

Akut Miyeloblastik Lösemide İmmünofenotipik Değerlendirme

Immunophenotyping in Acute Myeloblastic Leukemia: Review

Dr. Hüseyin GÜLEN^a

^aPediyatrik Hematoloji BD,
Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Manisa

Geliş Tarihi/Received: 24.09.2009
Kabul Tarihi/Accepted: 17.12.2009

Yazışma Adresi/Correspondence:
Dr. Hüseyin GÜLEN
Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Pediyatrik Hematoloji BD, Manisa,
TÜRKİYE/TURKEY
huseyingulen@hotmail.com

ÖZET Akut miyeloblastik lösemide morfolojik ve sitogenetik özelliklerin çeşitliliği sınıflamada güçlük yaratmaktadır. Özellikle sitomorfoloji ve sitokimya ile tanımlanamayan M0, M7 ve M3v gibi alt grupların tanımlanması akım sitometri ile mümkün olmuştur. M0 minimal antijenik diferansiyasyon göstermesinin yanı sıra morfolojik olarak lenfoblastik lösemisinin FAB L1/L2 tipindedir. Ayrıca TdT ve çeşitli lenfoid seri ilişkili antijen ekspresyonları (CD2, CD4, CD7, CD10 ve CD19) yaparak yanlışlıkla miyeloid antijen pozitif lenfoblastik lösemi tanısı alabilmektedir. cyCD3, CD5 ve cyCD79a antijenleri M0'ın lenfoblastik lösemi olgularından ayırımında en iyi belirteçlerdir. Akut promiyelositik lösemi(M3)'nin diğer alt tiplerden ayırımında en değerli belirteç HLA-DR ve CD34'tür. CD14 antijeni de bu anlamda oldukça değerlidir çünkü hiçbir M3 olgusunda bildirilmemiştir. M7 olgularını da morfolojik olarak tanımlamak güçtür. Akım sitometride CD41 (gpIIb) ve/veya CD61 (gpIIIa) ekspresyonunun saptanması ve miyeloperoksidazın da (-) olduğunun gösterilmesi megakaryoblastik lösemi tanısını koydurabilir. Son yıllarda prognoz tahmini ve minimal rezidüel hastalığın tanısı ve takibinde de akım sitometri kullanılmaktadır. Akut miyeloblastik lösemideki kötü prognozla ilişkilendirilen antijenler CD7, CD56 ve CD34'tür. CD117+ CD34+ CD15+ fenotipik özellik birçok miyeloblastik lösemi grubunda eksprese olmakta ve morfolojik remisyon sırasında minimal rezidüel hastalık izleminde kullanılmaktadır. Sonuç olarak; tüm miyeloblastik lösemi olgularında ilk tanıda CD13, CD33, HLA-DR, CD34, CD117, CD11, CD14, CD15, CD41, CD61, MPO, CD65, ve cyCD3, CD7, cyCD79a, CD19 antijenlerine bakılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Akım sitometri; immünofenotipleme; lösemi, miyeloid, akut

ABSTRACT Acute myeloid leukemia is a heterogeneous disease, presenting with a high diversity of phenotypes. Immunophenotyping is essential for diagnosis and definition of particular myeloid leukemia subtypes such as M0, M7 and M3 variants which cannot be defined by cytomorphology or cytochemistry alone. M0 blasts show minimally antigenic differentiation and also morphologically resemble to FAB L1/L2 blasts of lymphoblastic leukemia. Additionally, it can express TdT and lymphoid associated antigens such as CD2, CD4, CD7, CD10, CD19 and can be diagnosed falsely as myeloid antigen positive lymphoblastic leukemia. cyCD3, CD5 and cyCD79a antigens are the best markers in differentiation of M0 and lymphoblastic leukemia. HLA-DR and CD34 are the best markers in differentiation of M3 and other subtypes of myeloid leukemia. In this sense, CD14 is also a valuable marker, because it is not reported in any case of promyelocytic leukemia. M7 subtypes of myeloid leukemia can not be diagnosed by routine cytochemical dyes unless immunophenotyping. The establishing of CD41 (gpIIb) and/or CD61 (gpIIIa) positivity and myeloperoxidase negativity on blasts by immunophenotyping can confirm megakaryoblastic leukemia diagnosis. Recently, immunophenotyping of blast cells by flow cytometry plays an increasing role in diagnosis and following of minimal residual disease. The antigens associated with poor prognosis in myeloid leukemia are CD7, CD56 and CD34. A phenotype of CD117+ CD34+ CD15+ is expressed in many myeloid leukemia subgroups and is used in following of minimally residual disease during remission. In conclusion, CD13, CD33, HLA-DR, CD34, CD117, CD11, CD14, CD15, CD41, CD61, MPO, CD65, cyCD3, CD7, cyCD79a, and CD19 markers should be studied in all cases of myeloid leukemia at presentation.

