AKUT LÖSEMİLERDE MİNİMAL RESİDUEL HASTALIK VE TAKİBİNDE LABORATUVAR YÖNTEMLERİ

Dr. Pervin TOPÇUOĞLU,
Dr. Mutlu ARAT

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı (arat@medicine.ankara.edu.tr)

GİRİŞ

Akut lösemili hastalar tanıda yaklaşık 10^{12} malign hücreye sahiptir. Remisyon-indüksiyon tedavisi(leri) ile kemik iliğinde blast sayısı morfolojik olarak % 5'in altında kabul edildiğinde hematolojik tam remisyon tanımlaması kullanılır. Bunun anlamı kantitatif olarak lösemik hücrenin 2 log indirgenmesidir (10^{10}). Tam remisyondan itibaren klinik belirgin lösemik nükse kadar geçen sürede vücuttaki lösemik hücre yükü büyük oranda bilinmez. Bu nedenle de 10^{10} lösemik yükten itibaren hastalar benzer veya farklı rejimlerle lösemik yükü azaltmak, belki de tamamen yok edilmesi için tedavi alırlar (1).

TANIM

Hematolojik malignitelerinin tedavilerinde ilerlemeler yanıt oranlarını artırmakta ve pek çok hastada hastalıksız sağkalımı uzatmaktadır. Akut lenfoblastik lösemide (ALL) yaklaşık % 80-90'nında ve akut miyeloblastik lösemili (AML) yetişkinlerin % 70-80'inde ilk sıra tedaviler ile tam remisyon elde edilmektedir. Fakat hastaların yaklaşık % 60-70'i tedavi sonrası residuel hastalık nedeniyle nüks etmektedir. Konvansiyonel morfolojik bulguların saptadığı eşik değerin altında kalan residuel malin hücrelerin devam etmesine ***minimal residuel hastalık (MRH)*** denir ve nüks riski yüksek hastaları öngörebilir. Bu nedenle son dekadlarda MRH saptanması ve değerlendirilmesi için çeşitli laboratuvar yöntemleri kullanıma girmiştir: Akım sitometri (ASM) ile immuntiplendirme, flöresan in situ hibridizasyon (FİSH), sitogenetik analizler ve çeşitli polimeraz zincir reaksiyon (PCR=Polimerase change reaction) analizleri bunların arasında sayılabilir (Tablo 1) (2).

Tablo 1: Minimal residuel hastalıkları saptamada kullanılan yöntemler

Yöntem	Değerlendirilen Hücresel Yapı	Duyarlılık
Işık Mikroskobu	Morfoloji	$10^{-1} – 10^{-2}$
İmmuntiplendirme (ASM, Fluoresan mikroskobu, immunhistokimya)	Nüklear, sitoplazmik ve hücre yüzey antijenleri	$10^{-2} – 10^{-5}$
Klonojenik analizler	İn vitro koloni büyüme	~ 10^{-4}
Sitogenetik analizler	Karyotip anormallikleri	$10^{-1} – 10^{-2}$
Fluoresan insitu hibridizasyon	Karyotip anormallikleri (Sayılan hücre ve sayısına göre)	$10^{-1} – 10^{-4}$
Southern blot	Antijen reseptör gen rearanjmanları, lösemiye özgü translokasyonlar	$10^{-1} – 10^{-2}$
Polimeraz zincir reaksiyonu	Antijen reseptör gen rearanjmanları, lösemiye özgü translokasyonlar	$10^{-4} – 10^{-6}$

Kaynak: *Faderl S, et al. Minimal Residual Disease in Hematologic Malignancies. Arc Pathol Mol Med 1999; 123: 1030-1034.*

Residüel hastalığın morfolojik olarak değerlendirmesi yöntemindeki duyarlığın düşük olması (genelde 1 lösemik hücre/100 normal hücre) ve bazen lösemik hücreler ile rejenere olan kemik iliğindeki hematopoetik öncüllerin ayrılamaması nedeniyle MRH değerlendirmesinde morfolojik yöntemin kullanımını sınırlıdır. Ancak morfolojinin duyarlılık ve özgüllüğü immuntiplendirme ve FİSH gibi diğer yöntemler ile artırılabilir (2-5).

Klonojenik analizler ise in vitro olarak lösemik hücrelerin uygun koşullarda uyarılması ile oluşan blast kolonilerinin analizidir. Bu yöntem yoğun bir laboratuvar çalışması gerektirir ve zaman alıcıdır. Ayrıca değerlendirmede lösemik hücrelerin büyüme hızına bağlı olması ve tek koloni hedeflenmesi gibi dezavantajları vardır. Bu yöntemin avantajları ise: 1) Okkült malign hücrelerin tanımlanması, 2) Bu hücrelerin biyolojik özellikleri ve büyümeleri için gereksinimlerinin bilinmesi, ve 3) Tek koloni ile immunolojik, sitogenetik veya moleküler tekniklerin gelişimidir.

Konvansiyonel karyotiplendirme hem tanıda malin hücreye özgü klonal anormallikler, sayısal ve/veya yapısal belirleyicileri tanımlar, ayrıca hastaların risk sınıflandırması ile birlikte prognozlarının belirlenmesinde önemlidir. Hastaların takibinde ve nükste yeni gelişen klonal anormalliklerin kazanımı da bu yöntem ile saptanabilir. Hastaların % 60-70'inde kullanılabilir bir yöntemdir, ancak duyarlılığı % 1-5 arasında değişir ve zaman alıcıdır. Ayrıca, bölünen hücrelerde karyotiplendirme yapılabildiği için residüel hücrelerin kaybına yol açar.

FİSH tüm kromozom veya lokusa-özgü flöresanla işaretli problar kullanılarak duyarlılık artabilir. Genelde kromozom kayıp veya kazanımlarında translokasyonların saptanmasına göre daha duyarlıdır. Avantajları vardır: 1) Özgüllüğü, 2) Çok sayıda hücrede kısa zamanda çalışılabilmesi, 3) İn vitro kültüre gereksinim olmaması, 4) Hem metafaz hem de bölünmeyen interfaz hücrelerinin analiz edilebilmesi, ve 5) DAPİ ile hücre morfolojisi değerlendirilmesi yanısıra 6) Fikse edilen hücrelerde yeniden değerlendirilme yapılabilmesine izin verebilmesidir. Özellikle interfaz FİSH yöntemi ile periferik kan analizde kullanılabilir. Translokasyon problarında iki sinyalin birlikte yerleşimi ile yanlış pozitif sonuçlar alınabilmesi bu yöntemin duyarlılığını sınırlar.

PCR yöntemi ile nükleik asit amplifikasyon teknikleri MRH saptamada en duyarlı yöntemdir. Bu yöntemle lösemiye özgü translokasyonlar, klona özgü immunglobulin ağır zincir (IgH) ve T-hücre reseptörü (TCR=T-cell receptor) gen rearanjmanları saptanır. Ayrıca, son zamanlarda hastalık prognozu ve MRH izleminde WT-1, FLT-3 geninin mutasyonları, TAL1 gen anormallikleri vb de bu yöntemle belirlenebilmektedir. Çeşitli PCR yöntemleri ile, kantitatif gerçek zamanlı (RT)-PCR, yuvalanmış (nested) PCR gibi, mevcut anormallikler kantifiye edilebilir. Bu yöntemin aşırı duyarlı olması, özellikle aynı "primer" setlerinin farklı hastalarda kullanımı kontaminasyon nedeniyle yanlış pozitif sonuçlar verebilir. Ayrıca, malign klon geçici olarak tanısal transkriptleri eksprese etmez ise yanlış negatif sonuçlar da alınabilir.

İmmunfenotipleme de ise fluoresan mikroskobu veya akım sitometri yöntemi kullanılır. Bu yöntemlerinde birtakım dezavantajları vardır: 1) Malin hücrelerin normal hücrelere benzer antijen profili göstermesi, 2) Birkaç altpopulasyonun bulunması ve bazısı az miktarda olduğu için tanımlanmasının bu yöntemler ile zorluğu ve 3) Nükste fenotipik dönüşümün tanımlanamamasıdır.

Günümüzde MRH belirlemede en geçerli kantitatif yöntemler:

1) Çok parametreli akım sitometri yöntemi ile immunfenotipleme,
2) İmmunglobulin ve T-hücre reseptör (TCR) genlerinin rearanjman olan "juntional" bölgelerinin PCR ile tayini, ve
3) Kromozomal anormalliklerine eşlik eden füzyön transkriptleri, kromozomal veya moleküler rearanjmanların etrafındaki kırılma-noktası bölgeleri ve anormal eksprese edilen genlerin PCR ile tayinidir.

Bu üç laboratuvar yönteminin avantajları, dezavantajları, uygulanabilirlikleri ve duyarlılıkları tablo 2'de özetlenmektedir (6,7). Birçok çalışma akut lösemide MRH'nin kuvvetli ve bağımsız bir prognostik faktör olduğunu göstermektedir. MRH saptamada kullanılan submikroskobik yöntemler konvansiyonel yöntemlerden en az 100 kat daha duyarlıdır.

Tablo 2: Akut Lösemide MRH Saptamada En Sık Kullanılan İmmuntiplendirme ve PCR Yöntemlerinin Kullanımı, Duyarlılığı, Avantaj ve Dezavantajları

		PCR		
	İmmuntipleme	**Ig/TCR rearanjmanları**	**Füzyon gen transkriptleri**	**Kimerizmin VNTR/STR ile PCR analizi**
Kullanımı				
Çocuklukta				
AML	% 75 - 85	< % 10	% 25 – 30	> % 95
Öncül B-ALL	% 60 - 95	> % 95	% 30 - 35	> % 95
T-ALL	> % 95	> % 95	% 10 - 20	> % 95
Yetişkinlerde				> % 95
AML	% 75 - 85	< % 100	% 10 - 20	> % 95
Öncül B-ALL	% 80 - 90	> % 90	% 35 - 40	> % 95
T-ALL	> % 95	> % 95	% 10 - 20	> % 95
Duyarlılık	10^{-3} – 10^{-4}	10^{-4} – 10^{-5}	10^{-4} – 10^{-6}	10^{-2} – (hücre ayrılması sonrası 10^{-4})
Avantajları	+Hızlı +Görece hastaya özgün +Normal hücrelerde informatif +Görece kolay +Tek hücre analizi +Hücre canlılığı tanımlanabilir	+DNA stabilitesi +Hastaya özgü +DNA miktarı göreceli stabil	+stabil hedef +(gerçekte) zemin yok +Görece kolay ve hızlı	+Çoğu hastada kullanılabilir +Engraftman analizinde yararlı
Dezavantajları	+Normal hücre zemini +İmmunfenotipik şift +Altklon	-Rearanjman kaybı (devam eden/ikincil rearanjmanlar ve/veya altklonlar) -Genomik instabilite -Yoğun ve zaman alıcı -Normal hücre zemini -Yüksek kompleksite	-RNA insatbilitesi -Değişen ekspresyon düzeyleri (hasta ve zaman arasında) -Tümöre özgü (kontaminasyon riski)	-Duyarlılığı sınırlı -Lösemiye özgü değil

Kaynak: *Van der Velden VH, et al. Detection of Minimal Residual Disease in Acute Leukemi. J Biol Regulators&Homeostatic Agents. 2004: 18: 146-154; Uzunel M. The Methodology and Significance of Minimal Residual Disease Detection after Allogeneic Stem Cell Transplantation.Karolinska University Press. 2003*

AKIM SİTOMETRİ YÖNTEMİ İLE MRH SAPTANMASI

Normal kemik iliği ve perifer kanda eksprese edilmeyen immunfenotiplerin lösemik hücreler tarafından eksprese edildiğinin saptanması ile MRH çalışmalarında akım sitometrinin (ASM) kullanımını gündeme gelmiştir (3,8). İlk olarak ortak ALL antijeni (CALLA=CD10) ve TdT'nin periferik kandaki hücrelerde olmazken ALL'de lösemik hücrelerde eksprese edilmesi lösemik belirleyici olarak bu antijenlerin kullanımı gündeme getirmiştir (9).

ASM yöntemi ile birkaç hücre parametresi eş zamanlı analiz edilebilir. Hücre büyüklüğü, granülaritesi ve hücre yüzey ve hücre içi moleküllerin ekspresyon şiddeti birlikte değerlendirildiğinde lösemik hücreler normal hücrelerden immunfenotipik özellikler ile ayırt edilebilirler. PCR yönteminden farklı olarak, ASM'de çalışılan örnekte normal hematopoetik hücre ve hücre canlılığı hakkında da bilgi alınabilir, ölü hücreler ve hücre debrisleri tanınır. Bu nedenle de, geri dönüşümsüz olarak kemoterapi ile hasara uğramış ve daha fazla ekpansiyon yapılamayan (fakat pozitif PCR sinyalleri üretebilen) lösemik hücreler sayıma dahil edilmezler. Bu özellik sayesinde yalnızca analiz edilen örnek taze olduğunda (örn, 4 saat veya az) yani hücrenin sağkalımını sağlayan faktörler olmadığı için hücrelerin apoptozisinin önemli sayıda hücreyi etkilemediğinde bu yöntemin kullanımı yararlıdır. Ayrıca, kısa zamanda çok sayıda hücrede analiz imkanı da sağlar. Ancak, lösemiye-eşlik eden belirgin bir immunfenotip saptanmaz ise MRH çalışmalarında ASM kullanımı sınırlıdır. Günümüzde, bu sınırlama hastaların az bir kısmında görülür ve lösemide yeni belirleyicilerin kullanıma girmesiyle olasılık dışı olay azalacaktır. Hastalık seyri esnasında fenotipik değişiklikler nükste çalışılan hastaların % 20 ile % 70'i arasında değişen sıklıkta meydana geldiği bildirilmiştir (10-13). Normal ve rejenere olan lenfohematopoezin immunfenotipik özelliklerinin ASM ile kesin tanımlanması ile tanısal bir diagnostik immunfenotipik profil yokluğunda da ASM'nin MRH çalışmalarında kullanımına izin verecektir (14-18).

Çalışmalarda hastaların klinik özellikleri ve tedavi sonuçları ile ASM yöntemi ile MRH arasında çarpıcı bir ilişki saptanmıştır (19-22). Çoğu PCR tabanlı analizlere göre, kantitatif PCR dışında, ASM'nin tek bir özel avantajı MRH'ın doğrudan kantifikasyonudur (23).

ASM'nin MRH saptamada duyarlılığı 10^{-4} ile 10^{-5} arasındadır. Duyarlılık çalışılan örnek, fenotipik anormallik tipine, kullanılan monoklonal antikor kombinasyonlarına göre değişir. İki esas değişken ASM sonuçlarını etkiler: 1) Hedef hücreler ile kalan hücreler arasında morfolojik ve fenotipik farklılık derecesi, ve 2) Analiz edilebilen hücre sayısıdır. İdeal koşullarda, yani analiz için çok farklı hedef hücreler ve çok sayıda hücre ($\geq 10^7$) olması, ASM duyarlılığını PCR ile aynı yapar (24).

ASM bazı özel sınırlamalara da sahiptir. Bu yöntem ile 10^5 veya daha fazla normal hücre arasında 1 lösemik hücrenin saptanması gibi aşırı duyarlılığı devamlı sağlamak zordur. Böyle yüksek duyarlılık arzulanabilir, örneğin, hastalığın yamalı bir dağılımına sahip hastalarda MRH saptamada yada otolog graftlar içinde lösemik hücre kontaminasyonunun aranmasında. Diğer bir sınırlama lösemik hücrelerin immunfenotipi hastalık ilerlemesi esnasında değişebilir (Lienage Infedility). Bu değişiklik MRH izlemede kullanılan belirleyicileri etkilerse, yanlış negatif veya pozitif sonuçlar alınabilir (25-27). Bu fenomenin potansiyel dezavantajı her bir hastada kullanılan immun-belirleyici kombinasyonun sayısı ile ters ilişkili olmasıdır. Kısaca, hücreler bir uygun fenotipten daha fazlasını eksprese ederse, kaybolan bir fenotipin etkisi diğer anormal örneğin

devam etmesi ile dengelenebilir. Son olarak da, ASM analizlerinin diğer bir sınırlaması PCR kadar "siyah ve beyaz" görünmez. Bu lösemi hücrelerinin immun-fenotip özelliklerini ayırma sık, ancak devamlı olmayıp, lösemik ve normal hücreler arasındaki antijen ekspresyonundaki kantitatif farklılıkların sonucudur. Yine de, objektif MRH değerlendirmeleri, eğer çeşitli normal örneklerde normal antijenik ekspresyonun sınırları tanımlanırsa ve normal hücreler ile kısmen örtüşen immunfenotiplerin kullanımından sakınılırsa mümkündür.

Lösemik blast hücrelerin immunfenotipi ile normal kemik iliği hücrelerinin immunfenotipini karşılaştıran çalışmalarda lösemik hücrelerin sıklıkla ya anormal immunfenotip yada nadir bir fenotip eksprese ettikleri gösterilir. Bu özellik lösemik blastların normal hücrelerden ayrılmalarına izin verir (17,18,27-32). Bu lösemiye eşlik eden immunfenotipler (LEİFr) genellikle 1) Karşı serideki antijenlerin ekspresyonu (örn, AML hücrelerinde lenfoid antijen ekspresyonu), 2) Aşırı ekspresyon (normal kemik iliğinde gözlenen veya normalde kemik iliğinde eksprese edilmeyen antijenin ekspresyonu), 3) Asenkron ekspresyon (normalde granülositik, monositik ve lenfositik farklılaşma esnasında ardışık olarak eksprese edilen, ancak eş zamanlı eksprese edilmeyen antijenlerin birlikte ekspresyonu), ve 4) Antijen ekspresyon eksikliği (normal granülositik, monositik ve lenfositik farklılaşma esnasında eksprese edilen antijenin eksprese edilmemesi) (29,30,31-35) (Tablo 3). Ayrıca, T hücreli ALL'de, lösemik hücreler normal T lenfositlere benzer belirleyiciler eksprese ederler, fakat bu normal T hücreler özel dokulara sınırlı olup (timus), kemik iliği ve periferik kanda saptanmazlar (3,36,37). Günümüzde LEİFr AML hastalarının % 80 ve ALL hastalarının % 95'inde tanımlanır. Yetişkin akut lösemisinde MRH çalışmasında kullanılan belirleyiciler tablo 4 de gösterilmiştir (38).

