



Kronik Lenfositik Lösemide Ölçülebilir Kalıntı Hastalık: Kuru Tüp Akım Sitometri Metoduyla Gerçek Yaşam Deneyimi

Measurable Residual Disease in Chronic Lymphocytic Leukemia: Experience in Real-Life Setting with Dry Tube Flow Cytometric Method

Seval AKPINAR, Burhan TURGUT

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, Tekirdağ, Türkiye

ÖZ

Amaç: Kemoimmünoterapi (Kİ) sonrası ölçülebilir kalıntı hastalığın (ÖKH) negatifleşmesi uzun dönem progresyonsuz sağkalım (PS) ve genel sağkalım ile ilişkilidir. Ancak klinik çalışmalar dışında tedavi edilen hastalarda ÖKH negatifliğinin sağkalım üzerine etkisi belirsizdir. Kuru antikor tüp metodu gibi pipet kullanılmayan antikor boyama yöntemleri işlem ilişkili hataları azaltabilir ve daha iyi standardizasyon sağlayabilir. Fakat bu yöntemin kullanıldığı klinik veri bulunmamaktadır. Çalışmamızda kronik lenfositik lösemi (KLL) olgularının tedavisinde kuru antikor tüp metodunun etkililiğinin belirlenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Kİ uygulanan ve tedavinin bitiminden sonraki 6 ayda ÖKH analizi yapılan KLL hastalarının verileri geriye dönük olarak analiz edildi. Çalışmaya 46 hasta dahil edildi. ÖKH, çoğunlukla kuru tüp metodu kullanılarak, hassasiyeti 10^{-4} olan akım sitometri ile değerlendirildi.

Bulgular: Otuz (%65,2) hastada ÖKH negatifliği sağlandı. ÖKH negatifleşenlerde medyan PS süresi negatifleşmeyenlere kıyasla daha uzundu. Çalışma sürecinde 29 hasta yalnızca kuru tüp metodu ile değerlendirildi. Kuru tüp metodu ile çalışılan hastalar ayrıca değerlendirildiğinde ÖKH negatifliğinin uzamış PS ile ilişkili olduğu görüldü.

Sonuç: Çalışmamız KLL hastalarında akım sitometri temelli ÖKH izleminin klinik çalışmalardakine benzer şekilde PS açısından prognostik önemini ortaya koydu. Ayrıca kuru antikor paneli (DuraClone RE CLB Tube) yöntemi klinik pratikte ilk kez kullanıldı.

Anahtar Kelimeler: Ölçülebilir kalıntı hastalık, kemoimmünoterapi, kronik lenfositik lösemi, akım sitometri

ABSTRACT

Aim: Undetectable measurable residual disease (uMRD) after chemoimmunotherapy (CI) is associated longer progression-free survival (PFS) and overall survival. However, it remains to be demonstrated whether uMRD translates into survival benefit in patients treated outside of clinical trials. Pipetting-free antibody staining procedures such as dry antibody tube method can reduce process-related errors and provide a better standardization. However, there are no clinical data about this method. The aim of the study was to evaluate the impact of dry antibody tube-based MRD analysis in the management of chronic lymphocytic leukemia (CLL).

Materials and Methods: We retrospectively reviewed the data of CLL patients, who were treated with CI regimens and had MRD analysis within 6 months after therapy. Forty-six patients were included in the study. MRD was assessed by multi-color flow cytometry panels with a sensitivity level of 10^{-4} , mostly with dry tube.

Results: uMRD was achieved in 30 (65.2%) of the patients. The median PFS of patients who achieved uMRD was significantly longer compared to patients who did not. Twenty-nine patients were analyzed only by dry tube throughout study period. In the patients studied with the dry tube method, the median PFS of the ones who achieved uMRD was also significantly longer than those who did not.

Conclusion: Our study has indicated that flow cytometry based MRD surveillance of CLL patients in real-life setting provides prognostic information regarding PFS in accordance with clinical studies. In addition, clinical data of dry antibody panel (DuraClone RE CLB Tube) were presented for the first time.

Keywords: Measurable residual disease, chemoimmunotherapy, chronic lymphocytic leukemia, flow cytometry

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Seval AKPINAR, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, Tekirdağ, Türkiye

Tel.: +90 532 634 76 32 E-posta: seakpinar@nku.edu.tr ORCID ID: orcid.org/0000-0002-6961-8971

Geliş tarihi/Received: 24.11.2021 Kabul tarihi/Accepted: 07.01.2022

GİRİŞ

Son yıllarda, kronik lenfositik lösemisinin (KLL) tedavisi yeni biyolojik ajanların kullanıma girmesiyle kökten değişti¹. Bununla birlikte, fludarabin, siklofosfamid ve rituksimab (FCR) ve rituksimab-bendamustin (RB) gibi kemoimmünoterapi (Kİ) ajanları, özellikle mutasyona uğramış immünglobulin ağır zincir değişken bölge mutasyonu (IGHV) ile başvuran hastalarda veya del(11) (q22-23) ve del(17) (p13.1) gibi yüksek riskli sitogenetik anormallikler olmayanlarda, KLL'nin birinci basamak tedavisinde halen kullanılmaktadır².

KLL'de ölçülebilir kalıntı hastalık (ÖKH), tedaviyi takiben standart testlerin saptama sınırının altındaki lösemisinin kalıcılığı olarak tanımlanır. KLL'de saptanamayan ÖKH şu anda 10.000 lökositte 1'den az KLL hücresinin ($<10^{-4}$) varlığı olarak tanımlanmaktadır³. Kİ ile tedavi edilen KLL hastalarında, saptanamayan ÖKH'ye ulaşmanın daha uzun progresyonsuz sağkalım (PS) ve genel sağkalım (GS) için bağımsız bir öngörücü olduğu bulunmuştur⁴⁻⁶. Sonuç olarak, Avrupa Düzenleme Ajansı (EMA), ÖKH negatifliğinin elde edilmesini, yeni ajanların onaylanması için faz III klinik denemelerinin bir ara-son noktası olarak kabul etti⁷.