Key Words: Flow cytometry; immunophenotyping; leukemia, myeloid, acute

1970'li yıllardan önce lösemilerin sınıflandırmasında sitomorfoloji ve sitokimyasal yöntemler kullanılıyordu. Daha sonra klasik yöntemlere ilaveten sitogenetik ve moleküler sitogenetik [floresan in situ hibridizasyon (FISH), karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH), moleküler genetik (PCR temelli yöntemler) ve multiparametrik akımsitometrik immünofenotipleme (MAS)] kullanıma girmiştir.¹

Lösemi tanısına giderken 3, 4, 5 veya daha fazla renkli boyama ile yapılan MAS, sitomorfoloji ve sitokimyanın ayrılmaz bir parçası olmuştur. Geniş antikor panellerinin kullanımı tüm olgularda hücre dizilerinin tanımlanmasına özellikle de sadece sitomorfoloji ve sitokimya ile tanımlanamayan AML M0 ve M7'nin tanısını mümkün kılmaktadır. Tanımlanması karışık olan lösemi dizileri "European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL)" sınıflamasına göre yapılmıştır (Tablo 1).²⁻⁴

Lösemilerin immünofenotiplemesi ile klinik pratikte birçok önemli problemin çözümü mümkün olmuştur. Bunlar temel olarak;

1. Kronik lenfoproliferatif bir hastalık olarak lenfositozun tanımlanması,
2. Lenfoid ve miyelopoitik hücre dizilerinin ayırımı,
3. Akut lenfoblastik lösemilerin alt gruplarının belirlenmesi,

TABLO 1: Karışık dizi akut lösemi tanısı için EGIL sınıflaması. ²			
Skor	B-lenfoid	T-lenfoid	Miyeloid
2	CD79a	cy/sCD3 Anti	MPO
2	cyIgM	Anti TZRαβ	
2	cyCD22	Anti-TZRYδ	
1	CD19	CD2	CD13
1	CD10	CD5	CD33
1	CD20	CD8	CD65
1		CD10	CD117
0.5	TdT	TdT	CD14
0.5	CD24	CD7	CD15
0.5	CD1a		CD64

* Karışık lösemik dizi tanımı: Miyeloid ve B ya da T lenfoid için skor > 2.
EGIL: European Group for the Immunological Characterization of Leukemias.

4. Miyeloblastik lösemilerden özellikle M0, M6 ve M7'nin tanısı

5. Malign bir hastalıkla monoklonal bir komponentin ilişkisinin belirlenmesi ve

6. Morfolojik olarak tam remisyonda olan bir örnekte rezidüel lösemik hücrelerin saptanmasıdır.^{5,6}

Pratik olarak patolojik hücrelerin akım sitometrik olarak sadece morfolojik özelliklerini belirleyen "forward ve side light scatter" özelliklerine bakılarak saptanması mümkün olmamakta ve en azından bir monoklonal antikor reageni'nin de bununla kombine edilmesi gerekmektedir.

Hücre popülasyonu bir kez seçildiğinde aynı anda ilave boyaların da o popülasyonda analizi yapılarak sağlıklı-patolojik hücre ayırımı mümkün olabilmektedir. Akut miyeloblastik lösemi (AML)'ler için "CD45 side scatter" ile alan seçimi, B hücre dizisini ilgilendiren akut ve kronik lenfoproliferatif hastalıklar için CD19 ile alan seçimi, T hücre dizisi kökenli akut lenfoid kösemi (ALL)'ler için CD7 ile alan seçimi pratik bir yaklaşımdır.

"CD45 SIDE SCATTER (SSC)" İLE ALAN SEÇİMİ

Akut lösemideki blastik hücrelerin, sağlıklı difransiyasyon olan hücrelerden ayırımının daha spesifik ve duyarlı bir şekilde yapılabilmesi için faydalı bir yol olarak önerilmektedir. Çünkü lösemik hücreler genellikle birkaç sağlıklı hücrenin bulunduğu alanda görülmektedir.^{7,8} Bu tür bir yaklaşım difransiyasyon yolunun farklı basamaklarında bulunan monositik ve miyeloid hücrelerin ve lenfoid ve eritroid alt grupların daha kolay ayırt edilmesini sağlamaktadır. CD45'in normal popülasyonlardaki karakteristik ekspresyon yoğunluğu lösemik hücrelerden ayırımını sağlamaktadır:

- Lenfoblastlar tipik olarak CD45 negatif veya düşük boyanma ve düşük SSC düzeyi gösterir,
- Miyeloblastlarda ise CD45 ekspresyonu orta düzeyde ve SSC düzeyi daha yüksektir.

Bu yüzden CD45/SSC ile alan seçimi "forward scatter (FSC)/SSC ile alan seçimine göre lösemik hücre topluluğu ve minimal rezidüel hastalık (MRH) saptanmasında daha spesifiktir.

