T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALL HASTALARINDA KROMOZOM 8, 10, 11, 17, 18, Y VE X KROMOZOMLARINDAKİ SAYISAL ANOMALİLERİN FISH TEKNİĞİ KULLANILARAK İNCELENMESİ

Emine KOÇER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof.Dr. Tülin ÇORA

KONYA - 2011

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALL HASTALARINDA KROMOZOM 8, 10, 11, 17, 18, Y VE X KROMOZOMLARINDAKİ SAYISAL ANOMALİLERİN FISH TEKNİĞİ KULLANILARAK İNCELENMESİ

Emine KOÇER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof.Dr. Tülin ÇORA

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 10202020 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA - 2011

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince yardımcı olan sayın Prof. Dr. Hasan ACAR'a, çalışmamın her aşamasında desteğini esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Tülin ÇORA'ya ayrıca eğitimim boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

II. İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ **1**

1.1.Lösemi 1

1.1.1.Lösemilerin Sınıflandırılması 4

1.2.Akut Lenfoblastik Lösemi(ALL) 5

1.2.1.ALL'nin Morfolojik Sınıflandırılması 6

1.2.2.ALL'de Histolojik Boyama 8

1.2.3.ALL'de İmmünofenotiplendirme 9

1.2.4.ALL'de WHO Sınıflaması 11

1.2.5.ALL'de Genetik Tanı ve Prognozu 11

1.2.6.ALL'de Kromozom Yapısal Bozuklukları 12

1.2.7.ALL'de Kromozom Sayısal Bozuklukları 13

1.2.8.ALL'de Diğer Prognoztik Faktörler 17

1.3. Sitogenetik Yöntem. 20

1.4. Floresans In Situ Hibridizasyon (FISH) Tekniği 20

1.4. FISH Tekniğinin Lösemilerde Sayısal Anomalilere Uygulanması 21

2.GEREÇ ve YÖNTEM **23**

2.1. Hasta ve Kontrol Seçimi.. 23

2.2. Hücrenin Kültürünün Hazırlanması 23

2.3. FISH Preparatlarının Hazırlanması.. 24

2.4. Preparatların Mikroskopta İncelenmesi 25

2.5.İstatistiksel Analiz. 25

2.6. Kullanılan Solüsyonlar. 25

3. BULGULAR **26**

4. TARTIŞMA **48**

5. SONUÇ ve ÖNERİLER **52**

6. ÖZET **53**

7. SUMMARY **54**

8. KAYNAK **55**

9. ÖZGEÇMİŞ **61**

III. SİMGELER ve KISALTMALAR

ABL: Abelson mürin lösemi virüsü

ALL: Akut lenfoblastik lösemi

AML: Akut miyeloid lösemi

AP: Asid fosfataz

APL: Akut promiyelositik lösemi

BCR: Kromozom 22'deki kırık nokta toplama bölgesi

CBG: Centromer- barium- giemsa

CD: Cluster of differentiation

DAPI: 6- diamino-2-phenylindole

DNA: Deoksiribonükleik asit

EFS: Event free Survival

EGIL: European group fort he ımmunological characterisation of acute leukemia

FAB: French- American- British

Fe: Demir

FISH: Fluoresan in situ hibridizasyon

G- bantlama: Giemsa bantlama

HRB: High resolution bantlama

KCI: Potasyum klorür

KLL: Kronik lenfositik lösemi

KML: Kronik miyelositik lösemi

LOH: Loss of heterozygosity

MDS: Miyeloblastik sendrom

MIC: Morfoloji-Immünoloji sınıflaması

MPE: Miyeloperoksidaz

mRNA: mesajcı Ribonükleik asit

NACI: Sodyum Klorür

NOR: Nukleolar organiser- region

NSE: Nonspesifik esteraz

PAS: Periyodik- aside- schiff

Ph: Philadelphia

QFA: Quinakrin- Fluoresan- atebrin

RBG: Reverse- BrdU

SBB: Sudan black boyası

SCE: Sister chromatid exchange

TdT: Terminal deoksinükleotil transferaz

WBC: White blood count

WHO: World health organization

1. GİRİŞ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalarak komşu dokuları işgal etmesi ve/veya kaynağını aldığı organdan daha uzak bir yere, kan veya lenf yoluyla taşınması sonucu oluşan bir hastalıktır. Dünyada ölüm sebepleri içerisinde ilk sıralarda yer alan kanser, önemli ve yaygın bir sağlık sorunudur. 1970'li yıllarda sebebi bilinen ölümler arasında dördüncü sırada iken son yıllarda kardiyovasküler sistem hastalıklarından sonra ikinci sırada gelmektedir. Kanserdeki bu artış tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de her geçen gün artmaktadır. Ülkemizde erişkinlerde görülen kanserler sıralamasında ilk sıraları akciğer kanserleri (erkeklerde görülme sıklığı %26.8, kadınlarda %4.8), kolorektal kanser (erkeklerde %7.1, kadınlarda 8.2), mide kanserleri (erkeklerde %5.8, kadınlarda %5), kadınlarda meme kanserleri (%23.7) ve erkeklerde prostat kanseri (%11.2) alırken lösemiler %2,3 sıklığında görülmektedir (www.kanser.gov.tr/folders/file/8iL-2006-SON.pdf) . Çocukluk döneminde ise bu sıralamadan farklı olarak ilk sırayı lösemiler almaktadır (www.ukdk.org/pdf/kitap/11.pdf).

Lösemiler, yaşamın her döneminde yaygın olarak görülen malign hastalıklardır. Kemik iliğinde hemotopoietik hücrelerin farklılaşma yeteneklerini kaybederek kontrolsüz çoğalması ile oluşurlar. Bu klonal ekspresyon sonucunda oluşan hücreler kemik iliği ve/veya kanda birikerek normal hücre popülasyonundaki dengeyi bozar. Sonuçta kan pıhtılaşmasında rol oynayan plateletler ve savunmada rol oynayan lökositlerin sayısı azalmaya başlar ve malignite gelişir.

Lösemiler köken aldıkları hücrelere göre myloid ve lenfoid lösemiler olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Klinik seyirlerine göre ise akut ve kronik lösemiler olarak adlandırılırlar. Akut lösemilerin yaklaşık %80'nini akut miyeloid lösemi (AML), geriye kalan %20'sini ise akut lenfoblastik lösemi (ALL) oluşturur. ALL çocuklarda daha yaygın olarak görülmektedir. Tüm çocuk malignansilerinin yaklaşık %30'unu ve çocuk lösemilerinin hemen hemen %80'ini oluşturur.

Lösemide tanı ve tedavide etkili olan birçok prognostik faktör vardır. Bunlar arasında hastanın yaşı, WBC miktarı, immünofenotipi, sitogenetik bulguları bulunmaktadır. Prognostik faktörlerin belirlenmesi açısından sitogenetik ve moleküler genetik incelemelerin gün geçtikçe artmaktadır. Özellikle lösemi tiplerine non-random sayısal ve spesifik yapısal kromozom anomalilerinin bulunması prognozun belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. ALL'li

çocukların %80'inde, yetişkinlerin %70'inde karyotipik anomaliler vardır. Bu anomalilerin belirlenmesi lösemilerin tanı, tedavi ve prognozunda yardımcı olmaktadır.

Bu projede, ALL hastalarında kromozom 8, 10, 11, 17, 18, Y ve X 'in sayısal değişimlerini FISH tekniğini kullanarak belirlemeyi amaçladık.

1.1 Lösemi

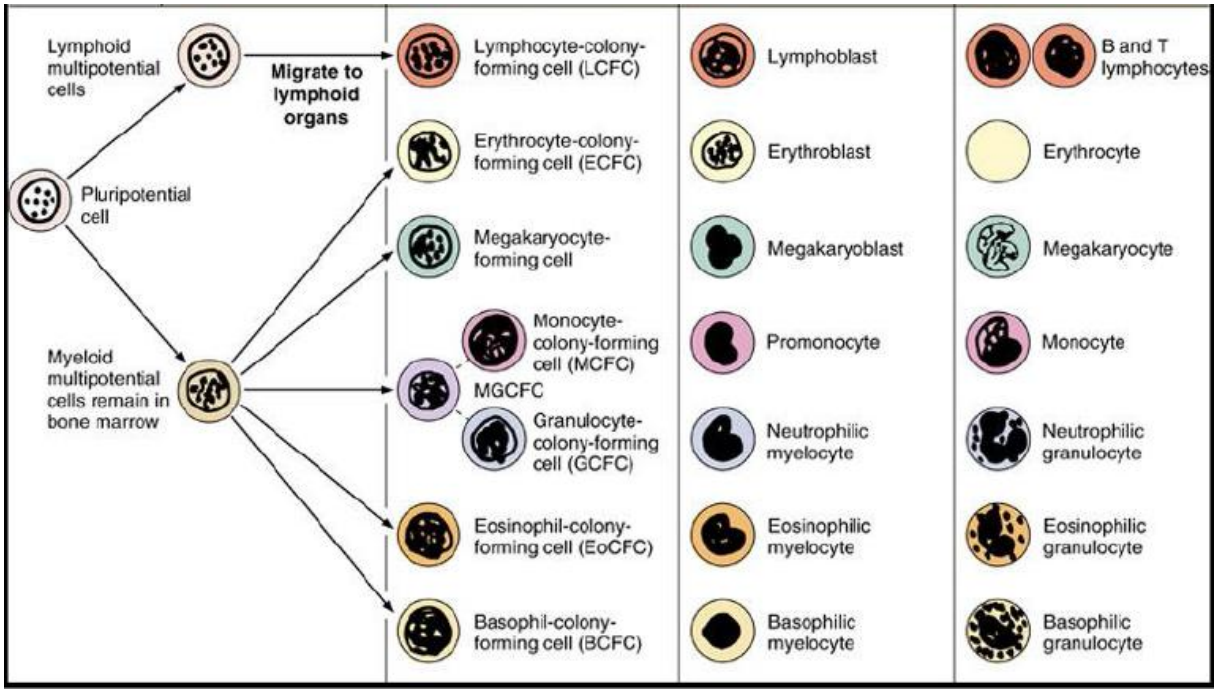
19. yüzyılda Avrupalı hekimler bazı hastaların kanında beyaz kan hücrelerinin sayısının çok fazla olduğunu görmüşler ve bu hastalığı adlandırmak için "Weisses Blut (Beyaz Kan)" terimini kullanmışlardır. Daha sonraları hastalığı adlandırmak için yunanca "leukos=beyaz" ve "haima=kan" kelimelerinden oluşan leukemia (lösemi) terimi kullanılmıştır. Lösemiler, hematopoietik hücrelerin malign transformasyonu sonucu gelişen, kemik iliği kökenli heterojen neoplastik hastalıklar grubudur.

Lösemiler gelişmiş toplumlarda tüm kanserlerin yaklaşık %3'ünü oluştururlar. Lösemi genellikle çocukluk çağı hastalığı olarak bilinse de, aslında yetişkinlerde de oldukça yaygın görülen bir hastalıktır. Tüm lösemilerin yarısından fazlası 60 yaş üstündeki insanlarda gözlenir ve hastalık erkeklerde kadınlara (1.3/1) göre daha yaygındır. Lösemi hastalarında 5 yıllık sağ kalım oranı son 40 yıl içinde 3 katına çıkmıştır. 1960'larda %14 iken; 1970'lerde %35 olan 5 yıllık sağ kalım oranı günümüzde %46'ya yükselmiştir (Turkington ve Lipera 2005).

Hematolojik kanserler, hematopoetik (haima=kan; poiesis=yapım) kökenlidir. Eritrosit, lökosit ve trombositler kanın hücresel bölümünü oluşturan elemanlardır. Normalde her hücre tipinin kandaki sayıları belirli sınırlar içinde sabit tutulur. Kan dokusundaki tüm hücrelerin tek bir kök hücreden geliştiği düşünülmektedir. Bu kökenden gelen tüm hücreler, hematopoetik organlarda bulunan kök hücrelerden gelişir. Kemik iliği kök hücreleri, hematopoezde temel görevi üstlenir. Bu hücreler, doku içindeki tüm hücreleri oluşturabileceklerinden pluripotent kök hücreler olarak adlandırılırlar. Pluripotent kök hücreleri çoğalarak tek tip kan hücrelerini oluşturabilecek olan ana hücreleri oluşturur. Bu hücrelerin bir kısmı miyeloid hücre serisine farklılaşacak olan miyeloid multipotent kök hücrelerini, bir kısmı da lenfoid hücrelere (lenfosit) farklılaşacak olan lenfoid multipotent kök hücrelerini oluşturur.

Multipotent kök hücreler çoğalır ve pluripotent hücrelere dönüşür. Pluripotent hücreler öncül hücrelere ya da blastlara; öncül hücreler ise tek tip kan hücrelerine farklılaşır. Bunlar

lenflerdeki B ve T hücreleri, eritrositler ve kan pulcukları, mast hücreleri, granülasitler, monositler ve makrofajlardan oluşan farklılaşmış hücrelerdir.



Şekil 1.1. Hematopoetik sistemde hücrelerin oluşum basamakları (uludag.edu.tr 2011).

Lösemi hücreleri ise genellikle normal kan hücrelerinden farklı görünen ve normal fonksiyonlarını yerine getiremeyen hücrelerdir. Çok sayıda lösemik hücrenin kana karışması ile sağlık hücrelerin miktarında azalma görülür ve malignite gelişir. Kandaki miktarları artan bu maling hücreler karaciğer, dalak, lenf nodları ve diğer birçok organa geçerek bu organların büyümesine yol açabilirler.

Lösemiler, kan hücre ontojenisinin herhangi bir aşamasında kromozomal değişiklikler ve çeşitli onkogenlerin uygunsuz ekspresyonuna bağlı olarak hücrede meydana gelen neoplastik transformasyon sonucu oluşmaktadır. Etiyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte hastalığın oluşumuna sebep olabilecek birçok faktör olduğu düşünülmektedir. Genetik eğilim, ilaçlar, çevresel ve mesleki etkenler lökomogenezin etyolojisini etkileyen faktörler arasında sayılabilir (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Akut lösemide etyoloji (Ülkü 2008).

1-İyonize radyasyon 2-Kimyasal maddeler (benzen) 3-İlaçlar -Alkilleyiciler: siklofosfamid, melfalan, klorambusil -Topoizomeraz II inhibitörleri: antrasiklinler, etoposit 4-Konjenital hastalıklar -Trizomi 21 -Fanconi anemisi -Klinefelter sendromu -Bloom sendromu -Ataksi telanjektazi 5-Edinsel hastalıklar -Kronik Miyeloproliferatif hastalıklar -Miyelodisplastik sendromlar -Aplastik anemi -Paroksizmal noktürnal hemoglobinüri

1.1.1. Lösemilerin Sınıflandırılması

Lösemiler köken aldıkları hücrelere göre "myloid" ve "lenfoid" lösemiler olarak isimlendirildikleri gibi klinik seyirlerine göre de "kronik" ve "akut" olarak isimlendirilirler.

Akut lösemiler tam olarak gelişmemiş ya da farklılaşmamış hücreleri etkileyen ve oldukça hızlı ilerleyen lösemilerdir. Henüz gelişimini tamamlayamamış olgunlaşmamış hücreler (blastlar) normal işlevlerini gerçekleştiremezler. Akut lösemilerde kontrolsüz çoğalan hücreler lenfoid öncü hücreler ise "akut lenfoblastik (lenfoid) lösemi", myeloid öncü hücreler ise "akut myelositik (myeloid) lösemi" olarak tanımlanır.

Kronik lösemiler ise yavaş ilerler ve daha fazla hücrenin olgunlaşmasına izin verir. Bu nedenle olgunlaşan hücreler bazı normal fonksiyonlarına devam ederler ve hastalık daha yavaş ilerler. Kronik lösemilerin oluşumuna sebep olan hücreler lenfoid öncü hücreler ise "kronik lenfositik (lenfoid) lösemi", myeloid öncü hücreler ise "kronik myelositik (myeloid) lösemi" olarak adlandırılır.

Lösemi hücrelerinin fenotipi, hücrelerin hangi aşamada etkilendiğine bağlıdır. Bir hematolojik kanser, kronik miyeloid lösemide (KML) olduğu gibi bir kök hücreden; akut promiyelositik lösemide (APL) olduğu gibi kısmen farklılaşmış bir hücreden ya da çoklu miyelomdaki gibi, farklılaşmanın ileri aşamasındaki hücreden kaynaklanabilir. Löseminin tipini belirlemek için farklılaşmanın hangi aşamada durduğunu anlamak önemlidir.

Farklılaşma sırasında her iki kök hücreden prolifere olan hücre alt grupları French-American-British (FAB) sınıflamasına göre karakterize edilmektedir. Bu sınıflamada kullanılan kriterler, hemapoetik sistemdeki anormal prolifere olan hücrelerin morfolojik, immünolojik ve sitokimyasal özellikleridir. Bu sınıflamaya ilave olarak hücrelerin morfolojik, immünolojik ve sitogenetik özellikleride dikkate alınarak MIC sınıflandırması yapılmaktadır. (Kurzrock ve Talpaz 1995, Rooney ve Czepulkowski 1992).

1.2.Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)

Akut lenfoblastik lösemide anormal şekilde prolifere olan lenfoblastların kontrolsüz ve aşırı çoğalmalarıyla kandaki sayıları hızla artar. Lenfoblastların olgun hücreler meydana getirmemesi sebebi ile bağışıklık sistemi zayıflar. Biriken olgunlaşmamış hücreler sebebi ile normal ilik hücrelerinin oluşumu engellenmiş olur. Bu durumda kandaki kırmızı hücrelerin (anemi), platelletlerin (trombositopeni) ve normal beyaz hücrelerin özellikle nötrofillerinin (nötropeni) yetersizliği ile de kendini gösterir.

Normalde lenfoid kökenli hücrelerde çoğalma ve farklılaşma diğer kan hücrelerinden biraz farklıdır; çünkü olgun lenfositler, enfeksiyonlara karşı cevap olarak çoğalabilme özelliğine sahiptir. Enfeksiyon etkisiz hale geldiğinde ise, lenfositlerin sayısı apoptozla kısıtlanır ve yalnızca hafıza hücreleri uzun dönemde varlığını sürdürür. Lenfoid hücrelerdeki kanserleşme yalnızca olgunlaşmamış hücrelerden kaynaklanmaz, yani kanser nedeni her zaman farklılaşma yolundaki bir bozukluk değildir. Aksine, farklılaşmış hücrelerde apoptozdan kaçma ve hücre dışından çoğalma ile ilgili uyarılar ile kazanılmış bağımsızlık veya her ikisi birden gözlenebilir.

ALL, çocuklarda yaygın olarak görülen bir lösemi alt grubudur. ALL tüm çocuk malignansilerinin yaklaşık %30'unu ve çocuk lösemilerinin hemen hemen %80'ini oluşturur (Chessels ve ark 1997). Çocuklarda 6 yaş altında, erişkinlerde ise genellikle 65 yaş ve üzerinde sık görülür. Erişkinlerde akut lösemilerin %20'sini ALL oluşturur.

Hastalığın teşhisi sırasında kan ve kemik iliği hücreleri incelenmektedir. Kırmızı hücre ve trombositlerin sayılarının incelenmesine ek olarak kan hücrelerinin histolojik olarak ışık mikroskobunda incelenmesi de blastların görüntülenmesine yardımcı olur. Bu incelemeler sonucunda elde edilen klinik ve laboratuar verileri ALL'de prognozun belirlenmesi açısından oldukça önemlidir.

Son zamanlarda ALL tedavisinde risk gruplarına göre tedavi şeklinin belirlenmesi gündeme gelmiştir. Prognoztik faktörler ışığında risk grubu değerlendirilmesi yapılmakta ve hastalara uygun tedavi protokollerinin uygulanması sağlanmaktadır. Bu risk gruplarının belirlenmesi sayesinde düşük risk grubundaki hastalara daha hafif tedavi protokolü uygulanarak, hastanın tedavi sırasında maruz kaldığı toksik etkiler en aza indirilmeye çalışılmaktadır. Risk grubu yüksek hastalara ise tedaviye yanıtı artırmak için daha yoğun tedavi protokolleri uygulanmaktadır. Risk gruplarının belirlenmesinde önemli olan faktörler arasında yaş, lökosit miktarı, santral sinir sistemi (SSS) tutulumu gibi klinik bulguların yanı sıra sitogenetik, immünofenotip gibi biyolojik özellikler sayılabilir. Kan ve/veya kemik iliği hücrelerinin incelenmesinde sitogenetik ve moleküler genetik teknikler kullanılarak kromozomlardaki yapısal ve sayısal anomaliler araştırılmaktadır. İmmünofenotiplendirmede olduğu gibi hücre yüzeyi markırlarının (antijen) incelenmesi ile de blastların biyolojik özelliğini belirlemek mümkündür.

Akut lenfoblastik lösemide prognozun belirlenmesinde blastların sınıflandırılması oldukça önemlidir. Sınıflandırma normal hematopoezin neresinde klonal farklılaşma olduğunu anlamaya yöneliktir. Blastların morfolojik, immünofenotipik, sitogenetik, biyokimyasal ve genetik özelliklerine bakılarak çeşitli sınıflandırmalar yapılmıştır.

1.2.1. ALL'nin Morfolojik Sınıflandırılması

En sık kullanılan FAB sınıflaması 1976 yılında Fransız-Amerikan-İngiliz hematologları tarafından ortaya konulmuştur ve son olarak 1985 yılında modifiye edilmiştir. ALL'deki sınıflama, çekirdek sitoplazma oranı, vakuol ve çekirdekçik varlığı, sitoplazma bazofillerine dayanır (Schumacher 1990). FAB sınıflandırmasında blastlar morfolojik ve sitokimyasal boyanma özelliklerine göre gruplandırılır. Fakat immünofenotipleme, elektron mikroskobu, sitogenetik ve moleküler biyolojik tetkikleri içermeyen bir sınıflandırmadır (Head 2004).