Tablo 3: AML de Lösemiye Eşlik Eden Anormal İmmunfenotipler (LEIFr)

LEIF	**Örnekler**
AML de Lösemiye Eşlik Eden Anormal İmmunfenotipler (LAIF)	$CD33^{+}/CD2^{+}/CD34^{+}$ $CD34^{+}/CD13^{+}/CD19^{+}$
Aşırı ekspresyon	$HLADR^{++}/CD33^{++}/CD34^{++}/CD64^{++}/CD4^{++}/CD45^{++}$
Bir antijen ekspresyonunun olmaması	$HLA\text{-}DR^{-}/CD33^{+}/CD34^{+}$
Antijenlerin ekspresyonunun asenkron olması	$CD15^{+}/CD33^{+}/CD34^{+}$ $CD65^{+}/CD33^{+}/CD34^{+}$

(+) ekspresyon; (++) aşırı ekspresyon; (-) ekspresyon yok: Ayrı LEIF AML de lösemik hücrelerin tamamı veya altgrubunda görülür.

Kaynak: *Kern W, et al. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia Crit Rev Oncol&Hematol 2005; 56: 283-309.*

Tablo 4: Yetişkin lösemi MRH izleminde kullanılan belirleyicilerin kombinasyonu (Salamanca Üniversitesi Hastanesinden adapte edilmiştir)

Lösemi alttipi	Kombinasyon	Kullanılabilirlik (%)*
T-hücreli ALL	CD7/CD5/CD3/CD34	70–80
	CD7/CD2/CD3/CD34	70–80
	CD7/CD4/CD8/CD34	60–70
	CD7/CD13/CD3/CD34	15–20
	CD7/CD33/CD3/CD34	15–20
	Anti-TdT/CD5/CD3/CD7	90
B-hücreli ALL	CD10/CD20/CD19/CD34	60–70
	CD10/CD13/CD19/CD34	20–30
	CD10/CD33/CD19/CD34	20–30
	Anti-TdT/CD10/CD19/CD45	70–80
	CD15/CD10/CD19/CD45	5–10
	CD10/anti-NG2/CD19/CD20	3–5
AML	CD34/CD33/HLA-DR/CD45	40–50
	CD34/CD117/CD33/CD45	20–30
	HLA-DR/CD117/CD33/CD34	20–30
	CD15/CD13/CD33/CD34	30–40
	CD15/CD33/HLA-DR/CD34	20–30
	CD15/CD117/CD33/CD34	30–40
	CD34/CD56/CD33/CD45	10–20
	CD7/CD33/CD34/CD45	10–15
	CD2/CD33/HLA-DR/CD34	20–25
	CD19/CD13/CD33/CD34	5–10
	CD34/CD11b/CD33/CD34	5–10
	CD15/anti-NG2/CD33/CD34	5–10

** Gösterilen kombinasyonlarda bir lösemi alttipinde yer alan vakaların yüzdesi duyarlı MRH çalışmalarına izin verir (ALL'de 10^{-4} duyarlılık; AML'de 10^{-3} duyarlılık).*
Kaynak: *Vidriales MB, et al. Minimal residual disease monitoring by flow cytometry. Best Practice&Research Clin Hematol. 2003; 16: 599-612.*

Akut Lenfoblastik Lösemide MRH Saptamada Kullanılan Belirleyiciler

Normal T-hücreli ALL immatür T hücrelerden kaynaklanır. İmmatür T hücreler timusa sınırlıdır halbuki lösemik T lenfoblastlar dolaşabildikleri için, T-hücreli ALL'de MRH çalışmaları immatür T hücre fenotiplerinin kemik iliği ve periferik kanda aranmasını içerir. Bunun için en yararlı immunfenotip TdT veya CD34 ile birlikte CD3 ve CD5 gibi T hücre belirleyicilerin birlikte saptanmasıdır (Tablo 4) (38). Ayrıca, diğer çalışmacılar T-ALL'de CD2 veya CD5 ile birlikte CD7 ve CD3 anormal ekspresyonununda MRH izlemede yararlı olduğuna işaret ederler (39,40).

B hücreli ALL B hücre öncüllerinden kaynaklanır. Bu hücreler kemik iliğinde yer alır ve az miktarda da olsa periferik kanda da bulunabilirler. Bu nedenle, MRH çalışmalarında B hücreli ALL normal B hücrelerden lösemik hücreleri ayırmalıdır. Bu da birkaç molekülün anormal olarak düşük veya yüksek düzeyde lösemik hücreleri eksprese edebilmesi ile mümkündür (14,16,41-43). Örneğin, $CD19^{+}CD34^{+}$ B progenitör hücreli ALL'de miyeloid antijenler, CD13, CD15, CD33 ve CD65 ve olgun B hücre belirleyicileri CD21 eksprese edilebilirken, normal $CD19^{+}CD34^{+}$ B hücre öncülleri bu belirleyicileri eksprese etmezler veya çok zayıf eksprese ederler (44). B hücreli ALL'de CD19, CD10, TdT ve CD34 ekspresyonu normal hücrelerden

önemli oranda farklıdır (düşük veya yüksek) (3,44,45), CD38 ve CD45 (ya da CD45RA) sıklıkla lösemik hücrelerde ekspresyonu düşüktür (41,44).

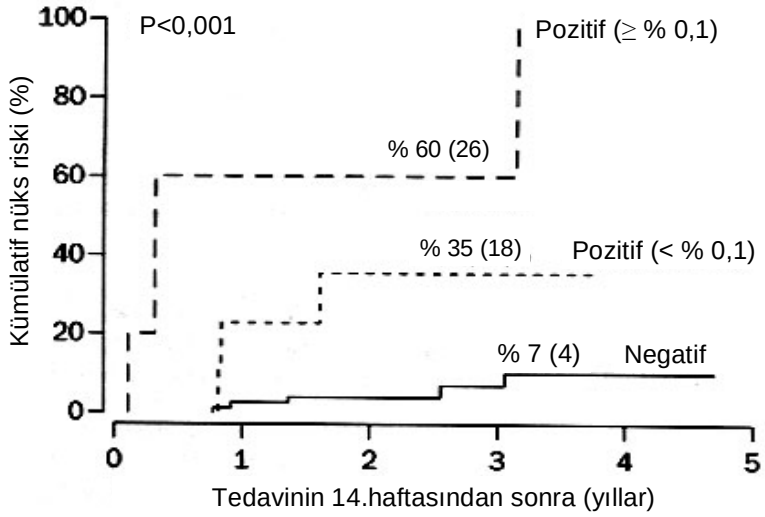
Gen ekspresyon analizlerinin kullanımı ile MRH çalışmalarında belirleyicileri tanımlamak için yeni olasılıklar gündeme geldi (46). ALL hücrelerini normal B hücre öncüllerinden ayırmak için yapılan gen profili çalışmasında (47), yaklaşık 4000 gen çalışıldı ve bir lösemik örnekten daha fazlasında aşırı eksprese edilen 250'nin üzerinde gen bulundu. Antikorları kolayca elde edilebilen ve ASM ile ekspresyonları ölçülebilen 9'u seçildi. Yedi proteinin (CD58, kreatin kinaz B, ninjurin 1, Ref1, caplastatin, HDJ-2 ve annexin VI) ekspresyonunun normal $CD19^{+}CD10^{+}$ B öncüllere göre B-hücreli ALL'de aşırı eksprese edildiği saptandı. Özellikle CD58 günümüzde B-ALL'de MRH çalışması için en yararlı belirleyicilerden biridir (48). Normal ve lösemik hücrelerin gen profillerinin karşılaştırması akut lösemide yeni, yaygın olarak kullanılabilecek belirleyicileri tanımlayacaktır ve sonunda pratik, güvenilir ve evrensel bir izleme sağlanabilmiştir.

Akut Miyeloblastik Lösemide MRH Saptamada Kullanılan Belirleyiciler

Lösemik miyeloblastlar ile normal kemik iliği miyelositer seri hücrelerini ayırt etmek önemlidir. AML'de ASM ile MRH saptanmasında bazı zorluklar vardır. İmmunfenotipik heterojenitesi nedeniyle (49), AML hücreleri genellikle sıkı kümelenme oluşturmak yerine herbiri pekçok alanda nokta dağılımlar (dot plot) tarzında yayılır. Bu nedenle, herhangi bir belirleyici kombinasyonu ile hücrelerin yalnızca ufak bir kısmı fenotipik olarak anormal olarak görülebilir. Ayrıca, AML hücreleri sıklıkla yüksek otoflöresansı olan normal hücrelerinkine benzer olarak ışık dağılımına sahiptir. Bu özellikler analizdeki karışıklığa neden olur, ve testin duyarlılığını azaltır. Yine de, AML'de duyarlı MRH saptanması olasıdır. Dört renkli ASM kullanılarak AML'li çocuklarda MRH çalışıldığında, çocukların % 48'inde 10000 veya daha fazla normal hücre arasında 1 lösemik hücre ve ayrıca % 37'inde de 1000 hücre arasında 1 lösemik hücre duyarlılığı saptanır (49). San Miguel ve ark.ları AML'li 233 yetişkin hastanın 175'inde (21), Venditti ve ark.ları 93 hastadan 65'inde (50) lösemiye eşlik eden immunfenotipleri saptadılar.

Akut Lenfoblastik Lösemide ASM ile MRH'nin Saptanmasının Klinik Önemi

St Jude Çocuk Hastanesinde 1991-1997 yılları arasında yeni tanı ALL'li çocuk hastalardan (n=316) Total XIII kemoterapisine kaydedilen ve tanıda ayrıntılı immunfenotipleme yapılan 290 hastada prospektif bir çalışmada MRH değerlendirilmiştir (28). Lösemiye eşlik eden immunfenotip saptanan 166 hastanın 158'sinde (% 95,2) remisyon indüksiyon tedavisinin sonunda (tanıdan 6 hafta sonra), tedavinin devamında 14, 32 ve 56.hafta ve tedavi sonunda (120.hafta) kemik iliğinde MRH bakılmıştır. Bu çalışmada 3-yıllık nüks sıklığının tanıda herhangi bir LEIF saptananlarda % 11,3±3,0 (Standart Hata-SH) LEIF negatif olanlarda % 4,8±2,4(SH) olarak bulunmuştur (p=0,04). Remisyon indüksiyon tedavisi sonunda hastaların % 23,4'ünde LEIF pozitif olarak saptanmış ve ayrıca MRH pozitif örnek oranının takip noktalarında anlamlı oranda azaldığı (14.haftada % 17,1, 32.haftada % 5,3 ve 56.haftada %3,6) ve tedavi sonunda hastaların tamamında (n=65) MRH negatifleştiği izlenmiştir. Tüm takip noktalarında MRH pozitifliğinin tedavi başarısızlığı ve nükse eşlik ettiği gözlenmiştir (p=0,002). Tedavinin 14.haftasındaki MRH düzeyinin nüksü kuvvetle öngerebildiğini saptamışlardır (Şekil 1).



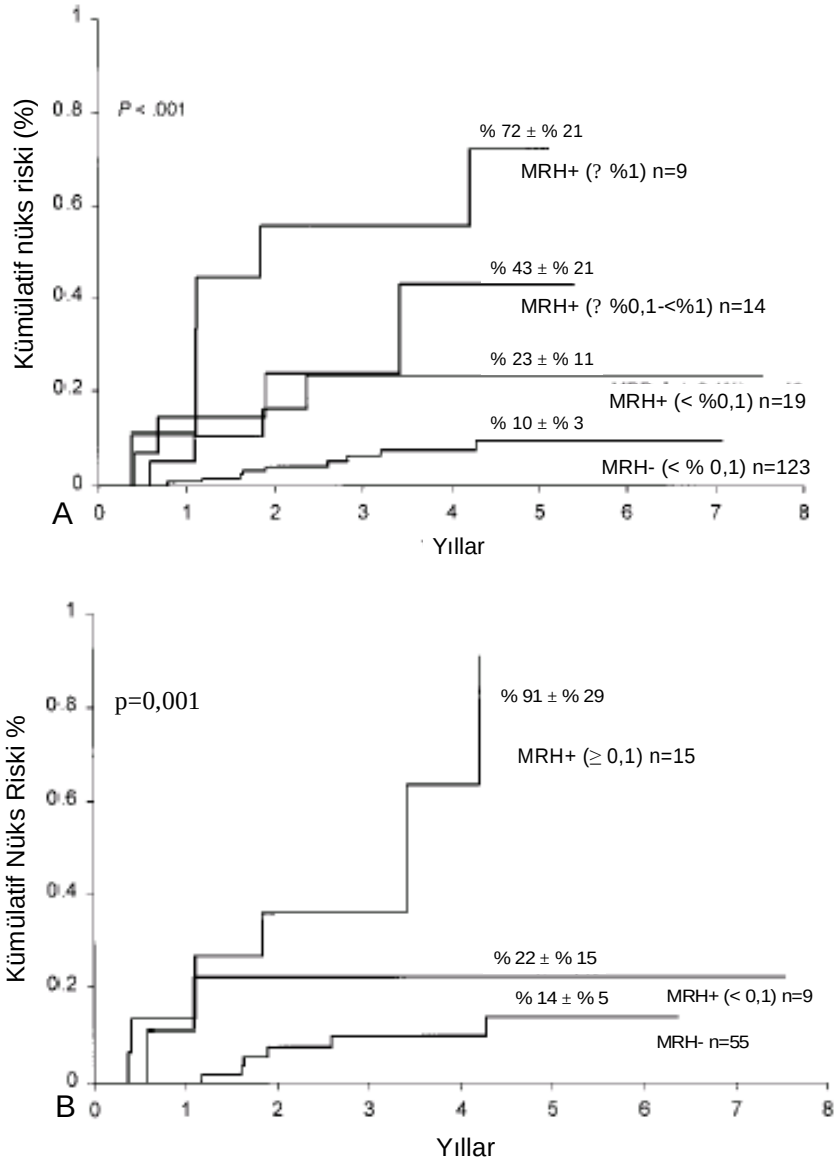
Şekil 1: ALL tedavisinin 14.haftasında MRH düzeyine göre nüks sıklığı ***(Kaynak:*** *Coustan-Smith E, et al. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia.Lancet 1998;351:550-554****)***

Çalışmada vaka sayısı artırılarak (MRH için değerlendirilebilen 195 hasta) çalışmanın sonuçlarını güncellediklerinde (20), değerlendirme yapılan zaman noktalarında MRH pozitifliğinin 5-yıllık nüks olasılığını artırdığını gösterdiler (p<0,001) (Tablo 5). Remisyon indüksiyon sonunda MRH düzeyinin hem hastaların tamamında hem de standart riskli hastalarda nüks olasılığını öngörebildiğini gösterdiler (Şekil 2A ve B).

Tablo 5: ALL'li çocuklarda klinik ve morfolojik remisyon esnasında MRH durumuna göre nüks sıklığı

	Test edilen örnek sayısı	**MRH+ liğinde LEIF (%)**	**5-yıllık nüks sıklığı (SH)**	
			MRH pozitif	**MRH negatif**
İndüksiyon tedavisi sonrası	165	25,5	% 43 ± % 11	% 10 ± % 3
Tedavi devamı				
14.hafta	145	13,8	% 69 ± % 16	% 10 ± % 3
32.hafta	156	3,8	% 86 ± % 17	% 14 ± % 4
56.hafta	163	4,3	% 51 ± % 25	% 12 ± % 4

Kaynak: *Coustan-Smith E, et al. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 2000; 96: 2691-2696.*

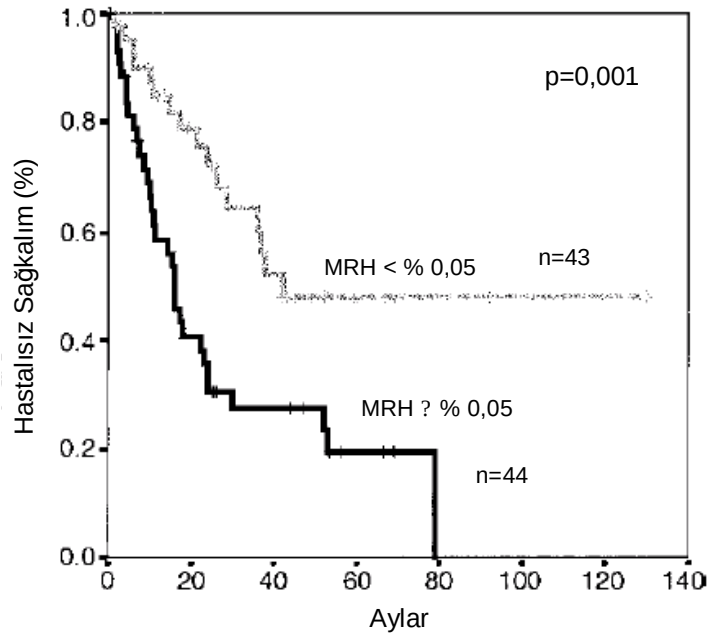


Şekil 2A-B: ALL'li hastalarda (A) ve standart riskli (B) ALL'li hastalarda remisyon indüksiyon sonunda MRH düzeyine göre nüks sıklığı (***Kaynak:*** *Coustan-Smith E, et al. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 2000; 96: 2196-2199*)

Bu çalışmalara benzer olarak Dworzak ve ark.ları ALL'li 108 çocuk hastanın tanı ve takibinde (tedavinin 15.gün, 33.gün, 22-24 hafta, ve az vakada daha ileri bir zaman noktasında) kemik iliği örnekleri ASM yöntemi ile MRH'ın prognostik önemini bildirdiler (22). MRH düzeyi takip dönemindeki örneklerde azaldığını gözlediler. Özellikle 33.günde ve 22-24.haftalarda MRH+ olması nüks olasılığını belirgin artırmaktadır (p<0,001). Bu durumun çok değişkenli analizlerde bağımsız bir risk faktörü olduğu saptanmıştır.