AKUT MİYELOBLASTİK LÖSEMİDE İMMÜNOFENOTİPİK BELİRTEÇLER

Birçok lösemi morfolojik olarak doğru sınıflanmasına karşın bazı alt tipler örneğin minimal diferansiyel AML (AML M0) ve B, T hücre dizili ALL olgularının ayırımı için MAS mutlak gerekli bir yöntemdir.¹ Ayrıca CD34 ve HLA-DR ekspresyon özellikleri de akut promiyelositik lösemi (AML M3/APL)'nin AML M1 ve M2'den ayırımında faydalı olmaktadır.⁹ AML tanısındaki en önemli immünofenotipik işaretleyiciler miyeloid hücrelerle ilişkili olan CD13 ve CD33 yanında CD34, HLA-DR, glikoforin A ve miyelo peroksidazdır. CD13 monosit, granülosit, bazı makrofajlar ve bağ dokusunda bulunur. CD33 ekspresyonu miyeloid hücrelerle sınırlıdır ve AML olgularının çok büyük bir bölümünde pozitif reaksiyon verir.¹⁰

STOPLAZMİK ANTİJENLER

Bazı membran ilişkili diferansiyasyon antijenleri hücre membranına taşınmadan önce stoplazmada eksprese olmaktadır. Bundan dolayı birçok laboratuvar ilk monoklonal antikor paneli olarak diziyi belirlemeye yönelik paneller, ikinci olarak da diferansiyasyonu belirlemeye yönelik paneller kullanılmaktadırlar.¹¹⁻¹³ Yakın zamanda yapılan çalışmalarda bazı antijenlerin stoplazmik ekspresyonlarının cyCD79a, cyCD22, cyCD3 ve cyMPO sırasıyla B, T ve miyeloid dizinin en erken tanımlanabilen spesifik belirteçleri oldukları bildirilmektedir.^{13,14}

HLA-DR, CD34 EKSPRESYONU

M3 (APL)-Diğer AML Ayırımı

HLA-DR ekspresyonu M3 dışındaki AML'lerde %86 gibi yüksek oranlarda pozitifdir. CD34'te M3 olgularında HLA-DR kadar olmasa bile yine çok düşük oranda pozitifdir. Bu bulgular da APL'nin diğer AML'lerden ayırımında faydalı olabilir. Bu iki antijenin birlikte kullanımının APL-diğer AML ayırımında etkisi tek kullanımlarından daha fazladır. HLA-DR ve CD34 birlikte pozitifliğine hiçbir AML M3 olgusunda rastlanmazken diğer AML'lerde %58 birlikte pozitiflik saptanmaktadır. Ancak yine de her iki antijenik özelliğin yokluğu daima

APL tanısını göstermez, çünkü diğer AML tiplerininin %10'unda da her iki antijen ekspresyonu (-) bulunmuştur.¹⁵

HLA-DR ve CD 34 (-) ancak MPO(+) AML olgularında t(15;17) ve/veya PML-RAR α ya da varyantları aranmalıdır. Çünkü morfolojik olarak APL'den çok M1/M2'ye benzeyen olgular görülebilmektedir.

MİYELOMONOSİTİK ANTİJENLER

(CD13, CD14, CD15, CD33 VE CD64)

AML olgularında CD13 %70-80 ve CD33 %80-90 oranında pozitif bulunmaktadır. APL, M4 ve M5 olgularında CD33'ün varlığı miyelomonositik kökeni göstermesi bakımından CD13'ten daha hassastır.¹⁵

AML olguları dışında CD13 ve CD33 özellikle Pre B ALL'de %10'a varan oranlarda, her ikisinin birlikte pozitifliği de %3 oranında bulunabilmektedir.¹⁵

CD14 genellikle monositik seri göstergesi olan bir antijendir. M4/M5 olgularında %53 pozitiflik saptanmıştır. APL'de (-) saptanmaktadır. CD15 ekspresyonu tüm AML'lerde ancak %15 (+)'lik göstermektedir. CD64 de monositik seri antijeni olarak belirtilmektedir. M4/M5 olgularında %58 pozitiflik saptanırken M1/M2'de de %17 oranında pozitiflik saptanmıştır. CD14'e benzer şekilde hiçbir APL olgusunda CD15 ekspresyonu gösterilememiştir.¹⁵

MİYELOPEROKSİDAZ

Akım sitometrik olarak MPO'nun 71 olguya uygulandığı çalışmada, 24 M0 olgusunun 17'sinde blastların %3'ünden fazlasında MPO ekspresyonu gösterilmiştir. M1/M2 22 olgunun 21'inde MPO'nun blastların %10'undan fazlasında eksprese olduğu bildirilmiştir.¹⁵

MEGAKARYOSİT VE NK HÜCRE İLİŞKİLİ ANTİJENLER

(CD41, CD61, CD56)

Megakaryosit ilişkili antijenler olan CD41 ve CD61 analiz edilen tüm M7 hastalarda pozitif bulunmasının yanı sıra bazı M0, M1/M2, M4 ve M5 olgularında da eksprese olduğu bildirilmiştir. Bu tür bir ekspresyonun önemi bilinmemesine rağmen en

mantıklı açıklaması trombositlerin Fc reseptörleri ile nonspesifik bağlanmaları sorumlu tutulmaktadır. Ancak diğer bir açıklama da bunların aberan ekspresyonudur. Çünkü bazılarında bu antijenlerin ikisi yerine yalnızca biri eksprese olmaktadır.¹⁵

CD56 ekspresyonu %25 eksprese edilmekte ve çoğu da monositik dizi kökenli AML olgularındır.¹⁵

MİYELOİD LÖSEMİLERDEKİ LENFOİD ANTİJEN EKSPRESYONU

Miyeloid lösemilerdeki lenfoid antijen ekspresyonu lenfoid lösemilerdeki miyeloid antijen ekspresyonundan daha yaygındır.