ALL'de FAB sınıflandırmasında; L1, L2 ve L3 olmak üzere 3 alt tipe ayırılarak sınıflandırılmaktadır (Çizelge 1.2.). Örneğin çocuk hastaların %85'i L1, %14'ü L2 ve %1'i L3 morfolojisine sahiptir (Miller ve ark 1985). L1 morfolojisine sahip hastalarda yaşam oranı diğerlerine göre daha yüksektir. L2 morfolojisindeki hastalarda ise prognoz L1'e kıyasla daha kötüdür (Lilleyman ve ark 1986). Yetişkinlerde ise L2 morfolojisi %67 oranında görülür ve kötü prognoza sebep olan faktörler arasında yer alır. ALL'nin yetişkinlerde kötü seyretmesinin sebebi L2 morfolojisinin yetişkin hastalarda sık görülmesi olabilir (Brearley ve

ark 1979). L3 morfolojisi ise en kötü prognoza sahip gruptur. Son yıllarda morfolojik, immünofenotipik, genetik özellikler ve tedavi yaklaşımları açısından diğerlerine göre farklılık gösteren matür B hücreli ALL'yi temsil eden L3 alt tipinin belirlenmesi yeterli olmaktadır (Margolin ve ark 2002).

Çizelge 1.2: Akut lenfoblastik lösemilerde FAB sınıflaması (Bennett ve ark 1976)

	L1	L2	L3
Hücre boyutu	Küçük	Büyük, heterojen	Büyük, homojen
Nükleer kromatin	Homojen	Değişken, heterojen	Noktalı ve homojen
Nükleus şekli	Düz konturlu, Bazen çentikli	İrregüler sıklıkla çentikli	Düzgün konturlu, Oval-yuvarlak
Nükleus	Görülmez veya silik, küçük	≥1, sıklıkla belirgin	Belirgin, ≥ , veziküler
Sitoplazma	Dar	Değişken, sıklıkla büyük	Orta derecede büyük
Sitoplazmik bazofil	Hafif veya orta, nadiren belirgin	Değişken, bazen koyu	Çok koyu
Sitoplazmik vakuol	Değişken	Değişken	Sıklıkla belirgin

FAB sınıflandırmasının güvenilirliğini belirlemek amacı ile Whittaker ve ark 1979 yılında yaptıkları bir çalışmada 278 ALL'li hasta için 5 hematolog arasında ortak tanı koyma oranını %45,7 olarak belirlemişlerdir. Benzer çalışmalarda bu oranı Dick ve ark 1982 yılında %58, Childs ve ark 1986 da %66 olarak belirlemişlerdir. Bu gruplandırmada ALL L1 ve L2 gruplandırmasındaki kriterlerin subjektif olamamasından kaynaklanan zorluklar olduğuna karar verilmiştir. L3'lü olguların gruplandırmasında problem yoktur (Dick ve ark 1982, Childs ve ark 1986).

Akut lenfoblastik lösemide FAB sınıflandırmasına yardımcı diğer bir yöntem ise histolojik boyamadır. Blastların L1, L2 ve L3 morfolojilerini anlamak için bazı boyalar kullanılmaktadır.

1.2.2. ALL'de Histolojik Boyama

Histolojik boyama yönteminde lösemik blastların bazı boyaları alıp almamasından faydalanılarak bir sınıflandırma yapılmaktadır. Kullanılan boyalar arasında; Miyeloperoksidaz (MPE), Sudan siyahı (SBB), Periyodik-Aside-Schiff (PAS), Asid Fosfataz (AP), Nonspesifik Esteraz (NSE), Terminal Deoksinükleotil Transferaz (TdT), Demir (Fe) boyaları yer alır (Onciu 2009, Barnard 1996).

Bu boyalardan MPE ve SBB ile sitoplazmik elementlerden yararlanılarak öncelikle miyeloid ve lenfoid lösemilerin ayrımı yapılır. MPE ve SBB ile granülasit ve monositlerdeki azurofilik granüller boyanır. Bu yapı lenfositlerde olmadığından boyama sonucu negatiftir. PAS yardımı ile ise sitoplazmik karbonhidratlar ve karbonhidrat ile kaplı proteinler ve yağlar belirlenir. Lenfosit sitoplazmalarında PAS(+) sonuç vermektedir. Çizelge 1.3.'de hangi alt grupların hangi boyalar ile boyandığı gösterilmektedir.

Çizelge 1.3. Akut lenfoblastik lösemide sitokimya (Margolin ve ark 1997)

FAB	MPE	SBB	AP	CAE	A-EST	B-EST	PAS	MGP	Fe	TdT
L1	-	-/np	+*	-	+/z	-/z	+/-	+	-	+
L2	-	-/np	+*	-	-/z	-/z	+/-	+	-	+
L3	-	-	+*	-	-	-	+/-	+	-	-

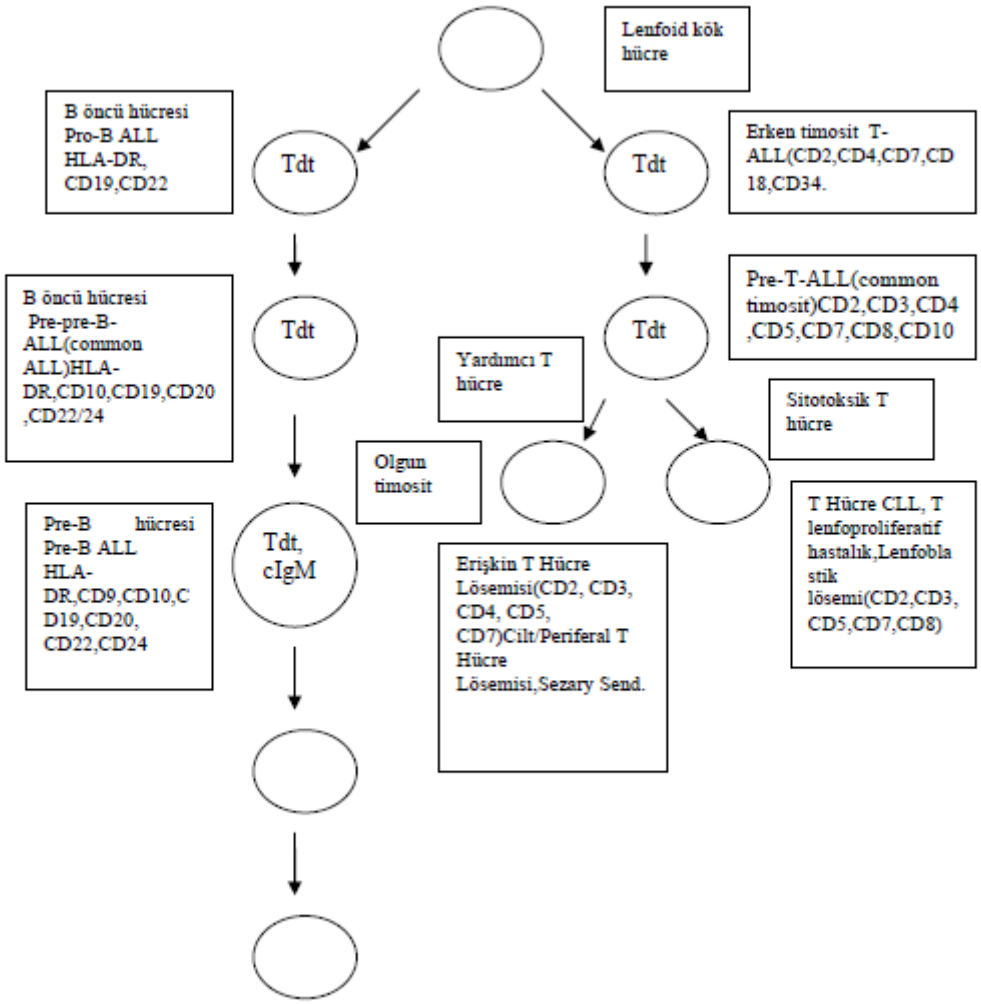
np: nadir pozitif, *****:T-ALL'de unipolar pozitif, **z**:zayıf

MPE: Miyeloperoksidaz, **SBB**: Sudan Black Boyası, **AP**: Acide Phosphatase, **CAE**: Choloroacetate Esterase, **A-EST**: Alpha Napthyl Acetate Esterase, **B-EST**: Alpha Napthyl Butyrate Esterase, **PAS**: Periodic Acide Schiff, **MGP**: Methyl Green Pyronine, **TdT**: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase.

ALL'deki sınıflandırmada blastın hangi aşamada durduğunu anlamaya yarayan tekniklerden bir diğeri ise immünofenotiplendirme yapmaktır. FAB sınıflandırmasının yetersiz kalması, hücre yüzey antijenlerinin kullanılmaya başlanması ile immünofenotiplendirme ALL'nin sınıflandırmasında önemli basamaklardan biri haline gelmiştir.

1.2.3. ALL'de İmmünofenotiplendirme

1970'li yıllarda ALL'lerin sınıflandırmasında immünofenotiplendirme de kullanılmaya başlanmıştır. 1980'lerde ise antikorlardan yararlanılarak blastların kemik iliğinin hangi dizisinde farklılaştığını, hangi evresinden köken aldıklarını belirlemeye yarayan yüzey işaretleyicileri kullanılmaya başlanmıştır. Bu yüzey işaretleyicilerine "Cluster of Differentiation (CD)" denilir. CD markırları sayesinde hücrenin hangi gelişim aşamasında olduğu hakkında bilgi elde edilir (Şekil 1.2.) (Manera ve ark 2000, Mauer 1991).



Şekil 1.2. Lenfoid hücrelerinin farklılaşma seviyeleri, ALL'nin immünolojik sınıflandırılması (Rooney 2001).

Akut lösemilerde; FAB sınıflandırmasının yetersiz kalması, sınıflandırmada hücre yüzey antijenlerinin ve sitogenetiğin öneminin artması ile immünofenotipleme tanıda ve ALL'nin risk gruplarının belirlenmesinde önemli basamaklardan biri haline gelmiştir.

ALL immünofenotiplendirme ile çizelge 1.4.'de gösterildiği gibi B hücre kaynaklı ve T hücre kaynaklı olmak üzere 2 ana gruba ayrılır. B ve T hücreli ALL'ler ise farklılaşmanın hangi evrede başladığına göre alt gruplara ayrılır. Çocukluk ve yetişkin ALL'de en sık görülen ALL tipi common ALL'dir. FAB sınıflandırması göz önüne alındığında ise Pro B-ALL, common ALL ve pre B-ALL L1/L2 morfolojine sahiptir. Olgun B-ALL de ise L3 morfolojisi görülmektedir (Rooney 2001).

ALL'ler genelde erken B hücre kaynaklıdır. Özellikle çocuklarda pre-B ALL'ye sık rastlanırken, yetişkinlerde T hücre kaynaklı ALL daha yaygındır. Prognoz açısından da B hücreli ALL'liler daha iyi prognoza sahiptir. ALL'nin yetişkinlerde daha kötü prognoz göstermesinin sebebi yetişkinlerde T hücreli ALL'nin daha sık görülmesi olabilir.

Çizelge 1.4: ALL alt tiplerinde immünofenotipik özellikler (Rooney 2001).

Alt Tip	**Yüzey Belirteci**	**Sıklık**
B-dize ALL	**$CD19^+$±$79a^+$±$CD22^+$**	**%76**
Pro B-ALL (B-I)	$CD19^+$±$79a^+$±$CD22^+$	%11
Common ALL (B-II)	$CD19^+$±$79a^+$±$CD22^+$+$CD10^+$	%51
Pre B-ALL (B-III)	$CD19^+$±$79a^+$±$CD22^+$+$clg\mu^+$	%10
Olgun B-ALL	$CD19^+$±$79a^+$±$CD22^+$+$slg\mu^+$+c/κ^+ veya λ^+	%4
T-dize ALL	**$cCD3^+$ veya $sCD3^+$**	**%24**
Pro T-ALL (T-I)	$cCD3^+$ veya $sCD3^+$+$CD7^+$	
Pre T-ALL (T-II)	$cCD3^+$ veya $sCD3^+$+$CD2^+$± $CD5^+$±$CD8^+$	
Kortikal T (T-III)	$cCD3^+$ veya $sCD3^+$+$CD1a^+$	
Olgun T-ALL (T-IV)	$cCD3^+$ veya $sCD3^+$ $CD1a^-$	

clg: sitoplazmik immunoglobulin; **slg:** yüzey immunoglobulin; **μ:** mu ağır zincir proteini; **κ:** kapa hafif zincir proteini; **λ:** lambda hafif zincir proteini.

2001 yılında Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) hemopoietek ve lenfoid neoplasmaları içeren bir sınıflama yapmıştır. WHO sınıflamasında; morfoloji, immünofenotipleme, sitogenetik ve moleküler biyolojik özellikler göz önüne alınmıştır (Head 2004). ALL'de WHO sınıflamasında tanı ancak immünofenotipleme ile mümkün olabilmektedir.

1.2.4. ALL'de WHO Sınıflaması

Prekürsör B-lenfoblastik lösemi/lenfoma

Blastlar L1, L2 veya karışık hücre morfolojisinde olabilirler. B hücre yüzey antijenlerinden CD19, CD20, CD22, CD79a pozitifliği ile karakterize edilir. Ayrıca CD10, HLA-DR, TdT ve nadiren CD34 pozitifliği de olabilir. Genetik olarak; a.iyi, b.ortalama, c.kötü riskli olmak üzere üç alt grubu vardır.

Prekürsör T-lenfoblastik lösemi/lenfoma

Bu grupta L1, L2 veya karışık hücre morfolojisi sahip blast olabilir. T hücre yüzey antijenlerinden CD2, CD3, CD5, CD7, cCD3 pozitifliği ile karakterizedir. Bunun dışında blastlarda genellikle TdT pozitifliği ve HLA-DR negatifliği mevcuttur. Ayrıca çeşitli kromozomal bozukluklar da mevcuttur.

Burkitt lenfoma/lösemi

Burkitt tipi lenfoma ve lösemi, prekürsör lenfoid neoplazma grubundan değildir. Lenfoma WHO sınıflamasında matür B hücreli neoplazma olarak ele alınmıştır. FAB sınıflamasına göre L3 morfolojisini gösterir. İmmünolojik olarak, slg, CD19, CD20, CD22, HLA-DR pozitifliği vardır. CD10 pozitifliği de saptanabilir (Head 2004).

1.2.5. ALL'de Genetik Tanı ve Prognozu

Çoğalma ve büyüme gen kontrolü altında olduğuna göre genetik faktörler tüm kanser türlerinde etkilidir şeklinde bir genelleme yapılabilir. Bununla birlikte bazı kanser türlerinde primer faktör olarak herhangi bir mutant gen sorumlu tutulmakla birlikte diğer bazılarında çevresel faktörler sorumlu tutulmakta ve dolayısıyla kontrolsüz hücre çoğalması sekonder faktör durumunu almaktadır. Fakat hangi faktör etkili olursa olsun tüm kanser türlerinin

somatik hücrelerdeki mutasyon ya da mutasyonlar sonucu oluştuğu ve mutasyonların da bir seri genin ekspresyonunu etkilediği kabul edilmektedir (Thompson 2005).

Tüm kanser türlerinde olduğu gibi ALL'de de birçok genetik bozukluğa rastlanmaktadır. ALL'de anormal genetik bulgular prognoz açısından önemli bir alt sınıflandırmadır. Blastlardaki genetik anomalileri belirlemek lösemik hücrelerin biyolojik davranışlarını ve tedaviye duyarlılıklarını belirlemek açısından oldukça önemlidir. Günümüzde sitogenetik ve moleküler genetik tekniklerin gelişmesi sayesinde kromozomlardaki yapısal ve sayısal anomaliler daha sık ve daha kolay saptanmaktadır. ALL'li çocukların %80 kadarında yetişkinlerin %70 kadarında genetik anomaliler vardır (Chen ve Sandberg 2002).

Genetik değişimler ALL'de hem tanı hem de tedavi de önemli faktörlerden biridir. Yetişkin ALL'li hastalarda tedaviye yanıt verme olasılığının çocuk ALL'li hastalara göre daha azdır. Bunun sebeplerinden biri, yetişkinlerde kötü prognoz sebebi sayılan genetik faktörlerin daha sık olmasına bağlı olmaktadır (Head 2004).

Örneğin ALL olgularında iyi prognoz sebepleri arasında yer alan hiperdiploidi görülme sıklığı çocuklarda %50 iken yetişkinlerde %10'dur. Yine çocuklarda sık görülen t(12;21) de iyi prognoz sebebidir. Trizomi 4, 10 ve 17'nin de çocuk hastalarında prognozu iyidir. Kötü prognoz sebebi olarak görülen MLL-AF4 füzyon genini oluşturan t(4;11)'e ise süt çocuğu ALL olgularında %50 sıklığında rastlanırken erişkin ALL'liler de %5 sıklığında rastlanmaktadır. Diğer bir kötü prognostik özellik olarak bilinen t(9;22) sıklığı yaşa bağlı olarak artmaktadır: çocuklarda %3, erişkinlerde %20, 50 yaş üzeri hastalarda ise %50 sıklığında gözlenmektedir (Pui ve Evans 2006).

Özellikle ALL'li çocuklarda iyi prognozla ilişkilendirilen t(12;21) ve yetişkinlerde kötü prognoz sebebi olarak bilinen t(9;22)'ye daha sık rastlanmaktadır. Çocuk ve yetişkinlerin her ikisinde de sayısal anomali görülme sıklığı ise oldukça fazladır (Kebriaei ve ark 2003).

1.2.6. ALL'de Kromozom Yapısal Bozuklukları

Çocukluk çağı ALL'lerin %75'inde kromozom translokasyonları görülmektedir. Bunların içinde t(9;22), t(4;11), t(8;14), t(1;19) ve t(10;14) en önemli kromozomal translokasyonlardır. Ayrıca 9p, 6q ve 12p delesyonlarına da sık rastlanır. ALL'de sık görülen p190 proteini, t(9;22) translokasyonu ile olusan BCR-ABL füzyon geninin bir ürünüdür. Diğer sık rastlanan bir moleküler değişiklik, t(4;11) sonucu oluşan MLL-AFT gen

düzenlenmesidir. ALL'de çocuklarda en sık görülen translokasyon TEL-AML genleri arasında gerçekleşen t(12;21) iken yetişkinlerde BCR-ABL genleri arasında gerçekleşen t(9;22)'dir (Turkington ve Lipera 2005). Bu genlerin ürünleri fonksiyonları erişkin ve çocukta klinik önemi çizelge 1.5'te verilmiştir.

Çizelge 1.5: ALL'li yetişkin ve çocuklarda görülen yaygın karyotipik anomaliler ve prognozu (Mandrell 2009, Emerenciano 2007, Kebriaei ve ark 2003, Chen ve Sandberg 2002, Gökbuget ve Hoelzer 2002, Arico ve ark 2000).

KARYOTİP	İLGİLİ GENLER	FÜZYON PROTEİNİN FONKSİYONU	ALL'deki FREKANSI (%)		PROGNOZ	
			ÇOCUK	YETİŞKİN	ÇOCUK	YETİŞKİN
8q24 translokasyonları	MYC,IGH,IGK,IGL	MYC overekspresyonu	2	3-5	İyi	İyi
t(4;11)(q21;q23)	MLL,AF4	Transkripsiyon faktörü deregülasyonu	60 (süt çocuğu)	3-6	Kötü	Kötü
t(17;19)(q22;p13)	E2A,HLF	Apoptozisin durdurulması	0.5-1	0.5-1	Kötü	Kötü
t(1;19)(q23;p13)	E2A,PBX1	Transkripsiyon faktörü	5-6	1-3	Kötü	Kötü
t(9;22)(q34;q11.2)	BCR,ABL	Tirozin kinaz	3-4	25-30	Kötü	Kötü
t(12;21)(p13;q22)	TEL,AML	TEL fonksiyonlarının eksikliği	20-25	1-3	İyi	?
t/dic 9;12), p(11-12;p11-13)	TEL,JAK2	Yapısal olarak aktif kinaz	nadir	nadir	?	?
14q11,7q35,7p14-15	T-hücre reseptörü yeniden düzenlemeleri	Transkripsiyon yolu bozuklukları	10	<5	İyi	İyi
del 9p	$P16^{INK4B}$,$P14^{ARF}$, $P15^{INK4B}$	Tümör supressör geni?	?	12	Kötü	Çocuklara göre İyi
del 12p	TEL,$p27^{KIP1}$	Tümör supressör geni?	17-33	5	İyi	İyi
del 6q	?	Tümör supressör geni?	32	3	İyi	?

?: Net bir bilgi elde edilememiştir.

1.2.7. ALL'de Kromozom Sayısal Bozuklukları

Yaklaşık 100 yıl önce Alman zoolog Theodor Boveri deniz kestanesi embriyoları üzerinde yaptığı çalışmalarda anormal mitotik bölünmeler görmüştür ve anöploidiyi ilk olarak tanımlamıştır (Boveri 1902). Boveri anormal kromozom oluşumlarını içeren bu durumun (anöploidi) kanser promotörü olabileceğini ileri sürmüştür. Bugünlerde yapılan çalışmalar neticesinde, solid insan tümörlerinde, anöploidinin yaygın olduğu bilinmektedir. Anöploidinin kanserleşmenin tetikleyicisi mi yoksa sonucu mu olduğu net olmamakla birlikte hastanın kliniğine belirlediği tahmin edilmektedir (Holland ve Cleveland 2009).

Kanserlerde kromozom anomalilerinin çok fazla olması ve kanserli hücrelerden kromozom elde edilmesinin zorluğu anöploidinin araştırılmasında sıkıntı oluşturmaktadır.