Yeni tanı ALL'li 231 çocukta kemik iliği ve periferik kan örneğini içeren 747 çift örnekte MRH değerlendirildiğinde (51), 78'inde hem kemik iliği hem de periferik kanda MRH pozitif, ancak 67'inde periferik kanda MRH'ın negatif olarak değerlendirilmiştir. Kalan 602 çiftte her iki örnekte de MRH saptanmıştır. T-hücreli ALL'de 179 çift örnekte periferik kan ve kemik iliği birbiri ile uyumlu olduğunu gösterilmiştir. B hücreli ALL'de ise 104 pozitif kemik iliği örneğinden yalnızca 37'inde periferik kan pozitifliği saptanmıştır. Periferik kanda MRH saptanan hastalarda çok yüksek olasılıkla hastalık nüksü olduğu ve B-hücreli ALL'de 4 yıllık kümülatif nüks insidansının remisyon-indüksiyon tedavisi sonunda periferik kanda MRH pozitif saptananlarda % 80 ± % 24,9, fakat yalnızca kemik iliğine sınırlı ise % 13,3 ± % 9,1 olduğunu göstermişlerdir (p=0,007): Bu sonuçlar periferik kanın MRH izlemede T-hücreli ALL'de kullanılabileceği ve remisyon-indüksiyon tedavisi sonrası periferik kanda MRH pozitif B-hücreli ALL'li hastalarda çok yüksek nüks riski olduğu sonucuna ulaşmaktadır.

Yetişkin ALL'de mevcut terapötik rejimler ile nüks insidansının yüksek ve uzun-dönem sağkalım olasılığının düşük olması nedeniyle MRH değerlendirilmesinin klinik önemi vardır. Yetişkin ALL'de MRH değerlendirmesinde ASM kullanımı ile ilgili az sayıda çalışma vardır ve ilk çalışmalar örneklerin ardışık takibine dayanır. Çoğu çalışmada residual blast sayısının yüksek olması ve/veya bir artış saptanması hematolojik nüksün yakın zamanda olacağını öngörmektedir. Yirmidokuz yetişkin ALL'de yapılan çalışmada takipte iki ardışık çalışmada MRH ≥ 10^{-3} veya artış eğiliminde olması yüksek nüks riskine eşlik ettiği gösterilmiştir (40). GIMEMA LAL0496 protokoluna alınan 53 T-ALL'li yetişkin hastalık bir seride tedavinin ilk yılında farklı takip noktalarında CD3 ve TdT'nin birlikte ekspresyonuna göre MRH saptanmasının yüksek nüks riskini öngördüğü bildirilir (52). Bu çalışmada konsolidasyon öncesi, 3.reindüksiyon ve 6.indüksiyon tedavisi öncesi MRH pozitif ve negatif olanlarda 2 yıllık hastalıksız-sağkalım % 39'a karşın % 82 (p=0,0007), % 16 karşın % 55 (p=0,009) ve % 16 ya karşın % 50 (p=0,03) idi. Adölesan (>14 yaş) ve yetişkin ALL'li 102 hastalık büyük bir seride tedavinin ilk fazın esnasında ASM yöntemi ile saptanan MRH düzeyinin nüks ile doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir (53). Tedavinin 35.gününde kemik iliğinde düşük düzeyde MRH olanlarda (MRH < %0,05) yüksek düzeyde MRH saptananlara göre hastalıksız sağkalımı daha uzundur (medyan 3 yıllık hastalıksız sağkalım 42 aya karşın 16 ay, p=0,001) (Şekil 3). MRH'nin prognostik gücü test zamanında yalnızca morfolojik remisyonda olanlar değerlendirildiğinde de devam etmiştir (medyan 3 yıllık hastalıksız sağkalım 42 aya karşın 17 ay, p=0,001). ASM ile tedavinin 14.gününde MRH çok düşük (< % 0,03) veya negatif olan 12 hastanın prognozlarının çok iyi olduğu gözlenmiştir (tahmini hastalıksız sağkalım 5 yılda % 90). Aksine, MRH'lı (> % 0,1) hastaların hepsi 2 yılda nüks etmiştir. Çok değişkenli analizde, adölesan ve yetişkin ALL hastalarında 35.gün MRH değerlendirmesi en kuvvetli bağımsız prognostik belirleyiciydi (p=0,01); yaşla birlikte (p=0,05) ve tanıdaki lökosit sayısı ile (p=0,05). 35.günde morfolojik remisyonda olan hastalar arasında yalnızca MRH düzeyleri (p=0,02) ve Philadelphia kromozomu (p=0,02) hastalıksız sağkalım için bağımsız bir değişkendi.



Şekil 3: Tedavinin 35.günü MRH ile hastalıksız sağkalım ilişkisi ***(Kaynak:*** *Vidriales VB, et al. Minimal residual disease (MRD) in adolescent (>14 years) and adult acute lymphoblastic leukaemias (ALL): early immunophenotypical evaluation has high clinical value. Blood. 2003;101:4695-700*).

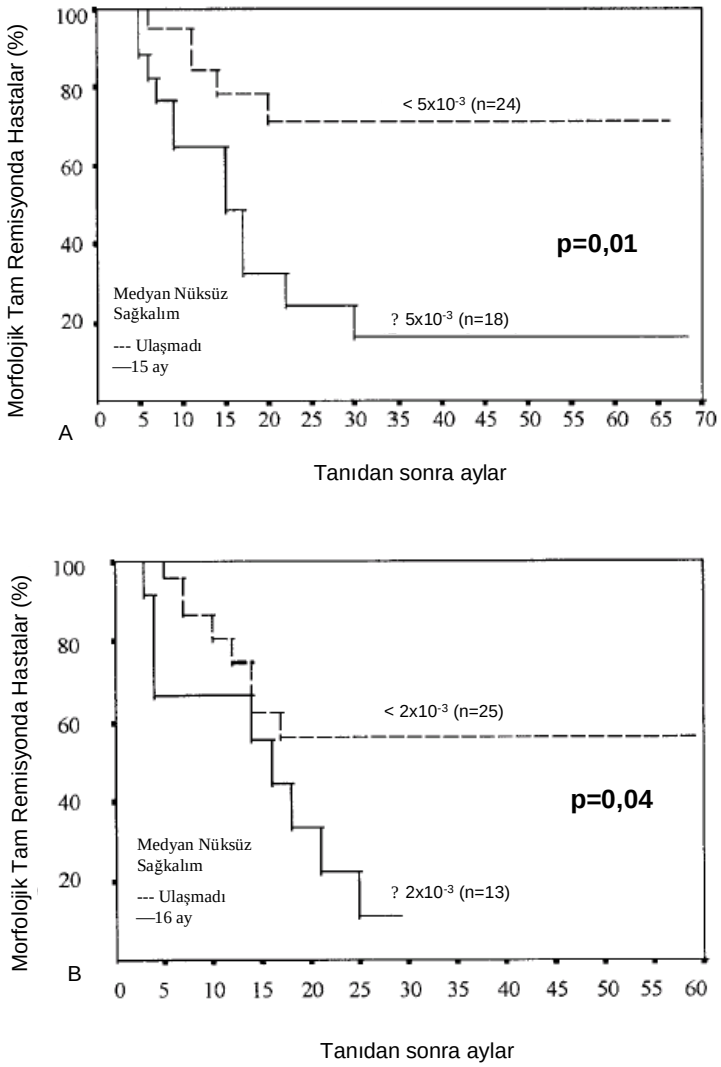
Allojeneik transplantasyon grubunda yapılan öncalışmalar MRH'nin immunfenotipik olarak araştırılmasının klinik olarak yararlı olduğunu gösterir. Çocuk ve yetişkin hastayı içeren (n=24) bir çalışmada transplantasyon öncesi mononüklear hücrelerde yüksek MRH saptanan (≥ % 0,2 blast hücresi) hastalarda MRH düşük düzeyde olanlara göre nüks oranı anlamlı oranda yüksek bulunmuştur (hastalıksız sağkalım % 33,3 e karşı % 73,5, p=0,03) (54). MRH düzeyinde transplantasyon sonrası artış saptanan 8 hastanın 1 ile 6 ay sonra nüks ettiği, MRH stabil düzeyde kalan 2 hastanın remisyonda seyrettiği gözlenmiştir.

Sonuçta çok parametreli ASM'nin MRH değerlendirmede kullanımı nüks olasılığını öngörebilir ve yeni alternatif tedavi yaklaşım(ları) gerektiren kötü prognozlu hastaların tanımlanmasını sağlar.

Akut Miyeloblastik Lösemide ASM ile MRH'nin Saptanmasının Klinik Önemi

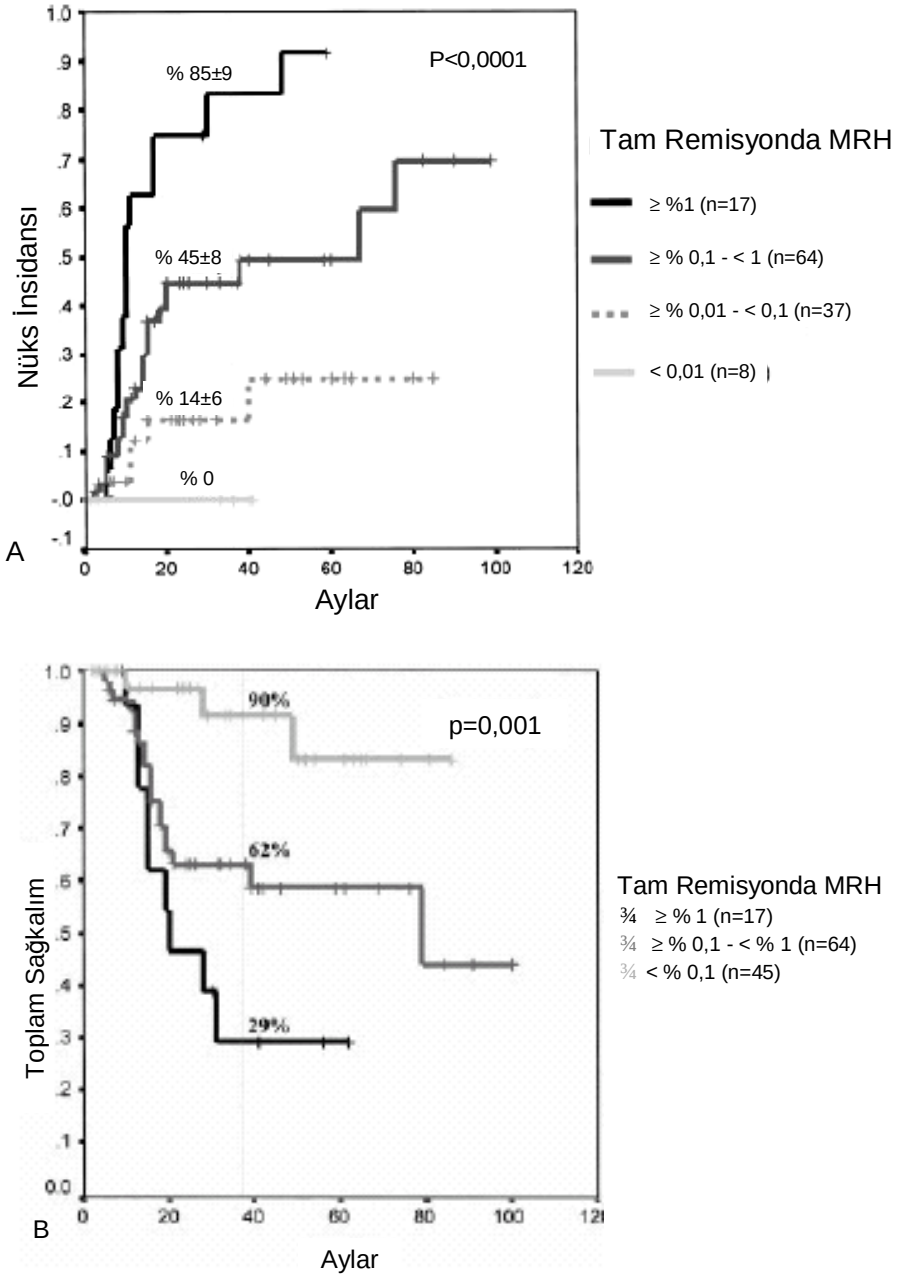
İmmunfenotipik yöntemlerle MRH ile nüks arasındaki ilişkiyi değerlendiren ilk çalışmalar 1990 yıllarında bildirilir (8). Bu çalışmalar flöresan mikroskobu ile TdT ve myeloid antijenlerin (CD13 ve CD33) anormal olarak birlikte ekspresyonunu gösteren çift-monoklonal antikorların kullanımını esas almaktaydı. ASM ile yapılan ilk çalışmalar az sayıda hasta grubu içermekteydi ve immunfenotipik olarak MRH'ın prognostik önemini teyit etmekteydi (34,55). Erken yıllarda yapılan bir çalışmada 45 yetişkin AML hastasında ilk tam morfolojik remisyonda kemik iliğinde hastaların 2/3'ünde > % 0,5 fenotipik olarak anormal hücre saptandı ve bu hastaların yarısı bir yıl içinde nüks etti (56).

Tanıda immunfenotipleme yapılan 53 yetişkin AML hastasında LEİF saptanan ve morfolojik tam remisyon elde edilenlerde kemik iliğinde indüksiyon tedavisi ve intensifikasyon tedavisi sonunda MRH düzeyinin hastalıksız sağkalıma etkisi değerlendirilmiştir (57). İndüksiyon sonrası MRH düzeyi % 0,5 ve intensifikasyon tedavisi sonunda % 0,2'ye göre hastalar iki farklı gruba ayrıldığında istatiksel olarak farklı hastalıksız sağkalımına ulaşılabileceği gösterilmiştir (Şekil 4A ve B).



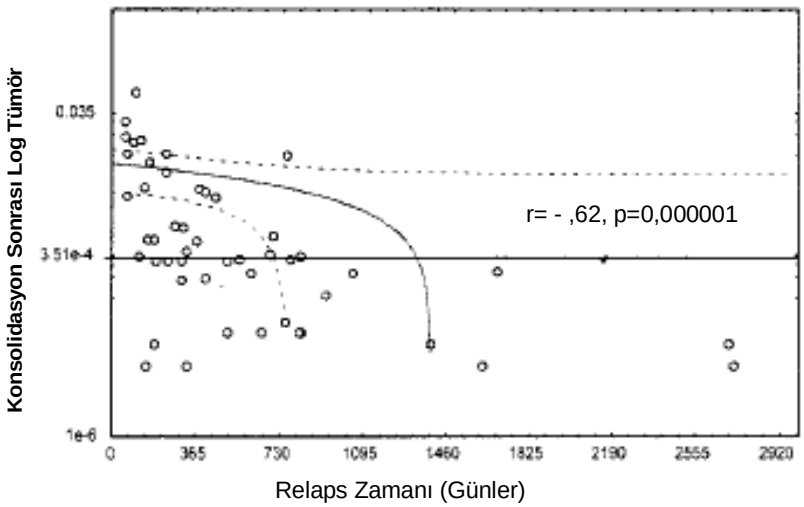
Şekil 4A-B: İndüksiyon tedavisi sonunda (A) ve intensifikasyon tedavisi sonunda (B) MRH düzeyi ve hastalıksız sağkalım ilişkisi ***(Kaynak:*** *San Miguel JF et al. Immunophenotyping investigation of minimal residual disease is a useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukemia patients.Blood 1997;90:2465-70)*

Aynı çalışmacılar 2001 yılında indüksiyon tedavisi sonrası morfolojik remisyonda olan yetişkin AML'li hastalarda MRH değerlendirmesinin çok bilgi verici olduğunu gösterdiler (21). Bu çalışmada 126 yetişkin AML hastası çalışılmış ve indüksiyon tedavisi sonrası MRH düzeyi ile nüks arasında ve toplam sağkalım arasında pozitif bir ilişki saptanmıştır (Şekil 5A-B).