B hücre ilişkili antijen CD19 M0 olguların %8'inde (+), M1/M2 olguların %2.4'ünde (+) iken, CD20 hiçbir AML olgusunda bildirilmemiştir.¹⁵

T hücre antijenlerinden en yaygın olanı CD7'dir ve M0 olgularının %44'ünde, M1/M2'lerin %25'inde, APL'lerin %6'sında, M5'lerin %25'inde, M6'ların %12'sinde ve M7'lerin %50'sinde eksprese olmaktadır. İkinci en sık eksprese olan T hücre ilişkili antijen CD2'dir. 154 AML olgusunun %19'unda (+) olduğu ve bunu %14 ile CD4(+)'liğinin izlediği bildirilmektedir. T hücre ilişkili antijenler arasında CD3 (cyCD3 dâhil), CD1, CD5 ve CD8 yoğun olarak preT hücreli ALL olgularında eksprese edilmektedir ve hiçbir pre-B ALL veya myeloid lösemide eksprese olmamaktadır.¹⁵

Miyeloid lösemilerde TdT ekspresyonu yalnızca M0 ve M1/M2'lerde görülmüştür, ancak APL hariç diğer AML gruplarında da görülebilir.¹⁶

BİFENOTİPİK AKUT LÖSEMİ

Bifenotipik akut lösemi dual dizi diferansiyasyon özellikleri gösteren olguları tanımlamaktadır.¹⁷ MPO veya NBE (+) AML olgularında lenfoid seri ilişkili antijenler (CD7, CD2, CD4, CD19, CD10) eksprese olabilmektedir. Ancak lenfoid seriye çok özel antijenlerin (cyCD3, cyCD79) negatif olması halinde bu olguların lenfoid antijen (+) AML olarak tanımlanmaları daha doğru bir ifadedir.

LÖSEMİ İLİŞKİLİ İMMÜNFENOTİP

Multiparametrik akımsitometri (MAS) ile AML ve ALL hastalarının çoğunluğunda lösemi ilişkili immünofenotipler (LAIP) tanımlanabilmektedir;

1. Farklı dizi antijenlerinin asenkron ekspresyonu/ko-ekspresyon
2. Ag ekspresyonunun olmaması,
3. Asenkron antijen ekspresyonu (örneğin; matür-immatür antijen birlikteliği) ya da
4. Antijen aşırı ekspresyonu varlığı ile tanımlanmaktadır.

LAIP tanımının yapılması, hastanın daha sonra MRD açısından takibinde de rol oynayabilmektedir.¹⁸⁻²¹

Önceki çalışmalarda normal miyeloid öncül hücreler ile blastik hücre antijenik yapılarının eşit olmadığı ve normal miyeloid diferansiyasyonla ilişkisi olmayan antijenlerin varlığı gösterilmiştir.^{22,23}

AML'deki aberan fenotip insidansı hâlâ tartışmalıdır ve farklı sonuçlar bildirmektedir. Kullanılan monoklonal antikor panellerindeki farklılığa bağlı olarak bu sıklık %4.5 ile %88 arasında bildirilmektedir.^{24,25} 35 denovo AML hastasında aberan fenotip ekspresyonunun araştırıldığı bir çalışmada;²⁶

Aberan fenotip tanımı için:

1. Miyeloid blastlarda lenfoid antijenlerin ko-ekspresyonu (CD2, CD7, CD10, CD19) ve
2. Asenkron antijen ekspresyonu (blast hücrelerinde hem matür hem de immatür antijenlerin ekspresyonunun varlığı):
 - *CD117 + CD34 + ve CD15 + (ya da CD65 + ya da CD11c +, ya da CD14 +)*
 - *CD117+ CD34- ve CD15+ (ya da CD65+ ya da CD11c+ ya da CD14+)*
 - *CD117- CD34+ ve CD15+ (ya da CD65+ ya da CD11c+ ya da CD14+)*
 - *CD34+ CD56+ dikkate alınmıştır.*

Bu çalışmada %88.6 olguda aberan fenotip, %74.2 olguda ise birden fazla aberan fenotip saptandığı bildirilmektedir.

Lenfoid antijen koekspresyonu %34.2 olguda saptanırken, en sık görüleni de CD 7 (%25.7) olarak bildirilmektedir. Bunu CD2 (%11), CD19 (%9) izlemektedir.