KLL hastalarında, şaşırtıcı bir şekilde kalıcı saptanamayabilir hastalığa⁸ sahip olanlarda uzun süreli hastalık kontrolü sağlayan ibrutinib gibi yeni biyolojik ajanların ortaya çıkmasından sonra, ÖKH değerlendirmesi, Kİ alan hastalarda aynı prediktif değere sahip olmayabilir. Ancak venetoklaksın KLL tedavi araçlarına dahil edilmesi ve yeni kemo-içermeyen kombinasyon stratejilerinin klinik çalışmalarda değerlendirilmeye başlamasından sonra, ÖKH değerlendirmesi bilim camiasının ilgisini yeniden çekmiştir^{9,10}.

ÖKH durumu, çok renkli akış sitometrisi (FCM), gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RQ-PCR) ve yüksek verimli sıralama (HTS) yoluyla değerlendirilebilir. RQ-PCR ve HTS daha duyarlı yöntemler olsa da, en son gerçekleştirilen standardizasyonu ve genel uygulanabilirliği nedeniyle FCM şüphesiz en yaygın uygulanan prosedürdür¹¹. Başlangıçta rezidüel hastalık 2 veya 3 renkli FCM ile düşük duyarlılıkla değerlendirildi, daha sonra ÖKH'nin tanımı ve uygulanabilirliği çarpıcı biçimde değişti. KLL Avrupa Araştırma Girişimi (ERIC), ABD ve Avustralya merkezleriyle işbirliği içinde, FCM ile ÖKH değerlendirmesine ilişkin, düzenleyici kurumlar tarafından da tanınan birkaç standart tahlil önermiştir¹¹⁻¹⁴.

Pipetleme kaynaklı hataların etkisini azaltan, kuru antikor kokteylleri gibi pipetleme gerektirmeyen antikor boyama prosedürlerinin kullanılması, teşhiste daha iyi standardizasyon sağlayabileceği iddia edilmiştir¹⁵. Son zamanlarda, Beckman Coulter tarafından, KLL numunelerinde ÖKH'nin saptanması için spesifik olan, kuru reaktif içeren sekiz renkli bir tüp geliştirilmiştir. Bu yeni teknoloji, tüpün dibine

yapıştırılmış, kuru antikorla kaplı paneli olan tüpler sağlar¹⁶. Bu panel, ERIC grubu tarafından amaçlanan ve sıvı reaktifler kullanan yöntemle karşılaştırıldı ve bu yeni yöntemle KLL örneklerinde ÖKH analizinin duyarlı ve uygulanabilir olduğu gösterildi¹⁶. Ancak şimdiye kadar bu yöntemle ilgili herhangi bir klinik veri yayınlanmamıştır.

Saptanamayan ÖKH'nin prognostik önemi ileriye dönük klinik çalışmalarda gösterilmiş olsa da, çalışma dışı tedavi edilen hastalarda saptanamayan ÖKH'nin gerçek bir faydaya dönüşüp dönüşmediği hala bilinmemektedir. Bu doğrultuda; çalışmamızın amacı, tedavi sonu ÖKH'nin gerçek yaşam ortamında KLL hastalarının yönetimine katkıda bulunup bulunmayacağını araştırmaktır. Ayrıca kuru tüp yönteminin geçerliliğini, klinik hasta örneklerinde göstermeyi amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Tasarımı

Haziran 2013 ile Ocak 2021 arasında bölümümüzde Kİ rejimleri [RFC, RB ve R-Clorambusil (R-CLB)] ile tedavi edilen KLL hastalarının verilerini geriye dönük olarak inceledik. Uluslararası KLL Çalıştayı'na (iwCLL)¹⁷ göre KLL tanısı koyulan ve birinci basamak tedavi olarak en az dört döngü Kİ almış ardışık tüm KLL hastalarını (≥ 18 yaş) dahil ettik. Hastalar, yalnızca klinik takip verileri mevcutsa ve tedavinin sonunda iwCLL kriterlerine göre tam yanıt (TY), TY eksik iyileşme (CRI) veya mutlak lenfositoz olmadan kısmi yanıt varsa ve tedaviden sonraki 6 ay içinde ÖKH analizi yapılmışsa dahil edildi.

Hastaların başlangıç özellikleri, Kİ'ye başlama anında kaydedildi. Buna yaş, cinsiyet, Rai evresi, tedavi endikasyonu, tanı ile Kİ başlangıcı arasındaki süre, tam kan sayımı değerleri, beta-2 mikroglobulin, albümin, kreatinin, laktat dehidrogenaz ve del(13q14), trizomi 12, del(17p), del(11q) gibi genetik özellikler dahil edildi. Ayrıca; döngünün Kİ sayısı, tedaviye yanıt, remisyon süresi ve diğer zaman parametreleri kaydedildi.

ÖKH Değerlendirmesi

FCM ile yapılan tüm ÖKH analizleri için taze periferik kan örnekleri kullanıldı. Mart 2015'e kadar, bir FACS Calibur (BD Biyolojik Bilimler, ABD) üzerinde anti-CD19, anti-CD20, anti-CD5, anti-CD43, anti-CD81, anti-CD79b ve anti-CD3'ü içeren antikor panelli dört renkli iki tüplü FCM yöntemi kullanıldı. Mart 2015 ile Şubat 2017 arasında; anti-CD19, anti-CD20, anti-CD5, anti-CD43, anti-CD81, anti-CD79b, anti-CD3 ve anti-CD45 içeren sekiz renkli tek tüplü FCM antikor paneli, BC Navious FCM'de kullanıldı (Beckman Coulter, FL, ABD). Her iki yöntem de KLL ERIC önerileriyle uyumluydu¹³.