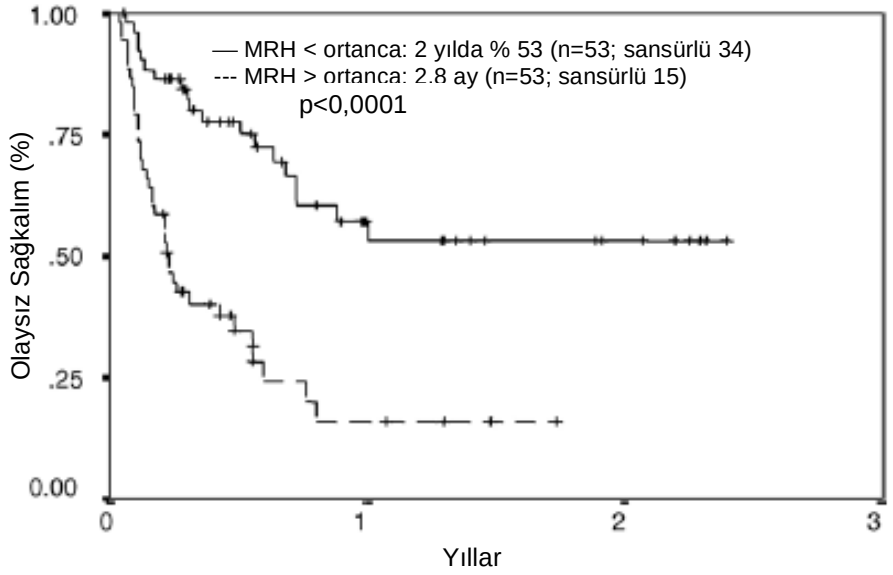
Şekil 5A-B: Morfolojik tam remisyonda MRH düzeyine göre 4 farklı risk kategorisinde nüks sıklığı (A) ve 3 risk kategorisine göre genel sağkalım (**Yüksek Risk**:MRH>10^{-2} LEIF+ hücre; **Orta Risk**: MRH= 10^{-3}-10^{-2} LEIF + hücreler; **Düşük Risk**: MRH <10^{-3} LEIF+ hücreler ve **Çok Düşük Risk**: <10^{-4} LEIF+ hücreler-hiç biri nüks etmedi) ***(Kaynak:*** *San Miguel JF et. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. Blood 2001;98:1746-1751*)

Diğer bir çalışmada ise 51 hastada konsolidasyon sonrası MRH çalışıldığında, en belirleyici MRH düzeyinin ‰ 0,35 olduğu saptanmıştır (Şekil 6) (50).

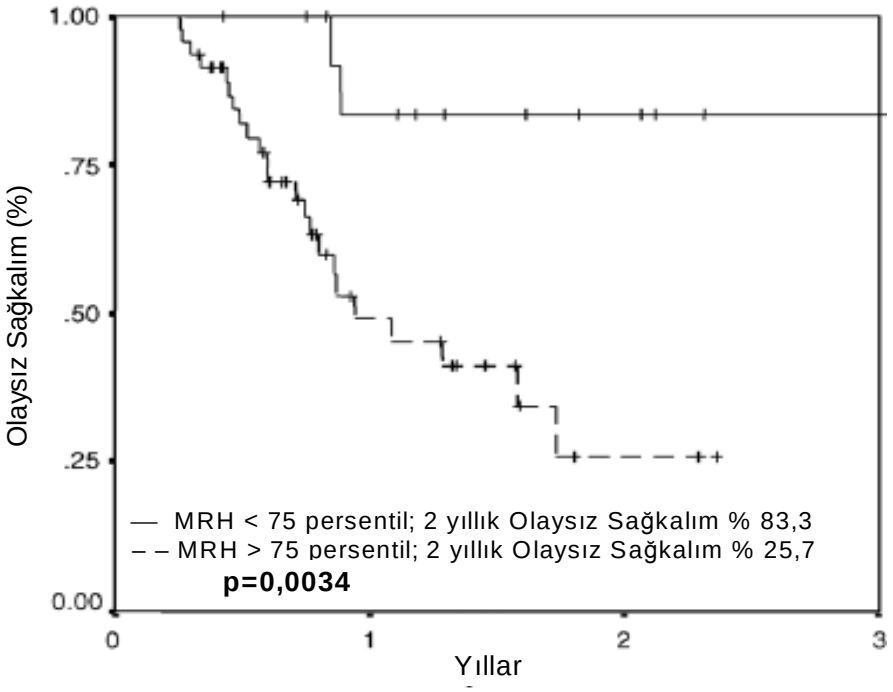


Şekil 6: Konsolidasyon Sonrası MRH Düzeyi ile Relaps zamanı Arasında İlişki (Sürekli tam remisyonda kalan hastalarda konsolidasyon sonunda residuel lösemik hücre miktarı $<3,5x10^{-4}$) (***Kaynak:*** *Venditti A et al. Level of minimal residual disease after consolidation therapy predicts outcome in acute myeloid leukemia Blood 2000; 96:3948-3952*).

Munõz ve ark.ları AML'li ve MLL-gen rearanjmanı olan indüksiyon ve/veya intensifikasyon tedavisi sonrası ASM ile yüksek MRH ($> 3x10^{-3}$) saptanan 6 hastanın 5'inin nüks ettiğini bildirmiştir (58). Yukarıda bahsedilen çalışmalar ASM için analizler genelde tam remisyon sonrası MRH değerlendirmesidir, son zamanlarda yayınlanan bir çalışmada indüksiyon tedavisi tamamlandıktan sonra hastanın aplazi döneminde sitomorfolojik olarak residuel hücre miktarı hastaların tam remisyona ulaşması ve uzun dönem sonuçları üzerinde bağımsız bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir (59). Kern ve ark.ları 2003 yılı ASH kongresindeki bildirilerinde 106 AML hastasında tanıda ve indüksiyon tedavisinin 16.günü aplazide iken ASM ile belirlenen MRH düzeyi ile tam remisyon elde edilmesi (p=0,0001), olaysız (p=0,0001), relapstan bağımsız (p=0,0003) ve genel sağkalım (p=0,003) arasında kuvvetli bir ilişki göstermişlerdir. Prognoz üzerine etkileri diğer değişkenlerden bağımsız olduğuda saptanmıştır (Şekil 7) (60,61). Konsolidasyon öncesi ve sonrası MRH hastalık için ayrıca analiz yapıldığında MRH'ın her iki zaman noktasında da bağımsız bir prognostik değişken olduğudur (Şekil 8).

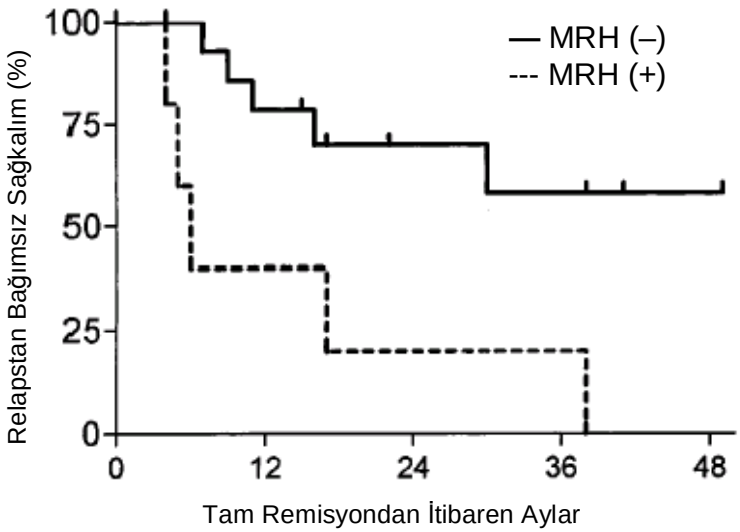


Şekil 7: ASM ile 16.günde MRH'ın prognostik etkisi *(**Kaynak:** Kern W, et al. Prognostic impact of early response to induction therapy as assessed by multiparameter flow cytometry in acute myeloid leukemia. Blood 2003;102:876a)*



Şekil 8: Çok parametreli ASM ile konsolidasyon sonrası MRH'ın prognostik önemi *(**Kaynak:** Kern W, et al. Prognostic impact of early response to induction therapy as assessed by multiparameter flow cytometry in acute myeloid leukemia. Blood 2003;102:876a)*

Otolog hematopoetik hücre nakli yapılan AML'li hastalarda ASM ile otolog graft içeriğindeki MRH ile hastalık nüksü arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (Şekil 9) (62).



Şekil 9: Otolog graftta MRH ile hastalıksız sağkalım ilişkisi *(**Kaynak:** Reichle A et al. Transplant characteristics: Minimal residual disease and impaired megakaryocytic colony growth as sensitive parameters for predicting relapse in acute myeloid leukemia. Leukemia 1999;13:1227-1234)*.

Sonuçta, ASM yöntemi ile MRH değerlendirmesi tüm AML hastalarında kullanılabilir. AML'de morfolojik tam remisyonda, indüksiyon tedavisinden sonra elde edilen ilk kemik iliği örneklerinde MRH değerlendirmesi daha spesifik konsolidasyon tedavilerine yönlenmekte yardımcı olabilir. Klinik çalışmalarda prognostik belirleyici olarak remisyon sonrası sınıflandırma ve risk stratifikasyonunda kullanılabilir.

POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU YÖNTEMİ İLE MRH SAPTANMASI

Pek çok hematolojik malignitede klinik sonuç ile PCR yöntemiyle saptanabilen çok düşük düzeyde hastalığa özgü belirleyiciler arasında önemli oranda ilişkili olduğu gösterilir. MRH saptamada PCR'ın üç esas hedefi vardır (63):

1) İmmunglobulin (Ig) allel veya T hücre reseptör (TCR= T-cell reseptor) genlerinin rearanjmanları,
2) Kromozom anormalliklerinin kırılma noktası füzyon bölgeleri ve füzyon gen transkriptleri, ve
3) Anormal genler veya anormal eksprese edilen genler.

Bu hedeflerin bazısı lösemi hücrelerine yüksek oranda özgüldür ve normal hücrelerde çok düşük veya hiç yoktur. Bu hedeflere başvurma ve duyarlılık hastalıklara göre değişir (Tablo 6). Kronik miyelositer lösemi ve ALL'de saptanan bir PCR hedefi tüm hastalarda normalde düşük düzeyde bulunabilir iken, AML'ye özgü PCR hedefleri yalnızca hastaların % 30-50'sinde saptanır.

Tablo 6: Akut lösemilerde MRH-PCR hedefleri, duyarlılığı ve kullanımı

	Ig/TCR gen rearanjman.	**Füzyon genleri (örn, transkriptler)**	**Diğer genler**		
			FLT3-ITD	**WT-1**	**HOX11L2**
Duyarlılık	**10^{-4} – 10^{-5} (%)**	**10^{-4} – 10^{-6} (%)**	**10^{-4} – 10^{-5} (%)**	**10^{-4} (%)**	**10^{-4} (%)**
B hücre					
Öncül B-ALL çocuk	95	40 – 50	< 2	Veri yok	< 2
Öncül B-ALL yetişkin	90	35 – 45	< 2	70 – 90	Veri yok
T hücre					
T-ALL çocuk	> 95	10 – 25	< 2		20 – 35
T-ALL yetişkin	90	5 –10	< 2	75	20 – 35
Miyeloid seri					
APL	Veri yok	> 95	20 –30	Veri yok	Veri yok
AML çocuk	5 – 10	20 – 40	10 – 20	85 – 100	< 2
AML yetişkin	5 – 10	10 – 20	15 –30	85 -100	Veri yok

Kaynak: van der Velden VHJ, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J and van Dongen JJM. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspect. Leukemia 2003;17: 1013-1034.

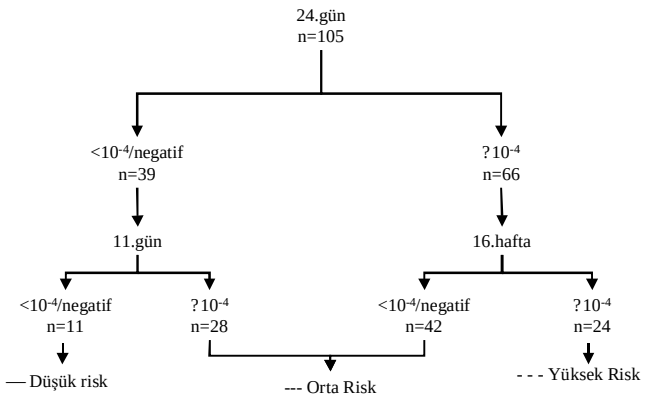
Ig/TCR Gen Rearanjmanları

Erken B ve T hücre farklılaşması esnasında Ig ve TCR gen komplekslerinin V, D ve J gen segmentleri yeniden düzenlenir, ve böylece herbir lenfosit özel bir V-D-J segment kombinasyonuna sahip olur. Her bir lenfoid (öncü) hücrenin birbirinden farklı olduğu sanılan rearanje olmuş Ig veTCR gen "junctional" bölgelerine sahiptirler ve bu özellikte tek bir "DNA-parmak izi" sekansı oluştururlar. Bir lenfoid malignitenin tüm hücreleri aynı Ig ve/veya TCR gen rearanjmanları ile ortak bir klonal orijine sahiptirler. Bu nedenle Ig ve/veya TCR gen "junctional bölge" rearanjmanları PCR hedefleri olarak kullanılırlar. ALL'de Ig/TCR gen rearanjmanları altklon oluşturma eğiliminde olabilir. Tanıda saptanan oligoklonun nükste yeniden ortaya çıkacağı kesin değildir, yine de PCR ile MRH takip edilmesi önerilir. Ancak ikincil Ig/TCR gen rearanjmanları ve devam eden Ig/TCR gen rearanjmanları tanı ve nüks arasındaki zaman periyodunda oluşabilir. Tüm B-hücreli ALL hastaları IgH zincir gen rearanjmanlarına sahiptir. Ayrıca Ig kappa delesyon bölümündeki (IgK-Kde) rearanjman kısmen yüksek sıklıkta bulunur (yaklaşık % 60). Çoğu T-ALL hastalarında TCR-B, TCR-G ve/veya TCR-D genleri rearanjmanı olur. B hücreli ALL'de TCR gen rearanjmanları saptanabilir. Doksandört B-ALL'li çocuk hastada tanıda tanımlanan Ig ve TCR gen rearanjmanlarının hastalık nüksünde % 71'inde saptandığı gösterilmiştir. En stabil olan IgK-Kde rearanjmanları, en az stabil olan ise TCR-D rerararanjmanları olduğu görülmüştür (63,64). Çocukluk öncül B-ALL'de monoklonal MRH-PCR hedefleri yüksek oranda stabil iken, oligoklonal MRH-PCR hedefleri nükste sıklıkla kaybolur (65,66). Yanlış negatif MRH sonuçlarını azaltmak için klinik çalışmalarda her hastada ***en az iki Ig/TCR hedefi belirlemek gerekir***.

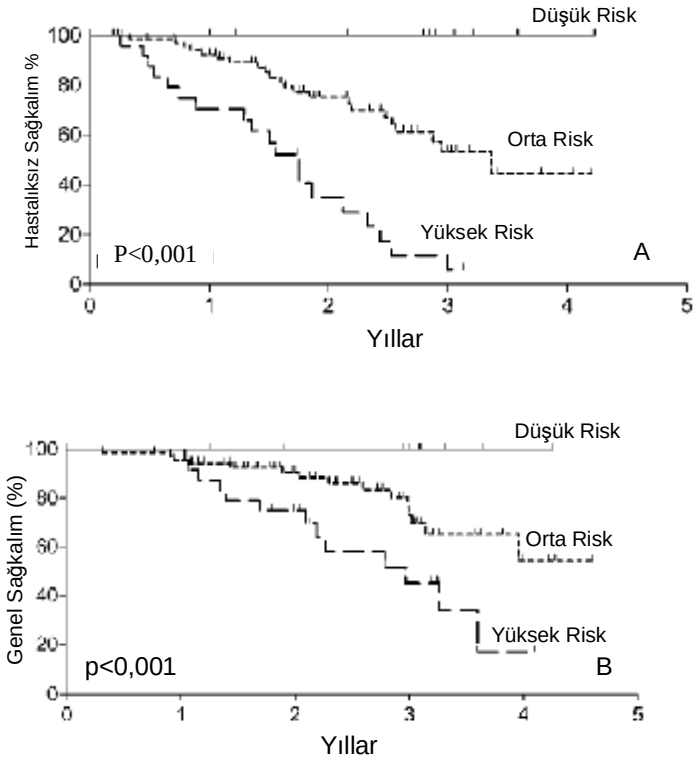
Çok merkezli lösemik hücrelerin klonalite tayininde TCR veya Ig gen rearanjmaları kullanılarak 246 çocuk hastada MRH > 10^{-2} olduğunda nüks için rölatif riskin 16 olduğu, konsolidasyon

sonrası MRH > 10^{-3} ise riskin 7 ve idame sonrası pozitiflik devam ederse riskin 9 olduğu saptanmıştır (67). Çok değişkenli analizde de diğer risk faktörlerinden sonra, yaş, yüksek lökosit sayısı ve immunfenotip gibi, MRH saptanması nüksü öngörmede bağımsız bir değişken olduğu gösterilmiştir. Diğer bir çalışmada iki farklı zaman noktasında (indüksiyon sonrası ve konsolidasyon öncesi) TCR ve Ig gen rearanjmanları ve TAL1 delesyonları PCR ile değerlendirilerek, MRH düzeyi temel alınarak nüks olasılığına göre hastalar üç gruba ayırdıklarında (68), 3-yılık nüks oranı yüksek riskli hastalarda (MRH > 10^{-3}) % 73, orta risk grubunda ($\geq 10^{-2}$-10^{-3}) % 23 ve MRH negatif olanlarda ($\leq 10^{-4}$) ise % 2 olduğu gözlenmiştir (p<0,0001).

Alman grubunun çok merkezli, herhangi bir konvansiyonel kötü prognostik kriteri olmayan standart riskli 196 yetişkin ALL hastasında, prospektif olarak kantitatif PCR ile farklı zaman noktalarında MRH değerlendirmesi ile hastalık seyri arasındaki ilişki sonuçları bildirilmiştir (69). Bu çalışmada hastaların tümü GMAL 06/09 standart risk prokolundadır. Bu çalışmada standart risk tanımlaması aşağıdaki kriterler esas alınarak yapılmıştır: 1) t(4;11)/MLL-AF4 ve t(9;22)/BCR-ABL olmaması; 2) Tanıda lökosit sayısı < 30x10e9/L olan common-/pre-B-ALL veya lökosit sayısı < 100x10e9/L olan kortikal- veya olgun-T-ALL; 3) Yaş 15-65 yıl arası; ve 4) Faz I indüksiyon tedavisi sonrası tam remisyona ulaşma. Tanıda tüm hastalarda TCR genleri TCR-B, TCR-G ve TCR-D ve Ig genleri IgH ve IgK-Kde için klonalite analizi yapılmış ve MRH indüksiyon tedavisi sonrası 9 farklı zaman noktasında değerlendirilmiştir. Hastaları MRH düzeyinde azalmaya göre üç farklı risk grubuna ayırmışlardır (Şekil 10): Hastaların % 10'u düşük risk grubunda (MRH $\leq 10^{-4}$) ve 3 yıllık nüks oranı % 0 iken, hastaların % 23'ü yüksek risk grubunda ve nüks oranı % 94 (% 95 CI; % 83-% 100) ve kalan hastalar orta risk grubunda ve nüks oranı % 47 (% 31-% 63) (p<0,001) olarak bildirilmiştir (Şekil 11A). Benzer olarakta MRH düzeyinin toplam sağkalıma etkisi gözlenmiştir (Şekil 11B).



Şekil 10: İndüksiyon tedavisinin 11.günü, 24.gün ve 26.haftadaki MRH-düzeyleri esas alınarak risk grupları (*Kaynak: Brüggemann M, et al. Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard risk acute lymphoblastic leukemia. Blood 2006; 107:1116-1123*)



Şekil 11: Risk gruplarına göre hastalıksız (A) ve toplam sağkalım (B) (*Kaynak: Brüggemann M, et al. Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard risk acute lymphoblastic leukemia. Blood 2006; 107:1116-1123*)

Mortuza ve arkları yetişkin B-ALL'li 85 hastada yarı-kantitatif PCR yöntemiyle IgH analizi yapıldığında kemik iliğinde tedavinin ilk 2 yılında 4 farklı zamanda MRH değerlendirilmiş ve tüm zaman noktalarında MRH pozitifliğinin nüks sıklığını artırdığı ve hastalıksız sağkalımı kısalttığını göstermişlerdir (70). Bu çalışmada hastalara yalnızca kemoterapi (n=50) veya 1.tam remisyonda iken otolog (n=16) yada allojeneik kemik iliği nakli (n=19) yapılmıştır. Allojeneik transplantasyon yapılanlarda transplantasyon sonrası MRH durumu ve otolog transplantasyonda ise transplantasyon öncesi MRH pozitifliğinin tam remisyon süresine etkisi olduğu saptanmıştır. Ayrıca çok değişkenli analizde nüksü öngermede bağımsız bir değişken olduğu da vurgulanmıştır.

Transplantasyon öncesi PCR ile Ig gen (IgH ve IgK-Kde) ve TCR gen (TCR-D ve TCR-G) rearanjmanları ile MRH değerlendiren bir çalışmada (71), 30 ALL hastasının 15'i yüksek MRH (10^{-2} - 10^{-3}), 10'u düşük MRH (10^{-4} - 10^{-5}) ve 5'inde ise MRH negatifti. Hastalık nüksü sıra ile 8, 5 ve 0 hastada gözlendi (p=0,05). Transplantasyon öncesi MRH yüksek ve düşük olan grupta nüks oranları arasında istatistiksel fark saptanmamıştır. Ancak bu çalışmada yazarlar yüksek ve düşük MRH grubu arasında fark olmamasını vaka sayısının az olması ve transplantasyon hazırlık rejimi ve bazı hastalarda T-hücre deplesyonu yapılması istatistiksel sonuçları etkilediği düşüncesindedirler.

Standart riskli yetişkin ALL'de Almanların Çok Merkezli çalışmasında (GMAL) tedavi sırasında ve birinci yılında ki MRH düzeyine göre risk sınıflaması yapmışlar (Tablo 7) ve bu sınıflandırmaya göre de tedavilerini planlanmıştır. Düşük riskli hastalarda tedavi sonlandırılmış, yüksek riskli hastalarda ise kök hücre nakli veya deneysel tedaviler planlanmıştır. Orta risk grubunda ise yoğunlaştırılmış idame tedavisi verilmiştir. Ön sonuçlar böyle bir sınıflandırmanın güvenilir olduğunu göstermektedir. GMAL07/2003 MRH için ara değerlendirmeyi indüksiyon ve iki konsolidasyon tedavisi sonrayı yapmayı planlayarak, yüksek riskli MRH hastalarını belirlemeyi amaçlamıştır (72).

Tablo 7: GMAL06/09 çalışmasında risk sınıflandırması

MRH göre risk grupları	**71.gün (indüksiyon sonrası, konsolidasyon öncesi)**		**Konsolidasyon esnasında 16.haftadan itibaren 52.haftaya kadar**
Düşük	$<10^{-4}$	ve	Daima $<10^{-4}$ 52.haftada negatif
Yüksek	$>10^{-4}$	ve	2 kez $>10^{-4}$ ve 52.haftada negatif değil
Orta	MRH değerlendirmesi olası değil		

Kaynak: *Gokbuket N, et al. Risk/MRD adapted GMALL trials in adult ALL. Ann Hematol. 2004; 83 (Suppl 1): S129-31*

MRH'da Füzyon Gen Transkriptlerinin PCR ile Analizi

Kromozom anormallikleri ile birlikte birkaç akut lösemi tümöre-özgü füzyonlara sahiptir. Örneğin BCR-ABL füzyon gen transkriptleri t(9;22)'ye sahip yetişkin ALL vakalarında, t(1;19)'a sahip çoğu pre-B-ALL'de E2A-PBX1, t(4;11)'li infant pro-B-ALL'de yüksek sıklıkta MLL-AF4 füzyon gen transkriptleri ve t(12;21)'li çocukluk prekürsor-B-ALL'de TEL-AML1 füzyon gen transkriptleri gibi (73). Böylece RT-PCR ile lösemiye-özgü gen transkriptleri prekürsor-B-ALL'de MRH saptamada kullanılabilir (Tablo 2). T-ALL'li hastaların % 10'u kadarında SIL-TAL1 füzyon gen transkriptleri RT-PCR analizi ile saptanabilir; hatta yine T-ALL'lilerin % 10'unda CALM-AF10 füzyon gen transkriptleride saptanabilir (72-74).

AML de MRH'ın moleküler saptanması tanımlanan kromozomla anormallikler ve füzyon genleri ile sınırlıdır. Son beş yılda AML'de MRH saptamada kantitatif-revers transkriptaz PCR (QRT-PCR) en sık kullanılan PCR yöntemidir. AML'de üç tane sık önemli resiprokal rearanjman üreten füzyon genleri t(15;17), inv(16)/t(16;16) ve t(8;21) dir. Bu rearanjmanlar tüm AML hastalarının % 20'sinde saptanır ve iyi prognozu gösterir (75-77). Bu genleri taşıyan hastaların çoğu tam remisyona ulaşır, ancak % 10-30'u sonunda nüks eder (78-80). RQ-PCR için kullanılan primerler, problar ve kontrol genler European Against Cancer Network tarafından tanımlanmıştır (81,82). Genelde duyarlılıkları en az 10^{-4} (yada 10 kopya)'dır. Ancak, sağlıklı bireylerde (83-85), kordon kanında veya uzun-dönem tam remisyondaki lösemik hastalarda füzyon gen transkriptleri düşük düzeylerde ($<10^{-6}$) bulunabilir (86,87). Ancak bu veriler tartışmalıdır (88-90). Yine de, malin-olmayan hücrelerde füzyon gen transkriptleri RQ-PCR analizinin duyarlılığının çok üstündeyse ($<10^{-6}$) MRH saptanmasını engelleyebilir. PCR tekniklerinin yüksek duyarlılığı nedeniyle, hasta örnekleri arasında RT-PCR ürünlerinin çapraz-kontaminasyonu füzyon-gen transkriptleri kullanan PCR-aracılı MRH çalışmalarında yanılmalara yol açabilir (81). Lösemiye

özgü füzyon gen RT-PCR ürünleri hastaya özgü olmadığı için çapraz-kontaminasyonu tanımlamak zordur. Ayrıca, RNA oldukça anstabildir ve füzyon gen transkriptlerinin ve kontrol gen transkriptlerinin diferansiyel stabilitesi inandırıcı olmayan MRH verilerine yol açabilir (91).

AML'de bu füzyon transkriptleri *PML-RARA*, *CBFB-MYH11* ve *AML1-ETO(RUNX1-MTG8)* olup, en çok çalışılan ise PML-RARA'dır. Kantitatif olmayan PCR ile yapılan ilk çalışmalarda akut promiyelositik lösemide (APL) PCR negatifliğinin uzun dönem remisyonu gösterirken (92-99) PCR pozitifliği yüksek oranda relapsla sonuçlanır (92,95,96,99-103). Residüel *PML-RARA*-pozitif hücreler hastalık nüksünü öngörür ve bu nedenle de tedavi kararlarında önemli bir parametredir (96, 103-106). Kantitatif olmayan PCR APL'de oldukça önemli olmasına rağmen, sınırlı bir parametredir, tümör yükü hakkında kesin bir bilgi vermez. Residuel *CBFB-MYH11* veya *AML1-ETO* transkriptlerinin morfolojik tam remisyonda saptanması henüz aydınlatılamamıştır. t(8;21)(+) AML'li hastalarda konvansiyonel ve nested PCR ile tanımlanan MRH verileri, uzun dönem remisyonlarda sürekli pozitif olan pek çok olguda eşlik ettiği gösterilmiştir (107-114). Ayrıca MLL-AF9 (115) ve diğer MLL-füzyon transkriptlerininde (116) önemini gösteren az sayıda çalışma da vardır.

Günümüzde QRT-PCR ile AML'de tanımlanan MRH düzeylerinin prognostik etkisi üzerine toplanan veriler takiplerde lösemik transkriptlerin doğru değerlendirmesine izin verir (117-119).

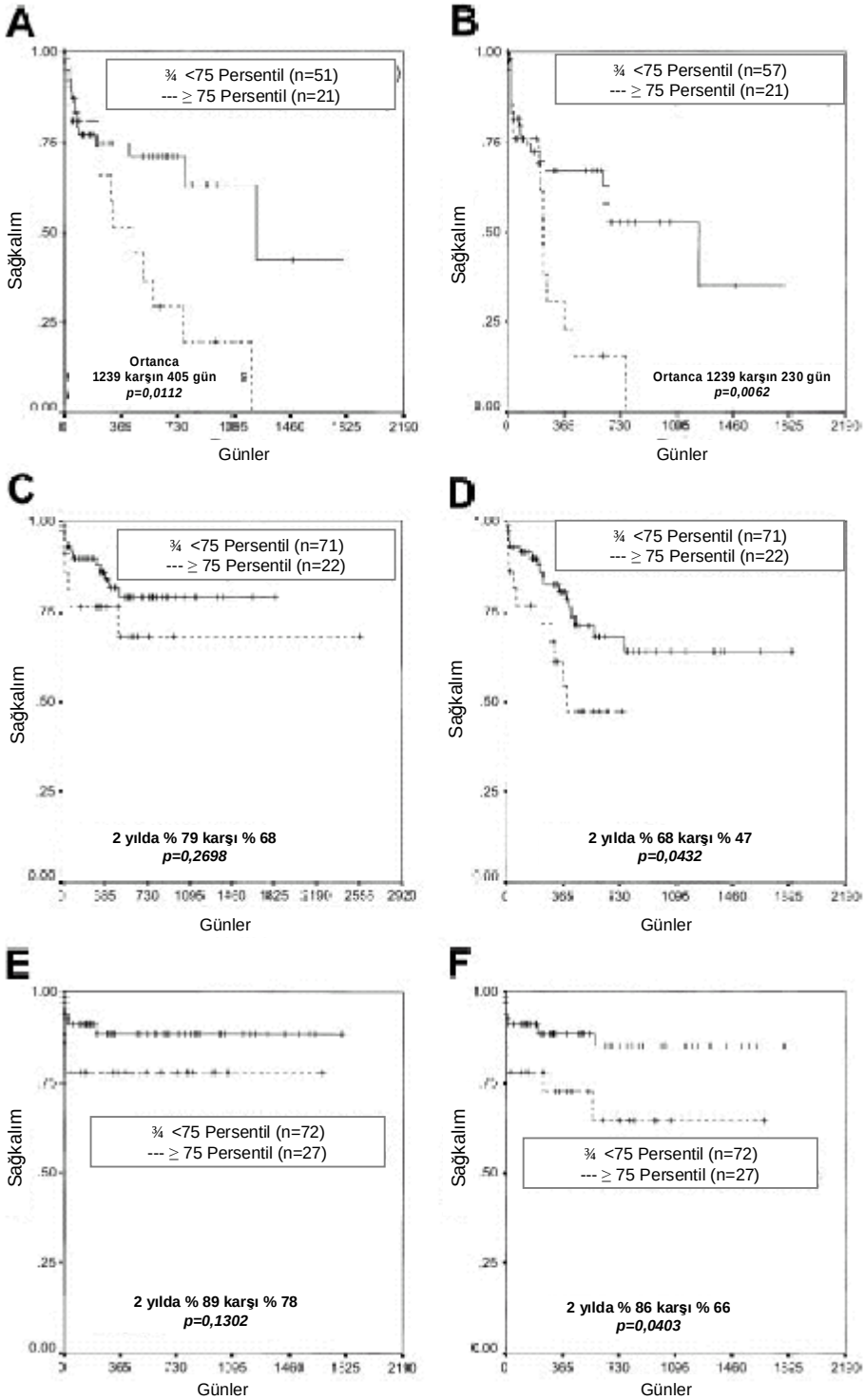
AML-özgü füzyonlar için RQ-PCR kullanımı 1998 yılında başlar (120) ve yapılan çalışmalar AML'de PCR-esaslı MRH saptanmasının klinik önemini gösterir (121-126). QRT-PCR üç konuyu değerlendirir: 1) Tanıda transkripsiyon oranı, 2) Lösemik klonun azalma kinetikleri, ve 3) Tekrarlayan klonun erken tanısı.

ALL'de MRH tayininde periferik kan kullanımı gösterilmesine rağmen, AML'de MRH değerlendirilmesinde periferik kanın kullanımı ile ilgili veriler az ve tartışmalıdır. Bu nedenle AML'de MRH değerlendirmesinde kemik iliği kullanımı önerilir.

Herhangi bir tedaviye başlamadan önce ilk tanıda bu füzyon genlerinin miktarını ölçmek önemlidir. Bu moleküler düzeyde değiştiği gibi, füzyon genin alttipini değerlendirme esasen önemlidir. Ayrıca, tanıdaki ilk değer MRH değerlendirme noktalarında bazal değer oluşturmak için zorunludur. Referans genlere göre tanıda bu ilk oranların herhangi bir prognostik etkisi gösterilememiştir (126-128). Ancak, *CBFB-MYH11*-pozitif AML'li 14 hasta ile yapılan bir çalışmada yüksek transkript oranlarının yüksek blast sayısı ve kısa sağkalıma eşlik ettiği gösterilmiştir (129).

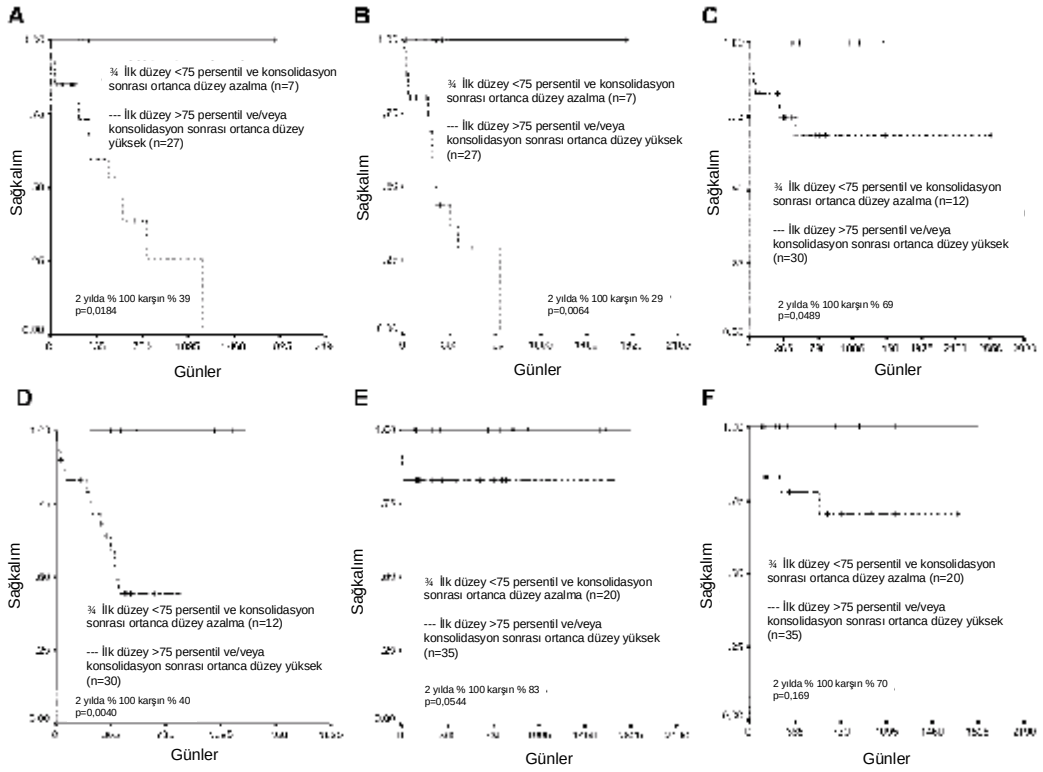
Başka bir çalışmada 131 hastada (34 AML1-ETO, 42 CBFB-MYH11 ve 55 PML-RARA) tanıda transkript miktarlarının yüksek olması üç tip AML'de klinik sonuçlar ile pozitif bir ilişkisi olduğu (Şekil 12), tam remisyon oranları üzerine etkisi gösterilememiştir (121). Üç AML alttipinde de olaysız sağkalım füzyon gen ekspresyon miktarından etkilenirken, toplam sağkalıma etki sadece AML1-ETO grubunda görülmüştür. Ayrıca, PML-RARA pozitif AML'de bcr3 transkripti bcr1'e göre daha kötü prognoza sahiptir, bu etki M3v ve lökosit sayısı arasındaki ilişkiyi yansıtır. Benzer olarak, AML-M4eo'da kötü prognozu göstermez. Yine bu çalışmada AML'de ilk ve ikinci indüksiyon tedavisi sonrası transkript oranlarında azalma kinetiğinin toplam ve olaysız sağkalıma etkisi olmadığı, halbuki tanıda transkripsiyon oranı % 75 persentilden az olan

altgruplarda konsolidasyon sonrası transkript düzeyi olaysız sağkalım ve toplam sağkalımı etkilediği gösterilmiştir (Şekil 13).



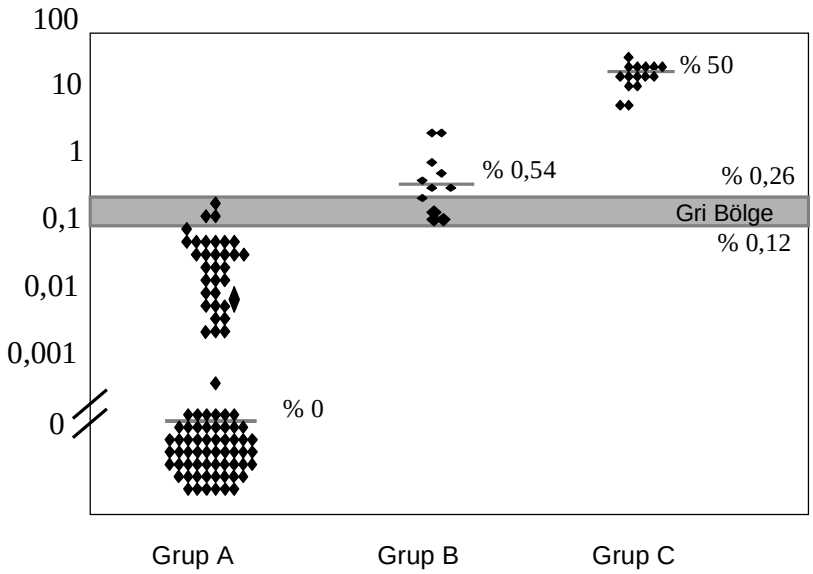
Şekil 12: AML1-ETO (A-B), CBFB-MYH11 (C-D) ve PML-RARA (E-F) füzyon transkriptlerine göre Toplam Sağkalım (A,C,E) ve Olaysız Sağkalım (B,D,F) ***(Kaynak:*** *Schnittger S*

et al. New score predicting for prognosis in PMLRARA-, AML1-ETO-, or CBFB-MYH11-positive acute myeloid leukemia based on quantification of fusion transcripts. Blood 2003;102:2746-55)



Şekil 13: Tanıda ortanca transkript miktarı 75 persentil ve tedaviden 3-4 ay sonra ortanca transkript oranına göre hastalar iki farklı grupta değerlendirildiğinde AML1-ETO (A-B), CBFB-MYH11 (C-D) ve PML-RARA (E-F) füzyon transkriptlerinde Toplam (A,C,E) ve Olaysız Sağkalım (B,D,F) (***Kaynak:*** *Schnittger S et al. New score predicting for prognosis in PMLRARA-, AML1-ETO-, or CBFB-MYH11-positive acute myeloid leukemia based on quantification of fusion transcripts. Blood 2003;102:2746-55)*

Krauter ve ark.ları indüksiyon tedavisi sonrası MRH ≥ % 1 saptanması ile nükse kadar geçen sürenin ortanca 3 ay olduğunu, bu nedenle de bu vakalarda tedaviye yüksek riskli hastalar gibi devam edilmesini önerirler (125). Başka bir çalışmada nüks eden hastalarında morfolojik tam remisyondaki örneklerinde CBFB-MYH11 transkript düzeyi (ortanca 151-dağılım 1-1632) nüks etmeyenlere göre (ortanca 0-dağılım 0-133) yüksek olduğu (p<0,0001) ve sonuçta sürekli tam remisyon için PCR negatifliğinin elde edilmesi gerektiğini göstermektedir (123). Ayrıca, 1.tam remisyondaki hastaları CBFB-MYH11 kopya/ 10000 ABL kopyası eşiğine göre (10^{-4}) yüksek ve düşük riskli olarak ikiye ayırdıklarında, eşik değerin altında kalan hastaların takip periyodunda tam remisyonların devam ettiğini gözlemişlerdir. Diğer bir çalışmada inv(16)/CBFB-MYH11 pozitif AML'ye odaklandığında, sınırlı sayıda hastada remisyonun herhangi bir zamanında % 0,25 kritik bir transkript oranı nüksü belirlediğini gösterilir (Şekil 14) (122).



Şekil 14: inv(16) AML'li 21 hastada 125 örnekte-A: Nüks olmayanlarda tedavi esnasında ve sonrasında; B: Nüksten hemen önce herhangi bir zamanda ve C: Tanıda veya nükste transkript düzeyi. MRH <% 0,12 ise nüks yok, fakat > % 0,25 ise nüks var *(**Kaynak:** Buonamici S et al. Real-time quantitation of minimal residual disease in inv(16)-positive acute myeloid leukemia may indicate risk for clinical relapse and may identify patients in a curable state. Blood 2002;99:443-9)*.

PML-RARA pozitif AML için 5 logdan az azalma 4 kat nüks riskine sahip olduğu gösterdiler (Tablo 8) (124).

Tablo 8: 53 hastada PML-RARA/GAPDH göre nüsk riski ve hastalıksız sağkalım

				Hastalıksız Sağkalım (%)		
Transkript miktarı	**Relaps/Hastalar**	**Risk Oranı**	**p**	**1 yıl**	**2 yıl**	**3 yıl**
> 10^{-5}	6/9			56	44	33
< 10^{-5}	16/44	4,1	0,008	86	72	65
< $10^{-7}/10^{-8}$	8/13			62	54	46
<$10^{-7}/10^{-8}$	14/40	2,4	0,074	88	72	63
> 10^{-10}	11/21			67	62	52
Negatif	11/32	1,7	0,244	91	70	64

Kaynak: *Gallagher RE, et al. Quantitative real-time RT-PCR analysis of PML-RAR{alpha} mRNA in acute promyelocytic leukemia: assessment of prognostic significance in adult patients from intergroup protocol 0129. Blood 2003;101:2521-8.*

Bu nedenle, farklı gruplar tarafından tanımlanan farklı eşikler çok duyarsız olabilir ve transkript düzeylerinde hastalar arasında yüksek varyasyon nedeniyle genel bir eşik değer belirlemek uygun değildir. Farklı çalışmalarda kullanılan farklı zaman noktalarında MRH testi nedeniyle takip değerlendirmeleri arasında en belirleyici zaman noktası ve zaman aralığı halen bilinmiyor ve bu konuda ileri dönük ve çok merkezli çalışmalar gereklidir.

Yukarıdaki çalışmalarda halen risk değerlendirmesi için en güvenilir takip noktası tartışmalı olmasına rağmen, 3 ayda bir takip önerilmektedir (121,125,129).

MRH'ın Saptanmasında PCR İçin Yeni Hedefler

Normal karyotipli veya resiprokal-olmayan kromozomal anormallikleri saptanmayan AML hastalarında PCR kullanımı olası değildir. Normal karyotipli AML'de veya diğer prognostik orta derece anormallikler, trizomi 8 veya 11 ve del(9q), FLT-3 geninde uzunlamasına mutasyonlar (FLT3-LM) ve MLL geninin parsiyel tandem duplikasyonu (MLL-PTD) sıklıkla saptanır ve MRH tanımlanmasında ümit vaat eden belirleyicilerdir. Ayrıca, WT1 geni veya EVI1 geninin anormal ekspresyonu gibi önemli belirleyiciler sınırlı sayıda çalışmada kullanılır. Böylece, sensitif PCR esaslı değerlendirilebilen hasta sayısı günümüzde artabilmektedir (Tablo 9).

Tablo 9: AML'de MRH Değerlendirmede Farklı PCR Hedefleri

PCR-hedefi	Yeni Tanı AML'de Pozitiflik	Normal veya orta riskli karyotipli AML'de pozitiflik	Kompleks anormal karyotipli AML'de pozitiflik
PML-RARA	% 7 - 8	-	-
AML1-ETO	% 7 - 8	-	-
CBFB-MYH11	% 7 - 8	-	-
MLL-AF6			
MLL-AF9			
MLL-AF10	% 5	-	-
MLL-ENL			
MLL-ELL			
MLL-PTD	% 6	% 10	% 2
FLT3-LM	% 23	% 40	% 2
WT1	% 100	% 100	% 100
EVI1	% 20	% 10	% 10

Kaynak: *Kern W, Schoch C, Haferlach T, Schnittger S. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia Crit Rev Oncol&Hematol 2005;56:283-309*

Malin hastalıklarda allojeneik hematopoetik kök hücre nakilleri sonrası önemli komplikasyonlardan biride hastalığın nüksüdür. Akut lösemili hastaların az kısmında füzyon trasnkriptleri vardır. Bu nedenle, transplantasyon sonrası hastaların hepsinde PCR esaslı VNTR/STR (Variable Number of Tandem Repeats/Short Tandem Repeats) amplifikasyonu ile kimerizm takibi altta yatan esas hastalık nüksünü öngörebilmektedir. Mattsson ve ark.ları AML'li 30 hastada lösemik hücre serilerine özgü kimerizmin tayini ile hastalık nüksünün belirlenebildiğini göstermişlerdir (130).

SONUÇ

Akut lösemide kantitatif PCR ve akım sitometri yöntemi MRH takibinde günümüzde yaygın olarak kullanılmakta, ayrıca tedavi stratifikasyonu için bir risk sınıflandırılması yapılmasına izin verebilmektedir. Her bir tekniğin kendine özgü avantaj ve dezavantajları bulunmakta ve günümüzde bazı noktalar hem immunolojik hem de moleküler izlem esaslı yöntemler için tartışmalıdır (Tablo 10) (131). Bu nedenle de her hastalık kategorisine ve klinik amaca göre en uygun yöntem dikkatle seçilmelidir. Böylece hem pozitif hem de negatif yanlış sonuçlar azalacak, gerçekten düşük riskli hastaların tanımlanmasında yeterli duyarlılık sağlayacaklardır. Ayrıca, en önemlisi hastalık nüksünü erkenden öngörüp, uygun tedavi yaklaşımının kullanımına hekimi yönlendirebilecektir.

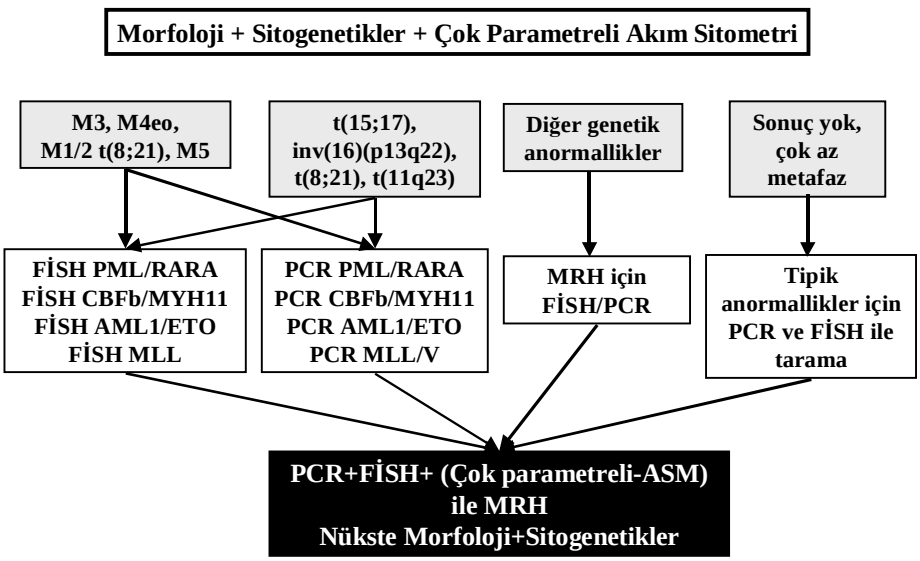
Tablo 10: MRH izlemede tartışmalı konular

İmmunolojik izlemde:
§ Seçilen doku tipi ve kullanımı. § Hücre hazırlamada kalite kontrol. § Çok parametreli akım sitometre kullanıldı mı? § Şüpheli hücre nereden seçilmeli? § Hangi lösemik antijen(ler) seçilmeli? § Kullanılan antikor panelleri lösemik antijen profilindeki değişiklikleri yeterince tanımlayabildi mi? § Bir duyarlılık düzeyi (en az 10^{-3}) gösterildi mi?
Moleküler izlemde:
§ RT-PCR (RNA analizi) karşı genomik DNA PCR? § Nükleik asit bütünlüğünün değerlendirilmesi. § Kalitatife karşı kantitatif PCR/nested PCR? § Diğer genler ile birlikte *primer* homologlarının seçimi? § Normal hücrelerdeki karşılaştırabilen gen reranjmanlarının sıklığı. § Normalizasyon için hangi kontrol genleri kullanılmalı? § Bir duyarlılık düzeyi (en az 10^{-4}) gösterildi mi?

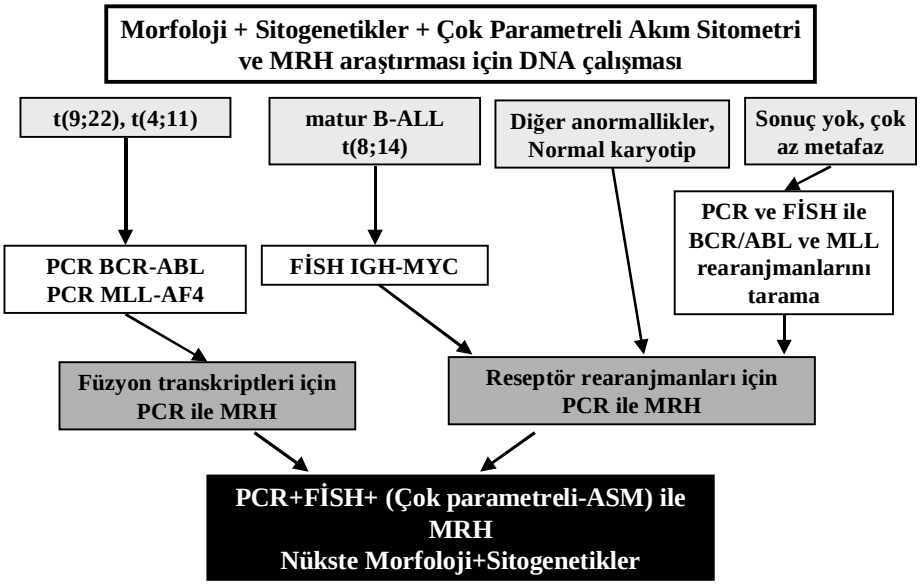
Kaynak: *Paietta E. Assessing minimal residual disease (MRD) in leukemia: a changing definition and concept? Bone Marrow Transplant 2002; 29:459-465.*

Kısaca, aşağıdaki akış çizelgesindeki gibi AML ve ALL hastaları tanı anında morfoloji, çok parametreli ASM yöntemi ile immunfenotiplendirme ve konvansiyonel sitogenetik ile kromozomal anormallikler yönünden tetkikleri ile birlikte füzyon transkriptleri veya klonal IgH/TCR rearanjmanları yönünden tetkik edilmeli, tedavi sonrası MRH takibi için hangi yöntemin kullanılabileceğine hasta bazında değerlendirme yapılmalıdır.

AML'de Tanı ve Takip Algoritması



ALL'de Tanı ve Takip Algoritması



Akış Çizelgesi: AML ve ALL'de tanı ve takip algoritması

KAYNAKLAR:

1- Campana D, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical. Blood. 1995;8: 813-818.

2- Faderl S, Kurzrock R, Estrov Z. Minimal Residual Disease in Hematologic Malignancies. Arc Pathol Mol Med 1999; 123: 1030-1034.

3- Campana D. Determination of Minimal Residaul Disease in Leukemia. Bri J Haematol 2003; 121: 823-838.

4- Liu Yin JA and Grimwade D. Minimal Residual Disease Evaluation in Acute Myeloid Leukaemia. Lancet 2002; 360: 160-162.

5- Raanani P and Ben-Bassat I. Detection of Minimal Residual Disease in Acute Myelogenous Leukemia. Acta Haematol. 2004; 112: 40-54.

6- Van der Velden VH, Boeckx N, Van Wering ER, Van Dongen JJM. Detection of Minimal Residual Disease in Acute Leukemi. J Biol Regulators&Homeostatic Agents. 2004: 18: 146-154.

7- Uzunel M. The Methodology and Significance of Minimal Residual Disease Detection after Allogeneic Stem Cell Transplantation.Karolinska University Press. 2003

8- Campana D, Coustan-Smith E, Janossy G: The immunologic detection of minimal residual disease in acute leukemia. Blood 1990;76: 163-171.

9- Janossy G, Bollum FJ, Bradstock KF and Ashley J. Cellular phenotypes of normal and leukemic hematopoietic cells determined by analysis with selected antibody combinations. Blood 1980; 50: 430-441.

10- Guglielmi C, Cordone I, Boecklin F, Masi S, Valentini T, Vegna ML, Ferrari A, Testi AM, Foa R. Immunophenotype of adult and childhood acute lymphoblastic leukemia: changes at first relapse and clinico-prognostic implications. Leukemia 1997; 11: 1501-1507.

11- Oelschlagel U, Nowak R, Schaub A, Koppel C, Herbst R, Mohr B, Loffler C, Range U, Gunther H, Assmann M, Siegert E, Wendt E, Huhn R, Brautigam E, Ehninger G. Shift of aberrant antigen expression at relapse or at treatment failure in acute leukemia. Cytometry 2000; 42: 247-253.

12- Baer MR, Stewart CC, Dodge RK, Leget G, Sule N, Mrozek K, Schiffer CA, Powell BL, Kolitz JE, Moore JO, Stone RM, Davey FR, Carroll AJ, Larson RA, Bloomfield CD. High frequency of immunophenotype changes in acute myeloid leukemia at relapse: implications for residual disease detection (Cancer and Leukemia Group B Study 8361). Blood 2001; 97: 3574–3580.

13- Tomova A & Babusikova O. Shifts in expression of immunological cell markers in relapsed acute leukemia. Neoplasma 2001; 48: 164-168.

14- Lucio P, Gaipa G, van Lochem EG, Van Wering ER, Porwit-MacDonald A, Faria T, Bjorklund E, Biondi A, van den Beemd MW, Baars E, Vidriales B, Parreira A, van Dongen JJ, San Miguel JF, Orfao A: BIOMED-I concerted action report: Flow cytometric immunophenotyping of precursor B-ALL with standardized triple-stainings. BIOMED-1 Concerted Action Investigation of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia: International Standardization and Clinical Evaluation. Leukemia 2001; 15:1185-1192.

15- Wells DA, Sale GE, Shulman HM et al. Multidimensional flow cytometry of marrow can differentiate leukemic from normal lymphoblasts and myeloblasts after chemotherapy and bone marrow transplantation. Am J Clin Pathol 1998; 110: 84-94.

16- Ciudad J, San Miguel JF, Lopez-Berges MC, Garcia Marcos MA, Gonzalez M, Vazquez L, del Canizo MC, Lopez A, Van Dongen JJ, Orfao A. Detection of abnormalities in B-cell differentiation pattern is a useful tool to predict relapse in precursor-B-ALL. Bri J Haematol 1999;104: 695-705.

17- Lucio P, Parreira A, van den Beemd MW, van Lochem EG, van Wering ER, Baars E, Porwit-MacDonald A, Bjorklund E, Gaipa G, Biondi A, Orfao A, Janossy G, van Dongen JJ, San Miguel JF. 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: 419-427.

18- Ciudad J, Orfao A, Vidriales B, Macedo A, Martinez A, Gonzalez M, Lopez-Berges MC, Valverde B, San Miguel JF. Immunophenotypic analysis of CD19+ precursors in normal human adult bone marrow: implications for minimal residual disease detection. Haematologica 1998; 83: 1069-1075.

19- Farahat N, Morilla A, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Pinkerton CR, Treleaven JG, Matutes E, Powles RL, Catovsky D. Detection of minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukaemia by quantitative flow cytometry. Bri J Haematol 1998;101:158-164.

20- Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Boyett JM, Behm FG, Raimondi SC, Sandlund JT, Rivera GK, Rubnitz JE, Ribeiro RC, Pui CH, Campana D. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 2000;96:2691- 2696.

21- San Miguel JF, Vidriales MB, Lopez-Berges C, Diaz-Mediavilla J, Gutierrez N, Canizo C, Ramos F, Calmuntia MJ, Perez JJ, Gonzalez M, Orfao A. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. Blood 2001;98:1746-1751.

22- Dworzak MN, Froschl G, Printz D, Mann G, Potschger U, Muhlegger N, Fritsch G, Gadner H. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 2002;99:1952-1958.

23- Neale GA, Coustan-Smith E, Pan Q, Chen X, Gruhn B, Stow P, Behm FG, Pui CH, Campana D. Tandem application of flow cytometry and polymerase chain reaction for comprehensive detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 1999;13:1221-1226.

24- Campana D&Coustan Smith E. Minimal Residual Disease Studies by Flow Cytometry in Acute Leukemia. Acta Haematol. 2004; 112: 8-15.

25- Oelschlagel U, Nowak R, Schaub A, Koppel C, Herbst R, Mohr B, Loffler C, Range U, Gunther H, Assmann M, Siegert E, Wendt E, Huhn R, Brautigam E, Ehninger G: Shift of aberrant antigen expression at relapse or at treatment failure in acute leukemia. Cytometry 2000;42:247-253.

26- Baer MR, Stewart CC, Dodge RK, Leget G, Sule N, Mrozek K, Schiffer CA, Powell BL, Kolitz JE, Moore JO, Stone RM, Davey FR, Carroll AJ, Larson RA, Bloomfield CD: High frequency of immunophenotype changes in acute myeloid leukemia at relapse: Implications for residual disease detection (Cancer and Leukemia Group B Study 8361). Blood 2001; 97:3574-3580.

27- Terstappen LW, Safford M, Konemann S, Loken MR, Zurlutter K, Buchner T, Hiddemann W, Wormann B. Flow cytometric characterization of acute myeloid leukemia. Part II. Phenotypic heterogeneity at diagnosis. Leukemia 1992; 6: 70-80.

28- Coustan-Smith E, Behm FG, Sanchez J, Boyett JM, Hancock ML, Raimondi SC, Rubnitz JE, Rivera GK, Sandlund JT, Pui CH, Campana D. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. Lancet 1998;351:550-554.

29- Macedo A, Orfao A, Gonzalez M et al. Immunological detection of blast cell subpopulations in acute myeloblastic leukemia at diagnosis: implications for minimal residual disease studies. Leukemia 1995; 9: 993-998.

30- Coustan-Smith E, Behm FG, Hurwitz CA, Rivera GK, Campana D. N-CAM (CD56) expression by CD34+ malignant myeloblasts has implications for minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. Leukemia 1993; 7: 853-858.

31- Macedo A, Orfao A, Vidriales MB, Lopez-Berges MC, Valverde B, Gonzalez M, Caballero MD, Ramos F, Martinez M, Fernandez-Calvo J, et al. Characterization of aberrant phenotypes in acute myeloblastic leukemia. Ann Hematol 1995; 70: 189-194.

32- Weir EG, Cowan K, LeBeau P, Borowitz MJ. A limited antibody panel can distinguish B-precursor acute lymphoblastic leukemia from normal B precursors with four color flow cytometry: implications for residual disease detection. Leukemia 1999; 13: 558-567.

33- Lamkin T, Brooks J, Annett G, Roberts W, Weinberg K. Immunophenotypic differences between putative hematopoietic stem cells and childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells. Leukemia 1994; 8: 1871-1878.

34- Reading CL, Estey EH, Huh YO, Claxton DF, Sanchez G, Terstappen LW, O'Brien MC, Baron S, Deisseroth AB. Expression of unusual immunophenotype combinations in acute myelogenous leukemia. Blood 1993; 81: 3083-3090.

35- Kern W, Schoch C, Haferlach T, Schnittger S. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia Crit Rev Oncol&Hematol 2005; 56:283-309

36- Bradstock KF, Janossy G, Pizzolo G, Hoffbrand AV, McMichael A, Pilch JR, Milstein C, Beverley P, Bollum FJ. Subpopulations of normal and leukemic human thymocytes: an analysis with the use of monoclonal antibodies. Journal of the National Cancer Institute 1980; 65: 33-42.

37- Bradstock KF, Janossy G, Tidman N et al. Immunological monitoring of residual disease in treated thymic acute lymphoblastic leukaemia. Leuk Res 1981; 5: 301-309.

38- Vidriales MB, San Miguel JF, Orfao A, Coustan-Smith E, Campana D. Minimal residual disease monitoring by flow cytometry. Best Practice&Research Clin Hematol. 2003; 16: 599-612.

39- Porwit-MacDonald A, Bjorklund E, Lucio P, van Lochem EG, Mazur J, Parreira A, van den Beemd MW, Van Wering ER, Baars E, Gaipa G, Biondi A, Ciudad J, van Dongen JJ, San Miguel JF, Orfao A: BIOMED-1 concerted action report: Flow cytometric characterization of CD7+ cell subsets in normal bone marrow as a basis for the diagnosis and follow-up of T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). Leukemia 2000;14:816–825.

40- Ciudad J, San Miguel JF, Lopez-Berges MC, Vidriales B, Valverde B, Ocqueteau M, Mateos G, Caballero MD, Hernandez J, Moro MJ, Mateos MV, Orfao A: Prognostic value of immunophenotypic detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol 1998;16:3774-3781.

41- Dworzak MN, Fritsch G, Fleischer C, Printz D, Froschl G, Buchinger P, Mann G, Gadner H. Comparative phenotype mapping of normal vs. malignant pediatric B-lymphopoiesis unveils leukemia-associated aberrations. Exp Hematol 1998;26:305-313.

42- Hurwitz CA, Loken MR, Graham ML, Karp JE, Borowitz MJ, Pullen DJ, Civin CI. Asynchronous antigen expression in B lineage acute lymphoblastic leukemia. Blood 1988;72:299-307.

43- Wells DA, Hall MC, Shulman HM, Loken MR: Occult B cell malignancies can be detected by three-color flow cytometry in patients with cytopenias. Leukemia 1998;12:2015-2023.

44- Campana D, Coustan-Smith E: Advances in the immunological monitoring of childhood acute lymphoblastic leukaemia. Best Pract Res Clin Haematol 2002;15:1-19.

45- Lavabre-Bertrand T, Janossy G, Ivory K, Peters R, Secker-Walker L, Porwit-MacDonald A: Leukemia-associated changes identified by quantitative flow cytometry. I. CD10 expression. Cytometry 1994;18:209-217.

46- Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, Williams WK, Patel D, Behm FG, Raimondi SC, Relling MV, Patel A, Cheng C, Campana D, Wilkins D, Zhou X, Li J, Pui CH, Evans WE, Wong L, Downing JR. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. Cancer Cell 2002;1:133-143.

47- Chen JS, Coustan-Smith E, Suzuki T, Neale GA, Mihara K, Pui CH, Campana D. Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. Blood 2001;97:2115-2120.

48- De Waele M, Renmans W, Jochmans K, Schots R, Lacor P, Trullemans F, Otten J, Balduck N, Vander GK, Van Camp B, van Schie RC, Van Riet I. Different expression of adhesion molecules on CD34+ cells in AML and B-lineage ALL and their normal bone marrow counterparts. Eur J Haematol 1999;63:192-201.

49- Coustan-Smith E, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Razzouk BI, Pui CH, Pounds S, Andreansky M, Behm FG, Raimondi SC, Shurtleff SA, Downing JR, Campana D. Clinical significance of residual disease during treatment in childhood acute myeloid leukemia. Bri J Haematol 2003; 123:243-252.

50- Venditti A, Buccisano F, Del Poeta G, Maurillo L, Tamburini A, Cox C, Battaglia A, Catalano G, Del Moro B, Cudillo L, Postorino M, Masi M, Amadori S: Level of minimal residual disease after consolidation therapy predicts outcome in acute myeloid leukemia. Blood 2000; 96:3948-3952.

51- Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Razzouk BI, Ribeiro RC, Rivera GK, Rubnitz JE, Sandlund JT, Pui CH, Campana D. Use of peripheral blood instead of bone marrow to monitor residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. Blood 2002;100: 2399-2402

52- Krampera M, Vitale A, Vincenzi C, Perbellini O, Guarini A, Annino L, Todeschini G, Camera A, Fabbiano F, Fioritoni G, Nobile F, Szydlo R, Mandelli F, Foa R, Pizzolo G. Outcome prediction by immunophenotypic minimal residual disease detection in adult T-cell acute lymphoblastic leukaemia. Bri J Haematol 2003; 120: 74-79.

53- Vidriales MB, Perez JJ, Lopez-Berges MC, Gutierrez N, Ciudad J, Lucio P, Vazquez L, Garcia-Sanz R, del Canizo MC, Fernandez-Calvo J, Ramos F, Rodriguez MJ, Calmuntia MJ, Porwith A, Orfao A, San-Miguel JF. Minimal residual disease (MRD) in adolescent (>14 years) and adult acute lymphoblastic leukaemias (ALL): early immunophenotypical evaluation has high clinical value. Blood 2003; 101: 4695-4700.

54- Sánchez J, Serrano J, Gomez P, Martinez F, Martin C, Madero L, Herrera C, Garcia M, Casano J, Torres A. Clinical value of immunological monitoring of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia after allogeneic transplantation. Bri J Haematol 2002; 116: 686-694.

55- Drach J, Drach D, Glassl H et al. Flow cytometric determination of atypical antigen expression in acute leukemia for the study of minimal residual disease. Cytometry 1992; 13: 893-901.

56- Wormann B, Griesinger F & Innig G. Detection of residual leukemic cells in patients with acute myeloid leukemia based on cell surface antigen expression. Sangre 1992; 37(supplement 3): 133-135.

57- San Miguel JF, Martinez A, Macedo A, Vidriales MB, Ló pez-Berges C, González M, Caballero D, Garcý-Marcos MA, Ramos F, Fernández-Calvo J, Calmuntia MJ, Diaz-Mediavilla J, Orfao A. Immunophenotyping investigation of minimal residual disease is a useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukemia patients. Blood 1997;90:2465-70.

58- Munõz L, Nomdedeu JF, Villamor N, Guardia R, Colomer D, Ribera JM, Torres JP, Berlanga JJ, Fernandez C, Llorente A, Queipo de Llano MP, Sanchez JM, Brunet S, Sierra J; Spanish CETLAM Group. Acute myeloid leukemia with MLL rearrangements: clinicobiological features, prognostic impact and value of flow cytometry in the detection of residualleukemic cells. Leukemia 2003; 17: 76-82.

59- Kern W, Haferlach T, Schoch C, Löffler H, Gassmann W, Heinecke A, Sauerland MC, Berdel W, Büchner T, Hiddemann W. Early blast clearance by remission induction therapy is a major independent prognostic factor for both achievement of complete remission and long-term outcome in acute myeloid leukemia: data from the German AML Cooperative Group (AMLCG) 1992 Trial. Blood 2003;101:64-70.

60- Kern W, Voskova D, Schnittger S, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T. Determination of relapse risk based on assessment of minimal residual disease during complete remission by multiparameter flow cytometry in patients with acute myeloid leukemia. Blood 2003;102:100a.

61- Kern W, Voskova D, Schoch C, Schnittger S, Hiddemann W, Haferlach T. Prognostic impact of early response to induction therapy as assessed by multiparameter flow cytometry in acute myeloid leukemia. Blood 2003;102:876a.

62- Reichle A, Rothe G, Krause S, Zaiss M, Ullrich H, Schmitz G, Andreesen R. Transplant characteristics: Minimal residual disease and impaired megakaryocytic colony growth as sensitive parameters for predicting relapse in acute myeloid leukemia. Leukemia 1999;13:1227-1234.

63- van der Velden VHJ, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJM. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspect. Leukemia 2003;17: 1013-1034.

64- Szczepanski T, Beishuizen A, Pongers-Willemse MJ, Hahlen K, Van Wering ER, Wijkhuijs AJ, Tibbe GJ, De Bruijn MA. and van Dongen JJ. Cross-lineage T cell receptor gene rearrangements occur in more than ninety percent of childhood precursor-B acute lymphoblastic leukemias: alternative PCR targets for detection ofminimal residual disease. Leukemia 1999; 13: 196-205.

65- Szczepanski T, Willemse MJ, Brinkhof B, van Wering ER, van der Burg M, van Dongen JJ. Comparative analysis of Ig and TCR gene rearrangements at diagnosis and at relapse of childhood precursor-B-ALL provides improved strategies for selection of stable PCR targets for monitoring of minimal residual disease. Blood 2002; 99: 2315-2323;

66- Szczepanski T, Flohr T, van der Velden VH, Bartram CR, van Dongen JJ. Molecular monitoring of residual disease using antigen receptor genes in childhood acute lymphoblastic leukaemia. Best Pract Res Clin Haematol 2002; 15: 37-57.

67- Cave H, van der Werff ten Bosch J, Suciu S, Guidal C, Waterkeyn C, Otten J, Bakkus M, Thielemans K, Grandchamp B, Vilmer E.Clinical significance of inimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. uropean Organization for Research and Treatment of Cancer-hildhood Leukemia Cooperative Group. N Engl J Med 1998, 339:591-598.

68- van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, Pongers-Willemse MJ, Corral L, Stolz F, Schrappe M, Masera G, Kamps WA, Gadner H, van Wering ER, Ludwig WD, Basso G, de Bruijn MA, Cazzaniga G, Hettinger K, van der Does-van den Berg A, Hop WC, Riehm H, Bartram CR. Prognostic value of inimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood.Lancet 1998, 352:1731-738.

69- Brüggemann M, Raff T, Flohr T, Gökbuket N, Nakao M, Droese J, Lüschen S, Pott C, Ritgen M, Scheuring U, Horst HA, Thiel E, Hoelzer D, Bartram CR and Kneba M. Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard risk acute lymphoblastic leukemia. Blood 2006; 107:1116-1123.

70- Mortuza FY, Papaioannou M, Moreira IM, Coyle LA, Gameiro P, Gandini D, Prentice HG, Goldstone A, Hoffbrand AV, and Foroni L. Minimal Residual Disease Tests Provide an Independent Predictor of Clinical Outcome in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. J Clin Oncol 20:1094-1104.

71- Mehmet Uzunel, Jonas Mattsson, Marie Jaksch, Mats Remberger, and Olle Ringdén. The significance of graft-versus-host disease and pretransplantation minimal residual disease status to outcome after allogeneic stem cell transplantation in patients with acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2001;98: 1982-1984.

72- Gokbuget N, Raff R, Brugge-Mann M, Flohr T, Scheuring U, Pfeifer H, Bartram CR, Kneba M, Hoelzer D. Risk/MRD adapted GMALL trials in adult ALL. Ann Hematol. 2004; 83 (Suppl 1): S129-31.

73- van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, Gottardi E, Rambaldi A, Dotti G, Griesinger F, Parreira A, Gameiro P, Diaz MG, Malec M, Langerak AW, San Miguel JF, Biondi A. Standardized RT-PCR analysis of füsion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. Leukemia 1999; 13: 1901-28

74- Asnafi V, Radford-Weiss I, Dastugue N, Bayle C, Leboeuf D, Charrin C, Garand R, Lafage-Pochitaloff M, Delabesse E, Buzyn A, Troussard X, Macintyre E. CALM-AF 10 is a common fusion transcript in T-ALL and is specific to the TCRgammadelta lineage. Blood 2003; 102:1000-1006.

75- Grimwade D, Walker H, Harrison G, Oliver F, Chatters S, Harrison CJ, Wheatley K, Burnett AK, Goldstone AH; Medical Research Council Adult Leukemia Working Party. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. Blood 2001;98:1312-20.

76- Mrozek K, Heinonen K, Bloomfield CD. Clinical importance of cytogenetics in acute myeloid leukaemia. Best Pract Res Clin Haematol 2001;14:19-47.

77- Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, Pettenati MJ, Patil SR, Rao KW, Watson MS, Koduru PR, Moore JO, Stone RM, Mayer RJ, Feldman EJ, Davey FR, Schiffer CA, Larson RA, Bloomfield CD; Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). Blood 2002;100:4325-36.

78- Plantier I, Lai JL, Wattel E, Bauters F, Fenaux P. Inv(16) may be one of the only ‘favorable’ factors in acute myeloid leukemia: a report on 19 cases with prolonged follow-up. Leuk Res 1994;18:885-8.

79- Larson RA, Williams SF, Le Beau MM, Bitter MA, Vardiman JW, Rowley JD. Acute myelomonocytic leukemia with abnormal eosinophils and inv(16) or t(16;16) has a favorable prognosis. Blood 1986;68:1242-9.

80- Martinelli G, Ottaviani E, Testoni N, Visani G, Terragna C, Amabile M, Trabacchi E, Montefusco V, Tura S. Molecular remission in PCR-positive acute myeloid leukemia patients with inv(16): role of bone marrow transplantation procedures. Bone Marrow Transplant 1999;24:694-7.

81- Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, Barbany G, Cazzaniga G, Cayuela JM, Cave H, Pane F, Aerts JL, De Micheli D, Thirion X, Pradel V, Gonzalez M, Viehmann S, Malec M, Saglio G, van Dongen JJ. Standardization and quality control studies of "real-time" quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) of fusion gene transcripts for minimal residual disease detection in leukemia –A Europe Against Cancer Program. Leukemia 2003; 17: 2318-57

82- Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, Bi W, Dee R, van der Schoot E, Delabesse E, Macintyre E, Gottardi E, Saglio G, Watzinger F, Lion T, van Dongen JJ, Hokland P, Gabert J. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. Leukemia 2003; 17: 2474-86.

83- Bose S, Deininger M, Gora-Tybor J, Goldman JM, Melo JV. The presence of typical and atypical BCR-ABL fusion genes in leukocytes of normal individuals: biologic significance and implications for the assessment of minimal residual disease. Blood 1998; 92: 3362-7.

84- Biernaux C, Loos M, Sels A, Huez G, Stryckmans P. Detection of major bcr-abl gene expression at a very low level in blood cells of some healthy individuals. Blood 1995; 86: 3118-22; Kim-Rouille MH, MacGregor A, Wiedemann LM, Greaves MF, Navarrete C. MLL-AF4 gene fusions in normal newborns. Blood 1999; 93: 1107-8

85- Quina AS, Gameiro P, Sa da Costa M, Telhada M, Parreira L. PML-RARA fusion transcripts in irradiated and normal hematopoietic cells. Genes Chromosomes Cancer 2000; 29: 266-75.

86- Jurlander J, Caligiuri MA, Ruutu T, Baer MR, Strout MP, Oberkircher AR, Hoffmann L, Ball ED, Frei-Lahr DA, Christiansen NP, Block AM, Knuutila S, Herzig GP, Bloomfield CD. Persistence of the AML1/ETO fusion transcript in patients treated with allogeneic bone marrow transplantation for t(8;21) leukemia. Blood 1996; 88: 2183-91.

87- Nucifora G, Larson RA, Rowley JD. Persistence of the 8;2 1 translocation in patients with acute myeloid leukemia type M2 in long-term remission. Blood 1993; 82: 712-5.

88- Trka J, Zuna J, Hrusak O, Michalova K, Muzikova K, Kalinova M, Horak J, Stary J. No evidence for MLL/AF4 expression in normal cord blood samples. Blood 1999; 93:1108-1110.

89- Kwong YL, Chan V, Wong KF, Chan TK. Use of the polymerase chain reaction in the detection of AML1/ETO fusion transcript in t(8;21). Cancer 1995; 75: 821-5.

90- Satake N, Maseki N, Kozu T, Sakashita A, Kobayashi H, Sakurai M, Ohki M, Kaneko Y. Disappearance of AML1-MTG8(ETO) fusion transcript in acute myeloid leukaemia patients with t(8;21) in long-term remission. Bri J Haematol 1995; 91: 892-8.

91- van der Velden VH, Boeckx N, Gonzalez M, Malec M, Barbany G, Lion T, Gottardi E, Pallisgaard N, Beillard E, Hop WC, Hoogeveen PG, Gabert J, van Dongen JJ; Europe Against Cancer Program. Differential stability of control gene and fusion gene transcripts over time may hamper accurate quantification of minimal residual disease-a study within the Europe Against Cancer Program. Leukemia 2004; 18: 884-6.

92- Sanz MA, Martin G, Rayon C, Esteve J, Gonzalez M, Diaz-Mediavilla J, Bolufer P, Barragan E, Terol MJ, Gonzalez JD, Colomer D, Chillon C, Rivas C, Gomez T, Ribera JM, Bornstein R, Roman J, Calasanz MJ, Arias J, Alvarez C, Ramos F, Deben G. A modified AIDA protocol with anthracycline-based consolidation results in high antileukemic efficacy and reduced toxicity in newly diagnosed PML/RARalpha positive acute promyelocytic leukemia. PETHEMA group. Blood 1999;94:3015–21.

93- Avvisati G, Lo Coco F, Diverio D, Falda M, Ferrara F, Lazzarino M, Russo D, Petti MC, Mandelli F. AIDA (all-trans retinoic acid + idarubicin) in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: a Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) pilot study. Blood 1996;88:1390-8.

94- Perego RA, Marenco P, Bianchi C, Cairoli R, Urbano M, Nosari AM, Muti G, Morra E, Del Monte U. PML/RAR alpha transcripts monitored by polymerase chain reaction in acute promyelocytic leukemia during complete remission, relapse and after bone marrow transplantation. Leukemia 1996;10:207-12.

95- Koller E, Karlic H, Krieger O, Mistrik M, Michlmayr G, Gadner H, Lutz D, Heinz R, Pittermann E. Early detection of minimal residual disease by reverse transcriptase polymerase chain reaction predicts relapse in acute promyelocytic leukemia. Ann Hematol 1995;70:75-8.

96- Korninger L, Knobl P, Laczika K, Mustafa S, Quehenberger P, Schwarzinger I, Lechner K, Jaeger U, Mannhalter C. PML-RAR alpha PCR positivity in the bone marrow of patients with APL precedes haematological relapse by 2–3 months. Bri J Haematol 1994;88:427–3.

97- Laczika K, Mitterbauer G, Korninger L, Knobl P, Schwarzinger I, Kapiotis S, Haas OA, Kyrle PA, Pont J, Oehler L, et al. Rapid achievement of PML-RAR alpha polymerase chain reaction (PCR)-negativity by combined treatment with all-trans-retinoic acid and chemotherapy in acute promyelocytic leukemia: a pilot study. Leukemia 1994;8:1-5.

98- Diverio D, Pandolfi PP, Biondi A, Avvisati G, Petti MC, Mandelli F, Pelicci G, Lo Coco F. Absence of reverse transcription-polymerase chain reaction detectable residual disease in patients with acute promyelocytic leukemia in long-term remission Blood 1993;82:3556-9.

99- Huang W, Sun GL, Li XS, Cao Q, Lu Y, Jang GS, Zhang FQ, Chai JR, Wang ZY, Waxman S, et al. Acute promyelocytic leukemia: clinical relevance of two major PML-RAR alpha isoforms and detection of minimal residual disease by retrotranscriptase/ polymerase chain reaction to predict relapse. Blood 1993;82:1264-9.

100- Miller Jr WH, Levine K, DeBlasio A, Frankel SR, Dmitrovsky E, Warrell Jr RP. Detection of minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia by a reverse transcription polymerase chain reaction assay for the PML/RAR-alpha fusion mRNA. Blood 1993;82:1689-94.

101- Jurcic JG, Nimer SD, Scheinberg DA, DeBlasio T, Warrell Jr RP, Miller Jr WH. Prognostic significance of minimal residual disease detection and PML/RAR-alpha isoform type: long-term follow-up in acute promyelocytic leukemia. Blood 2001;98:2651-6.

102- Burnett AK, Grimwade D, Solomon E, Wheatley K, Goldstone AH. Presenting white blood cell count and kinetics of molecular remission predict prognosis in acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid: result of the Randomized MRC Trial. Blood 1999;93:4131-43.

103- Ikeda K, Sasaki K, Tasaka T, et al. PML-RAR alpha fusion transcripts by RNA PCR in acute promyelocytic leukemia in remission and its correlation with clinical outcome. Int J Hematol 1994;60:197-205.

104- Lengfelder E, Reichert A, Schoch C, Haase D, Haferlach T, Loffler H, Staib P, Heyll A, Seifarth W, Saussele S, Fonatsch C, Gassmann W, Ludwig WD, Hochhaus A, Beelen D, Aul C, Sauerland MC, Heinecke A, Hehlmann R, Wormann B, Hiddemann W, Buchner T. Double induction strategy including high dose cytarabine in combination with alltrans retinoic acid: effects in patients with newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. German AML Cooperative Group. Leukemia 2000;14:1362-70.

105- Tallman MS, Nabhan C, Feusner JH, Rowe JM. Acute promyelocytic leukemia: evolving therapeutic strategies. Blood 2002;99:759-67.

106- Diverio D, Rossi V, Avvisati G, De Santis S, Pistilli A, Pane F, Saglio G, Martinelli G, Petti MC, Santoro A, Pelicci PG, Mandelli F, Biondi A, Lo Coco F. Early detection of relapse by prospective reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of the PML/RARalpha fusion genes in patients with acute promyelocytic leukemia enrolled in the GIMEMA-AIEOP Multicenter “AIDA” Trial. GIMEME-AIEOP Multicenter “AIDA” Trial. Blood 1998;92:784-9.

107- Inokuchi K, Iwakiri R, Futaki M, Hanawa H, Tanosaki S, Nomura T, Dan K. Minimal residual disease in acute myelogenous leukemia with PML/RAR alpha or AML1/ETO mRNA and phenotypic analysis of possible T and natural killer cells in bone marrow. Leuk Lymphoma 1998;29:553-61.

108- Chang KS, Fan YH, Stass SA, Estey EH, Wang G, Trujillo JM, Erickson P, Drabkin H. Expression of AML1-ETO fusion transcripts and detection of minimal residual disease in t(8;21)-positive acute myeloid leukemia. Oncogene 1993;8:983-8; Nucifora G, Larson RA, Rowley JD. Persistence of the 8;21 translocation in patients with acute myeloid leukemia type M2 in longterm remission. Blood 1993;82:712-5.

109- Marcucci G, Caligiuri MA, Bloomfield CD. Defining the "absence" of the CBFbeta/MYH11 fusion transcript in patients with acute myeloid leukemia and inversion of chromosome 16 to predict long-term complete remission: a call for definitions. Blood 1997;90:5022-4.

110- Tobal K, Newton J, Macheta M, Chang J, Morgenstern G, Evans PA, Morgan G, Lucas GS, Liu Yin JA. Molecular quantitation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia with t(8;21) can identify patients in durable remission and predict clinical relapse. Blood 2000;95:815-9.

111- Tobal K, Johnson PR, Saunders MJ, Harrison CJ, Liu Yin JA. Detection of CBFB/MYH11 transcripts in patients with inversion and other abnormalities of chromosome 16 at presentation and remission. Bri J Haematol 1995;91:104-8.

112- Nucifora G, Larson RA, Rowley JD. Persistence of the 8;21 translocation in patients with acute myeloid leukemia type M2 in longterm remission. Blood 1993;82:712-5.

113- Verma A & Stock W. Management of adult acute lymphoblastic leukemia: moving toward a risk-adapted approach. Current Opinion Oncology 2001; 13: 14-20.

114- Bassan R, Gatta G, Tondini C, Willemze R. Adult acute lymphoblastic leukaemia Crit Rev Oncol&Hematol. 2004; 50:223-261.

115- Scholl C, Breitinger H, Schlenk RF, Dohner H, Frohling S, Dohner K. Development of a real-time RT-PCR assay for the quantification of the most frequent MLL/AF9 fusion types resulting from translocation t(9;11)(p22;q23) in acute myeloid leukemia. Genes Chromosomes Cancer 2003;38:274–80.

116- Weisser M, Kern W, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T, Schnittger S. Risk assessment by monitoring expression levels of partial tandem duplications in the MLL gene in acute myeloid leukaemia. Haematologica 2005;90:881-9.

117- Tobal K, Newton J, Macheta M, Chang J, Morgenstern G, Evans PA, Morgan G, Lucas GS, Liu Yin JA. Molecular quantitation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia with t(8;21) can identify patients in durable remission and predict clinical relapse. Blood 2000;95:815–9.

118- Evans PA, Short MA, Jack AS, Norfolk DR, Child JA, Shiach CR, Davies F, Tobal K, Liu Yin JA, Morgan GJ. Detection and quantitation of the CBFbeta/MYH11

transcripts associated with the inv(16) in presentation and follow-up samples from patients with AML; Leukemia 1997;11:364–9.

119- Laczika K, Novak M, Hilgarth B, Mitterbauer M, Mitterbauer G, Scheidel-Petrovic A, Scholten C, Thalhammer-Scherrer R, Brugger S, Keil F, Schwarzinger I, Haas OA, Lechner K, Jaeger U. Competitive CBFbeta/MYH11 reverse-transcriptase polymerase chain reaction for quantitative assessment of minimal residual disease during postremission therapy in acute myeloid leukemia with inversion(16): a pilot study. J Clin Oncol 1998;16:1519-25.

120- Marcucci G, Livak KJ, Bi W, Strout MP, Bloomfield CD, Caligiuri MA. Detection of minimal residual disease in patients with AML1/ETO-associated acute myeloid leukemia using a novel quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assay. Leukemia 1998;12:1482-9.

121- Schnittger S, Weisser M, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T, Kern W. New score predicting for prognosis in PMLRARA-, AML1-ETO-, or CBFB-MYH11-positive acute myeloid leukemia based on quantification of fusion transcripts. Blood 2003;102:2746-55.

122- Buonamici S, Ottaviani E, Testoni N, et al. Real-time quantitation of minimal residual disease in inv(16)-positive acute myeloid leukemia may indicate risk for clinical relapse and may identify patients in a curable state. Blood 2002;99:443-9.

123- Guerrasio A, Pilatrino C, De Micheli D, Cilloni D, Serra A, Gottardi E, Parziale A, Marmont F, Diverio D, Divona M, Lo Coco F, Saglio G. Assessment of minimal residual disease (MRD) in CBFbeta/MYH11-positive acute myeloid leukemias by qualitative and quantitative RT-PCR amplification of fusion transcripts. Leukemia 2002;16:1176-81

124- Gallagher RE, Yeap BY, Bi W, Livak KJ, Beaubier N, Rao S, Bloomfield CD, Appelbaum FR, Tallman MS, Slack JL, Willman CL. Quantitative real-time RT-PCR analysis of PML-RAR{alpha} mRNA in acute promyelocytic leukemia: assessment of prognostic significance in adult patients from intergroup protocol 0129. Blood 2003;101:2521-8.

125- Krauter J, Gorlich K, Ottmann O, Lubbert M, Dohner H, Heit W, Kanz L, Ganser A, Heil G. Prognostic value of minimal residual disease quantification by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction in patients with core binding factor leukemias. J Clin Oncol 2003;21:4413-22;

126- Grimwade D. The significance of minimal residual disease in patients with t(15;17). Best Pract Res Clin Haematol 2002;15:137-58.

127- Krauter J, Wattjes MP, Nagel S, Heidenreich O, Krug U, Kafert S, Bunjes D, Bergmann L, Ganser A, Heil G. Real-time RT-PCR for the detection and quantification of

AML1/MTG8 fusion transcripts in t(8;21)-positive AML patients. Bri J Haematol 1999;107:80–5.

128- Krauter J, Hoellge W, Wattjes MP, Nagel S, Heidenreich O, Bunjes D, Ganser A, Heil G. Detection and quantification of CBFB/MYH11 fusion transcripts in patients with inv(16)-positive acute myeloblastic leukemia by real-time RT-PCR. Genes Chromosomes Cancer 2001;30:342-8

129- Marcucci G, Caligiuri MA, Dohner H, Archer KJ, Schlenk RF, Dohner K, Maghraby EA, Bloomfield CD. Quantification of CBFbeta/MYH11 fusion transcript by real time RT-PCR in patients with INV(16) acute myeloid leukemia. Leukemia 2001;15:1072–80.

130- Mattson C, Uzunel M, Tammik I, Aschan J, Ringden O. Leukemia lineage-spesific chimerism analysis is a sensitive predictor of relapse in patients with acute myeloid leukemia and myeodysplastic syndrome after allogeneic stem cell transplantation. Leukemia 2001;15:1976-1985.

131- Paietta E. Assessing minimal residual disease (MRD) in leukemia: a changing definition and concept? Bone Marrow Transplant 2002; 29:459-465.