Asenkron Antijen Ekspresyonu

Yüzde 82.4 ile en sık rastlanan aberan fenotipik özellik olarak verilmektedir. Matür antijenler en sık CD117+ CD34+ fenotipi birlikteliği şeklinde ve en sık görüleni %67 ile “CD117+ ve/veya CD34+ ve CD11c +” liği olarak belirtilmektedir.

Aberan Fenotiplerin Klinik Özellikler ile İlişkisi

CD117+ CD15+ asenkron ekspresyonu tedaviyle ilişkisi en belirgin olan fenotip olarak bildirilmiştir. Bu olguların %81’i tam remisyona ulaşırken, taşımayanların %23’ünün girebildiği ayrıca karyotip analizlerinde bu fenotipi göstermeyen olgularda daha kötü prognozlu kromozom anomalilerinin saptandığı, taşıyanlarda ise daha iyi prognozlu anomalilerin görüldüğü bildirilmiştir.

İMMÜNFENOTİP-MRD İLİŞKİSİ

Akut lösemili hastaların çoğunda indüksiyon tedavisi sonrası veya idame tedavisi sırasında relaps riski akım sitometrik MRD analizleri ile değerlendirilmektedir. Böylece tam remisyondan kalitesi tespit edilebilmekte, hastalık progresyonu daha erken tahmin edilebilmekte ve MRD düzeyi yüksek bulunan hastalara daha yoğun tedaviler gerekli olabilmektedir. Bu yöntem ayrıca allojeneik kemik iliği transplantasyonu yapılan hastalarda MRD saptanması için de faydalıdır. Böyle bir hastada MRD saptandığı zaman immünsüpressif tedavi kesilerek “graft versus host” hastalığı (GVHD) ile birlikte “graft-versus-lösemi (GVL)” etkisi de indüklenmekte ve MRD oranı düşürülmektedir.

MAS ayrıca akut lösemilerde remiyon kriterleri içinde de yerini almaktadır.²⁷ Tanı anında ve hemen başlangıç tedavisi sonrası LAIP pozitif hücre sayısındaki azalmanın gösterilmesi AML ve ALL hastalarında remisyona girme ve uzun dönem yaşam oranları ile ilişkili bulunmuştur.^{28,29} Bu yöntem tedavinin herhangi bir zamanında yüksek riskli hastaların tedavisini mümkün kılması yanı sıra, takipte sitomorfolojik olarak remisyonda olup relaps yapacak hastaların da önceden tespitini mümkün kılacaktır.¹⁸⁻²⁰

Alman BFM grubunun çocuk AML olgularında yaptığı MRD çalışmasında, MRD pozitif olguların relaps risklerinin iki kat daha fazla olduğu

ve üç yıllık yaşam oranlarının belirgin şekilde daha düşük olduğu gösterilmiştir.²¹ Coustan-Smith ve ark.nın çocuk AML hastalarındaki çalışmasında tedavi sonrası 10^{-3} ve üzerinde AML blast hücresi olanlarda 3 yıllık yaşam oranları %33 iken daha az blastik hücre olanlarda %72 bulunmuştur.³⁰

GENETİK ANOMALİ-İMMÜNFENOTİP İLİŞKİSİ

Yakın zamanda bazı yazılarda lösemik hücrelerdeki bazı spesifik genetik anomalilerle immünofenotipik karakteristikler arasında da kuvvetli ilişki gösterilmiştir.^{18,27}

111 AML hastasında multipl boya kullanılarak yapılan akım sitometrik analizden elde edilen verilere göre üç fenotipik özellik kombinasyonunun (*blastik hücre popülasyonu büyüklüğü, CD34/CD15 ekspresyonu ve CD13 ekspresyonu*) PML/RAR- α geni taşıyan AML olgularının saptanmasında çok duyarlı (%100) ve spesifik (%99) olduğu bildirilmektedir. Ayrıca bazı non-spesifik miyeloid belirteçler olan CD2 ekspresyonunun inv(16)’lı AML-M4-Eo ile, CD19 ve CD56 ekspresyonunun t(8;21)’li AML-M2 (17,26) ile ilişkisi gösterilmiş ve bu genetik defektlerle ilişkili yeni immünofenotipik alt grupların tanımlanmasında faydalı olmuştur.