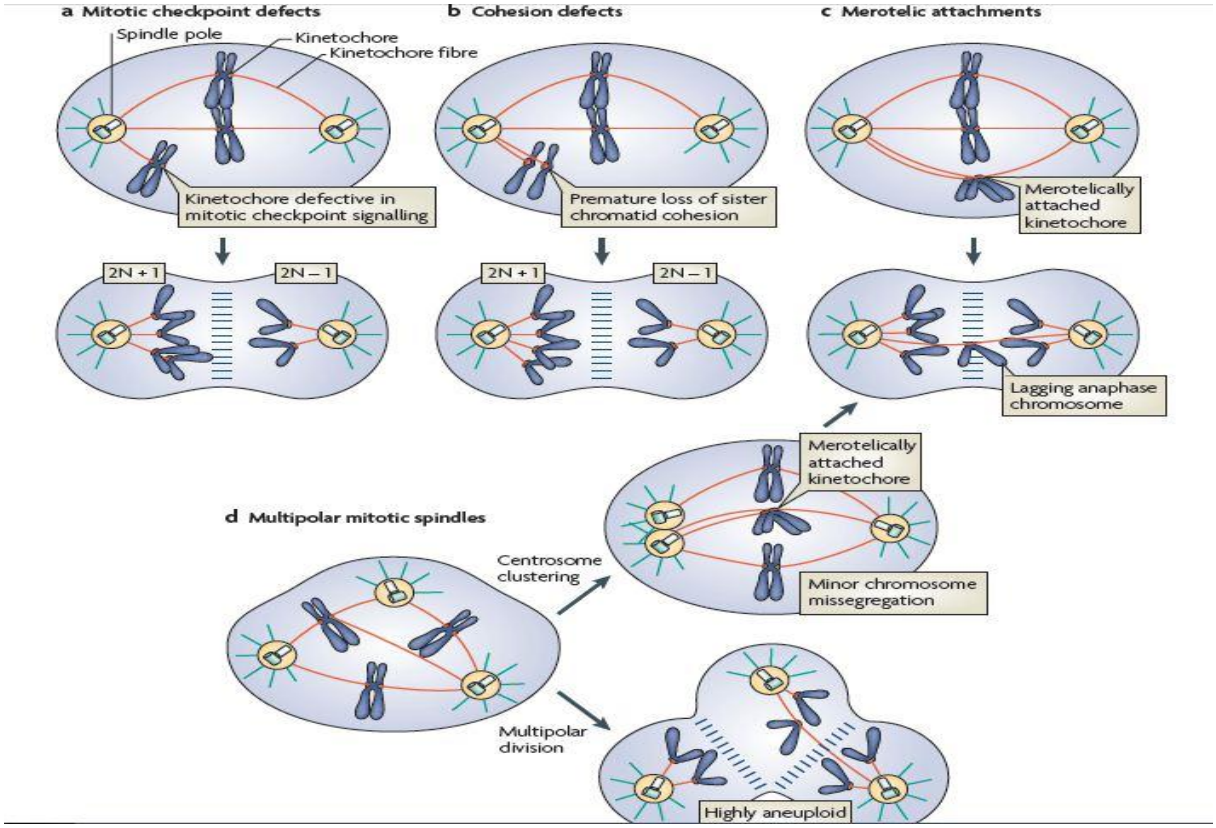
Anöploidinin Oluşumu

Anöploidinin, mitoz ve mayoz bölünme esnasında meydana gelen bölünme hataları sonucunda oluşur. Mitotik checkpoint olarak adlandırılan kontrol mekanizması, bölünme esnasında kromozomların yanlış ayrılmasına karşı koruyucu görev üstlenir (Kops ve ark 2005). Checkpoint elemanları sayesinde, bütün kromozomlar metafazda mikrotübüler eksen de çift yönlü olana kadar anafazın başlamasını erteleyerek kromozom ayrılmasının doğru gerçekleşmesini sağlar. Fakat hücre bölünmesini etkileyen mekanizmalardaki bozukluklar anöploidinin oluşmasına sebep olur. Bu mekanizmalar arasında:

- Mitotik checkpoint defekti
- Kohezyon defekti
- Merotelik bağlanma
- Multipolar mitoz'u sayabiliriz.

Mitotik checkpoint defekti: Mayalar ve sinekler gibi bazı organizmalarda mitotik kontrol noktası gerekli değildir (Buffin ve ark 2007), memelilerde ise mitotik kontrol noktası tam olarak inaktif olduğu zaman mitoz esnasında kromozomal yanlış ayrılmalar, hücre ölümleri hatta erken embriyonik ölümler gerçeklerşir (Kalitsis ve ark 2000). Yani normal şartlarda mitotik kontrol noktası sinyalleri mitoz bölünmeyi yavaşlatarak bölünmenin doğru gerçekleşmesini sağlar. Fakat sinyaller azalırsa veya tamamen yok olursa metafazda kromozomlar kendi eksen bağlantılarını kurmadan önce anafazı başlatabilir ve kromozomların yanlış ayrılmasına dolayısı ile anöploid hücrelerin oluşmasına yol açar (Şekil 1.4-a).

Meme, kolon, rahim, akciğer kanserileri gibi solid tümörlerde ve lösemi tiplerinde yapılan çalışmalarda, anöploidiye çok sık rastlanmaktadır. Moleküler genetik çalışmalar bu kanserlerde mitotik checkpoint elemanlarını kodlayan genlerdeki değişikliklerden (mutasyon ve kromozom bozuklukları) kaynaklanan ekspresyon bozuklukları olduğu gözlenmiştir (Weaver ve Cleveland 2006).



Şekil 1.4. Anöploidinin oluşum yolları (Holland ve Cleveland 2009).

Kohezyon defekti: Kardeş kromozomlardaki bağlanmayı kontrol eden mekanizmadaki bozukluklar da anöploidiye sebep olur. Hücrelerde kohezyon defektinin oluşması sonucunda kardeş kromozomlardaki bağlanmayı kontrol eden mekanizmalarda aksama olur. Bunun sonucu kardeş kromozomların her ikisi de aynı kutuptan gelen mikrotübüllere bağlanır. Aynı yavru hücreye aktarılan kromozomlar sonucunda biri fazla kromozom sayısına sahip biri ise o kromozomdan yoksun olmak üzere anöploid hücreler oluşur (Şekil 1.4.-b) (Zhang ve ark 2008).

Merotelik bağlanma: Mitoz bölünme sırasında kromozomların yanlış ayrılmasına sebep olan bir diğer durum da, kinetekorların eksen mikrotübüllerine düzensiz bağlanmasından kaynaklanabilir. Tek bir kinetekor ekseninin her iki kutuptanda ayrılan mikrotübüllere bağlanması sonucunda da anöploid hücreler oluşur. Bu durum, merotelik bağlanma olarak bilinir (Şekil 1.4.-c). Merotelik bağlanma da kinetekorlara bağlanma gerçekleşir ve gerilim oluşur. Dolayısı ile mitotik kontrol noktası sinyalleri aktivitesi gerçekleşmez ve hücre anafazı başlatır. Kutuplardan herhangi birinin kuvvetli olması sonucu kardeş kromotidlerin her ikiside aynı kutuba çekilebilir. Ya da geciken kromozom eksen orta hattında kalır ve her iki hücreden de dışlanır (Cimini D. 2008).

Multipolar mitoz: Anöploidinin oluşmasına sebep olan diğer bir mekanizma ise mitoz esnasında multipolar yapının oluşmasıdır. Sentromer mitotik eksenin kutuplarında lokalize olur ve normal şartlarda bipolar bir yapıda hücre bölünme gerçekleşir. Sentromer sayısındaki artış bipolar yapıyı bozar ve multipolar bir yapıda bölünmeye gidilir (Şekil 1.4.-d). Bu kutup bozuklukları düzeltilemez. Sonuçda üç yada daha fazla anöploidili yavru hücre oluşur. Aslında bu duruma sık rastlanmaz. Hücrelerde ekstra kromozomlar dahi olsa kromozomlar iki gruplu yapıda kümelenme eğilimindedir. Dolayısıyla bipolar forma olanak sağlanır (Ganem ve ark 2009)

Bazı tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar, anöploidi ile birleşerek tümör oluşumunu başlatır. Anaploidinin bu riski nasıl arttırdığı hala açıklanamamaktadır. Birinci ihtimal, anaploidinin protein dengesini bozarak ve genomik instabiliteyi arttırarak tümör gelişimini kolaylaştırmasıdır. Nadir olarak görülen bu artmış instabilite, kansere sebep olan mutasyonların oluşumunu tetikleyebilir. Diğer bir ihtimal ise; anöploidi, onkogenik allelleri içeren kromozomların duplikasyonlarına veya tümör baskılayıcı genleri içeren kromozomların kaybolmasına loss of heterozygosity-LOH adı verilen heterozigosite kaybı neden olur (Kalitsis ve ark 2005).

Tüm bunların aksine anöploidi diğer bir yandan da tümör oluşumunu engelliyor olabilir. Anöploidi sonucu oluşan fazla kromozomlar, haployetersiz genlerdeki mutasyonların etkilerine karşı hücreyi koruyan ek kromozomlar olabilir. Böylece anöploidi, DNA'nın hasarlı olması durumunda hücrelerin daha fazla hayatta kalmasına olanak sağlayabilir. Bu durumda hücreler, büyümeyi hızlandıran ve/veya değiştiren mutasyonların birikmesi sırasında daha fazla zaman kazanır (Holland ve Cleveland 2009, Zhang ve ark 2008).

Anöploidide nokta mutasyonlardan farklı olarak sadece genlerin az bir miktarını etkilenmesinin aksine tüm kromozomun kaybı ya da kazanımı söz konusudur. Bunun sonucunda da binlerce genin transkripsiyonunu değiştirmekte ve hücrede fizyolojik işlemlerin birçoğu bozulmaktadır (Williams ve ark 2008). Bu dengesizlik anöploid hücrelerin büyümesini engeller ve strese sokar. Hücrelerin dezavantajla büyümesini sağlar ya da letaliteye neden olur. Anöploidinin kromozom imbalansının yan etkilerini tolere eden hücrelere izin vererek ilave mutasyonların birikmesi için seçici baskılama yaptığı düşünülmektedir. Anöploididen kaynaklanan düzensiz gen ekspresyonu onların yaşam ve proliferasyonu için gerekli olan hücrelerde, hücrelerin kazandığı mutasyon oranını artırabilir. Oluşan bu adaptasyonlar anöploidinin onkojenik potansiyelini ortaya çıkarır. Artan genomik

instabilitenin karşısında hücrelerin yaşamına izin vererek proliferasyonu devam ettirir (Torres ve ark 2008)

Anöploidi tümör gelişiminin gidişatını hücre tipine ve genetik içeriğine bağlı olarak pozitif ya da negatif etki edebilmektedir. Bu nedenle, yapılacak çalışmalarla; hangi genetik değişiklikler içerdiği ve hangi hücre tipinin anöploidiyi ilerlettiği ve tümörgenezi baskıladığını belirlemenin önemli olduğu düşünülmektedir. Tüm kanser türlerinde olduğu gibi ALL'de de birçok genetik bozukluklar arasında anöploidi görülme sıklığı oldukça fazladır ve prognozlada ilişkili olduğu bilinmektedir.

ALL'li hastalarda sayısal kromozom anomalileride oldukça sık görülmektedir. Bu anomaliler kromozom sayılarına göre hiperdiploidi, hipodiploidi ve haploide yakın olarak sınıflandırılmaktadır. Bu anomaliler ve prognozları çizelge 1.6'da gösterilmektedir.

Çizelge 1.6: ALL'de sayısal anomaliler ve prognozları (Traje 2011, Pui ve Evans 2006, Tommerup ve Schaffer 2005, Chen ve Sandberg 2002, Hruak ve MacDonald 2002).

Sayısal Anomali	Kromozom Sayısı	Prognoz	Görülme Sıklığı (%)
Hiperdiploid (>46)	47-50	Çok kötü	25-30
	51-56	Kötü	
	56-67	İyi	
	82-94	Çok kötü	
Hipodiploid (<46)	23-28	Kötü	10
	34-45	Kötü	

1.2.8. ALL'de Diğer Prognostik Faktörler

ALL'de birçok klinik ve laboratuar bulguları prognoz açısından önem taşımaktadır. Prognozda önemli sayılan kriterlerin belirlenmesi, risk grubunun tayin edilerek hastalara uygun tedavi planlamasının yapılması için önemlidir. T hücreli ve matür B-hücreli immünofenotipik özelliklerde olduğu gibi bazı prognostik faktörler zamanla tedavi yaklaşımlarının değişmesi ile önemini yitirmiştir. Önceleri çok kötü prognoz sebebi olarak düşünülürken şimdi tersi düşünülmektedir. Önceleri önemli sayılmayan sitogenetik özellikler ise şimdilerde oldukça önemli olduğunu göstermiştir. Mesela bazı sitogenetik özellikler belli

yaş gruplarında yoğunlaşmıştır. Bunlardan TEL/AML çocuklarda, BCR/ABL yetişkinlerde prognoz açısından önemlidir (Fiedmann ve Weinstein 2000).

Yaş, cinsiyet ve lökosit sayısı ise zamanla önemini kaybetmeyen prognostik faktörler arasındadır. Birçok çalışmada ALL'nin risk gruplandırmasında hala kullanılmaktadır (Kwon ve ark 2009, Ceppi ve ark 2009, Gmidene ve ark 2008). Bazı prognostik faktörler ise tedavi şeklinin yoğunlaşması sonucunda önemini kısmen yitirmiştir sadece belli çalışmalarda risk gruplandırılmasında kullanılmaktadır. Bunlar arasında malnütrisyon, immünglobulin düzeyleri, mediastinal kitle, inisyal hemoglobin ve trombosit değerleri, FAB sınıflamasına göre morfoloji ve immünofenotip sayılabilir. Yine de bunlardan bir çoğu tekrar gündeme gelebilmekte ve yeni koşullarda önemi tekrar değerlendirilebilmektedir (Fiedmann ve Weinstein 2000).

Çizelge 1.7: ALL'li çocuklarda prognostik faktörler (Fiedmann ve Weinstein 2000).

RİSK FAKTÖRLERİ	**SONUÇ**	
	İYİ	**KÖTÜ**
Yaş	1≥ ve ≤ yaş	<1 ya da >9 yaş
Cinsiyet	Kadın	Erkek
Irk	Kafkas, Asya	Afrika, Amerika
Tanı sırasında WBC miktarı	< 50.000/mm^3	≥ 50.000/mm^3
Lösemi hücrelerinde kromozom sayısı.	>50	<45, özellikle 24-28
8.günde prednisone cevap	Periferal blast yok	Periferal blast
*CNS durumu	CNS 1	CNS 1 ya da CNS 3
Sitogenetik	Trizomi 4 ve 10	t(4;11), t(9;22)
Moleküler genetik	TEL/AML1	MLL geni yeniden düzenlemeleri
İmmünofenotip	Öncül B hücre	T hücreli, olgun B hücreli

*CNS: Central Nervous System

Kemoterapiye dirençlilik

Tedaviye yanıt lösemik hücrelerin genetiğini, hastanın farmakodinamik ve farmakogenetik özelliklerini yansıttığından hastanın prognozunu gösteren diğer tüm klinik ve biyolojik faktörlerden daha önemli bir prognostik faktördür. ALL'nin değişik alt gruplarında prognozun farklı olması primer olarak lösemik hücrelerin kemoterapiye dirençli olmaları ile ilşkilidir. Hiperdiploidili karyotipteki hücrelerin kemoterapiye duyarlılığı buna örnektir. Hiperdiploidiye sahip olan blastik hücrelerin %97'den fazlasında 21.kromozomun üç veya dört kopyası vardır. Metotreksatın hücre içine alınmasında etkin olan gen bu kromozom

üzerinde yer almaktadır. Bu yüzden hiperdiploidi gösteren hücrelerin kemoterapiye yanıtları çok iyidir (Belkov ve ark 1999).

Yaş

Tanı anında hasta yaşı önemli bir prognostik faktördür. Bir yaşın altındaki hastalarda immatür proB-ALL immünofenotipi ve MLL pozitifliği sık olduğundan prognoz oldukça kötüdür. Children Cancer Group 2-9 yaş, Pediatric Oncology Group 3-5 yaş, SJCRH ise 1-10 yaş aralığını düşük risk olarak almıştır (Smith ve ark 1996). Adolesanlarda T-ALL sıklığının daha yüksek olması ve hiperdiploidi, TEL-AML gibi iyi prognostik faktörlerin daha az görülmesinden dolayı prognoz kötüdür. T-ALL' de lösemik hücrelerde metatreksat ve sitarabin gibi kemoterapötiklere dirençlidir. Ancak risk gruplarına göre kemoterapi yoğunluğunun düzenlenmesinden sonra B öncül hücreli ALL'lere yakın kür şansı elde edilmektedir (Pieters ve Carroll 2008).

Lökosit Sayısı

Lökosit sayısı yıllardır yapılan çalışmaların tümünde prognostik önemini korumaktadır. Ancak düşük risk grubu için belirlenmiş tek bir değer yoktur. Lökosit miktarının 20000/mm^3'ün altında olması standart risk olarak kabul edilir. Düşük risk grubu için lökosit sayısının üst sınırını 50000/mm^3 olarak belirleyen çalışmalarda vardır.

Kromozom anomalileri, kromozom kayıp kazanımları ya da yapısal değişiklikleri geleneksel ya da moleküler sitogenetik metodlarla belirlenebilir. Bu analizler lösemi tanısı, prognozu ve tedavi seçeneklerinin belirlenemesinde önemli ölçüde destek sağlar.

1.3. Sitogenetik Yöntem

Periferik kandan ve kemik iliğinden kültür metodu kültür ve direk kullanılarak metafaz plakları elde edilir. Periferik kan için ideal kültür süresi 72 saattir. Kemik iliği materyali için ise direk, 24, 48, 72 saatlik kültürlerden metafaz plağı elde edilir. Hücre kültürüne kolşisin (colsemid) ilave edilerek iğ ipliklerinin protein yapısı bozulmakta ve mitoz metafaz evresinde durdurulmaktadır. Böylece daha fazla sayıda metafaz elde edilmektedir. Hücre zarının yarı geçirgen özelliğinden yararlanılarak hacmini genişletmek için hipotonik solüsyon uygulanması ve hücrelerin fiksasyonu ile daha kaliteli metafazlar elde edilmektedir. Bundan sonraki adım kromozomların bantlama teknikleri ile tek tek tanınıp sayısal ve/veya yapısal bir anomalinin olup olmadığını araştırılmasıdır.

Kromzomlarda daha ayrıntılı tanıya gidebilmek için bantlama yöntemlerinin uygulanması gerekmektedir. Uygulanan bantlama yöntemleri GTG/GTL (Giemsa-Tripsin-Giemsa/Giemsa-Tripsin-Leishman); QFA (Quinakrin-Fluoresan-Atebrin); CBG (Centromer-Barium-Giemsa); RBG1 (Reverse-Brdu); NOR (Nukleolar Organiser-Region); HRB (High Resolution Banding) ve SCE (Sister Chromatid Exchange) dir.

1.4. Floresans In Situ Hibridizasyon Tekniği

Karyotipin doğru yorumlanması malignansilerde tanı ve tedavinin belirlenmesinde önemlidir. Tümör hücrelerinde metafaz kromozomu elde etmek zordur. Elde edilen metafazları ise morfolojik yapılarından dolayı klasik yöntemlerle analiz etmek oldukça zordur. Bu zorluk moleküler sitogenetik ya da FISH analizinin ilerlemesi ile kolaylaşmıştır. FISH analizi hem metafaz hem interfaz hücrelerinde inceleme imkanı sağladığı için kanser genetiğinde kullanılan en önemli tekniklerden biri olmuştur.

FISH tekniği tanısal ve araştırma amaçlı kullanılır.

Tanısal amaçlı olarak sitogenetik, prenatal tanı, interfaz sitogenetiği, mikrodelesyon sendromlarının tanısı, dokuda enfeksiyon ajanlarının tanısı, kanser sitogenetiği ve dokuda mRNA düzeyinde onkogenlerin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır.

İnterfaz hücrelerine de FISH yönteminin uygulanabilir olması, hızlı sonuç vermesi, az miktarda materyal ile birlikte çok sayıda hücre üzerinde çalışma imkanı sunması da geleneksel sitogenetik yöntemlerinde karşılaşılan zorlukların ortadan kalkmasına ve güvenilir sonuçlara ulaşmaya olanak sağlamaktadır. Ancak sitogenetik yöntemlerde kaliteli metafaz

elde edildiğinde tüm kromozomlar sayısal ve yapısal olarak aynı anda incelenebilmekte iken FISH tekniği ile her bir yapısal anomali için farklı prob kullanılmaktadır (Rowland 2002). In situ hibridizasyonda sistemin duyarlılığı hedef dokudaki hücrelerin temiz ve tek katlı olmasının yanında görüntüleme tekniği ve probun özelliklerine de bağlıdır.

1.4.1. FISH Tekniğinin Lösemilerde Sayısal Anomalilere Uygulanması

FISH tekniğinin güvenilirliği birçok çalışmayla onaylanmıştır. Nordgen ve ark (2001), 22 ALL'li çocuk hastaya ait kemik iliği örnekleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada; BCR/ABL ve TEL/AML1 probları kullanılarak FISH tekniği uygulanmıştır. Daha önce klasik sitogenetik yöntemler ile herhangi bir kromozom anomalisi belirlenemeyen 10 hastada (%45) anomali bulmuşlardır. Altı hastada yapısal değişiklikler ve spesifik gen düzenlemesi saptamışlardır.

ALL tedavisi gören çocuklarda yapılan bir diğer çalışmada ise kromozomal anomolileri belirlemek için; G-bantlama, spectral karyotipleme (SKY) ve BCR/ABL, TEL/AML1 yeniden düzenleme probları kullanılarak FISH yöntemi uygulanmıştır. G-bantlama tekniğinin uygulanmasında hastaların %60'ında yapısal değişiklik saptamışlardır. FISH tekniği kullandıklarında ise hastaların %80'inde yapısal değişikliklere rastlamışlardır (Nordgren ve ark 2002). Bu çalışmalarda normal karyotipleme ile belirlenemeyen kromozomal anomaliler FISH yöntemi ile ortaya konmuştur. Yapılan bu çalışmalarda göstermektedir ki; FISH tekniği ALL'deki kromozomal yapısal ve sayısal düzensizliklerin belirlenmesinde oldukça önemli bir tekniktir.

Biz de bu çalışmada sitogenetikde karyotiplendirme yapılamayan 30 ALL'li hastada FISH tekniğini kullanarak bazı kromozomlardaki sayısal anomalileri belirlemeyi amaçladık. Bütçenin kısıtlı olması ve FISH tekniğinde kullanılan probların maliyetinin yüksek olması sebebi ile sınırlı sayıda kromozom incelenmiştir.

Literatürde ALL hastalarında görülen sayısal kromozom anomalilerinde bazı kromozomların kayıp ve kazanımlarına diğerlerinden daha sık rastlanmaktadır. Kazanımları en sık görülen kromozomlar: Kromozom 4, 5, 6, 8, 10, 14, 17, 21 ve X kromozomunun kazanımlarıdır (Ceppi ve ark 2009, Gmidine ve ark 2008, Hamouda 2007, .Heerema ve ark 2007, Sutceliffe ve ark 2005). Biz mevcut çalışmamızda bu kromozomlardan kromozom 8, 10, 17 ve X kromozomlarındaki sayısal değişiklikleri incelemeyi amaçladık. Bu kazanımların yanı sıra literatürde kayıplarına sık rastlanan kromozomlar, 1, 5, 6, 7, 10, 11, 18, 19, 21, 22

ve X kromozolarıdır (Kwon ve ark 2009, Gmidine ve ark 2008, Harrison 2002). Biz bu kromozomlar arasından 10, 11, 18 ve X kromozomların yanı sıra, kayıp ve kazanımına sık rastlanmayan Y kromozomunun sayısal değişimlerini, uygun FISH problarını kullanarak belirlemeye çalıştık.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamız Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında yapılmıştır. Çalışmaya başlanmadan önce Meram Tıp Fakültesi Etik Kurulundan (09.12.2009 tarih 2009-063 sayı) onay alınmıştır. Çalışmaya dahil edilen hastalar için kan örnekleri alınırken bilgilendirilmiş onamları alınmıştır.

2.1. Hasta ve Kontrol Seçimi

Bu çalışma, 2-77 yaşları arasında (ort 22.86± S.E 4.12) toplam 30 ALL hastası (18 erkek, 12 kadın) ile hiçbir şikayeti ve bulgusu olamayan 5-47 yaşları arasında (ort 22.2± S.E 2.04) toplam 10 sağlıklı birey (5 erkek, 5 kadın) üzerinde gerçekleştirildi.

Hastaların mevcut klinik bilgileri (WBC miktarı, flow sitometri ve laboratuar bulguları) kaydedildi. Hastalardan elde edilen kemik iliği ve/veya periferik kan örneğinden hücre kültürü yapıldı. Bu kültürden elde edilen hücreler ile FISH preparatları hazırlandı.

Kontrol grubunda ise; çalışmamızın sonuçlarını değerlendirirken cut off değerini oluşturmak için lösemi ve herhangi bir sitogenetik anomalisi olmayan 10 kişinin periferik kan örneklerinin aynı şekilde kültürü yapıldı ve FISH preparatları hazırlanarak incelendi.

2.2. Hücre Kültürünün Hazırlanması

a) Heparinize edilmiş kemik iliği veya periferik kan örneklerinden enjektör ucu ile hastanın lökosit sayısına göre 4ml lik vasatlara eklenir.

b) Tüpler birkaç kez ters çevirilerek karıştırılır ve 37^{o}C lik etüve konur.

c) Tüplere 24, 48 ve 72. saatinde kolşisin ilave edilip 20 dakika etüvde bekletilir. Direk kültür çalışmalarında kolşisin ilavesi çalışmadan 20 dakika önce yapılmıştır. Etüv de bekletilen tüpler 20dk.'lık süreleri sonunda 1300 rpm de 8 dakika santrifüj edilir ve süpernatant atılır.

d) Önceden 37^{o}C'ye ısıtılmış hipotonik (0,075 M lık KCI) solüsyonundan vorteksle karıştırılarak tüplere 5 ml eklenir ve 37^{o}C lik etüvde 30 dakika bekletilir. 1300 rpm de 8 dakika santrifüj edilir ve süpernatant atılır.

e) Tüplere 5 ml fiksatif (3:1 methanol/asetikasit) ilave edilir. 1300 rpm de 8 dakika santrifüj edilir ve süpernatant atılır. Bu işlem 3 defa tekrarlanır.

f) Son santrifüj işleminden sonra süpernatant atılır sonra pelet süspansiyon haline getirilerek hemen damlatılır yada daha sonra damlatmak için $+4^0$ C de bekletilir.

2.3. FISH Preparatlarının Hazırlanması

a) Kültür sonrası elde edilen solüsyon lamlara damlatılır ve birkaç saat kurumaya bırakılır.

Bundan sonraki aşamalar karanlık ortamda uygulanır.

b) Kuruyan preparatlar ışık mikroskobunda incelenerek probu ilave etmeye uygun bölge seçilir.

c) Lamel üzerine damlatılan prob lam üzerinde işaretlenmiş bölgeye yapıştırılır. Daha sonra lamelin kenarları su girmemesi ve probun uygun bölge dışına çıkmaması için lamelin etrafı yapıştırıcı ile kaplanır.

d) Preparatlar denatürasyon için su banyosunda 6 dakika 70^oC de bekletilir.

e) 70^oC den alınan preparatlar 37^oC lik su banyosunda hibridizasyon için bir gece bekletilir.

f) Hibridizasyonu tamamlanan preparatlar su banyosundan çıkarılarak lamellerin etrafındaki yapıştırıcı dikkatlice temizlenir.

g) Preparatlar 37^oC deki 2XSSC solüsyonunda hafifce karıştırılarak lamellerden uzaklaştırılır.

h) Lamellerden uzaklaştırılan preparatlar 5 dakika 37^oC 2XSSC de yıkanır. Bu yıkama işlemi iki kez tekrarlanır.

ı) Preparatlar daha sonra 2 defa da 5 dakika 37^oC de 4XSSC de yıkanır. Bu yıkama işlemi iki kez tekrarlanır.

i) Preparatlar son yıkamadan sonra DAPI damlatılmış lameller ile kapatılır. İnceleme aşamasına kadar -20^oC de karanlıkta bekletilir.

2.4. Preparatların Mikroskopta İncelenmesi

Preparatlar floresan mikroskobunda uygun filtrelerde incelendi. Floresan mikroskobuna bağlı bilgisayar sistemi ile sinyaller değerlendirildi. Kamera aracılığı ile interfaz ve metafaz

plaklarının foroğrafı çekildi. Her bir preparat için hücre yoğunluğuna göre 200-1000 arasında hücre sayıldı.

2.5. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değeri belirlemek için; hasta grubu ve kontrol grubunun karşılaştırılması ile yapılan Mann Whitney U Testi sonucuna göre çalışma sonuçların anlamlılıkları belirlendi. Her bir anomaliye göre, söz konusu değer 0,05'den küçük ise kontrol ve hasta grubu arasındaki ilişki $p<0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlıdır.

2.6. Kullanılan Solüsyonlar

0.075 M Hipotonik solüsyonu

0,56 gr KCl

100 ml distile su

Fiksatif: 3:1 oranında Metanol: Asetik asit

20XSSC Solüsyonu

175,3 gr. NaCI (3M)

88,4 gr. Tri Sodyum Sitrat (0.3M)

1000ml Distile su

HCI ile pH 7.0 a ayarlanır.

2XSSC Solüsyonu

10ml 20XSCC

90ml Distile Su

4XSSC Solüsyonu

20ml 20XSSC

80ml Distile Su

3. BULGULAR

Çalışma grubumuz ALL'li 30 hasta (18 erkek, 12 bayan) birey ve hematolojik olarak herhangi bir hastalığı olmayan sitogenetik olarak normal olan 10 sağlıklı (5 erkek, 5 bayan) bireyden oluşmaktadır. Hasta grubunun yaş ortalamasının 22.86± S.E 4.12, kontrol grubunun yaş ortalamasının ise ort 22.2± S.E 2.04 olduğu görüldü. Hasta grubuna ait klinik ve laboratuar bulguları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Hastaların klinik ve laboratuar bulguları.

Vaka No	Yaş	Cinsiyet	WBC mik.	İmmünofenotip
1	2	K	*	*
2	73	E	1300	B hücreli
3	9	E	4800	*
4	14	K	28000	Pre B hücreli
5	4	K	77300	Pre B hücreli
6	24	E	32950	*
7	77	E	115300	AML M0-M1
8	21	K	400	Pre B hücreli
9	21	K	2400	Pre B hücreli
10	43	E	88600	Pre-B hücreli
11	79	E	1400	AML M0-M1
12	18	E	2400	*
13	34	E	1000	T-hücreli
14	6	K	100700	Pre-B hücreli
15	9	E	14900	T-hücreli
16	5	E	181500	T hücreli
17	18	E	85500	B hücreli
18	2	K	38500	Pre B hücreli
19	15	E	17400	T-hücreli
20	10	E	82160	T hücreli
21	11	K	2.700	Pre B hücreli
22	46	K	3.200	Bifenotipik lösemi
23	40	K	5600	T hücreli
24	9	E	4610	Pre-B hücreli
25	3	E	6800	Pre-B hücreli
26	6	K	3500	Pre B hücreli
27	13	E	7330	*
28	5	E	180	Pre B hücreli
29	51	K	43370	Pre-B hücreli
30	18	E	3300	Pre-B hücreli

*: Bilgiler hastanın takip edildiği klinikten temin edilememiştir.

Mevcut çalışmada FISH analizi için kromozom X, Y, 8, 10, 11, 17 ve 18 için alfa satellit DNA probları kullanıldı. Her prob için 0 (hiç sinyal olamayan), 1, 2, 3 ve 4 sinyalli hücreler kaydedildi. FISH analizi yapılan 30 hasta ve 10 sağlıklı bireye ait sinyal sayı ve oranları listelendi (Çizelge 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15). **Çizelge 3.2.** Kromozom 8 spesifik sentromerik alfa satellit DNA probu ile vakalardan elde edilen FISH sinyallerinin dağılım ve yüzdesi

Vaka No	Cinsiyet	1 (%)	2 (%)	3 (%)	4 (%)
1	K	**52 (7.72)**	600 (89.02)	**22 (3.26)**	0
2	E	**24 (4.80)**	475 (95.00)	**1 (0.20)**	0
3	E	**40 (9.88)**	345 (85.19)	**20 (4.94)**	0
4	K	**35 (8.75)**	352 (88.00)	**11 (2.75)**	**2 (0.50)**
5	K	**37 (7.40)**	457 (91.40)	**6 (1.20)**	0
6	E	**29 (5.80)**	432 (86.40)	**39 (7.80)**	0
7	E	**31 (6.20)**	446 (89.00)	**23 (4.60)**	0
8	K	**14 (14.00)**	86 (86.00)	0	0
9	K	**51 (15.00)**	289 (85.00)	0	0
10	E	**43 (13.44)**	263 (82.19)	**14 (4.38)**	0
11	E	**10 (8.33)**	100 (83.33)	**10 (8.33)**	0
12	E	**39 (7.80)**	433 (86.60)	**24 (4.80)**	**4 (0.80)**
13	E	12 (3.31)	341 (93.94)	**10 (2.75)**	0
14	K	5 (1.11)	74 (16.44)	**358 (79.56)**	**13 (2.89)**
15	E	13 (2.35)	440 (79.42)	**34 (6.14)**	**67 (12.09)**
16	E	**29 (5.47)**	490 (92.45)	**11 (2.08)**	0
17	E	**41 (7.11)**	500 (86.66)	**36 (6.24)**	0
18	K	**58 (9.39)**	547 (88.51)	**11 (1.78)**	**2 (0.32)**
19	E	**28 (9.33)**	267 (89.00)	**4 (1.33)**	**1 (0.33)**
20	E	6 (1.20)	479 (95.80)	**15 (3.00)**	0
21	K	19 (3.80)	477 (95.40)	**4 (0.80)**	0
22	K	0	99 (99.00)	**1 (1.00)**	0
23	K	**9 (5.14)**	166 (94.86)	0	0
24	E	**25 (5.00)**	464 (92.80)	**11 (2.20)**	0
25	E	**35 (7.00)**	453 (90.60)	**11 (2.20)**	**1 (0.20)**
26	K	**23 (4.60)**	464 (92.80)	**13 (2.60)**	0
27	K	**25 (5.00)**	472 (94.40)	**3 (0.60)**	0
28	E	4 (4.04)	94 (94.95)	**1 (1.01)**	0
29	E	12 (2.40)	390 (78.00)	**98 (19.60)**	0
30	E	13 (2.60)	481 (96.20)	**6 (1.20)**	0

Koyu yazılılar: Hasta

Çizelge 3.3. Kromozom 10 spesifik sentromerik alfa satellit DNA probu ile vakalardan elde edilen FISH sinyallerinin dağılım ve yüzdesi

Vaka No	Cinsiyet	1 (%)	2 (%)	3 (%)
1	K	**27 (8.16)**	302 (91.24)	2 (0.60)
2	E	**23 (4.48)**	466 (90.84)	**24 (4.68)**
3	E	**5 (5.00)**	95 (95.00)	0
4	K	0	100 (100.00)	0
5	K	**5 (5.00)**	91 (91.00)	**4 (4.00)**
6	E	1 (0.25)	200 (50.51)	**195 (49.24)**
7	E	10 (2.50)	390 (97.50)	0
8	K	**9 (8.26)**	100 (91.74)	0
9	K	**6 (3.33)**	174 (96.67)	0
10	E	**10 (5.00)**	175 (87.50)	**15 (7.50)**
11	E	**7 (5.93)**	111 (94.07)	0
12	E	**16 (6.40)**	234 (93.60)	0
13	E	0	100 (100.00)	0
14	K	0	100 (100.00)	0
15	E	**6 (4.29)**	117 (83.57)	**17 (12.14)**
16	E	0	300 (100,00)	0
17	E	0	150 (100.00)	0
18	K	**16 (4.02)**	382 (95.98)	0
19	E	0	100 (100.00)	0
20	E	5 (1.00)	493 (98.60)	2 (0.40)
21	K	3 (1.50)	197 (98.50)	0
22	K	0	150 (100.00)	0
23	K	6 (1.40)	424 (98.60)	0
24	E	9 (1.70)	500 (94.52)	**20 (3.78)**
25	E	**10 (3.33)**	290 (96.67)	0
26	K	**31 (8.73)**	323 (90.99)	1 (0.28)
27	K	3 (1.94)	100 (64.52)	**52 (33.55)**
28	E	**5 (5.00)**	95 (95.00)	0
29	E	11 (2.75)	365 (91.25)	**24 (6.00)**
30	E	**17 (3.43)**	464 (93.74)	**14 (2.83)**

Koyu yazılılar: Hasta

Çizelge 3.4. Kromozom 11 spesifik sentromerik alfa satellit DNA probu ile vakalardan elde edilen FISH sinyallerinin dağılım ve yüzdesi.

Vaka No	Cinsiyet	1 (%)	2 (%)	3 (%)
1	K	0	200 (100.00)	0
2	E	**18 (8.61)**	190 (90.91)	1 (0.48)
3	E	**13 (8.67)**	137 (91.33)	0
4	K	10 (5.00)	190 (95.00)	0
5	K	**16 (7.41)**	200 (92.59)	0
6	E	**17 (7.83)**	200 (92.17)	0
7	E	12 (6.00)	188 (94.00)	0
8	K	**12 (9.16)**	119 (90.84)	0
9	K	**9 (8.04)**	103 (91.96)	0
10	E	0	200 (100.00)	0
11	E	**8 (7.77)**	95 (92.23)	0
12	E	16 (5.97)	250 (93.28)	2 (0.75)
13	E	**16 (12.21)**	115 (87.79)	0
14	K	15 (5.73)	245 (93.51)	2 (0.76)
15	E	11 (4.44)	224 (90.32)	4 (1.61)
16	E	0	250 (100.00)	0
17	E	**24 (7.32)**	300 (91.46)	4 (1.22)
18	K	14 (6.45)	200 (92.17)	3 (1.38)
19	E	**12 (11.76)**	90 (88.24)	0
20	E	4 (2.37)	165 (97.63)	0
21	K	2 (1.00)	198 (99.00)	0
22	K	17 (6.20)	250 (91.24)	**7 (2.55)**
23	K	**56 (20.29)**	200 (72.46)	**20 (7.25)**
24	E	17 (6.42)	248 (93.58)	0
25	E	**28 (11.20)**	222 (88.80)	0
26	K	**29 (9.67)**	271 (90.33)	0
27	K	**27 (9.00)**	272 (90.67)	1 (0.33)
28	E	**12 (10.91)**	98 (89.09)	0
29	E	**11 (7.59)**	134 (92.41)	0
30	E	8 (2.67)	287 (95.67)	5 (1.67)

Koyu yazılılar: Hasta

Çizelge 3.5. Kromozom 17 spesifik sentromerik alfa satellit DNA probu ile vakalardan elde edilen FISH sinyallerinin dağılım ve yüzdesi.

Vaka No	Cinsiyet	1 (%)	2 (%)	3 (%)
1	K	**69 (10.78)**	569 (88.91)	2 (0.31)
2	E	**45 (9.00)**	443 (88.60)	**12 (2.40)**
3	E	**19 (9.50)**	181 (90.50)	0
4	K	**23 (15.33)**	127 (84.67)	0
5	K	**27 (10.80)**	223 (89.20)	0
6	E	**43 (14.33)**	257 (85.67)	0
7	E	**23 (11.50)**	177 (88.50)	0
8	K	**17 (8.21)**	189 (91.30)	1 (0.48)
9	K	**10 (9.09)**	97 (88.18)	**3 (2.73)**
10	E	**43 (14.33)**	257 (85.67)	0
11	E	1 (1.39)	71 (98.61)	0
12	E	**32 (6.40)**	468 (93.60)	0
13	E	2 (2.00)	98 (98.00)	0
14	K	3 (3.00)	90 (90.00)	**7 (7.00)**
15	E	6 (3.00)	194 (97.00)	0
16	E	**43 (8.60)**	457 (91.40)	0
17	E	**37 (12.13)**	268 (87.87)	0
18	K	**43 (8.60)**	457 (91.40)	0
19	E	**17 (8.46)**	184 (91.54)	0
20	E	20 (4.00)	480 (96.00)	0
21	K	10 (2.50)	390 (97.50)	0
22	K	1 (0.99)	100 (99.01)	0
23	K	21 (5.83)	337 (93.61)	2 (0.56)
24	E	**36 (7.20)**	448 (89.60)	**16 (3.20)**
25	E	**40 (8.00)**	454 (90.80)	**6 (1.20)**
26	K	14 (2.80)	452 (90.40)	**34 (6.80)**
27	K	13 (4.13)	301 (95.56)	1 (0.32)
28	E	**9 (7.26)**	100 (80.65)	**15 (12.10)**
29	E	20 (5.71)	300 (85.71)	**30 (8.57)**
30	E	4 (1.95)	200 (97.56)	1 (0.49)

Koyu yazılılar: Hasta

Çizelge 3.6. Kromozom 18 spesifik sentromerik alfa satellit DNA probu ile vakalardan elde edilen FISH sinyallerinin dağılım ve yüzdesi.

Vaka No	Cinsiyet	1 (%)	2 (%)
1	K	0	120 (100.00)
2	E	0	100 (100.00)
3	E	0	150 (100.00)
4	K	0	200 (100.00)
5	K	0	200 (100.00)
6	E	**15 (7.50)**	185 (92.50)
7	E	0	200 (100.00)
8	K	3 (2.29)	128 (97.71)
9	K	0	109 (100.00)
10	E	0	200 (100.00)
11	E	0	100 (100.00)
12	E	10 (3.85)	250 (96.15)
13	E	2 (1.64)	120 (98.36)
14	K	10 (4.00)	240 (96.00)
15	E	11 (4.74)	221 (95.26)
16	E	**13 (6.10)**	200 (93.90)
17	E	**14 (6.54)**	200 (93.46)
18	K	**15 (7.50)**	185 (92.50)
19	E	**6 (5.88)**	96 (94.12)
20	E	5 (3.40)	142 (96.60)
21	K	**11 (5.21)**	200 (94.79)
22	K	**30 (15.00)**	170 (85.00)
23	K	0	200 (100.00)
24	E	**17 (6.46)**	246 (93.54)
25	E	1 (0.71)	140 (99.29)
26	K	10 (4.00)	240 (96.00)
27	K	**28 (9.72)**	260 (90.28)
28	E	**5 (5.00)**	95 (95.00)
29	E	0	110 (100.00)
30	E	10 (3.03)	320 (96.97)

Koyu yazılılar: Hasta

Çizelge 3.7. Kromozom X spesifik sentromerik alfa satellit DNA probu ile vakalardan elde edilen FISH sinyallerinin dağılım ve yüzdesi.

Vaka No	Cinsiyet	0 (%)	1 (%)	2 (%)	3 (%)	4 (%)
1	K	0	**17 (13.60)**	108 (86.40)	0	0
2	E	0	199 (99.50)	**1 (0.50)**	0	0
3	E	0	155 (91.18)	**15 (8.82)**	0	0
4	K	0	3 (0.67)	388 (87.19)	**48 (10.79)**	**6 (1.35)**
5	K	0	7 (1.33)	468 (88.80)	**52 (9.87)**	0
6	E	0	468 (92.49)	**37 (7.31)**	**1 (0.20)**	0
7	E	**2 (0.45)**	428 (97.05)	**11 (2.49)**	0	0
8	K	0	**11 (4.38)**	233 (92.83)	**7 (2.79)**	0
9	K	0	**14 (7.45)**	160 (85.11)	**14 (7.25)**	0
10	E	**4 (0.88)**	431 (95.14)	**18 (3.97)**	0	0
11	E	0	204 (93.15)	**13 (5.94)**	**2 (0.91)**	0
12	E	**9 (1.90)**	424 (89.45)	**38 (8.02)**	**3 (0.63)**	0
13	E	**19 (11.38)**	143 (85.63)	**5 (2.99)**	0	0
14	K	0	10 (2.01)	116 (23.29)	**355 (71.29)**	**17 (3.41)**
15	E	0	552 (92.00)	**48 (8.00)**	0	0
16	E	0	108 (81.20)	**25 (18.80)**	0	0
17	E	0	140 (95.24)	**7 (4.76)**	0	0
18	K	0	**95 (10.81)**	773 (87.94)	**11 (1.25)**	0
19	E	0	459 (98.29)	**7 (1.50)**	**1 (0.21)**	0
20	E	**2 (0.36)**	478 (86.44)	**68 (12.30)**	**5 (0.90)**	0
21	K	0	**73 (10.55)**	604 (87.28)	**15 (2.17)**	0
22	K	0	**25 (4.93)**	477 (94.08)	**5 (0.99)**	0
23	K	0	**36 (4.60)**	718 (91.82)	**22 (2.81)**	**6 (0.77)**
24	E	**5 (0.81)**	598 (96.45)	**17 (2.74)**	0	0
25	E	**24 (3.07)**	712 (91.17)	**45 (5.76)**	0	0
26	K	0	16 (2.27)	680 (96.59)	**8 (1.14)**	0
27	K	0	16 (3.17)	415 (82.34)	**63 (12.50)**	**10 (1.98)**
28	E	0	81 (72.32)	**29 (25.89)**	**2 (1.79)**	0
29	E	**3 (0.58)**	465 (90.47)	**43 (8.37)**	**3 (0.58)**	0
30	E	**3 (0.28)**	994 (94.40)	**56 (5.32)**	0	0

Koyu yazılılar: Hasta

Çizelge 3.8. Kromozom Y spesifik sentromerik alfa satellit DNA probu ile vakalardan elde edilen FISH sinyallerinin dağılım ve yüzdesi.

Vaka No	Cinsiyet	0 (%)	1 (%)	2 (%)
2	E	0	200 (100.00)	0
3	E	0	201 (99.01)	**2 (0.99)**
6	E	**2 (0.40)**	497 (98.22)	**7 (1.38)**
7	E	**1 (0.23)**	433 (97.96)	**8 (1.81)**
10	E	0	428 (94.48)	**25 (5.52)**
11	E	0	218 (99.54)	**1 (0.46)**
12	E	**6 (1.05)**	548 (95.47)	**20 (3.48)**
13	E	**1 (0.60)**	162 (97.01)	**4 (2.40)**
15	E	0	549 (91.50)	**51 (8.50)**
16	E	0	127 (100.00)	0
17	E	0	148 (100.00)	0
19	E	0	457 (97.86)	**10 (2.14)**
20	E	0	548 (99.10)	**5 (0.90)**
24	E	**2 (0.32)**	613 (98.87)	**5 (0.81)**
25	E	**3 (0.38)**	774 (99.10)	**4 (0.51)**
28	E	0	104 (92.86)	**8 (7.14)**
29	E	**6 (1.17)**	494 (96.11)	**14 (2.72)**
30	E	**2 (0.19)**	1039 (98.67)	**12 (1.14)**

Koyu yazılılar: Hasta

Çizelge 3.9. Kromozom 8 spesifik sentromerik alfa satellit DNA probu ile kontrol grubundan elde edilen FISH sinyallerinin dağılım ve yüzdesi

Vaka No	Cinsiyet	1 (%)	2 (%)	3 (%)
1	K	0	100 (100)	0
2	K	0	100 (100)	0
3	K	2 (2)	98 (98)	0
4	K	0	100 (100)	0
5	K	2 (2)	98 (98)	0
6	E	1 (1)	99 (99)	0
7	E	3 (3)	97 (97)	0
8	E	0	100 (100)	0
9	E	0	100 (100)	0
10	E	2 (2)	98 (98)	0

Çizelge 3.10. Kromozom 10 spesifik sentromerik alfa satellit DNA probu ile kontrol grubundan elde edilen FISH sinyallerinin dağılım ve yüzdesi

Vaka No	Cinsiyet	1 (%)	2 (%)	3 (%)
1	K	0	100 (100)	0
2	K	0	100 (100)	0
3	K	0	99 (99)	1 (1)
4	K	2 (2)	98 (98)	0
5	K	2 (2)	98 (98)	0
6	E	1 (1)	99 (99)	0
7	E	0	100 (100)	0
8	E	0	100 (100)	0
9	E	1 (1)	99 (99)	0
10	E	0	100 (100)	0

Çizelge 3.11. Kromozom 11 spesifik sentromerik alfa satellit DNA probu ile kontrol grubundan elde edilen FISH sinyallerinin dağılım ve yüzdesi

Vaka No	Cinsiyet	1 (%)	2 (%)	3 (%)
1	K	2(2)	98 (98)	0
2	K	2 (2)	97 (97)	1 (1)
3	K	0	100 (100)	0
4	K	4 (4)	94 (94)	2 (2)
5	K	5 (5)	95 (95)	0
6	E	1 (1)	99 (99)	0
7	E	0	100 (100)	0
8	E	3 (3)	97 (97)	0
9	E	1 (1)	99 (99)	0
10	E	1 (1)	98 (98)	1 (1)

Çizelge 3.12. Kromozom 17 spesifik sentromerik alfa satellit DNA probu ile kontrol grubundan elde edilen FISH sinyallerinin dağılım ve yüzdesi

Vaka No	Cinsiyet	1 (%)	2 (%)	3 (%)
1	K	0	100 (100)	0
2	K	0	100 (100)	0
3	K	1 (1)	98 (98)	1 (1)
4	K	3 (3)	97 (97)	0
5	K	2 (2)	98 (98)	0
6	E	3 (3)	97 (97)	0
7	E	4 (4)	96 (96)	0
8	E	0	100 (100)	0
9	E	2 (2)	98 (98)	0
10	E	2 (2)	98 (98)	0

Çizelge 3.13. Kromozom 18 spesifik sentromerik alfa satellit DNA probu ile kontrol grubundan elde edilen FISH sinyallerinin dağılım ve yüzdesi

Vaka No	Cinsiyet	1 (%)	2 (%)	3 (%)
1	K	3 (3)	97 (97)	0
2	K	1 (1)	99 (99)	0
3	K	2 (2)	95 (95)	3 (3)
4	K	2 (2)	98 (98)	0
5	K	1 (1)	99 (99)	0
6	E	1 (1)	99 (99)	0
7	E	1 (1)	99 (99)	0
8	E	4 (4)	96 (96)	0
9	E	1 (1)	99 (99)	0
10	E	2 (2)	98 (98)	0

Çizelge 3.14. Kromozom X spesifik sentromerik alfa satellit DNA probu ile kontrol elde edilen FISH sinyallerinin dağılım ve yüzdesi

Vaka No	**Cinsiyet**	**0 (%)**	**1 (%)**	**2 (%)**	**3 (%)**	**4 (%)**
1	K	0	2 (2)	98 (98)	0	0
2	K	0	0	96 (96)	0	0
3	K	0	2 (2)	98 (98)	0	0
4	K	0	2 (2)	98 (98)	0	0
5	K	0	0	100 (100)	0	0
6	E	0	97 (97)	3 (3)	0	0
7	E	0	98 (98)	2 (2)	0	0
8	E	0	97 (97)	3 (3)	0	0
9	E	0	98 (97)	4 (3)	0	0
10	E	0	99 (97)	5 (3)	0	0

Çizelge 3.15. Kromozom Y spesifik sentromerik alfa satellit DNA probu ile kontrol grubundan elde edilen FISH sinyallerinin dağılım ve yüzdesi

Vaka No	Cinsiyet	0 (%)	1 (1)	2 (%)
6	E	0	100 (100)	0
7	E	0	101 (100)	0
8	E	0	102 (100)	0
9	E	0	103 (100)	0
10	E	0	104 (100)	0

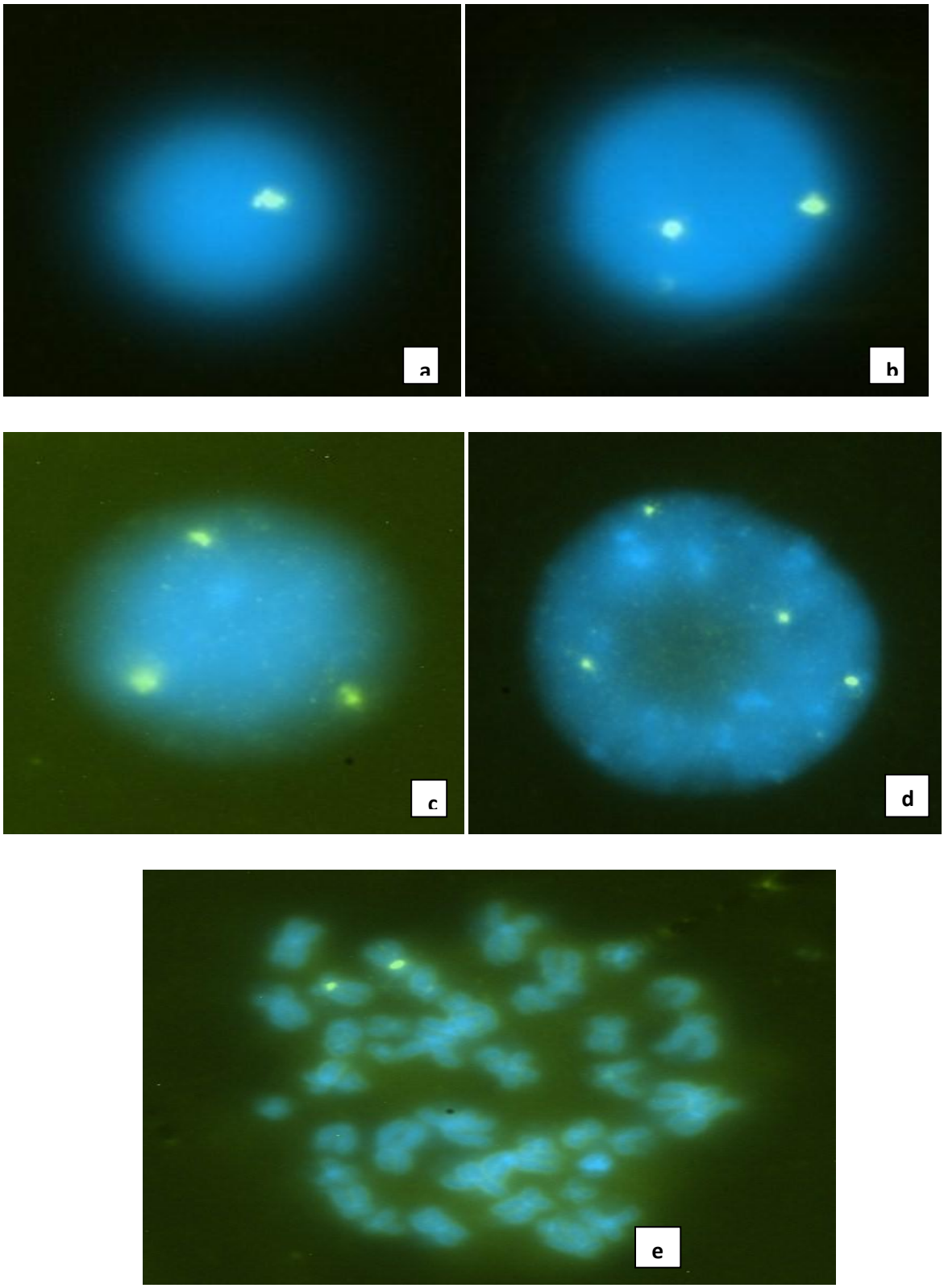
Çizelge 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13, 3.14 ve 3.15 te verilen verilere göre 10 sağlıklı bireye ait sinyal sayı ve yüzdelerine ait değerler kullanılarak ortalama (ort.) ve standart sapmaları (SS) hesaplandı.

FISH analizlerinde elde edilen sonuçların yorumlanmasında cut off değerlerinin belirlenmesi gereklidir. Mevcut çalışmada cut off değerinin belirlenmesi için ortalamaya standart sapmanın üç katı eklendi (ort. + 3 X SS). Monozomi, trizomi, tetrazomi, erkek hastalarda kromozom X ve Y için dizomidir kararı sinyal yüzdelerinin cut off değerinden büyük olması ile belirlendi. Hesaplanan Cut off değerleri çizelge 3.16 da verilmiştir.

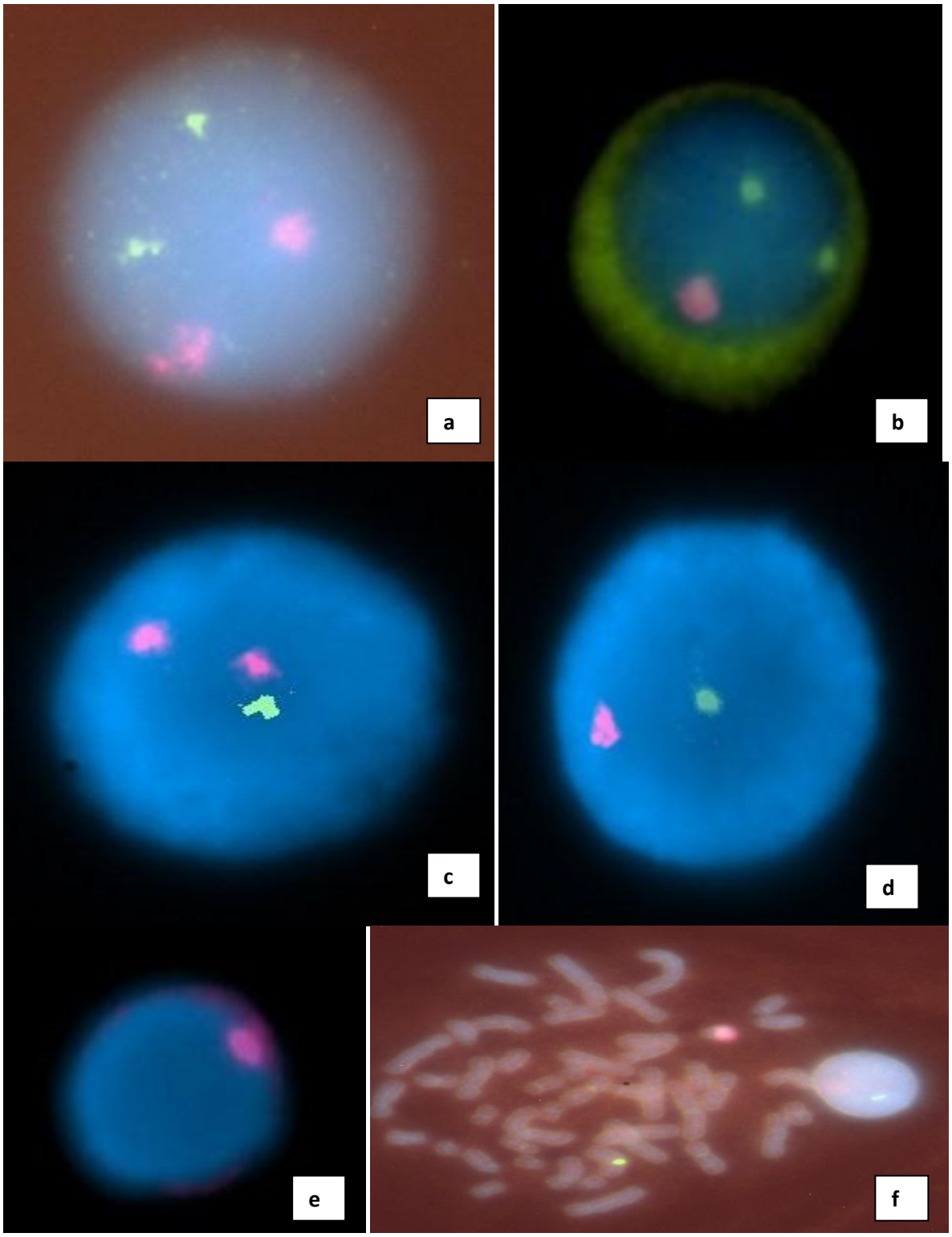
Çizelge 3.16. Problara ait cut off değerleri.

Prob		Sinyal/hücre sayısı oranları (ortalama ve standart sapma)			
		0	**1**	**3**	**4**
Sentromer 8	ort	0	1.00	0	0
	SS	0	1.16	0	0
Cut off	ort+ 3xSS	**0**	**4.48**	**0**	**0**
Sentromer 10	ort	0	0.60	0.10	0
	SS	0	0.84	0.32	0
Cut off	ort+ 3xSS	**0**	**3.12**	**1.06**	**0**
Sentromer 11	ort	0	1.90	0.40	0
	SS	0	1.66	0.70	0
Cut off	ort+ 3xSS	**0**	**6.88**	**2.50**	**0**
Sentromer 17	ort	0	1.70	0.10	0
	SS	0	1.42	0.32	0
Cut off	ort+ 3xSS	**0**	**5.96**	**1.06**	**0**
Sentromer 18	ort	0	1.80	0	0
	SS	0	1.03	0	0
Cut off	ort+ 3xSS	**0**	**4.89**	**0**	**0**

Ayrıca hastalara ait preparatlardaki mevcut sayısal anomalilerin (monozomi, dizomi, trizomi, tetrazomi) fotoğrafları çekilmiştir. Çalışmamızda görülen anomalileri göstermek amacı ile kullanılan bazı problar için fotoğraflar resim 3.1, 3.2'de verilmiştir.



Resim 3.1: Yeşil renkle işaretlenmiş kromozom 8 sentromerik prob ile hazırlanan interfaz FISH; (a) monozomi 8, (b) (normal) dizomi 8, (c) trizomi 8, (d) tetrazomi 8 ve (e) (normal) dizomi 8 hücre çekirdeği (vaka no:18).



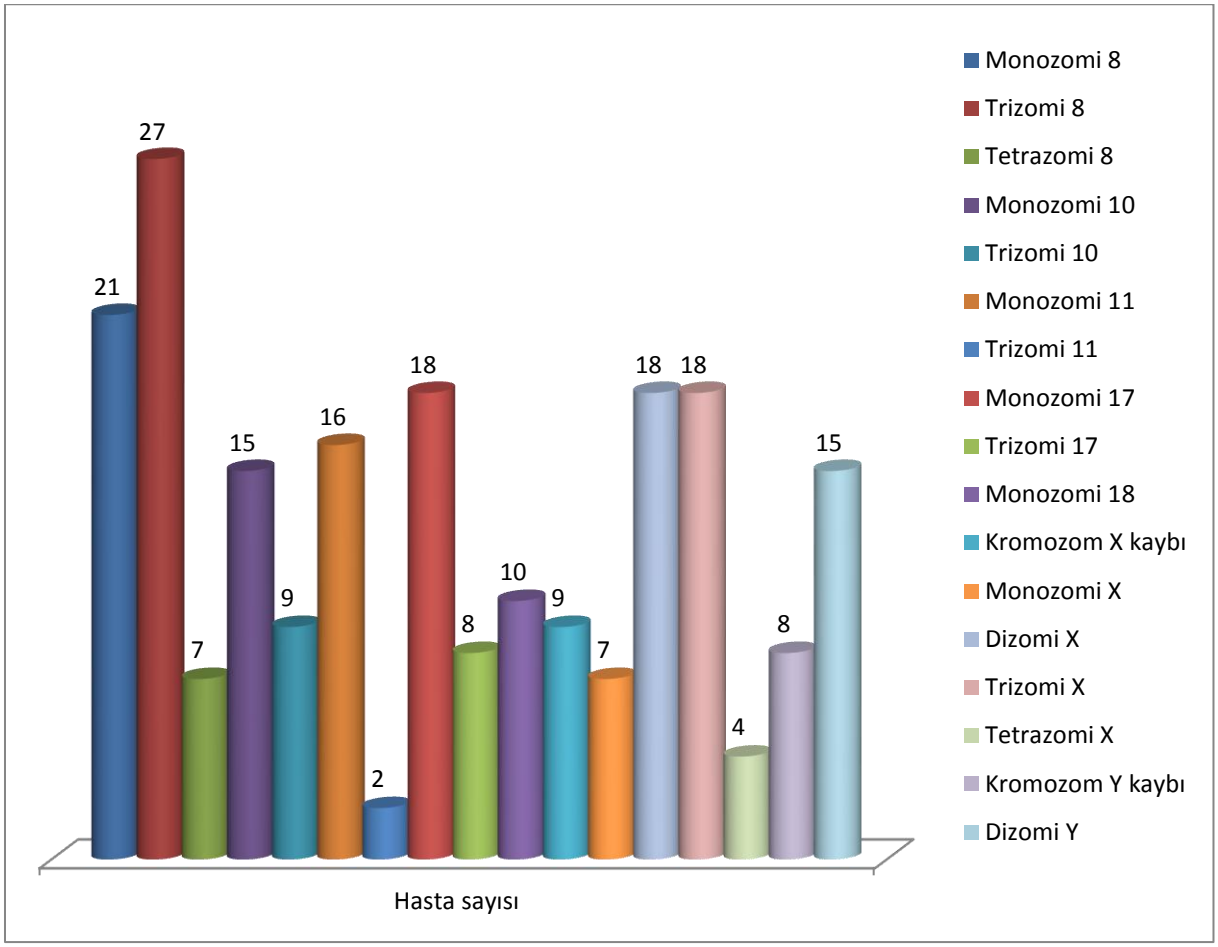
Resim 3.2: İki renkle (X yeşil, Y kırmızı) işaretlenmiş XY sentromerik prob ile hazırlanan interfaz FISH; (a) dizomi X-dizomi Y (Vaka no:15), (b) dizomi X (Vaka no:13), (c) dizomi Y (Vaka no:15), (d) normal XY (Vaka no:15) ve (e) sadece Y (kromozom X kayıp) (vaka no:13), (f) normal XY(vaka no:13) hücre çekirdeği (Erkeklerde) .

Bu çalışmada yapılan FISH incelemeleri sonucunda cut off değerlerine göre bulunan veriler şu şekildedir (Çizelge 3.17 ve Çizelge 3.18):

Çizelge 3.17. Çalışma sonucu elde edilen veriler.

Kromozom anomalisi	**Anormal hücreye sahip hasta sayısı/ Toplam hasta sayısı (yüzde).**
Monozomi 8	21/30 (%70)
Trizomi 8	27/30 (%90)
Tetrazomi 8	7/30 (%23)
Monozomi 10	15/30 (%50)
Trizomi 10	9/30 (%30)
Monozomi 11	16/30 (%53)
Trizomi 11	2/30 (%6,6)
Monozomi 17	18/30 (%60)
Trizomi 17	8/30 (%26,6)
Monozomi 18	10/30 (%33)
Kromozom X kaybı	9/30 (%30)
Monozomi X	7/30 (%23)
Dizomi X	18/30 erkek (%100)
Trizomi X	18/30 (%60)
Tetrazomi X	4/30 (%13)
Kromozom Y kaybı	8/30 (%44)
Dizomi Y	15/30 (%83)

Çizelge 3.18: Çalışma sonucu elde edilen veriler, hasta sayıları ve grafiği.



İstatistiksel değeri belirlemek için; hasta grubu ve kontrol grubunun karşılaştırılması ile yapılan Mann Whitney U Testi sonucuna göre çalışma sonuçların anlamlılıkları belirlendi. Her bir anomaliye göre, söz konusu değer 0,05'den küçük ise kontrol ve hasta grubu arasındaki ilişki $p<0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlıdır.

$p<0,05$ değerine göre hasta ve kontrol grubu arasındaki ilişki anlamlı bulunan durumlar ve p değerleri aşağıda verilmiştir (Çizelge:3.19). Çocuk ve yetişkin hastaların anomali sayıları karşılaştırılmış ancak bir fark görülmemiştir. Karşılaştırma grafiği aşağıda verilmiştir (Çizelge: 3.20).

Monozomi 8(p=0,000)

Trizomi 8(p=0,000)

Monozomi 10(p=0,006)

Monozomi 11(p=0,001)

Monozomi 17(p=0,000)

Dizomi X(p=0,002)

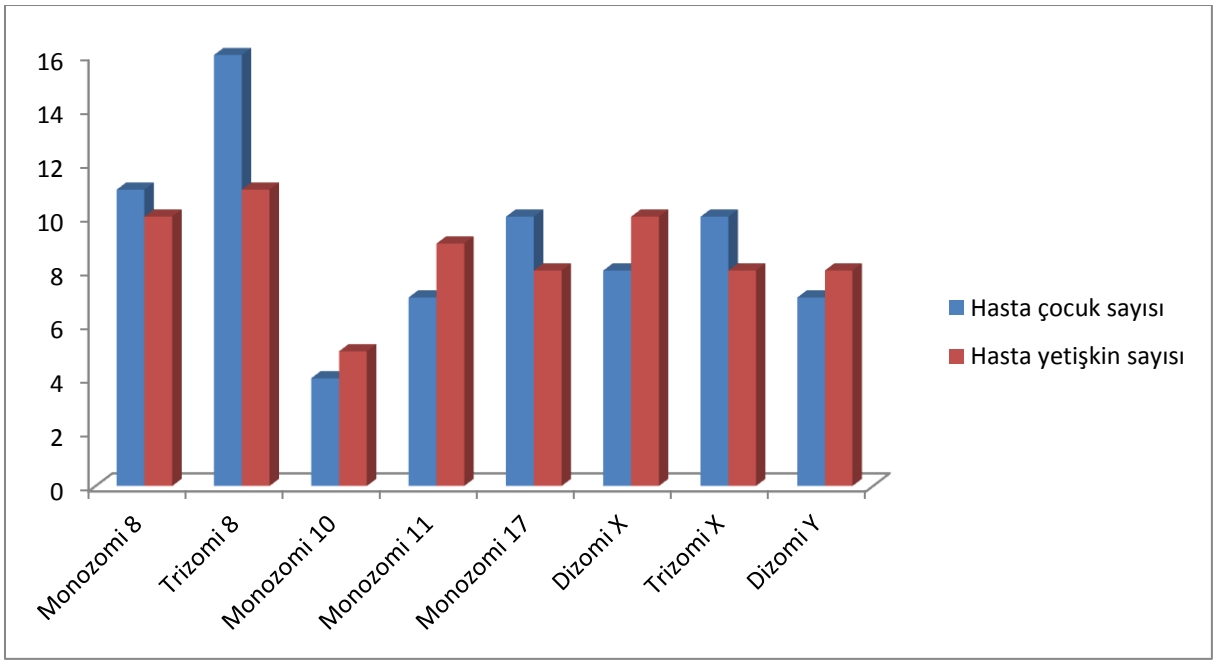
Trizomi X(p=0,005)

Dizomi Y(p=0,010)

Çizelge 3.19. Yetişkin ve çocuklarda hasta sayıları.

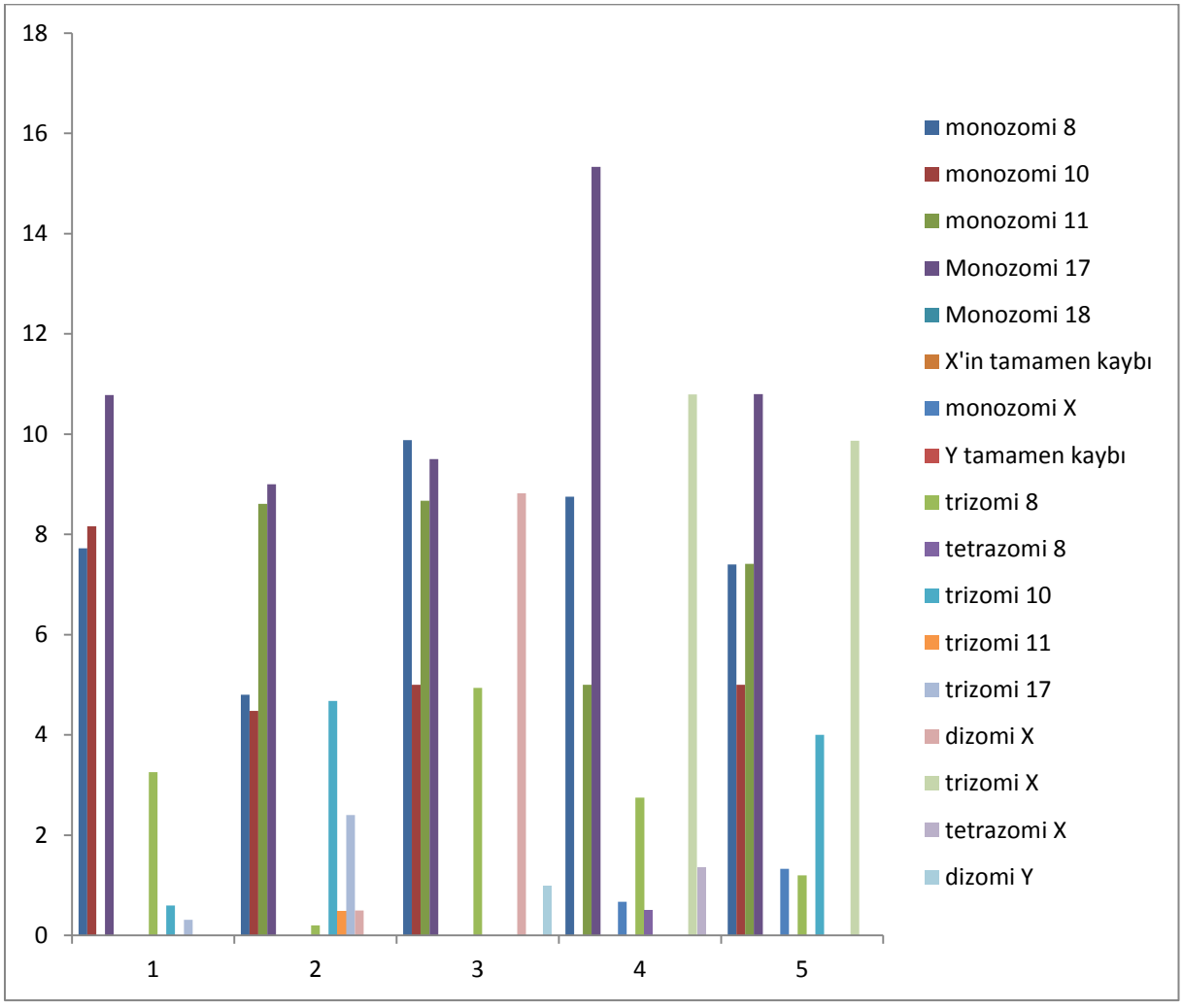
Anomali	Hasta çocuk sayısı / Toplam çocuk sayısı	Hasta yetişkin sayısı/ Toplam yetişkin sayısı
Monozomi 8	11/16	10/14
Trizomi 8	16/16	11/14
Monozomi 10	4/16	5/14
Monozomi 11	7/16	9/14
Monozomi 17	10/16	8/14
Dizomi X	8/16	10/14
Trizomi X	10/16	8/14
Dizomi Y	7/16	8/14

Çizelge 3.20. Yetişkin ve çocuk hasta sayılarının karşılaştırılması.

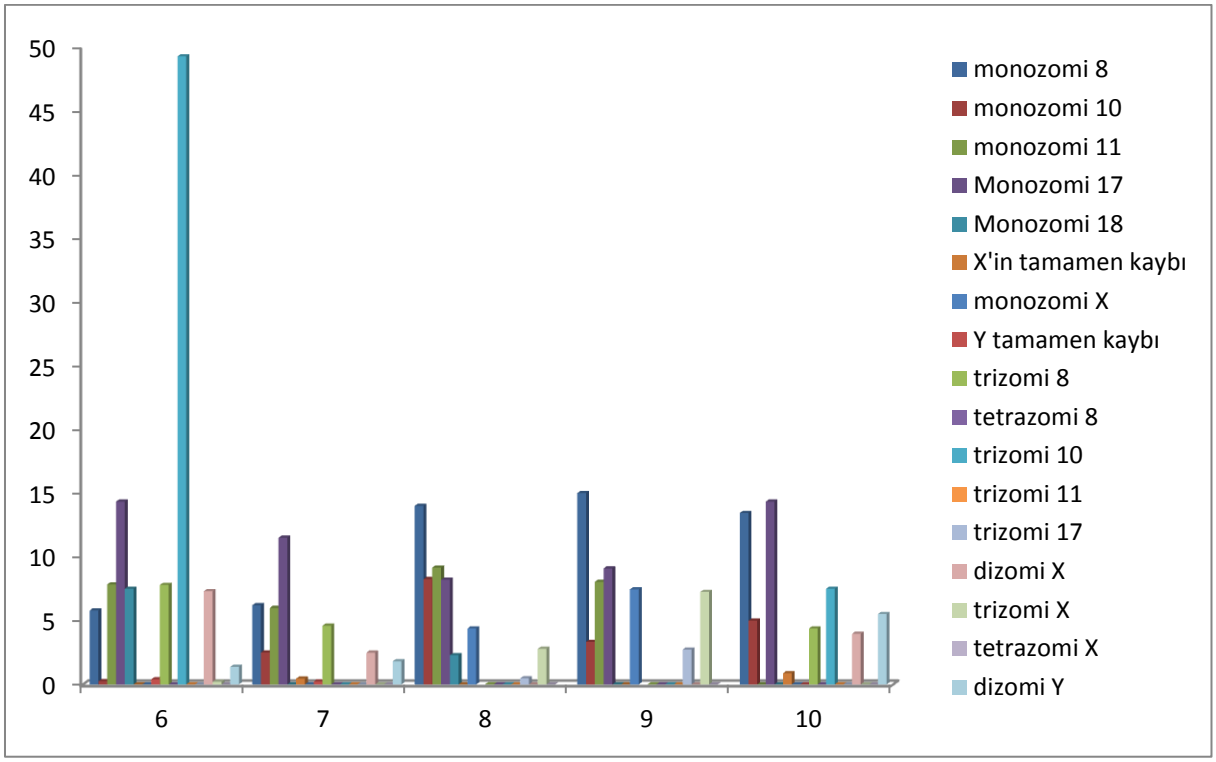


Hastalara ait verilerin toplu halde görülmesi ve değerlendirilmesi için oluşturulan grafikler aşağıda verilmiştir. Bu grafiklerden de anlaşılacağı gibi hastaların hepsinde sayısal anomali mevcuttur(Çizelge 3.21, 3.22, 3.23, 3.24, 3.25, 3.26). Örneğin çizelge 3.21'de görüldüğü gibi 1 no'lu hastayı ele alırsak: Hastada kromozom 8, 10, 17'nin monozomisi mevcuttur. Bu kromozomlar açısından değerlendirdiğimizde hastayı hipodiploidi olarak yorumlayabiliriz. Ancak aynı zamanda kromozom 8, 10, 17'nin trizomisi de görülmüştür, bu trizomiler açısından baktığımızda ise hastayı hiperdiploidi olarak yorumlayabiliriz.

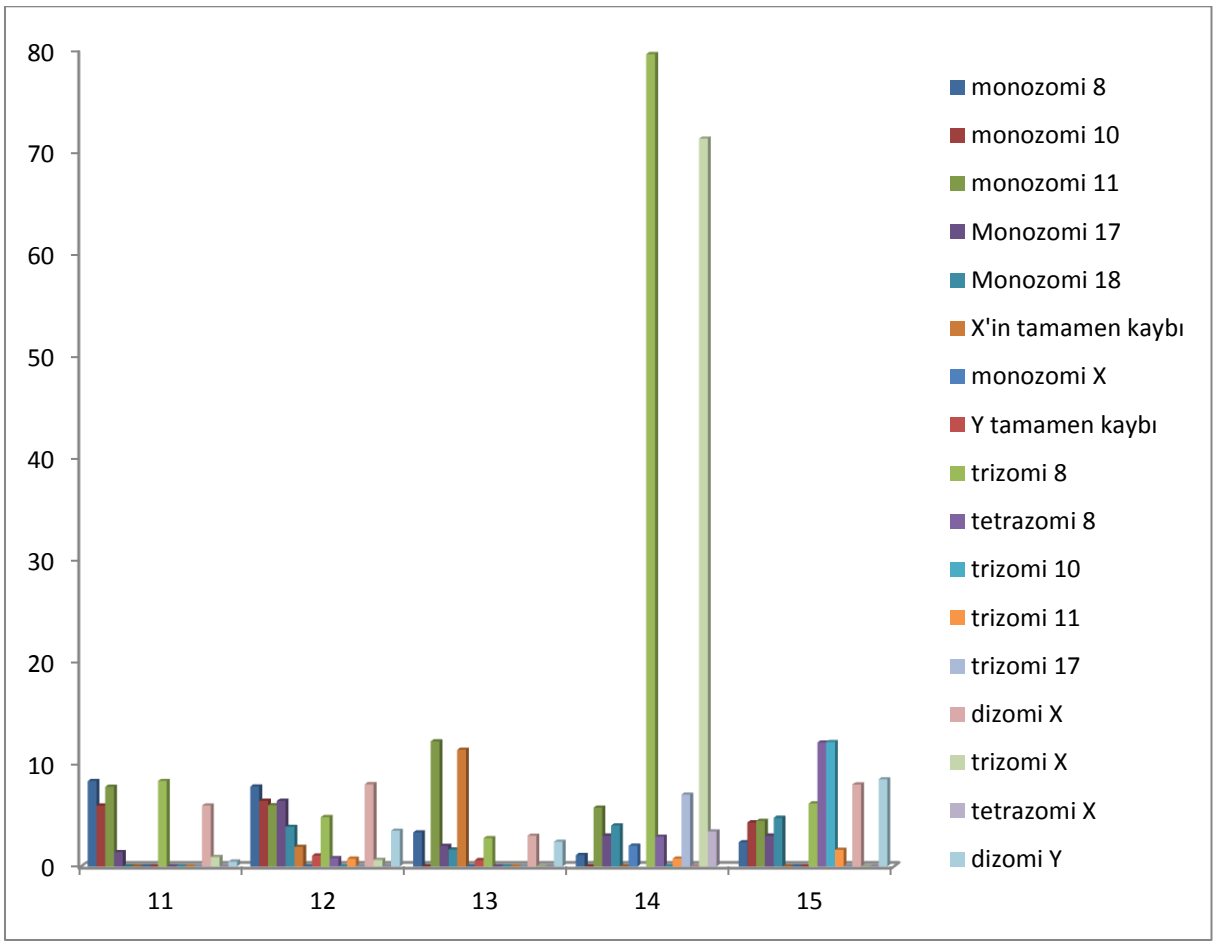
Çizelge 3.21: 1- 5 no'lu vakalarda incelenen kromozomların verileri.



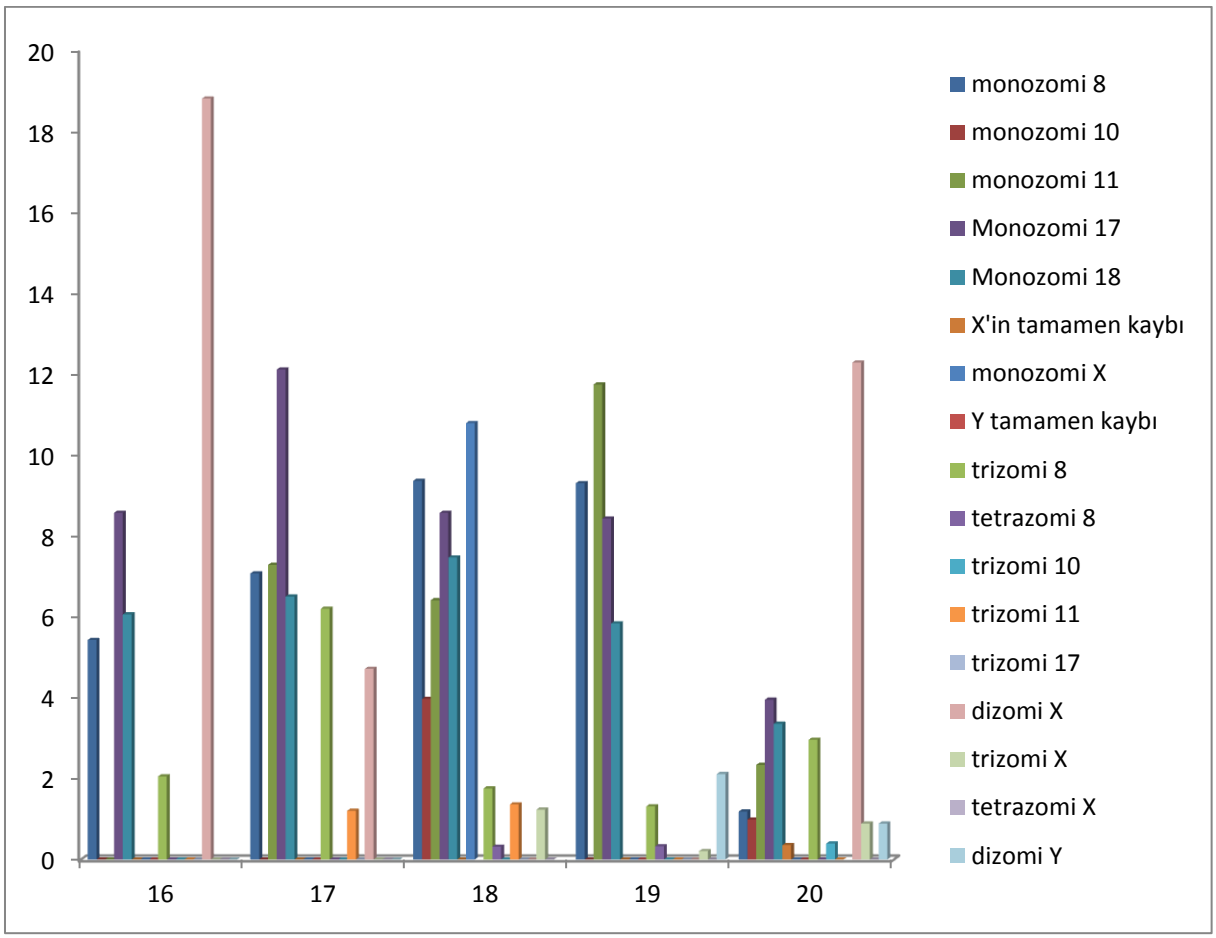
Çizelge 3.22: 6-10 no'lu vakalarda incelenen kromozomların verileri.



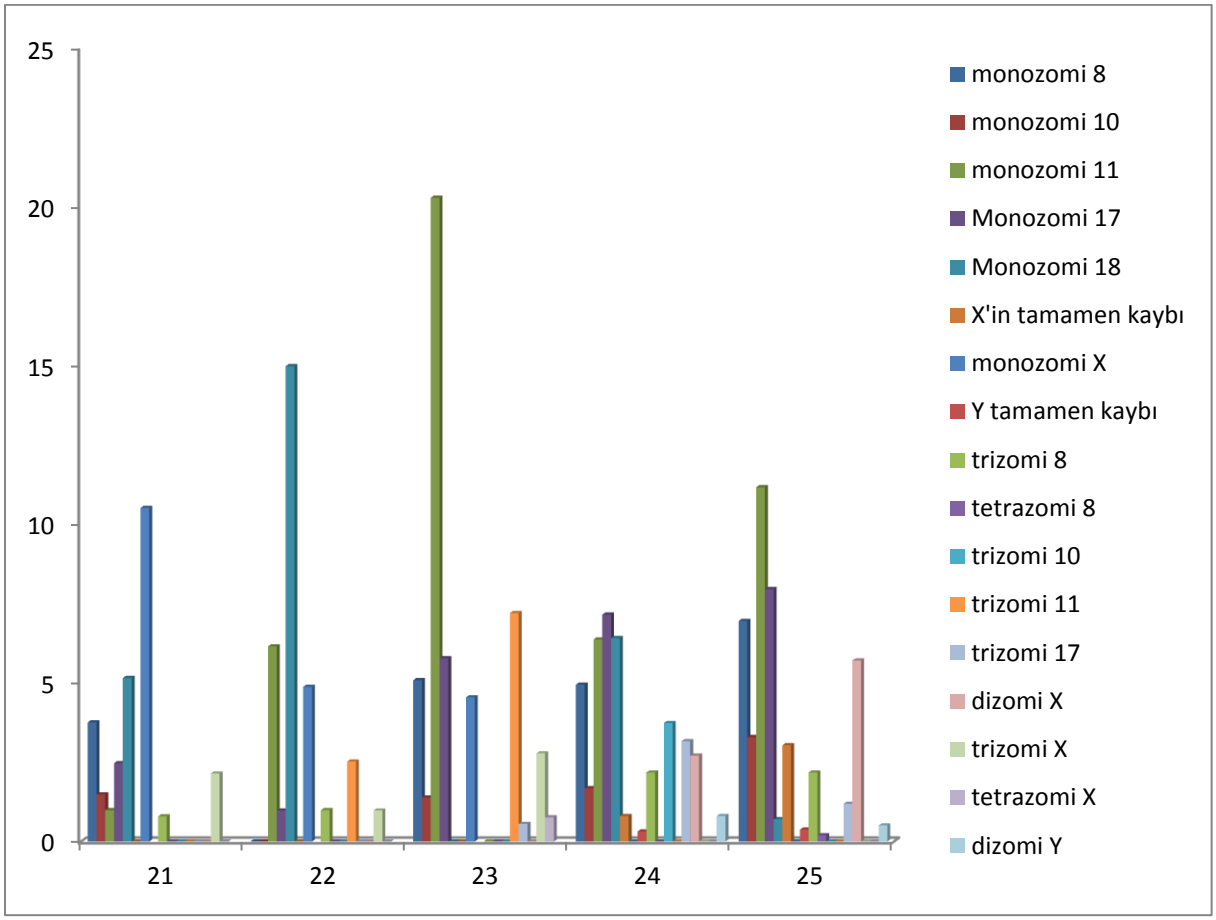
Çizelge 3.23: 11-15 no'lu vakalarda incelenen kromozomların verileri.



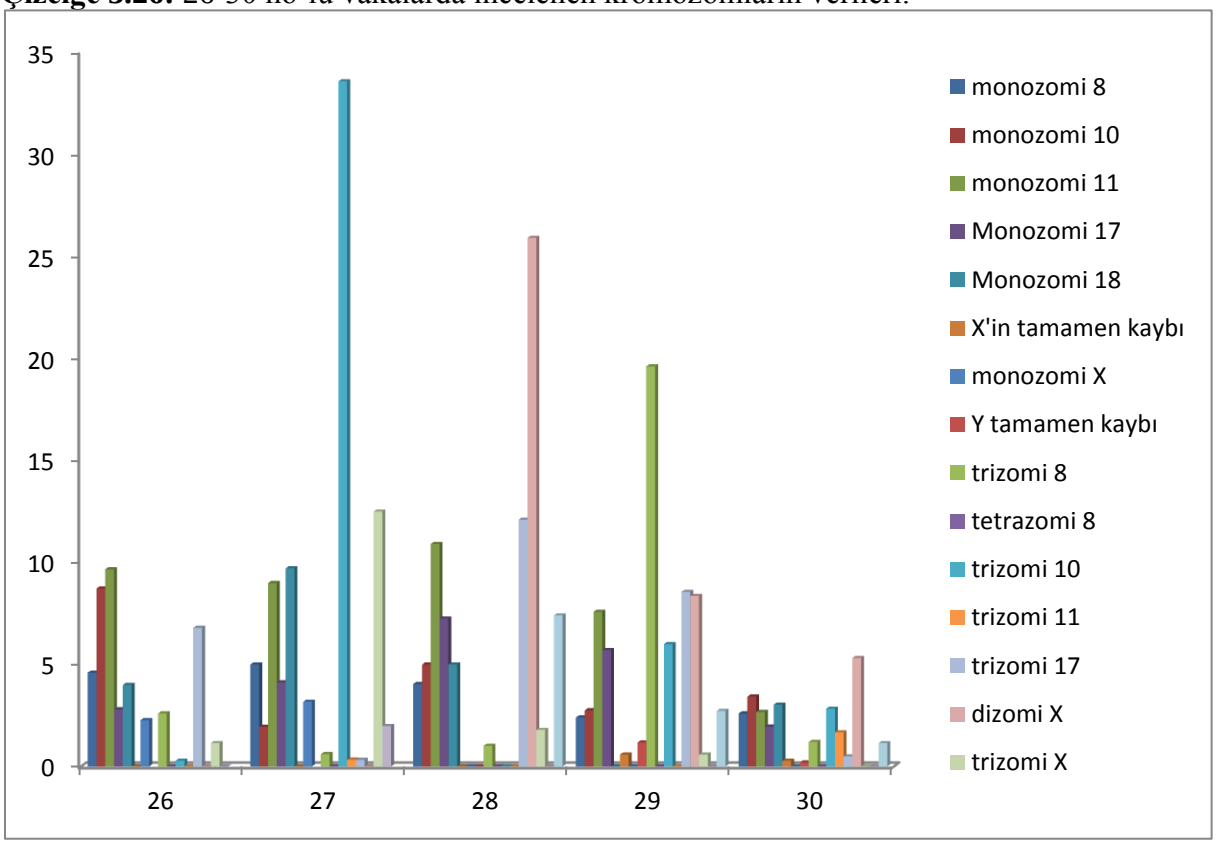
Çizelge 3.24: 16-20 no'lu vakalarda incelenen kromozomların verileri.



Çizelge 3.25: 21-25 no'lu vakalarda incelenen kromozomların verileri.



Çizelge 3.26: 26-30 no'lu vakalarda incelenen kromozomların verileri.



Gözlenen anomalilerin hepsi anlamlı bulunmamıştır. $p<0,05$ değerine göre hasta ve kontrol grubu arasındaki ilişki anlamsız bulunan gruplar aşağıda verilmiştir. Bunlar:

Tetrazomi 8 (p=0,230)

Trizomi 10(p=0,117)

Trizomi 11(p=0,937)

Tetrazomi 11 (p=0,564)

Tirizomi 17(p=0,090)

Monozomi 18(p=0,506)

Kromozom X'in tamamen kaybı(p=0,131)

Ve monozomi X(p=0,305)'dir.

4.TARTIŞMA

Yetişkinlerde lösemiler tüm kanserler arasında %3 oranında görülmektedir. Bunların içinde ise akut lösemilerin %20'sini akut lenfoblastik lösemi (ALL) oluşturur. ALL çocukluk çağının en sık görülen malignitelerinden biridir. Çocuk malignensilerinin %30'unu, çocuk lösemilerinin ise %80'ini oluşturur. Heterojen bir dağılım gösteren ALL gelişmiş ülkelerde sanayileşme ve kentleşmenin de etkisiyle daha yaygın olarak gözlenmektedir. Ülkemizde ise çocukluk çağı maligniteleri içinde sıklığı %34,9 olarak belirlenmiştir. ALL erkeklerde bayanlara oranla daha sık görülmektedir (Ceppi ve ark 2009).

ALL özellikle 2-5 yaş arası çocuklarda daha fazla görülmesine rağmen yetişkin lösemi hastalarında (%20) özellikle 50 yaş üzerinde de oldukça sık görülür (Chessels ve ark 1997, Hoelzer ve Gokbuget 2000). ALL hastalarında ileri yaş faktörünün kötü prognoz sebeplerinden biri olduğu bilinmektedir. Erken yaşlarda ise hastalarda sağ kalım oranı %70'lere kadar yükselmektedir (Usvasalo ve ark 2008). Mevcut çalışmamızda hasta bireylerin yaş ortalaması 22.86± S.E 4.12 idi. Mevcut çalışmada 18 yaş üzeri 6 hastanın survisinin kısa olması kötü prognoz sebepleri arasında yer alan yaş faktörü ile bağlantılı olabilir. Aynı zamanda hasta grubumuzda 18 yaş altı Ph (+) olan 3 hastanın tedaviye yanıtının iyi olması küçük yaşlarda survinin daha yüksek olmasından kaynaklanabilir.

ALL'li hastaların diagnozunda lösemik blastlarında kazanılan kromozom anomalilerinin varlığı ile prognozu belirleyerek hastaların alt grup sınıflandırmasını yapmak önemlidir. (Secker- Walker ve ark 1978, Krivtsov ve Armstrong 2007). Anöploidiler tüm kanser türlerinde olduğu gibi ALL'de de oldukça sık görülür. Çocukluk çağı ALL'lerinin yaklaşık %80'i (Nordgren ve ark 2001, Carroll ve ark 2008) erişkin ALL'li hastaların yaklaşık %60-85 (Jaffe ve ark 2001) kadarı tanı sırasında birçok kromozom anomalisine sahiptir. Mevcut çalışmamızda hasta grubunda 18 yaş altında 16, 18 yaş üzerinde ise 14 hasta vardı. Fakat anomalilerin görülme sıklığı açısından yetişkin ve çocuk hastalar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

ALL de kromozomal anomaliler, yapısal değişiklikleri içeren kromozom kırılmaları ya da sayısal kromozom değişiklikleridir. Bu sayısal ve yapısal anomalilerin her ikisi de birçok ALL'li hastanın karyotiplerinde mevcut olup hastalığın risk değerlendirmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Yapısal kromozom değişiklikleri inversiyonlar, insersiyonlar, delesyonlar, translokasyonlar ve onkogenik aktivite gösteren genlerdeki yeniden düzenlenmelerdir. Yapısal kromozom anomalilerinde Ph kromozomunun varlığı, MLL geni (Mixed Lineage

Leukemia) yeniden düzenlemeleri ve TEL/AML genlerinin translokasyonları değerlendirmede önemlidir. Sayısal kromozom değişikliklerinin risk değerlendirilmesinde ise kromozomların bir ya da daha fazla kopyasını içeren ya da hiç içermeyen klonların kromozom sayısı önemlidir. Yapılan çalışmalarda sayısal anomaliler arasında yer alan hiperdiploidi (>46 kromozom) oranının ALL'li hastalarda %30, hipodiploidi (<46 kromozom) oranının ise %10 oranında gözlendiği bildirilmektedir (Chen ve Sandberg 2002, Harrison ve Foroni 2002, Kwon ve ark 2009).

Hiperdiploidi ilk olarak 1978 yılında Walker ve ark tarafından gösterilmiş ve iyi prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Walker ve ark yaptıkları çalışmalarında ALL' li çocukların 10 yıl süren takibi sonucu 5 yıllık hayatta kalma (Event Free Survival) oranlarının %80 olduğunu bildirmişlerdir (Secker- Walker 1989). Hiperdiploidi durumlarının iyi prognozla ilişkilendirilmesine rağmen kromozom 4 ve 10 (van Dongen ve ark 1998), kromozom 6 (Jackson ve ark 1990), kromozom 17 ve izokromozom 17 i(17)(q10) (Heerema ve ark 2000) gibi bazı kromozom kazanımları kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir.

Yapılan çalışmalar hiperdiploidilerde bazı kromozomların ekstra kopyalarının diğerlerine göre daha sık görüldüğünü ortaya koymuştur (Nordgren 2001, Hamouda 2007, Ceppi ve ark 2009). Gmidene ve ark 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada kromozom 4, 5, 6, 8, 10, 14, 17, 21 ve X 'in kazanımlarının olduğunu bildirmişlerdir. Kwon ve ark ise 2009 yılında yaptıkları çalışmada 54 hiperdiploidili hastada en sık görülen kazanımları kromozom 4, 10, 17 ve 21 olduğunu bildirmişlerdir. Özellikle bu grupdaki hastalarda trizomi 4, 10 ve 17 olgularının çok sık olduğunu bildirilmiştir. Önceki çalışmaların aksine daha sonraları trizomi 4, 10 ve 17 diğer trizomilerle kıyaslandığında daha iyi prognoza sahip olmaları açısından önemlidir (Heerema ve ark 2007, Sutcliffe ve ark 2005).

Mevcut çalışmamızda ise farklı kromozomları içeren birçok sayısal değişimler gözlenmiştir. Bu değişimlerden kromozom 8, 10, 11, 17, X ve Y kromozomlarına ait kazanımlar olduğu görüldü. Bunlar arasında en sık görülen **trizomi 8**'di ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan diğer kazanımlar ise sırasıyla **trizomi X**, **dizomi X** ve **dizomi Y**'dir. Bu anomaliler literatürle kıyaslandığında trizomi 8 ve X diğer çalışmalarla uygunluk gösterirken, dizomi Y diğer çalışmalardan farklı olarak bizim çalışmamızda anlamlı bulunmuştur. Ayrıca tetrazomi 8, trizomi 10, trizomi 11, tetrazomi 11, trizomi 17 hasta grubunda görülen kazanımlar arasında yer almaktaydı ancak bunlar bizim çalışmamızda kontrol grubu ile kıyaslandığında

istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu kromozomlardan 8, 10 ve 17 literatürde en sık görülen kromozom kazanımları arasında yer almasına rağmen bizim çalışmamızda anlamlı kayıplar olarak belirlenemedi. Bunun aksine literatürde kazanımına sık rastlanmayan kromozom 10 ise literatürle uyumlu olarak çalışmamızda anlamlı kayıplar arasında yer almamıştır (Nordgren 2001, Hamouda 2007, Gmidene ve ark 2008, Ceppi ve ark 2009, Kwon ve ark 2009).

Bir diğer sayısal anomali olarak hipodiploidi ise, normal kromozom sayısı olan 46 dan daha az kromozom sayısının gözlendiği durumlardır. Hipodiploidi hiperdiploidiye göre daha kötü prognoza sebep olur (Wetzler ve ark 1999 , Stark ve ark 2001, Harrison 2002, Kwon ve ark 2009). Gmidene ve ark 2008 yılındaki çalışmalarında en sık kaybedilen kromozomların; Kromozom 1, 5, 6, 10, 11, 18, 19, 21 ve 22 olduğunu belirlemişlerdir. Diğer bir çalışmada ise Kwon ve ark kromozom X ve kromozom 7'nin kaybını gözlemlemişlerdir.

Mevcut çalışmamızda hastalarda en sık görülen kromozom kayıpları sırasıyla **Monozomi 8**, **monozomi 10**, **monozomi 11** ve **monozomi 17** idi. Gözlenen bu monozomiler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Literatürle kıyaslandığında kromozom 10 ve 11'in kaybındaki anlam uyumludur. Ancak literatürde kaybına az rastlanan kromozom 8 ve 17'nin kaybı bizim çalışmamızda oldukça sık görülmüş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Gözlenen diğer monozomiler ise monozomi 18, monozomi X ve kromozom X'in tamamen kaybı olmuştur. Ancak bunlar kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Literatürle kıyaslandığında ise her iki kromozomda diğer çalışmalarda en sık görülen kromozom kayıpları arasında yer almasına rağmen bizim çalışmamızda istatistiksel olarak anlamsız kayıplar arasındadır (Wetzler ve ark 1999 , Stark ve ark 2001, Harrison 2002, Gmidene ve ark 2008, Kwon ve ark 2009).

Çalışmamız sonucunda 30 hastanın hepsinde sayısal anomalilere rastlanmıştır. Hasta grubunda en sık gözlenen anomali kromozom 8 'in monozomi ve trizomisi olmuştur. Trizomi 8 özellikle akut miyoloid lösemi (AML) ve miyeloblastik sendrom (MDS) da en sık görülen kromozom anomalisidir. Daha nadir olmakla birlikte ALL ve KLL (Kronik Lenfositik Lösemi) gibi lenfoid malignensili hastalarda da tespit edilmiştir (Mitelman ve ark 2008). Bu çalışmada trizomi 8'in görülme sıklığı diğer lösemilerle kıyaslandığında ALL'de oldukça azdır. Buna rağmen bizim çalışma grubumuzdaki ALL hastaları arasında en sık görülen anomali trizomi 8 olmuştur.

Elde ettiğimiz verilere göre ALL hastalarında anöploidiye oldukça sık raslanmaktadır (%100) ve heterojen bir dağılım göstererek bir çok hastada farklı kromozomları tutmaktadır. Bu durum literatürdeki diğer çalışmalarlada uygunluk göstermektedir (Sutcliffe ve ark 2005, Heerema ve ark 2007, Hamouda ve ark 2007, Gmidene ve ark 2008, Ceppi ve ark 2009, Kwon ve ark 2009). Örneğin; Kore de yapılan bir çalışma da da hastaların %54'ünde (Kwon ve ark 2009), Nikaragua da yapılan bir diğer çalışmada ise hastaların %24'ünde sayısal anomaliye (hiperdiploidi) rastlanmıştır (Ceppi ve ark 2009) yine Tunus da yapılan bir çalışmada ise yetişkin hastaların %17.3 ve çocuk hastaların %20.8'de sayısal anomalilere rastlanmıştır (Gmidene ve ark 2008). Bu çalışmaların tümünde ALL hastalarda mevcut anöploidilerin tespiti ve klinikle ilişkisinin belirlenmesinin hastalığın tedavi sürecinde önemli olabileceği düşünülmektedir.

Bizim çalışmamızda ise çocuk ve yetişkin hastaların tümünde sayısal anomaliler gözlenmiştir. Fakat anomalilerin prognozla ilişkisi belirlenememiştir. ALL hastalarında yapılan bu çalışmaların uzun süre takipinin yapılmasının, hastalardaki gözlenen anomalilerin prognoza etkisinin anlaşılması ve tedavi sürecindeki değişimlerinin belirlenmesi açısında önemli olduğu düşünülmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda kromozom 8, 10, 11, 17, 18, X ve Y kromozomlarının kayıp ve kazanımlarına bakılmıştır. Bunların içinde literatürde kaybı sık görülen kromozomlar 8, 10, 17, 18 ve X kromozomlarıdır. Bizim çalışmamızda da bu kromozomlardan, kromozom 8 ve kromozom X'in kaybı anlamlı bulunmuştur. Ayrıca literatürde kaybına sık rastlanmayan Y kromozomu kaybı da bizim çalışmamızda anlamlı bulunmuştur.

Bu kazanımların yanı sıra literatürde kaybına sık rastlanan kromozom 10, 11 ve X kromozomlarına bakılmıştır. Bunların içinde kromozom 10 ve kromozom 11'deki kayıplar anlamlı bulunmuştur. Ayrıca literatürde sık rastlanmayan kromozom 8 ve kromozom 17'nin kayıplarıda çalışmamızda anlamlı bulunmuştur.

Mevcut çalışmada ALL hastalarında sayısal değişimler araştırılmış ve bakılan tüm kromozomlarda sayısal değişimlere rastlanmıştır. Yukarıda belirtildiği gibi bunlardan bazıları anlamlı bulunurken bazıları anlamsız bulunmuştur. Çalışmamızda hipodiploidi (<46 kromozom) ve hiperdiploidi (>46 kromozom) durumlarının belirlenmesinden ziyade sadece bazı kromozomları içeren kayıp ve kazanımlar tespit edilmiştir.

Çalışma grubumuzdaki hasta sayısı azdır. Daha anlamlı bilgiler elde edebilmek için bu tür çalışmaların geniş popülasyonlarda ve klinik ile birlikte yürütülmesi gerektiği düşünülmektedir.

Daha önceki çalışmalarda olduğu gibi bu çalışmada da bazı kromozomların kayıp ve kaznanımlarının diğerlerinden fazla olduğu belirlenmiştir. Anöploidi durumlarında neden bu kromozomların daha çok etkilendiği ya da bu kromozomlardan kaynaklanan sebeplerden dolayı mı anöploidinin tetiklendiğinin araştırmasının önemli olabileceği düşünülmektedir.

6. ÖZET

T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ/ KONYA-2011

Emine KOÇER

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

ALL Hastalarında Kromozom 8, 10, 11, 17, 18, X ve Y Kromozomlarındaki Sayısal Anomalilerin FISH Tekniği Kullanılarak İncelenmesi

Lösemi kemik iliğinde hemotopoietik hücrelerin farklılaşma yeteneklerini kaybederek kontrolsüz çoğalması ile karakterize malign bir hastalıktır. Akut lenfoblastik lösemi (ALL) lenfoblastların anormal bir şekilde kontrolsüz ve aşırı çoğalmasıylaoluşur. ALL çocukluk dönemi lösemilerinin yaklaşık %80'inden, erişkin lösemilerinin yaklaşık %20'sinden sorumludur. Kromozomal anomaliler ALL'nin tanısı ve risk değerlendirilmesinde önemli rol oynar. ALL de sayısal ve yapısal birçok anomali görülür. Sayısal anomaliler kromozom kayıp ve kazanımları şeklindedir. Bazı kromozomların kayıp ve kazanımları diğer kromozomlara göre daha yaygındır.

Mevcut çalışmada 30 ALL hastasında kromozom 8, 10, 11, 17, 18, X ve Y, kromozomlarındaki sayısal değişimleri FISH tekniğini kullanarak belirlemeye çalıştık. Değerlendirme yapılırken tüm kromozomlar için değişiklikler monozomi, trizomi, tetrazomi olarak belirlendi. Hastaların tamamında kromozomal değişikliklere rastlandı. bu değişiklikler; 7 hastada Monozomi X (%23), 18 erkek hastanın hepsinde dizomi X (%100), 16 hastada trizomi X(%60), 4 hastada tetrazomi X (%13), 8 hastada Y kaybı(%44), 15 hastada dizomi Y(%83), 21 hastada monozomi 8(%70), 27 hastada trizomi 8(%90), 7 hastada tetrazomi 8(%23), 15 hastada monozomi 10(%50), 9 hastada trizomi 10(%30), 16 hastada monozomi 11(%53), 2 hastada trizomi 11(%6,6), 18 hastada monozomi 17(%60), 8 hastada trizomi 17(%26,6) ve 10 hastada monozomi 18(%33) olarak belirlendi.

Daha geniş populasyonlarda, klinik ile birlikte yapılan çalışmaların hastalarda uygun tedavi seçiminde önemli olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Lösemi; ALL; Sayısal Anomali; Moleküler Sitogenetik; FISH

7. SUMMARY

Numerical Anomalies of Chromosome 8, 10, 11, 17, 18, X and Y Chromosomes in ALL Patients by FISH Technique

Leukemia is a malignant disease that is characterized by losing the ability to differentiate and uncontrolled proliferation of hemotopoietik cells in the bone marrow. Acute lymphoblastic leukemia (ALL) occurs with the abnormal uncontrolled and excessive proliferation of lymphoblasts. ALL responsible for approximately 80% of childhood leukemia and approximately 20% of adult leukemia. Chromosomal aberrations play an important role, that is about risk assessment and diagnosis of ALL. Many numerical and structural abnormalities Seen in ALL. Numerical anomalies are in the form of chromosomal in losses and gains. Losses and gains of some chromossomes are more common than the other chromosomes.

In this current study we tried to determine of choromosomes numerical changes with choromosome 8,10,11,17,18,X and Y in 30 ALL patients by using technique of FISH . While as a set reviews monozomy, trisomy and tetrasomy of all chromosomes in changes. Chromosomal changes were observed in all patients. Results are as follows: monosomy X in 7 patients (23%), disomy X in all 18 male patiens (100%), trisomy X in 16 patients (60%), tetrasomy X in 4 patients (13%), loss of Y in 8 patients (44%), disomy Y in 15 patients (83%), monosomy 8 in 21 patients (70%), trisomy 8 in 27 patients (90%), tetrasomy 8 in 7 patients (23%), monosomy 10 in 15 patients (50%), trisomy 10 in 9 patients (30%), monosomy 11 in 16 patients (53%), trisomy 11 in 2 patients (6,6%), monosomy 17 in 18 patient (60%), trisomy 17 in 8 patients (26,6%), and monosomy 18 in 10 patients (33%) was seen.

It is thought that in wider population, works made with clinic are important for the choice of treatment suitable for the sick people.

8. KAYNAKLAR

1. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Robert K ve Watson JD. Molecular Biology of The Cell 3.baskı. Gardlan publishing, New York 1994; s: 1061-1175,1255-1294.
2. Arico M, Valsecchi MG, Camitta B, Schrappe M, Chessells J, Baruchel A, Gaynon P, Silverman L, Schaub GJ, Kamps W, Puı CH, Masera G. Outcome of treatment in children with philaldelphia chromosome positive in acute lymhoblastic leukemia. NEJM. 2000; 342:998-1006.
3. Aster, J.C. (1997). Hematopoetic and Lymphoid System. içinde Kumar, V. (Ed.), Cotran, R.S., Robbins, S.L. *Basic Pathology.* (6th ed.) USA, W.B. Saunders Company. 362-78.
4. Barnard DR, et al. Morphologic, immunologic and cytogenetic classification of ALL in childhood. Leukemia 1996; 10:5-12
5. Belkov VM, Krynetski EY, Schuetz JD, et al. Reduced folate carrier expression in acute lymphoblastic leukemia: a mechanism for ploidy but not lineage differences in methotrexate accumulation. Blood 1999;93:1643-50
6. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al. Proposals fort he immunological classification of acute leukemias. European Group fort he Immunological characterization of leukemias (EGIL). Leukemia 1995;9:1783-6
7. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals fort he classification of the acute leukemias. Br J Haematol 1976; 33:45-61
8. Berkarda B. Kan hastalıkları. İ.Ü. basım ve yayınevi müdürlüğü. S:155-68. İstanbul.2003
9. Boveri T, Über mehrpolige mitosen als mittel zur analyse des zellkerns. Verh. Phys. Med. Ges. Würzburg 35, 67-90 (1902) (in German)
10. Brearley RL, Johnson SA, Lister TA. Acute lymphoblastic leukemia in adults: Clinicopathological correlations with the French-American-British (FAB) co-operative group classification. Eur J Cancer. 1979;15:909-14
11. Buffin E, Emre D, Karess RE. Flies without a spindle checkpoint. Nature Cell Biol. 2007; 9:565-72.
12. Carroll WL, Bhojwani D, Min DJ, Raetz E, Relling M, Davies S, Downing JR, Willman CL, Reed JC. Pediatric Acute Lymphoblastik Leukemia. Hematology. 2003 ;78:102-31.
13. Ceppi F, Brown A, Betts DR, Niggli F, Popovic MB. Cytogenetic characterization of childhood acute lyphoblastic leukemia in Nicaragua. Pediatr Blood Cancer. 2009
14. Chang CPVI, Cleary ML. The Hox cooperativity motif of the chimeric oncoprotein E2a-Pbx1 is necessary and sufficient for oncogenesis. Mol Cell Biol. 1997; 17:81-8
15. Chen Z, Sandberg AA. Molecular cytogenetic aspects of hematological malignancies: Clinical implications. American Journal of Medical Genetics (Semin. Med. Genet.) 2002;115:130-41.
16. Chessels JM, Swansbury GJ, Reeves B, Bailey CC, Richards SM. Cytogenetics and prognosis in Childhood lymphoblastic leukemia: results of MRC UKALL X. British Journal of Haematology ,1997;99:93-100
17. Childs C. The morphologic classification of ALL in child. AM J Clin Pathol. 1986;86:503-6
18. Cimini D. Merotelic kinetochore orientation, aneuploidy, and cancer 2008. Biochim. Biophys. Acta 1786; 32-40.
19. Deward GW, Ketterling RP, Wyatt WA, Stupca PJ. Cytogenetic studies in neoblastic hematological disorders. 32:3-30

20. Dick Fr. Diagnostic concurrence in the subclassification of adult acute leukemia using FAB criteria. CANCER, 1982;49:916-20.
21. Dick Fr. Diagnostic concurrence in the subclassification of adult acute leukemia using FAB criteria. CANCER, 1982;49:916-20.
22. Doğru Ö. Akut lenfoblastik lösemilerde genetik ve immünofenotipik özelliklerin klinik ve prognostik önemi 2009. İstanbul Üniversitesi Yandal uzmanlık tezi; s: 2
23. Emerenciano M, Koifman S, Pombo-de-Oliveira MS. Acute leukemia in early childhood. Braz J Med Biol Res 2007 ; 40(6):749-60.
24. Felix CA, Lange BJ. Leukemia in Infants. The Oncologist 1999; 4(3):225-40.
25. Fiedmann AM, Weinstein HJ. The role of prognostic features in the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia 2000. The Oncologist 5: 321-28
26. Ganem NJ, Godinho SA, Pellman D. A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability 2009. Nature.(doi:10.1038/nature08136).
27. Gmidene A, Sennana H, Elghezal H, Ziraoui, Youssef YB, Elloumi M. Cytogenetic analysis of 298 newly diagnosed cases of acute lymphoblastic leukemia in Tunisia.Hematol Oncol. 2008;26: 91-7.
28. Gökbuget N, Hoelzer D. Recent approachersin acute lymhoblastic leukemia in adults. Rev Clin Exp Hematol 2002; 6.2:114-41.
29. Graux C. Biology of acute lymphoblastic leukemia (ALL): clinical and therapeutic relevance. Transfusion and Apheresis Science 2011; 44: 183-9
30. Hamouda F, El-Sissy AH, Radwan AK, Hussein H, Gadallah FH, Al-Sharkawy N, Sedhom E, Ebeid E, Salem SI, Kamel AM. Correlation of karyotype and immunophenotype in Childhood acute lymphoblastic leukemia: experience at the national cancer institute, Cairo University, Egypt. Journal of the Egyptian Nat.Cancer Inst. 2007; 19: 87-95.
31. Harrison CJ, Foroni L. Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. Rev Clin Exp Hematol,2002
32. Head DR. Classification and differentiation of the acute leukemias. In: Wintrobe's Clinical Hematology, Eds: Greer JP, Foerster J, Lukenks JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2004; 2063-76
33. Heerema NA, Raimondi SC, Anderson JR, Biegel J, Camitta BM, Cooley LD, Gaynon PS, Hirsch B, Magenis RE, McGavran L, Patil S, Pettenati MJ, Pullen MJ, Rao K, Roulston D, Schneider NR, Shuster JJ, Sanger W, Sutcliffe MJ, van Tuinen P, Watson MS, Carroll AJ. Specific extra chromosomes ocur in a modal number dependent pattern in pediatric acute lymphoblastic leukemia. Genes Chromosomes Cancer 2007;46:684-93
34. Hoelzer D, Gokbuget N. Recent approaches in acute lymphoblastic leukemia in adults. Critical Reviews in Oncology and Hematology, 2000; 36:49-58
35. Holland AJ, Cleveland DW. Boveri revisited: chromosomal instability, aneuplody and tumorigenesis. 2009, Nat rev Mol Cell Biol. 10(7):478-87.
36. Hruák O, MacDonald AP. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. Leukemia. 2002; 16: 1233-58

37. İstanbui.edu.tr. Kutluk T. Çocukluk çağı kanserlerinin epidemiyolojisi. Cerrahpaşa tıp fakültesi sürekli tıp eğitimi etkinlikleri. www.ctf.istanbul.gov.tr/stek/pdfs/49/4901.pdf. erişim tarihi: 09.06.2011
38. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. Pathology and genetics: tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon:JARC Press.2011.
39. Kalitsis P, Earle E, Fowler KJ, Choo KH. Bub3 gene disruption in mice reveals essential mitotic spindle checkpoint function during early embryogenesis 2000. Genes Dev. 14, 2277-82.
40. Kalitsis P. Et al. Increased chromosome instability but not cancer predisposition in haploinsufficient Bub3 mice 2005. Genes Chromosomes Cancer. 44;29-36.
41. Kebriaei P, Anastasi J, Larson R.A. Acute Lymphoblastic leukemia: diagnosis and classification. Best Practice & Research Clinical Haematology; 2003;4:597-621.
42. Kops GJ, Weaver BA, Cleveland DW. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. Natura Rev. Cancer 2005;5:773-85.
43. Krivtsov AV, Armstrong SA. MLL translokations, histone modifications and leukemia stem-cell development. Nat Rev Cancer 2007; 7:823-33.
44. Kurzrock R ve Talpaz M. Molecular biyology in cancer medicine. Martin Dunitz, London. 1995; S:1-155
45. Kwon YJ, Lee JW, Kim MS, Jang PS, Chung NG, Jeong DC, Kim YG, Han KJ, Lee SJ, Cho B, Kim HK. Cytogenetic analysis in childhood acute lymphoblastic leukemia: experience at a single institution in Korea. Int J Hematol 2009; 89: 150-8.
46. Legnad O, Perrot JY, Baudard M, et al. The Immunophenotype of 117 adults with acute myeloid leukemia: proposal of a prognostic score. Blood 2000;98:870-7.
47. Lilleyman JS, Hann IM, Stevens RF. The clinical significance of blast cell morphology in childhood lymphoblastic leukemia. Med Pediatr Oncol. 1986; 14:144-7
48. Look AT, Roberson PK, Williams DL, Rivera G, Bowman WP, Pui CH, et al. Prognostic importance of blast cell DNA content in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 1985; 65:1079-86.
49. Mandrell BN. The genetic profile and monitoring of acute lyphoblastic leukemia in children and adolescents. Journal of pediatric nursing 2009.
50. Manera R, Raminez I, Mullins J, Pinkel D. Pilot studiies of species-specific chemotherapy of childhood acute lymphoblastic leukemia using genotype and immunophenotype. Leukemia. 2000;14:1354-61
51. Margolin JF, PoplackDG, et al. ALL. In: Principles and Practice of Pediatric Oncology, 3rd edition. Philedelphia, 1997: 409-47
52. Margolin JF, Steuber CP, Poplack DG: Acute lymphoblastic leukemia. In Pizzo PA and Poplack DG: Principles and Practice of Pediatric Oncology: Lippincott Williams and Wilkins Company, Philadelphia, 4th edt. 2002; 489-5444
53. Matsuo Y, Drexler HG. Establishment and characterization of human B cell precursor-leukemia cell lines. Leuk Res 1998;22:567-79.
54. Mauer AM. Hematology 4th ed. New York: Graw-Hill, 1991:994-1005
55. Miller DR, Krailo M, Bleyer WA, et al. Prognostic implications of blast cell morphology in childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Study Group. Cancer Treat Rep. 1985; 69:1211-21

56. Mitelman F, Johansson B, Mertens F, editors Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer. 2008. http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman.
57. Moorman AV, Clark R, Farrell DM, et al. Probes for hidden hyperdiploidy in acute lymphoblastic leukemia. Genes Chromosom Cancer. 1996; 16:40-5.
58. Nordgren A, Farnebo F, Johansson B, Holmgren G, Forestier E, Larsson C, Söderhall S, Nordenskjöld M, Blennow E. Identification of numerical and structural chromosome aberrations in 15 high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemias using spectral karyotyping. Eur J Haematol, 2001; 66:297-304
59. Nordgren A, Heyman M, Sahlen S, Schoumans J, Soderhall S, Nordenskjold M, Blennow E. Spectral karyotyping and interphase FISH reveal abnormalities not detected by conventional G-banding. Implications for treatment stratification of childhood acute lymphoblastic leukaemia: detailed analysis of 70 cases. Eur J Haematol. 2002 Jan;68(1):31-41.
60. Nordgren A, Schoumans J, Soderhall S, Nordenskjold M, Blennow E. Interphase fluorescence in situ hybridization and spectral karyotyping reveals hidden genetic aberrations in children with acute lymphoblastic leukaemia and a normal banded karyotype. Br J Haematol. 2001 ; 114(4):786-93.
61. Onciu M. Acute lymphoblastic Leukemia. Hematol Oncol Clin N Am. 2009;23:655-74
62. Özdamar E. Floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi ile çocukluk dönemi akut lenfoblastik lösemide (ALL) 9;22 ve 12;21 translokasyonlarının tanımlanması. İstanbul Üniversitesi Yüksek lisans tezi; s: 9
63. Pekçelen Y. Lösemiler. Klinik Hematoloji. Nobel Tıp Kitabevleri, 2003.
64. Pieters R, Carroll WL. Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. Pediatr Clin N Am 2008; 55:1-20.
65. Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med. 2006. 354: 166-78.
66. Romana SP, Mauchauffe M, Le Coniat M, et al. The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion. Blood. 1995; 85:3662-70.
67. Rooney DE ve Czepulkowski BH. Human Cytogenetic. A practical Approach, vol .II Malignancy and Acquired Abnormalities, 2.ed.,pp:1-155, Oxford Universty pres, New York, 1992
68. Rooney DH, Czepulkowski B, Gibbons B. Human Cytogenetics, Malignancy and Acquired Abnormalities. The Practical Approach Series, Oxford University Press, 2001.
69. Rowland JM. Molecular Genetic Diagnosis of Pediatric Cancer: Currant and Emerging Methods. The Pediatrics Clinics of North America Pediatric Hematology/Oncology, Part II. 2002; 49(6): 1415-35.
70. Schumacher HR. Acute leukemia approach to diagnosis. Schumacher HR(ed) Igaku-Shoin Ltd. New York. 1990
71. Secker- Walker LM, Lawler SD, Hardisty RM. Prognostic implications of chromosomal finding in acute lymphoblastic leukemia at diagnosis. Br Med J, 2: 1529-1530,1978.
72. Secker-Walker LM, Chessels JM, Stewart EL, et al. Chromosomes and other prognostic factors in acute lymphoblastic leukemia. A long-term follow-up. BR J Haematol, 72:336-342,1989.
73. Shurtleff SA, Buijs A, Behm FG, et al. TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. Leukemia. 1995; 9:1985-89.

74. Smith M, Arthur D, Camitta B, et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignement for children with acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol 1996;14:18-24.
75. Stam RW, van den Heuvel-Eibrink MM, den Boer ML, et al. Multidrug resistance genes in infant acute lymphoblastic leukemia: ara-C is not a substrate for breast cancer resistance protein. Leukemia 2004; 18:78-83.
76. Stark B, Jeison M, Gobuzov R, et al. Near haploid childhood acute lymphoblastic leukemia masked by hyperdiploid line: Detection by fluorescence in situ hybridization. Cancer Genet Cytogenet. 2001; 128:108-13.
77. Sutcliffe MJ, Shuster JJ, Sather HN, Camitta BM, Pullen J, Schultz KR, Browitz MJ, Gaynon PS, Carroll AJ, Heerema NA. High concordance from independent studies by the Children's Cancer Group (CCG) and Pediatric Oncology Group (POG) associating favorable prognosis with combined trisomies 4, 10, and 17 in children with NCI Standart- risk B-precursor aute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group (COG) initiative. Leukemia 2005; 19:734-40
78. Tekgündüz E, Demir M, Akpınar S. Prognostik faktörler ışığında akut lenfoblastik lösemi. UHOD 2010;1:57-66.
79. Thompson MW, Mclnnes RR, Willard HF. Tıbbi genetik 6.baskı, güneş kitabevi, 2005, s:311-333
80. Tiraje C. Çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemisi.Pediatrik hematoloji-onkoloji bilim dalı Cerrahpaşa tıp fakültesi. Klinik gelişim;14-25. Erişim tarihi: 25.04.2011 http://www.klinikgelisim.org.tr/eskisayi/cilt20sayi2/trajeakutlenfoblastik.pdf
81. Tommerup N, Schaffer LG. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature.2005;88-95.
82. Torres EM, Williams BR, Amon A. Aneuploidy: cells losing their balance 2008. Genetic. 179; 737-46.
83. Tömekçe NB. Apoptozla ilişkili genler BCL2L12 ve PDCD4'ün lösemi hastalarındaki ekspresyon analizi 2008. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi; s:4
84. Turkington, C., Lipera, W. (2005). *The Encyclopedia of Cancer.* New York, Facts On File, Inc. 207-10.
85. Türk Hematoloji Derneği Kursu 2006 www.thd.org.tr/doc/kurs-pdf/2006akutlosemi.pdf erişim tarihi: 25.04.2011
86. Uludag.edu.tr.http://tip.uludag.edu.tr/fizyoloji/dosya/kanin-bilesimi-fizyolojik-ozellikleri hematopoez.pdf erişim tarihi: 21.10.2011
87. Usvasalo A, Räty R, Knuutila S, Vettenranta K, Harila- Saari A, Jantunen E, et al. Acute lymphoblastic leukemia in adolescents and young adults in Finland. Haematologica 2008;93:1161-68.
88. Ülkü B. Hematoloji ders kitabı. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi yayınevi. İstanbul. 2008 s:119-138
89. Weaver BA, Cleveland DW. Does aneuploidy cause cancer?. Curr. Opin. Cell Biol. 2006;18:658-67.
90. Wetzler M, Dodge RK, Mrozek K et al. Prospective karyotype analysis in adult acute lymphoblastic leukemia: The cancer and leukemia Group B experience. Blood. 1999; 93: 3983-3993
91. Whittaker JA. Leukemia classification. A study of the accuracy of diagnosis in 456 patienta. Br J Hematoloji, 1979;41:177-84.
92. Williams BR, et al. Aneuploidy affects proliferation and spontaneous immortalization in mammalian cells 2008. Science 322; 703-9.

93. Williams DL, Tsiatis A, Brodeur GM, Look AT, Melvin SL, Bowman WP, et al. Prognostic importance of chromosome number in 136 untreated chidren with acute lymphoblastic leukemia. Blood 1982; 60:864-71
94. www.kanser.gov.tr/folders/file/8iL-2006-SON.pdf , Kanser Savaş Daire Başkanlığı, 2004-2006 yılları Türkiye kanser insidansı., erişim tarihi: 09.06.2011
95. www.ukdk.org/pdf/kitap/11.pdf
96. Zhang N. Et al. Overexpression of seperase induces aneuploidy and mamary tumorigenesis 2008. Proc. Natl Acad Sci. USA 105,13033-13038.
97. Zuna J, Ford AM, Peham M, Patel N, Saha V, Eckert C, Köchling J, Grümayer RP, Trka J, Greaves, M. TEL deletion analysis supports a novel view of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. Clin Cancer Res. 2004; 10: 5355-60.

9. ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Konya'da doğdu. İlkokulu İstanbul'da Anafartalar İlkokulu'nda, ortaokulu Açık İlköğretim de tamamladı. Lise öğrenimini Açık Öğretim Lisesinde tamamladı. 2004 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü kazandı ve 2008 de mezun oldu. Aynı yıl Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsün Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.