....	19
2.4. MRD Analizi.....	20

2.4.1. MRD Analiz Yöntemleri.....	21
2.4.1.1. Moleküler PCR ile MRD analizi.....	21
2.4.1.2. NGS ile MRD analizi.....	22
2.4.1.3. Akım sitometri ile MRD analizi.....	22
2.5. Hematogon Kavramı ve B Hücre Olgunlaşması.....	23
2.5.1. Hematogonların Morfolojik Özellikleri.....	23
2.5.2. Hematogonların İmmünofenotipik Özellikleri.....	24
2.5.3. Hematogonların Akım Sitometrik Analizi.....	25
2.5.4. Akım Sitometrik B-ALL MRD Analizi.....	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
4. BULGULAR.....	39
4.1. Analiz Verilerinin Özellikleri.....	39
4.2. İmmatür Hücre Gruplarının RMFI Seviyeleri.....	39
4.2.1. Hücre Gruplarının CD38 RMFI Seviyeleri	39
4.2.1.1. Hücre gruplarının CD38 RMFI ^{gr} değerlerinin karşılaştırılması.....	40
4.2.1.2. Hücre gruplarının CD38 RMFI ^{mo} değerlerinin karşılaştırılması.....	41
4.2.1.3. Hücre gruplarının CD38 RMFI ^{ble} değerlerinin karşılaştırılması.....	43
4.2.1.4. Hücre gruplarının CD38 RMFI ^{ble} değerlerinin karşılaştırılması.....	44
4.2.2. Hücre gruplarının CD10 RMFI seviyeleri.....	45
4.2.2.1. Hücre gruplarının CD10 RMFI ^{gr} değerlerinin karşılaştırılması.....	46
4.2.2.2. Hücre gruplarının CD10 RMFI ^{mo} değerlerinin karşılaştırılması.....	47
4.2.2.3. Hücre gruplarının CD10 RMFI ^{ble} değerlerinin karşılaştırılması.....	48
4.2.2.4. Hücre gruplarının CD10 RMFI ^{tle} değerlerinin karşılaştırılması.....	49
4.2.3. Hücre gruplarının CD34 RMFI seviyeleri.....	50
4.2.3.1. Hücre gruplarının CD34 RMFI ^{gr} değerlerinin karşılaştırılması.....	50
4.2.3.2. Hücre gruplarının CD34 RMFI ^{mo} değerlerinin karşılaştırılması.....	52
4.2.3.3. Hücre gruplarının CD34 RMFI ^{ble} değerlerinin karşılaştırılması.....	53
4.2.3.4. Hücre gruplarının CD34 RMFI ^{tle} değerlerinin karşılaştırılması.....	54
4.2.4. Hücre gruplarının CD45 RMFI seviyeleri.....	55

4.2.4.1. Hücre gruplarının CD45 RMFI ^{gr} değerlerinin karşılaştırılması.....	55
4.2.4.2. Hücre gruplarının CD45 RMFI ^{mo} değerlerinin karşılaştırılması.....	56
4.2.4.3. Hücre gruplarının CD45 RMFI ^{ble} değerlerinin karşılaştırılması.....	57
4.2.4.4. Hücre gruplarının CD45 RMFI ^{tle} değerlerinin karşılaştırılması.....	58
4.2.5. Hücre gruplarının CD19 RMFI seviyeleri.....	59
4.2.5.1. Hücre gruplarının CD19 RMFI ^{gr} değerlerinin karşılaştırılması.....	60
4.2.5.2. Hücre gruplarının CD19 RMFI ^{mo} değerlerinin karşılaştırılması.....	61
4.2.5.3. Hücre gruplarının CD19 RMFI ^{ble} değerlerinin karşılaştırılması.....	62
4.2.5.4. Hücre gruplarının CD19 RMFI ^{tle} değerlerinin karşılaştırılması.....	63
4.2.6. Hücre Gruplarının CD20 RMFI Seviyeleri.....	64
4.2.6.1. Hücre gruplarının CD20 RMFI ^{gr} değerlerinin karşılaştırılması.....	65
4.2.6.2. Hücre gruplarının CD20 RMFI ^{mo} değerlerinin karşılaştırılması.....	66
4.2.6.3. Hücre gruplarının CD20 RMFI ^{ble} değerlerinin karşılaştırılması.....	67
4.2.6.4. Hücre gruplarının CD20 RMFI ^{tle} değerlerinin karşılaştırılması.....	68
4.3. Antikor Pozitiflik Sınır Değerlerinin Belirlenmesi.....	70
4.3.1. CD38 RMFI Parametreleri İçin Pozitiflik Sınır Değerlerinin Belirlenmesi.....	70
4.3.2. CD10 RMFI Parametreleri İçin Pozitiflik Sınır Değerlerinin Belirlenmesi.....	71
4.3.3. CD34 RMFI Parametreleri İçin Pozitiflik Sınır Değerlerinin Belirlenmesi.....	72
4.3.4. CD19 RMFI Parametreleri İçin Pozitiflik Sınır Değerlerinin Belirlenmesi.....	73
4.3.5. CD45 RMFI Parametreleri İçin Pozitiflik Sınır Değerlerinin Belirlenmesi.....	74
4.3.6. CD20 RMFI Parametreleri İçin Pozitiflik Sınır Değerlerinin Belirlenmesi.....	75
4.4. Tedavi sonrası antijenik modülasyonun değerlendirilmesi.....	75
4.5. Pozitiflik sınır değerlerine göre hücre gruplarının dağılımı	76
5. TARTIŞMA.....	79
6. SONUÇLAR.....	90
7. KAYNAKLAR.....	92
8. ÖZGEÇMİŞ VE İLETİŞİM BİLGİLERİ.....	101
9. EKLER.....	102

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALL	Akut lenfoblastik lösemi
AML	Akut myeloid lösemi
AUC	Eğri altında kalan alan
B-ALL	B hücreli akut lenfoblastik lösemi
CD	Cluster of Differentiations
cIg	Sitoplazmik immunoglobulin
DNA	Deoksiribo nükleik asit
EFS	Kötü olaysız sağkalım
EGIL	Avrupa lösemi immünolojik sınıflandırma grubu
FAB	Fransız-Amerikan-İngiliz çalışma grubu
FISH	Floresan in situ hibridizasyon
FITC	Floresan izotiyosiyanat
FSC	İleri saçılım kanalı
GA	Güven aralığı
HG	Hematogon
kDa	Kilodalton
LAIP	Lösemi ilişkili immünofenotip
MESF	Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome
MFI	Ortalama floresan yoğunluğu
MRD	Minimal rezidüel hastalık
NGS	Yeni nesil dizileme
NK	Natural killer hücre
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PMT	Foton çoğaltıcı tüplerle
RFS	Relapssız sağkalım
RMFI	Rölatif ortanca floresan yoğunluk seviyesi
ROC	Alıcı işlem karakteristikleri
sIg	Yüzey immunoglobulin
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SSC	Yana saçılım kanalı
T-ALL	T hücreli akut lenfoblastik lösemi
TdT	Terminal deoksिनükleotidil transferaz
WBC	Beyaz kan hücresi
WHO	Dünya sağlık örgütü

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 2.1. B-ALL alt tiplerinin immünofenotipik profilleri

Tablo 2.2. T-ALL alt tiplerinin immünofenotipik profilleri

Tablo 2.3. WHO 2016 akut lösemi sınıflandırması

Tablo 2.4. Günümüzde klinik laboratuvarlarındaki akım sitometri uygulamaları

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan B-ALL, MRD ve HG panellerini oluşturan antikor-florokrom çiftleri

Tablo 4.1. HG, Blast ve MRD hücre gruplarının CD38 RMFI değerleri

Tablo 4.2. İkili hücre gruplarının CD38 RMFI^{gr} değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.3. İkili hücre gruplarının CD38 RMFI^{mo} değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.4. İkili hücre gruplarının CD38 RMFI^{ble} değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.5. İkili hücre gruplarının CD38 RMFI^{tle} değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.6. HG, Blast ve MRD hücre gruplarının CD10 RMFI değerleri

Tablo 4.7. İkili hücre gruplarının CD10 RMFI^{gr} değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.8. İkili hücre gruplarının CD10 RMFI^{mo} değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.9. İkili hücre gruplarının CD10 RMFI^{ble} değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.10. İkili hücre gruplarının CD10 RMFI^{tle} değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.11. HG, Blast ve MRD hücre gruplarının CD34 RMFI değerleri

Tablo 4.12. İkili hücre gruplarının CD34 RMFI^{gr} değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.13. İkili hücre gruplarının CD34 RMFI^{mo} değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.14. İkili hücre gruplarının CD34 RMFI^{ble} değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.15. İkili hücre gruplarının CD34 RMFI^{tle} değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.16. HG, Blast ve MRD hücre gruplarının CD45 RMFI değerleri

Tablo 4.17. İkili hücre gruplarının CD45 RMFI^{gr} değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.18. İkili hücre gruplarının CD45 RMFI^{mo} değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.19. İkili hücre gruplarının CD45 RMFI^{ble} değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.20. İkili hücre gruplarının CD45 RMFI^{tle} değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.21. HG, Blast ve MRD hücre gruplarının CD19 RMFI değerleri

Tablo 4.22. İkili hücre gruplarının CD19 RMFI^{gr} değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.23. İkili hücre gruplarının CD19 RMFI^{mo} değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.24. İkili hücre gruplarının CD19 RMFI^{ble} değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.25. İkili hücre gruplarının CD19 RMFI^{tle} değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.26. HG, Blast ve MRD hücre gruplarının CD20 RMFI değerleri

Tablo 4.27. İkili hücre gruplarının CD20 RMFI^{gr} değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.28. İkili hücre gruplarının CD20 RMFI^{mo} değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.29. İkili hücre gruplarının CD20 RMFI^{ble} değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.30. İkili hücre gruplarının CD20 RMFI^{tle} değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.31. CD38 RMFI^{gr}, RMFI^{mo}, RMFI^{ble}, RMFI^{tle} değişkenleri için ROC eğrisi analizi

Tablo 4.32. CD10 RMFI^{gr}, RMFI^{mo}, RMFI^{ble}, RMFI^{tle} değişkenleri için ROC eğrisi analizi

Tablo 4.33. CD34 RMFI^{gr}, RMFI^{mo}, RMFI^{ble}, RMFI^{tle} değişkenleri için ROC eğrisi analizi

Tablo 4.34. CD19 RMFI^{gr}, RMFI^{mo}, RMFI^{ble}, RMFI^{tle} değişkenleri için ROC eğrisi analizi

Tablo 4.35. CD45 RMFI^{gr}, RMFI^{mo}, RMFI^{ble}, RMFI^{tle} değişkenleri için ROC eğrisi analizi

Tablo 4.36. CD20 RMFI^{gr}, RMFI^{mo}, RMFI^{ble}, RMFI^{tle} değişkenleri için ROC eğrisi analizi

Tablo 4.37. Tedavi sonrası antijenik ekspresyon değişimi

Tablo 4.38. Belirlenen pozitiflik sınır değerlerine göre HG hücre gruplarının dağılımı

Tablo 4.39. Belirlenen pozitiflik sınır değerlerine göre blast hücre gruplarının dağılımı

Tablo 4.40. Belirlenen pozitiflik sınır değerlerine göre rezidüel blast hücre gruplarının dağılımı

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Akım sitometri cihazının bileşenleri

Şekil 2.2. Hidrodinamik odaklama

Şekil 2.3. B hücre gelişiminde antijenik ekspresyon profili

Şekil 2.4. Normal B hücre gelişimi.

Şekil 3.1. SSC/CD45 grafiği ile granülosit popülasyonunun kapılanması

Şekil 3.2. CD33/CD20 grafiği ile monosit popülasyonunun kapılanması

Şekil 3.3. CD10/CD20 grafiği ile olgun B lenfositlerin kapılanması

Şekil 3.4. SSC/CD3 grafiği ile T lenfosit kapılanması

Şekil 3.5. CD10/CD34 grafiği ile Tip 1 HG ve Tip 2 HG popülasyonlarının kapılanması

Şekil 3.6. İlgili antikora karşı açılan Count grafikleri ile ilgili popülasyonların ortalama, ortanca, mode değerlerinin belirlenmesi

Şekil 3.7. SS/CD45 grafiği ile granülosit, lenfosit ve monosit popülasyonlarının kapılanması

Şekil 3.8. CD19/CD34 grafiği ile lenfoblast popülasyonunun kapılanması

Şekil 3.9. CD19/SSC grafiği ile B ve T lenfosit popülasyonlarının kapılanması

Şekil 3.10. İlgili antikora karşı açılan Count grafikleri ile ilgili popülasyonların ortalama, ortanca, mode değerlerinin belirlenmesi

Şekil 4.1. Hücre gruplarının CD38 RMFI^{gr} değerlerinin dağılım grafiği

Şekil 4.2. Hücre gruplarının CD38 RMFI^{mo} değerlerinin dağılım grafiği

Şekil 4.3. Hücre gruplarının CD38 RMFI^{ble} oranlarının dağılım grafiği

Şekil 4.4. Hücre gruplarının CD38 RMFI^{tle} oranlarının dağılım grafiği

Şekil 4.5. Hücre gruplarının CD10 RMFI^{Gr} değerlerinin dağılım grafiği

Şekil 4.6. Hücre gruplarının CD10 RMFI^{mo} değerlerinin dağılım grafiği

Şekil 4.7. Hücre gruplarının CD10 RMFI^{ble} değerlerinin dağılım grafiği

Şekil 4.8. Hücre gruplarının CD10 RMFI^{tle} değerlerinin dağılım grafiği

Şekil 4.9. Hücre gruplarının CD34 RMFI^{gr} değerlerinin dağılım grafiği

Şekil 4.10. Hücre gruplarının CD34 RMFI^{mo} değerlerinin dağılım grafiği

Şekil 4.11. Hücre gruplarının CD34 RMFI^{ble} değerlerinin dağılım grafiği

Şekil 4.12. Hücre gruplarının CD34 RMFI^{tle} değerlerinin dağılım grafiği

Şekil 4.13. Hücre gruplarının CD45 RMFI^{gr} değerlerinin dağılım grafiği

Şekil 4.14. Hücre gruplarının CD45 RMFI^{mo} değerlerinin dağılım grafiği

Şekil 4.15. Hücre gruplarının CD45 RMFI^{ble} değerlerinin dağılım grafiği

Şekil 4.16. Hücre gruplarının CD45 RMFI^{tle} değerlerinin dağılım grafiği

Şekil 4.17. Hücre gruplarının CD19 RMFI^{gr} değerlerinin dağılım grafiği

Şekil 4.18. Hücre gruplarının CD19 RMFI^{mo} değerlerinin dağılım grafiği

Şekil 4.19. Hücre gruplarının CD19 RMFI^{ble} değerlerinin dağılım grafiği

Şekil 4.20. Hücre gruplarının CD19 RMFI^{tle} değerlerinin dağılım grafiği

Şekil 4.21. Hücre gruplarının CD20 RMFI^{gr} değerlerinin dağılım grafiği

Şekil 4.22. Hücre gruplarının CD20 RMFI^{mo} değerlerinin dağılım grafiği

Şekil 4.23. Hücre gruplarının CD20 RMFI^{ble} değerlerinin dağılım grafiği

Şekil 4.24. Hücre gruplarının CD20 RMFI^{tle} değerlerinin dağılım grafiği

Şekil 4.25. CD38 RMFI^{gr}, RMFI^{mo}, RMFI^{ble}, RMFI^{tle} değişkenleri için ROC eğrisi

Şekil 4.26. CD10 RMFI^{gr}, RMFI^{mo}, RMFI^{ble}, RMFI^{tle} değişkenleri için ROC eğrisi

Şekil 4.27. CD34 RMFI^{gr}, RMFI^{mo}, RMFI^{ble}, RMFI^{tle} değişkenleri için ROC eğrisi

Şekil 4.28. CD19 RMFI^{gr}, RMFI^{mo}, RMFI^{ble}, RMFI^{tle} değişkenleri için ROC eğrisi

Şekil 4.29. CD45 RMFI^{gr}, RMFI^{mo}, RMFI^{ble}, RMFI^{tle} değişkenleri için ROC eğrisi

Şekil 4.30. CD20 RMFI^{gr}, RMFI^{mo}, RMFI^{ble}, RMFI^{tle} değişkenleri için ROC eğrisi

Şekil 5.1. Hematogon/Blast ayırımına yönelik geliştirilen algoritma

ÖZET

Amaç: Akım sitometri analizi, B-ALL tanı ve takibinin yanı sıra ayırıcı tanıların desteklenmesi için hızlı ve güvenilir bir yöntemdir [1]. Morfolojik ve immünofenotipik benzerlikleri nedeniyle neoplastik lenfoblastların, sağlıklı hücre karşılığı olan hematogon (HG) popülasyonundan ayrımı önem teşkil eder [2]. Bu çalışmada akım sitometrik B-ALL MRD panelinde yer alan CD10, CD38, CD45, CD20, CD19, CD34 antikorlarının rölatif floresan ekspresyon seviyelerini HG ve lenfoblastik B hücrelerinde hesaplayarak; bu değerler sayesinde oluşturulacak pozitiflik sınır değerleri ile HG-blast ayırımına yönelik objektif bir yaklaşım getirmek amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada Eylül 2019-Aralık 2020 tarihleri arasında Dr. Sami Ulus Kadın Doğum, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde B-ALL ayırıcı tanısı veya B-ALL tanılı hastalarda immünofenotiplendirme ve MRD analizi için Ankara Şehir Hastanesi Akım Sitometri Laboratuvarı'nda kemik iliği numunelerinden B-ALL panel antikorları çalışılan 0-18 yaş arası hastalara ait veriler incelendi. Çalışmada oluşturulan HG, blast ve rezidüel blast hücre gruplarının antijen ekspresyon düzeyleri değerlendirildi. İncelenmesi hedeflenen blast, HG ve rezidüel blast hücre gruplarını sağlıklı hücre grubu olarak değerlendirdiğimiz granülosit, monosit, B lenfosit ve T lenfosit gruplarına oranlayarak rölatif ortanca floresan yoğunluk seviyesi (RMFI) değerleri elde edildi. RMFI değerleri ile hücre gruplarının antijen ekspresyon dereceleri karşılaştırıldı ve ROC analizi ile HG/blast ayırımına yönelik pozitiflik sınır değerleri oluşturuldu.

Bulgular: Çalışmamızda oluşturduğumuz RMFI parametreleri açısından neoplastik lenfoblastlar, Tip 1 HG popülasyonuna göre CD19, CD20 anlamlı derecede yüksek, CD38'i düşük ekspresyon gösterirken CD10 ve CD34 ekspresyonu açısından anlamlı fark bulamadık. Blast/HG ayırımına yönelik ise en güvenilir 2 parametreyi CD19 $RMFI^{Tle}$ ve CD38 $RMFI^{Mo}$ olarak bulduk. Bu iki parametreye ait pozitiflik sınır değerlerini CD19 $RMFI^{Tle}$ için 4,07; CD38 $RMFI^{Mo}$ için 1,51 olarak belirledik.

Sonuç: Belirlediğimiz pozitiflik sınır değerleri ile HG/Lösemi ilişkili blast ayırımının kantitatif değerlendirme ile objektif olarak yapılabilmesi için bir algoritma geliştirdik. Elde edilen verilerin, B-ALL ayırıcı tanısında faydalı olmasının yanı sıra

güvenilir ve standardize B ALL MRD analizi için de önemli bir adım olacağını düşünüyoruz.

Anahtar Kelimeler: B hücreli akut lenfoblastik lösemi (B-ALL), minimal rezidüel hastalık (MRD), akım sitometri, mean fluorescence intensity (MFI)



ABSTRACT

Objective: Flow cytometry analysis is a fast and reliable method for the diagnosis and follow-up of B-ALL, as well as to support differential diagnosis. Because of their morphological and immunophenotypic similarities, it is important to distinguish neoplastic lymphoblasts from their healthy cell counterpart, the hematogone population. In this study, by calculating the relative fluorescent expression levels of CD10, CD38, CD45, CD20, CD19, CD34 antigens in the flow cytometric B-ALL MRD panel in HG and lymphoblastic B cells; it is aimed to bring an objective approach to the differentiation of HG-blast with the positivity limit values to be created by these values.

Material and Method: In this study, the data of patients with the age between 0-18 whose B-ALL panel antibodies were studied from bone marrow samples in Ankara City Hospital Flow Cytometry Laboratory for differential diagnosis of B-ALL or immunophenotyping and MRD analysis in patients with B-ALL between September 2019 and December 2020 at the Dr. Sami Ulus Gynecology, Child Health and Diseases Training and Research Hospital were examined. Antigen expression levels of HG, blast and residual blast cell groups formed in the study were evaluated. Relative median fluorescence intensity level (RMFI) values were obtained by proportioning the blast, HG and residual blast cell groups, which were aimed to be analyzed, to the granulocyte, monocyte, B lymphocyte and T lymphocyte groups, which we considered as healthy cell groups. RMFI values and antigen expression levels of cell groups were compared and cut-off values for HG/blast differentiation were established by ROC analysis.

Results: While neoplastic lymphoblasts showed significantly higher expression of CD19, CD20 and lower expression of CD38 compared to Type 1 HG population in terms of RMFI parameters we created in our study, we could not find any significant difference in terms of CD10 and CD34 expression. We found the two most reliable parameters for blast/HG discrimination as CD19 RMFITle and CD38 RMFIMo. The cut-off values were determined 4.07 for CD19 RMFITle and 1.51 for RMFIMo.

Conclusion: We have developed an algorithm to objectively distinguish HG/Leukemia-associated blasts with the cut-off values we have determined, by the

quantitative evaluation. We think that the obtained data will be an important step for reliable and standardized B ALL MRD analysis as well as being useful in the differential diagnosis of B-ALL.

Key words: B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL), minimal residual disease (MRD), flow cytometry, mean fluorescence intensity (MFI)



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akut lenfoblastik lösemi (ALL), lenfoid öncül hücrelerin anormal klonal proliferasyonu ile karakterize bir hastalıktır [3]. ALL, çocukluk çağı kanserlerinin yaklaşık %25'ini oluştururken, en sık görülen çocukluk çağı kanseridir [4]. Çocukluk çağı lösemi vakalarının yaklaşık %77'sini ALL, %11'ini akut myeloid lösemi (AML), %2-3'ünü kronik myeloid lösemi ve %1-2'sini juvenil myelomonositik lösemi oluşturur. ALL'de lösemik hücrelerin kemik iliğini infiltre etmesiyle anemi, nötropeni, trombositopeni ile karakterize kemik iliği yetmezliği bulgularının yanı sıra farklı organ tutulumlarına bağlı çeşitli klinik belirtiler gelişebilir [5].

Akım sitometri cihazı, süspansiyon halindeki hücrelerinin belli bir akış kanalından geçerken hücresel özelliklerinin tespitine yönelik bir ölçüm sistemidir [6]. Klinik rutinde kullanılan akım sitometri cihazları her bir hücre üzerinde çok sayıda parametreyi aynı anda ölçme ve değerlendirme imkanı sağlamaktadır. Günümüzde akım sitometri yöntemi, dokulardaki çeşitli hücresel elementlerin tanımlanması ve sayımı için farklı uzmanlık alanlarının klinik laboratuvarlarla birlikte yürüttüğü bir uygulama alanına dönüşmüştür [7]. Klinik laboratuvarlarda gerçekleştirilen akım sitometri uygulamalarından biri olan immünofenotiplendirmenin, normal ve malign lenfoblastların ayrımı için tanısal bir araç olmasının yanı sıra lösemi hastalarında tedavi sırasında ve sonrasında minimal rezidüel hastalığın (MRD) araştırılması için de güvenilir bir yaklaşım olduğu kanıtlanmıştır [8]. Erken tedavi yanıtının kesin tanımı, farklı tedavi protokolleri arasında değişkenlik gösterse de günümüzde tedavinin ilk aşamasından sonra MRD varlığı veya yokluğunun B-ALL'li çocuklarda en güçlü prognostik gösterge olduğu kabul edilmektedir [9].

B-ALL'de MRD analizinin temel prensibi normal öncül hücrelere kıyasla blastlardaki immünofenotipik farklılığın detaylı analizidir. Sağlıklı kemik iliği T lenfositlerin aksine B lenfositlerin üretim bölgesidir. Kemik iliği numunesinden çalışılan akım sitometrik B-ALL MRD analizinde neoplastik lenfoblast hematogonlarla (HG) çakışabilmekte ve iki hücre grubunun ayırt edilmesini zorlaştırmaktadır. Lösemi ilişkili immünofenotipler (LAIP), akım sitometrik B-ALL

MRD analizinde blastların sağlıklı hücrelerden ayrımını sağlar. Rastlanan fenotipler genel hatlarıyla, imm nfenotipik olgunlaşmanın durması, antijen ekspresyonlarının artması veya azalması, uyumsuz antijen ekspresyonları, farklı soylara ait antijenlerin birlikte ekspresyonudur [10].

Çalışmamızda hastanemiz akım sitometri laboratuvarında B-ALL panel antikorları çalışılmış 0-18 yaş arası hastaların akım sitometri verileri üzerinden, sağlıklı ve neoplastik B hücrelerinin antijen ekspresyon düzeylerini karşılaştırmayı ve rutin analizde karşılaşılan bir problem olan neoplastik lenfoblast/HG ayrımına yönelik pozitiflik sınır değerlerini belirlemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. LÖSEMİ

2.1.1. Lösemi Tanım ve Sınıflandırması

“Lösemi” kelimesi yunanca “leukos”(beyaz) ve “haima”(kan) kelimelerinden köken alarak türetilmiştir ve çevresel veya genetik etkenler nedeniyle myeloid veya lenfoid hematopoezin bozulup klonal proliferasyon sonucu oluşan neoplastik hücrelerin başta kemik iliği ve diğer dokuları infiltre etmesiyle oluşan malign hastalık grubunu tanımlamaktadır[11].

Lösemi sınıflandırmasında ilk kriter olan akut-kronik lösemi ayrımı klonal proliferasyona uğrayan hücre grubuyla ilişkili bir ayrımdır. Akut lösemi, hastalık tablosunda immatür hücrelerin baskın olduğu agresif seyirli ve tedavisiz mortalite süresi daha kısa olan durumu tanımlarken, kronik lösemi daha olgun hücrelerin proliferasyonu ile karakterize ve klinik olarak daha yavaş seyirli hastalık grubunu ifade eder.

Sınıflandırmada diğer bir kriter olan lenfoid-myeloid ayrımı ise lösemik hücrelerin köken aldıkları hücre soyuna dayanmaktadır. AML ve ALL çocukluk çağı lösemilerinin önemli bir kısmını oluşturmakta olup kronik lösemiler çocukluk çağı lösemilerinde nadiren görülür. ‘Konjenital lösemi’ terimi ise hayatın ilk 4 haftası içerisinde teşhis edilen lösemileri ifade eder [12].

2.1.2. Lösemi Etiyolojisi

Hastalığın nedeni sıklıkla belirsizdir ve tanımlanabilir bir risk faktörü yoktur, ancak artan insidans belirli çevresel veya genetik risk faktörleri ile ilişkilendirilmiştir [3]. Erken çocukluk döneminde ilk defa ve çok sayıda farklı antijenle karşılaşma sonucu artan ve genetik yeniden düzenlenmeye uğrayan lenfositler nedeniyle bu yaş grubunda ALL insidansının artmış olduğu varsayılmaktadır. Yapılan geniş ölçekli çalışmalarda ileri babalık yaşı ve maternal fetal kayıp artmış ALL insidansı ile ilişkili bulunmuştur. ALL’li 1900’ü aşan çocuk üzerinde yapılan İskandinav vaka kontrol çalışmasında, artmış doğum ağırlığının ALL için artmış risk ile ilişkili olduğunu bildirilmiştir [13]. Çocukluk çağı lösemisi ile kentsel/kırsal durum, nüfus yoğunluğu ve diğer olası etiyolojik faktörler (çevresel maruziyetler, yaygın enfeksiyonlara

anormal immün yanıt gibi) arasındaki ilişkiye dair çalışmalarda tutarsız sonuçlar bulunmuştur.

Ataksi telenjektazi, Bloom sendromu, Down sendromu, Fanconi anemisi, Nörofibromatozis tip 1 gibi pek çok yapısal ve tek gen bozukluğunun çocukluk çağında lösemi riskini artırdığı bilinmesine rağmen bunlar toplamda vakaların çok az kısmında sorumlu tutulmaktadır[5]. Bu bozukluklar arasında en çok bilinen Down sendromunda ALL ve AML insidansı yaklaşık 10-20 kat artış göstermektedir. Ayrıca AML’de t(8;21), t(15;17), t(9,11), inv(16); ALL’de t(12,21), t(4,11), t(1,19) gibi pek çok kazanılmış kromozomal bozukluk lösemili hastalarda bulunmuştur. Lösemi insidansını artırdığı bilinen çevresel etkenler iyonize radyasyon ve belli kemoterapi ilaçlarına (etoposit, siklofosfamid) maruziyetidir [12, 14].

2.1.3. Lösemi Epidemiyolojisi

Çocukluk çağının en sık görülen neoplazisi olan lösemiler, 15 yaş altındaki çocuklarda görülen kanserlerin yaklaşık %30’unu oluşturmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri’nde löseminin yıllık insidansı 4,5/100.000 iken ülkemizde 1,5/100.000’dir [3, 15]. Çocukluk çağında ALL, AML’den daha sık görülmesine karşın erişkin yaş grubunda kronik lösemiler daha sık olmakla birlikte AML, ALL’den daha sık görülmektedir. Çocukluk çağı lösemi vakalarının yaklaşık %77’sini ALL %11’ini AML, %2-3’ünü kronik myeloid lösemi ve %1-2’sini juvenil myelomonositik lösemi oluşturur. Çeşitli lösemi formlarının görülme sıklığı hem çocuklarda hem de yetişkinlerde yaşa göre değişir. ALL hastalarının %55,4’ü 20 yaşından küçüktür ve ALL insidansı özellikle 2-4 yaş arasında belirgin pik yapmaktadır [4]. AML insidansı ise infant yaş grubunda karşılaşılan küçük bir pik dışında çocukluk çağında sabit olup ileri yaş grubunda hızla yükselme gösterir [12].

ALL erkek cinsiyette kadına göre yaklaşık 1,3 kat daha fazla görülmekte iken, AML ise erkek cinsiyette daha fazla görülmektedir. Etnik köken olarak da lösemi insidansında farklar görülebilmektedir. Yapılan bir çalışmada ALL insidansı siyahilerde milyonda 14,8, beyaz ırkta milyonda 35,6 bulunurken başka bir çalışmada hispaniklerde milyonda 43 bulunmuştur [16, 17].

2.2 Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)

ALL, periferik kanda, kemik iliğinde ve diğer organlarda olgunlaşmamış lenfoid hücrelerinin anormal klonal proliferasyonu ile karakterize heterojen bir malignitedir [3]. Çocukluk çağı kanserlerinin yaklaşık %25'ini oluşturmakta olup, çocuklukta en sık görülen çocukluk çağı kanseridir [4]. ALL patolojik olarak akut lenfoblastik lenfomadan ayırt edilemez ve bu iki durum 2008 Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflandırmasında tek bir antite (akut lenfoblastik lösemi/lenfoma) olarak kabul edilmiştir [18]. Akut lenfoblastik lenfoma, lenf nodu ve ektranodal bölge tutulumuyla sınırlı olup nadiren kan veya kemik iliğinin tutulmamasıyla karakterizedir.

2.2.1. ALL Sınıflandırması

2.2.1.1. Morfolojik ve sitokimyasal sınıflandırma (FAB sınıflaması)

1976 yılında Fransız-Amerikan-İngiliz çalışma grubu (FAB) tarafından oluşturulan ve standardize edilen ALL'nin morfolojik sınıflandırılmasında, lösemik blastlar görünümüne göre üç sınıfa (L1, L2 ve L3) ayrılmıştır [19]. L1; yüksek nükleer-sitoplazma oranına sahip, belirsiz nükleolus görünümü olan küçük lenfoblastlarla karakterizedir. Çocukluk çağı ALL'lerinin %90'ında görülen en sık alt tip L1'dir. L1 lenfoblastlardan daha büyük ve belirgin nükleollere ve daha belirgin sitoplazmaya sahip lenfoblastlar L2 sınıfını oluşturur. Çocukluk çağı ALL vakalarının %5-15'ini L2 alt sınıf oluşturur. Çocukluk çağı ALL vakalarının %1'ini oluşturan L3 morfolojisine sahip lenfoblastlarda ise bazofilik sitoplazma ve belirgin sitoplazmik vakuolizasyonlar görülür [20, 21].

2.2.1.2. İmmunfenotipik sınıflandırma (EGIL sınıflaması)

Pluripotent kök hücreler ile başlayan hematopoez süreci, sekansiyal gen ekspresyonu kontrolünde farklı hücre soylarına ait olgun kan hücrelerinin üretimini sağlar [22]. Bu farklı hücrelere ait sinyal iletimi, adezyon, büyüme gibi pek çok farklı işleve aracılık eden yüzey molekülleri CD (Cluster of Differentiations) olarak adlandırılır. Hematopoetik hücreler belli CD yüzey antijenlerini maturasyon, aktivasyon ve soy durumuna göre farklı eksprese ederler. İmmunfenotipik analiz için geçmiş yıllarda floresan mikroskobu veya immünsitokimya kullanılırken günümüzde

monoklonal antikorlar ile florokromların kullanılabilirliğinin artması sonucu çok renkli akım sitometri cihazlarıyla hızlı, objektif, ayrıntılı immünofenotiplendirme yapılabilmektedir.

Avrupa lösemi immünolojik sınıflandırma grubu (EGIL) akut löseminin tek başına immünofenotipik olarak sınıflandırmaktadır. Buna göre lösemiler myeloid soy, T soyu, B soyu veya bifenotipik olarak standartlaştırılmış kriterlerle sınıflandırılır [23].

Yüzey antijen ekspresyon paternine göre ALL'ler öncül B hücreli ALL, olgun B hücreli ALL ve T hücreli ALL olarak 3 ana gruba ayrılır.

Öncül B hücreli ALL: ALL'li çocukların %80-85'inde görülen öncül B hücre fenotipi, B hücrelerine özgü antijen ekspresyonlarının varlığı ile tanımlanır. Yüzey immunoglobulinlerin (sIg) olmaması ile olgun B hücreli ALL fenotipinden ayırt edilebilmektedir. Öncül B-ALL fenotipindeki lenfoblastların büyük çoğunluğu CD10'u eksprese etmektedir. Öncül B-ALL çeşitli yüzey antijenlerinin farklı ekspresyon paternlerine bağlı olarak alt gruplara ayrılır [24, 25].

Pro-B hücreli ALL (EGIL B1): B lenfositin en immatür hücre grubu olan Pro-B hücrelerinden köken alan bu alt tip CD10'un negatif olması ve sitoplazmik immunoglobulinlerin (cIg) yokluğu ile karakterizedir [26].

Erken Pre-B hücreli ALL (EGIL B2): Çocuk yaş grubunda en sık gözlenen öncül B-ALL alt grubu olan erken Pre-B hücreli ALL, CD10'u eksprese ederken cIg eksprese etmez [23, 25, 27].

Pre-B hücreli ALL (EGIL B3): cIg ekspresyonu ile karakterize olan Pre-B hücreli ALL, erken pre-B hücrelerinden daha olgun blastlara sahip olsa da henüz sIg eksprese edecek kadar olgun değildir [25, 28].

Olgun B hücreli ALL (EGIL B4): Pediatrik yaş grubunda yaklaşık %1 oranında görülmekte olup, klasik B hücre antijenlerinin yanında sıklıkla IgM tipinde

sIg ekspresyonu ile karakterizedir. Morfolojik olarak FAB L3 grubu ile uyumlu blastlar mevcuttur [25, 29].

Tablo 2.1. B-ALL alt tiplerinin immünofenotipik profilleri

B-ALL Alt Tipleri	İmmünofenotipik Profil
Pro-B hücreli ALL	TdT+ CD19/CD22/CD79a + CD10- cIg- sIg-
Erken Pre-B hücreli ALL	TdT+ CD19/CD22/CD79a+ CD10+ cIg- sIg-
Pre-B hücreli ALL	TdT+ CD19/CD22/CD79a+ CD10+ cIg+ sIg-
Olgun B hücreli ALL	TdT- CD19/CD22/CD79a+ CD10+ cIg+ sIg+

T hücreli ALL: Pediatrik yaş grubu ALL hastalarının %10-15’inde T hücreli ALL (T-ALL) görülmektedir. T-ALL, T hücrelerinin gelişim basamaklarıyla karakterize yüzey antijen ekspresyonlarına göre alt sınıflara ayrılabilir ancak alt gruplarının hasta kliniği ile ilişkisi sınırlıdır[30] T hücre belirteçleri genellikle CD1a, CD2, cCD3, sCD3, CD4, CD5, CD7 ve CD8’dir. CD2, CD5 ve CD7 antijenleri, en immatür T hücre belirteçleridir ancak hiçbirisi kesinlikle soy spesifik değildir. Bu nedenle T-ALL’yi tanımlamak için s/cCD3’ün gösterilmesi gerekir[29].

Tablo 2.2. T-ALL alt tiplerinin immünofenotipik profilleri

T-ALL Alt Tipleri	İmmünofenotipik Profil
Pro-T ALL (EGIL T-1)	cCD3+, CD7+
Pre-T ALL (EGIL T-2)	cCD3+, CD7+, CD5/CD2+
Kortikal T-ALL (EGIL T-3)	cCD3+, CD1a+, sCD3+/-
Olgun T-ALL (EGIL T-4)	cCD3+, sCD3+, CD1a-

2.2.1.3. WHO sınıflandırması

2000’li yılların başında akut lösemideki genetik ve moleküler bozuklukların tanımlanmasıyla birlikte WHO tarafından immünofenotip, morfolojik ve genetik özelliklerin beraber değerlendirildiği WHO sınıflandırılması oluşturulmuştur. 2008 yılında revize edilen sınıflamadan sonra gelişen teknolojiye paralel yeni nesil dizileme teknolojisi, lösemi ilişkili spesifik belirteçlerin artması ve gen ekspresyon analizleriyle tanısal ve prognostik kriterlerin gelişimi ile 2016 yılındaki son revizyonla beraber WHO sınıflandırmasının en güncel hali oluşturulmuştur [18]. WHO 2016 akut lösemi sınıflandırması **Tablo 2.3’te** özetlenmektedir.