Şubat 2017'den sonra, son ERIC önerilerine uyumlu olarak, anti-CD81, anti-ROR1, anti-CD79b, anti-CD19, anti-CD5, anti-CD43, anti-CD20 ve anti-CD45 dahil olmak üzere sekiz

renkli DuraClone RE CLB tüpü kullandık¹¹. Çalışma prosedürü, üreticinin talimatlarına göre yapıldı. Kısaca, 300 mL tam kan doğrudan kurutulmuş reaktif tüpüne ilave edildi ve karanlıkta oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Daha sonra örnekler VersaLysing Solüsyonu (Beckman Coulter) ile 20 dakika boyunca parçalandı, santrifüjlendi ve bir kez fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkandı. 500 µL PBS içinde yeniden süspansiyon edildi. Bundan sonra numuneler bir Navios Flow Sitometrisine (Beckman Coulter, FL, ABD) alındı. Numuneler için ayar ve kompanzasyon matrisi, üreticinin talimatlarına göre kitle sağlanan Kompanzasyon Kiti kullanılarak yapıldı. Veri analizi Kaluza Flow Cytometry Analysis Software (Beckman Coulter, ABD) üzerinde yapıldı. Çalışma süresi boyunca akış sitometrik ÖKH değerlendirmesine ilişkin kullanılan metodolojiden bağımsız olarak, ERIC tarafından tavsiye edildiği gibi 10⁻⁴'ün altında bir duyarlılık düzeyine ulaşmak için her olguda en az 500000 hücreyi analiz ettik. Tüm katılımcılar, klinik/laboratuvar verilerinin araştırma amaçlı kullanımı için yazılı bilgilendirilmiş onam verdi. Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alındı (tarih: 29/09/2020 protokol no: 2020.219.09.06) ve Helsinki deklarasyonuna uygun olarak yürütüldü.

İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler, IBM Statistical Package for the Social Sciences Statistics (Sürüm 25.0; IBM Corp., ABD) kullanılarak yapıldı. Sürekli ve nitel değişkenlerin tanımlayıcı bir analizi yapıldı. PS, tedavinin başlangıcından hastalığın ilerlemesine kadar geçen süre olarak tanımlandı. Hayatta kalma eğrileri Kaplan-Meier yöntemi kullanılarak hesaplandı ve gruplar arası karşılaştırmalar log-rank testi kullanılarak yapıldı. Tedavi öncesi özellikler ile PS arasındaki ilişki için tek değişkenli ve çok değişkenli analizler Cox regresyon analizi kullanılarak yapıldı. ÖKH durumu (ikili sonuç) için çok değişkenli analiz, lojistik regresyon analizi kullanılarak yapıldı. Gruplar arası klinik ve biyolojik özellikler χ^2 testi veya Kruskal-Wallis testi ile analiz edildi. Tüm p-değerleri iki yönlüydü ve p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Kırk altı hasta çalışmaya dahil edildi. FCR, RB ve R-CLB gruplarındaki hasta sayıları sırasıyla 24, 17 ve 5 idi. Hastaların özellikleri ve sonuçları Tablo 1'de sunulmuştur. Beklendiği gibi, çalışma kolları arasında yaş açısından bir fark vardı. FCR grubu, RB ve R-CLB kollarına kıyasla normal böbrek fonksiyonu olan daha genç hastaları içermiştir. Aynı eğilim, çalışma kohortu arasında serum kreatinin seviyelerindeki farklılıklarla açıklanabilecek serum β -2-mikroglobulinde de gözlemlendi. Toplamda, sitogenetik değerlendirme sonuçları sadece 22 hastada (%47,8) mevcuttu. Hastaların hiçbirinde del(17p)

yoktu. IgHV mutasyon durumu ve ZAP 70 ekspresyonu çoğu hastada çalışılmadığından, analize dahil edilmedi.

Yirmi dokuz hasta, çalışma süresi boyunca sadece kuru tüp ile analiz edildi. On yedi hasta daha önce başka yöntemlerle analiz edilmiş, ancak Şubat 2017'den sonra tüm bu olgularda analizler kuru tüp yöntemi ile tekrarlanmıştır. Kuru tüp yöntemi kullanılmayan ÖKH pozitif değerlendirilen tüm hastalar, kuru tüp yöntemi ile tekrar pozitif bulunmuştur. Tedavi sonunda, hastaların 30'unda (%65,2) saptanamayan ÖKH elde edildi. FCR grubundaki on sekiz hasta ve bendamustin/rituksimab (BR) grubundaki 12 hastada saptanamayan ÖKH elde edildi; bununla birlikte, R-CLB grubundaki hastaların hiçbirinde saptanamayan ÖKH'ye ulaşılamamıştır (Tablo 1). Yaş, evre, CD38 ekspresyonu ve β -2 mikroglobulin dahil olmak üzere tedavi öncesi özellikler, çok değişkenli analizde tedavi sonu saptanamayan ÖKH ile ilişkili değildi (veriler gösterilmemiştir).

Tüm olgular birlikte değerlendirildiğinde, tahmini medyan PS 56 aydı (Şekil 1A). Medyan takip süresi 34,5 ay (9-100 ay) idi. Takip süresi içinde 46 hastadan sadece biri öldü. Saptanamayan ÖKH elde edilen hastaların medyan PS'si, elde edilemeyen hastalara (29 ay) kıyasla önemli ölçüde daha uzundu (ulaşılamadı) (Şekil 1B). Tedavi gruplarında; yaş, β -2 mikroglobulin, albümin ve kreatinin tek değişkenli analizde PS ile ilişkilendirildi (Tablo 2), ancak çok değişkenli analizde sadece albümin, PS ile ilişkilendirildi [P: 0,008, risk oranı: 15,54, güven aralığı: 2.030-119,1). Saptanamayan ÖKH elde edilen hastaların sadece 4'ünde nüks meydana geldi, bunlardan 2'si RB grubunda ve ikisi RFC grubundaydı. Ayrıca, saptanamayan ÖKH'ye ulaşılamayan 13 hastada nüks görüldü.