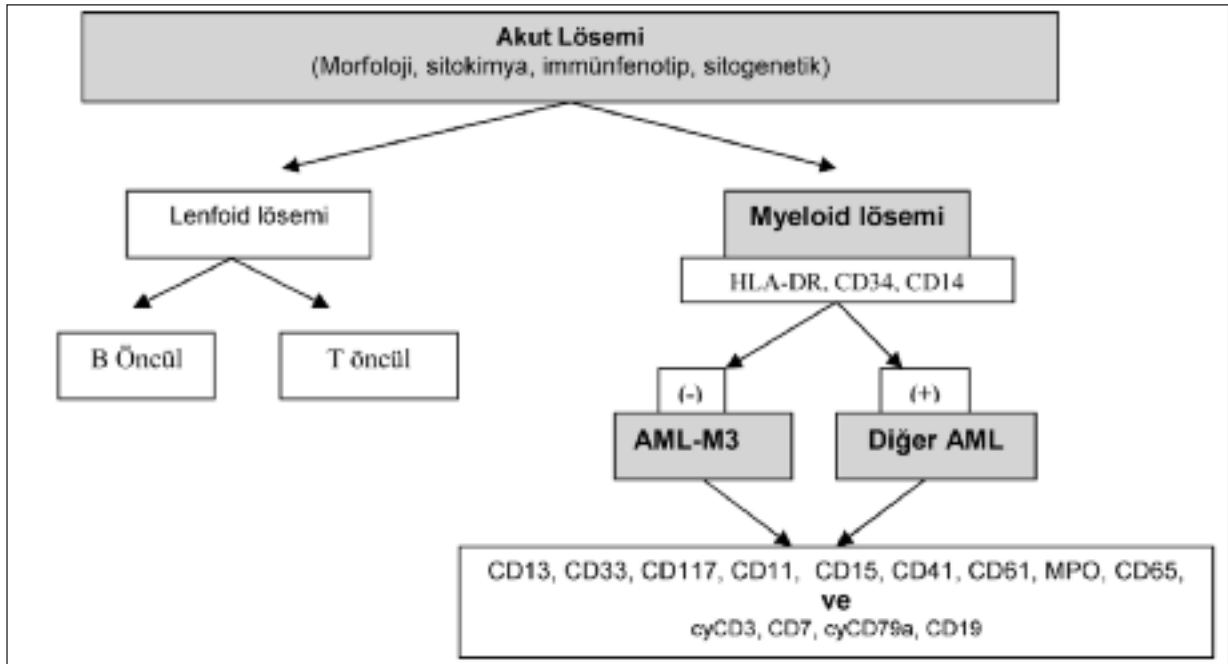
SONUÇ

Tedavi planı açısından akut lösemiler önce lenfoid veya miyeloid orijinli olarak ayrılmalıdır. Sonraki aşamada ALL’ler öncül B veya T hücre orijinli olarak ayrılırken, AML’ler de APL ve diğer AML’ler olarak ayrılmalıdır (Şekil 1).¹⁵

Çoğu zaman bu ayırım morfolojik ve sitokimyasal enzim yöntemleriyle yapılmaktadır. Ancak bazen bunlar doğru tanı için yeterli olmamakta ve MAS gerekmektedir.

■ MAS’ın en faydalı ve önemli olduğu durumlardan birisi de miyeloid dizinin tanımlanabilmesi ve minimal diferansiye akut lösemilerde lenfoid dizinin ekarte edilmesidir.

■ CD33 miyeloid diziyi göstermede CD13’ten daha duyarlı olmasına karşın daha az spesifiktir. Çünkü AML M7 ve lenfoid lösemilerdeki aberan ekspresyonu daha yüksektir.



ŞEKİL 1: Akut lösemi tanı akış şeması.

■ AML M0 minimal diferansiyasyon göstermesi dışında sıklıkla FAB L1/L2 morfolojidedir. TdT ve çeşitli lenfoid seri ilişkili antijen ekspresyonları yaparak yanlışlıkla miyeloid antijen pozitif ALL tanısı alabilmektedir.³¹ cyCD3, CD5 antijenleri AML M0'ın pT-ALL olgularından ayırımında en iyi belirteçdir. MPO tüm M0 olgularında pozitif olmadığından tanı daha önce tanımlanan diğer kriterlere de dayandırılmalıdır.¹⁷

■ CD2, CD4, CD7, CD10 ve CD19 ekspresyonları lenfoid diferansiyasyon delilleri olarak alınmamalıdır. Çünkü bu antijenlerin ekspresyonları (özellikle T hücre ilişkili antijenler) AML M0 olgularında görülebilmektedir. Hem cyCD3 hem de cyCD79a'nın yokluğu AML M0 tanısını koymada MPO varlığından daha değerlidir.

■ APL(M3)'nin diğer AML tiplerinden ayırımında en değerli belirteç HLA-DR'dir. Çünkü HLA-DR APL'lerde hemen hemen görülmemektedir. CD34 ekspresyonu da ilave edilirse ayırım daha net olarak yapılabilmektedir. Böylece sadece MPO ekspresyonu olan bir AML olgusunda HLA-DR ve CD34 (+)'liği APL tanısını tamamen dışlayabilmektedir. Ancak her iki antijen yokluğu %10 kadar AML M1/M2 olgusunda da görülebilmektedir.¹⁵

■ CD14 antijeni de bu anlamda oldukça değerlidir çünkü hiçbir APL olgusunda bildirilmemiştir. Genel olarak M4/M5 olgularında pozitif bulunmaktadır. M1/M2'lerin %10'unda pozitif olabilmektedir.¹⁵

■ CD117 tüm AML alttiplerinde bulunabildiğinden alt grup ayırımında çok faydalı bulunmuştur.¹⁵

■ AML M4, M5 ve M6 tanısı immünofenotipleme olmaksızın rutin sitokimyasal boyalar ile konulabilir.