Tablo 2.3. WHO 2016 akut lösemi sınıflandırması [18]

Akut myeloid lösemi ve ilişkili neoplaziler
Tekrarlayan genetik anomalilerle seyreden AML
t(8;21)(q22;q22.1);RUNX1-RUNX1T1 pozitif AML
inv(16)(p13.1;q22) or t(16;16)(p13.1;q22);CBFB-MYH11 pozitif AML
PML-RARA pozitif AML
t(9;11)(p21.3;q23.3);MLLT3-KMT2A pozitif AML
t(6;9)(p23;q34.1);DEK-NUP214 pozitif AML

inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM pozitif AML
t(1;22)(p13.3;q13.3);RBM15-MKL1 pozitif AML
BCR-ABL1 pozitif AML
NPM1 pozitif AML
CEBPA pozitif AML
Myelodisplastik değişiklik içeren AML
Tedavi ilişkili myeloid neoplaziler
AML, başka biçimde tanımlanamayan (NOS)
Minimal farklılaşmanın eşlik ettiği AML
Maturasyonun olmadığı AML
Maturasyonun olduğu AML
Akut myelomonositik lösemi
Akut monoblastik/monositik lösemi
Akut eritroid lösemi
Akut megakaryoblastik lösemi
Akut bazofilik lösemi
Myelofibrozis ile birlikte olan akut panmyelozis
Granülositik olgunlaşma gösteren akut myeloblastik lösemi
Down sendromu ilişkili myeloid proliferasyonlar
Geçici Anormal Myelopoezis
Down sendromu ilişkili myeloid lösemi
Blastik plazmasitoid dendritik hücre neoplazisi
Belirsiz seri akut lösemiler
Akut andiferansiye lösemi
Karışık fenotipli akut lösemi (MPAL) t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1 pozitif
MPAL t(v;11q23.3) pozitif
MPAL, B/myeloid, NOS
MPAL, T/myeloid, NOS
B-lenfoblastik lösemi/lenfoma
B-lenfoblastik lösemi/lenfoma, NOS

Tekrarlayan genetik anamolilerle seyreden B-lenfoblastik lösemi/lenfoma
t(9;22)(q34.1;q11.2);BCR-ABL1 pozitif B-lenfoblastik lösemi/lenfoma
t(v;11q23.3); pozitif B-lenfoblastik lösemi/lenfoma
t(12;21)(p13.2;q22.1); ETV6-RUNX1 pozitif B-lenfoblastik lösemi/lenfoma
B-lenfoblastik lösemi/lenfoma hiperdiploidili
B-lenfoblastik lösemi/lenfoma hipodiploidili
B-lenfoblastik lösemi/lenfoma t(5;14)(q31.1;q32.3) IL3-IGH pozitif B-lenfoblastik lösemi/lenfoma
t(1;19)(q23;p13.3);TCF3-PBX1 pozitif B-lenfoblastik lösemi/lenfoma
B-lenfoblastik lösemi/lenfoma, BCR-ABL1–benzeri
iAMP21 pozitif B-lenfoblastik lösemi/lenfoma
T-lenfoblastik lösemi/lenfoma
Erken öncül T hücreli lenfoblastik lösemi
Natural killer (NK) hücreli lenfoblastik lösemi/lenfoma

2.2.2. ALL Klinik Özellikleri

Hastalığın ilk klinik bulguları genellikle yorgunluk, halsizlik, sinirlilik gibi spesifik olmayan bulgulardır. Kemik ve eklem ağrıları eşlik edebilir. Hastalık ilerledikçe yetersiz apoptozis ve anormal klonal proliferasyon nedeniyle aşırı çoğalan neoplastik hücrelerin kemik iliğini infiltre etmesi nedeniyle anemi, nötropeni, trombositopeni ile karakterize kemik iliği yetmezliği bulguları gelişir. Anemiye bağlı olarak hastada solukluk, yorgunluk, egzersiz intoleransı, nefes darlığı; nötropeniye bağlı olarak enfeksiyona yatkınlık, ateş; trombositopeniye bağlı olarak peteşi, purpura ve mukozal kanamalar görülebilir. Hastada lenfoid sistem infiltrasyonuna bağlı lenfadenopati, hepatosplenomegali; merkezi sinir sistemi tutulumuna bağlı baş ağrısı, nöbet, kraniyal sinir felçleri görülebilir. Hastada yine diğer organ tutulumlarına bağlı kas, kemik ağrıları, ağrısız testis büyümesi, hematüri gibi çeşitli klinik durumlar gelişebilir [5].

2.2.3. ALL Laboratuvar Bulguları

ALL hastalarında değişken derecede sitopeni görülürken hastaların %5’inden azında pansitopeni görülür. Anemi ve trombositopeni hastalarda sıklıkla görülürken

beyaz kan hücresi (WBC) değerleri değişkendir [3]. Hastaların %53'ünde $WBC < 10 \times 10^3 / \mu l$ iken %17'sinde ise $WBC > 50 \times 10^3 / \mu l$ 'dür [5]. Periferik kanda her zaman blast hücreleri her zaman saptanmayabilir. Hafif hipokalsemi ALL hastalarında en sık görülen elektrolit bozukluğu iken tanı anında hastaların %50'sinde hiperürisemi görülür. Periferik kanda blast gözlenmesi veya kemik iliğinde %5'in üzerinde blast bulunması lösemi şüphesini artırır ve ileri analizler gerektirmektedir[3].

2.3. Akım Sitometri

Akım sitometri cihazı, süspansiyon halindeki hücreleri belli bir akış kanalından geçirirken hücresel özelliklerinin tespitine yönelik bir ölçüm sistemidir. Süspansiyon halindeki hücreler kanaldan geçerken lazer ışığına karşı verdikleri sinyaller ile hücrelerin floresan özellikleri, boyutları, granülarite yapısı hakkında veriler elde edilir[6].

İletken sıvı içinde akan hücrelerin incelendiği hücre akım sitometrisi, 1953'te Wallace H. Coulter tarafından patentlenen Coulter prensibini kullanarak hücreleri saymak için hücresel empedans prensibine dayalı olarak ortaya çıkmıştır [31]. Bu ilkeye göre bir sıvı fazda, bir hücrenin boyutunun bir çift elektrottan geçerken yer değiştirdiği elektrolit hacmi tarafından belirlenebileceği belirtilmiştir. Bu yöntem ilk akım sitometri cihazlarının temelini oluşturmuştur. 1965 yılında Kamensky ve arkadaşları boyanmamış hücrelerin absorpsiyonunu ve geri dağılım aydınlatmasını ölçen iki parametrelili bir akım sitometri oluşturarak hücre nükleik asit içeriğini ve boyutunu belirlemek için kullanmıştır [32] [33]. 1967 yılında Thompson, damlacıkların elektrostatik yüklenmesi ile hücre sınıflamasını sağlayan bir sistem geliştirmiştir. Hücre sınıflandırmasında pek çok ilerleme olmasına rağmen, hücre içeren damlacıkları bir elektrik alanı yoluyla yönlendirme tekniği günümüzde hala kullanılmaktadır [34]. İlk floresans temelli akım sitometrisi 1968'de Wolfgang Göhde tarafından Münster Üniversitesi'nde geliştirilmiş ve hücreler hücre boyutundan çok floresansa dayalı bir yöntem olarak sınıflandırılmıştır. Göhde'nin sitometri alanındaki en önemli katkılarından biri, hücrelerin ayrı ayrı analiz edilmeleri için bir odak noktasına yönlendirilmesine izin veren akış hücresinin geliştirilmesiydi. Bir diğer önemli gelişme, o zamanlar daha çok tercih edilen,

absorbsiyon yerine floresan molekül emisyonunun kullanılmasıydı. Akım sitometresinin ticarileştirilmesi ise ilk olarak 1968'de Alman şirketi Partec tarafından gerçekleştirilmiştir [35].

Floresan bazlı akış sitometrelerinin ortaya çıkması, monoklonal antikor ve floresan molekül teknolojisi gelişimini hızlandırmıştır [32]. Monoklonal antikorlar ortaya çıkmadan önce kullanılan poliklonal antikorlar farklı birden fazla B hücresi tarafından üretilip aynı antijenin birden çok epitopuna bağlanan antikor grubudur. Poliklonal antikorlar yüksek afinite göstermelerine rağmen antikor değişkenliği ve çapraz reaksiyon gibi belirgin dezavantajlara sahiptir. Çeşitli hayvan serumlarından saflaştırılan poliklonal antikorlar hayvandan hayvana olan genetik farklılıkları nedeniyle farklı üretim serilerinde değişkenlikler gösterebilmektedir. 1975'te George Kohler ve Cesar Milstein B hücrelerini myelom hücresi ile birleştirme prensibine dayalı hibridoma teknolojisi ile sınırsız antikor üreten hibridoma hücrelerini keşfetmiştir. Bu sayede aynı hedef antijenin tek bir epitopuna yönelik, lottan lota farklılık göstermeyen yüksek özgüllüklü monoklonal antikorlar elde edilmiştir. Akım sitometri alanında hücre tanımlamasını sağlayan çeşitli spesifik antikorların üretilmesine öncü olan bu teknoloji 1984 yılında Nobel almıştır [36]. Ancak günümüzde rekombinant antikor teknolojisi kullanılarak monoklonal antikorlar üretilmektedir.

Leonard Herzenberg, floresansa dayalı hücre sınıflaması fikrini ortaya koymuştur. Bunu başarmak için, hücreler üzerindeki işaretleyicilere özgü monoklonal antikorları, yüzey belirteçlerinin fenotipine dayalı olarak hücrelerin floresan olarak sınıflandırılmasına izin veren floresan moleküllere bağlanmıştır [37]. Herzenberg, hücreleri sıralamak için boyuttan ziyade floresanın kullanıldığı yöntemi "FACS" veya Floresanla Aktifleştirilmiş Hücre Sıralaması olarak tanımlamıştır [38]. Klinikte ilk akım sitometri cihazlarının kullanımı ise 1983 yılını bulmuştur. Monoklonal antikorların kullanılması, bilgisayar teknolojisindeki gelişmeler ile akım sitometri cihazları 90'lı yılların başından itibaren rutin kullanıma girmiştir [32].

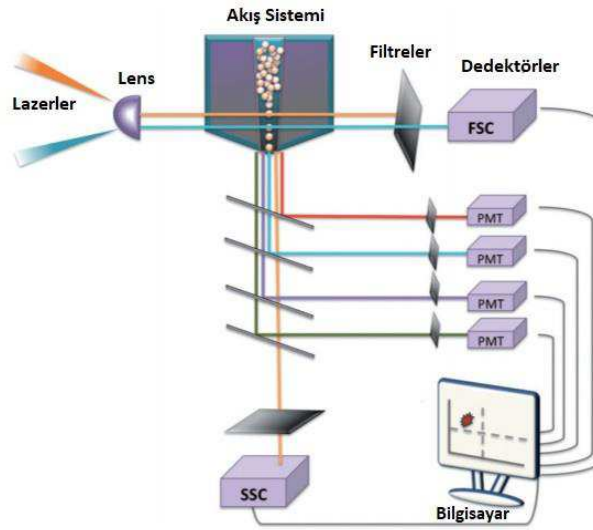
Bugün piyasada bulunan üç tip akım sitometresi bulunmaktadır [39]:

1. Akışkan temelli akım sitometreleri.
2. Akustik temelli akım sitometreleri.
3. Kütle sitometreleri veya CyTOF.

Akışkan tabanlı akım sitometreleri en yaygın kullanılanlardır ve lazer/dedektör parametrelerinin sayısı her geçen gün artmaktadır. Akustik tabanlı sitometreler, akışkanlardan ziyade akustik odaklamayı kullanır. Kütle sitometrisi, florokromlar yerine ağır metallere balanmış monoklonal antikörleri kullanır ve aynı anda analiz edilen parametrelerin sayısını büyük ölçüde artırabilir. Günümüzde daha hassas, optimize ve otomatize çalışan akım sitometri cihazları her bir hücre için 10'un üzerinde parametreyi değerlendirerek; saniyede 100.000 hücreyi inceleyebilecek kapasitede çalışmaktadır [40].

2.3.1. Akım Sitometri Çalışma Prensibi

Klinik rutinde kullanılan akım sitometri cihazları her bir hücre üzerinde çok sayıda parametreyi aynı anda ölçme ve değerlendirme imkanı sağlamaktadır. Akım sitometri cihazı akış sistemi, optik sistem ve elektronik/bilgisayar sistemi olmak üzere üç temel fonksiyonel üniteden oluşur. Akım sitometri cihazının bileşenleri Şekil 2.1.'de gösterilmiştir.

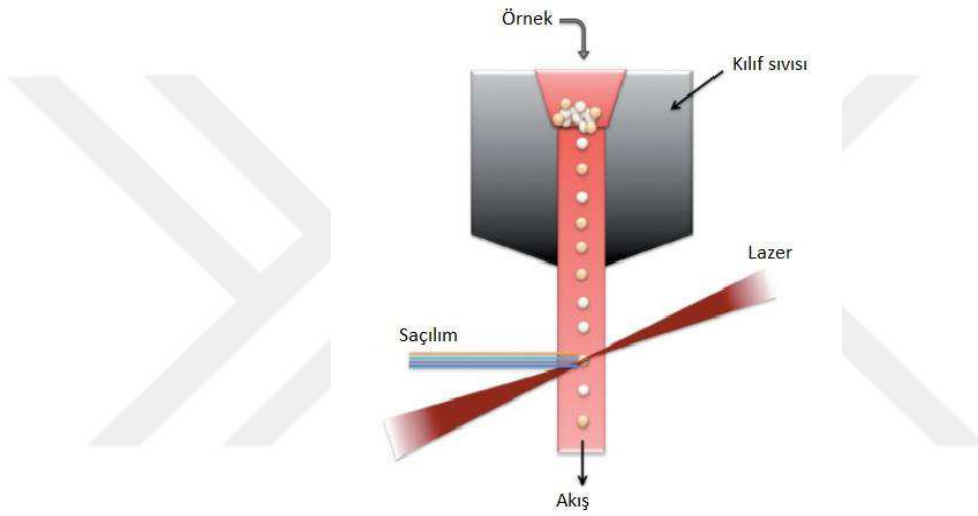


Şekil 2.1. Akım sitometri cihazının bileşenleri [41]

2.3.1.1. Akış sistemi

Akış sisteminin amacı floresan antikörlerle işaretlenmiş hücrelerin lazer tarafından uyarılmaları için lazer odak noktasına iletme. Bu olay farklı akış

hızlarına sahip iki sıvı akımının aynı yönde yan yana aktığı zaman olan laminar akış ile sağlanır. Hidrodinamik odaklama ile her bir hücre sırasıyla lazer odak noktasından geçmektedir. Akış sistemi sıklıkla fosfat tamponlu salin ve dış kılıf sıvısı (sheath fluid) ile sarılıdır. Merkezi akışta yer alan hücreler rastgele dağılımla akım sitometri cihazına girerken daha yavaş olan kılıf sıvı akışı numune akışına paralel ilerleyerek laminar akış yaratır ve hızlı akan numune sıvısı yüksek basınç altında kanalın merkezine odaklanarak her bir hücrenin tek tek ilerlemesine imkan sağlar [42-45].



Şekil 2.2. Hidrodinamik odaklama [41]

Hücre süspansiyonunun kılıf sıvısının merkezine enjekte edildiği hızın değiştirilmesi, numune akımının genişliğini ve odak noktasından geçen hücre sayısını etkilemektedir[39]. Numune akış basıncı arttıkça koaksiyal geçiş artacaktır. Bu durum hem akım sitometresinin tek hücre çözünürlüğünü bozar hem de girişteki hücrelerin tıkanmasına ve numune kaybına neden olabilir. Konsantre olan hücreler daha düşük bir akış hızı gerektirirken, seyreltilmiş hücreler daha yüksek bir akış hızı gerektirir. Numune hacminin ayarlanması da bu işleme yardımcı olabilir. Akım sitometrisini kullanarak numuneleri analiz ederken düşük akış hızlarında çalıştırmak önemlidir. Düşük diferansiyel basınç, hücre ayrımı ve döngüsü analizinin yanı sıra daha iyi çözünürlük ve çift hücre ayrımı elde etmek için idealdir [46].

Akım sitometri cihazında ideal akış hızı farklı uygulama alanları için değişebilmektedir[39]. İmmünofenotiplendirme için yüksek akış hızı uygulanırken, örneğin DNA analizi çok daha yüksek bir çözünürlük gerektirdiğinden tek hücrelerin herhangi bir zamanda lazer ışınından geçmesini sağlamak için düşük bir akış hızı uygulanmalıdır [6].

2.3.1.2. Optik sistem

Hidrodinamik odaklamadan sonra hücreler tek sıra halinde optik sisteme taşınır[39]. Optik sistem, eksitasyon optikleri ve toplayıcı optiklerden oluşur. Eksitasyon optikleri lazeri odaklamak için lens ve prizmalardan oluşmaktadır. Toplayıcı optikler ise lens ayna ve filtrelerden oluşan bir sistemdir. Saçılan ışığın optik algılayıcılarda toplanmasını sağlar [6].

- Işık Saçılımı:

Hücreler odak noktasından geçerken lazer ışığının ileri ve 90 derece yan tarafa doğru ışık saçılımına neden olur. Işık saçılımı, hücre boyutu, çekirdek yapısı, sitoplazmik granülarite gibi hücrelerin fiziksel yapısı ile ilişkilidir [6].

İleri yönde saçılan ışık ileri saçılım kanalı (FSC) olarak isimlendirilen lens ile toplanarak elde edilen sinyaller hücre büyüklüğünün yanı sıra çekirdek sitoplazmik oranı, membran topografyası ve diğer hücresel özellikler hakkında da bilgi verir. Yana saçılım kanalı (SSC) lensi tarafından yana saçılan ışınla elde edilen veriler ise hücrenin granülaritesi hakkında bilgi verir[39]. Saçılan bu ışınlar dedektörlerde toplanıp sinyale çevirilerek elektronik sisteme analiz için iletilir. FSC'ye karşı açılan SSC nokta grafiği, genellikle akım sitometri analizinde ilk açılan grafiklerden biridir ve sadece bu iki parametre kullanılarak, numunedeki farklı hücre tipleri değerlendirilebilir [39].

- Floresan:

İleri ve yana saçılan ışık sinyalleri 488 nm dalga boyunda ve lazer ışığı ile aynı renktedir. Bu nedenle sinyallerin tespiti için ayrı bir floresan probuna ihtiyaç yoktur. Ancak hücre hakkında spesifik içerikleri belirlemek için hücreler direk boyanarak ya da ligand ilişkili florokromlarla bağlanarak incelenmektedir. Boyalar

veya florokromlar o molekül için karakteristik dalga boyundaki ışınla uyarılabilmektedir. Optik sistem FSC ve SSC kanalları tarafından toplanan bilgilere ek olarak florokromlar tarafından yayılan floresan ışığının bu florokromlara özgü foton çoğaltıcı tüplerle (PMT) filtrelenmesi ve yönlendirilmesinden de sorumludur. Her sitometre, belirli bir dalga boyunda ışın yayan bir dizi uyarma lazeri içerir. BD FACScan TM gibi eski akım sitometri cihazlarında, 488 nm dalga boyunda ışık yayan tek bir 488 nm (mavi) eksitasyon lazeri varken BD LSR Fortessa TM gibi daha modern akım sitometreleri 350 nm, 405 nm, 488 nm, 561 nm ve 640 nm olmak üzere 5 eksitasyon lazeri içerir [39]. Her lazer belirli bir dalga boyunda ışık üretir. Her lazer ayrıca, görünür ışık spektrumuna göre yaydığı ışığın rengiyle de anılmaktadır. Bulundukları ışık spektrum aralıklarına bağlı olarak;

- 405 nm ışık, mor renk spektrumunda (380-450 nm), mor lazer
- 350 nm ışık, ultraviyole ışık spektrumu (10 nm – 380 nm), ultraviyole lazer
- 488 nm ışık, mavi ışık spektrumu (450 nm – 495 nm), mavi lazer
- 640 nm ışık, kırmızı ışık spektrumu (620 nm – 750 nm), kırmızı lazer
- 561 nm ışık, yeşil ve sarı ışık spektrumları (495–570 nm ve 570–590 nm), sarı yeşil lazer olarak adlandırılır [39].

Florokromlar, ışık fotonları yayan bir lazer tarafından uyarıldığında, florokrom moleküllerini oluşturan elektronlar, uyarma lazerinden gelen enerjiyi emer ve daha yüksek bir uyarma durumuna atlar. Bu uyarılma durumu kısa bir süredir (yaklaşık 8-10 saniye) ve uyarılmış elektronlar doğal temel durumlarına döndükçe emdikleri enerjiyi serbest bırakmaları gerekir. Bu enerjinin bir kısmı küçük miktarlarda ısı olarak salınırken, enerjinin geri kalanı ışık fotonları şeklinde salınır [39].

Florokrom molekülleri tarafından yayılan ışık fotonları, her florokroma özgü dalga boyuna sahiptir. Bir florokromun eksitasyon dalga boyları (nm cinsinden), aynı florokromun emisyon dalga boylarından daha düşüktür. Floresan İzotiyosiyanat (FITC), uyarıldığında 475 nm ile 650 nm arasında 525 nm'lik bir tepe emisyon dalga boyu ile ışık fotonları yayar. Florokromlar, çeşitli dalga boyları tarafından uyarıldığı ve ışık yaydığı için, florokromları maksimum uyarıldıkları ve en fazla ışık yaydıkları

ışık dalga boylarıyla karakterize etmek daha kolaydır. Bu değerlere maksimum uyarılma ($\text{Excitation}^{\text{max}}$ veya EX^{max}) ve maksimum emisyon ($\text{Emission}^{\text{max}}$ veya EM^{max}) değerleri denir ve bu değerler arasındaki nanometre cinsinden sayısal fark “Stokes Kayması” olarak adlandırılır. Her florokromun spesifik bir Stokes kayması vardır ve akım sitometrisi için florokrom seçerken florokrom tarafından yayılan ışığın florokromu harekete geçirmek için gereken ışıktan daha kolay ayırt edilebilmesi için büyük bir Stokes kayması istenir [47]. Uyarılmış florokromdan yayılan ışık fotonları, floresan ışığı algılayan ve yükselten bir dizi PMT'den oluşan toplama optiğine yönlendirilirler [48].

2.3.1.3. Elektronik sistem

Elektronik sistem ışınlarla elde edilen sinyalleri numerik dataya çevirerek analiz imkanı tanır. Işık fotodedektörlere çarptığında, gelen fotonlar elektronlara dönüştürülerek bir akıma neden olur. Bu akım bir amplifikatörden geçerek voltaj oluşturulur. Fotodiyotlar ve PMT olarak adlandırılan iki tür fotodetektör kullanılır. Fotodiyotlar, PMT'lerden daha düşük hassasiyetle çalışır ve daha az verimlidir. Genellikle güçlü bir sinyal üreten ileri ışık dağılımını toplamak için kullanılır. PMT'lerin etkinliği çok daha yüksektir. Zayıf yan saçılımı ve floresan sinyalleri toplamak için kullanılır [6].

Fotodedektörlere bir voltaj uygulayarak elektrik sinyalleri yükseltilebilir. PMT'lere uygulanan voltaj ayarları, bir PMT tarafından algılanan floresan sinyalinin ne kadarının yükseltileceğini belirler. Voltajların, zayıf sinyallerin negatif sinyallerden ayırt edilebilmesi için yeterince yüksek, ancak güçlü sinyallerin ölçek dışı olmasını veya benzer emisyon spektrumlarına sahip diğer florokromlarla karışmasını önlemek için de yeterince düşük olması gerekir. Amplifiye edilmiş sinyallerin analizi için sayısal veri eldesi gereklidir. Voltaj yüksekliği, genişliği ve alanı için sayısal bir değer üretilir ve analog dijital dönüştürücü tarafından bir kanal numarası atanır, ardından bilgisayara aktarılır ve bir analiz grafiği üzerinde bir nokta olarak görüntülenir. Sinyaller, analiz için doğrusal veya logaritmik olarak uygulanabilir[6].

2.3.1.4. Veri görüntüleme ve analiz

Sinyallere kanal numaraları atandığında bilgisayar bu değerleri işleyerek depolar. Depolanan veri dosyaları piyasadaki analiz yazılımları kullanılarak bilgisayar tarafından analiz edilecek dijital sinyallere dönüştürülür ve çeşitli şekillerde görüntülenerek defalarca yeniden analiz imkanı sağlar. Akış veri grafikleri, bu floresan sinyallerin akış sitometri elektronigi tarafından anlamlı verilere dönüştürülmesinin sonucudur. Rutin olarak kullanılan üç ana grafik kullanılır.

- **Histogram:** Tek parametreyi değerlendirmek için histogram kullanılır. X ekseninde araştırılan parametrenin floresan veya ekspresyonuna karşı y eksenindeki hücre sayısını gösteren bir parametre grafiğidir.

- **Dot Plot (Nokta alan):** Her bir noktanın bir hücreyi temsil ettiği bu grafikte 2 parametre aynı anda değerlendirilebilir.

- **Density plot (Yoğunluk alan):** İlgili proteinleri ifade eden hücrelerin birikimini ve göreceli yoğunluğunu gösteren iki parametrelili grafiklerdir. Veriler, yüksek/yoğun konturlamanın ilgili proteinleri ifade eden yüksek sayıda hücreyi gösterdiği konturlar (nokta grafiklerde olduğu gibi tek tek hücreler değil) kullanılarak gösterilmektedir.

- **Kapılama:** Heterojen yapıdaki numunede bir grup hücre popülasyonunun seçme ve ayırt etme işlemi için akım sitometrik analizde sık kullanılan bir ifadedir. Doğrusal kapılar histogramlarda kullanılırken çokgenler, dikdörtgenler veya daireler nokta grafiklerinde geçiş yapmak için kullanılabilir. Bu sayede numunedeki belli bir hücre grubunu analiz öncesi işlem yapılmadan analiz sonrası değerlendirme imkanı sağlamaktadır[6]

- **Ortalama Floresan Yoğunluğu (MFI):** Floresans, akım sitometrisinde lazerle uyarılan antikorlar üzerindeki florokrom kaynaklı ışık emisyonu olarak tanımlanır. Bir antikorun oluşturduğu floresan yoğunluğunun tanımlamanın bir yolu ortalama floresan yoğunluğudur. Yalnızca ilgili antijenin varlığı ile değil, aynı zamanda belirli bir hücre popülasyonunda bu antijenin ekspresyon seviyesi ile de ilgilidir. MFI değeri yüksek olan antikor yüksek sinyal yoğunluğu verir. Neoplastik hücrelerin normal hücre popülasyonlarından ayrıştırılmasında kullanıldığından

büyük önem taşımaktadır. MFI değeri geometrik, aritmetik veya medyan indeks kullanılarak hesaplanır [48]. Geometrik MFI, uç değerlerden daha fazla etkilenir ve zayıf ekspresyon gösteren antikörleri tespit etmekte kullanılabilir [49]. Medyan MFI hücre floresan yoğunlukları düşükten yükseğe sıralandığında ortadaki değerdir. Bir antikora ait floresan histogram grafiği belirgin tepe şeklinde ise bu 3 MFI değeri birbirine yakın iken, daha yayvan bir grafikte ise MFI değerleri farklılık gösterir. Genel olarak ortanca MFI, aritmetik ve geometrik MFI değerlerinin arasında yer aldığından sinyal yoğunluğunu tanımlamak için en iyi parametre olsa da istisnaları mevcuttur [39].

2.3.2. Akım Sitometri Uygulamaları

Günümüzde akım sitometri yöntemi, dokulardaki çeşitli hücresel elementlerin tanımlanması ve sayımı için farklı uzmanlık alanlarının klinik laboratuvarlarla birlikte yürüttüğü bir uygulama alanına dönüşmüştür[7]. Bu uygulamalar, çeşitli hastalıkların teşhisi, prognozu ve takibi için kullanılır. Günümüzde klinik süreçte kullanılan akım sitometri uygulamaları **Tablo 2.4.**'te özetlenmiştir.

Tablo 2.4. Günümüzde klinik laboratuvarlarındaki akım sitometri uygulamaları[7, 50, 51]

İmmün Yetmezlik Tanısı
Lenfosit alt gruplarının sayımı
Nötrofil fonksiyonunun değerlendirilmesi
T hücre proliferasyonunun değerlendirilmesi
Spesifik antijenlerin değerlendirilmesi
Hiper IgM sendromunun tanısı
Lökosit adezyon defektlerinin tespiti
Hematolojik Uygulamalar
Lösemik hücrelerin immünofenotiplendirmesi
Paroksizmal noktürnal hematüri tanısı

Hücre canlılığının tespiti
Hücre DNA içeriğinin analizi
Kalıntı hastalık takibi (MRD Analizi)
Transplantasyon Tıbbi Uygulamaları
Doku reddi tedavisinin izlemi
HLA allo-antikorlarının tespiti
CD34+ kök hücre sayımı
Transfüzyon tıbbi uygulamaları
Fetal hemoglobinin tespiti
Kalıntı lökosit hücrelerin tespiti

2.4. MRD Analizi

Çocukluk çağı ALL takip ve tedavisindeki en önemli basamaklardan biri, nüksün önlenmesi için agresif tedavi gereken hasta popülasyonunun belirlenmesidir. İndüksiyon tedavisi sonrası lösemik hücrelerin klirens hızı, hastalığın uzun vadeli prognozunu gösteren önemli bir parametredir [52, 53]. Akım sitometrik yöntemlerin yaygınlaşmasından önce ALL'de erken tedavi yanıtının belirlenmesinde, tedavinin 14. gününde kemik iliğinin morfolojik incelemesi kullanılmaktaydı [54]. Ancak, lösemik ve normal hücrelerin birlikte değerlendirildiği çalışmalarda, düşük seviyeli lösemik hücrelerin morfolojik değerlendirme ile güvenilir bir şekilde tespit edilmediğini ve başlangıçta tam remisyon olarak kabul edilen $<5\%$ blastlı bir kemik iliğinde potansiyel 10^{11} - 10^{12} kadar lösemik hücre olabileceği ortaya konuldu [54]. Bu çalışmalardan sonra morfolojik incelemeyle tespit edilebilen rezidüel hücre seviyesinin altındaki hastalık kavramı ortaya çıkmıştır ve lösemik hücre yükünü ölçmek için tedavi sırasında ve sonrasında MRD durumunu değerlendirmek için daha kompleks yöntemlere ihtiyaç duyulmuştur. Yapılan çalışmalarla, B-ALL'de hasta prognozu, nüks riski ve sağkalım ile ilişkili olarak MRD ölçümünün klinik önemi gösterilmiştir [55, 56]. Standart morfolojik yöntemler, genel olarak kabul edilen 5% anormal hücre duyarlılığı ile blast popülasyonlarını saptayabilirken; kullanılan yönteme bağlı olarak MRD analizleri $0,01\%$ ila $0,001\%$ duyarlılık seviyelerine ulaşılmıştır [57]. MRD pozitif hastalar, istatistiksel olarak anlamlı derecede daha

kötü olaysız sağkalımın (EFS) yanı sıra artmış relaps riski (RR) ve daha düşük relapssız sağkalıma (RFS) sahiptir. 13.000'den fazla ALL hastasını kapsayan 39 çalışmadan derlenen yeni bir meta-analiz çalışmasında, MRD ile sağkalım arasındaki ilişki doğrulanmış olup, MRD negatif vakalarda 10 yıllık sürede daha yüksek EFS saptanmıştır [58]. Erken tedavi yanıtının kesin tanımı, farklı tedavi protokolleri arasında değişkenlik gösterse de günümüzde tedavinin ilk aşamasından sonra MRD varlığı veya yokluğunun B-ALL'li çocuklarda ve adölesanlarda en güçlü prognostik gösterge olduğu kabul edilmektedir [9]. MRD'nin değerlendirilmesi ile hasta risk sınıflaması yapılmasının yanı sıra hastaya uygun tedavi protokünün seçilmesine de yardımcı olur [59].

2.4.1. MRD Analiz Yöntemleri

MRD analiz çalışmalarının yararlı olabilmesi için yüksek hassasiyet, doğruluk ve tekrarlanabilirlik göstermesi gerekir [53]. Morfolojik yöntemler immünohistokimyasal testlerin yardımıyla bile yeterli hassasiyet ve doğruluk göstermekten çok uzaktır. Benzer şekilde konvansiyonel karyotipleme ve floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemleri de lösemi hücrelerini %1-5 duyarlılıkla tespit edebildiklerinden yeterli hassasiyet seviyesine ulaşamazlar [60]. Günümüzde MRD değerlendirilmesinde kullanılan asıl yöntemler aberran immünofenotipe sahip hücrelerin tespit edilmesi prensibine dayalı olan akım sitometrik yöntemler ve antijen reseptörlerinin tümöre özgü dizilerini tanımlamaya yönelik olan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tabanlı moleküler yöntemlerdir. Aynı zamanda anormalliklerin moleküler tespiti için yeni nesil dizileme (NGS) teknikleri de kullanılmaya başlanmıştır [54].

2.4.1.1. Moleküler PCR ile MRD analizi

PCR tabanlı moleküler yöntemler, MRD'yi klonal yeniden düzenlenmiş immunoglobulin ağır zincir veya T hücre reseptör genlerinin analizine ve spesifik translokasyonların tespitine dayanır. Normal öncü B hücreleri gibi lösemik B lenfoblastlar da gelişimlerinin erken dönemlerinde immunoglobulin ağır zincir üzerindeki değişken bölgelerin somatik rekombinasyonuna uğrar. Rastgele nükleotidlerin eklenmesinden sonra, her bir pre-B hücresinin değişken bölgesi

benzersiz bir diziye sahiptir. Klonal soy, orijinal hücre ile aynı diziyi paylaşır; bu moleküler yöntemler, alele özgü oligonükleotid PCR primerleri ile tanımlanabilir [54]. Hemen hemen tüm B-ALL'ler (%90) yeniden düzenlenmiş immunoglobulin ağır zincir genlerine sahiptir. Ek olarak, B-ALL'lerin yarısından fazlası, TCR genlerinin klonal yeniden düzenlenme de gösterebilir. Moleküler PCR yoluyla MRD analizi, tanı anında benzersiz klonal gen sekansının tespit edilmesini gerektirir ve hasta takibi esnasında da bu gen sekansı takip edilir [53]. PCR yöntemleri MRD'yi 10^4 - 10^5 hassasiyetle tespit edebilmektedir [54, 61]. MRD analizi oldukça standardize edilmiştir ve tekrarlanabilirliği oldukça yüksektir [62]. Bu avantajlarının yanında bu yöntemin pek çok dezavantajı mevcuttur. Gösterdiği yüksek analitik duyarlılık mutlak yüksek klinik duyarlılık anlamına gelmemektedir ve pozitif PCR sonucu gerçek rezidüel hastalığı göstermeyebilir [55]. PCR yöntemleri aynı zamanda yoğun işgücü gerektirir ve daha zaman alıcı işlemler içerir. Her hastaya özgü primer sentezleme ve doğrulama süresinin uzun olması, MRD analizinin tedavinin erken dönemlerinde tedaviyi yönlendiren bir etken olmasını sınırlar. Diğer yandan akım sitometrisi daha yaygın olarak bulunması, görece daha ucuz olması ve saatler içinde sonuç alınması klinik yararlılık gözetildiği sürece en ideal teknik olarak karşımıza çıkmaktadır [54].

2.4.1.2. NGS ile MRD analizi

1990'ların sonunda ortaya çıkan 2000'li yıllarda çeşitli araştırmalarda kullanılmaya başlanan NGS yöntemi, kısa sürede büyük miktarlarda DNA dizileme yeteneğine sahip olmanın yanı sıra çok küçük klonları (10^6 hücrede 1 hücre) saptayabilecek duyarlılığa sahiptir. Bu özellikleriyle, önce T-ALL'de ve kısa bir süre sonra da B-ALL'de MRD analizi araştırma çalışmaları için NGS yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır [63].

2.4.1.3. Akım sitometri ile MRD analizi

Akım sitometri cihazı, her bir hücrede birden çok parametrenin değerlendirilmesine olanak sağlayarak milyonlarca hücre ortamında ilgilenilen az sayıda hücre popülasyonunun (yani MRD) tanımlanmasına yardımcı olur. St. Jude Çocuk Araştırma Hastanesinde gerçekleştirilen akım sitometrik çalışmalar, 10^4

normal hücre başına bir (1/10000) lösemik hücre düzeyinde güvenilir sonuçların tespit edilebileceğini göstermiştir [64]. Ancak, akım sitometri tabanlı MRD sonuçlarının laboratuvarlar arası karşılaştırılmasının zor olması, bu tekniğin standardizasyonu üzerinde çalışan çeşitli gruplar için bir zorluk olmaya devam etmektedir[65].

2.5. Hematogon Kavramı ve B Hücre Olgunlaşması

Hematogon (B-lenfosit öncülleri), ilk olarak 1937'de Peter Vogel tarafından çocuklardan alınan kemik iliği aspirasyonlarında "lenfoid görünümlü hücreler" olarak tanımlanmıştır [66]. Hematogon kelimesi, "kan yapıcı" anlamına gelen Latince "hematogonia" teriminden türemiştir ve önemi belirsiz hücreleri tanımlar. 40-50 yıl önce, bu önemi ve işlevi bilinmeyen hücreleri tanımlamak için lenfoid görünümlü kemik iliği hücresi, tedavi sonrası kök hücreler, blast, TdT (Terminal deoksiniukleotidil transferaz) + hücreler, CALLA+ hücreler gibi pek çok terim kullanılmıştır [67]. 1970'lerde, immüno Floresan ve akım sitometrik analiz yöntemleri ile B-ALL'ye benzer immüno fenotipe sahip olgunlaşmamış hücrelerin lösemik olmayan kemik iliğinde de bulunabileceği gösterilmiştir. Bu olgunlaşmamış kemik iliği hücreleri, sağlıklı kemik iliği lenfoblastları olarak kabul edilmiştir. 1980'lerden itibaren, immünolojideki gelişmeler, bu hücrelerin fizyolojik öncül B hücreleri olarak tanınmasını sağlamıştır [68].