Kuru tüp yöntemi ile çalışılan hastalar da ayrıca değerlendirildi. Bu hastalarda medyan takip süresi 25 aydı. Bu hastaların diğer özellikleri Tablo 3'te verildi. Saptanamayan ÖKH elde edilen hastaların medyan PS'si, elde edilemeyenlerden (22 ay) önemli ölçüde daha uzundu (ulaşılamadı) (Şekil 2).

TARTIŞMA

Gerçek yaşam ortamında tedavi edilen KLL hastalarını içeren çalışmamız, KLL'nin Kİ ile birinci basamak tedavisinin sonunda saptanamayan ÖKH elde edilmesinin, daha uzun PS ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu göstermiştir.

İlk olarak, FCR300 ve CLL8 çalışmaları, KLL için birinci basamak tedavi olarak FCR'nin etkinliğini göstermiştir^{18,19}. Yukarıda bahsedilen çalışmalar, mutasyona uğramış IGHV'ye sahip ve del(17p13.1) ve del(11q22.3) gibi yüksek riskli sitogenetik anormallikleri olmayan bir hasta alt grubunun, FCR ile uzun süreli kalıcı remisyon elde ettiğini açıkça göstermiştir. Genç hastalarda FCR'nin RB'ye kıyasla daha uzun PS ile sonuçlandırıldığının bilinmesine rağmen, 65 yaşın üzerindeki hastalarda fayda görülmedi ve BR kohortunda ciddi enfeksiyon

oranı daha düşük gözlemlendi²⁰. Bu nedenle, 65 yaş üstü standart riskli olan yaşlı KLL hastaları için, bendamustin için bir kontrendikasyon olmadığı sürece, BR iyi bir risk-fayda oranına sahip, mantıklı bir birinci basamak tedavi seçeneğidir. Bu durumda klorambusil artı rituksimab kullanılabilir ve BR'de

tercih edilebilir²⁰. KLL11 çalışması, obinituzumabın ek hastalıkları olan yaşlı hastalardaki etkisini değerlendirdi²¹. Obinituzumab-CLB ile tedavi, R-CLB ve CLB monoterapisine kıyasla, yanıt oranlarını artırdı ve PS'sini uzattı. Son olarak, venetoklaks ve BTK inhibitörlerinin KLL tedavisine girmesiyle Ki'nin KLL

Tablo 1. Çalışma grubunun özellikleri ve sonucu

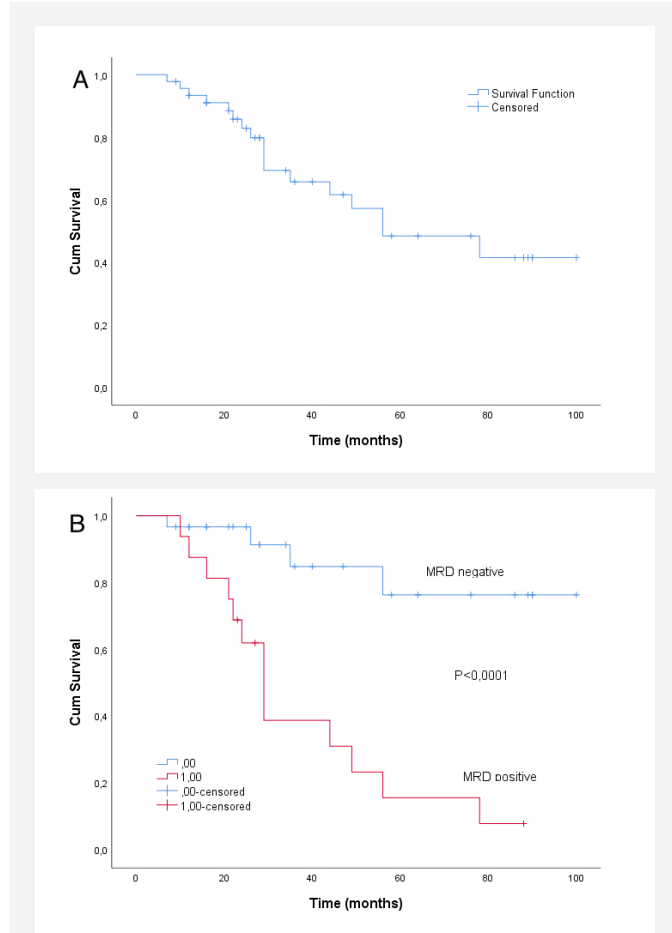
Değişken*	Tüm hastalar, n=46	RFC grubu, n=24	RB grubu, n=17	R-CLB grubu, n=5	p değeri
Yaş (yıl)	65 (45-83)	58,5 (45-68)	68 (60-83)	76 (75-77)	<0,0001
Cinsiyet, n (%)					
Erkek	27 (58,7)	14 (58,3)	10 (58,8)	3 (60)	0,998
Kadın	19 (41,3)	10 (41,7)	7 (41,2)	2 (40)	
RAI aşaması; n, (%)					
0-2	24 (52,2)	13 (54,2)	8 (47,1)	3 (60)	0,844
3,4	22 (47,8)	11 (45,8)	9 (52,9)	2 (40)	
Tedavi endikasyonu** n, (%)					
1	20 (43,5)	10 (41,7)	7 (41,2)	3 (60)	0,602
2	8 (17,4)	5 (20,8)	3 (17,6)	0 (0)	
3	8 (17,4)	5 (20,8)	3 (17,6)	0 (0)	
4	2 (4,3)	0 (0)	1 (5,9)	1 (20)	
5	8 (17,4)	4 (16,7)	3 (17,6)	1 (20)	
Tanıdan tedaviye kadar geçen süre, ay, medyan, (aralık)	12 (1-156)	7 (1-48)	23 (1-81)	18 (8-156)	0,108
Döngü sayısı, n (%)					
4	3 (6,5)	2 (8,3)	1 (5,9)	0 (0)	0,79
5	6 (13)	4 (16,7)	2 (11,8)	0 (0)	
6	37 (80,4)	18 (75)	14 (82,4)	5 (100)	
Hemoglobin, (gr/dL)	11,8 (8,2-16,26)	11,72 (8,3-14,4)	11,84 (8,2-14,4)	11,66 (10-16,26)	0,974
Lenfosit sayısı, (10 ⁹ /L)	50,35 (5,2-138,8)	47,3 (9,6-138,8)	59,3 (5,83-126,2)	43,97 (12,9-61,5)	0,262
Trombosit sayısı, (10 ⁹ /L)	149,5 (23,0-505,0)	180,5 (84,0-505,0)	139,0 (23,0-261,0)	120,5 (91,0-257,0)	0,291
B2M, (mg/L)	4,4 (2,1-8,0)	3,15 (2,1-6,4)	4,7 (2,6-8,0)	6,6 (3,5-7,1)	0,002
Kreatinin, (mg/dL)	0,91 (0,5-1,6)	0,77 (0,5-1,31)	1,08 (0,63-1,6)	1,08 (0,55-1,49)	0,016
Albümin, (gr/dL)	4,47 (2,30-5,23)	4,35 (3,0-4,9)	4,6 (4,0-5,23)	4,7 (4,4-5,1)	0,232
LDH (U/L)	249 (120-568)	235 (127-475)	248 (178-568)	251 (232-407)	0,423
CD38 pozitif (>%30), n (%)	5 (11,4)	4 (16,6)	0 (0)	1 (20)	0,197
FISH (mevcut: 22); n (%)					
Del (17p)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	-
Del (11q)	1 (4,54)	0 (0)	1 (8,33)	0 (0)	
Del (13q)	7 (31,8)	2 (25)	5 (41,6)	0 (0)	
Trizomi 12	2 (9,0)	0 (0)	2 (16,6)	0 (0)	
Sapma yok	11 (50)	6 (75)	4 (33,3)	1 (100)	
Yanıtlar, n (%)					
TY	31 (67,4)	16 (66,7)	12 (70,6)	3 (60)	0,22
CRi	10 (21,7)	6 (25)	4 (23,5)	0 (0)	
PY	5 (10,9)	2 (8,3)	1 (5,9)	2 (40)	
Saptanamayan ÖKH hastaları, n (%)	30 (65,2)	18 (75)	12 (70,6)	0 (0)	0,005
Nüksetmiş hastalar, n (%)	17 (37,0)	7 (29,2)	7 (41,2)	3 (60)	0,388

