

Akış Sitometrisi Verilerinin Geriye Dönük Taranması: Tek merkez deneyimi

Retrospective Analysis of Flow Cytometry Results: Experience of a single center

¹Mehmet Şevki UYANIK, ²Mehmet BAYSAL, ²Veysi ASOĞLU, ³Muhammet MADEN, ³Elif Gülsüm ÜMİT, ³Gülsüm Emel PAMUK, ⁴Burhan TURGUT, ⁵Ceyhun VARIM, ³Ahmet Muzaffer DEMİR

¹ Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Hematoloji Bölümü, Sakarya-TÜRKİYE

² Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji BD. Edirne-TÜRKİYE

³Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD. Edirne-TÜRKİYE

⁴Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji BD. Tekirdağ-TÜRKİYE

⁵Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İç Hastalıkları AD. Sakarya-TÜRKİYE

Geliş Tarihi : 08.07.2015

Kabul Tarihi : 10.08.2015

Özet

Amaç: Akış sitometrisi (AS) çeşitli hücrelerin bir süspansiyon halinde bir akış kanalı boyunca tek tek geçmesi ve bu esnada hücre büyüklük ve içeriğine göre sınıflandırılması esasına dayanan florokromojenik-lazer tabanlı bir tanı yöntemidir. Hematolojik malignitelerin tanısı AS cihazının en fazla kullanım alanıdır. Mevcut çalışmada hastanemiz AS laboratuvarına gönderilen örneklerin yıllara göre dağılımlarını, istek yapan bilim dalının dağılımını, gönderinin yapıldığı örnek tipini ve tanı-izlemede AS'nin yerini değerlendirmeyi hedefledik.

Yöntem ve Gereçler: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi AS Laboratuvarı'na 01.01.2002 ile 01.01.2014 tarihleri arasında gönderilerek değerlendirilen AS testleri geriye dönük olarak değerlendirildi. Elde edilen parametreler tanımlayıcı istatistik çerçevesinde değerlendirildi.

Sonuç: Bu zaman zarfında toplam 4874 adet test değerlendirildi (Ortalama: 406 test/yıl). Örneklerin %18,7'si çocuk yaştaki hastalardan (n=964) gönderilmişken, % 81,3'ü (n=3910) erişkin hastalarından gönderilmişti. Gönderilen örneklerin %35,3'ü (n=1725) kemik iliği, %58,2'si periferik kan (n=2828), %6,5'i (n=321) diğer vücut dokularından gönderilmişti. Örneklerin %20,2'sinin (n=989) tanısında AS inceleme başrol oynamıştı. Örneklerin %18,5'i (n=880) hastalıkların tedaviye yanıtlarının değerlendirilmesinde kullanıldı. Tanısı AS'yle konulan hastaların %34,6'sı akut myeloid lösemi, %32'si kronik B-lenfoproliferatif hastalıklar, %19,5'i akut lenfosit lösemi, %10,2'si myelodisplastik sendrom, %3,2'si kronik myeloid lösemi, %0,3'ü Burkitt lösemi/lenfoma, %0,1'i T-lenfoproliferatif hastalık ve %0,1'i bifenotipik lösemi idi.

Tartışma: Tek merkez verilerinin değerlendirildiği bu çalışma tanı konulması istenilen hastalıkların ülkemizdeki sıklıklarını göstermesi açısından önemli veriler sunmaktadır. Yıllara göre dağılım ise merkezimizin deneyim artışı ve hastaların merkezimize ulaşımının kolaylaşması olarak değerlendirilebilir. Hastane verilerine dayalı geriye dönük çalışmaların yararları arasında hastalık sıklık verilerinin saptanmasında dolaylı bir yöntem olması sayılabilir.

Anahtar Kelimeler: Akış Sitometrisi, hematolojik maligniteler

Abstract

Aim: Flow Cytometry (FC) is a fluorescent-laser based diagnosis tool that is used to subclassify the cells due to their cell size and cytoplasmic content. Diagnosis of hematological malignancies is one of the most commonly used field of application. In the present study we aimed to determine the distribution of samples per year, distribution of requesting departments (whether pediatric or adult), sample type (bone marrow, peripheral blood, cerebrospinal fluid or pleural fluid), and the usage of FC during diagnosis/follow up.

Material and Methods: FC results were screened retrospectively from 01.01.2002 to 01.01.2014. Descriptive statistics were performed to analysis the results.

Results: 4874 samples were revised (with a mean of 406 sample per year). 18.7% of the samples were from pediatric patients, 81.3 % were from adult patient population. %35.3 of the samples (n=1725) were obtained from bone marrow, 58.2 % (n=2828) were obtained from peripheral blood, 6.5 % (n=321) of the samples were obtained from other body fluids. FC was the leading diagnostic tool in 20.2 % (n=989) of the samples. 18.5% (n=880) of the samples were used for follow up of the patients. The distribution of the diagnoses that were established by the use of FC were 34.6 % acute myeloid leukemia, 32 % chronic B-lymphoproliferative disease, 19.5 % acute lymphoid leukemia, 10.2 % myelodysplastic syndrome, 3.2 % chronic myeloid leukemia, 0.3% Burkitt leukemia/lymphoma, 0.1 % T-lymphoproliferative disease ve 0.1 % biphenotypic leukemia.

Discussion: The present study demonstrated important results about the disease incidence in Turkey. The elevated sample size in following years might be due to increased experience, and easy accessibility of patients to our facility. To be an indirect tool to demonstrate disease distribution is one of the benefits of retrospective analysis of hospital data.

Key Words: Flow Cytometry, hematological malignancy

Giriş

Akış sitometrisi (AS) çeşitli hücrelerin bir süspansiyon halinde bir akış kanalı boyunca tek tek geçmesi ve bu esnada hücre büyüklük ve içeriğine göre sınıflandırılması esasına dayanan florokromojenik-lazer tabanlı bir tanı yöntemidir (1). AS hematolojik malignitelerin tanı ve tedaviye yanıtlarına, B ve T lenfosit sayı ve fonksiyonlarına, HIV analizine, DNA analizine, hücre canlılığının değerlendirilmesine, retikülosit/eritrosit analizine, hücre içi glutatyon tayinine ve ayrıca trombosit fonksiyonlarının değerlendirilmesine olanak tanıyan bir immunohematolojik laboratuvar uygulamasıdır (2).

Günümüzde hematolojik malignitelerin tanısı AS cihazının en fazla kullanım alanlarından birisidir (3). Fenotipik anormal popülasyonlar aralarında (Non)-Hodgkin lenfoma, kronik lenfosit lösemi, plazma hücreli lösemi, akut lösemiler, paroksizmal nokturnal hemoglobinüri, mast hücre hastalıkları ve myelodisplastik sendromun bulunduğu hematolojik hastalıklar da mevcuttur (2). Dünya Sağlık Örgütü'nün 2001 yılındaki sınıflaması hematolojik malignitelerin tanısının konulmasında çoklu antikör kullanımlarının gerekliliğini ortaya koymuştur (4). Bu durum maliyet-yarar ilişkisinin önemini ortaya koymuş ve doğru hastaya doğru testin yapılması için retrospektif datanın gerekliliğinin altını çizmiştir. Bu doğrultuda çalışma grupları maliyetin azaltılması için hangi grup hastada akış sitometri yapılmamasına gerek

olmadığını belirlemeyi amaçlamıştır. 'Bethesda Group' matür nötropeni, poliklonal gammopati, polistemia vera, trombositoz ve bazofili tetkik ederken akış sitometrinin uygun olmadığını belirlemiştir (5).

Mevcut çalışmada hastanemiz AS laboratuvarına gönderilen örneklerin yıllara göre dağılımlarını, istek yapan bilim dalının dağılımını, gönderinin yapıldığı örnek tipini ve tanı-izlemede AS'nin yerini değerlendirmeyi hedefledik.

Yöntem ve Gereçler

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi AS Laboratuvarı'na 01.01.2002 ile 01.01.2014 tarihleri arasında gönderilerek değerlendirilen AS testleri geriye dönük olarak değerlendirildi. Immunofenotipik analiz ayrı zamanlarda Beckman Coulter (Beckman Coulter EPICS XL) veya Beckton Dickenson (BD FACSCalibur™ platform) firmalarının AS cihazları kullanılarak yapıldı. İncelemede eritrosit lizisi sonrası tam kan örneklerinin direk konjuge monoklonal antikörlerle muamelesi kullanıldı. Tanısı akış sitometri ile konulmuş olan hastaların tanıları 2008 Dünya Sağlık Örgütü kuralları temel alınarak tekrar gözden geçirildi (6). Çalışma için Trakya Üniversitesi Yerel Etik Kurulundan yazılı onam alındı.

Parametrelerin istatistiki değerlendirilmesinde SPSS versiyon 17 programı kullanıldı. Elde edilen parametreler tanımlayıcı istatistik çerçevesinde değerlendirildi.

Bulgular

Bu zaman zarfında toplam 4874 adet test değerlendirildi. Yıllara göre AS örneklerinin dağılımı Şekil 1'de gösterilmiştir. Yıllık test sayısı ortalama 406 test/yıld. Örneklerin %18,7'si çocuk yaştaki hastalardan (n=964) gönderilmişken, % 81,3'ü (n=3910) erişkin hastalarından gönderilmişti.

Örneklerin yıllara göre gönderilme amaçları Şekil 2'de özetlenmiştir. Gönderilen örneklerin %35,3'ü (n=1725) kemik iliği, %58,2'si periferik kan (n=2828), %6,5'i (n=321) diğer vücut dokularından gönderilmişti. AS örneklerin %81,5'inin başlangıç tanısının konulmasında kullanıldı. Akış sitometrik inceleme örneklerin %20,2'sinin (n=989) incelenmesiyle başlangıç tanısının konulmasında başrol oynamıştır. Örneklerin %61,3'ünde ise yardımcı tanı yöntemi olarak kullanılmıştır. Örneklerin %18,5'i (n=880) hastalıkların tedaviye yanıtlarının değerlendirilmesinde kullanıldı. Örneklerin %44,9'unda (n=2190) akış sitometri anormal olarak saptandı. Örneklerin %55,1'inde (n=2684) AS normal sınırlardaydı.

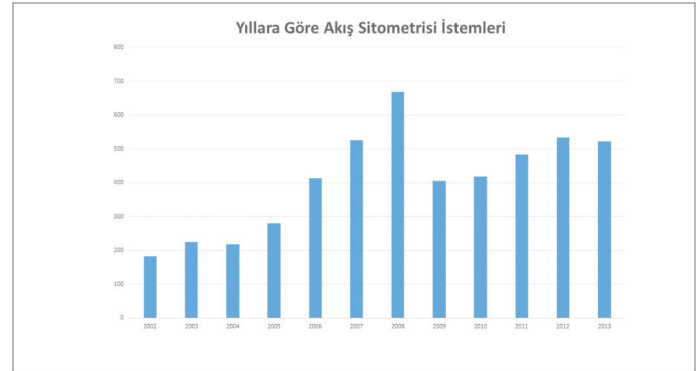
Tanısı akış sitometrik yöntemle konulan hastalıklar Şekil 3'de özetlenmiştir. Tanısı AS'yle konulan hastaların %34,6'sı akut myeloid lösemi (n=342), %32'si kronik B-lenfoproliferatif hastalıklar (n=316), %19,5'i akut lenfositik lösemi (n=193), %10,2'si myelodisplastik sendrom (n=101), %3,2'si kronik myeloid lösemi (n=32), %0,3'ü Burkitt lösemi/lenfoma (n=3), %0,1'i T-lenfoproliferatif hastalık (n=1) ve %0,1'i bifenotipik lösemi (n=1) (Şekil 2).

Akut miyeloid lösemi (AML) tanısı alan hastaların %2,8'i AML-M0, %18,3'ü AML-M1, %40,8'i AML-M2, %16,2'si AML-M3, %10,6'sı AML-M4, %13'ü AML-M5, %0,7'si AML-M6, %1,4'ü AML-M7 idi. Akut lenfositik lösemi (ALL) tanısı alan hastaların ise %71,4'ü B-ALL, %28,6'sı T-ALL idi (Şekil 3).

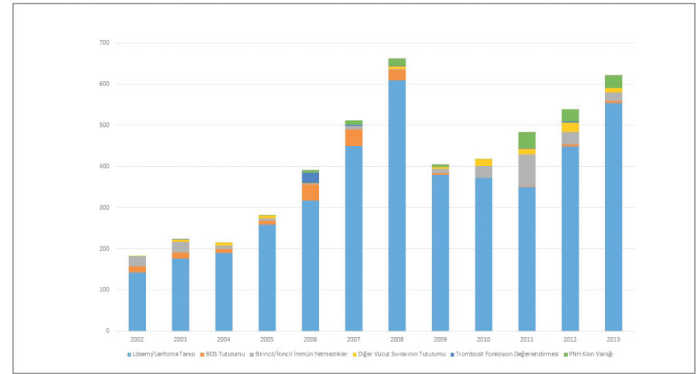
Veriler ayrıca yaş gruplarına göre bölünerek çalışıldı. Pediatrik hasta grubunda hastaların %78,5'i ALL, %15'i AML, %2,8'i B-lenfoproliferatif hastalıklar, %1,9'u miyelodisplastik sendrom (MDS), %0,9'u Burkitt lösemi/lenfoma, %0,9'u kronik myeloid lösemi iken; erişkin yaş gurubunda hastaların %37'si AML, %35,5'i Kronik lenfositik lösemi (KLL), %12,4'ü ALL, %11,2'si MDS, %0,2'si Burkitt lösemi/lenfoma, %0,1'i T-lenfoproliferatif hastalık, %0,1'i bifenotipik lösemi idi.

Tartışma

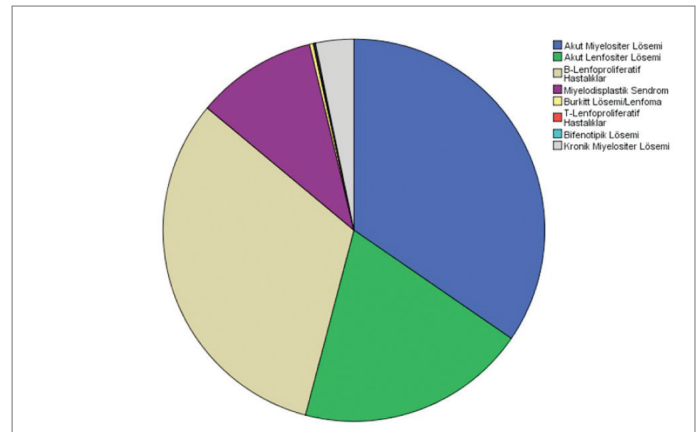
Mevcut çalışma ile deneyimli bir akış sitometri laboratuvarının 12 yıllık deneyimi tanımlayıcı istatistik çerçevesinde analiz edilmiştir. Bilgilerimize göre çalışmamız AS sonuçlarının geriye dönük taranmasını



Şekil 1



Şekil 2



Şekil 3

içeren ilk çalışmadır. Elde edilen veriler ülkemizdeki hematolojik malignitelerin sıklıkları hakkında yorum yapma olanağı sunmuştur. Verilerimizin tanı konulması istenilen hastalıkların ülkemizdeki sıklıklarını göstermesi açısından önemli veriler olduğu kanısındayız. Tek merkez verilerinin değerlendirildiği bu çalışmada elde edilen veriler, ülke genelindeki ortalamaları yansıtmamaktadır. Bunun nedenleri arasında çalışmamızda tanı yöntemi olarak sadece AS sonuçları değerlendirildiğinden dolayı tanısı immünohistokimyasal boyamalarla konulan Hodgkin lenfoma, malignite hücrelerinin stromaya fazlaca tutunmasına bağlı kemik iliği aspirasyonuna yansımadiği

multiple myelom ya da tanı konulması konusunda AS'nin immünohistokimyasal yöntemlerin gerisinde kaldığı MDS gibi hastalıkların sıklık yüzdesi beklenenin altında kalması sayılabilir. Bunun yanında tanı konulması akış sitometrik yöntemin baz alındığı Matutes skoruna dayanan KLL'nin göreceli daha sık saptanmış olması nedeniyle B-lenfoproliferatif hastalıklar beklenenin üzerinde saptanmıştır (7). Yukarıda sayılan tüm bu nedenlere bağlı olarak örnek olarak ALL yetişkin hasta popülasyonunda beklenenin altında saptanmıştır (8). Yıllara göre dağılım ise merkezimizin deneyim artışı ve hastaların merkezimize ulaşımının kolaylaşması olarak değerlendirilebilir.

Bu tarzda laboratuvar verilerine dayalı geriye dönük çalışmaların yararları arasında hastalık sıklık verilerinin saptanmasında dolaylı bir yöntem olması ve ilgili merkezin deneyimini yansıması sayılabilir. İleri teknoloji ürünü olan bu yöntemin araştırma amaçlı da kullanılması cihazın ve bilim camiamızın verimi açısından oldukça önemlidir (12).

Son on yılda AS inceleme geniş popülasyonların incelenmesinin ötesinde küçük hücre gruplarının da incelenmesine olanak kılacak şekilde gelişmiştir (2). Böylelikle minimal kalıntı hastalık (MKH) tayini artık tayin edilebilir olmuştur. Laboratuvar yöntemleri arasında MKH'nın değerlendirilmesi için konvansiyonel sitogenetik yöntemler, floresan in situ hibridizasyon, moleküler genetik yöntemler ve AS en fazla kullanılan yöntemlerdir (9-11). Her ne kadar moleküler genetik yöntemler daha hassas olsalar da AS'nin MKH değerlendirilmesinde özel bir yeri vardır (12). AS lösemi hücrelerinin üzerlerinde ekspres edilen 'leukemia associated immunophenotypic patterns (=lösemi hücresine özel immünofenotipik kalıplar)' tanınmasını sağlayarak MKH'nın görüntülenmesini mümkün kılar (12). Bunun yanında moleküler genetik yöntemlerle saptanan yanlış pozitifliğin de doğrulama testi olarak kullanılabilir (13).

Kliniğimizde özellikle 2012 yılından önce kullanılan cihaz ile çoklu boyama yapma imkanı olmaması nedeniyle MKH saptanmasında aberan ekspresyon varlığına bakılarak MKH varlığı değerlendirilmiştir. Çalışmamızın kısıtlamalarından birisi MKH'nın belirli hastalık gruplarında değerlendirilmemesidir. MKH'nın değerlendirilmesinde çoklu boyamanın gerekliliği ve MKH'nın değerlendirilmesindeki teknik yetersizlikler nedeniyle MKH ile ilgili verilerin analiz sonuçları bu çalışmada verilmemiştir.

Sonuç olarak çalışmamız özellikle tanısında öncelikli olarak AS'nin yer aldığı hematolojik malignitelerin sıklıklarının belirlenmesinde AS laboratuvar kayıtlarının geriye dönük taranmasının faydalı olacağını göstermiştir.

Kaynaklar

1. Wood B. 9-color and 10-color flow cytometry in the clinical laboratory. *Arch Pathol Lab Med*, 2006. 130(5):680-90.
2. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*, 2008. 111(8):3941-67.
3. Orfao A, Schmitz G, Brando B, Ruiz-Arguelles A, Basso G, Braylan R, et al. Clinically useful information provided by the flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies: current status and future directions. *Clin Chem*, 1999. 45(10):1708-17.
4. Sander CA, Flaig MJ, Jaffe ES. Cutaneous manifestations of lymphoma: a clinical guide based on the WHO classification. *World Health Organization. Clin Lymphoma*, 2001. 2(2):86-100; discussion 1-2.
5. Davis BH, Holden JT, Bene MC, Borowitz MJ, Braylan RC, Cornfield D, et al. Bethesda International Consensus recommendations on the flow cytometric immunophenotypic analysis of hematology neoplasia: medical indications. *Cytometry B Clin Cytom*, 2007. 72(1):5-13.
6. Sabattini E, Bacci F, Sagranso C, Pileri SA. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: an overview. *Pathologica*, 2010. 102(3):83-7.
7. Matutes E, Attygalle A, Wotherspoon A, Catovsky D. Diagnostic issues in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Best Pract Res Clin Haematol*, 2010. 23(1):3-20.
8. Cortes JE, Kantarjian HM. Acute lymphoblastic leukemia. A comprehensive review with emphasis on biology and therapy. *Cancer*, 1995. 76(12):2393-417.
9. Campana D. Minimal residual disease studies in acute leukemia. *Am J Clin Pathol*, 2004. 122:(49)-57-8.
10. Campana D, Coustan-Smith E. Minimal residual disease studies by flow cytometry in acute leukemia. *Acta Haematol*, 2004. 112 (1-2):8-15.
11. Szczepanski T. Why and how to quantify minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia? *Leukemia*, 2007. 21(4):622- 26
12. Zhao XS1, Liu YR, Zhu HH, Xu LP, Liu DH, Liu KY, Huang XJ. Monitoring MRD with flow cytometry: an effective method to predict relapse for ALL patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Hematol*, 2012. 91(2):183-92.
13. Borowitz MJ, Pullen DJ, Shuster JJ, Viswanatha D, Montgomery K, Willman CL, Camitta B. Minimal residual disease detection in childhood precursor-B-cell acute lymphoblastic leukemia: relation to the risk factors. *A Children's Oncology Group study. Leukemia*, 2003. 17 (8):1566-72.

Sorumlu Yazar: Dr Mehmet Şevki Uyanık

Adres: Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Hematoloji Bölümü, Korucuk-Sakarya- TÜRKİYE

E-posta: msevkiuyanik@gmail.com

Tel: +90 444 54 00