2.5.1. Hematogonların Morfolojik Özellikleri

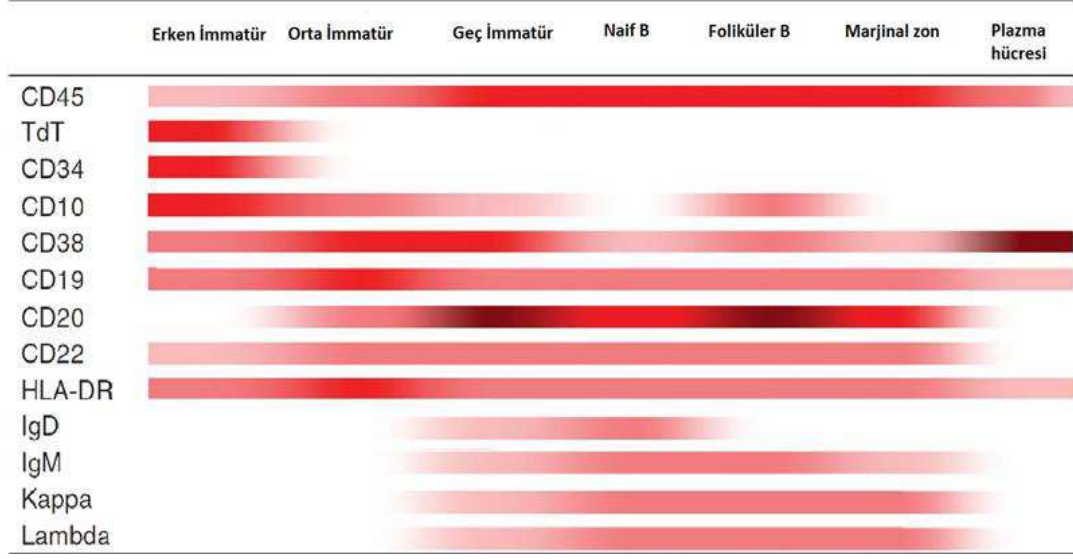
Hematogonlar lenfoid görünümlü hücrelerdir. Kemik iliği yaymalarının incelenmesi, HG'lerin sitolojik özelliklerinin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. Çapı 10 ila 20 µ arasında değişse de, bu morfolojik olarak farklı hücreler karakteristik olarak yoğun, tek tip nükleer kromatin ve yetersiz sitoplazmik özellik gösterirler [69].

En olgunlaşmamış HG'ler, lenfoblastlarla ortak sitolojik özelliklere sahiptir ve bazı durumlarda ALL'deki neoplastik lenfoblastlardan ayırt edilemez. Tip 1 HG'ler genellikle girintili yuvarlak çekirdeklere, yetersiz sitoplazmaya, belirgin nükleollü homojen nükleer kromatine sahiptir. Yeterli sitoplazma varlığında, orta-yoğun bazofilik görünümlü, granül veya vakuolden yoksundur. Bir veya daha fazla

nükleolün varlığı, hücre immatüritesini gösterir [70]. Bu nedenle, HG'ler ve neoplastik B lenfoblastlar arasındaki ayrım, özellikle ALL için kemoterapiyi izleyen kemik iliği rejenerasyonu sırasında sorun olabilmektedir. En olgun HG'ler, yoğunlaştırılmış homojen nükleer kromatinli olgun B lenfositlere benzer; nükleol yoktur veya belirsizdir. HG'ler, yenidoğan veya umbilikal kord kanı dışında periferik yaymada tespit edilmezler [66]. Bununla birlikte akım sitometri veya immünofloresan mikroskobu tekniği ile, çoğu çocuk ve yetişkinin kanında az sayıda HG tespit edilmiştir. Yetişkin kan örneğindeki HG'ler yalnızca olgun aşamadır ve kandaki olgun B hücrelerinin sayısı ile korelasyon gösterir [71].

2.5.2. Hematogonların İmmünotipik Özellikleri

Akım sitometrik analiz günümüzde HG'leri karakterize etmek için en kullanışlı yöntem haline gelmiştir [72]. Tanımlanabilir en immatür B hücre öncülleri (Tip 1 HG), TdT, CD34, CD38, CD45 ve CD19'u *dim* pozitif; CD10'u parlak pozitif ve CD22'yi soluk pozitif eksprese ederken, CD20 eksprese etmezler. Tip 2 HG'lerde ise immatürite belirteçlerinin ekspresyon seviyeleri düşerken, CD19, CD45, CD22 ve CD20'nin ekspresyon seviyesi artar. CD10 ekspresyonu ise yavaş yavaş azalır. Tip 3 HG'ler, artmış CD20 ekspresyonu, düşük CD10 ekspresyonunun yanında değişken CD38 ekspresyonu gösterirler. CD10'un azalan regülasyonunun tamamlanmasıyla beraber CD38 kısmi azalan regülasyona uğrar ve CD22 ekspresyonu artar. CD10'u tamamen kaybeden hücreler matür B lenfosit olarak kabul edilir. Yüzey immünooglobulinlerin ekspresyonu CD20'nin yüksek ekspresyon derecesine ulaşması ile eş zamanlı gerçekleşir. HG'lerde sitoplazmik IgM ekspresyonu üzerine yapılan çalışmalarda sitoplazmik IgM ekspresyonunun, CD19 ekspresyonunun artması, CD10 ekspresyonunun azalması ve TdT / CD34 kaybı ile birlikte HG olgunlaşması sırasında meydana geldiğini göstermiştir. Sitoplazmik IgM, HG gelişiminde evre 1'den evre 2'ye geçiş sırasında kazanılır [67, 73, 74]. B hücre gelişim sürecinde değişen antijen ekspresyon profilleri **Şekil 2.3**'te gösterilmektedir.



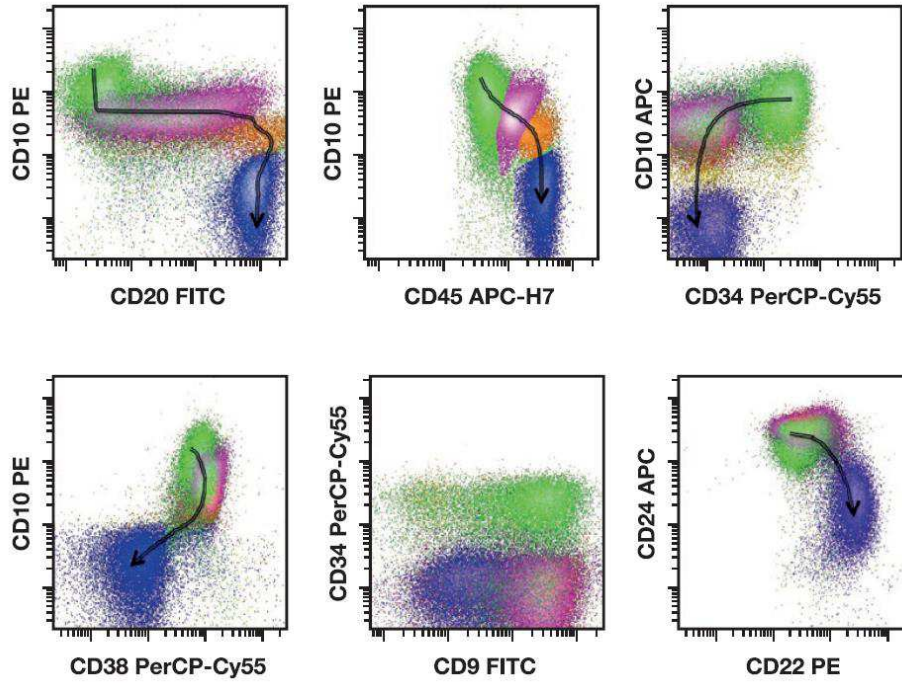
Şekil 2.3. B hücre gelişiminde antijenik ekspresyon profili [75]

2.5.3. Hematogonların Akım Sitometrik Analizi

Akım sitometrik veri analizinde HG'lerin tanımlanmasına yönelik bazı ipuçları mevcuttur;

- CD34/CD10 grafiğinde
 - Evre 1: CD34+/CD10 parlak
 - Evre 2: CD34-/CD10+
 - Evre 3: CD34-/CD10- olarak saptanması,
- CD45/SSC grafiğinde; düşük SSC'ye karşı *dimden* parlağa doğru uzanan 3 heterojen grup olarak ayrılması,
- CD10/CD20 grafiğinde klasik şelale paterni izlenmesi,
- CD58, CD38 ve diğer birçok antijenin değişken farklı ekspresyon yoğunlukları ile ayırım sağlanabilir.[10]

Akım sitometrik analizde gelişim basamaklarına paralel HG alt tipleri **Şekil 2.4.**'te gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Normal B hücre gelişimi. B hücre olgunlaşma basamakları oklarla gösterilmiştir. Tip 1 HG yeşil, Tip 2 HG pembe, Tip 3 HG turuncu ve olgun B hücreler mavi renkle gösterilmiştir [57].

Sağlıklı kemik iliğinde, HG'ler erken ve geç antijenleri beraber eksprese edemeyeceği gibi HG'lerde antijenlerin anormal yüksek veya düşük ekspresyonu da gözlenmez. Tüm HG tipleri CD19, CD22, CD38 ve CD10'u eksprese eder. Herhangi bir evredeki HG oranları kişiden kişiye değişse de çoğu evre 2'dedir (ortalama %65'i). Tip 1 HG'ler, HG'lerin en immatür alt kümesidir ve bu öncül-B hücrelerin azınlığını temsil eder. Bununla birlikte, 4 yaşından küçük bebeklerde ve yüksek doz kemoterapi verilen hastalarda tip 1 HG oranlarında artış görülmüştür [76].

2.5.4. Akım Sitometrik B-ALL MRD Analizi

ALL'de MRD analizinin temel prensibi normal öncül hücrelere kıyasla blastlardaki fenotipik farklılığın detaylı analizidir. ALL esas olarak kemik iliğinin tutulumu olan, kan ve ektranodal dokuların ikincil tutulumuyla karakterize bir hastalıktır ve bundan dolayı tedavi yanıtını değerlendirmek için en yaygın olarak kemik iliği örnekleri kullanılır. Sağlıklı kemik iliği dokusunda öncül T hücre

bulunmadığından T-ALL vakalarında, rezidüel blast hücrelerinin saptanması daha kolaydır [77]. Ancak, kemik iliği normal B öncül hücre üretim bölgesi olduğundan akım sitometrik B-ALL MRD analizinde neoplastik lenfoblastların, HG'lerden ayırt edilmesi karşılaşılan en büyük zorluklardan biridir [78].

Lösemi ilişkili fenotipler, akım sitometrik B-ALL MRD analizinde blastların sağlıklı hücrelerden ayrımını sağlar ve aşağıdaki fenotipik özelliklerin bir veya birden fazlasının varlığı ile tanımlanır [10];

- İmmüfenotipik olgunlaşmanın durması
- Antijen ekspresyonlarının artması veya azalması
- Uyumsuz antijen ekspresyonları
- Farklı soylara ait antijenlerin birlikte ekspresyonu

Antijen ekspresyonunun kantitatif anormallikleri, B-ALL vakalarının %30-50'sinde görülür. Yaygın olarak blastlarda artmış ekspresyonu görülen antijenler CD10, CD34, CD58 ve CD20'dir. Blastlarda genel olarak azalmış ekspresyonu görülen antijenler ise CD45, CD38, CD10, CD20 ve CD81'dir [6, 10].

Kalitativ anormallikler ise, çapraz soy antijen ekspresyonu (CD13 / 33, CD7, CD15, CD11a), füzyon transkripti ile ilişkili antijenler (CD66c, CD15, NG2-Ab 7.1), ektopik fenotipler veya maturasyonel uyumsuz antijen ekspresyonlarıdır (CD19 / CD34 + öncü B hücrelerinde CD20 ekspresyonu gibi). Tüm bu belirteç kombinasyonları ile %95 vakada MRD tespit edilmesi mümkündür. Hastada tanı anında tespit edilen LAIP'ler, hasta takibindeki MRD analizlerinde blast tespitinde yol gösterici olarak da kullanılır. Bununla birlikte, blastı tanımlayan LAIP'lerde antijen ekspresyon paternindeki değişiklikler MRD analizini etkileyebilir [10].

B-ALL'de akım sitometrik MRD analizi için iki temel strateji vardır.

Özgün LAIP'leri tanımlama ve takip etme: Oluşturulan farklı grafiklerde blastların olması gereken bölgeler önceden belirlenir ve tedavi sonrası rezidüel blastların bu önceden tanımlanan blastik bölgelerde izlenmesi hedeflenir.

Normal maturasyon spektrumu/HG'lerden sapma: Sağlıklı kemik iliğinde HG olması gereken bölgelerin belirlenip bu alanların dışında kalan bölgelere düşen hücrelerin rezidüel blastik hücre olarak tanımlanması hedeflenir [10].



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Eylül 2019-Aralık 2020 tarihleri arasında Dr. Sami Ulus Kadın Doğum, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde B-ALL ayırıcı tanısı veya B-ALL tanılı hastalarda immüfenotiplendirme ve MRD analizi için Ankara Şehir Hastanesi Akım Sitometri Laboratuvarı'nda kemik iliği numunelerinden B-ALL panel antikorları çalışılan 0-18 yaş arası hastalara ait veriler değerlendirildi. 18 yaşından büyük hastalar, akım sitometrik verileri yetersiz olan hastalar, MRD analizi yapılmış olup laboratuvarımızda immüfenotiplendirmesi yapılmamış hastalar ve B-ALL dışı lösemi tanılı hastalar çalışma dışında bırakıldı.

Çalışmaya 30 HG, 43 B-ALL vakası dahil edildi. Çalışmada yer alan 43 B-ALL vakasından 22'sinin ileriye yönelik MRD analizleri de incelendi. B-ALL vakaları, güçlü klinik şüphe ve belirgin immüfenotipik profil temelinde seçilmiş olup, klinik ve histopatolojik değerlendirme ile doğrulanmıştı. HG vakaları anemi, pansitopeni, kronik enfeksiyon, metabolik hastalık, immünyetmezlik tanıları ile izlenen hastalardan elde edildi. Bu hastalarda artmış immatür hücre popülasyonunun lösemi temelli olmadığı, hastanın benign seyirli takip süreciyle desteklendi. Çalışmaya dahil edilen rezidüel B-ALL vakaları ise hastanın tanısız immüfenotipik profili ile uyumlu olması ile doğrulandı.

Dr. Sami Ulus Kadın Doğum, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde ilgili hastalardan asepti kurallarına uyularak, etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)'lı kan tüpüne alınan minimum 2 ml kemik iliği örneği 4-6 saat içinde Ankara Şehir Hastanesi Akım Sitometri Laboratuvarı'na ulaştırılıp 24 saat içinde çalışıldı.

“Tube Stain/Lysis/Wash” (SLW) protokolüne uygun şekilde tüplere eklenen ilgili antikorların üzerine kemik iliği numunelerinden elde edilen 100 µl hücre süspansiyonu eklendi. İnkübasyon sonrası eklenen 1 ml “Versalyse” solüsyonu ile eritrositler parçalanması sağlandıktan sonra numuneler analiz edilmek üzere oto-analizöre konuldu. Tüm akım sitometrik analizler Navios EX (Beckman Coulter) akım sitometri cihazında çalışıldı.

Akım sitometrik analizlerde laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası güvenilir, doğru ve karşılaştırılabilir sonuçlar elde etmek için oluşturulan Euroflow, Bethesda gibi çalışma grupları; standartlaştırılmış laboratuvar prosedürleri ve antikor panelleri oluşturarak hematolojik malignitelerin tanı ve takibinin standardizasyonunu amaçlamaktadırlar [79, 80]. Ankara Şehir Hastanesi Akım Sitometri Laboratuvarı'nda yapılan analizlerde B-ALL tanı ve takibine yönelik oluşturulmuş Euroflow antikor panelleri kullanılmaktadır. Bu çalışmada kullanılan akım sitometri panelleri **Tablo 3.1.**'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan B-ALL, MRD ve HG panellerini oluşturan antikor-florokrom çiftleri

	FITC	PE*	ECD*	PC5.5*	PC7*	APC*	Alexa 700	Alexa 750	Pacific Blue	Krom Orange
B-ALL Paneli	TdT	MPO*	CD13	CD33	CD34	cCD79a	cCD22	cCD3	sCD3	CD45
	CD58	CD10		CD9	CD34	CD123		CD19	CD38	CD45
	CD81	CD10	CD13	CD33	CD34	CD15	CD22	CD19	CD20	CD45
B-ALL MRD Paneli	Syto16	CD11a	CD19	CD58	CD34	CD10		CD38	CD20	CD45
Hematogon Paneli	CD3	CD14	CD10	CD33	CD34	CD117	CD20	CD19	CD38	CD45

*FITC: Fluorescein Isothiocyanate

PE: Phycoerythrin

ECD: PhycoerythrinTexas Red-X

PC5.5: Phycoerythrin-Cyanin 5.5

PC7: Phycoerythrin Cyanin 7

APC: Allophycoerythrin

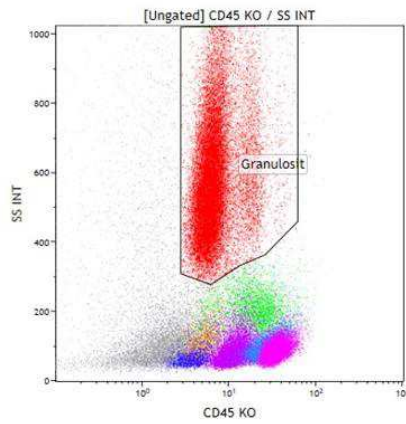
HG ve B-ALL vakalarına ait hasta veri dosyaları “Kaluza Flow Cytometry Analysis” yazılımı ile bu çalışmada yeniden analiz edildi.

Son yıllarda akım sitometri analizindeki gelişmeler doğrultusunda HG popülasyonunun güçlü ve hassas şekilde tanımlanabilmektedir. 1994 yılında Loken ve arkadaşları [81] ve 2004 yılında McKenna ve arkadaşlarının [82] çalışmalarına dayanarak HG'ler immünofenotipik olarak sınıflanabilir ve ileri analizi yapılabilmektedir.

- Hematogon vakalarının analizi:

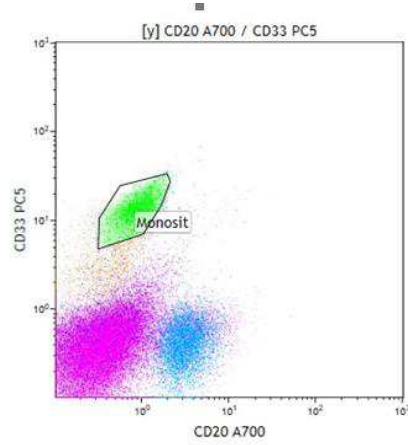
Analize rezidüel eritrositler, ölü hücreler, debris, platelet çökeltileri ve tek tek düşmeyen (doublet) hücreler dışlandıktan sonra canlı hücreler FSC/SSC ve SSC/CD45 grafiğinden seçilerek başlandı.

Verilerin analizinde oluşturulan SSC/CD45 grafiğinde, lenfositlerin parlak CD45, zayıf SSC; monositlerin lenfositlere göre daha yüksek SSC sinyali gösterdiği, granülositlerin ise görece zayıf CD45 eksprese ederken yüksek SSC sinyali verdiği bilinmektedir [83]. Çalışmamızda öncelikle SSC/CD45 grafiğinde yüksek SSC sinyali ile zayıf CD45 ekspresyonu gösteren hücrelerden olan granülosit popülasyonu kapılandı ve bu hücre grupları Boolean kapılama yöntemi ile dışlandı. (Şekil 3.1.)



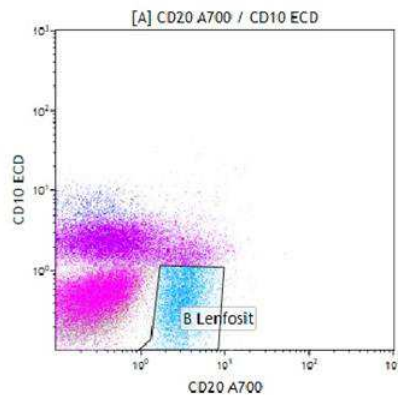
Şekil 3.1. SSC/CD45 grafiği ile granülosit popülasyonunun kapılanması

CD33 antijeni monositlerde parlak, granülositlerde dim ekspresyon göstermektedir [84]. Çalışmamızda granülosit popülasyonunu dışladıktan sonra oluşturulan CD33/CD20 grafiğinde CD33 antijenini parlak eksprese eden hücrelerden monosit kapısı alındı ve kapılama sonrası Boolean kapılama yöntemiyle monosit popülasyonu ileri analiz için dışlandı. (Şekil 3.2.)

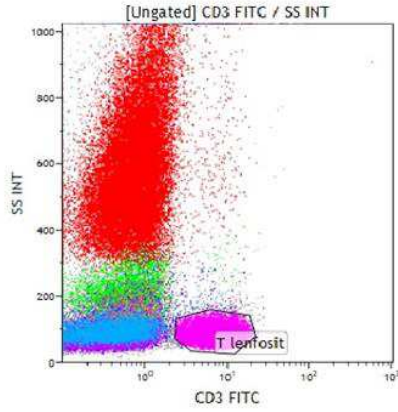


Şekil 3.2. CD33/CD20 grafiği ile monosit popülasyonunun kapılanması

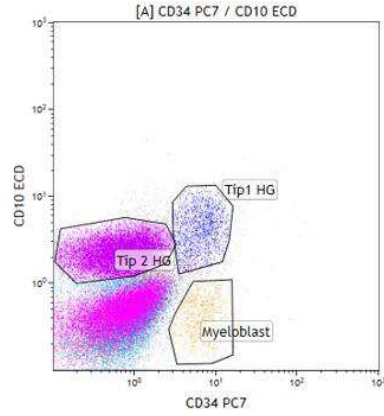
Kemik iliğinde en immatür B hücre öncül formu olan Tip 1 HG, immatürite markerları olan CD34 ve TdT taşır; bu hücre grubu aynı zamanda parlak CD10 eksprese ederken CD20 eksprese etmemesi ile karakterizedir. HG popülasyonunun büyük kısmını kaplayan Tip 2 HG ise CD34 eksprese etmezken azalan derecede CD10 ve tespit edilebilir derecede CD20 eksprese etmesiyle tanımlanır [85]. Çalışmamızda CD10/CD34 grafiğinden kapılanan CD10+/CD34+ hücrelerden Tip 1 HG, CD10+/CD34- hücrelerden Tip 2 HG ve CD10-/CD34+ hücrelerden myeloblast kapısı alındı. CD10/CD20 grafiğinde CD10-/CD20+ hücrelerden olgun B lenfosit kapısı alındı. SS/CD3 grafiğinde SSC düşük/CD3+ hücrelerden T lenfosit kapısı alındı. (Şekil 3.3-3.4-3.5)



Şekil 3.3. CD10/CD20 grafiği ile olgun B lenfositlerin kapılanması

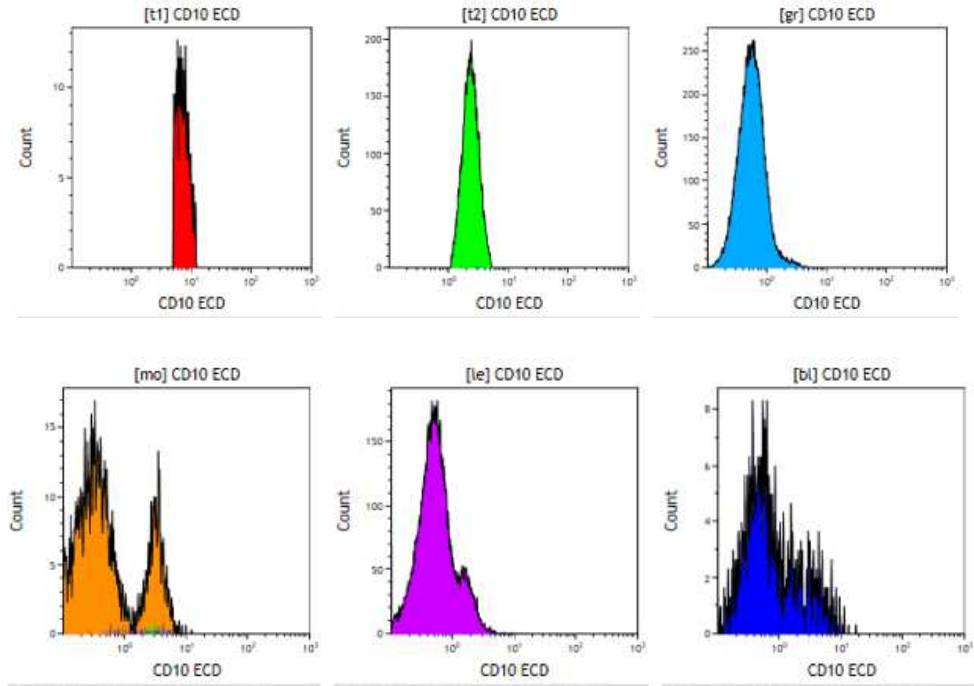


Şekil 3.4. SSC/CD3 grafiği ile T lenfosit kapılanması



Şekil 3.5. CD10/CD34 grafiği ile Tip 1 HG ve Tip 2 HG popülasyonlarının kapılanması

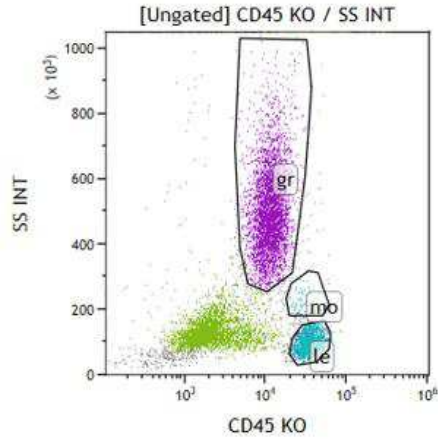
Kapılanan granülosit, monosit, tip 1 HG, tip 2 HG, B lenfosit, T lenfosit ve myeloblast hücre gruplarında sırasıyla Count/CD19, Count/CD10, Count/CD20, Count/CD34, Count/CD38, Count/CD45 grafikleri açıldı. Bu grafikler yardımıyla ilgili antikor floresan yoğunluğunun kapılanan hücre grubuna yönelik aritmetik ortalama, ortanca, mode ve geometrik ortalama değerleri elde edildi. (Şekil 3.6.)



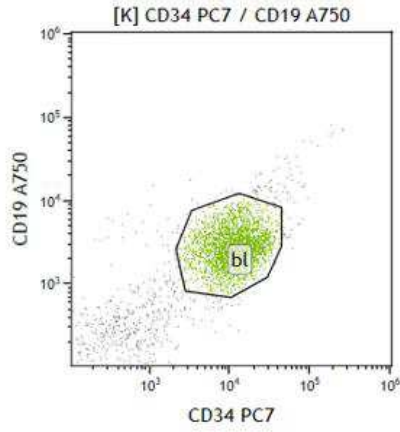
Şekil 3.6. İlgili antikora karşı açılan Count grafikleri ile ilgili popülasyonların ortalama, ortanca, mode değerlerinin belirlenmesi

- B-ALL Vakalarının Analizi;

Analize rezidüel eritrositler, ölü hücreler, debris, platelet çökeltileri ve doublet hücreler dışlandıktan sonra canlı hücreler FSC/SSC ve SSC/CD45 grafiğinden seçilerek başlandı. Ardından SSC/CD45 grafiğinden granülosit, monosit ve lenfosit hücreleri kapılandı. (Şekil 3.7.) Boolean kapılama yöntemiyle granülosit, monosit ve lenfosit olarak belirlenen hücreler dışlandı ve CD19/CD34 grafiğinde CD19+/CD34+ hücrelerden lenfoblast kapısı alındı. (Şekil 3.8.)

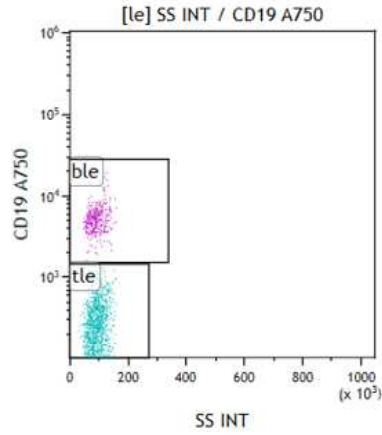


Şekil 3.7. SS/CD45 grafiği ile granülosit, lenfosit ve monosit popülasyonlarının kapılanması



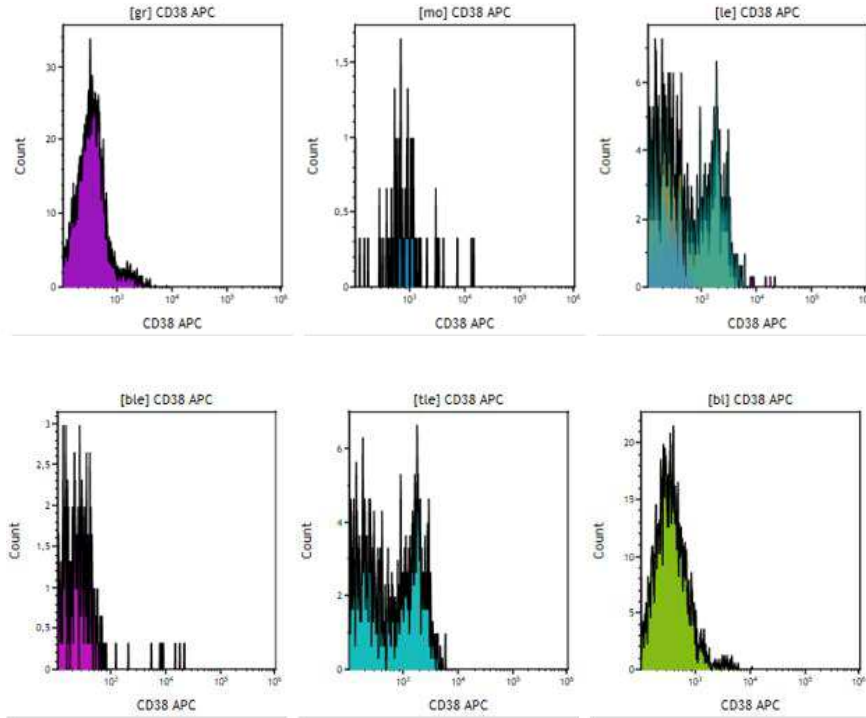
Şekil 3.8. CD19/CD34 grafiği ile lenfoblast popülasyonunun kapılanması

Lenfosit kapısından açılan CD19/SSC grafiğinde CD19+ hücreler B-Lenfosit, CD19- hücrelerden T lenfositler kapılandı. (Şekil 3.9.)



Şekil 3.9. CD19/SSC grafiği ile B ve T lenfosit popülasyonlarının kapılanması

Kapılanan granülosit, monosit, lenfosit, B lenfosit, T lenfosit ve lenfoblast hücre gruplarında sırasıyla Count/CD19, Count/CD10, Count/CD20, Count/CD34, Count/CD38, Count/CD45 grafikleri açıldı. Bu grafikler yardımıyla ilgili antikor floresan yoğunluğunun kapılanan hücre grubuna yönelik aritmetik ortalama, ortanca, mode ve geometrik ortalama değerleri elde edildi. (Şekil 3.10.)



Şekil 3.10. İlgili antikora karşı açılan Count grafikleri ile ilgili popülasyonların ortalama, ortanca, mode değerlerinin belirlenmesi

- MRD Vakalarının Analizi;

Analize rezidüel eritrositler, ölü hücreler, debris, platelet çöktelleri ve doublet hücreler dışlandıktan sonra canlı hücreler FSC/SSC ve SSC/CD45 grafiğinden seçilerek başlandı. Ardından SSC/CD45 grafiğinden granülosit, monosit ve lenfosit hücreleri kapılandı. Lenfosit kapısından açılan CD19/SSC grafiğinde CD19+ hücreler B-Lenfosit, CD19- hücrelerden T lenfositler kapılandı.

SSC/CD19 grafiğinde CD19+ hücreler kapılandıktan sonra hastanın başlangıç tanısal immünofenotipik profiline paralel olacak şekilde açılan dot plot grafiklerde sıralı olarak kapılanarak MRD popülasyonu seçildi.

Kapılanan granülosit, monosit, lenfosit, B lenfosit, T lenfosit ve MRD hücre gruplarında sırasıyla Count/CD19, Count/CD10, Count/CD20, Count/CD34, Count/CD38, Count/CD45 grafikleri açıldı. Bu grafikler yardımıyla ilgili antikor floresan yoğunluğunun kapılanan hücre grubuna yönelik aritmetik ortalama, ortanca, mode ve geometrik ortalama değerleri elde edildi.

Akım sitometrik analizde MFI değeri, numunede hücre popülasyonları arasında incelenecek hücre grubunun antijen ifadesini karşılaştırmak için kullanılmaktadır. Ancak hücre gruplarının MFI değerleri, ilgili boyama aşamasındaki minimal farklar, lazer gücündeki değişimler, kalibrasyon ayarları veya kompanzasyon farkları gibi faktörlerden etkilenecek farklı ölçümlerin karşılaştırılabilirliğini sınırlamaktadır [86]. Bu nedenle bu çalışmada verileri normalize etmek için hedeflediğimiz blast, HG ve MRD hücre gruplarını sağlıklı hücre grubu olarak değerlendirdiğimiz granülosit, monosit, B lenfosit ve T lenfosit gruplarına oranlanarak RMFI değerleri elde edildi.

Böylece B-ALL vakaları için, CD38, CD45, CD19, CD20, CD10, CD34 antijenlerinin ilgili hücre grubuna yönelik $MFI^{Blast/Granulosit}$, $MFI^{Blast/Monosit}$, $MFI^{Blast/B lenfosit}$, $MFI^{Blast/ T lenfosit}$ oranları ile sırasıyla $RMFI^{gr}$, $RMFI^{mo}$, $RMFI^{ble}$, $RMFI^{tle}$ değerleri elde edildi.

HG vakaları için CD38, CD45, CD19, CD20, CD10, CD34 antijenlerinin ilgili hücre grubuna yönelik $MFI^{Tip1 HG/Granulosit}$, $MFI^{Tip2 HG/Granulosit}$, $MFI^{Toplam HG/Granulosit}$, $MFI^{Tip1 HG/Monosit}$, $MFI^{Tip2 HG/Monosit}$, $MFI^{Toplam HG/Monosit}$, $MFI^{Tip1 HG/B-Lenfosit}$,

MFI^{Tip2 HG/B-Lenfosit}, MFI^{Toplam HG/ B-Lenfosit}, MFI^{Tip1 HG/T Lenfosit}, MFI^{Tip2 HG/ T Lenfosit}, MFI^{Toplam HG/TLenfosit} oranları ile Tip 1 HG, Tip 2 HG ve Toplam HG'ler için sırasıyla RMFI^{gr}, RMFI^{mo}, RMFI^{ble}, RMFI^{tle} değerleri elde edildi.

MRD vakaları için CD38, CD45, CD19, CD20, CD10, CD34 antijenlerinin ilgili hücre grubuna yönelik MFI^{MRD/Granulosit}, MFI^{MRD/Monosit}, MFI^{MRD/B lenfosit}, MFI^{MRD/ T lenfosit} oranları ile sırasıyla RMFI^{gr}, RMFI^{mo}, RMFI^{ble}, RMFI^{tle} değerleri elde edildi.

İstatistiksel Analiz

Araştırma verilerinin istatistiksel analizi için SPSS 26.0 istatistik paket programı kullanılmıştır. İstatistiksel analiz olarak kategorik değişkenler sayı ve yüzde verilerek, sürekli değişkenler ortalama $\pm$ standart sapma ve ortanca (95% GA) ile sunuldu. Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu görsel (histogram ve olasılık grafikleri) ve analitik yöntemler (Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk testleri) kullanılarak değerlendirildi. Normal dağılım göstermeyen gruplarda grubun ortalamaları arasındaki farklılığın anlamlılığını test etmek amacıyla Kruskal Wallis testi uygulandı. Tedavi sonrası antijenik modülasyonu değerlendirmek için Wilcoxon bağımlı örneklem testleri işaretli sıralamalar testi uygulandı. Bu çalışmada istatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Analiz Verilerinin Özellikleri

Çalışmaya T.C. Sağlık Bakanlığı SBÜ Ankara Dr. Sami Ulus Kadın Doğum, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde takip edilmiş olan 73 hastanın kemik iliği numunesinden çalışılan akım sitometri analiz verileri dahil edildi. Analizlerin 30'u HG, 43'ü B-ALL vakası idi. Çalışmada yer alan 43 B-ALL vakasından 22'sinin ileriye yönelik MRD analizleri de incelendi.

Çalışmaya dahil olan 43 B-ALL hastalarının immünofenotipik profillerini belirlemek için kalitatif antijenik ekspresyonları değerlendirildi. Blast popülasyonunun kalitatif antijen ekspresyon pozitifliği için %20 cut-off değeri kullanıldı. Hastaların tamamı CD19+ ve CD45+, %97'si CD10+, %97'si CD58+, %93'ü CD34+, %62'si TdT+, %60'ı CD38+, %25'i CD20+ idi.

4.2. İmmatür Hücre Gruplarının RMFI Seviyeleri

4.2.1. Hücre Gruplarının CD38 RMFI Seviyeleri

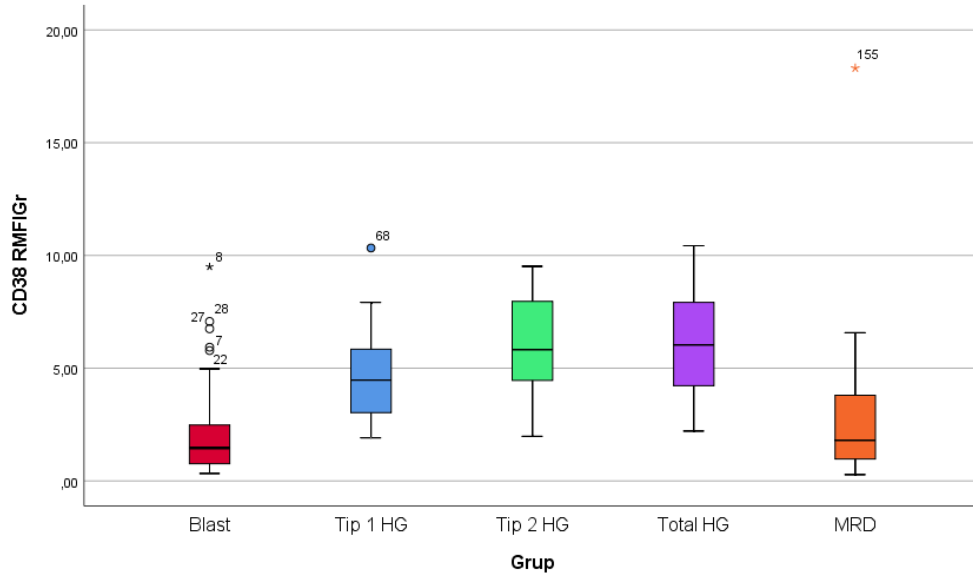
Tanımlayıcı istatistik yardımıyla $RMFI^{gr}$, $RMFI^{mo}$, $RMFI^{ble}$, $RMFI^{tle}$ parametrelerinin hücre gruplarına göre ortalama ve %95 güven aralığı (GA) değerleri **Tablo 4.1.**'de gösterildi.