*Parametrik değişkenler ortanca (minimum-maksimum) olarak ifade edilmiştir.

**1: İlerleyici kemik iliği yetmezliği kanıtı 2: Masif/septomatik veya ilerleyici splenomegali/lenfadenomegali 3: İki aylık bir periyotta >%50'lik bir artışla ilerleyici lenfositoz veya <6 aylık lenfosit ikiye katlanma süresi. 4: Kortikosteroidlere zayıf yanıt veren otoimmün anemi ve/veya trombositopeni 5: Konstitüsyonel semptomlar.

B2M: β-2 mikroglobulin, LDH: Laktat dehidrogenaz, FISH: Floresan *in situ* hibridizasyon, TY: Tam yanıt, PY: Parsiyel yanıt, CRi: Eksik kemik iliği iyileşmesi olan CR: Saptanamayan, ÖKH: Saptanamayan ölçülebilir rezidüel hastalık, RFC: Rituximab, fludarabine, cyclophosphamide, RB: rituximab, bendamustine, R-CLB: rituximab, clorambucil

tedavisindeki rolü daralmış olsa da, Kİ özellikle iyi prognostik özelliklere sahip KLL hastalarında halen kullanılmaktadır². Yakın zamana kadar, ağırlıklı olarak KLL hastalarını Kİ ile tedavi ettiğimiz için, 2013-2020 yılları arasında Kİ ile takip ve tedavi edilen KLL hastaları çalışmamıza dahil edildi.

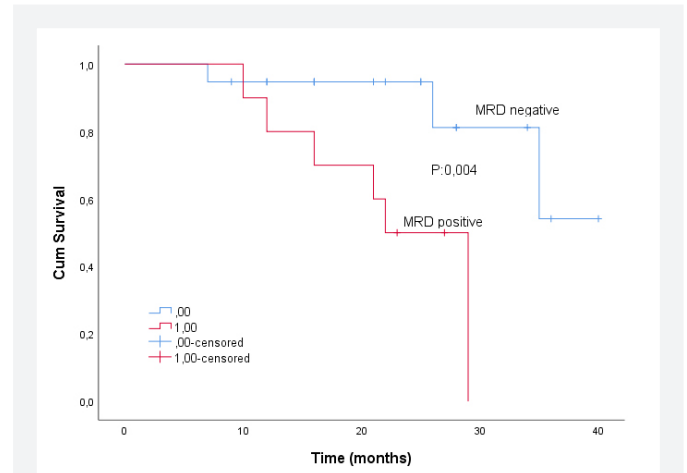


Şekil 1. Tüm hastaların (A) ve ÖKH durumuna (B) göre progresyonsuz sağkalımı

ÖKH: Ölçülebilir kalıntı hastalık

ÖKH'yi ölçmek için en sık kullanılan yöntemler FCM ve PCR. HTS ve daha spesifik testler araştırılıyor olsa da, FCM ÖKH'yi değerlendirmek için altın standart olmaya devam etmektedir¹¹. KLL'de FCM ile ÖKH analizi, klasik belirteçler olan CD19 ve CD5'in birlikte pozitifliğinin veya dengesiz kappa/lambda hafif zincir oranının değerlendirildiği 2 renkli boyama temelinde başlatıldı, ancak bu yöntem, immünohistokimya ile elde edilebilecek olanın ötesine geçemedi²²⁻²⁴. ERIC grubunun ve diğer uluslararası katılımcıların girişimleriyle; 4, 6 ve son olarak 8 renkli akış sitometrisi protokolü geliştirilmiştir ve bu şu anda ileriye dönük klinik çalışmalarda altın standart olarak kalmaktadır^{11,13}. Çalışmamızda; her ikisi de ERIC önerilerine uygun olan, 2015 yılına kadar dört renkli iki tüplü FCM yöntemi, 2015 yılından sonra ise sekiz renkli tek tüplü FCM yöntemi kullanılmıştır.