■ M7 olgularında da aşırı kemik iliği fibrozisi nedeniyle pansitopeni ve sadece birkaç dolaşan blast vardır.³² Birçok olguda da megakaryoblastlar küçük lenfoblastlara hatta lenfositlere benzeyerek tanıyı daha güçleştirebilmektedir. Bu tür durumlarda MAS dolaşan nadir atipik hücrelerde CD41 (gpIIb) ve/veya CD61(gpIIIa) ekspresyonunu saptayarak ve MPO'yu da (-) göstererek megakaryoblast olarak tanımlayabilir.

■ Üç veya üzerinde aberan fenotipik özellik daha çok M4 ve M5 olgularında görülmektedir. Asenkron ekspresyon en sık aberan fenotipik özelliktir. Erken antijenlerin CD11c ile birlikteliği daha sık görülmektedir.²⁶

■ Aberan fenotip-prognoz ilişkisi: M2 ve M3 AML 'de CD 56 ekspresyonunun varlığı daha kötü bir klinik gidişle ilişkili bulunmuştur.³³⁻³⁵ AML'deki kötü prognozla ilişkilendirilen bir diğer antijen CD 7'dir.³⁶ CD7 (+) olgularda aynı zamanda multidrug rezistan protein ve kötü prognostik gidişle ilgili bilinen CD34 ekspresyonu da (+) olmaktadır. Asenkron antijen ekspresyonlarından CD117+ CD15+ liği iyi prognozla ilişkilidir. Ayrıca iyi klinik gidişle ilişkili kromozomal defektlerin bu grupta görülmesi ve kötü prognozlu kromozomal anoma-

lilerin de yalnızca CD117 ve CD15 negatif grupta saptanması önemli bir bulgudur.²⁶

■ CD117+ CD34+ CD15+ fenotipik özellik birçok AML grubunda eksprese olmaktadır ve morfolojik remisyon sırasında MRD izleminde kullanılabilir.²⁶

■ CD13, CD33, HLA-DR, CD34, CD117, CD11, CD14, CD15, CD41, CD61, MPO, CD65, ve cyCD3, CD7, cyCD79a, CD19 tüm AML olgularında ilk tanıda bakılmalıdır.²⁶

KAYNAKLAR

- Haferlach T, Bacher U, Kern W, Schnittger S, Haferlach C. Diagnostic pathways in acute leukemias: a proposal for a multimodal approach. *Ann Hematol* 2007;86(5):311-27.
- Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995;9(10):1783-6.
- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 1st ed. Lyon: IARC Press, 2001. p.352.
- Matutes E, Morilla R, Farahat N, Carbonell F, Swansbury J, Dyer M, et al. Definition of acute biphenotypic leukemia. *Haematologica* 1997;82(1):64-6.
- Pagnucco G, Vanelli L, Gervasi F. Multidimensional flow cytometry immunophenotyping of hematologic malignancy. *Ann N Y Acad Sci* 2002;963:313-21.
- Jennings CD, Foon KA. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood* 1997;90(8):2863-92.
- Stelzer GT, Shults KE, Loken MR. CD45 gating for routine flow cytometric analysis of human bone marrow specimens. *Ann N Y Acad Sci* 1993;677:265-80.
- Borowitz MJ, Guenter KL, Shults KE, Stelzer GT. Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometric analysis: use of CD45 and right-angle light scatter to gate on leukemic blasts in three-color analysis. *Am J Clin Pathol* 1993;100(5):534-40.
- Stelzer GT, Goodpasture L. Use of multiparameter flow cytometry and immunophenotyping for the diagnosis and classification of acute myeloid leukemia. In: Stewart CC, Nicholson JKA, eds. *Immunophenotyping*. 1st ed. New York: Wiley-Liss; 2000. p.215-38.
- Yenerel MN. [Leukemia immunophenotyping evaluation]. *Türkiye Klinikleri J Hem Onc-Special Topics* 2009;2(1):60-5.
- Paredes-Aguilera R, Romero-Guzman L, Lopez-Santiago N, Burbano-Ceron L, Camacho-Del Monte O, Nieto-Martinez S. Flow cytometric analysis of cell-surface and intracellular antigens in the diagnosis of acute leukemia. *Am J Hematol* 2001;68(2):69-74.
- Pombo de Oliveira MS, Matutes E, Rani S, Morilla R, Catovsky D. Early expression of MCS-2 (CD13) in the cytoplasm of blast cells from acute myeloid leukaemia. *Acta Haematol* 1988;80(2):61-4.
- Knapp W, Strobl H, Majdic O. Flow cytometric analysis of cell surface and intracellular antigens in leukemia diagnosis. *Cytometry* 1994;18(4):187-98.
- Janossy G, Coustan-Smith E, Campana D. The reliability of cytoplasmic CD3 and CD22 antigen expression in the immunodiagnosis of acute leukemia: a study of 500 cases. *Leukemia* 1989;3(3):170-81.
- Kaleem Z, Crawford E, Pathan MH, Jasper L, Covinsky MA, Johnson LR, et al. Flow Cytometric Analysis of Acute Leukemias Diagnostic Utility and Critical Analysis of Data. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127(1):42-8.
- Bitter MA, Le Beau MM, Rowley JD, Larson RA, Golomb HM, Vardiman JW. Association between morphology, karyotype and clinical features in myeloid leukemias. *Human Pathol* 1987;18(3):211-25.
- Kaleem Z, White G. Diagnostic criteria for minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML-M0): evaluation and a proposal. *Am J Clin Pathol* 2001;115(6):876-84.
- Campana D. Determination of minimal residual disease in leukaemia patients. *Br J Haematol* 2003;121(6):823-38.
- Griesinger F, Piro-Noack M, Kaib N, Falk M, Renziehausen A, Troff C, et al. Leukaemia-associated immunophenotypes (LAIP) are observed in 90% of adult and childhood acute lymphoblastic leukaemia: detection in remission marrow predicts outcome. *Br J Haematol* 1999;105(1):241-55.
- Kern W, Schoch C, Haferlach T, Schnittger S. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005;56(2):283-309.
- Langebrake C, Creutzig U, Dworzak M, Hrusak O, Mejstrikova E, Griesinger F, et al. Residual disease monitoring in childhood acute myeloid leukemia by multiparameter flow cytometry: the MRD-AML-BFM Study Group. *J Clin Oncol* 2006;24(22):3686-92.
- Griffin JD, Mayer RJ, Weinstein HJ, Rosenthal DS, Coral FS, Beveridge RP, et al. Surface marker analysis of acute myeloblastic leukemia: identification of differentiation-associated phenotypes. *Blood* 1983;62(3):557-63.
- Andrews RG, Torok-Storb B, Bernstein ID. Myeloid associated differentiation antigens on stem cells and their progeny identified by monoclonal antibodies. *Blood* 1983;62(1):124-32.
- Reading CL, Estey EH, Huh YO, Claxton DF, Sanchez G, Terstappen LW, et al. Expression of unusual immunophenotype combinations in acute myelogenous leukemia. *Blood* 1993;81(11):3083-90.
- Macedo A, Orfao A, Vidriales MB, López-Berges MC, Valverde B, González M, et al. Characterization of aberrant phenotypes in acute myeloblastic leukemia. *Ann Hematol* 1995; 70(4):189-94.

26. Bahia D, Yamamoto M, Chauffaille M, Kimura E, Bordin JO, Filgueiras MA, et al. Aberrant phenotypes in acute myeloid leukemia: a high frequency and clinical significance. *Haematologica* 2001;86(8):801-6.
27. Cheson BD, Bennett JM, Kopecy KJ, Büchner T, Willman CL, Estey EH, et al.; International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 2003;21(24):4642-9.
28. 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. *Haematologica* 2004;89(5):528-40.
29. San Miguel JF, Vidriales MB, Lopez-Berges C, Díaz-Mediavilla J, Gutiérrez N, Cañizo C, et al. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. *Blood* 2001;98(6): 1746-51.
30. Coustan-Smith E, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Razzouk BI, Pui CH, Pounds S, et al. Clinical significance of residual disease during treatment in childhood acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2003;123(2):243-52.
31. Childs C, Hirsch-Ginsberg C, Walters RS, Andersson BS, Reuben J, Trujillo JM, et al. Myeloid surface antigen positive acute lymphoblastic leukemia (My1 ALL): immunophenotypic, ultrastructural, cytogenetic and molecular characteristics. *Leukemia* 1989;3(11):777-83.
32. Brunning RD. Acute myeloid leukemia. In: Knowles DM, ed. *Neoplastic Hematopathology*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.p.1667-715.
33. Orfao A, Chillón MC, Bortoluci AM, López-Berges MC, García-Sanz R, Gonzalez M, et al. The flow cytometric pattern of CD34, CD15 and CD13 expression in acute myeloblastic leukemia is highly characteristic of the presence of PML-RARalpha gene rearrangements. *Haematologica* 1999;84(5): 405-12.
34. Murray CK, Estey E, Paietta E, Howard RS, Edenfield WJ, Pierce S, et al. CD56 expression in acute promyelocytic leukemia: a possible indicator of poor treatment outcome? *J Clin Oncol* 1999;17(1):293-7.
35. Ferrara F, Morabito F, Martino B, Specchia G, Liso V, Nobile F, et al. CD56 expression is an indicator of poor clinical outcome in patients with acute promyelocytic leukemia treated with simultaneous all-trans-retinoic acid and chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000; 18(6):1295-300.
36. Saxena A, Sheridan DP, Card RT, McPeck AM, Mewdell CC, Skinnider LF. Biologic and clinical significance of CD7 expression in acute myeloid leukemia. *Am J Hematol* 1998; 58(4):278-84.