Tablo 4.1. HG, Blast ve MRD hücre gruplarının CD38 RMFI değerleri

CD38			Grup									
			Blast		Tip 1 HG		Tip 2 HG		Total HG		MRD	
			Değer	Std. Hata	Değer	Std. Hata	Değer	Std. Hata	Değer	Std. Hata	Değer	Std. Hata
RMFI ^{Gr}	Ortalama		2.19	0.32	4.73	0.36	5.94	0.42	5.98	0.41	3.11	0.79
	Ortanca		1.46		4.47		5.83		6.03		1.80	
	95% GA	Alt Sınır	1.54		4.00		5.08		5.15		1.48	
		Üst Sınır	2.85		5.47		6.80		6.82		4.75	
RMFI ^{Mo}	Ortalama		0.97	0.18	2.13	0.14	2.66	0.16	2.67	0.15	0.82	0.12
	Ortanca		0.67		2.22		2.83		2.71		0.87	
	95% GA	Alt Sınır	0.61		1.84		2.33		2.36		0.58	
		Üst Sınır	1.33		2.41		2.99		2.98		1.06	
RMFI ^{BLc}	Ortalama		3.15	0.52	5.03	0.51	6.48	0.79	6.50	0.74	3.21	0.83
	Ortanca		1.82		4.76		5.42		5.66		1.79	
	95% GA	Alt Sınır	2.09		3.99		4.87		4.98		1.48	
		Üst Sınır	4.20		6.06		8.09		8.02		4.93	
RMFI ^{Tle}	Ortalama		4.63	0.74	7.89	1.97	10.17	2.47	10.13	2.44	5.20	1.16
	Ortanca		3.27		4.87		6.65		6.44		3.20	
	95% GA	Alt Sınır	3.14		3.87		5.12		5.14		2.79	
		Üst Sınır	6.12		11.91		15.23		15.11		7.61	

4.2.1.1. Hücre gruplarının CD38 RMFI^{Gr} değerlerinin karşılaştırılması

Hesaplanan ortalama CD38 RMFI^{Gr} değerleri blast, Tip 1 HG, Tip 2 HG, toplam HG (Tip 1 ve Tip 2 HG) ve MRD popülasyonları arasında karşılaştırılarak değerlendirildi. İmmatür hücre popülasyonlarının CD38 RMFI^{Gr} değerlerinin dağılımı **Şekil 4.1.**'de gösterilmektedir. CD38 RMFI^{Gr} değeri, incelenen hücre grupları arasında anlamlı fark mevcut olup ($p=0.000$) bu fark blast-HG, MRD-HG ikili gruplarından kaynaklandığı ($p<0,05$) görüldü. Ortalama CD38 RMFI^{Gr} değerleri karşılaştırıldığında Tip 2 HG'de Tip 1 HG'den daha yüksekti (Tip 1 ve Tip 2 HG için sırasıyla ortalama CD38 RMFI^{Gr}: 4,73-5,94). Blast popülasyonu ile Tip 1 HG karşılaştırıldığında ise Tip 1 HG yaklaşık 2 kat daha yüksek bulundu (Tip 1 ve Blast için sırasıyla Ortalama CD38 RMFI^{Gr}: 4,73-2,19). Blast-MRD popülasyonları arasında ise anlamlı fark bulunamadı. (**Tablo 4.2.**)



Şekil 4.1. Hücre gruplarının CD38 RMFI^{gr} değerlerinin dağılım grafiği

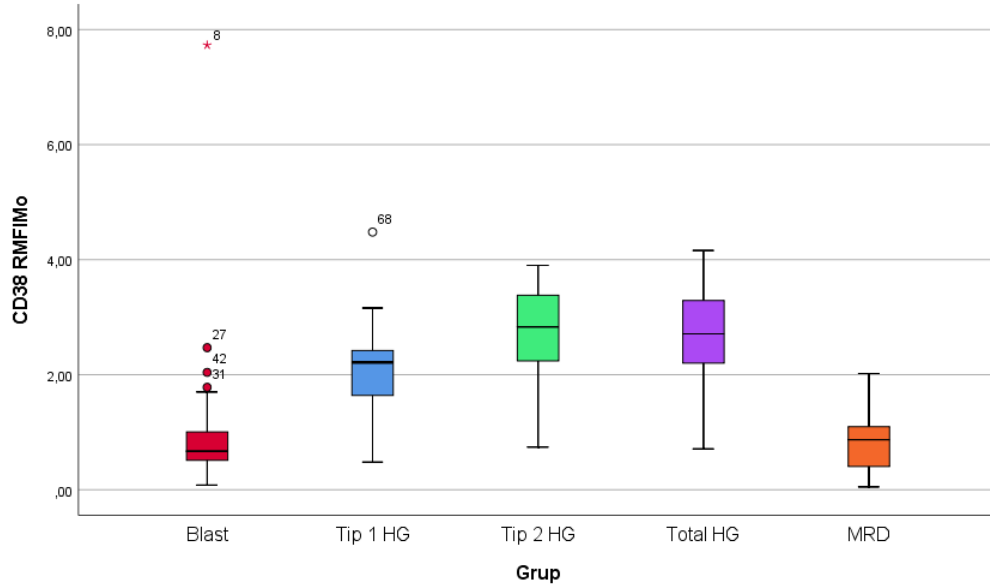
Tablo 4.2. İkili hücre gruplarının CD38 RMFI^{gr} değerlerinin karşılaştırılması

Sample 1-Sample 2	Test Statistic	Sig.	Adj. Sig. ^a
Blast-MRD	1,668	0,196	1,000
Blast-Tip 1 HG	28,427	0,000	0,000
Blast-Tip 2 HG	28,427	0,000	0,000
Blast-Total HG	28,427	0,000	0,000
MRD-Tip 1 HG	8,578	0,003	0,034
MRD-Tip 2 HG	16,303	0,000	0,001
MRD-Total HG	16,303	0,000	0,001
Tip 1 HG-Tip 2 HG	4,267	0,039	0,389
Tip 1 HG-Total HG	4,267	0,039	0,389
Tip 2 HG-Total HG	0,000	1,000	1,000

4.2.1.2. Hücre gruplarının CD38 RMFI^{mo} değerlerinin karşılaştırılması

İmmatür hücre popülasyonlarının CD38 RMFI^{mo} değerlerinin dağılımı Şekil 4.2.'de gösterilmektedir. CD38 RMFI^{mo} değeri, incelenen hücre grupları arasında anlamlı fark mevcut olup ($p=0.000$) bu fark Blast-Tip1/Tip2/Toplam HG, MRD-Tip1/Tip2/Toplam HG ikili gruplarından kaynaklandığı ($p<0,05$) gözlemlendi. Tip2 HG popülasyonunun ortalama CD38 RMFI^{mo} değeri Tip 1 HG'den daha yüksekti (Tip 1 ve Tip 2 HG için sırasıyla Ortalama CD38 RMFI^{mo}: 2,13-2,66). Blast popülasyonu

ile Tip 1 HG karşılaştırıldığında ise Tip 1 HG yaklaşık 2 kat daha yüksek bulundu (Tip 1 HG ve Blast için sırasıyla Ortalama CD38 RMFI^{gr}: 2,13-0,97). Blast-MRD popülasyonları arasında ise anlamlı fark bulunmadı. (**Tablo 4.3.**)



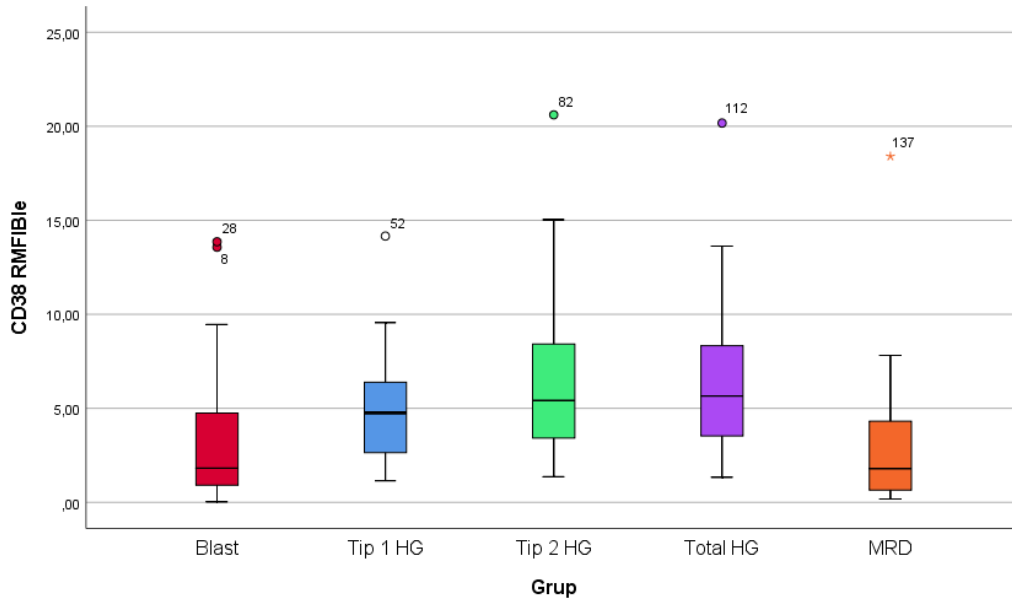
Şekil 4.2. Hücre gruplarının CD38 RMFI^{mo} değerlerinin dağılım grafiği

Tablo 4.3. İkili hücre gruplarının CD38 RMFI^{mo} değerlerinin karşılaştırılması

Sample 1-Sample 2	Test Statistic	Sig.	Adj. Sig. ^a
Blast-MRD	1,668	0,196	1,000
Blast-Tip 1 HG	33,728	0,000	0,000
Blast-Total HG	36,091	0,000	0,000
Blast-Tip 2 HG	28,427	0,000	0,000
MRD-Tip 1 HG	21,087	0,000	0,000
MRD-Total HG	32,500	0,000	0,000
MRD-Tip 2 HG	32,500	0,000	0,000
Tip 1 HG-Total HG	13,067	0,000	0,003
Tip 1 HG-Tip 2 HG	9,600	0,002	0,019
Total HG-Tip 2 HG	0,267	0,606	1,000

4.2.1.3. Hücre gruplarının CD38 RMFI^{ble} değerlerinin karşılaştırılması

İmmatür hücre popülasyonlarının CD38 RMFI^{ble} değerlerinin dağılımı **Şekil 4.3**'te gösterilmektedir. CD38 RMFI^{ble} değeri, incelenen hücre grupları arasında anlamlı fark mevcut olup ($p=0.007$) bu fark Blast-Tip1/Tip2/Toplam HG ikili gruplarından kaynaklandığı ($p<0,05$) tespit edildi. CD38 RMFI^{ble} parametresi için Tip 1 HG ile Tip 2 HG arasında anlamlı fark bulunmadı. Tip 1 HG grubunun ortalama CD38 RMFI^{ble} değeri blast hücre grubundan daha yüksek bulundu (Tip 1 ve Blast için sırasıyla Ortalama CD38 RMFI^{gr}: 5,03-3,15). Blast-MRD, MRD-HG ikili grupları arasında da anlamlı fark bulunmadı. (**Tablo 4.4**)



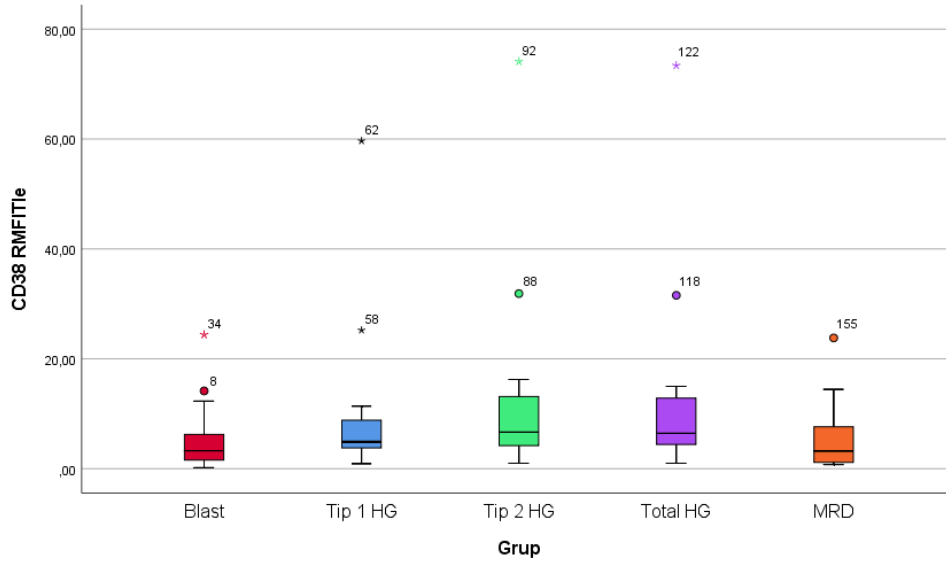
Şekil 4.3. Hücre gruplarının CD38 RMFI^{ble} oranlarının dağılım grafiği

Tablo 4.4. İkili hücre gruplarının CD38 RMFI^{ble} değerlerinin karşılaştırılması

Sample 1-Sample 2	Test Statistic	Sig.	Adj. Sig. ^a
MRD-Blast	0,067	0,796	1,000
MRD-Tip 1 HG	8,578	0,003	0,034
MRD-Tip 2 HG	8,578	0,003	0,034
MRD-Total HG	8,578	0,003	0,034
Blast-Tip 1 HG	15,243	0,000	0,001
Blast-Tip 2 HG	15,243	0,000	0,001
Blast-Total HG	15,243	0,000	0,001
Tip 1 HG-Tip 2 HG	0,267	0,606	1,000
Tip 1 HG-Total HG	1,067	0,302	1,000
Tip 2 HG-Total HG	0,000	1,000	1,000

4.2.1.4. Hücre gruplarının CD38 RMFI^{le} değerlerinin karşılaştırılması

İmmatür hücre popülasyonlarının CD38 RMFI^{le} değerlerinin dağılımı Şekil 4.4.'te gösterilmektedir. CD38 RMFI^{le} değeri, incelenen hücre grupları arasında anlamlı fark vardı ($p=0.02$) bu farkın sadece Blast-Tip1/Tip2/Toplam HG ikili gruplarından kaynaklandığı ($p<0,05$) tespit edilmiş olup blast grubunun Ortalama CD38 RMFI^{le} değeri daha düşük bulundu (Tip 1 HG, Tip 2 HG ve blast için sırasıyla 7,89-10,17-4,63). Tip1 HG-Tip2 HG ve Blast-MRD ikili grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. (Tablo 4.5.)



Şekil 4.4. Hücre gruplarının CD38 RMFI^{le} oranlarının dağılım grafiği

Tablo 4.5. İkili hücre gruplarının CD38 RMFI^{le} değerlerinin karşılaştırılması

Sample 1-Sample 2	Test Statistic	Sig.	Adj. Sig. ^a
MRD-Blast	,067	,796	1,000
MRD-Tip 1 HG	1,602	,206	1,000
MRD-Total HG	3,313	,069	,687
MRD-Tip 2 HG	3,313	,069	,687
Blast-Tip 1 HG	6,135	,013	,133
Blast-Total HG	8,718	,003	,032
Blast-Tip 2 HG	8,718	,003	,032
Tip 1 HG-Total HG	2,400	,121	1,000
Tip 1 HG-Tip 2 HG	1,067	,302	1,000
Total HG-Tip 2 HG	,000	1,000	1,000

4.2.2. Hücre gruplarının CD10 RMFI seviyeleri

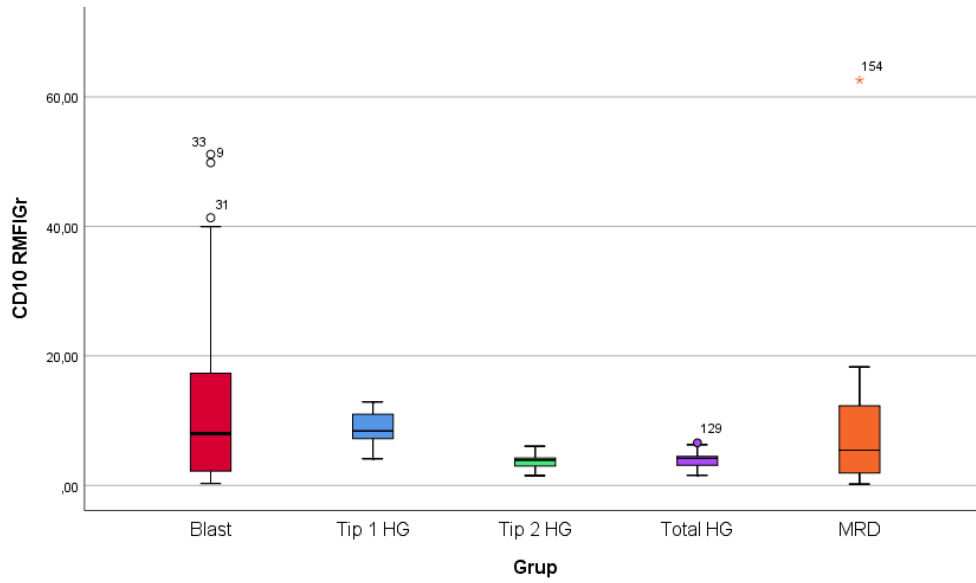
Çalışmada incelenen HG vakalarından elde edilen Tip 1 HG, Tip 2 HG ve toplam HG (Tip 1 ve Tip 2 HG); B-ALL vakalarından elde edilen blast ve MRD vakalarından elde edilen MRD immatür hücre popülasyonlarına ait CD10 MFI değerleri aynı hasta veri dosyasından kapılanan sırasıyla granülosit, monosit, B-lenfosit ve T lenfosit hücre gruplarının MFI değerlerine oranlanarak $RMFI^{gr}$, $RMFI^{mo}$, $RMFI^{ble}$, $RMFI^{tle}$ değerleri elde edildi. CD10 antijenine yönelik RMFI oranlarının istatistiksel verileri **Tablo 4.6.**'da gösterildi. CD10 RMFI parametrelerinin dağılımını değerlendirmek için Shapiro-Wilk testi uygulandı ve $CD10\ RMFI^{gr}$, $RMFI^{mo}$, $RMFI^{ble}$, $RMFI^{tle}$ için normal dağılıma uymadığı saptandı ($p<0,05$). Hücre grupları arasındaki ortalamaların anlamlılığını değerlendirmek için Kruskal-Wallis-H testi kullanıldı.

Tablo 4.6. HG, Blast ve MRD hücre gruplarının CD10 RMFI değerleri

CD10			Grup									
			Blast		Tip 1 HG		Tip 2 HG		Total HG		MRD	
			Değer	Std. Hata	Değer	Std. Hata	Değer	Std. Hata	Değer	Std. Hata	Değer	Std. Hata
$RMFI^{gr}$	Ortalama		12.41	2.14	8.76	.42	3.65	.19	3.91	.21	8.76	2.72
	Ortanca		8.00		8.41		3.91		4.18		5.44	
	95% GA	Alt Sınır	8.10		7.90		3.26		3.48		3.12	
		Üst Sınır	16.72		9.61		4.03		4.33		14.39	
$RMFI^{mo}$	Ortalama		17.98	4.11	18.82	1.83	7.67	.63	8.20	.67	22.08	8.32
	Ortanca		5.00		16.57		6.97		7.31		8.42	
	95% GA	Alt Sınır	9.69		15.08		6.38		6.82		4.83	
		Üst Sınır	26.27		22.56		8.97		9.58		39.32	
$RMFI^{ble}$	Ortalama		24.64	4.05	18.37	1.44	7.40	.48	7.91	.51	18.85	8.09
	Ortanca		14.85		17.44		6.72		7.45		5.92	
	95% GA	Alt Sınır	16.46		15.42		6.42		6.87		2.07	
		Üst Sınır	32.82		21.31		8.39		8.96		35.63	
$RMFI^{tle}$	Ortalama		34.09	4.49	24.36	2.44	9.89	.85	10.58	.91	39.90	15.81
	Ortanca		24.25		22.67		9.95		10.56		17.66	
	95% GA	Alt Sınır	25.03		19.37		8.15		8.72		7.10	
		Üst Sınır	43.15		29.34		11.64		12.44		72.69	

4.2.2.1. Hücre gruplarının CD10 RMFI^{Gr} değerlerinin karşılaştırılması

İmmatür hücre popülasyonlarının CD10 RMFI^{Gr} değerlerinin dağılımı Şekil 4.5.'te gösterilmektedir. CD10 RMFI^{Gr} değerlerinin incelenen hücre grupları arasında anlamlı fark mevcut olup ($p=0,000$) bu farkın Tip1 HG ile Tip2 HG hücre grupları arasından kaynaklandığı ($p<0,05$) gözlemlendi. Blast- Tip 1 Hg ve Blast-MRD hücre grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. (Tablo 4.7.)



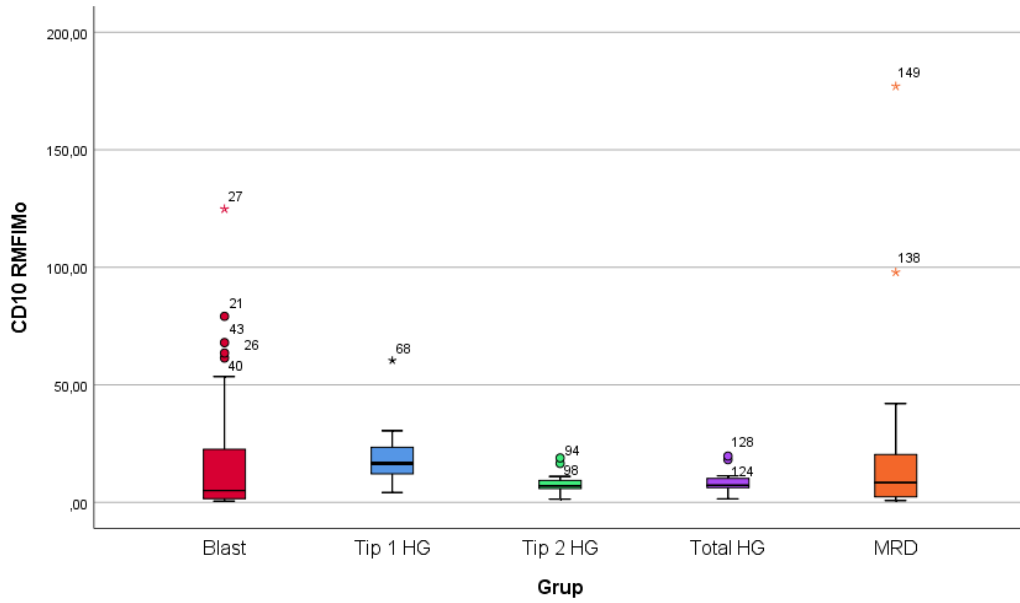
Şekil 4.5. Hücre gruplarının CD10 RMFI^{Gr} değerlerinin dağılım grafiği

Tablo 4.7. İkili hücre gruplarının CD10 RMFI^{Gr} değerlerinin karşılaştırılması

Sample 1-Sample 2	Test Statistic	Sig.	Adj. Sig. ^a
Tip 2 HG-Total HG	0,601	0,438	1,000
Tip 2 HG-MRD	0,408	0,523	1,000
Tip 2 HG-Blast	1,768	0,184	1,000
Tip 2 HG-Tip 1 HG	45,067	0,000	0,000
Total HG-MRD	0,158	0,691	1,000
Total HG-Blast	1,768	0,184	1,000
Total HG-Tip 1 HG	45,067	0,000	0,000
MRD-Blast	0,601	0,438	1,000
MRD-Tip 1 HG	3,313	0,069	0,687
Blast-Tip 1 HG	0,329	0,566	1,000

4.2.2.2. Hücre gruplarının CD10 RMFI^{mo} değerlerinin karşılaştırılması

İmmatür hücre popülasyonlarının CD10 RMFI^{mo} değerlerinin dağılımı **Şekil 4.6.**'da gösterilmektedir. CD10 RMFI^{mo} değerlerinde incelenen hücre grupları arasında anlamlı fark mevcut olup ($p=0,000$) bu farkın Tip 1 HG ile Blast/Tip 2 HG/Toplam HG gruplarından kaynaklandığı ($p<0,05$) gözlemlendi. Tip 1 HG CD10 RMFI^{mo} değeri blast grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. Blast ve MRD grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi. (**Tablo 4.8.**)



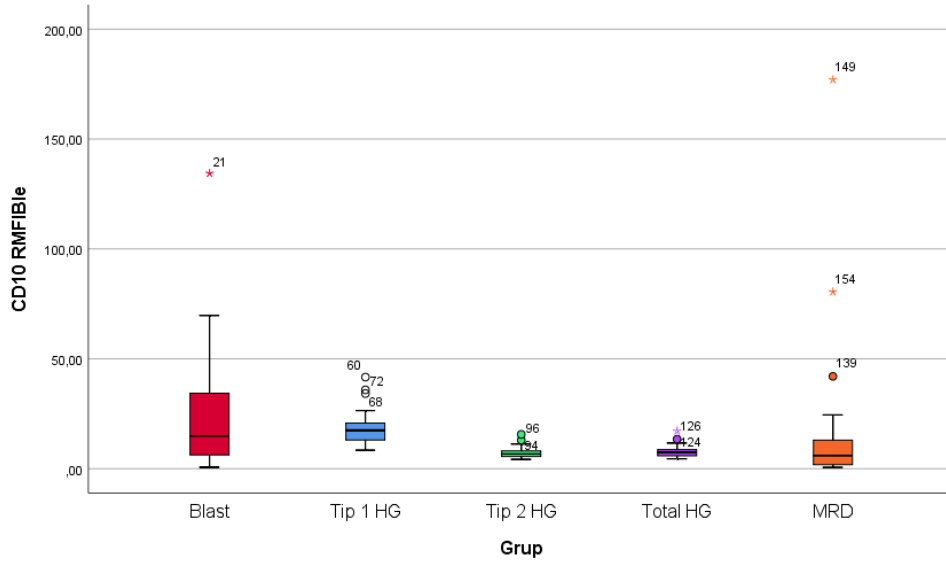
Şekil 4.6. Hücre gruplarının CD10 RMFI^{mo} değerlerinin dağılım grafiği,

Tablo 4.8. İkili hücre gruplarının CD10 RMFI^{Mo} değerlerinin karşılaştırılması

Sample 1-Sample 2	Test Statistic	Sig.	Adj. Sig. ^a
Blast-Tip 2 HG	0,329	0,566	1,000
Blast-Total HG	0,329	0,566	1,000
Blast-MRD	0,601	0,438	1,000
Blast-Tip 1 HG	11,754	0,001	0,006
Tip 2 HG-Total HG	0,267	0,606	1,000
Tip 2 HG-MRD	0,906	0,341	1,000
Tip 2 HG-Tip 1 HG	38,400	0,000	0,000
Total HG-MRD	0,158	0,691	1,000
Total HG-Tip 1 HG	32,267	0,000	0,000
MRD-Tip 1 HG	1,602	0,206	1,000

4.2.2.3. Hücre gruplarının CD10 RMFI^{ble} değerlerinin karşılaştırılması

İmmatür hücre popülasyonlarının CD10 RMFI^{ble} değerlerinin dağılımı Şekil 4.7.'de gösterilmektedir. CD10 RMFI^{ble} değeri açısından, incelenen hücre grupları arasında anlamlı fark mevcut olup ($p=0.000$) bu farkın MRD-Blast, MRD-Tip 1 HG, Tip 2 HG-Total HG, Tip 2 HG-Blast, Tip 2 HG-Tip 1 HG, Total HG-Blast, Total HG-Tip 1 HG grupları arasında mevcut olduğu ($p<0,05$) saptandı. MRD-Tip 2 HG, MRD-Total HG, Blast-Tip 1 HG grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. (Tablo 4.9.)



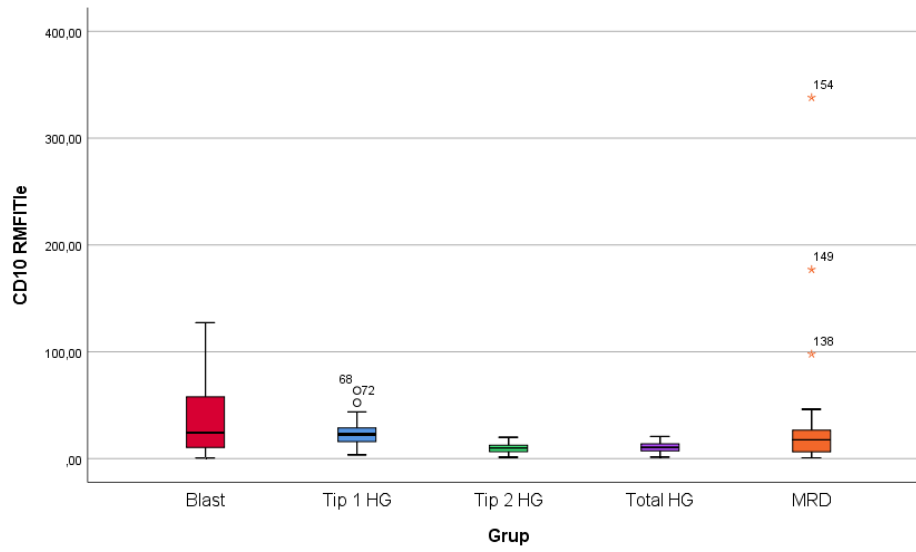
Şekil 4.7. Hücre gruplarının CD10 RMFI^{ble} değerlerinin dağılım grafiği

Tablo 4.9. İkili hücre gruplarının CD10 RMFI^{ble} değerlerinin karşılaştırılması

Sample 1-Sample 2	Test Statistic	Sig.	Adj. Sig. ^a
MRD-Tip 2 HG	0,025	0,875	1,000
MRD-Total HG	0,025	0,875	1,000
MRD-Blast	5,405	0,020	0,201
MRD-Tip 1 HG	12,133	0,000	0,005
Tip 2 HG-Total HG	1,067	0,302	1,000
Tip 2 HG-Blast	10,452	0,001	0,012
Tip 2 HG-Tip 1 HG	32,267	0,000	0,000
Total HG-Blast	10,452	0,001	0,012
Total HG-Tip 1 HG	32,267	0,000	0,000
Blast-Tip 1 HG	0,329	0,566	1,000

4.2.2.4. Hücre gruplarının CD10 RMFI^{le} değerlerinin karşılaştırılması

İmmatür hücre popülasyonlarının CD10 RMFI^{le} değerlerinin dağılımı **Şekil 4.8.**'de gösterilmektedir. CD10 RMFI^{le} değeri açısından, incelenen hücre grupları arasında anlamlı fark mevcut olup ($p=0.000$) bu farkın Tip 2 HG-Tip 1 HG, Tip 2 HG-Blast, Total HG-Tip 1 HG, Total HG-Blast ikili gruplarından kaynaklandığı ($p<0,05$) tespit edilmiştir. Tip 2 HG-Total HG, Tip 2 HG-MRD, Total HG-MRD, MRD-Tip 1 HG, MRD-Blast, Tip 1 HG-Blast ikili grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. (**Tablo 4.10.**)



Şekil 4.8. Hücre gruplarının CD10 RMFI^{le} değerlerinin dağılım grafiği

Tablo 4.10. İkili hücre gruplarının CD10 RMFI^{le} değerlerinin karşılaştırılması

Sample 1-Sample 2	Test Statistic	Sig.	Adj. Sig. ^a
Tip 2 HG-Total HG	0,267	0,606	1,000
Tip 2 HG-MRD	0,906	0,341	1,000
Tip 2 HG-Tip 1 HG	21,600	0,000	0,000
Tip 2 HG-Blast	17,511	0,000	0,000
Total HG-MRD	0,906	0,341	1,000
Total HG-Tip 1 HG	17,067	0,000	0,000
Total HG-Blast	13,755	0,000	0,002
MRD-Tip 1 HG	1,602	0,206	1,000
MRD-Blast	1,668	0,196	1,000
Tip 1 HG-Blast	0,143	0,705	1,000

4.2.3. Hücre gruplarının CD34 RMFI seviyeleri

Çalışmada incelenen HG vakalarından elde edilen Tip 1 HG, Tip 2 HG ve Toplam HG; B-ALL vakalarından elde edilen blast ve MRD vakalarından elde edilen MRD immatür hücre popülasyonlarına ait CD34 MFI değerleri aynı hasta veri dosyasından kapılanan sırasıyla granülosit, monosit, B-lenfosit ve T lenfosit hücre gruplarının MFI değerlerine oranlanarak $RMFI^{gr}$, $RMFI^{mo}$, $RMFI^{ble}$, $RMFI^{tle}$ değerleri elde edildi. CD34 antijenine yönelik RMFI oranlarının istatistiksel verileri **Tablo 4.11.**'de gösterilmektedir.

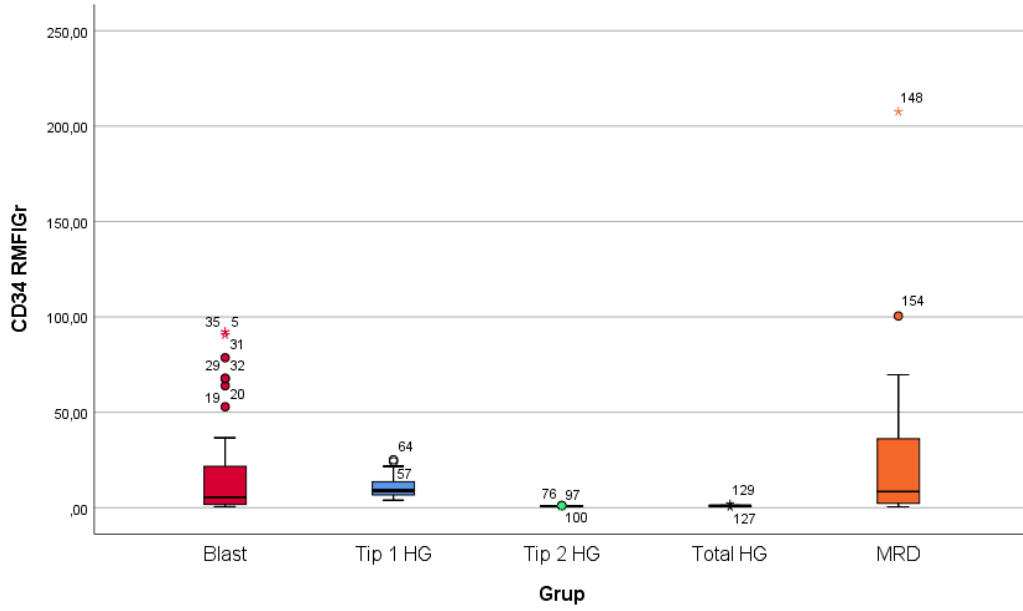
Tablo 4.11. HG, Blast ve MRD hücre gruplarının CD34 RMFI değerleri

CD34			Grup									
			Blast		Tip 1 HG		Tip 2 HG		Total HG		MRD	
			Değer	Std. Hata	Değer	Std. Hata	Değer	Std. Hata	Değer	Std. Hata	Değer	Std. Hata
$RMFI^{Gr}$	Ortalama		18.76	4.04	10.71	1.04	0.83	0.03	0.96	0.05	29.31	9.93
	Ortanca		5.48		8.94		0.83		0.93		8.48	
	95%	Alt Sınır	10.60		8.58		0.78		0.86		8.71	
	GA	Üst Sınır	26.92		12.84		0.89		1.06		49.91	
$RMFI^{Mo}$	Ortalama		20.12	5.53	9.96	1.07	0.76	0.03	0.86	0.03	29.32	10.26
	Ortanca		4.46		8.68		0.77		0.83		6.18	
	95%	Alt Sınır	8.96		7.77		0.70		0.80		8.03	
	GA	Üst Sınır	31.29		12.15		0.82		0.92		50.60	
$RMFI^{BLE}$	Ortalama		20.60	3.90	11.71	1.34	0.87	0.03	0.99	0.03	24.31	7.36
	Ortanca		9.97		10.23		0.89		0.99		5.33	
	95%	Alt Sınır	12.73		8.98		0.81		0.91		9.05	
	GA	Üst Sınır	28.47		14.45		0.92		1.06		39.57	
$RMFI^{Tle}$	Ortalama		56.54	10.72	9.96	1.07	0.76	0.03	0.86	0.03	47.50	16.30
	Ortanca		22.57		8.68		0.77		0.83		9.06	
	95%	Alt Sınır	34.91		7.77		0.70		0.80		13.70	
	GA	Üst Sınır	78.17		12.15		0.82		0.92		81.31	

4.2.3.1. Hücre gruplarının CD34 $RMFI^{gr}$ değerlerinin karşılaştırılması

İmmatür hücre popülasyonlarının CD34 $RMFI^{gr}$ değerlerinin dağılımı **Şekil 4.9.**'da gösterilmektedir. CD34 $RMFI^{gr}$ değeri açısından, incelenen hücre grupları arasında anlamlı fark mevcut olup ($p=0.000$) bu farkın Tip 2 HG-Total HG, Tip 2 HG-Blast, Tip 2 HG-MRD, Tip 2 HG-Tip 1 HG, Total HG-Blast, Total HG-MRD,

Total HG-Tip 1 HG ikili gruplarından kaynaklandığı ($p<0,05$) gözlemlendi. Blast-MRD, Blast-Tip 1 HG, MRD-Tip 1 HG ikili grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. (Tablo 4.12.)