Son yıllarda; ÖKH analizi için, hücre kaybına neden olan ve standardizasyonu zorlaştıran pipetleme ve yıkama gibi aşamaları ortadan kaldıran kuru tüp yöntemleri geliştirilmiştir¹⁴.



Şekil 2. ÖKH durumuna göre kuru tüp yöntemi ile değerlendirilen hastaların progresyonsuz sağkalımları

ÖKH: Ölçülebilir kalıntı hastalık

Tablo 2. Progresyonsuz sağkalım ile ilgili değişken üzerinde tek değişkenli analiz

Değişken	RO (%95 GA)	p değeri
Yaş	1,055 (1,003-1,109)	0,039
Kreatinin	5,823 (1,068-31,73)	0,042
Albümin	5,339 (1,332-21,40)	0,018
β-2 mikroglobulin	1,590 (1,119-2,259)	0,01
Tedavi grubu		
RFC	9,52	0,009
RB	4,297 (1,331-13,87)	0,015
R-CLB	9,855 (2,072-46,86)	0,004

Analizler tek değişkenli Cox modelleri kullanılarak yapıldı.

RO: Risk oranı, GA: Güven aralığı, RFC: Rituksimab, fludarabin, siklofosamid; RB: rituksimab, bendamustin, R-CLB: Rituksimab, klorambusil

Son zamanlarda, Beckman Coulter, KLL numunelerinde FCM ile ÖKH'nin saptanmasına özel, kurutulmuş reaktifler içeren sekiz renkli bir tüp geliştirmiştir. Bu tüpler, tüpün dibine yapııştırılmış

Tablo 3. Kuru tüp yöntemi ile analiz edilen hastaların özellikleri ve sonuçları

Değişken*	Hastalar, n=29
Yaş (yıl)	66 (45-77)
Cinsiyet, n (%)	
Erkek	17 (58,6)
Kadın	12 (41,4)
RAI aşaması; n, (%)	
0-2	15 (51,7)
3,4	14 (48,3)
Tedavi endikasyonu** n, %	
1	12 (41,4)
2	4 (13,8)
3	6 (20,7)
4	2 (6,9)
5	5 (17,2)
Tanıdan tedaviye kadar geçen süre (ay)	13 (1-156)
Tedavi, n (%)	
RFC	9 (31)
RB	15 (51,7)
RCLB	5 (17,2)
Döngü sayısı, n (%)	
5	2 (6,9)
6	27 (93,1)
Hemoglobin, (gr/dL)	12,15 (8,2-16,26)
Lenfosit sayısı, (10 ⁹ /L)	53,20 (5,4-126,2)
Trombosit sayısı, (10 ⁹ /L)	150,0 (23,0-505,0)
B2M, (mg/L)	5,7 (2,33-8,0)
Kreatinin, (mg/dL)	1,01 (0,55-1,6)
Albümin, (gr/dL)	4,60 (3,0-5,23)
LDH (U/L)	254 (167-568)
CD38 pozitif (>%30), n (%)	1 (3,4)
Yanıtlar, n (%)	
TY	20 (69)
CRi	5 (17,2)
PY	4 (13,8)
Saptanamayan ÖKH hastaları, n (%)	19 (65,5)
Nüksetmiş hastalar, n (%)	11 (37,9)

*Parametrik değişkenler ortanca (minimum-maksimum) olarak ifade edilmiştir.
 **1: İlerleyici kemik iliği yetmezliği kanıtı 2: Masif/sempomatik veya ilerleyici splenomegali/lenfadenomegali 3: İki aylık bir periyotta >%50'lik bir artışla ilerleyici lenfositoz veya <6 aylık lenfosit ikiye katlanma süresi. 4: Kortikosteroidlere zayıf yanıt veren otoimmün anemi ve/veya trombositopeni 5: Konstitüsyonel semptomlar.
 RFC: Rituximab, fludarabine, cyclophosphamide, RB: Rituximab, bendamustine, R-CLB: Rituximab, clorambucil, B2M: β -2 mikroglobulin, LDH: Laktat dehidrogenaz, TY: Tam yanıt, PY: Parsiyel yanıt, CRi: Eksik kemik iliği iyileşmesi olan, CR: Saptanamayan, ÖKH: Saptanamayan ölçülebilir rezidüel hastalık

kuru bir antikor paneli kaplaması içerir. Bu tüp, ERIC grubu tarafından önerilen çekirdek belirteçlere ek olarak ROR- α içerir. Çalışmamızda Mart 2017 sonrası ÖKH analizinde bu kuru tüp yöntemi kullanılmıştır. ÖKH tüm olguların takibinde bu yöntemle yeniden çalışılmıştır. KLL örneklerinde kuru tüp yönteminin geçerliliği, klinik bir veri olarak değil, ECIL grubu tarafından önerilen yöntemle karşılaştırmada gösterilmiştir¹⁵. Çalışmamızda, sadece kuru tüp yöntemi ile çalışılan hastaları ayrı ayrı incelediğimizde, toplam çalışma popülasyonuna benzer sonuçlar gözlemledik. İlk basamak tedavinin sonunda saptanamayan ÖKH elde edilmesi, kuru tüp yöntemiyle değerlendirilen hastalarda daha uzun PS ile de anlamlı şekilde ilişkiliydi. Çalışmamız ile bu kuru tüp yönteminin klinik verileri ilk kez sunulmuştur.

Son zamanlarda geliştirilen 8 renkli tek tüp yöntemi 10⁻⁵ duyarlılığa ulaşmış olsa da, Avrupa İlaç Ajansı'nın (AİA) da önerdiği düzey olan 10⁻⁴ duyarlılık, prospektif klinik çalışmaların çoğunda kullanılmıştır^{4-6,25-30}. 10⁻⁵ duyarlılığa ulaşmak için en az 1 milyon hücre çalışılmalıdır. Çalışmamızda ortalama 500.000 hücreyi geri çektik. Bu nedenle, 8 renk tek tüp yöntemi kullanmamıza rağmen duyarlılık seviyemiz 10⁻⁴ idi.