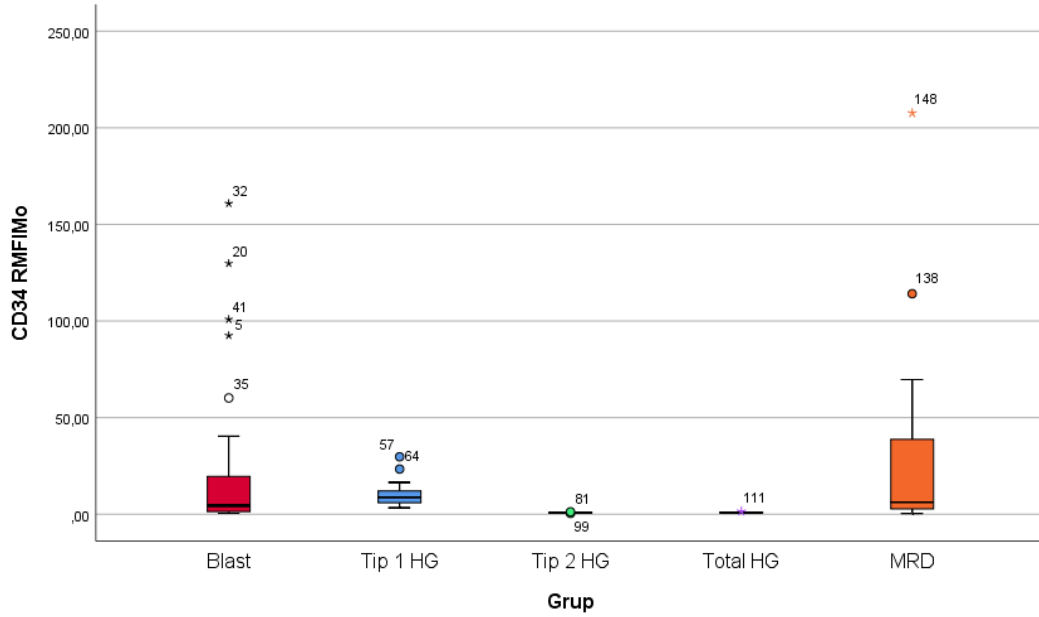
Şekil 4.9. Hücre gruplarının CD34 RMFI^{gr} değerlerinin dağılım grafiği

Tablo 4.12. İkili hücre gruplarının CD34 RMFI^{gr} değerlerinin karşılaştırılması

Sample 1-Sample 2	Test Statistic	Sig.	Adj. Sig. ^a
Tip 2 HG-Total HG	9,600	0,002	0,019
Tip 2 HG-Blast	43,081	0,000	0,000
Tip 2 HG-MRD	35,301	0,000	0,000
Tip 2 HG-Tip 1 HG	60,000	0,000	0,000
Total HG-Blast	43,081	0,000	0,000
Total HG-MRD	18,304	0,000	0,000
Total HG-Tip 1 HG	60,000	0,000	0,000
Blast-MRD	1,668	0,196	1,000
Blast-Tip 1 HG	2,326	0,127	1,000
MRD-Tip 1 HG	0,025	0,875	1,000

4.2.3.2. Hücre gruplarının CD34 RMFI^{mo} değerlerinin karşılaştırılması

İmmatür hücre popülasyonlarının CD34 RMFI^{mo} değerlerinin dağılımı **Şekil 4.10**'da gösterilmektedir. CD34 RMFI^{mo} değeri açısından, incelenen hücre grupları arasında anlamlı fark mevcut olup ($p=0.000$) bu farkın Tip 2 HG-Total HG, Tip 2 HG-Blast, Tip 2 HG-MRD, Tip 2 HG-Tip 1 HG, Total HG-Blast, Total HG-MRD, Total HG-Tip 1 HG ikili gruplarından kaynaklandığı ($p<0,05$) tespit edildi. Blast-MRD, Blast-Tip 1 HG, MRD-Tip 1 HG ikili grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. (**Tablo 4.13.**)



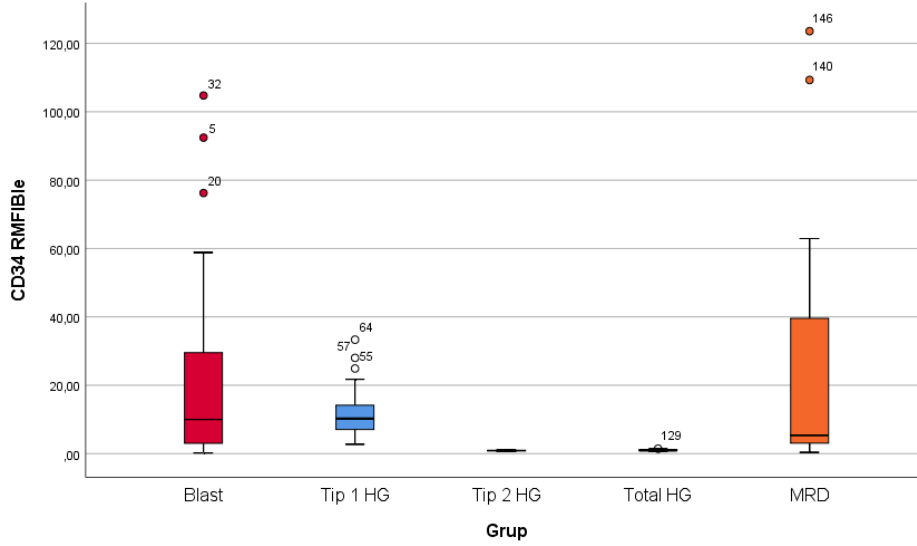
Şekil 4.10. Hücre gruplarının CD34 RMFI^{mo} değerlerinin dağılım grafiği

Tablo 4.13. İkili hücre gruplarının CD34 RMFI^{mo} değerlerinin karşılaştırılması

Sample 1-Sample 2	Test Statistic	Sig.	Adj. Sig. ^a
Tip 2 HG-Total HG	6,667	0,010	0,098
Tip 2 HG-Blast	40,614	0,000	0,000
Tip 2 HG-MRD	35,301	0,000	0,000
Tip 2 HG-Tip 1 HG	60,000	0,000	0,000
Total HG-Blast	31,495	0,000	0,000
Total HG-MRD	25,435	0,000	0,000
Total HG-Tip 1 HG	60,000	0,000	0,000
Blast-MRD	0,601	0,438	1,000
Blast-Tip 1 HG	2,326	0,127	1,000
MRD-Tip 1 HG	0,506	0,477	1,000

4.2.3.3. Hücre gruplarının CD34 RMFI^{ble} değerlerinin karşılaştırılması

İmmatür hücre popülasyonlarının CD34 RMFI^{ble} değerlerinin dağılımı Şekil 4.11.'de gösterilmektedir. CD34 RMFI^{ble} değeri açısından, incelenen hücre grupları arasında anlamlı fark mevcut olup ($p=0.000$) bu farkın blast-HG, MRD-HG ikili gruplarından kaynaklandığı ($p<0,005$) tespit edildi. Blast-MRD ve HG ikili grupları arasında anlamlı fark bulunmadı. (Tablo 4.14.)



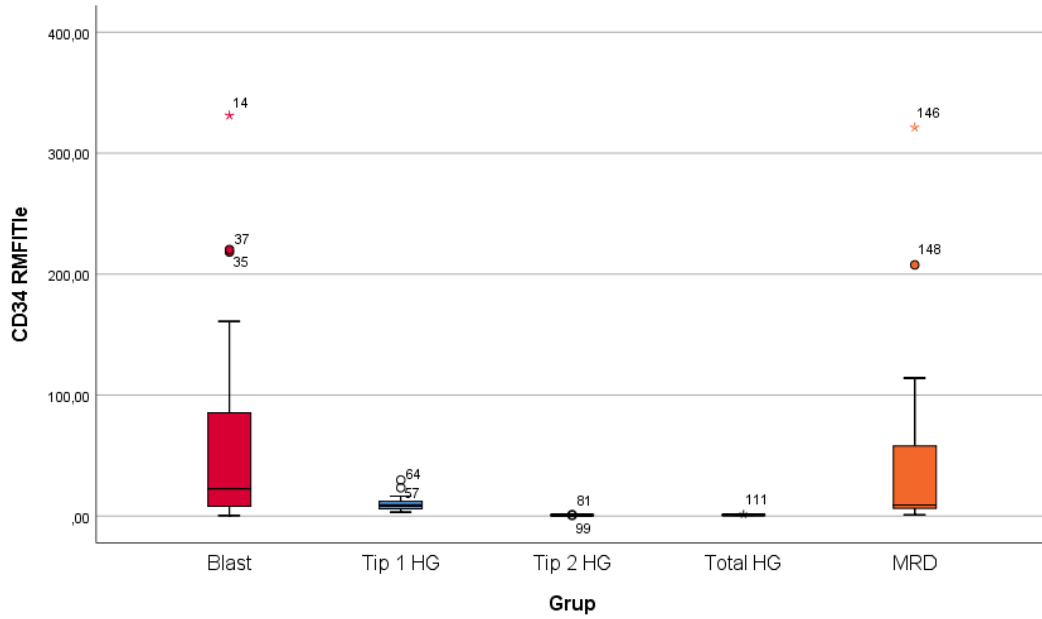
Şekil 4.11. Hücre gruplarının CD34 RMFI^{ble} değerlerinin dağılım grafiği

Tablo 4.14. İkili hücre gruplarının CD34 RMFI^{ble} değerlerinin karşılaştırılması

Sample 1-Sample 2	Test Statistic	Sig.	Adj. Sig. ^a
Tip 2 HG-Total HG	4,267	0,039	0,389
Tip 2 HG-MRD	29,020	0,000	0,000
Tip 2 HG-Blast	49,554	0,000	0,000
Tip 2 HG-Tip 1 HG	60,000	0,000	0,000
Total HG-MRD	18,304	0,000	0,000
Total HG-Blast	43,081	0,000	0,000
Total HG-Tip 1 HG	60,000	0,000	0,000
MRD-Blast	1,668	0,196	1,000
MRD-Tip 1 HG	1,602	0,206	1,000
Blast-Tip 1 HG	0,329	0,566	1,000

4.2.3.4. Hücre gruplarının CD34 RMFI^{le} değerlerinin karşılaştırılması

İmmatür hücre popülasyonlarının CD34 RMFI^{le} değerlerinin dağılımı Şekil 4.12’de gösterilmektedir. CD34 RMFI^{le} değeri açısından, incelenen hücre grupları arasında anlamlı fark mevcut olup ($p=0.000$) bu farkın Tip 2 HG-MRD, Tip 2 HG-Tip 1 HG, Tip 2 HG-Blast, Total HG-MRD, Total HG-Tip 1 HG, Total HG-Blast ikili gruplarından kaynaklandığı ($p<0,005$) tespit edilmiştir. MRD-Tip 1 HG, MRD-Blast ikili grupları arasında anlamlı fark bulunmamıştır. (Tablo 4.15)



Şekil 4.12. Hücre gruplarının CD34 RMFI^{le} değerlerinin dağılım grafiği

Tablo 4.15. İkili hücre gruplarının CD34 RMFI^{le} değerlerinin karşılaştırılması

Sample 1-Sample 2	Test Statistic	Sig.	Adj. Sig. ^a
Tip 2 HG-Total HG	-12,750	0,277	1,000
Tip 2 HG-MRD	-69,655	0,000	0,000
Tip 2 HG-Tip 1 HG	73,217	0,000	0,000
Tip 2 HG-Blast	83,861	0,000	0,000
Total HG-MRD	-56,905	0,000	0,000
Total HG-Tip 1 HG	60,467	0,000	0,000
Total HG-Blast	71,111	0,000	0,000
MRD-Tip 1 HG	3,562	0,777	1,000
MRD-Blast	14,206	0,225	1,000
Tip 1 HG-Blast	10,644	0,323	1,000

4.2.4. Hücre gruplarının CD45 RMFI seviyeleri

Çalışmada incelenen HG vakalarından elde edilen Tip 1 HG, Tip 2 HG ve Toplam HG; B-ALL vakalarından elde edilen blast ve MRD vakalarından elde edilen MRD immatür hücre popülasyonlarına ait CD45 MFI değerleri aynı hasta veri dosyasından kapılanan sırasıyla granülosit, monosit, B-lenfosit ve T lenfosit hücre gruplarının MFI değerlerine oranlanarak $RMFI^{Gr}$, $RMFI^{Mo}$, $RMFI^{ble}$, $RMFI^{tle}$ değerleri elde edildi. CD45 antijenine yönelik RMFI oranlarının istatistiksel verileri **Tablo 4.16.** da gösterilmektedir.

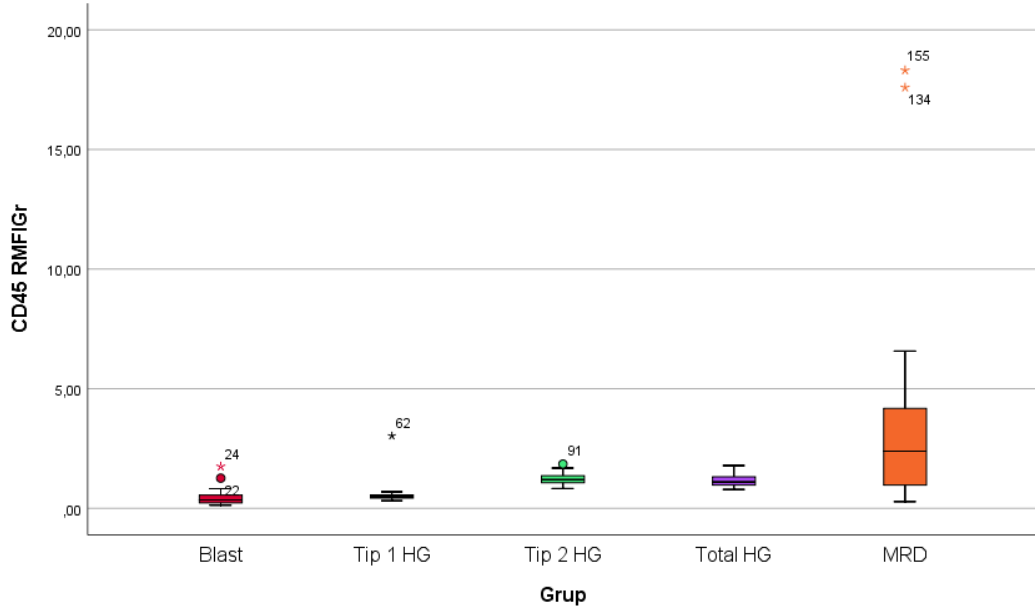
Tablo 4.16. HG, Blast ve MRD hücre gruplarının CD45 RMFI değerleri

CD45			Grup									
			Blast		Tip 1 HG		Tip 2 HG		Total HG		MRD	
			Değer	Std. Hata	Değer	Std. Hata	Değer	Std. Hata	Değer	Std. Hata	Değer	Std. Hata
RMFI ^{Gr}	Ortalama		0.43	0.05	0.59	0.09	1.24	0.04	1.15	0.04	3.89	1.00
	Ortanca		0.35		0.51		1.20		1.11		2.39	
	95% GA	Alt Sınır	0.34		0.42		1.15		1.06		1.83	
		Üst Sınır	0.52		0.77		1.33		1.23		5.96	
RMFI ^{Mo}	Ortalama		0.13	0.01	0.20	.02	0.45	.02	0.42	0.02	1.13	0.32
	Ortanca		0.12		0.17		0.45		0.42		0.90	
	95% GA	Alt Sınır	0.10		0.16		0.40		0.37		0.46	
		Üst Sınır	0.15		0.25		0.49		0.46		1.79	
RMFI ^{BL}	Ortalama		0.16	0.02	0.17	.02	0.36	.01	0.33	0.01	4.77	1.70
	Ortanca		0.14		0.15		0.36		0.33		2.70	
	95% GA	Alt Sınır	0.13		0.13		0.33		0.31		1.24	
		Üst Sınır	0.19		0.21		0.39		0.35		8.30	
RMFI ^{Tle}	Ortalama		0.14	0.01	0.15	.02	0.32	.01	0.30	0.01	6.18	1.37
	Ortanca		0.14		0.13		0.31		0.30		3.23	
	95% GA	Alt Sınır	0.12		0.11		0.30		0.28		3.33	
		Üst Sınır	0.17		0.18		0.35		0.31		9.03	

4.2.4.1. Hücre gruplarının CD45 $RMFI^{Gr}$ değerlerinin karşılaştırılması

İmmatür hücre popülasyonlarının CD45 $RMFI^{Gr}$ değerlerinin dağılımı **Şekil 4.13.**'de gösterilmektedir. CD45 $RMFI^{Gr}$ değeri açısından, incelenen hücre grupları

arasında anlamlı fark mevcut olup ($p=0.000$) tüm ikili hücre gruplarında fark gösterildi ($p<0,05$). (Tablo 4.17.)



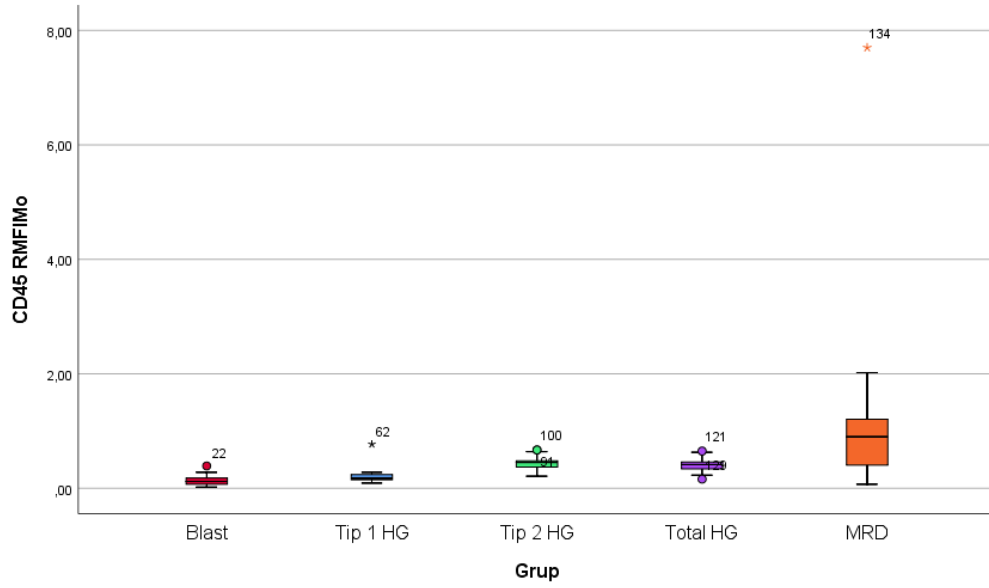
Şekil 4.13. Hücre gruplarının CD45 RMFI^{gr} değerlerinin dağılım grafiği

Tablo 4.17. İkili hücre gruplarının CD45 RMFI^{gr} değerlerinin karşılaştırılması

Sample 1-Sample 2	Test Statistic	Sig.	Adj. Sig. ^a
Blast-Tip 1 HG	5,748	0,017	0,165
Blast-Total HG	52,345	0,000	0,000
Blast-Tip 2 HG	52,345	0,000	0,000
Blast-MRD	25,915	0,000	0,000
Tip 1 HG-Total HG	52,267	0,000	0,000
Tip 1 HG-Tip 2 HG	52,267	0,000	0,000
Tip 1 HG-MRD	29,020	0,000	0,000
Total HG-Tip 2 HG	1,067	0,302	1,000
Total HG-MRD	6,839	0,009	0,089
Tip 2 HG-MRD	6,839	0,009	0,089

4.2.4.2. Hücre gruplarının CD45 RMFI^{mo} değerlerinin karşılaştırılması

İmmatür hücre popülasyonlarının CD45 RMFI^{mo} değerlerinin dağılımı Şekil 4.14.'de gösterilmektedir. CD45 RMFI^{mo} değeri açısından, incelenen hücre grupları arasında anlamlı fark mevcut olup ($p=0.000$) tüm ikili hücre gruplarında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi ($p<0,05$). (Tablo 4.18.)



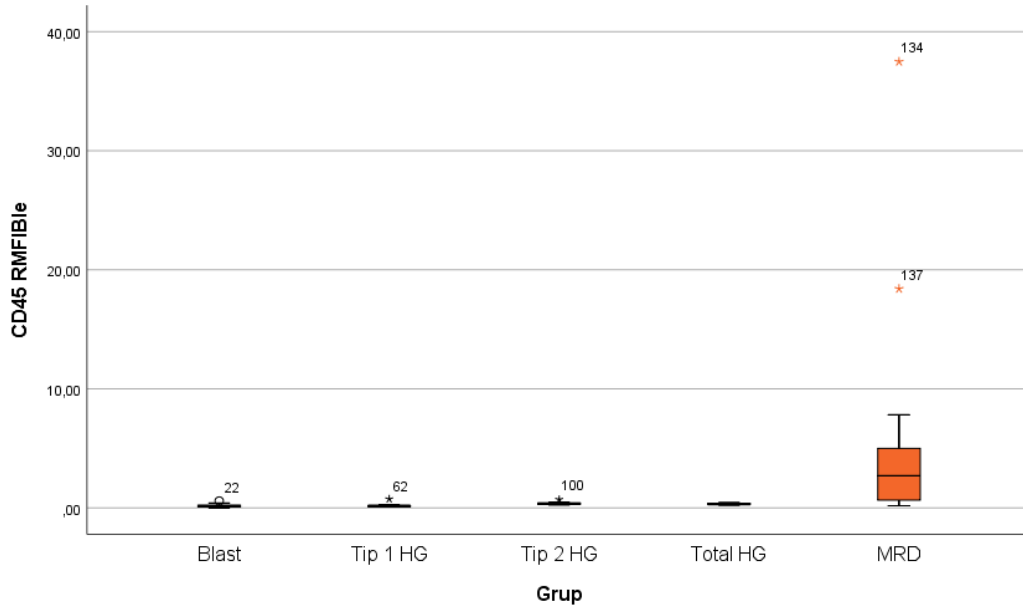
Şekil 4.14. Hücre gruplarının CD45 RMFI^{mo} değerlerinin dağılım grafiği

Tablo 4.18. İkili hücre gruplarının CD45 RMFI^{mo} değerlerinin karşılaştırılması

Sample 1-Sample 2	Test Statistic	Sig.	Adj. Sig. ^a
Blast-Tip 1 HG	9,470	0,002	0,021
Blast-Total HG	51,357	0,000	0,000
Blast-Tip 2 HG	55,296	0,000	0,000
Blast-MRD	20,919	0,000	0,000
Tip 1 HG-Total HG	38,400	0,000	0,000
Tip 1 HG-Tip 2 HG	38,400	0,000	0,000
Tip 1 HG-MRD	13,867	0,000	0,002
Total HG-Tip 2 HG	2,411	0,121	1,000
Total HG-MRD	4,246	0,039	0,393
Tip 2 HG-MRD	4,246	0,039	0,393

4.2.4.3. Hücre gruplarının CD45 RMFI^{ble} değerlerinin karşılaştırılması

İmmatür hücre popülasyonlarının CD45 RMFI^{ble} değerlerinin dağılımı **Şekil 4.15.**'de gösterilmektedir. CD45 RMFI^{ble} değeri açısından, incelenen hücre grupları arasında anlamlı fark mevcut olup ($p=0.000$) bu farkın Blast-Total HG, Blast-Tip 2 HG, Blast-MRD, Tip 1 HG-Total HG, Tip 1 HG-Tip 2 HG, Tip 1 HG-MRD, Total HG-MRD, Tip 2 HG-MRD ikili gruplarından kaynaklandığı ($p<0,005$) görüldü. Blast-Tip 1 HG arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. (**Tablo 4.19.**)



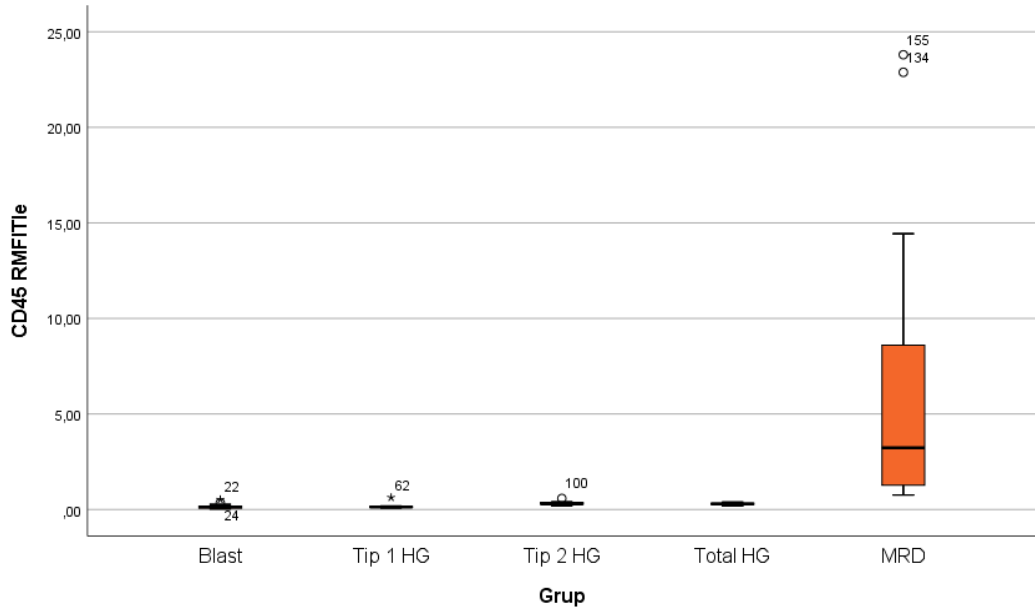
Şekil 4.15. Hücre gruplarının CD45 RMFI^{ble} değerlerinin dağılım grafiği

Tablo 4.19. İkili hücre gruplarının CD45 RMFI^{ble} değerlerinin karşılaştırılması

Sample 1-Sample 2	Test Statistic	Sig.	Adj. Sig. ^a
Blast-Tip 1 HG	0,005	0,942	1,000
Blast-Total HG	47,626	0,000	0,000
Blast-Tip 2 HG	55,296	0,000	0,000
Blast-MRD	29,430	0,000	0,000
Tip 1 HG-Total HG	48,654	0,000	0,000
Tip 1 HG-Tip 2 HG	52,267	0,000	0,000
Tip 1 HG-MRD	38,327	0,000	0,000
Total HG-Tip 2 HG	0,267	0,606	1,000
Total HG-MRD	34,733	0,000	0,000
Tip 2 HG-MRD	31,761	0,000	0,000

4.2.4.4. Hücre gruplarının CD45 RMFI^{tle} değerlerinin karşılaştırılması

İmmatür hücre popülasyonlarının CD45 RMFI^{tle} değerlerinin dağılımı Şekil 4.16.'da gösterilmektedir. CD45 RMFI^{tle} değeri açısından, incelenen hücre grupları arasında anlamlı fark mevcut olup ($p=0.000$) bu farkın blast-HG, MRD-HG ikili gruplarından kaynaklandığı ($p<0,005$) tespit edildi. Blast-MRD ve HG ikili grupları arasında anlamlı fark bulunmadı. (Tablo 4.20.)



Şekil 4.16. Hücre gruplarının CD45 RMFI^{le} değerlerinin dağılım grafiği

Tablo 4.20. İkili hücre gruplarının CD45 RMFI^{le} değerlerinin karşılaştırılması

Sample 1-Sample 2	Test Statistic	Sig.	Adj. Sig. ^a
Tip 1 HG-Blast	0,885	0,347	1,000
Tip 1 HG-Total HG	52,267	0,000	0,000
Tip 1 HG-Tip 2 HG	52,267	0,000	0,000
Tip 1 HG-MRD	49,099	0,000	0,000
Blast-Total HG	45,686	0,000	0,000
Blast-Tip 2 HG	45,686	0,000	0,000
Blast-MRD	37,509	0,000	0,000
Total HG-Tip 2 HG	2,411	0,121	1,000
Total HG-MRD	45,509	0,000	0,000
Tip 2 HG-MRD	42,196	0,000	0,000

4.2.5. Hücre gruplarının CD19 RMFI seviyeleri

Çalışmada incelenen HG vakalarından elde edilen Tip 1 HG, Tip 2 HG ve toplam HG; B-ALL vakalarından elde edilen blast ve MRD vakalarından elde edilen MRD immatür hücre popülasyonlarına ait CD19 MFI değerleri aynı hasta veri dosyasından kapılanan sırasıyla granülosit, monosit, B-lenfosit ve T lenfosit hücre gruplarının MFI değerlerine oranlanarak RMFI^{gr}, RMFI^{mo}, RMFI^{ble}, RMFI^{le}

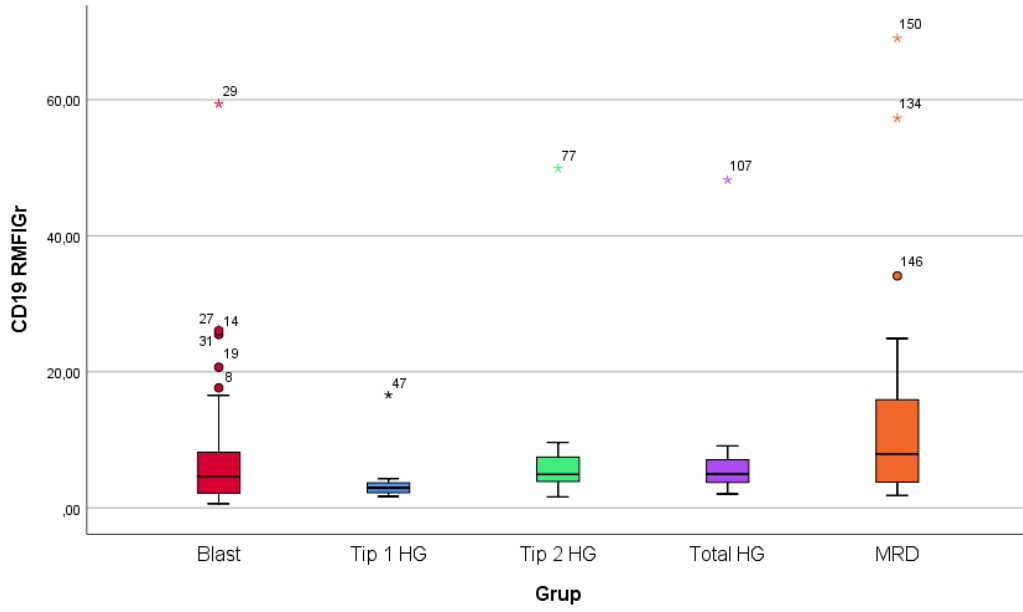
değerleri elde edildi. CD19 antijenine yönelik RMFI oranlarının istatistiksel verileri **Tablo 4.21.**'de gösterilmektedir.

Tablo 4.21. HG, Blast ve MRD hücre gruplarının CD19 RMFI değerleri

CD19			Grup									
			Blast		Tip 1 HG		Tip 2 HG		Total HG		MRD	
			Değer	Std. Hata	Değer	Std. Hata	Değer	Std. Hata	Değer	Std. Hata	Değer	Std. Hata
RMFI ^{Gr}	Ortalama		8.40	1.62	3.43	0.48	6.81	1.54	6.63	1.47	14.24	3.64
	Ortanca		4.66		2.94		4.94		4.97		7.93	
	95% GA	Alt Sınır	5.13		2.45		3.66		3.61		6.69	
		Üst Sınır	11.66		4.40		9.95		9.64		21.79	
RMFI ^{Mo}	Ortalama		5.84	1.20	3.89	0.50	7.82	1.59	7.66	1.52	7.60	1.52
	Ortanca		2.26		3.28		5.66		5.84		6.12	
	95% GA	Alt Sınır	3.42		2.87		4.57		4.55		4.45	
		Üst Sınır	8.27		4.91		11.07		10.77		10.75	
RMFI ^{BLc}	Ortalama		0.87	0.08	.43	0.02	0.75	0.04	0.73	0.03	0.92	0.10
	Ortanca		0.79		.40		0.75		0.71		0.85	
	95% GA	Alt Sınır	0.72		.39		0.68		0.67		0.70	
		Üst Sınır	1.02		.47		0.82		0.79		1.14	
RMFI ^{Tle}	Ortalama		15.78	2.34	3.13	0.16	5.62	0.43	5.51	0.39	11.82	2.13
	Ortanca		9.90		3.14		5.71		5.43		8.34	
	95% GA	Alt Sınır	11.06		2.79		4.75		4.72		7.41	
		Üst Sınır	20.51		3.46		6.50		6.30		16.24	

4.2.5.1. Hücre gruplarının CD19 RMFI^{Gr} değerlerinin karşılaştırılması

İmmatür hücre popülasyonlarının CD19 RMFI^{Gr} değerlerinin dağılımı **Şekil 4.17.**'de gösterilmektedir. CD19 RMFI^{Gr} değeri açısından, incelenen hücre grupları arasında anlamlı fark mevcut olup ($p=0.000$) bu durumun Tip 1 HG-Blast, Tip 1 HG-Tip 2 HG, Tip 1 HG-Total HG, Tip 1 HG-MRD ikili gruplarından kaynaklandığı ($p<0,005$) tespit edildi. Blast-Tip 2 HG, Blast-Total HG, Blast-MRD, Tip 2 HG-Total HG, Tip 2 HG-MRD, Total HG-MRD ikili grupları arasında anlamlı fark bulunmadı. (**Tablo 4.22.**)



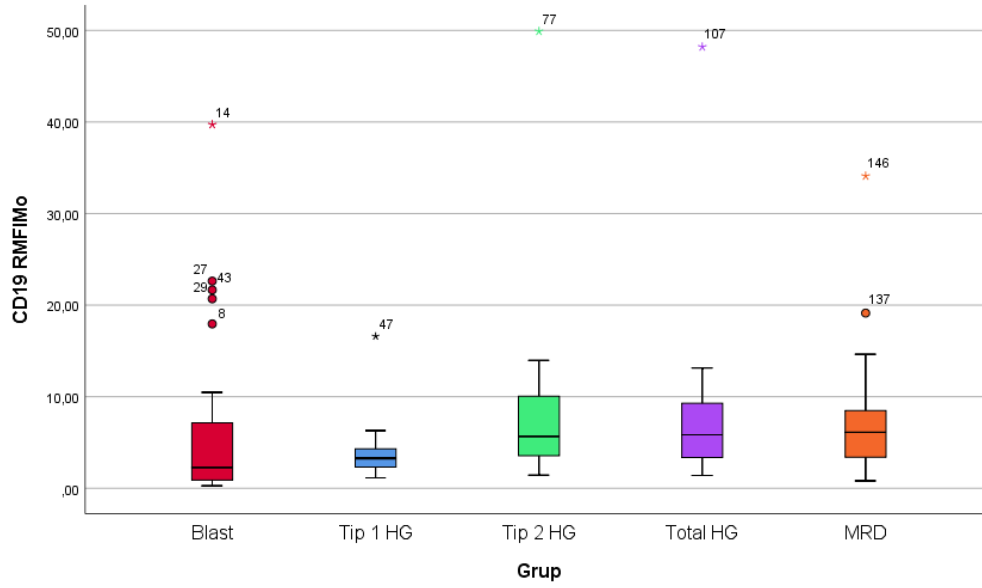
Şekil 4.17. Hücre gruplarının CD19 RMFI^{gr} değerlerinin dağılım grafiği

Tablo 4.22. İkili hücre gruplarının CD19 RMFI^{gr} değerlerinin karşılaştırılması

Sample 1-Sample 2	Test Statistic	Sig.	Adj. Sig. ^a
Tip 1 HG-Blast	10,452	0,001	0,012
Tip 1 HG-Tip 2 HG	17,067	0,000	0,000
Tip 1 HG-Total HG	17,067	0,000	0,000
Tip 1 HG-MRD	10,046	0,002	0,015
Blast-Tip 2 HG	0,010	0,922	1,000
Blast-Total HG	0,010	0,922	1,000
Blast-MRD	3,270	0,071	0,706
Tip 2 HG-Total HG	0,000	1,000	1,000
Tip 2 HG-MRD	0,906	0,341	1,000
Total HG-MRD	2,269	0,132	1,000

4.2.5.2. Hücre gruplarının CD19 RMFI^{mo} değerlerinin karşılaştırılması

İmmatür hücre popülasyonlarının CD19 RMFI^{mo} değerlerinin dağılımı **Şekil 4.18.**'de gösterilmektedir. CD19 RMFI^{mo} değeri açısından, incelenen hücre grupları arasında anlamlı fark mevcut olup ($p=0.000$) bu farkın sadece Tip 1 HG-Tip 2 HG, Tip 1 HG-Total HG ikili gruplarından kaynaklandığı ($p<0,005$) tespit edildi. (**Tablo 4.23.**)



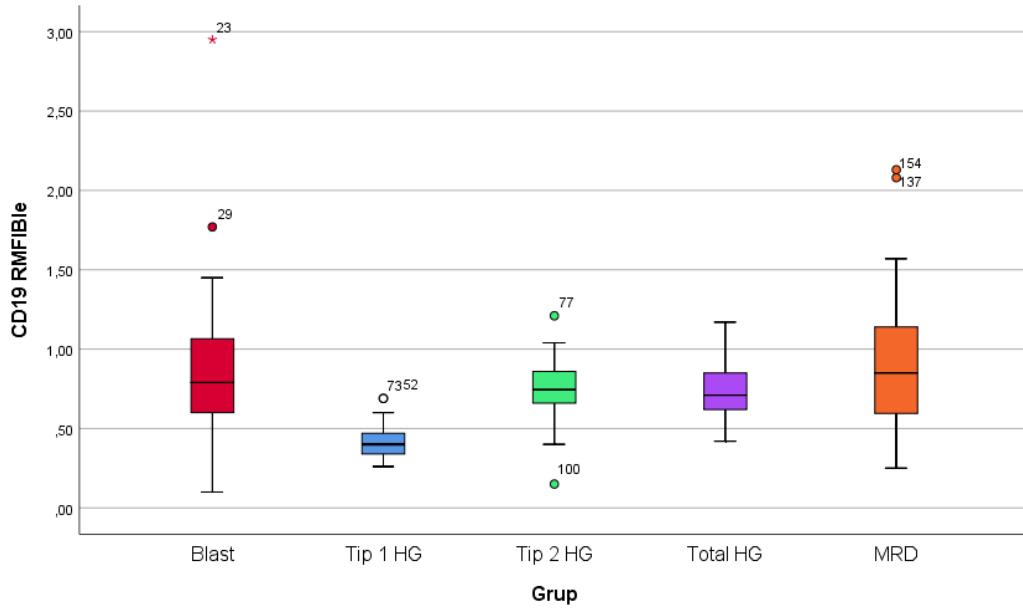
Şekil 4.18. Hücre gruplarının CD19 RMFI^{mo} değerlerinin dağılım grafiği

Tablo 4.23. İkili hücre gruplarının CD19 RMFI^{mo} değerlerinin karşılaştırılması