KLL hastalarında yapılan birkaç büyük randomize kontrollü çalışma (RKÇ), indüksiyon tedavisinden sonraki ÖKH durumunun PS ve GS'nin bağımsız bir öngörücüsü olduğunu göstermiştir⁴⁻⁶. 2016 yılında, bu denemelerin yayınlanmasından sonra, AİA, ilaç onayı için kullanılan RKÇ'lerde bir ara-son nokta olarak saptanamayan ÖKH'nin kullanılmasına izin verdi⁷, ancak rutin ÖKH testinin de klinik uygulamanın bir parçası olması gerekip gerekmediği hala devam eden bir tartışmadır. Alman CLL8 çalışmasında, FC veya FCR tedavisi alan hastalarda ÖKH analiz edildi, FC ile tedavi edilen hastaların %35'inde PB'de ve %63'ünde FCR Kİ'sinden sonra saptanamayan ÖKH'ye (<10⁻⁴) ulaşıldı. Tedavinin bitiminden sonraki saptanamayan ÖKH, orta ($\geq 10^{-4}$ ila $<10^{-2}$) veya yüksek ÖKH'ye ($\geq 10^{-2}$)⁴ göre önemli ölçüde daha uzun PS ile ilişkilendirilmiştir. Aynı çalışmada, FC kemoterapisi ile düşük seviyeli ÖKH'ye ulaşılan hastalarda, FCR ile düşük KLL hücre seviyelerine ulaşılan hastalarinkine benzer PS vardı. Bu nedenle yazarlar, kalıcı remisyonlar için tedavinin türü değil, saptanamayan ÖKH başarısının anahtar faktör olduğu sonucuna varmışlardır. Benzer şekilde, çalışmamızda tedavi rejimine (RB veya RFC) bakılmaksızın saptanamayan ÖKH'ye ulaşılan hastalarda düşük nüks oranları gözlemlendi.

Çalışmamızda FCR uygulanan 24 hastanın 18'inde (%75) saptanamayan ÖKH elde edilmiştir. Hastalarımız arasında 17pdel'li hastaların olmaması ve sadece 11q delesyonu olan 1 hastanın olması, çalışmamızda elde edilen yüksek saptanamayan ÖKH oranının açıklayabilir. GCLLSG (Alman KLL Çalışma Grubu) CLL10 çalışmasında, RB Kİ'ye kıyasla FCR'nin saptanamayan ÖKH'ye ulaşmadaki üstünlüğü gösterilmiştir¹⁹.

Çalışmamızda BR ile tedavi edilen 17 hastanın 12'sinde (%70,6) saptanamayan ÖKH vardı. Retrospektif çalışmamızda RB alan hastalar yaşları ve komorbiditeleri nedeniyle FCR için uygun değildi. Bu nedenle, çalışmamızda RB ile yüksek saptanamayan ÖKH yüzdesi dikkat çekici olmasına rağmen, iki grubu karşılaştırmak uygun değildi. R-CLB alan hastaların hiçbirinde saptanamayan ÖKH yoktu ve PS'leri beklendiği gibi düşüktü, bu da bu rejimin yeterince güçlü olmadığı fikrini destekliyor.

Çalışmaya dahil edilen hasta sayısının az olması nedeniyle genetik değişiklikler ile saptanamayan ÖKH elde edilmesi arasındaki ilişki değerlendirilememiştir. Hastaların çoğunda IGHV mutasyonu ve ZAP 70 ekspresyonu çalışılmamıştır. Çalışmalarda bir diğer önemli prognostik faktör olan CD38, çalışmamızda saptanamayan ÖKH ile ilişkili bulunmamıştır. Ayrıca, hastaların diğer temel hastalık özellikleri ile saptanamayan ÖKH elde etme arasında bir korelasyon yoktu.

Çalışma Kısıtlılıkları

Çalışmanın en önemli kısıtlılıkları, retrospektif tek merkezli olması ve hasta sayısının sınırlı olmasıdır. IGHV mutasyon durumu ve ZAP 70 ekspresyonu gibi önemli prognostik parametreleri de çalışma kohortumuzun çoğunda değerlendiremedik.

SONUÇ

Sonuç olarak, çalışmamızda klinik araştırma dışında KLL hastalarının takibinde ÖKH analizi kullanılmış ve klinik çalışmalar doğrultusunda PS hakkında bilgi verebileceği ortaya konmuştur. Ayrıca, kuru antikor yönteminin (DuraClone RE CLB Tüpü) klinik verileri ilk kez sunuldu.

Teşekkür

MRD analizine katkılarından dolayı Öznür Güngör ve Sinem Ülkümen'e teşekkür ederiz.

Etik

Etik Kurul Onayı: Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alındı (tarih: 29/09/2020 protokol no: 2020.219.09.06).

Hasta Onayı: Tüm katılımcılar, klinik/laboratuvar verilerinin araştırma amaçlı kullanımı için yazılı bilgilendirilmiş onam verdi.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

Yazarlık Katkıları

Cerrahi ve Medikal Uygulama: S.A., B.T., Konsept: S.A., B.T., Dizayn: B.T., Veri Toplama veya İşleme: S.A., Analiz veya Yorumlama: S.A., B.T., Literatür Arama: S.A., Yazan: S.A.

Çıkar Çatışması: Yazarlar bu makale ile ilgili olarak herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

Finansal Destek: Çalışmamız için hiçbir kurum ya da kişiden finansal destek alınmamıştır.