Sample 1-Sample 2	Test Statistic	Sig.	Adj. Sig. ^a
Blast-Tip 1 HG	0,329	0,566	1,000
Blast-Tip 2 HG	4,004	0,045	0,454
Blast-Total HG	4,004	0,055	0,454
Blast-MRD	3,270	0,071	0,706
Tip 1 HG-Tip 2 HG	6,667	0,010	0,098
Tip 1 HG-Total HG	5,406	0,020	0,201
Tip 1 HG-MRD	4,246	0,039	0,393
Tip 2 HG-Total HG	0,000	1,000	1,000
Tip 2 HG-MRD	0,158	0,691	1,000
Total HG-MRD	0,158	0,691	1,000

4.2.5.3. Hücre gruplarının CD19 RMFI^{ble} değerlerinin karşılaştırılması

İmmatür hücre popülasyonlarının CD19 RMFI^{le} değerlerinin dağılımı **Şekil 4.19.**'da gösterilmektedir. CD19 RMFI^{le} değeri açısından, incelenen hücre grupları arasında anlamlı fark mevcut olup ($p=0.000$) bu farkın Tip 1 HG-Total HG, Tip 1 HG-Tip 2 HG, Tip 1 HG-Blast, Tip 1 HG-MRD ikili gruplarından kaynaklandığı ($p<0,05$) gösterildi. Total HG-Tip 2 HG, Total HG-Blast, Total HG-MRD, Tip 2 HG-Blast, Tip 2 HG-MRD, Blast-MRD ikili grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. (**Tablo 4.24.**)



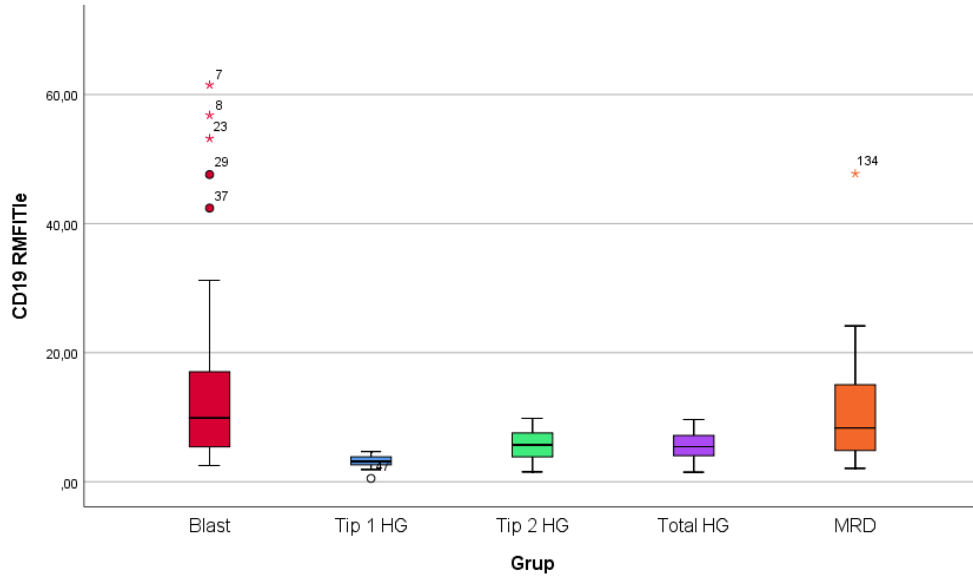
Şekil 4.19. Hücre gruplarının CD19 RMFI^{ble} değerlerinin dağılım grafiği

Tablo 4.24. İkili hücre gruplarının CD19 RMFI^{ble} değerlerinin karşılaştırılması

Sample 1-Sample 2	Test Statistic	Sig.	Adj. Sig. ^a
Tip 1 HG-Total HG	32,267	0,000	0,000
Tip 1 HG-Tip 2 HG	38,400	0,000	0,000
Tip 1 HG-Blast	31,495	0,000	0,000
Tip 1 HG-MRD	18,304	0,000	0,000
Total HG-Tip 2 HG	0,267	0,606	1,000
Total HG-Blast	0,885	0,347	1,000
Total HG-MRD	0,158	0,691	1,000
Tip 2 HG-Blast	0,143	0,705	1,000
Tip 2 HG-MRD	0,158	0,691	1,000
Blast-MRD	0,067	0,796	1,000

4.2.5.4. Hücre gruplarının CD19 RMFI^{tle} değerlerinin karşılaştırılması

İmmatür hücre popülasyonlarının CD19 RMFI^{tle} değerlerinin dağılımı **Şekil 4.20.**'de gösterildi. CD19 RMFI^{tle} değeri açısından, incelenen hücre grupları arasında anlamlı fark mevcut olup ($p=0.000$) MRD-Blast hariç tüm ikili hücre gruplarında ($p<0,005$) tespit edildi. (**Tablo 4.25.**)



Şekil 4.20. Hücre gruplarının CD19 RMFI^{le} değerlerinin dağılım grafiği

Tablo 4.25. İkili hücre gruplarının CD19 RMFI^{le} değerlerinin karşılaştırılması

Sample 1-Sample 2	Test Statistic	Sig.	Adj. Sig. ^a
Tip 1 HG-Total HG	17,067	,000	,000
Tip 1 HG-Tip 2 HG	13,067	,000	,003
Tip 1 HG-MRD	18,304	,000	,000
Tip 1 HG-Blast	49,554	,000	,000
Total HG-Tip 2 HG	,267	,606	1,000
Total HG-MRD	4,246	,039	,393
Total HG-Blast	13,755	,000	,002
Tip 2 HG-MRD	4,246	,039	,393
Tip 2 HG-Blast	9,240	,002	,024
MRD-Blast	,067	,796	1,000

4.2.6. Hücre Gruplarının CD20 RMFI Seviyeleri

Çalışmada incelenen HG vakalarından elde edilen Tip 1 HG, Tip 2 HG ve toplam HG; B-ALL vakalarından elde edilen blast ve MRD vakalarından elde edilen MRD immatür hücre popülasyonlarına ait CD20 MFI değerleri aynı hasta veri dosyasından kapılanan sırasıyla granülosit, monosit, B-lenfosit ve T lenfosit hücre gruplarının MFI değerlerine oranlanarak $RMFI^{gr}$, $RMFI^{mo}$, $RMFI^{ble}$, $RMFI^{tle}$

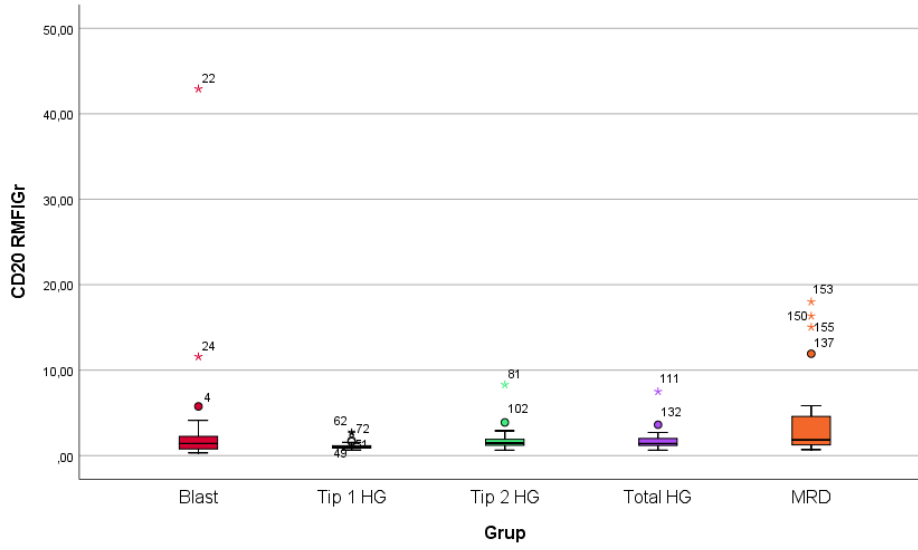
değerleri elde edildi. CD20 antijenine yönelik RMFI oranlarının istatistiksel verileri **Tablo 4.26.**'da gösterilmektedir.

Tablo 4.26. HG, Blast ve MRD hücre gruplarının CD20 RMFI değerleri

CD20			Grup									
			Blast		Tip 1 HG		Tip 2 HG		Total HG		MRD	
			Değer	Std. Hata	Değer	Std. Hata	Değer	Std. Hata	Değer	Std. Hata	Değer	Std. Hata
RMFI ^{Gr}	Ortalama		2.88	1.00	1.13	0.09	1.84	0.25	1.76	0.23	4.54	1.16
	Ortanca		1.42		0.97		1.46		1.42		1.85	
	95% GA	Alt Sınır	0.86		0.95		1.32		1.29		2.12	
		Üst Sınır	4.89		1.32		2.36		2.22		6.96	
RMFI ^{Mo}	Ortalama		2.45	1.00	0.75	0.07	1.15	0.14	1.11	0.13	3.15	0.77
	Ortanca		0.98		0.74		1.06		1.03		1.58	
	95% GA	Alt Sınır	0.44		0.61		0.87		0.85		1.54	
		Üst Sınır	4.47		0.89		1.43		1.37		4.75	
RMFI ^{BL}	Ortalama		0.35	0.11	0.08	0.01	0.12	0.01	0.12	.01	0.43	0.09
	Ortanca		0.11		0.08		0.10		0.10		0.24	
	95% GA	Alt Sınır	0.12		0.07		0.10		0.09		0.25	
		Üst Sınır	0.58		0.10		0.15		0.14		0.61	
RMFI ^{Tle}	Ortalama		3.90	1.06	1.32	.11	2.07	.25	1.98	.23	3.82	0.81
	Ortanca		2.10		1.13		1.67		1.68		1.90	
	95% GA	Alt Sınır	1.75		1.10		1.56		1.52		2.14	
		Üst Sınır	6.04		1.54		2.59		2.44		5.50	

4.2.6.1. Hücre gruplarının CD20 RMFI^{Gr} değerlerinin karşılaştırılması

İmmatür hücre popülasyonlarının CD20 RMFI^{Gr} değerlerinin dağılımı **Şekil 4.21.**'de gösterilmektedir. CD20 RMFI^{Gr} değeri açısından, incelenen hücre grupları arasında anlamlı fark mevcut olup (p=0.000) bu farkın Tip 1 HG-Blast, Tip 1 HG-Total HG, Tip 1 HG-Tip 2 HG, Tip 1 HG-MRD ikili gruplarından kaynaklandığı (p<0,005) tespit edildi. Blast-Total HG, Blast-Tip 2 HG, Blast-MRD, Total HG-Tip 2 HG, Total HG-MRD, Tip 2 HG-MRD ikili grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. (**Tablo 4.27.**)



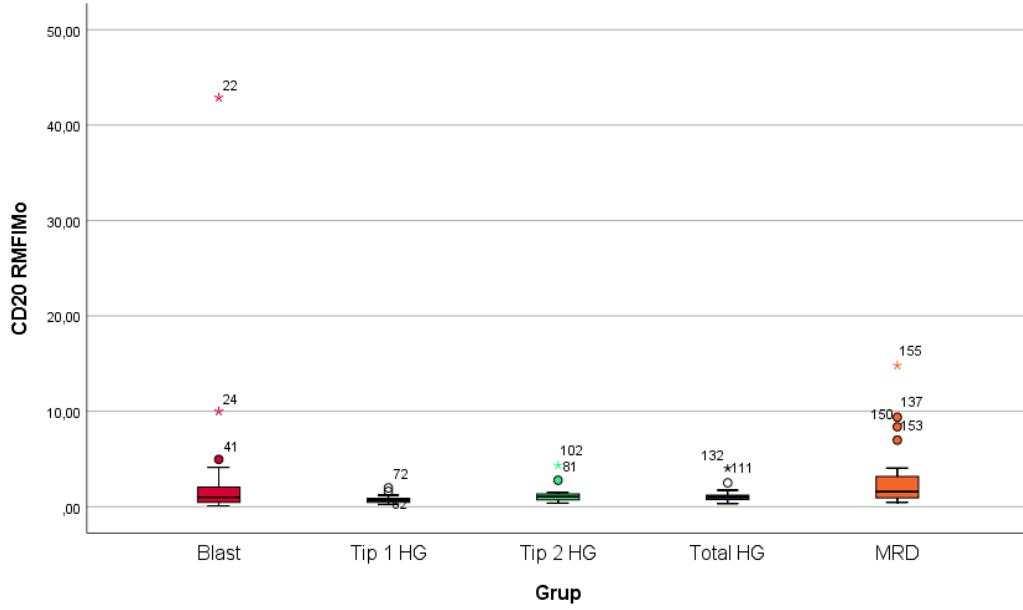
Şekil 4.21. Hücre gruplarının CD20 RMFI^{gr} değerlerinin dağılım grafiği

Tablo 4.27. İkili hücre gruplarının CD20 RMFI^{gr} değerlerinin karşılaştırılması

Sample 1-Sample 2	Test Statistic	Sig.	Adj. Sig. ^a
Tip 1 HG-Blast	5,204	0,023	0,025
Tip 1 HG-Total HG	17,067	0,000	0,000
Tip 1 HG-Tip 2 HG	17,067	0,000	0,000
Tip 1 HG-MRD	11,345	0,001	0,008
Blast-Total HG	0,010	0,922	1,000
Blast-Tip 2 HG	0,329	0,566	1,000
Blast-MRD	0,626	0,429	1,000
Total HG-Tip 2 HG	0,601	0,438	1,000
Total HG-MRD	2,836	0,092	0,922
Tip 2 HG-MRD	0,639	0,424	1,000

4.2.6.2. Hücre gruplarının CD20 RMFI^{mo} değerlerinin karşılaştırılması

İmmatür hücre popülasyonlarının CD20 RMFI^{mo} değerlerinin dağılımı **Şekil 4.22.**'de gösterilmektedir. CD20 RMFI^{mo} değeri açısından, incelenen hücre grupları arasında anlamlı fark mevcut olup ($p=0.000$) bu farkın Tip 1 HG-Total HG, Tip 1 HG-Tip 2 HG, Tip 1 HG-MRD, Blast-MRD, Total HG-MRD, Tip 2 HG-MRD ikili gruplarından kaynaklandığı ($p<0,05$) tespit edildi. Tip 1 HG-Blast, Blast-Total HG, Blast-Tip 2 HG, Total HG-Tip 2 HG ikili grupları arasında anlamlı fark bulunmadı. (**Tablo 4.28.**)



Şekil 4.22. Hücre gruplarının CD20 RMFI^{mo} değerlerinin dağılım grafiği

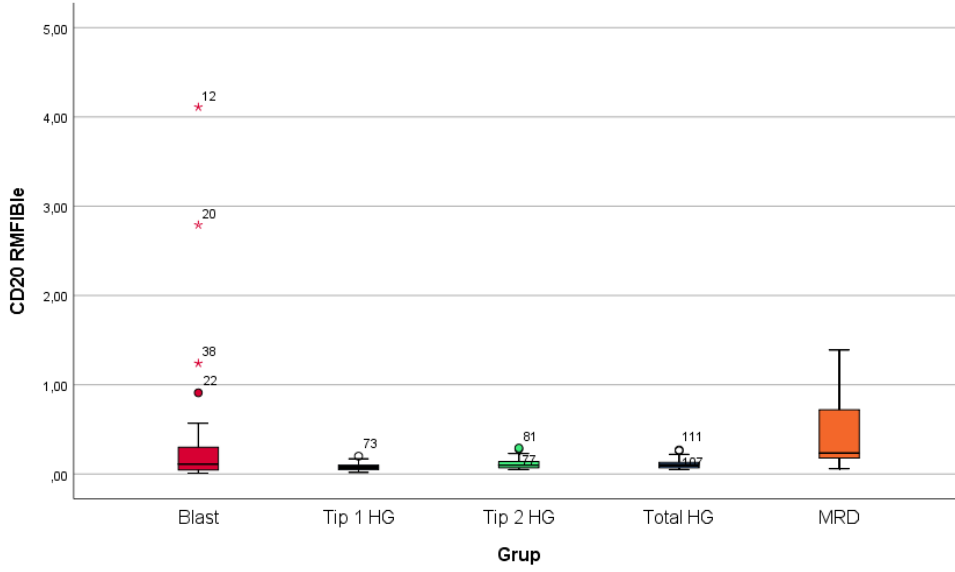
Tablo 4.28. İkili hücre gruplarının CD20 RMFI^{mo} değerlerinin karşılaştırılması

Sample 1-Sample 2	Test Statistic	Sig.	Adj. Sig. ^a
Tip 1 HG-Blast	4,260	0,041	0,710
Tip 1 HG-Total HG	4,267	0,039	0,389
Tip 1 HG-Tip 2 HG	6,667	0,010	0,098
Tip 1 HG-MRD	11,345	0,001	0,008
Blast-Total HG	0,592	0,441	1,000
Blast-Tip 2 HG	0,592	0,441	1,000
Blast-MRD	2,761	0,097	0,966
Total HG-Tip 2 HG	0,267	0,606	1,000
Total HG-MRD	5,042	0,025	0,247
Tip 2 HG-MRD	5,042	0,025	0,247

4.2.6.3. Hücre gruplarının CD20 RMFI^{ble} değerlerinin karşılaştırılması

İmmatür hücre popülasyonlarının CD20 RMFI^{ble} değerlerinin dağılımı **Şekil 4.23.**'de gösterilmektedir. CD20 RMFI^{ble} değeri açısından, incelenen hücre grupları arasında anlamlı fark mevcut olup ($p=0.000$) bu farkın Tip 1 HG-Tip 2 HG, Tip 1 HG-Blast, Tip 1 HG-MRD, Tip 2 HG-MRD, Total HG-MRD, Blast-MRD ikili

gruplarından kaynaklandığı ($p<0,05$) gösterildi. Tip 2 HG-Blast, Total HG-Blast, Tip 2 HG-Total HG ikili grupları arasında anlamlı fark bulunmadı. (Tablo 4.29.)



Şekil 4.23. Hücre gruplarının CD20 RMFI^{ble} değerlerinin dağılım grafiği

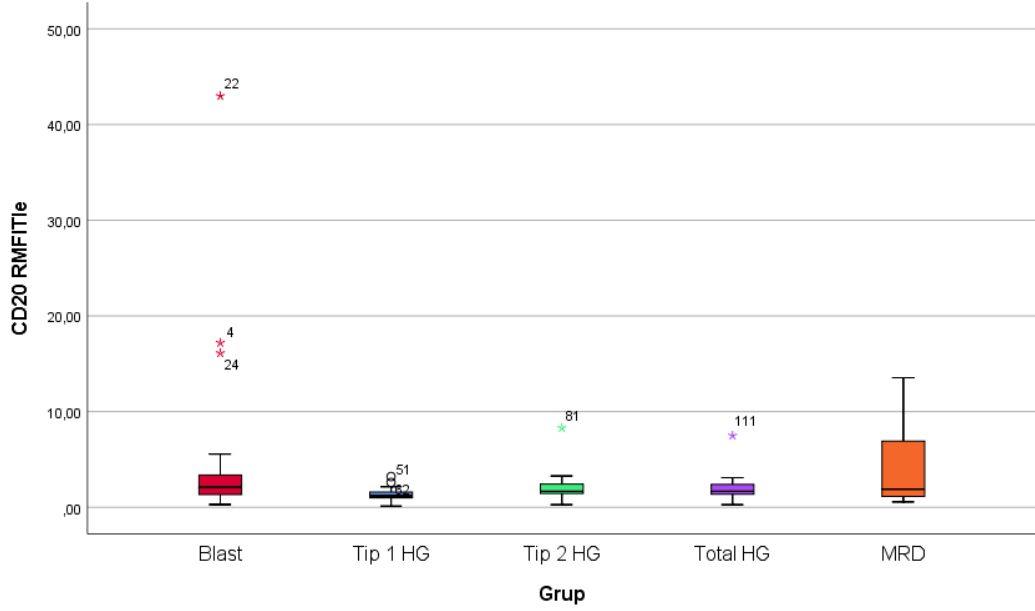
Tablo 4.29. İkili hücre gruplarının CD20 RMFI^{ble} değerlerinin karşılaştırılması

Sample 1-Sample 2	Test Statistic	Sig.	Adj. Sig. ^a
Tip 1 HG-Tip 2 HG	4,344	0,037	0,371
Tip 1 HG-Total HG	3,360	0,067	0,668
Tip 1 HG-Blast	6,572	0,010	0,104
Tip 1 HG-MRD	20,170	0,000	0,000
Tip 2 HG-Blast	0,557	0,455	1,000
Total HG-Blast	1,739	0,187	1,000
Tip 2 HG-Total HG	0,067	0,795	1,000
Tip 2 HG-MRD	11,345	0,001	0,008
Total HG-MRD	14,859	0,000	0,001
Blast-MRD	8,355	0,004	0,038

4.2.6.4. Hücre gruplarının CD20 RMFI^{tle} değerlerinin karşılaştırılması

İmmatür hücre popülasyonlarının CD20 RMFI^{tle} değerlerinin dağılımı Şekil 4.24.'de gösterilmektedir. CD20 RMFI^{tle} değeri açısından, incelenen hücre grupları arasında anlamlı fark mevcut olup ($p=0.000$) bu farkın Tip 1 HG-Tip 2 HG, Tip 1

HG-Total HG, Tip 1 HG-MRD, Tip 1 HG-Blast ikili gruplarından kaynaklandığı (p<0,005) tespit edildi. (Tablo 4.30.)



Şekil 4.24. Hücre gruplarının CD20 RMFI^{tle} değerlerinin dağılım grafiği

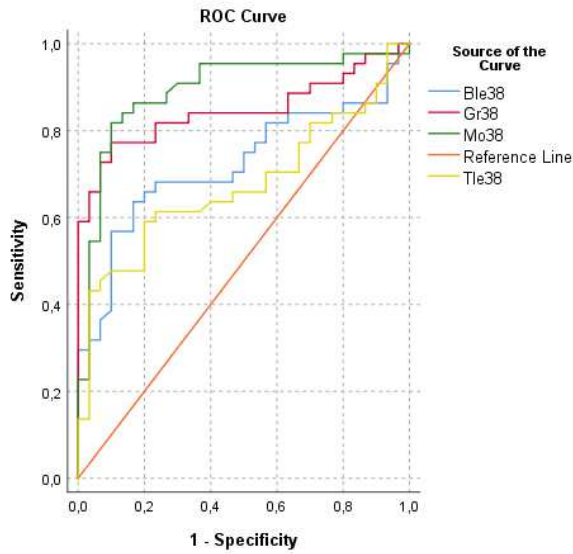
Tablo 4.30. İkili hücre gruplarının CD20 RMFI^{tle} değerlerinin karşılaştırılması

Sample 1-Sample 2	Test Statistic	Sig.	Adj. Sig. ^a
Tip 1 HG-Tip 2 HG	9,600	0,002	0,019
Tip 1 HG-Total HG	9,600	0,002	0,019
Tip 1 HG-MRD	6,175	0,013	0,130
Tip 1 HG-Blast	10,452	0,001	0,012
Tip 2 HG-Total HG	0,067	0,796	1,000
Tip 2 HG-MRD	0,315	0,575	1,000
Tip 2 HG-Blast	3,260	0,071	0,710
Total HG-MRD	0,315	0,575	1,000
Total HG-Blast	3,260	0,071	0,710
MRD-Blast	0,190	0,663	1,000

4.3. Antikor Pozitiflik Sınır Değerlerinin Belirlenmesi

İmmünfenotipik benzerlikleri nedeniyle analiz esnasında lenfoblast popülasyonu ile karışma potansiyeli en yüksek olan hücre grubunun Tip 1 HG olması nedeniyle çalışmada öncelikli olarak CD34+ B-ALL ile Tip 1 HG ayırımına odaklandık. Bu nedenle çalışmada antikor pozitiflik sınır değerlerinin belirlenmesi için CD34+ hastalar seçildi. Blast ve Tip 1 HG popülasyonlarından CD38, CD10, CD45, CD34, CD19, CD20 antikorlarına yönelik oluşturulmuş RMFI^{gr}, RMFI^{mo}, RMFI^{ble}, RMFI^{tle} değerleri ile istatistik paket programı yardımıyla ROC analizi yapıldı. ROC analizi ile RMFI değerlerinden Tip 1 HG-blast ayırımına yönelik eğri altında kalan alan (AUC), pozitiflik sınır değerleri ve bu sınır değerlerine karşılık gelen sensitivite, spesifite değerleri belirlendi. Farklı hücre serilerine ait RMFI değerleri içinde AUC ve sensitivite/spesifite değerleri en yüksek hücre grubu belirlenerek nihai algoritmada kullanıldı.

4.3.1. CD38 RMFI Parametreleri İçin Pozitiflik Sınır Değerlerinin Belirlenmesi



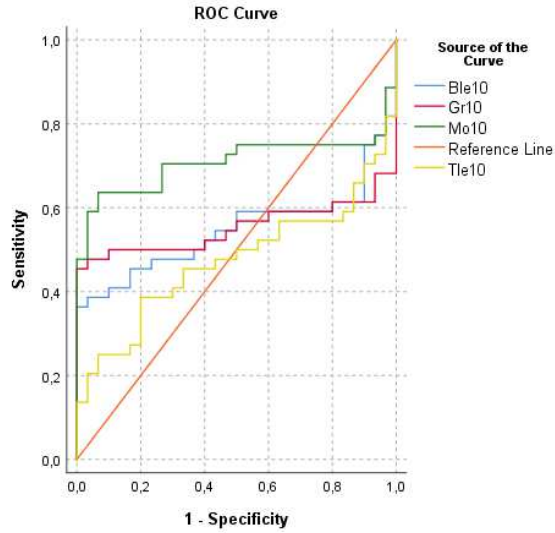
Şekil 4.25. CD38 RMFI^{gr}, RMFI^{mo}, RMFI^{ble}, RMFI^{tle} değişkenleri için ROC eğrisi

Tablo 4.31. CD38 RMFI^{gr}, RMFI^{mo}, RMFI^{ble}, RMFI^{tle} değişkenleri için ROC eğrisi analizi

CD38	AUC(95%)	Cut off	p değeri	Sensitivite	Spesifite
RMFI ^{gr}	0,847	3,96	0,00	0,841	0,667
RMFI ^{mo}	0,892	1,51	0,00	0,864	0,833
RMFI ^{ble}	0,722	2,6200	0,00	0,682	0,767
RMFI ^{tle}	0,673	4,7850	0,005	0,659	0,533

CD38 antikoru için AUC değeri en yüksek olan parametre RMFI^{mo} olarak belirlendi.

4.3.2. CD10 RMFI Parametreleri İçin Pozitiflik Sınır Değerlerinin Belirlenmesi



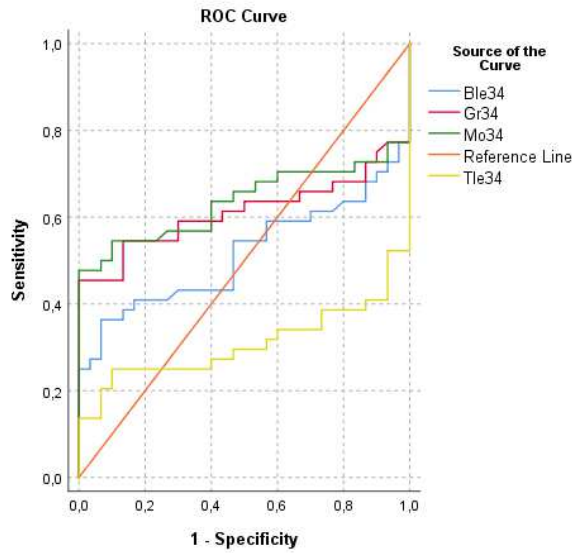
Şekil 4.26. CD10 RMFI^{gr}, RMFI^{mo}, RMFI^{ble}, RMFI^{tle} değişkenleri için ROC eğrisi

Tablo 4.32. CD10 RMFI^{gr}, RMFI^{mo}, RMFI^{ble}, RMFI^{tle} değişkenleri için ROC eğrisi analizi

CD10	AUC(95%)	Cut off	p değeri	Sensitivite	Spesifite
RMFI ^{gr}	0,552		0,460		
RMFI ^{mo}	0,708	14,0150	0,001	0,705	0,700
RMFI ^{ble}	0,546		0,501		
RMFI ^{tle}	0,473		0,694		

CD10 antikoru için AUC değeri en yüksek olan parametre RMFI^{mo} olarak belirlendi.

4.3.3. CD34 RMFI Parametreleri için Pozitiflik Sınır Değerlerinin Belirlenmesi



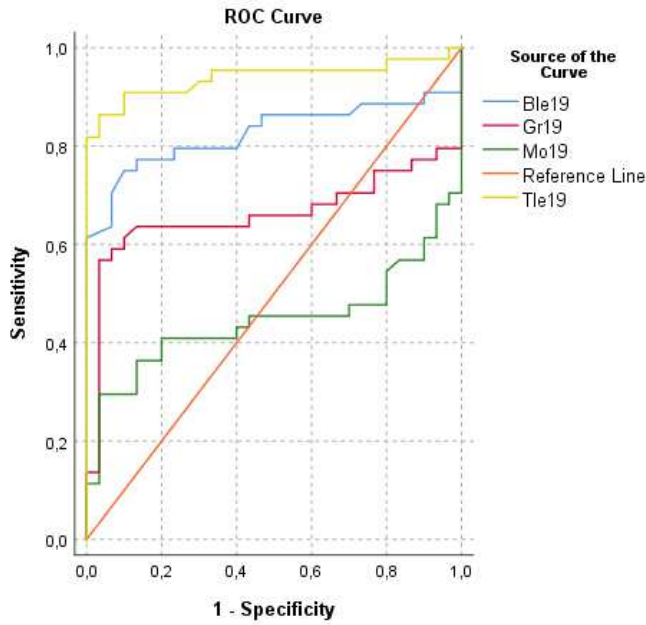
şekil 4.27. CD34 RMFI^{gr}, RMFI^{mo}, RMFI^{ble}, RMFI^{tle} değişkenleri için ROC eğrisi

Tablo 4.33. CD34 RMFI^{gr}, RMFI^{mo}, RMFI^{ble}, RMFI^{tle} değişkenleri için ROC eğrisi analizi

CD34	AUC(95%)	Cut off	p değeri	Sensitivite	Spesifite
RMFI ^{gr}	0,613		0,096		
RMFI ^{mo}	0,636	7,8150	0,041	0,636	0,600
RMFI ^{ble}	0,515		0,823		
RMFI ^{tle}	0,308		0,003		

CD34 antikoru için AUC değeri en yüksek olan parametre RMFI^{mo} olarak belirlendi.

4.3.4. CD19 RMFI Parametreleri İçin Pozitiflik Sınır Değerlerinin Belirlenmesi



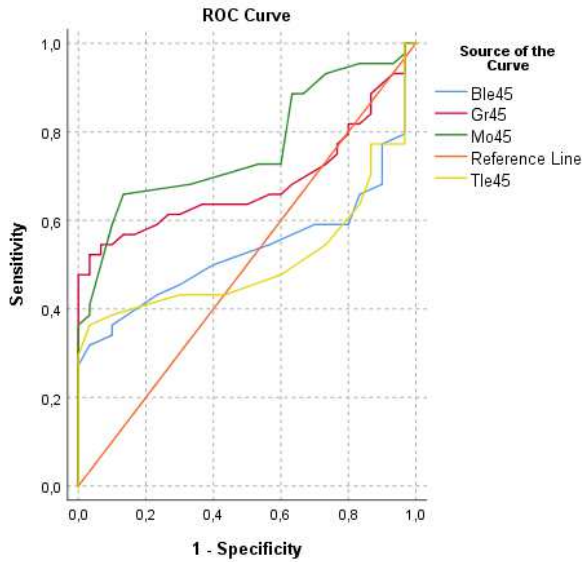
Şekil 4.28. CD19 RMFI^{gr}, RMFI^{mo}, RMFI^{ble}, RMFI^{tle} değişkenleri için ROC eğrisi

Tablo 4.34. CD19 RMFI^{gr}, RMFI^{mo}, RMFI^{ble}, RMFI^{tle} değişkenleri için ROC eğrisi analizi

CD19	AUC(95%)	Cut off	p değeri	Sensitivite	Spesifite
RMFI ^{gr}	0,660	4,100	0,016	0,636	0,867
RMFI ^{mo}	0,446		0,431		
RMFI ^{ble}	0,825	0,475	0,000	0,795	0,767
RMFI ^{tle}	0,940	4,070	0,000	0,909	0,900

CD19 antikoru için AUC değeri en yüksek olan parametre RMFI^{tle} olarak belirlendi.

4.3.5. CD45 RMFI Parametreleri İçin Pozitiflik Sınır Değerlerinin Belirlenmesi



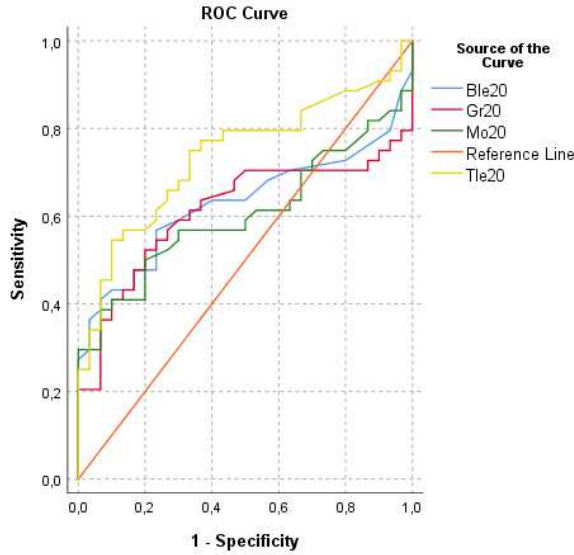
Şekil 4.29. CD45 RMFI^{gr}, RMFI^{mo}, RMFI^{ble}, RMFI^{tle} değişkenleri için ROC eğrisi

Tablo 4.35. CD45 RMFI^{gr}, RMFI^{mo}, RMFI^{ble}, RMFI^{tle} değişkenleri için ROC eğrisi analizi

CD45	AUC(95%)	Cut off	p değeri	Sensitivite	Spesifite
RMFI ^{gr}	0,683	0,4850	0,003	0,636	0,633
RMFI ^{mo}	0,763	0,1550	0,000	0,682	0,667
RMFI ^{ble}	0,535		0,604		
RMFI ^{tle}	0,511		0,869		

CD45 antikoru için AUC değeri en yüksek olan parametre RMFI^{mo} olarak belirlendi.

4.3.6. CD20 RMFI Parametreleri İçin Pozitiflik Sınır Değerlerinin Belirlenmesi



Şekil 4.30. CD20 RMFI^{gr}, RMFI^{mo}, RMFI^{ble}, RMFI^{tle} değişkenleri için ROC eğrisi

Tablo 4.36. CD20 RMFI^{gr}, RMFI^{mo}, RMFI^{ble}, RMFI^{tle} değişkenleri için ROC eğrisi analizi

CD20	AUC (95%)	Cut off	p değeri	Sensitivite	Spesifite
RMFI ^{gr}	0,613		0,092		
RMFI ^{mo}	0,604		0,113		
RMFI ^{ble}	0,630	0,0850	0,047	0,636	0,600
RMFI ^{tle}	0,737	1,2000	0,000	0,773	0,600

CD20 antikoru için AUC değeri en yüksek olan parametre RMFI^{tle} olarak belirlendi.

4.4. Tedavi sonrası antijenik modülasyonun değerlendirilmesi

Çalışmaya dahil edilen 23 hastaya ait aynı hastanın hem tanısal hem de tedavi sonrası takip sürecindeki akım sitometri verilerinden elde edilen blast ve MRD popülasyonları, çalışmaya dahil olan antijenlerin ekspresyon düzeylerini gösteren

RMFI^{Gr}, RMFI^{Mo}, RMFI^{Ble}, RMFI^{Tle} değerleri ile incelendi. Aynı hastanın tanısal akım sitometri analizinde tespit edilen blastların takip sürecinde MRD analizi ile saptanan blastlardan antijen ekspresyonu açısından anlamlı farkı değerlendirmek için Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi uygulandı. Analiz sonucu elde edilen Z skoru ve p değerleri **Tablo 4.37**'da gösterilmektedir. Analiz sonucunda CD45 ekspresyon şiddetinin tedavi ile değişebildiği, diğer antijenlerin rölatif ekspresyon şiddetlerinin ise tedavi ile değişmediği gözlemlendi.

Tablo 4.37. Tedavi sonrası antijenik ekspresyon değişimi

Tedavi Sonrası-Tedavi Öncesi	Z Skoru	Asymp. Sig. (2-tailed)
CD38 RMFI ^{Gr}	-1.612	0.107
CD38 RMFI ^{Mo}	-.682	0.495
CD38 RMFI ^{Ble}	-1.095	0.273
CD38 RMFI ^{Tle}	-1.460	0.144
CD10 RMFI ^{Gr}	-.517	0.605
CD10 RMFI ^{Mo}	-1.110	0.267
CD10 RMFI ^{Ble}	-1.886	0.059
CD10 RMFI ^{Tle}	-.091	0.927
CD34 RMFI ^{Gr}	-.821	0.412
CD34 RMFI ^{Mo}	-1.217	0.224
CD34 RMFI ^{Ble}	-.608	0.543
CD34 RMFI ^{Tle}	-.821	0.412
CD20 RMFI ^{Gr}	-2.062	0.059
CD20 RMFI ^{Mo}	-1.672	0.095
CD20 RMFI ^{Ble}	-.556	0.578
CD20 RMFI ^{Tle}	-.666	0.506
CD19 RMFI ^{Gr}	-2.038	0.042
CD19 RMFI ^{Mo}	-2.068	0.059
CD19 RMFI ^{Ble}	-.167	0.867
CD19 RMFI ^{Tle}	-.852	0.394
CD45 RMFI ^{Gr}	-4.197	0.000
CD45 RMFI ^{Mo}	-4.198	0.000
CD45 RMFI ^{Ble}	-4.197	0.000
CD45 RMFI ^{Tle}	-4.198	0.000

4.5. Pozitiflik sınır değerlerine göre hücre gruplarının dağılımı

ROC analizi ile belirlenen, antikor RMFI parametrelerinin AUC değerlerini göz önüne alarak yüksek AUC gösteren CD19 RMFI^{Tle} ve CD38 RMFI^{Mo} parametreleri HG/Blast ayırımına yönelik en güvenilir parametreler olarak seçildi. ROC analizinde bu parametrelere ait koordinat değerleri ayrıntılı incelenerek en yüksek duyarlılık ve özgüllük gösteren değerler belirlendi ve pozitiflik sınır değerleri

oluşturuldu. Pozitiflik sınır değeri CD19 RMFI^{Tle} için 4,07; CD38 RMFI^{Mo} için 1,51 olarak belirlendi.