KAYNAKLAR

1. Hallek M, Shanafelt TD, Eichhorst B. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 2018;391:1524-37.
2. Milne K, Sturrock B, Chevassut T. Chronic Lymphocytic Leukaemia in 2020: the Future Has Arrived. *Curr Oncol Rep*. 2020;22:36.
3. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*. 2018;131:2745-60.
4. Böttcher S, Ritgen M, Fischer K, Stilgenbauer S, Busch RM, Fingerle-Rowson G, et al. Minimal residual disease quantification is an independent predictor of progression-free and overall survival in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate analysis from the randomized GCLSG CLL8 trial. *J Clin Oncol*. 2012;30:980-8.
5. Kwok M, Rawstron AC, Varghese A, Evans PA, O'Connor SJ, Doughty C, et al. Minimal residual disease is an independent predictor for 10-year survival in CLL. *Blood*. 2016;128:2770-3.
6. Santacruz R, Villamor N, Aymerich M, Martínez-Trillos A, López C, Navarro A, et al. The prognostic impact of minimal residual disease in patients with chronic lymphocytic leukemia requiring first-line therapy. *Haematologica*. 2014;99:873-80.
7. European Medicines Agency. Appendix 4 to the guideline on the evaluation of anticancer medicinal products in man – condition specific guidance. Ref number: EMA/CHMP/703715/2012 Rev. 2. Published Feb 15, 2016.
8. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger JA, Blum KA, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2013;369:32-42.
9. Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Puvvada SD, Gerecitano JF, et al. Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374:311-22.
10. Seymour JF, Kipps TJ, Eichhorst B, Hillmen P, D'Rozario J, Assouline S, et al. Venetoclax-Rituximab in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378:1107-20.
11. Rawstron AC, Böttcher S, Letestu R, Villamor N, Fazi C, Kartsios H, et al. Improving efficiency and sensitivity: European Research Initiative in CLL (ERIC) update on the international harmonised approach for flow cytometric residual disease monitoring in CLL. *Leukemia*. 2013;27:142-9.
12. Rawstron AC, Kreuzer KA, Soosapilla A, Spacek M, Stehlikova O, Gambell P, et al. Reproducible diagnosis of chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry: An European Research Initiative on CLL (ERIC) & European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) Harmonisation project. *Cytometry B Clin Cytom*. 2018;94:121-8.
13. Rawstron AC, Villamor N, Ritgen M, Böttcher S, Ghia P, Zehnder JL, et al. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*. 2007;21:956-64.
14. Correia RP, Rajab A, Bento LC, Alexandre AM, Vaz AC, Schimidell D, et al. A ten-color tube with dried antibody reagents for the screening of hematological malignancies. *Int J Lab Hematol*. 2018;40:136-43.
15. Bento L, Correia R, de Sousa F, Vaz A, Pedro E, Schimidell D, et al. Performance of eight-color dry antibody reagent in the detection of minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia samples. *Cytometry B Clin Cytom*. 2020;98:529-35.
16. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008;111:5446-56.

17. Keating MJ, O'Brien S, Albitar M, Lerner S, Plunkett W, Giles F, et al. Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2005;23:4079-88.
18. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2010;376:1164-74.
19. Eichhorst B, Fink AM, Bahlo J, Busch R, Kovacs G, Maurer C, et al. First-line chemoimmunotherapy with bendamustine and rituximab versus fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with advanced chronic lymphocytic leukaemia (CLL10): an international, open-label, randomised, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Oncol*. 2016;17:928-42.
20. Michallet AS, Aktan M, Hiddemann W, Ilhan O, Johansson P, Laribi K, et al. Rituximab plus bendamustine or chlorambucil for chronic lymphocytic leukemia: primary analysis of the randomized, open-label MABLE study. *Haematologica*. 2018;103:698-706.
21. Goede V, Fischer K, Busch R, Engelke A, Eichhorst B, Wendtner CM, et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med*. 2014;370:1101-10.
22. Lenormand B, Bizet M, Fruchart C, Tilly H, Daliphard S, Thouret F, et al. Residual disease in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients and prognostic value. *Leukemia*. 1994;8:1019-26.
23. Cabezudo E, Matutes E, Ramrattan M, Morilla R, Catovsky D. Analysis of residual disease in chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry. *Leukemia*. 1997;11:1909-14.
24. Robertson LE, Huh YO, Butler JJ, Pugh WC, Hirsch-Ginsberg C, Stass S, et al. Response assessment in chronic lymphocytic leukemia after fludarabine plus prednisone: clinical, pathologic, immunophenotypic, and molecular analysis. *Blood*. 1992;80:29-36.
25. Strati P, Keating MJ, O'Brien SM, Burger J, Ferrajoli A, Jain N, et al. Eradication of bone marrow minimal residual disease may prompt early treatment discontinuation in CLL. *Blood*. 2014;123:3727-32.
26. Abrisqueta P, Villamor N, Terol MJ, González-Barca E, González M, Ferrà C, et al. Rituximab maintenance after first-line therapy with rituximab, fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone (R-FCM) for chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013;122:3951-9.
27. Munir T, Howard DR, McParland L, Pocock C, Rawstron AC, Hockaday A, et al. Results of the randomized phase IIB ADMIRE trial of FCR with or without mitoxantrone in previously untreated CLL. *Leukemia*. 2017;31:2085-93.
28. Stilgenbauer S, Leblond V, Foà R, Böttcher S, Ilhan O, Knauf W, et al. Obinutuzumab plus bendamustine in previously untreated patients with CLL: a subgroup analysis of the GREEN study. *Leukemia*. 2018;32:1778-86.
29. Appleby N, O'Brien D, Quinn FM, Smyth L, Kelly J, Parker I, et al. Risk adjusted therapy in chronic lymphocytic leukemia: a phase II cancer trials Ireland (CTRIAL-IE [ICORG 07-01]) study of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab therapy evaluating response-adapted, abbreviated frontline therapy with FCR in non-del(17p) CLL. *Leuk Lymphoma*. 2018;59:1338-47.
30. Thompson PA, Tam CS, O'Brien SM, Wierda WG, Stingo F, Plunkett W, et al. Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab treatment achieves long-term disease-free survival in IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2016;127:303-9.