Çalışmaya dahil edilen 30 HG popölasyonundan 22'si (%73) her iki pozitiflik sınır değerine uymakta iken 8'i (%27) 2 sınır değerinden sadece 1'ini karşılıyordu. HG olup da her iki sınır değerine de uymayan hiçbir örnek saptanmadı. (Tablo 4.38.)

Tablo 4.38. Belirlenen pozitiflik sınır değerlerine göre HG hücre gruplarının dağılımı

Hematogon(n=30)		CD19 RMFI ^{Tle}	
		<4,07	>4,07
CD38 RMFI ^{Mo}	>1,51	22	3
	<1,51	5	0

Çalışmaya dahil olan 43 blast popölasyonundan 35'i (%81) her iki pozitiflik sınır değerine uymakta iken 8'i (%19) 2 sınır değerinden sadece 1'ini karşılıyordu. Blast hücre grubundan her iki sınır değerine uymayan hiçbir örnek yoktu. (Tablo 4.39.).

Tablo 4.39. Belirlenen pozitiflik sınır değerlerine göre blast hücre gruplarının dağılımı

Blast(n=43)		CD19 RMFI ^{Tle}	
		>4,07	<4,07
CD38 RMFI ^{Mo}	<1,51	35	3
	>1,51	5	0

Çalışmaya dahil olan 22 MRD analizine ait rezidüel blast popölasyonundan 16'sı (%72) her iki pozitiflik sınır değerine uymakta iken 6'sı (%26) 2 sınır değerinden sadece 1'ini karşılıyordu. Blast hücre grubundan her iki sınır değerine uymayan hiçbir örnek yoktu. (Tablo 4.40.)

Tablo 4.40. Belirlenen pozitiflik sınır değerlerine göre rezidüel blast hücre gruplarının dağılımı

Rezidüel Blast(n=22)		CD19 RMFI ^{Tle}	
		>4,07	<4,07
CD38 RMFI ^{Mo}	<1,51	16	3
	>1,51	3	0

5. TARTIŞMA

Akım sitometrik analiz, B-ALL tanı ve takibinin yanı sıra ayırıcı tanılarının desteklenmesi için de hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. HG'ler kemik iliğinin sağlıklı hücresel alt gruplarından ve olgunlaşma aşamasına göre alt gruplara ayrılırlar. HG'ler kemik iliğinde; yaş, genetik özellikler gibi faktörlere bağlı olarak farklı yüzdelerde bulunabilirler. Kronik inflamatuvar hastalıklar, otoimmün veya konjenital sitopeniler, çeşitli enfeksiyonlar ve metabolik hastalıklarda kemik iliği HG yüzdesi artar ve HG'ler morfolojik görünimleri nedeniyle neoplastik hastalıkları taklit edebilir. Bu nedenle morfolojik ve immünofenotipik benzerlikleri nedeniyle neoplastik lenfoblastların, sağlıklı hücre karşılığı olan HG grubundan ayrımı önem teşkil eder [2].

Günümüzde herhangi bir antijenin ekspresyon seviyesinin değerlendirilmesi, negatif kontrol olarak belirlenen referans popülasyonla kıyaslanarak seçilen, referans popülasyondan daha yüksek MFI gösteren popülasyonun yüzdesi şeklinde tanımlanır. Bu yaklaşımda hücre popülasyonu bir bütün olarak değerlendirilemeyebilir. Ayrıca farklı laboratuvarlarda herhangi bir antijen için pozitiflik sınırı farklılık gösterebilmektedir. Antijen ekspresyon seviyesinin "soluk", "dim", "parlak" terimleri ile yarı-kantitatif değerlendirilmesi de günümüz antijen ekspresyon seviyelerinin ifadesinde sıklıkla kullanılan ifade şeklidir. Ancak bu terimlerin kullanımında objektif kriterler belirlenemediğinden analiz sonuçları görecelik içerebilmektedir [26, 82].

Bu çalışmada hücre gruplarının antijen ekspresyonlarını standardize ederek hücre antijen ekspresyon düzeylerini objektif olarak değerlendirebilmeyi amaçladık.

CD38, 45 kilodalton (kDa) ağırlığında olan bir hücre integral membran glikoproteinidir. Asıl olarak öncül B lenfosit, plazma hücresi ve timositlerde eksprese edilir [87]. Aynı zamanda aktive T lenfositler, NK hücreleri myeloblast ve eritroblastlar da eksprese ederler. HG'ler CD38'i gelişim basamaklarının son evresine kadar parlak ve homojen eksprese ederler. Pluripotent kök hücrelerde CD38 eksprese edilmezken, CD34+ hücrelerin %90'ında CD38 ekspresyonu mevcuttur. Lucio ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Tip 1 ile Tip 2 HG arasında CD38 parlaklığı açısından anlamlı fark bulamadıklarını bildirmiştir [88]. Polonya'da blast

ve HG alt tiplerinin antijen ekspresyonlarının kantitatif değeriendirildiği çalışmada Tip 2 HG'nin CD38 ekspresyonunun Tip 1 HG'den yaklaşık 1,5 kat yüksek olduğu bulunmuştur [26]. Biz ise yaptığımız çalışmada CD38 ekspresyonunu derecesini ifade eden RMFI parametrelerinden RMFI^{Gr} ve RMFI^{mo}'yi Tip 2 HG'de anlamlı derecede daha yüksek bulurken, RMFI^{Ble} ve RMFI^{Tle} parametrelerinde iki HG alt grubu arasında anlamlı fark bulamadık.

B-ALL'de lenfoblastların CD38'i pozitif ancak soluk ve heterojen eksprese ettiği bilinmektedir [89]. Lo ve arkadaşları 2016 yılında yaptıkları bir çalışmada HG'lerde CD38 ekspresyonunu, lenfoblastlardan anlamlı derecede daha yüksek bulmuştur [90] Karawajew ve arkadaşları 2015 yılında yaptıkları çalışmada CD38 floresan yoğunluğunu, HG'lerde lenfoblastlardan 6 kat yüksek bulmuşlardır [91]. Coustan-Smith ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada CD38'in ekspresyon kaybının lenfoblastların normal hücreden ayırımında yeterli olmadığını, CD38'in yanına CD97/CD86 gibi başka bir antikorun eklenmesiyle etkili bir ayırma gücüne sahip olduğunu belirtmişlerdir [92]. Seegmiller ve arkadaşlarının 2009 yılında 200 B-ALL vakasında karşılaşılan aberran antijen ekspresyonlarını incelediği çalışmada, vakaların 116'sında CD38'in aberran ekspresyonu görölürken 112'sinde azalmış ekspresyon, 4'ünde ise ekspresyonun olmadığı gösterilmiştir [93]. Irak'ta aberran antijen ekspresyonlarının incelendiği retrospektif bir çalışmada ise vakaların %31'inde CD38'in azalmış ekspresyonu gösterilmiştir [94]. Don ve arkadaşlarının 2020 yılında HG, blast ayırımına yönelik yaptıkları çalışmada HG'lerin CD38 MFI seviyelerinin tutarlı şekilde 2.dekat seviyesinde bulunduğu; B-ALL lösemik blast hücrelerinde ise 2.dekat seviyesinde, üstünde veya altında olabileceği bildirilmiştir [2]. Sedek ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise CD10+ blast'ların CD38 rölatif antijen ekspresyonları, hem Tip 1 HG hem de Tip 2 HG'den anlamlı olarak düşük bulunurken incelenen vakaların %86'sında CD38'in azalmış ekspresyonunun olduğu ifade edilmiştir [26]. Biz de yaptığımız çalışmada literatür bilgisini destekler şekilde; blast popölasyonun CD38 RMFI değerielerini, hem Tip 1 HG hem de toplam HG popölasyonundan anlamlı derecede düşük bulduk.

CD38 RMFI^{Gr}, RMFI^{mo}, RMFI^{Ble} değerieleri HG popölasyonunda Don ve arkadaşlarına [2] benzer şekilde değişkenliği düşük olsa da RMFI^{Tle} değeri diğer parametrelere kıyasla daha yüksek standart hata gösterdiği bulundu. CD38, erken T

lenfositlerde ve CD4+CD8+ T lenfositlerde güçlü şekilde eksprese edilir. Olgun T lenfositler ise zayıf CD38 ekspresyonu gösterirken, mitojenik aktivasyonla birlikte CD38 ekspresyon seviyesi artar [95]. T lenfosit kapısında yer alan ve farklı CD38 ekspresyon düzeyleri gösteren T lenfositler nedeniyle RMFI^{le} değerinin standart hatasının daha yüksek bulunduğu düşünüldü.

CD19, 95 kDa ağırlığında, immünglobulin süperaillesine dahil olan bir transmembran glikoproteindir. Normal ve neoplastik B hücrelerinin yanı sıra foliküler dendritik hücrelerde de eksprese edilir [96]. Çalışmamızda incelediğimiz CD19 RMFI değerleri biraz düşündürücüydü. İdeal şartlar altında granülosit, monosit ve T lenfositler CD19 eksprese etmeyecekleri için oluşturduğumuz RMFI^{gr}, RMFI^{mo}, RMFI^{le} parametrelerinin CD19 için tanımsız olması beklenirdi. Ancak incelediğimiz tüm hasta örneklerinde bu hücre gruplarından floresan yoğunluğu elde ettik ve bunu CD19 için arka plan floresansı olarak değerlendirdik. Antijen eksprese etmediği bilinen hücrelerin pozitif sinyal vererek arka plan floresansı oluşturmalarının 3 ana nedeni vardır ; otofloresans, “spektral overlap” ve istenmeyen antikor bağlanması [97]. Çalışmada tespit ettiğimiz arka plan floresansı, bize hücrelerin ilgili antijene ait ölçülen MFI değerlerinin doğrudan kullanılmasının hata kaynağı olarak karşımıza çıkabileceğini, çalışmamızda oluşturduğumuz RMFI değerleriyle ise bu etkilenmenin daha az olacağını düşündürdü. Ayrıca çalışmamızda incelediğimiz tüm blast ve HG’lere ait CD19 RMFI^{gr}, RMFI^{mo}, RMFI^{le} değerlerinin 1’den büyük olması (yani incelenen bütün immatür hücrelerin CD19 MFI değerlerinin, negatif hücrelerin CD19 MFI değerinden fazla olması) incelediğimiz tüm immatür hücre popülasyonlarının CD19 antijenlerine sahip olduklarını doğrularken aynı zamanda elde ettiğimiz RMFI değerleri ile bu hücrelerin CD19 ekspresyonlarını dolaylı yoldan gösteren kantitatif veriler elde ettik.

CD19’un hücre yüzeyindeki yoğunluğu B hücre gelişimi ile paralel şekilde artıp, plazma hücresine ileri farklılaşırken antijen ekspresyon kaybı görülür [88, 98]. Babusikova ve arkadaşlarının 2005 yılında 16 kemik iliği numunesi ile HG alt tiplerinin floresan yoğunluklarının kantitatif olarak değerlendirildiği çalışmada Tip 2 HG’de CD19’u eksprese eden molekül sayısının (MESF) Tip 1 HG’den anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur [99]. Biz de tüm CD19 RMFI parametrelerinde

Tip 2 HG'yi Tip 1 HG'den yüksek bularak olgunlaşma sürecinde B lenfositlerin CD19 ekspresyon seviyelerinin arttığı bilgisini destekledik.

Seegmiller ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları çalışmada incelenen 200 B-ALL vakasının 35'inin (%17) CD19'un aberran ekspresyonu gösterdiği ve bunların 32'sinin azalmış, 3'ünün artmış CD19 ekspresyonu olduğu bildirilmiştir [93]. Farsani ve Rego yaptıkları çalışmalarda HG ve blast arasında CD19 ekspresyonları açısından anlamlı fark tespit etmezken [100, 101], Farahat ve arkadaşlarının yaptığı kantitatif akım sitometri çalışmasında B-ALL lenfoblast hücrelerinin HG'lerden daha az CD19 ekspresyon gösterdiği bildirilmiştir [102]. Mckenna ve arkadaşları ise inceledikleri 49 B-ALL hastasının %18'inde blastlarda azalmış CD19 ekspresyonu göstermişlerdir [76]. Çalışmamızda blast grubu ile toplam HG grubu arasında CD19 RMFI^{Gr} RMFI^{Mo} RMFI^{Ble} açısından anlamlı fark bulmazken, literatürden farklı olarak CD19 RMFI^{Tle}'yi blastlarda toplam HG'ye göre anlamlı derecede yüksek bulduk. İmmünofenotipik profil açısından blastlarla daha çok karışabileceği düşünülen Tip 1 HG ise RMFI^{Gr}, RMFI^{Ble}, RMFI^{Tle} parametreleri açısından blastlardan daha düşük CD19 ekspresyonu göstermekteydi.

Literatürde yer alan hasta bazlı çalışmalarda sık olmamakla birlikte CD19'un daha çok azalmış ekspresyon gösterdiği bilgisi yer almakla birlikte bu çalışmalar blastları tüm HG spektrumu ile kıyaslamaktaydı. Bu çalışmada ise biz CD19 ekspresyonunu Tip 1 HG'ye kıyaslayarak blastlarda daha yüksek eksprese edildiğini bulduk. HG popülasyonunun daha küçük bir kısmını oluşturan Tip 1 HG, Toplam HG popülasyonunun MFI değerine Tip 2 HG kadar etki etmese de sıklıkla görülen Common B-ALL, Pre-B ALL gibi daha öncül hücrelerden köken alan lösemilerin MRD analizinde lenfoblastlarla daha kolay karışabilecek hücre grubudur. Bu açıdan immünofenotipik benzer iki hücre grubunu ayırmada CD19 antijen ekspresyonu tek başına yararlı bir parametre olabilir.

'Leukocyte Common Antigen' olarak da bilinen CD45, glikoprotein yapısında olan bir tirozin fosfatazdır ve hücrenin aktivasyon düzeyine göre farklı izoformları bulunur [103]. Platelet, eritrosit ve eritroid seriye ait diğer elementler hariç olgun/immatür tüm hematopoetik hücrelerde eksprese edilir. CD45'in en zayıf eksprese edildiği totipotent kök hücre döneminden sonra B lenfosit olgunlaşma

dönemi süresince antijen ekspresyonunu artırırken; eritroid ve megakaryositik olgunlaşma yolağında giderek azalır [104]. Lucio ve arkadaşları 38 sağlıklı kemik iliğinde HG alt tiplerinin incelediği bir çalışmada Tip 2 HG’de Tip 1 HG’ye göre daha parlak CD45 antijen ekspresyonu olduğunu bildirmişlerdir [88]. Babiskova ve arkadaşları Tip 2 HG’de CD45 MESF değerini Tip 1 HG’den daha yüksek bulmuştur [99]. Sedek ve arkadaşları da maturasyon aşamasına paralel sağlıklı öncül B hücrelerin CD45 ekspresyonunu arttığını göstermişlerdir [26]. Biz de çalışmamızda literatüre uyumlu şekilde, CD45 antijen ekspresyonunu gösteren tüm RMFI parametrelerinde Tip 2 HG’yi Tip 1 HG’den yüksek bulduk.

B hücreli lenfoblastların CD45 ekspresyonunun HG’lerden daha düşük olduğu iyi bilinmektedir [89]. Çeşitli çalışmalarda, B hücreli neoplastik hastalıklardaki blastik CD45 yoğunluğunun sağlıklı immatür B hücrelerin CD45 yoğunluğuna benzer, olgun lenfositlerden ise düşük olduğu belirtilmiştir [105, 106]. Seegmiller ve arkadaşlarının B-ALL vakalarındaki aberran fenotipleri inceledikleri çalışmada 200 B-ALL hastasının 132’sinde negatif veya azalmış CD45 ekspresyonu bulunurken, çocuk popülasyonunda azalmış CD45 ekspresyonunun daha sık olduğunu gösterilmiştir [93]. Sedek ve arkadaşları ise CD10+ blastlarda CD45 ekspresyonunu Tip 1 HG’den daha düşük bulurken, inceledikleri hastaların %66,7’sinde azalmış CD45 ekspresyonunu göstermişlerdir[26]. Literatüre uyumlu olarak çalışmamızda hesapladığımız tüm CD45 RMFI parametrelerinde blast popülasyonu toplam HG popülasyonundan daha düşük değere sahipti.

CD10, “Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen” (CALLA) olarak da bilinen, 100 kDa hücre yüzey metalloproteazıdır. Normalde HG’lerde, germinal merkezdeki B hücrelerinde ve bazı timosit alt tiplerinde eksprese edilir. Ayrıca olgun nötrofillerde eksprese edilirken, bazofil, eozinofil ve bant hücrelerinde eksprese edilmezler. CD 10, hematopoetik sistemde, inhibitör propeptitlerin aktivasyonu ve uyarıcı peptitlerin inaktivasyonu yoluyla B hücresi proliferasyonunu düzenlenmesine aracılık eder [2, 107]. CD10, erken HG’lerde parlak eksprese edilirken olgunlaşma aşamasına paralel yoğunluğu azalmaktadır. Ancak HG’nin en erken aşamalarında eksprese edilmeyebilir. Çalışmamız Babiskova [99] ve Sedek’in [26] kantitatif çalışmalarına benzer şekilde, tüm CD10 RMFI parametrelerinde Tip 1 HG’de Tip 2 HG’den daha yüksek değer elde edildi.

B-ALL vakalarının yaklaşık %90'ında CD10 eksprese edilir. MRD analizinde diğer immaturite belirteçleriyle birlikte değerlendirilirken yararlı olmasının yanı sıra, lösemik lenfoblastlarda herhangi bir HG grubundan daha parlak eksprese olabilmesi CD10'un tek başına tanısal belirteç olarak kullanılabileceği belirtilmiştir [89]. Polonya'da 125 çocuk B-ALL hastasıyla gerçekleştirilen çalışmada CD10+ blastların CD10 ekspresyonunu Tip 1 HG'den anlamlı derecede yüksek bulurken, hastaların %57,9'unda artmış CD10 ekspresyonu göstermişler. Brezilya'da gerçekleştirilen kantitatif akım sitometri çalışmasında ise çalışmada ise hem yetişkin hem çocuk CD10+ B-ALL hastalarında, lenfoblastların CD10 spesifik antikor bağlanma kapasitesini sağlıklı öncül hücrelere karşı anlamlı derecede yüksek bulmuşlar [101]. McKenna ve ark. inceledikleri 49 B-ALL hastasının %57'sinde [76], Seegmiller ve ark. inceledikleri 119 çocuk hastanın 92'sinde (%77) artmış CD10 ekspresyonu bulmuşlardır [93]. Biz ise çalışmamızda literatürden farklı olarak CD10 ekspresyonu açısından değerlendirdiğimiz hiçbir RMFI parametresinde Tip 1 HG ile blast grubu arasında anlamlı fark bulmadık. Blast Toplam HG popülasyonu arasında ise RMFI^{Gr} ve RMFI^{mo} parametrelerinde anlamlı fark yok iken, RMFI^{ble} ve RMFI^{tle} parametrelerini blast popülasyonunda anlamlı derecede yüksek bulduk.

CD20; 33-37 kDa ağırlığında 11. Kromozomun uzun kolundaki MS4A1 geni tarafından kodlanan transmembran proteindir [107]. Aynı zamanda alfa ve beta T lenfosit alt grupları da CD20'yi zayıf eksprese ederler. Pediatrik popülasyonda CD20 ekspresyonunun translokasyon t(4;11) ile ilişkili olduğu; CD20 azalan ekspresyonu veya negatifliğinin ise t(12;21) ile ilişkili olduğu bulunmuştur [107]. HG'lerde negatiften parlak pozitif kadar geniş bir yelpazede eksprese olması MRD analizinde açılan histogramlarda başka bir antijenle birlikte değerlendirilirken kullanılmasına imkan sağlar.

Çalışmamızda Sedek ve Babusikova'nın sonuçlarına benzer şekilde incelediğimiz tüm parametreler açısından CD20 ekspresyonunu Tip 2 HG'da Tip 1 HG'dan yüksek bulduk [26, 99]. B hücre gelişim aşamasına paralel CD20 ekspresyonu arttığından dolayı Tip 2 HG da CD20 ekspresyonunun anlamlı derecede yüksek olması beklediğimiz bir sonuçtu.

Çalışmamızda oluşturduğumuz RMFI parametrelerine göre CD20 antijen ekspresyonu açısından blastların toplam HG popülasyonu arasında fark yok iken, blastlar Tip 1 HG'den anlamlı derecede daha yüksek antijen ekspresyonuna sahipti. Çalışmamız bu açıdan, inceledikleri 114 B-ALL hastasına ait lenfoblastın Tip 1 HG'ye kıyasla %42'sinde artmış ekspresyon, %58'inde benzer ekspresyon gösterirken hiçbir blast hücresinde azalmış CD20 ekspresyonu göstermediğini bildiren Sedek'in çalışmasını destekler nitelikteydi [26].

CD34; 105-120 kDa ağırlığında olup 1. kromozomun uzun kolunda yer alan bir gen tarafından kodlanır. İmmatür hematopoetik hücrelerin yanı sıra pek çok farklı hücre tarafından da eksprese edilir. Pediatrik popülasyon B-ALL vakalarında CD34 ekspresyonunun iyi prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir.

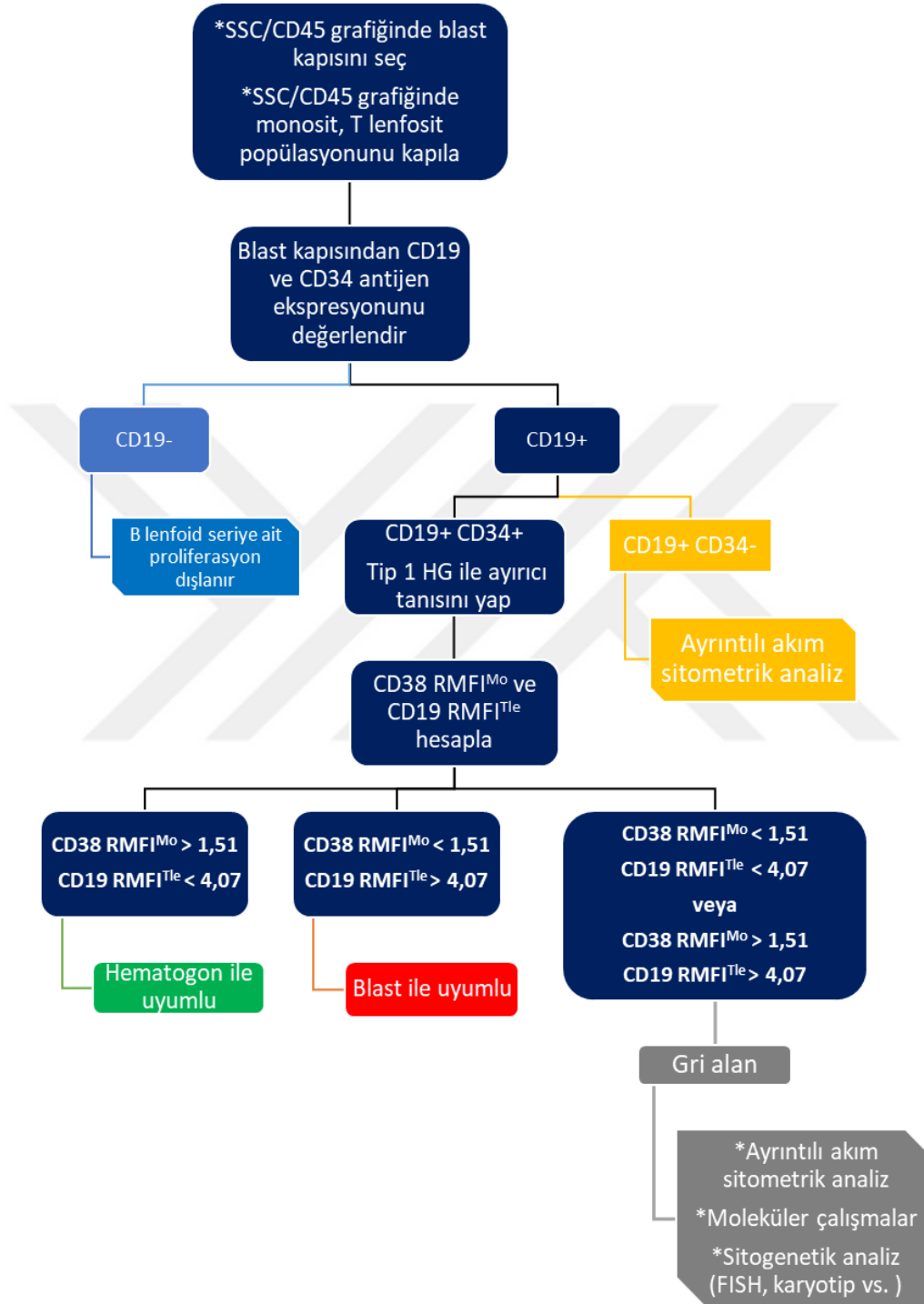
Slovakya'da gerçekleştirilen çalışmada CD34 ekspresyonu açısından Tip 1 HG'un MESF değerinin Tip 2 HG'dan anlamlı derecede yüksek bulmuşlar. Farsani ve arkadaşları TdT ve CD34'ün sadece erken HG aşamalarında tespit edildiğini bildirmişler. Literatür ile uyumlu şekilde çalışmamızda incelediğimiz tüm CD34 RMFI parametrelerinde Tip 1 HG'de Tip 2 HG'den daha yüksek bulduk. Çalışmamızı oluştururken HG popülasyonlarını CD34'ün kalitatif ekspresyon derecesine göre kapılayarak oluşturduğumuz için bizim için beklenen bir sonuç oldu.

Sedek ve arkadaşları inceledikleri 114 CD10+ B-ALL hastasının %62'sinde azalan ekspresyon, %23'ünde artmış ekspresyon gösterdiğini bildirmişler. McKenna ve arkadaşları inceledikleri 49 B-ALL hastasına aberran antijen eksikliğini inceledikleri çalışmada, hastaların %86'sında tek tip veya devamlı ekspresyon spektrumu gösterdiğini bildirmişler. Babusikova ve arkadaşları inceledikleri 16 kemik iliği numunesinde lenfoblastların MESF değerinin Tip 1 HG'dan anlamlı derecede düşük bulmuşlar. Seegmiller ve arkadaşları inceledikleri 139 çocuk B-ALL hastasının 122'sinde CD34 aberran antijen ekspresyonu gösterirken bunların 70'inde tek tip ekspresyon 19'unda negatif ekspresyon, 33'ünde ise anormal spektrum tespit etmişler. Brezilya'da 12 sağlıklı ve 29 B-ALL hasta çocuğun değerlendirildiği çalışmada CD34 spesifik antikor bağlanma kapasiteleri arasında fark bulamamışlar. Biz ise çalışmamızda toplam HG popülasyonuna kıyasla Blast popülasyonunun tüm CD34 RMFI değerlerini daha yüksek bulduk. CD34 eksprese etmeyen Tip 2 HG

popülasyonu, toplam HG popülasyonunun büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Bundan dolayı blast popülasyonunun daha yüksek CD34 RMFI değerleri elde etmemiz beklenen bir durumdur. Çalışmamızda Tip 1 HG ile blast popülasyonu arasında hiçbir CD34 RMFI parametresi açısından fark olmadığından bu iki hücre popülasyonunun benzer antijen ekspresyonu gösterdiğini düşünüldü.

Çalışmamızda benzer immünofenotipik özellik gösteren Tip 1 HG ile CD34+ neoplastik lenfoblastların RMFI parametreleri açısından ayırımına yönelik ROC analizi gerçekleştirildi. Antikor RMFI parametrelerinin AUC değerlerini göz önüne alarak yüksek AUC gösteren CD19 RMFI^{Tle} ve CD38 RMFI^{Mo} parametreleri HG/Blast ayırımına yönelik en güvenilir parametreler olarak seçildi. ROC analizinde bu parametrelere ait koordinat değerleri ayrıntılı incelenerek en yüksek duyarlılık ve özgüllük gösteren değerler belirlendi ve pozitiflik sınır değerleri oluşturuldu. Pozitiflik sınır değeri CD19 RMFI^{Tle} için 4,07; CD38 RMFI^{Mo} için 1,51 olarak belirlendi.

Çalışmamızda tek bir belirtecin blast-HG ayırımında yeterli olmadığını bulduk. Bu sebeple en yüksek duyarlılık ve özgüllük gösteren iki parametremizi dahil ederek akım sitometrik analizde HG-blast ayırımını gerçekleştirmeye yönelik uzmanlara yardımcı olabilecek bir algoritma oluşturduk (**Şekil 5.1.**). Algoritmaya normal/neoplastik blastları kapılamak için ilk olarak Borowitz ve Stelzer tarafından önerildiği şekilde SSc/CD45 grafiğini kullanarak başladık[108, 109]. Ancak farklı hücre gruplarının blast kapısına düşebileceği gibi, blastların da blast kapısı dışındaki bölgelere de düşebileceği unutulmamalıdır [110]. Blast popülasyonuna ait soy antijeni olarak, pozitiflik sınır değerini oluştururken de kullandığımız CD19'u seçtik. B hücre gelişiminin en erken aşamalarından itibaren eksprese edilen CD19, tüm gelişim aşamalarında ve son farklılaşma basamağı olan plazma hücrelerinde de eksprese edildiği için Pan-B belirteci olarak da adlandırılır ve lösemi tanısı, sınıflandırmasının yanı sıra B-ALL rezidüel hastalık takibinde birincil kapılama için kullanılan belirteçtir [111]. Ancak analiz sırasında literatürde de yer alan CD19- B-ALL hastalarının olabileceği unutulmamalı ve özellikle anti CD 19 immünoterapi alan hastaların yanlış yoruma açık olduğundan, analizlerinde daha dikkatli olunmalıdır [111, 112].



Şekil 5.1. Hematogon/Blast ayırımına yönelik geliştirilen algoritma

B-ALL’de neoplastik lenfoblastlar, köken aldığı olgunlaşma aşamasındaki öncül B hücrelerine benzemekle birlikte farklılık gösteren immünofenotipik özelliklerinin araştırılması akım sitometrik analizin temel yapıtaşını oluşturur. Olgunlaşma aşamasına göre sınıflandırılan HG’lerde Tip 1 HG CD34+ olması ile kalan HG grubundan ayrılır [82]. CD34 ekspresyonu olan hastalardan oluşturduğumuz algoritma, immünofenotipik benzerlik gösteren blastlar ile Tip 1 HG ayrımı üzerine kuruluydu. Bundan dolayı algoritmanın devamında blast kapısında yer alan hücrelerin CD34 ekspresyonlarının kalitatif değerlendirilmesini öneriyoruz. CD34 eksprese ettiği tespit edilen immatür hücre grubu için CD19 RMFI^{Te} ve CD38 RMFI^{Mo} değerleri hesaplanarak, çalışma sonucu elde ettiğimiz pozitiflik sınır değerlerinin her ikisine de uyan hücre grubunda blast/HG ayrımı güvenle yapılabileceğini düşünüyoruz. Ancak ilgili parametreler uyumsuz ise ayrıntılı akım sitometrik analiz yapılmasını veya moleküler, sitogenetik çalışmalar ile blast/HG ayrımının sağlanmasını öneriyoruz.

Literatürde B-ALL hastalarının immünofenotipik profillerinin değerlendirildiği çeşitli çalışmalar mevcuttur. Çin’de 183 B-ALL hastasının değerlendirildiği çalışmada hastaların %75’inin [113], Hindistan’da 334 B-ALL hastasının incelendiği çalışmada hastaların %81’inin [114], Hindistan’da yapılan başka bir çalışmada hastaların %70’inin [115] CD34 antijeni eksprese ettiği ve bu hastaların daha sıklıkla Pro-B ALL ve Common-B ALL olduğu bildirilmiştir. Bu bilgiye paralel, oluşturduğumuz algoritma CD34+ blastları HG’lerden güvenli bir şekilde ayırarak daha sıklıkla Pro-B ALL ve Common-B ALL’nin tanısı ve/veya ayırıcı tanısında kullanışlı olacaktır. Pre-B ALL ve Olgun B-ALL’de ise olgunlaşmanın daha geç basamaklarından köken alan blastların antijen ekspresyon derecelerinin değişebileceğinden dolayı oluşturduğumuz sınır değerlerinin bu hastalar için geçerli olmayabilir. Bu sebeple CD34 eksprese etmeyen hastalar için ayrıntılı akım sitometrik analiz yapılmasını ve ileride yapılacak çalışmalar ile CD34-lenfoblastların ayrımına yönelik sınır değerlerin oluşturulmasını öneriyoruz.

MRD değerlendirilmesi hasta risk sınıflaması yapılmasının yanı sıra hastaya uygun tedavi protokolünün seçilmesinin temel aşamalarından biridir [59]. Moleküler

yönteme kıyasla daha ucuz ve hızlı değerlendirme fırsatı olması MRD analizinde çok renkli akım sitometri yöntemini ön plana çıkarmıştır. Son yıllarda gerçekleştirilen standardizasyon çalışmalarıyla akım sitometrik MRD analizinin hassasiyeti moleküler yöntemlere yaklaşmaktadır. Tedavi ilişkili immünofenotipik modülasyon MRD analizini engelleyebilecek bir unsurdur [116]. Tedavi ilişkili lösemik blastlardaki antijenik ekspresyon değişimi ile ilgili literatürde çok sayıda çalışma mevcuttur [116-119]. Burnusov ve arkadaşları 2016 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada, tedavi sonrası CD10, CD19 ve CD34'te azalmış ekspresyon CD20'de artmış ekspresyon gözlerken, CD38 ve CD45'te anlamlı değişiklik bulmadıklarını bildirmişler [116]. Dworzak ve arkadaşları, CD10 ve CD34 ekspresyonunu tedavi sonrası 33. Güne kadar anlamlı derecede düşüşünü bulurken 78. Güne kadar eski seviyesine döndüğünü; CD20 ve CD45 ekspresyonunun 15 ila 33. Günler arasında anlamlı artış gösterdiğini, CD34'ün ise değişken olduğunu bulmuşlar [117]. Polonya'da 78 çocuk hastada antijen ekspresyon değişimlerinin incelendiği bir çalışmada en sık gözlenen değişiklikler CD10, CD19 ve CD34'ün azalan CD45, CD20 ve CD11a'nın artan modülasyonu olarak bildirmişler[118]. Yaptığımız çalışmada tedavi sonrası antijenik değişimi literatürden farklı olarak sadece CD45 üzerinde bulurken; CD10, CD19, CD20, CD34, CD38'in antijenik ekspresyonu açısından rezidüel hücre ile tanı anındaki blast anında fark bulmadık. Literatürden farklı sonuç bulmamız, hastaların tedavi sonrası MRD değerlendirme günlerinin farklı olmasından kaynaklanabilir. Oluşturduğumuz parametrelerde CD19 RMFI^{Tle} ve CD38 RMFI^{Mo} için tedavi sonrası anlamlı fark bulmadığımızdan dolayı oluşturduğumuz algoritmadaki pozitiflik sınır değerlerinin MRD analizinde de kullanışlı olabileceğini düşünüyoruz. Ancak analiz esnasında CD45 ekspresyonunun değişebileceği akılda tutulmalıdır. İleride yapılacak benzer çalışmalarda MRD analiz zamanlarının ve tedavi protokollerinin standartlaştırılmasının yararlı olabileceğini düşünüyoruz.

6. SONUÇLAR

1- Sağlıklı öncül B hücreleri, immünofenotipik benzerlikleri nedeniyle akım sitometrik analizde neoplastik lenfoblastlarla karışabilmektedir. B-ALL'nin ayırıcı tanısında veya takip edilen B-ALL tanılı hastalardaki MRD analizinde bu iki hücre grubunun ayrımının doğru yapılabilmesi önemlidir. Blast ve HG popülasyonu gösterdikleri antijen ekspresyon yoğunlukları ile ayrımı yapılabilir. Günümüzde sıklıkla herhangi bir antijenin ekspresyon seviyesinin değerlendirilmesi, negatif kontrol olarak belirlenen referans popülasyonla kıyaslanarak kalitatif olarak yapılmaktadır. Ancak antijen ekspresyonu derecesinin kantitatif göstergesi olan floresans yoğunluğu arka plan floresansı, non-spesifik bağlanma gibi çeşitli nedenlerden etkilenerek floresans yoğunluğunun farklı analizler arasında karşılaştırılabilirliğini sınırlamaktadır. Bu durumun çözümü için, ilgilendiğimiz hücre popülasyonunu sağlıklı hücre gruplarına oranlayarak, karşılaştırılabilir kantitatif değerler elde ettik.

2- Çalışmamızda oluşturduğumuz RMFI parametreleri açısından Tip 1 HG'da Tip 2 HG'ye göre CD10 ve CD34 anlamlı derecede yüksek; CD19, CD20 ve CD45 anlamlı derecede düşük bulundu.

3- Çalışmamızda oluşturduğumuz RMFI parametreleri açısından neoplastik lenfoblastlar, Tip 1 HG popülasyonuna göre CD19 ve CD20'yi anlamlı derecede yüksek, CD38'i ise düşük eksprese ederken, CD10 ve CD34 ekspresyonu için anlamlı fark bulunmadı.

4- Oluşturduğumuz RMFI parametreleri açısından neoplastik lenfoblastlar, toplam HG popülasyonuna göre CD38 ve CD45'i anlamlı derecede düşük eksprese ederken, CD10 ve CD19 ekspresyonu için anlamlı fark bulunmadı.

5- Çalışmamızda blast/HG ayırma yönelik en güvenilir iki parametreyi CD19 RMFI^{Tle} ve CD38 RMFI^{Mo} olarak bulduk. Bu iki parametreye ait en yüksek duyarlılık ve özgüllüğün elde edildiği pozitiflik sınır değerleri CD19 RMFI^{Tle} için

4,07; CD38 RMFI^{Mo} için 1,51 olarak belirlendi. Bu pozitiflik sınır değerleri ile akım sitometrik analizde HG-blast ayırımı gerçekleştirmeye yönelik uzmanlara yardımcı olabilecek bir algoritma oluşturuldu.

6- CD34 ekspresyonu pozitif olan hastalardan oluşturduğumuz algoritma, immünofenotipik benzerlik gösteren blastlar ile Tip 1 HG ayırımı üzerine kuruluydu. CD34 eksprese etmeyen hasta verisi yetersiz olduğundan bu hasta grubuna yönelik pozitiflik sınır değeri oluşturulamadı. CD34 eksprese etmeyen hastalar için ayrıntılı akım sitometrik analiz yapılmasını ve ileride yapılacak çalışmalar ile CD34-lenfoblastların ayırımına yönelik sınır değerlerin oluşturulmasını öneriyoruz.

7- Çalışmamızda dahil ettiğimiz MRD analizlerini, hastaların aldığı tedavi protokolüne ve MRD analiz gününe göre sınıflandıramadık. İleride yapılacak çalışmalarda oluşturulan pozitiflik sınır değerlerinin hastaların tedavi protokolü ve MRD analiz günlerine göre kategorize edilerek değerlendirilmesinin yararlı olacağını düşünüyoruz.

8- Akım sitometri laboratuvarlarında maliyet etkin test istemi, yalnızca araştırılan klinik durum veya tanıya yönelik verimli test seçimi ve uygulanmasıdır. Çalışmamızda oluşturduğumuz algoritma daha kısıtlı antikor sayısı ile HG/blast ayırımına yönelik bir çalışmadır. Çalışmamızla ve ileride yapılacak benzer çalışmalarla birlikte HG/Blast ayırımının yapılması gereken analizlerde daha az sayıda antikorla etkili sonuçlar alınarak laboratuvar maliyetini azaltabileceğini düşünüyoruz.

Sonuç olarak çalışmamız ile özellikle çocukluk çağı B ALL takibinde çok önemli bir problem olan HG/Lösemi ilişkili blast ayırımının kantitatif değerlendirme ile objektif olarak yapılabilmesi için bir algoritma geliştirmiş olduk. Elde edilen verilerin, B-ALL ayırıcı tanısında faydalı olmasının yanı sıra güvenilir ve standardize B ALL MRD analizi için de önemli bir adım olacağını düşünüyoruz.

7. KAYNAKLAR

1. Gajendra S. Flowcytometry in acute leukemia. Clin Oncol. 2016;1(1166):372.
2. Don MD, Lim W, Lo A, Cox B, Huang Q, Kitahara S, et al. Improved Recognition of Hematogones From Precursor B-Lymphoblastic Leukemia by a Single Tube Flow Cytometric Analysis. Am J Clin Pathol. 2020;153(6):790-8. Epub 2020/02/19. doi: 10.1093/ajcp/aqaa007. PubMed PMID: 32068791.
3. David G. Tubergen AB, A. Kim Ritchey, Erika Friehling. Nelson Textbook of Pediatrics, 2-Volume Set: Elsevier; 2020.
4. Horibe K, Saito AM, Takimoto T, Tsuchida M, Manabe A, Shima M, et al. Incidence and survival rates of hematological malignancies in Japanese children and adolescents (2006-2010): based on registry data from the Japanese Society of Pediatric Hematology. International journal of hematology. 2013;98(1):74-88. Epub 2013/05/25. doi: 10.1007/s12185-013-1364-2. PubMed PMID: 23702913.
5. William L. Carroll TB. Lanzkowsky's Manual of Pediatric Hematology and Oncology. Lanzkowsky's Manual of Pediatric Hematology and Oncology: Elsevier; 2016.
6. Leach M, Bain, B. J., Jackson, B., Mckay, P., Doig, A. and Drummond, M. Practical Flow Cytometry in Haematology. 2015.
7. Henel G, Schmitz JL. Basic Theory and Clinical Applications of Flow Cytometry. Laboratory Medicine. 2007;38(7):428-36. doi: 10.1309/ghlewlv0cd8025jl.
8. Bouriche L, Bernot D, Nivaggioni V, Arnoux I, Loosveld M. Detection of Minimal Residual Disease in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Using an Eight-Color Tube with Dried Antibody Reagents. Cytometry Part B, Clinical cytometry. 2019;96(2):158-63. Epub 2019/01/31. doi: 10.1002/cyto.b.21766. PubMed PMID: 30698327.
9. Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. The New England journal of medicine. 2015;373(16):1541-52. Epub 2015/10/16. doi: 10.1056/NEJMra1400972. PubMed PMID: 26465987.
10. Saxena R, Pati H. Hematopathology. 2020.
11. Karrman K, Johansson B. Pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. Genes, Chromosomes and Cancer. 2017;56(2):89-116. doi: <https://doi.org/10.1002/gcc.22416>.
12. Patrick Brown SPH. Acute Leukemia in Children. Conn's Current Therapy 2021: Elsevier; 2019.
13. Karalexi MA, Dessypris N, Skalkidou A, Biniaris-Georgallis S, Kalogirou E, Thomopoulos TP, et al. Maternal fetal loss history and increased acute leukemia subtype risk in subsequent offspring: a systematic review and meta-analysis. Cancer causes & control : CCC. 2017;28(6):599-624. Epub 2017/04/13. doi: 10.1007/s10552-017-0890-2. PubMed PMID: 28401353.
14. Spector LG, Charbonneau B, Robison LL. Epidemiology and etiology. In: Pui C-H, editor. Childhood Leukemias. 3 ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2012. p. 49-71.
15. Celkan T. Çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemisi. Klinik Gelişim Dergisi. 2007;20:14-25.
16. Lim JY, Bhatia S, Robison LL, Yang JJ. Genomics of racial and ethnic disparities in childhood acute lymphoblastic leukemia. Cancer. 2014;120(7):955-62. Epub 2014/01/03. doi: 10.1002/cncr.28531. PubMed PMID: 24382716; PubMed Central PMCID: PMC4015138.
17. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. Lancet (London, England). 2013;381(9881):1943-55. Epub 2013/03/26. doi: 10.1016/s0140-6736(12)62187-4. PubMed PMID: 23523389; PubMed Central PMCID: PMC3816716.
18. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 2016;127(20):2391-405. doi: 10.1182/blood-2016-03-643544.

19. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976;33(4):451-8. Epub 1976/08/01. doi: 10.1111/j.1365-2141.1976.tb03563.x. PubMed PMID: 188440.
20. Van Eys J, Pullen J, Head D, Boyett J, Crist W, Falletta J, et al. The French-American-British (FAB) classification of leukemia. The Pediatric Oncology Group experience with lymphocytic leukemia. *Cancer*. 1986;57(5):1046-51. Epub 1986/03/01. doi: 10.1002/1097-0142(19860301)57:5<1046::aid-cnrcr2820570529>3.0.co;2-0. PubMed PMID: 3484662.
21. Lilleyman JS, Hann IM, Stevens RF, Richards SM, Eden OB, Chessells JM, et al. Cytomorphology of childhood lymphoblastic leukaemia: a prospective study of 2000 patients. *British Journal of Haematology*. 1992;81(1):52-7. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1992.tb08170.x>.
22. Payne KJ, Crooks GM. Human hematopoietic lineage commitment. *Immunological reviews*. 2002;187:48-64. Epub 2002/10/09. doi: 10.1034/j.1600-065x.2002.18705.x. PubMed PMID: 12366682.
23. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*. 1995;9(10):1783-6. Epub 1995/10/01. PubMed PMID: 7564526.
24. Hann IM, Richards SM, Eden OB, Hill FGH, on behalf of the Medical Research Council Childhood Leukaemia Working P. Analysis of the immunophenotype of children treated on the Medical Research Council United Kingdom Acute Lymphoblastic Leukaemia Trial XI (MRC UKALLXI). *Leukemia*. 1998;12(8):1249-55. doi: 10.1038/sj.leu.2401093.
25. Alejandro Gutierrez LBS. Nathan and Oski's Hematology and Oncology of Infancy and Childhood. Nathan and Oski's Hematology and Oncology of Infancy and Childhood: Elsevier; 2015.
26. Sędek Ł, Bulsa J, Sonsala A, Twardoch M, Wieczorek M, Malinowska I, et al. The immunophenotypes of blast cells in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: How different are they from their normal counterparts? *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. 2014;86(5):329-39. doi: <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21176>.
27. Orfao A, Ortuño F, de Santiago M, Lopez A, San Miguel J. Immunophenotyping of acute leukemias and myelodysplastic syndromes. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2004;58(1):62-71. Epub 2004/03/03. doi: 10.1002/cyto.a.10104. PubMed PMID: 14994223.
28. Carroll AJ, Crist WM, Parmley RT, Roper M, Cooper MD, Finley WH. Pre-B cell leukemia associated with chromosome translocation 1;19. *Blood*. 1984;63(3):721-4. Epub 1984/03/01. PubMed PMID: 6607758.
29. Chiaretti S, Zini G, Bassan R. Diagnosis and subclassification of acute lymphoblastic leukemia. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*. 2014;6(1):e2014073. Epub 2014/11/20. doi: 10.4084/mjhid.2014.073. PubMed PMID: 25408859; PubMed Central PMCID: PMC4235437.
30. Roper M, Crist WM, Metzgar R, Ragab AH, Smith S, Starling K, et al. Monoclonal antibody characterization of surface antigens in childhood T-cell lymphoid malignancies. *Blood*. 1983;61(5):830-7. Epub 1983/05/01. PubMed PMID: 6338974.
31. Moldavan A. PHOTO-ELECTRIC TECHNIQUE FOR THE COUNTING OF MICROSCOPICAL CELLS. *Science*. 1934;80(2069):188-9. doi: 10.1126/science.80.2069.188.
32. Macey, Marion G. *Flow Cytometry Principles and Applications*. 2007.
33. Crosland-Taylor PJ. A device for counting small particles suspended in a fluid through a tube. *Nature*. 1953;171(4340):37-8. Epub 1953/01/03. doi: 10.1038/171037b0. PubMed PMID: 13025472.

34. Kamentsky LA, Melamed MR, Derman H. Spectrophotometer: new instrument for ultrarapid cell analysis. *Science* (New York, NY). 1965;150(3696):630-1. Epub 1965/10/29. doi: 10.1126/science.150.3696.630. PubMed PMID: 5837105.
35. Dittrich WM GW. Flow-through chamber for photometers to measure and count particles in a dispersion medium. United States Patent US3761187A. 1968.
36. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975;256(5517):495-7. doi: 10.1038/256495a0.
37. Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M, Herzenberg LA. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clinical chemistry*. 2002;48(10):1819-27. Epub 2002/09/27. PubMed PMID: 12324512.
38. Julius MH, Masuda T, Herzenberg LA. Demonstration that antigen-binding cells are precursors of antibody-producing cells after purification with a fluorescence-activated cell sorter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1972;69(7):1934-8. Epub 1972/07/01. doi: 10.1073/pnas.69.7.1934. PubMed PMID: 4114858; PubMed Central PMCID: PMC426835.
39. Goetz C, Hammerbeck, C., & Bonnevier, J. *Flow Cytometry Basics for the Non-Expert. Techniques in Life Science and Biomedicine for the Non-Expert*. 2018.
40. Riley RS, *Principles and Applications of Flow Cytometry*
41. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical reviews in biotechnology*. 2017;37(2):163-76. Epub 2016/01/16. doi: 10.3109/07388551.2015.1128876. PubMed PMID: 26767547.
42. Nunez R. Flow cytometry: principles and instrumentation. *Current issues in molecular biology*. 2001;3(2):39-45. Epub 2001/07/27. PubMed PMID: 11471975.
43. McCoy JP, Jr. Basic principles of flow cytometry. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2002;16(2):229-43. Epub 2002/07/04. doi: 10.1016/s0889-8588(01)00015-6. PubMed PMID: 12094472.
44. Givan AL. Principles of flow cytometry: an overview. *Methods in cell biology*. 2001;63:19-50. Epub 2000/11/04. doi: 10.1016/s0091-679x(01)63006-1. PubMed PMID: 11060835.
45. Golden JP, Justin GA, Nasir M, Ligler FS. Hydrodynamic focusing--a versatile tool. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2012;402(1):325-35. Epub 2011/09/29. doi: 10.1007/s00216-011-5415-3. PubMed PMID: 21952728; PubMed Central PMCID: PMC3251643.
46. Intro to flow cytometry: a learning guide. BD Biosciences. 2002; Manual Part Number: 11-11032-01.
47. Bhardwaj N, Bhardwaj SK, Nayak MK, Mehta J, Kim K-H, Deep A. Fluorescent nanobiosensors for the targeted detection of foodborne bacteria. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2017;97:120-35. doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.010>.
48. Goetz, Christine, Hammerbeck, Christopher, Bonnevier, Jody, *Physics of a Flow Cytometer. Techniques in Life Science and Biomedicine for the Non-Expert: Springer International Publishing*; 2018.
49. Wu YJ, Wang H, Liang JH, Miao Y, Liu L, Qiu HR, et al. Using the geometric mean fluorescence intensity index method to measure ZAP-70 expression in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Oncotargets and therapy*. 2016;9:797-805. Epub 2016/03/05. doi: 10.2147/ott.s94613. PubMed PMID: 26937202; PubMed Central PMCID: PMC4762435.
50. Jaye DL, Bray RA, Gebel HM, Harris WAC, Waller EK. Translational Applications of Flow Cytometry in Clinical Practice. *The Journal of Immunology*. 2012;188(10):4715-9. doi: 10.4049/jimmunol.1290017.

51. DiGiuseppe JA, Wood BL. Applications of Flow Cytometric Immunophenotyping in the Diagnosis and Posttreatment Monitoring of B and T Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2019;96(4):256-65. Epub 2019/06/25. doi: 10.1002/cyto.b.21833. PubMed PMID: 31231940.
52. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Razzouk BI, Ribeiro RC, Rivera GK, et al. Use of peripheral blood instead of bone marrow to monitor residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002;100(7):2399-402. Epub 2002/09/20. doi: 10.1182/blood-2002-04-1130. PubMed PMID: 12239148.
53. Gaipa G, Basso G, Biondi A, Campana D. Detection of minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2013;84(6):359-69. Epub 2013/06/13. doi: 10.1002/cyto.b.21101. PubMed PMID: 23757107.
54. Druley TE. *Minimal Residual Disease Testing Current Innovations and Future Directions*: Springer International Publishing; 2019.
55. Campana D, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood*. 1995;85(6):1416-34. Epub 1995/03/15. PubMed PMID: 7888664.
56. Campana D. Determination of minimal residual disease in leukaemia patients. *Br J Haematol*. 2003;121(6):823-38. Epub 2003/06/06. doi: 10.1046/j.1365-2141.2003.04393.x. PubMed PMID: 12786792.
57. Cherian S, Soma LA. How I Diagnose Minimal/Measurable Residual Disease in B Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma by Flow Cytometry. *American Journal of Clinical Pathology*. 2020;155(1):38-54. doi: 10.1093/ajcp/aqaa242.
58. Berry DA, Zhou S, Higley H, Mukundan L, Fu S, Reaman GH, et al. Association of Minimal Residual Disease With Clinical Outcome in Pediatric and Adult Acute Lymphoblastic Leukemia: A Meta-analysis. *JAMA oncology*. 2017;3(7):e170580. Epub 2017/05/12. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.0580. PubMed PMID: 28494052; PubMed Central PMCID: PMC5824235 company that designs Bayesian and adaptive clinical trials for pharmaceutical and medical device companies, groups funded by the US National Institutes of Health, and consortia funded by international agencies. No other disclosures are reported.
59. Chatterjee G, Sriram H, Ghogale S, Deshpande N, Khanka T, Panda D, et al. Immunophenotypic shift in the B-cell precursors from regenerating bone marrow samples: A critical consideration for measurable residual disease assessment in B-lymphoblastic leukemia. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. 2021;100(4):434-45. doi: <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21951>.
60. Bielorai B, Golan H, Trakhtenbrot L, Reichart M, Toren A, Daniely M, et al. Combined analysis of morphology and fluorescence in situ hybridization in follow-up of minimal residual disease in a child with Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2002;138(1):64-8. Epub 2002/11/07. doi: 10.1016/s0165-4608(02)00578-2. PubMed PMID: 12419587.
61. van Dongen JJ, Breit TM, Adriaansen HJ, Beishuizen A, Hooijkaas H. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by immunological marker analysis and polymerase chain reaction. *Leukemia*. 1992;6 Suppl 1:47-59. Epub 1992/01/01. PubMed PMID: 1548936.
62. van der Velden VH, Panzer-Grümayer ER, Cazzaniga G, Flohr T, Sutton R, Schrauder A, et al. Optimization of PCR-based minimal residual disease diagnostics for childhood acute lymphoblastic leukemia in a multi-center setting. *Leukemia*. 2007;21(4):706-13. Epub 2007/02/09. doi: 10.1038/sj.leu.2404535. PubMed PMID: 17287857.
63. Wu D, Emerson RO, Sherwood A, Loh ML, Angiolillo A, Howie B, et al. Detection of minimal residual disease in B lymphoblastic leukemia by high-throughput sequencing of IGH. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer*

- Research. 2014;20(17):4540-8. Epub 2014/06/28. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-13-3231. PubMed PMID: 24970842; PubMed Central PMCID: PMC5142743.
64. Coustan-Smith E, Behm FG, Sanchez J, Boyett JM, Hancock ML, Raimondi SC, et al. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* (London, England). 1998;351(9102):550-4. Epub 1998/03/11. doi: 10.1016/s0140-6736(97)10295-1. PubMed PMID: 9492773.
 65. Dworzak MN, Gaipa G, Ratei R, Veltroni M, Schumich A, Maglia O, et al. Standardization of flow cytometric minimal residual disease evaluation in acute lymphoblastic leukemia: Multicentric assessment is feasible. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2008;74(6):331-40. Epub 2008/06/13. doi: 10.1002/cyto.b.20430. PubMed PMID: 18548617.
 66. Vogel P, Erf LA, Rosenthal N. Hematological Observations on Bone Marrow Obtained by Sternal Puncture. *American Journal of Clinical Pathology*. 1937;7(5):436-47. doi: 10.1093/ajcp/7.5.436.
 67. Chantepie SP, Cornet E, Salaün V, Reman O. Hematogones: an overview. *Leuk Res*. 2013;37(11):1404-11. Epub 2013/08/13. doi: 10.1016/j.leukres.2013.07.024. PubMed PMID: 23932356.
 68. Borella L, Green AA, Webster RG. Immunologic Rebound After Cessation of Long-term Chemotherapy in Acute Leukemia. *Blood*. 1972;40(1):42-51. doi: 10.1182/blood.V40.1.42.42.
 69. Fenneteau O, Lainey E. [Bone marrow examination of inherited diseases in children]. *Annales de biologie clinique*. 2007;65(5):483-503. Epub 2007/10/05. PubMed PMID: 17913668.
 70. Braham Jmili N, Nsaibia S, Jacob MC, Omri H, Laatiri MA, Yacoub S, et al. Immunophenotypic analysis of bone marrow B lymphocyte precursors (hématogones) by flow cytometry. *Clinical laboratory science : journal of the American Society for Medical Technology*. 2009;22(4):208-15. Epub 2009/12/09. PubMed PMID: 19967915.
 71. Schuurmans Stekhoven JH, Langenhuisen CA, Bakkeren JA, Holland R, Höller I, De Vaan GA, et al. Morphology and incidence of the "posttherapeutic lymphoid cell" in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol*. 1986;124(1):46-52. PubMed PMID: 2425623.
 72. Loken MR, Shah VO, Hollander Z, Civin CI. Flow Cytometric Analysis of Normal B Lymphoid Development. *Pathology and Immunopathology Research*. 1988;7(5):357-70. doi: 10.1159/000157129.
 73. Kroft SH, Asplund SL, McKenna RW, Karandikar NJ. Haematogones in the peripheral blood of adults: a four-colour flow cytometry study of 102 patients. *British Journal of Haematology*. 2004;126(2):209-12. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.05011.x>.
 74. Greaves M, Delia D, Janossy G, Rapson N, Chessells J, Woods M, et al. Acute lymphoblastic leukaemia associated antigen. IV Expression on non-leukaemic 'lymphoid' cells. *Leukemia Research*. 1980;4(1):15-32. doi: [https://doi.org/10.1016/0145-2126\(80\)90044-2](https://doi.org/10.1016/0145-2126(80)90044-2).
 75. McPherson RA, Pincus MR, Henry JB. *Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods*. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007.
 76. McKenna RW, Washington LT, Aquino DB, Picker LJ, Kroft SH. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry. *Blood*. 2001;98(8):2498-507. Epub 2001/10/06. doi: 10.1182/blood.v98.8.2498. PubMed PMID: 11588048.
 77. Roshal M, Fromm JR, Winter S, Dunsmore K, Wood BL. Immaturity associated antigens are lost during induction for T cell lymphoblastic leukemia: implications for minimal residual disease detection. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2010;78(3):139-46. Epub 2010/02/16. doi: 10.1002/cyto.b.20511. PubMed PMID: 20155852; PubMed Central PMCID: PMC3025860.

78. Rimsza LM, Larson RS, Winter SS, Foucar K, Chong YY, Garner KW, et al. Benign hematogone-rich lymphoid proliferations can be distinguished from B-lineage acute lymphoblastic leukemia by integration of morphology, immunophenotype, adhesion molecule expression, and architectural features. *Am J Clin Pathol.* 2000;114(1):66-75. Epub 2000/07/08. doi: 10.1309/lxu4-q7q9-3yab-4qe0. PubMed PMID: 10884801.
79. Wood BL, Arroz M, Barnett D, DiGiuseppe J, Greig B, Kussick SJ, et al. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. *Cytometry Part B, Clinical cytometry.* 2007;72 Suppl 1:S14-22. Epub 2007/09/07. doi: 10.1002/cyto.b.20363. PubMed PMID: 17803189.
80. van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VHJ, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia.* 2012;26(9):1908-75. doi: 10.1038/leu.2012.120.
81. Loken MR, Shah VO, Hollander Z, Civin CI. Flow cytometric analysis of normal B lymphoid development. *Pathol Immunopathol Res.* 1988;7(5):357-70. Epub 1988/01/01. doi: 10.1159/000157129. PubMed PMID: 3266012.
82. McKenna RW, Asplund SL, Kroft SH. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) and neoplastic lymphoblasts by 4-color flow cytometry. *Leukemia & lymphoma.* 2004;45(2):277-85. Epub 2004/04/23. doi: 10.1080/1042819031000151950. PubMed PMID: 15101712.
83. Brahimi M, Saidi D, Touhami H, Bekadja M. The Use of CD45/SSC Dot Plots in the Classification of Acute Leukemias. *Journal of Hematology and Thromboembolic Diseases.* 2014;2.
84. Terstappen LW, Hollander Z, Meiners H, Loken MR. Quantitative comparison of myeloid antigens on five lineages of mature peripheral blood cells. *Journal of leukocyte biology.* 1990;48(2):138-48. Epub 1990/08/01. doi: 10.1002/jlb.48.2.138. PubMed PMID: 2196321.
85. Sevilla DW, Colovai AI, Emmons FN, Bhagat G, Alobeid B. Hematogones: a review and update. *Leukemia & lymphoma.* 2010;51(1):10-9. Epub 2009/12/17. doi: 10.3109/10428190903370346. PubMed PMID: 20001239.
86. Illingworth A. What is MFI and how is it calculated? Available from: https://www.cytometry.org/web/q_view.php?id=152&filter=Analysis%20Techniques.
87. Dockrell HM. Leucocyte Typing IV. White Cell Differentiation Antigens: *Immunology.* 1991 Jan;72(1):159-60.
88. Lúcio P, Parreira A, van den Beemd MW, van Lochem EG, van Wering ER, Baars E, et al. Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B-ALL. *Leukemia.* 1999;13(3):419-27. Epub 1999/03/23. doi: 10.1038/sj.leu.2401279. PubMed PMID: 10086733.
89. Shaver AC, Seegmiller AC. B Lymphoblastic Leukemia Minimal Residual Disease Assessment by Flow Cytometric Analysis. *Clinics in laboratory medicine.* 2017;37(4):771-85. Epub 2017/11/13. doi: 10.1016/j.cll.2017.07.005. PubMed PMID: 29128068.
90. Lo A, Miller M, Cervania M, Li Q, Ewalt MD, Huang Q, et al. Improved Recognition of Hematogones from B Lymphoblastic Leukemia By 5-Color Flow Cytometric Analysis. *Blood.* 2016;128(22):1732-. doi: 10.1182/blood.V128.22.1732.1732.
91. Karawajew L, Dworzak M, Ratei R, Rhein P, Gaipa G, Buldini B, et al. Minimal residual disease analysis by eight-color flow cytometry in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2015;100(7):935-44. Epub 2015/05/24. doi: 10.3324/haematol.2014.116707. PubMed PMID: 26001791; PubMed Central PMCID: PMC4486228.
92. Coustan-Smith E, Song G, Clark C, Key L, Liu P, Mehrpooya M, et al. New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood.*

- 2011;117(23):6267-76. Epub 2011/04/14. doi: 10.1182/blood-2010-12-324004. PubMed PMID: 21487112; PubMed Central PMCID: PMC3122946.
93. Seegmiller AC, Kroft SH, Karandikar NJ, McKenna RW. Characterization of immunophenotypic aberrancies in 200 cases of B acute lymphoblastic leukemia. *Am J Clin Pathol.* 2009;132(6):940-9. Epub 2009/11/21. doi: 10.1309/ajcp8g5rmtwuemuu. PubMed PMID: 19926587.
 94. Jalal SD, Al-Allawi NAS, Al Doski AAS. Immunophenotypic aberrancies in acute lymphoblastic leukemia from 282 Iraqi patients. *International journal of laboratory hematology.* 2017;39(6):625-32. Epub 2017/07/20. doi: 10.1111/ijlh.12716. PubMed PMID: 28722319.
 95. Sandoval-Montes C, Santos-Argumedo L. CD38 is expressed selectively during the activation of a subset of mature T cells with reduced proliferation but improved potential to produce cytokines. *Journal of leukocyte biology.* 2005;77(4):513-21. doi: <https://doi.org/10.1189/jlb.0404262>.
 96. Tedder TF, Isaacs CM. Isolation of cDNAs encoding the CD19 antigen of human and mouse B lymphocytes. A new member of the immunoglobulin superfamily. *The Journal of Immunology.* 1989;143(2):712-7.
 97. Hulspar R, O'Gorman MR, Wood BL, Gratama JW, Sutherland DR. Considerations for the control of background fluorescence in clinical flow cytometry. *Cytometry Part B, Clinical cytometry.* 2009;76(6):355-64. Epub 2009/07/04. doi: 10.1002/cyto.b.20485. PubMed PMID: 19575390.
 98. Wang K, Wei G, Liu D. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Experimental Hematology & Oncology.* 2012;1(1):36. doi: 10.1186/2162-3619-1-36.
 99. Babusíková O, Zelezníková T, Mlcáková A, Kusenda J, Stevulová L. The knowledge on the 3rd type hematogones could contribute to more precise detection of small numbers of precursor B-acute lymphoblastic leukemia. *Neoplasma.* 2005;52(6):502-9. Epub 2005/11/15. PubMed PMID: 16284697.
 100. Allahbakhshian Farsani M, Shahabi Satlsar E, Mohseni A, Mosleh M, Mehrpouri M, Agaiepour M, et al. Use of Four-Color Flow Cytometric Assay for Discrimination of Hematogone from Lymphoblast: Critical Issue for MRD Assessment in B-ALL Patients. *Iranian journal of Pediatric Hematology and Oncology.* 2020;10(1):17-27. doi: 10.18502/ijpho.v10i1.2166.
 101. Rego EM, Garcia AB, Carneiro JJ, Falcão RP. Immunophenotype of normal and leukemic bone marrow B-precursors in a Brazilian population. A comparative analysis by quantitative fluorescence cytometry. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas.* 2001;34(2):183-94. Epub 2001/02/15. doi: 10.1590/s0100-879x2001000200005. PubMed PMID: 11175493.
 102. Farahat N, Lens D, Zomas A, Morilla R, Matutes E, Catovsky D. Quantitative flow cytometry can distinguish between normal and leukaemic B-cell precursors. *Br J Haematol.* 1995;91(3):640-6. Epub 1995/11/01. doi: 10.1111/j.1365-2141.1995.tb05360.x. PubMed PMID: 8555067.
 103. Tchilian EZ, Beverley PCL. Altered CD45 expression and disease. *Trends in Immunology.* 2006;27(3):146-53. doi: <https://doi.org/10.1016/j.it.2006.01.001>.
 104. Hendrickx A, Bossuyt X. Quantification of the leukocyte common antigen (CD45) in mature B-cell malignancies. *Cytometry.* 2001;46(6):336-9. Epub 2001/12/26. doi: 10.1002/cyto.10032. PubMed PMID: 11754202.
 105. Billadeau D, Van Ness B, Kimlinger T, Kyle RA, Therneau TM, Greipp PR, et al. Clonal circulating cells are common in plasma cell proliferative disorders: a comparison of monoclonal gammopathy of undetermined significance, smoldering multiple myeloma, and active myeloma. *Blood.* 1996;88(1):289-96. Epub 1996/07/01. PubMed PMID: 8704185.
 106. Wechsler J, Bagot M, Nikolova M, Parolini S, Martin-Garcia N, Boumsell L, et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor expression delineates in situ Sézary syndrome

- lymphocytes. *The Journal of pathology*. 2003;199(1):77-83. Epub 2002/12/11. doi: 10.1002/path.1251. PubMed PMID: 12474229.
107. Ortolani C. Antigens. *Flow Cytometry of Hematological Malignancies*. p. 1-157.
 108. Borowitz MJ, Guenther KL, Shults KE, Stelzer GT. Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometric analysis. Use of CD45 and right-angle light scatter to gate on leukemic blasts in three-color analysis. *Am J Clin Pathol*. 1993;100(5):534-40. Epub 1993/11/01. doi: 10.1093/ajcp/100.5.534. PubMed PMID: 8249893.
 109. Stelzer GT, Shults KE, Loken MR. CD45 gating for routine flow cytometric analysis of human bone marrow specimens. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1993;677:265-80. Epub 1993/03/20. doi: 10.1111/j.1749-6632.1993.tb38783.x. PubMed PMID: 8494214.
 110. Pan Z, Yang M, Huang K, Büsche G, Glage S, Ganser A, et al. Flow cytometric characterization of acute leukemia reveals a distinctive "blast gate" of murine T-lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Oncotarget*. 2018;9(2):2320-8. Epub 2018/02/09. doi: 10.18632/oncotarget.23410. PubMed PMID: 29416774; PubMed Central PMCID: PMC5788642.
 111. Ghodke K, Bibi A, Rabade N, Patkar N, Subramanian PG, Kadam PA, et al. CD19 negative precursor B acute lymphoblastic leukemia (B-ALL)—Immunophenotypic challenges in diagnosis and monitoring: A study of three cases. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. 2017;92(4):315-8. doi: <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21373>.
 112. Hussein S, Pinkney K, Jobanputra V, Bhagat G, Alobeid B. CD19-negative B-lymphoblastic leukemia associated with hypercalcemia, lytic bone lesions and aleukemic presentation. *Leukemia & lymphoma*. 2015;56(5):1533-7. Epub 2014/09/16. doi: 10.3109/10428194.2014.963579. PubMed PMID: 25219596.
 113. Tong H, Wang Q, Lu C, Liu Z, Hu Y. Immunophenotypic, cytogenetic, and clinical features of 207 cases of childhood acute lymphoblastic leukemia in china. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 2011;33(6):437-41. Epub 2011/07/28. doi: 10.1097/MPH.0b013e3182198dd7. PubMed PMID: 21792039.
 114. Gupta N, Pawar R, Banerjee S, Brahma S, Rath A, Shewale S, et al. Spectrum and Immunophenotypic Profile of Acute Leukemia: A Tertiary Center Flow Cytometry Experience. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*. 2019;11(1):e2019017. Epub 2019/03/13. doi: 10.4084/mjhid.2019.017. PubMed PMID: 30858955; PubMed Central PMCID: PMC6402547.
 115. Gujral S, Badrinath Y, Kumar A, Subramanian PG, Raje G, Jain H, et al. Immunophenotypic profile of acute leukemia: critical analysis and insights gained at a tertiary care center in India. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2009;76(3):199-205. Epub 2008/09/23. doi: 10.1002/cyto.b.20451. PubMed PMID: 18803279.
 116. Burnusuzov HA, Spasova MI, Murdjeva MA, Stoyanova AA, Mumdzhev IN, Kaleva VI, et al. Immunophenotypic Modulation of the Blast Cells in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Minimal Residual Disease Detection. *Folia medica*. 2016;58(1):28-35. Epub 2016/07/08. doi: 10.1515/folmed-2016-0004. PubMed PMID: 27383875.
 117. Dworzak MN, Gaipa G, Schumich A, Maglia O, Ratei R, Veltroni M, et al. Modulation of antigen expression in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia during induction therapy is partly transient: evidence for a drug-induced regulatory phenomenon. Results of the AIEOP-BFM-ALL-FLOW-MRD-Study Group. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2010;78(3):147-53. Epub 2010/03/05. doi: 10.1002/cyto.b.20516. PubMed PMID: 20201055.
 118. Pawińska-Wasikowska K, Balwierz W. [Cells antigens' expression modulation during induction treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia]. *Przegląd lekarski*. 2010;67(6):361-5. Epub 2011/02/25. PubMed PMID: 21344762.
 119. Gaipa G, Basso G, Aliprandi S, Migliavacca M, Vallinoto C, Maglia O, et al. Prednisone induces immunophenotypic modulation of CD10 and CD34 in nonapoptotic B-

cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells. Cytometry Part B, Clinical cytometry. 2008;74(3):150-5. Epub 2008/02/14. doi: 10.1002/cyto.b.20408. PubMed PMID: 18271020.



8. ÖZGEÇMİŞ VE İLETİŞİM BİLGİLERİ

1. Bireysel Bilgiler

Adı – Soyadı: Uğurcan EKER

Doğum yeri ve tarihi:

Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti

Medeni durumu: Evli

İletişim adresi ve telefonu:

Yabancı dili: İngilizce

2. Eğitimi

- SBÜ Ankara Şehir Hastanesi SUAM – Tıbbi Biyokimya Uzmanlık Eğitimi (2019-2021)
- SBÜ Ankara Numune EAH – Tıbbi Biyokimya Uzmanlık Eğitimi (2017-2019)
- Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi (2010-2016)
- Samsun Fen Lisesi (2005-2009)

3. Ünvanları

- Tıp doktoru (2016)

4. Mesleki Deneyim

- SBÜ Ankara Şehir Hastanesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı / Asistan Doktor (Eylül 2017-halen)
- T.C. Sağlık Bakanlığı Boyabat Toplum Sağlığı Merkezi / Pratisyen hekim (Eylül 2016-Eylül 2017)

5. Bilimsel İlgi Alanları

8.EKLER

EK-1: Etik kurul onayı



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
İL SAĞLIK MÜDÜRLÜĞÜ
Ankara Şehir Hastanesi
2 Nolu Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı

Sayı : E.Kurul –E2-21-444 No’lu çalışma

Ankara Şehir Tıbbi Biyokimya Kliniği’nden “Akım sitometrik B hücreli lenfoblastik lösemi MRD panel antikorlarının hematogon-blast ayırımına yönelik rölatif floresan ekspresyon seviyeleri ve MRD pozitifliği sınır değerlerinin belirlenmesi” konulu çalışma incelenmiş olup, Etik açıdan oy birliği ile uygun görülmüştür.

05/05/2021

Prof. Dr. Fuat Emre Canpolat
2 Nolu Etik Kurul Başkanı

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Akım Sitometrik B Hücreli Lenfoblastik Lösemi MRD Panel Antikorlarının Hematogon-Blast Ayrımına Yönelik Rölatif Floresan Ekspresyon Seviyeleri ve MRD Pozitifliği Sınır Değerlerinin Belirlenmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	-

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Ankara Şehir Hastanesi 2 Nolu Klinik Araştırmalar Etik Kurul
	AÇIK ADRESİ:	Üniversiteler Mah. Bilkent Cad. No:1 ÇANKAYA /ANKARA
	TELEFON	0312 552 66 00
	FAKS	0312 552 99 82
	E-POSTA	

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Fatma Meriç YILMAZ			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyokimya Kliniği			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Şehir Hastanesi			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	-			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)	-			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
		Gözlemsel ilaç çalışması	☐		
		Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐		
		İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐		
		İlaç dışı klinik araştırma	☐		
Diğer ise belirtiniz: Retrospektif Çalışma					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐	

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Fuat Emre CANPOLAT
İmza:

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Akım Sitometrik B Hücreli Lenfoblastik Lösemi MRD Panel Antikorlarının Hematogon-Blast Ayırımına Yönelik Rölatif Floresan Ekspresyon Seviyeleri ve MRD Pozitifliği Sınır Değerlerinin Belirlenmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	-

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı			Açıklama
	SİGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐		
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	İLAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
	DİĞER:	☐		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:E2-21-444	Tarih: 05.05.2021		
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.			

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Sovadı: Prof. Dr. Fuat Emre CANPOLAT
İmza:

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Akım Sitometrik B Hücreli Lenfoblastik Lösemi MRD Panel Antikorlarının Hematogon-Blast Ayrımına Yönelik Rölatif Floresan Ekspresyon Seviyeleri ve MRD Pozitifliği Sınır Değerlerinin Belirlenmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	-

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Fuat Emre CANPOLAT

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkisi	Katılım *	İmza
Prof. Dr. Fuat Emre CANPOLAT	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Neonatoloji	Ankara Şehir Hastanesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. İlkan TATAR	Anatomi	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Dilek ŞAHİN	Kadın Hastalıkları ve Doğum /Perinatoloji	Ankara Şehir Hastanesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Mehmet Ali Nahit ŞENDUR	Tıbbi Onkoloji	Ankara Şehir Hastanesi (YBÜ)	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Bilgen BAŞGUT	Farmakoloji	Yakın Doğu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Hayriye Gözde KANMAZ KUTMAN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Neonatoloji	Ankara Şehir Hastanesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Gülhan KURTOĞLU ÇELİK	Acil Tıp	Ankara Şehir Hastanesi (YBÜ)	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Bedi DİNÇ	Tıbbi Mikrobiyoloji	Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Ayça Tuba DUMANLI ÖZCAN	Anestezi ve Reanimasyon	Ankara Şehir Hastanesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Özlem Yılmaz TAŞDELEN	Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon	Ankara Şehir Hastanesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Dilek ÖZTAŞ	Halk Sağlığı	Ankara Şehir Hastanesi (YBÜ)	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Muhammet Kadri ÇOLAKOĞLU	Gastroenteroloji Cerrahisi	Ankara Şehir Hastanesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Sağ. Mens. Olm. Üye. Mehmet Hilmi ŞEÇİLMİŞ	İktisat Maliye	Emekli	E ☒ K ☐	E ☐ H ☐	E ☐ H ☒	
Av. Nuriye Betül BAYRAK	Hukuk	BF Hukuk Bürosu	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Mühendis Selahattin KAHRİMAN	Biyomedikal Mühendis	Ankara Şehir Hastanesi/ CCN Teknik	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Fuat Emre CANPOLAT
İmza: