

**T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ISPARTA SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ BÜNYESİNDE  
KEMOTERAPİ TEDAVİSİ GÖREN LÖSEMİ HASTALARINDA  
G-BAN TLAMA METODU İLE SİTOGENETİK ANALİZLER**

**Ayşe ALTUNBAŞAK**

**TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Danışman  
Yrd. Doç. Dr. Efkan UZ**

**Bu Tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu Tarafından  
1093 Nolu Proje ile Desteklenmiştir.**

**Tez No: 35  
2006-İSPARTA**

## KABUL VE ONAY


Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
**Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanlığı**  
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından  
**Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 17 / 08 / 2006

Tez Danışmanı :   
Yrd.Doç.Dr. Efkân UZ  
Süleyman Demirel Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye :   
Prof.Dr. Ali AYATA  
Süleyman Demirel Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

Üye :   
Doç.Dr. H. Ramazan YILMAZ  
Süleyman Demirel Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**ONAY:** Bu yüksek lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

  
Prof.Dr. Halis KOYLÜ  
Enstitü Müdürü

**ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR**

Anabilim dalımızın bir düzen içerisinde yürümesini sağlayan ve yetişmemde gayret gösteren Anabilim Dalı Başkanımız Prof.Dr. Nurten ÖZÇELİK'e,

Çalışmalarım sırasında değerli yardımları ve eleştirileri ile büyük katkıda bulunan tez danışmanım Yrd.Doç.Dr. Efkan UZ'a,

Yoğun klinik tempoları arasında değerli vakitlerini ayırarak her türlü yardımı esirgemeyen ve hastalara ulaşmamda her zaman yardımcı olan Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Onkolojisi Bilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr.Ali AYATA ve İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd.Doç.Dr.E. Güçhan ALANOĞLU'na ayrıca desteklerinden dolayı tüm asistan ve çalışanlara,

Sitogenetik değerlendirme açısından değerli bilgilerini esirgmeden sunan Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Yrd.Doç.Dr. Tuna GÜLTEN ve merkez çalışanlarına,

Tez süresince destek ve yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Doç. Dr. H. Ramazan YILMAZ'a, Yrd. Doç. Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU'na ve asistan arkadaşlarım Arş.Gör. Pınar ASLAN KOŞAR'a, Arş.Gör. Mustafa SOYÖZ'e, Arş.Gör. Esin SAKALLI ÇETİN ve Arş.Gör. Barış YAŞAR'a,

Tezimin yazımı sırasında yardım eden Arş.Gör. Hakan DARICI'ya,

Ve hep yanımda olan güzel insanlara çok teşekkür ederim.

**İÇİNDEKİLER**

	<b>Sayfa No</b>
<b>KABUL ve ONAY</b>	ii
<b>ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR</b>	iii
<b>İÇİNDEKİLER</b>	iv
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b>	vi
<b>TABLolar ve ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	vii
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1 Lösemi	3
2.1.1. Löseminin Tarihçesi	3
2.1.2. Löseminin Patogenezi	4
2.1.3. Lösemi Etiyolojisi	4
2.1.3.1 Çevresel Etkenler	5
2.1.3.2 Kalıtsal Etkenler	6
2.1.4. Lösemilerin Sınıflandırılması	7
2.1.4.1. Akut Lösemiler	7
2.1.4.1.1. ALL: Akut Lenfoid Lösemiler	8
2.1.4.1.2. AML: Akut Miyoleid Lösemi	12
2.1.4.2. Kronik Lösemiler	15
2.1.4.2.1. KLL: Kronik Lenfositler Lösemi	15
2.1.4.2.2. KML: Kronik Myeloid Lösemi	17
2.2. Lösemik Dönüşümün Gösterildiği Metodlar ve Mutasyon Tarama Testleri	19
2.2.1. Klasik Sitogenetik Analiz Yöntem	19
2.2.1.1. GTG Bantlama Tekniği	20
2.2.1.2. Mikronükleus Tekniği	20
2.2.1.3. Kardeş Kromatid Değişimi Tekniği	20
2.2.2. Moleküler Sitogenetik Yöntemleri	22
2.2.3. Moleküler Genetik Teknikler	23
2.3. Lösemilerde Genetik İnceleme	24
2.3.1. Kromozom Sayısı Mutasyonları	25
2.3.2. Kromozom Yapısı Mutasyonları	26
2.3.2.1. Yer Değiştirme (Translokasyon)	26
2.3.2.2. Eksilme (Delesyon)	27
2.3.2.3. Artma (Duplikasyon)	27

	<b>Sayfa No</b>
2.3.2.4. Ters Dönme (İnversiyon)	27
2.3.2.5. Halka (Ring) Kromozom	27
2.3.2.6. İzokromozom	28
2.4. Lösemilerde Tedavi	29
2.4.1. Kemoterapi	29
2.4.2. Kanser Tedavisinde Kullanılan İlaçların Genel Sınıfları ve Etki Mekanizmaları	33
2.4.2.1. Alkilleyici Ajanlar	33
2.4.2.2. Antimetabolitler	33
2.4.2.3. Doğal Ürünler	33
2.4.2.4. Çok Yönlü Ajanlar	33
2.4.2.5. Hormonlar	33
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>39</b>
3.1. Gereç	39
3.2. Metod	39
3.2.1. Periferik Kan Hücre Kültürü	39
3.2.1.1. Zenginleştirilmiş Besiyerinin Hazırlanması	39
3.2.1.2 Ekim İşlemleri	40
3.2.2. Kromozom Eldesi	41
3.2.2.1. Kullanılan solüsyonlar	41
3.2.2.2. Hücrelerin elde edilmesi	41
3.2.3. Giemsa Bantlama Tekniği	42
3.2.3.1. Kullanılan solüsyonlar:	42
3.2.3.2. Preparatların Boyama İşlemleri	43
3.2.4. Dijital Görüntülerin Elde Edilmesi	43
3.3. İstatistiksel Analizler	43
<b>4. BULGULAR</b>	<b>44</b>
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ</b>	<b>57</b>
<b>ÖZET</b>	<b>60</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>62</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>64</b>

**SİMGELER VE KISALTMALAR**

KML	: Kronik Myeloid Lösemi
KLL	: Kronik Lenfoid Lösemi
ALL	: Akut Lenfoid Lösemi
AML	: Akut Myeloid lösemi
SCE	: Sister Cromatid Exchange (Kardeş Kromatid Değişimi )
ANNL	: Akut Nonlenfositer Lösemi
Ph Kromozomu	: Philadelphia Kromozomu
FISH	: Flouresan In-Situ Hybridization
RT-PCR	: Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction
GTG Bantlama	: Giemsa-Trypsin-Giemsa Bantlama
FAB Sınıflaması	French-American-British Sınıflaması

## TABLOLAR ve ŞEKİLLER DİZİNİ

TABLOLAR	Sayfa No
<b>Tablo 1:</b> ALL ve AML'nin immüfenotipik olarak değerdendirilmesi	10
<b>Tablo 2:</b> ALL'de Sayısal ve Yapısal Anomaliler ve Prognastik Önemleri	11
<b>Tablo 3:</b> FAB Grubunun AML Sınıflaması	14
<b>Tablo 4:</b> AML'de Sayısal ve Yapısal Anomaliler ve Prognostik Önemi	15
<b>Tablo 5:</b> Lösemi tedavisinde kullanılan kemoterapatikler	30
<b>Tablo 6:</b> AML Remisyon İndüksiyon Tedavi Protokolü (3-7 protokolü)	37
<b>Tablo 7:</b> ALL Remisyon İndüksiyon Tedavi Protokolü (CVAD)	37
<b>Tablo 8:</b> KML Remisyon İndüksiyon Tedavi Protokolü	38
<b>Tablo 9:</b> Hastaları yaş, cinsiyet, tanı ve evrelerine göre dağılımı	46
<b>Tablo 10:</b> Kontrol grubunun yaş ve cinsiyet olarak dağılımı	47
<b>Tablo 11:</b> KLL grubunun kontrol grubuna göre karşılaştırması.	48
<b>Tablo 12:</b> ALL grubunun kontrol grubuna göre karşılaştırması.	49
<b>Tablo 13:</b> KML grubunun kontrol grubuna göre karşılaştırması.	49

## ŞEKİLLER

<b>Şekil 1:</b> Kontrol grubuna ait bir fotoğraf	50
<b>Şekil 2:</b> Kontrol grundan 46,XX karyotipli bir olgu	50
<b>Şekil 3:</b> del(17p) gösteren ALL vakasına ait bir fotoğraf	51
<b>Şekil 4:</b> t(2;5) translokasyonunu gösteren ALL vakası	52
<b>Şekil 5:</b> perisentrik inv(1) gösteren vakalar	53
<b>Şekil 6:</b> KLL vakasında t(9;22) gösteren saha	54
<b>Şekil 7:</b> t(9;22) gösteren KML vakasından metafaz örneği	55
<b>Şekil 8:</b> Perisentrik inv(9) gösteren ALL vakası	56

## 1. GİRİŞ

Malign hastalıkların etyolojisinde genetik materyalin önemli rol oynadığı moleküler ve sitogenetik gelişmelerle net bir şekilde açığa çıkmaktadır. Özellikle familial lösemi olgularının tahmin edilenden fazla olması, genetik faktörün lösemi etyolojisinde önemli rol oynadığı lehinde bir delildir.

Lösemiler kan hücrelerinin üretildiği kemik iliğinin klonal habis hastalıklarıdır. Aşırı çoğalan fakat tam olarak farklılaşmayan lökositler, kemik iliği, karaciğer, dalak, merkezi sinir sistemi ve diğer iç organları istila edebilir. Bu hücreler fazlaca üretilmesine karşın, farklılaşmadığı için fonksiyonunu yapan hücre sayısı giderek azalacak ve bu hücrelerin sitopenik durumları gözlenecektir.

Son yıllarda malign gelişimlerin genetik bir temele oturtulup oturtulamayacağı sorusu çalışmaları hızlandırmıştır. Lösemilerde meydana gelen komozomal değişikliklerin tespiti, değişik lösemi alt gruplarının belirlenmesine ve buna bağlı olarak tedavi yöntemlerinin belirlenmesine katkıda bulunmuştur. Ayrıca tedavi sürecinde hastanın tedaviye verdiği yanıtın değerlendirilmesinde yine sitogenetik yöntemlere başvurulmaktadır. Mevcut çalışmalar kromozomlardaki olası sayısal ve yapısal mutasyonları ararken; en yeni ve detaylı çalışmalar ise yapısal veya sayısal olarak değişmiş bölgelerdeki ilgili genleri tespit edip bu genlerin lösemi ile bağlantısını çözmeyi amaçlamaktadır. Lösemi genetiğindeki değişimler, lösemi tanısında kullanılmakta olan, hücre morfolojisine dayanan French American British (FAB) sınıflaması, sitokimyasal boyalar, lökosit yüzey antijenlerine dayanan immün fenotiplendirme metodlarına, sitogenetik ve moleküler genetik yöntemlerin eklenmesini sağlamıştır. Çalışmamızda kullanmakta olduğumuz konvensiyonel sitogenetik analizi birçok genetik laboratuvarı rutin genetik analiz metodu olarak kullanmakta ve hızlı ve net sonuçlar alınabilmektedir.

Kısaca lösemi hücresindeki genetik kusurun, hücre fonksiyonlarını dolayısıyla hastalığın klinik seyri ve prognozunu yansıtan en iyi özellik olduğu anlaşılmış ve genetik özellikleri ile farklılık gösteren lösemilerde, farklı alt gruplara farklı tedavi protokollerinin belirlenmesini sağlamıştır.



Lösemi alt gruplarında gözlenen sitogenetik analizler farklılık gösterebilmektedir. Bu noktaya en güzel örnek KML için anahtar rol oynayan Philadelphia kromozomudur.

Kromozomal bozukluklar, sitogenetik analizin yanı sıra moleküler sitogenetik ve moleküler genetik metodlar ile desteklenebilmektedir. Metotlardan sitogenetik analiz, moleküler sitogenetik analiz ile desteklenirken, tüm bu çalışmaları destekleyen en kesin sonuç moleküler genetik yöntemler ile konulmaktadır. Ayrıntılı tanıya gidişte oldukça kullanışlı olan sitogenetik analiz metodları, çeşitli bantlama yöntemlerini kapsamaktadır. Ayrıca olası mutajenik etkilerin tarandığı mutasyon tarama testleri de sitogenetik analizlerin içindedir. Bunlar içinde kardeş kromatit değişimi (Sister Chromatid Exchange = SCE) ve mikronükleus tekniği etkin biçimde kullanılanlardır (1-3). Kullanım alanlarından biri olan kanser genetiğinde de hastalığın tanısının konulması ve takibinin yapılmasında önemli bir yer tutmaktadır. Tedavinin yanısıra hastalığın ilerlemesi ile ortaya çıkan ikincil kromozomal değişikliklerin tespitinde oldukça kullanışlıdır (4).

Çalışmamızda, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi onkolojik hemotoloji kliniğinde tedavisi ve takibi yapılan lösemi hastalarında, kemoterapi sonrası muhtemel kromozom anomalilerinin gözlenmesi amaçlandı. Konvensiyonel sitogenetik (Giemsa-Trypsin-Giemsa; GTG-Bantlama) yöntemi kullanılmak suretiyle olası yapısal ve sayısal kromozomal değişimler saptanmaya çalışılmıştır. Bu işlemdeki amaç sağlıklı kontrol bireylere oranla sitogenetik boyutta kemoterapi uygulanan vakalarda bir değişimin olup olmayacağını belirlemesiydi.

Çalışmada elde edilecek verilerin; tanının desteklenmesi, klinik yönlendirme, tedavi protokollerinin belirlenmesi, hastalığın prognozunun değerlendirilmesi ve hastalığın olası faz değişimlerinin belirlenmesinde faydalı olacağı düşüncesindeyiz.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Lösemi

#### 2.1.1. Löseminin Tarihçesi

1827’de Velpeau tarafından lösemi ile ilgili ilk vaka bildiriminden bu yana, lösemi gerek klinik gerekse genetik incelemelerde ilgi duyulan bir neoplazm olmuştur. Velpeau tarafından tespit edilen hastada; ateş, güçsüzlük, karın şişliği ve idrar yolları taşlarından kaynaklanan ağrılar şikayet edilmiş ve hastahaneye başvurusundan kısa bir süre sonra hasta kaybedilmiştir. Hastanın otopsisinde çok büyük dalak ve karaciğerin yanı sıra, kanın kırmızı şarap rengine ve kıvamının artmış olduğu adeta lapa kıvamında olduğu bildirilmiştir (5).

Bu tarihten 1845 yılına kadar lösemi çok iyi tanımlanamamıştır. Bu tarihlerde Virchow ve Benett ayrı ayrı olgularının otopsisinde, kanın beyaz rengine dikkat çekmiş ve hastalığı tanımlamışlardır (6).

Bu yüksek lökosit sayısına atfen beyaz kan terimi (weisses blut) kullanılmış, daha sonralarda ise Yunanca kökenli olarak beyaz anlamına gelen “leukos” ve kan anlamına gelen “haima” sözcüklerinden leukemia terimi türetilerek kullanılmaya başlanmıştır (6).

Lösemiler kan hücrelerinin üretildiği kemik iliğinin klonal habis hastalıklarıdır. Çok fazla çoğalan fakat farklılaşmayan lökositler, başta kemik iliği olmak üzere karaciğer, lenf bezleri, dalak, deri, testis ve merkezi sinir sistemi (MSS) gibi organ ve sistemleri işgal edebilir. Yeterinden fazla hücre üretilmesine karşın, bu hücreler tam olarak olgunlaşıp farklılaşmadığından işlev gören hücre sayısı azalarak anemi, trombositopeni ve nötropeni oluşmaktadır (7).

Bu tam olarak farklılaşmamış hücreler ‘blast’ olarak adlandırılmaktadır. Bu hücreler normal fonksiyonlarını yerine getirme yeteneğinden yoksundur. Lösemilerin kendi içindeki alt sınıflamalarında ve fazlara ayırımında bu blastların normal hücrelere oranı ve yapısı dikkate alınmaktadır.

### 2.1.2. Löseminin Patogenezi

Kan hücreleri hematopoietik organlardaki kök hücrelerinden gelişirler. Fetal dönemde karaciğer ve dalak gibi geçici hematopoietik organlarda oluşturulan kan hücreleri fetal dönemin sonuna doğru esas hematopoietik doku haline gelen kemik iliğinden üretilir.

Tüm kan hücrelerinin kemik iliğinde tek bir kök hücrelerinden geliştiğine inanılmaktadır. Bu hücreler bütün hücre türlerini verdiği için ‘pluripotent kök hücresi’ olarak isimlendirilir. Pluripotent hücreler çoğalarak tek tür kan hücresini oluşturan ana hücreleri verirler. Bu hücrelerden bir kısmı ‘lenfoid’ diğer bir kısmı ise ‘myeloid’ hücre serisine farklılaşır. Myeloid hücreler kemik iliğinde gelişerek eritrositler, granülositler, monositler ve megakaryositlere dönüşürler. Gelişimin erken döneminde lenfoid hücreler kemik iliğinden lenf düğümleri, dalak ve timusa göç ederek lenfositlere farklılaşırlar.

Yani hematopoez kök hücrelerinden gelişen ve farklılaştıkça dönüşme özellikleri azalan eş zamanlı ve devamlı olarak çeşitli hücrelerin üretilmesi ve bu hücrelerin farklılaşması işlemidir.

Lösemi, kök hücreden spesifik kan hücrelerinin oluşumuna kadar herhangi bir farklılaşma aşamasında gözlenebilir. Lösemik dönüşüm temelde bir mutasyon sonucu oluşmaktadır. Mutasyona uğrayan hücrelerin çoğu organizma tarafından çeşitli mekanizmalarla ortadan kaldırılmasına rağmen az sayıda hücre aşırı çoğalma özelliği kazanabilmektedir. İşte bu hücreler “klonojenik lösemik hücreler” olarak adlandırılmaktadır (6). Lösemilerin tek hücre kaynaklı klonal bir genişleme gösterdiği düşünülmektedir.

### 2.1.3. Lösemi Etiyolojisi

Lösemilerin oluş sebebi tam olarak bilinmemekle birlikte meydana gelişinden tek bir faktörün sorumlu olmadığı da bir gerçektir. Muhtemelen çeşitli etkenler hastalığın oluşumunu hazırlamaktadır. Lösemi oluşumuna götüren etmenleri 2 grup altında inceleyebiliriz.

- 1) Çevresel (dış) etkenler
- 2) Bireysel (kalıtsal) etkenler

### 2.1.3.1 Çevresel Etkenler

Fiziksel ve kimyasal ajanlar ile virüsleri içeren çevresel etkenlerin karsinojenik etkisinin olduğu bilinmektedir (8-10). Bu karsinojenlerin kromozomlar üzerinde hasarlar yaparak kanser oluşturabildikleri bildirilmiştir (9-11). Karsinojenlerin kanser oluşturma riskleri; karsinojenlerin dozuna, etki süresine ve kişinin gen duyarlılığına bağlanmaktadır (12, 13). Örneğin Çernobil faciasında ülkemizin bölgeye en yakın yöresindeki Karadeniz kıyılarında artan sitogenetik değişim oranı buna en güzel göstergedir (14).

Özellikle radyasyon, hücrede öncül nükleotidlerin yapısında değişikliğe neden olmaktadır. Bu da kromozomlarda kırılmalara, ring kromozom, disentrik kromozom ve sayısal anomalilere neden olarak lösemi insidansını arttırmaktadır (15, 16).

Ayrıca DNA'da fosfodiester bağlarında kırılmalara neden olduğundan DNA sentez evresinde hatalı replikasyon ve dolayısıyla kromatid tipinde kırıklar oluşturmaktadır. Bunların yıllar içindeki artış ve birikimi artmış lösemi insidansı olarak geri bildirilmektedir. Örneğin; atom bombasının etkisine maruz kalanlarda 3 yıl sonra lösemi görülmeye başlanmış ve görülme oranı 5-7 yıl sonra oldukça fazla artmıştır. Ayrıca spondilit artritis için radyasyon gören vakalarda da lösemi insidansı yükselirken (11, 17), yüksek doz radyasyonun yalnız lösemi insidansı değil diğer malignitelerde de artışa sebep olduğu gözlenmiştir (8, 9, 17).

Yaklaşık 3000 Å<sup>0</sup> dalga uzunluğundaki UV ışınlarının özellikle beyazlarda deri kanserine neden olduğu bildirilmektedir (8, 9, 17).

Birçok kimyasal ajan da radyasyon gibi karsinojenik etki edebilmektedir. Ayrıca kimyasal karsinojenler hücre bölünmesi sırasında kromozom davranışlarını etkilemektedir.

Kimyasal karsinojenlerin en önemlileri benzen ve alkilleyici ajanlardır. Benzenin hematopoietik, lenfoid ve akciğer kanserlerine sebep olduğu vurgulanmaktadır (8, 18).

İstanbul'da benzene maruz kalanlarda lösemi insidansı normalden 2-3 kat daha fazla bulunmuştur (19). Benzer olarak kloramfenikol ve fenilbutazonun lökomojenik etkisini gösteren raporlar vardır (20, 21).

Yine kombine ilaç tedavisinde, pestisit ve insektisit gibi kimyasal ajanların kullanımında, artan lösemi insidansı çalışmalarda göze çarpmaktadır (22).

Kombine terapide antitümör ajanlar, kromozomal bozulma ve kemik iliği disfonksiyonuna neden olurlar, alkilleyiciler ise immünoşüpresif özelliğe sahiptirler (23, 24). Çevresel faktörler, Kromozom veya kromatidlerin yanlış birleşmelerinden dolayı anormal kromozom sayıları da meydana gelmektedir (17).

### **2.1.3.2 Kalıtsal Etkenler**

Malign hastalıkların etiyolojisinde genetik materyalin önemli rol oynadığı moleküler ve sitogenetik gelişmelerle net bir şekilde açığa çıkmaktadır. Özellikle familial lösemi olgularının tahmin edilenden daha sık olması genetik faktörün lösemi etiyolojisinde rol oynadığı lehinde bir delildir (25). Bu genetik eğilimi destekleyen diğer iki unsur da, bazı kalıtsal hastalıklarda lösemi sıklığının artmış oluşu ve monozigot ikizlerde bir kardeşte lösemi görüldüğü zaman diğer kardeşte de lösemi görülme insidansının yüksek oluşudur (26). Çift yumurta ikizlerinde bu oranın düşüşü genetik yapının da olayla ilişkili olduğunu desteklemektedir. Doğumsal kromozomal anomalileri bulunan olgularda malignite oranı sağlıklı bireylere göre yüksektir (15, 27).

Down sendromlu olgularda lösemi insidansı, sağlıklı bireylere göre 16-30 kat daha fazladır (26, 28, 29).

Çocukluk döneminde Down sendromlu olguların; % 30,2'si AML'ye, % 69,8'i ALL'ye, yeni doğan dönemde ise % 80 AML'ye, % 20 ALL'ye dönüş olduğu bildirilmiştir (9, 11, 27).

Aynı şekilde, Klinefelter ve Turner sendromlu olgularda da eksik veya fazla kromozomların neden olduğu gerek hormonal gerekse genetik etkilerden dolayı çeşitli tip kanserlere yakalanma oranlarının sağlıklı bireylere göre katlarca fazla olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (9, 10, 27).

Otozomal resesif kalıtım gösteren Ataksi telenjiektazi (AT), Kseroderma pigmentozum (KP), Fanconi anemisi (FA), Bloom sendromu (BS) gibi durumlarda, çeşitli tip kanser vakalarında önemli artışlar gözlemlenmiştir. BS'lu hastalarda; homolog rekombinasyon eğilimi artar, quadriradial formasyon, SCE sıklığında artış vardır. FA hastalarda; somatik hücrelerde kromozom aberrasyonlarında genel bir

artış vardır, SCE sıklığı normaldir. AT hastalarında ise strüktürel kromozom aberrasyonlarında artış vardır, stabil düzensizlikler bulunur fakat normal SCE (Sister Chromatid Exchange) görülür.

KP hastalarında temel anormallik DNA tamir mekanizmasındaki azalmadır. Görüldüğü gibi kromozomal yapıdaki anormallik ve kararsızlıklar bu hastaları normal bireylere oranla daha hızlı kanserojen oluşumuna sürüklemektedir (9, 11, 15). Bazal şartlarda bu kromozom kırık sendromlarında kromozomal aberrasyonlar normal seviyededir, fakat sistem uygun mutajence baskı altına alınır o zaman anomalilerde bir artış olmaktadır.

#### **2.1.4. Lösemilerin Sınıflandırılması**

Lösemiler, köken aldıkları hücre grubuna, semptomlarına, ortaya çıkış ve ilerleme hızlarına ayrıca klinik seyirlerine göre gruplara ayrılırlar. Lösemiler ortaya çıkış hızlarına göre öncelikle akut ve kronik olmak üzere 2 ana gruba ayrılırlar. Her iki grup da kendi içinde köken aldıkları hücre grubuna göre ikişer alt sınıfa ayrılır. Böylece lösemiler 2 ana başlıkta 4 grupta incelenir.

1. Akut Myelositer Lösemi
2. Akut Lenfositer Lösemi
3. Kronik Myelositer Lösemi
4. Kronik Lenfositer Lösemi

Her bir lösemi tipi de kendi içinde gelişiminin herhangi basamağında yada evresinde olduğuna göre subtiplere ayrılırlar.

##### **2.1.4.1. Akut Lösemiler**

Akut lösemiler (AL), hematopoietik dokuların malign, ilerleyici ve tedavi edilmedikleri takdirde genellikle 6 ay içinde ölümlle sonuçlanan bir grup hastalığıdır. Hastalık sitopatolojik olarak kemik iliği ve çevre kanında iri, olgunlaşmamış ve anormal hücrelerin bol miktarda bulunması ile karakterizedir.

AML'de lösemik hücreler myeloblast ve premyeloblast basamağından öte olgunlaşamadıkları için, farklılaşmamış ya da çok az farklılaşmış immatür hücreler şeklinde kendilerini gösterirler.

Bu anormal hücreler kemik iliğini infiltre ederek diğer hücrelerin yerini alır, kemik iliğinin normal yapısını tamamen bozabilir. Hastaların %10'unda lökosit sayısı normal iken, %80-90'ında periferik yaymada blastlar görülür (9, 10).

Blast oranı prognozu belirleyen en önemli faktördür. Geliştikleri hücre grubuna göre myeloid veya lenfoid olarak 2 alt gruba ayrılırlar. Bazı hastalarda lösemik transformasyon myeloid kök hücre düzeyinde bazı hastalarda ise yönlendirilmiş hücrelerde meydana gelmektedir (16, 30, 31).

AL'ler prognostik faktörlere ve morfolojisine göre ALL ve Akut non-lenfoblastik lösemi (ANLL)=AML olmak üzere 2 gruba ayrılır. AL'ler her yaşta görülebilen hastalık olup, çocuklarda 1-14 yaşlar arası ölümcüldür ve kendini ALL tipinde gösterirken, erişkinlerde ise daha sık olarak AML tipinde görülmektedir. Yaş ilerledikçe AML sıklığı artarken ALL sıklığı azalır. Kan tabloları ise, beyaz küre sayısı olguların % 80-90'ında artmış olup  $20000/\text{mm}^3$  den fazladır.

Bu ana gruplarda da bazı alt gruplar vardır. Bu alt gruplar muhtemelen hematopoietik öncülerin hangi aşamada lösemik hale geldiklerini yansıtmaktadır. Ayrıca sınıflandırmada, hematopoietik sistemde anormal proliferasyon olan hücrelerin morfolojik, immünolojik ve sitokimyasal özellikleri dikkate alınmalıdır.

Burada kullanılan yararlı bir sınıflandırma sistemi French-American-British (FAB) çalışma grubunun yaptığı sınıflandırmadır. Sınıflandırma esas olarak rutin boyalarla boyanan preparatların morfolojik incelenmesine ve sitoşimik reaksiyonlara dayanmaktadır (9, 10, 15).

#### **2.1.4.1.1. ALL: Akut Lenfoid Lösemiler**

ALL, lenfoid ana hücrelerin klonal ekspresyonu sonucu gelişir. Malign transformasyon farklılaşmasının değişik safhalarında gelişebilir. Akut myeloblastik lösemi blastları ile karşılaştırıldığında lösemik ALL blastlarının farklılaşma ve olgunlaşma kapasitesi oldukça sınırlıdır.

Klonalite, kromozom analizleri, yüzey proteinleri analizi, immunoglobulinler ve T-hücre reseptörlerini kodlayan genlerin yeniden düzenlenme analizleri ile

gösterilebilir. Kemik iliğinde blast sayısı arttıkça hematopoez geniş ölçüde baskılanır. Anemi, lökopeni, trombositopeni ve buna bağlı olarak da solukluk, enfeksiyonlar, kanama ve kemik ağrıları ile başlar. Lösemik hücrelerle infiltrasyon sonucu birçok hastada lenfadenopati ve hepatosplenomegali görülür. Testiküler infiltrasyon ve MSS'nin lösemik infiltrasyonu hastaların % 10'unda görülür. Periferik kan tetkiklerinde vakaların % 50'sinde  $10 \times 10^9/L$  üzerinde lökositoz ve % 80 vakada trombositopeni ( $100 \times 10^9/L$  altında) görülür. Lösemik blastlar periferik kan yaymasında görülmeyebilir, kemik iliği aspirasyonu gereklidir. ALL'de lenfoblastlar dar, sitoplazma agranülerdir (32).

FAB sınıflamasına göre lösemik hücrelerin L1, L2 ve L3 olmak üzere 3 subtipi vardır. Bu sınıflamada daha çok sitolojik özellikler baz alınmıştır. L1 alt tipi daha çok çocuklarda görülmekte; monomorfik, yuvarlak çekirdekli, dar sitoplazmalı, küçük ve orta büyüklükte blastlar, homojen nükleer kromatin yapısı ve belirsiz nükleoluslar dikkat çekicidir. L2 alt tipine erişkinlerde sıklıkla rastlanır. Blastlar daha büyük, daha geniş sitoplazmalı ve değişken görünümüdür. Düzensiz kenarlı çekirdek yapısı ve belirgin nükleuslar görülmektedir. L3 tip çok nadir görülür, hücreler koyu bazofilik sitoplazma ve sitoplazmik yağ içeren vakuoller ile karakterizedir. Morfolojik sınıflama giderek önemini kaybetmektedir. Bunlar yerine, monoklonal antikorların kullanıldığı yüzey belirleyici analizi, sitoplazmik belirleyiciler, kromozom yapısı ve yeniden gen düzenlenmelerinin analizine başvurulmaktadır. Bu çalışmalar ALL'nin sürekli olarak tanımlanan yeni alt grupları ile büyük orandaki heterojenitesini ortaya koymuştur.

Özellikle ALL'nin AML'den ayırımında ve kendi içinde alt tiplere ayırımında monoklonal antikorlardan yararlanılır (33).



**Tablo 1:** ALL ve AML'nin immünofenotipik olarak değerlendirilmesi (33).

AML	ALL
CD 11b (M0,1,2,4,5)	CD 10 (Common ALL antigen=CALLA)
CD 13 (M0-5)	CD 2, CD 5, CD 7 (T-hücreli ALL)
CD 14 (M1,2,4,5)	CD 3 (T)
CD 15 (M2-5)	CD 4, CD 8 (T hepler)
CD 33 (M0-7)	CD 5 (B, T)
CD 41 (M7)	CD 19 (B)
CD 61 (M7)	CD 20 (B)

(CD: Cluster of Differentiation)

Kromozomal çalışmalarda da prognostik önemi olan yapısal ve sayısal değişiklikler tanımlanabilmektedir. Ayrıca özgül yapısal sitogenetik çalışmalar normal hücre fonksiyonları ve onkogenezde rol oynayan genlerin belirlenmesini sağlamıştır (34). Yeni WHO sınıflaması ALL subtiplerini fenotipik ve sitogenetik özelliklerine göre sınıflamaktadır. Yani FAB sınıflaması bu sınıflamada kullanılmaktadır.

L1 tip ALL: Küçük ve homojen hücrelerden oluşur. Hücrelerin %25'i T lenfositlerdir. Nükleus membranı düzenlidir. En sık görülen kromozom anomalileri t(9;22), t(1;19), t(4;11), t(8;14), 6q ve 9p anormallikleridir.

L2 tip ALL: Hücre sitoplazması daha geniş olup, bir veya daha fazla belirgin nükleolus vardır. Hücrelerin %25'i T lenfositlerdir. Karşılaşılan kromozom anomalileri t(9;22), t(4;11), 6q, +21, +8, i(17q), 7p-, 11q- dir (35, 36).

L3 tip ALL: Hücreler büyük ve homojendir. ALL'nin %5'inden fazlası bu tiptir. Pek çok hücre olgun B lenfositlerden köken alır (11, 19, 20, 37-39). Kromozom anomalileri t(8;14), t(8;22), t(2;8), 1q-, +6, 6q-, 8q+ dir.

ALL 5 yaşın altındaki çocuklarda daha sık görülür (35, 40, 41). Erişkinlerde ise ALL remisyon oranı ve hayat süresi çocuklara göre daha azdır.

t(9;22) (q34;q11) ALL'de sık gözlenen bir düzenlemedir. Yaklaşık yetişkin ALL'lerin %30'unu çocuk ALL'lerinde %5'ini kapsar. Sitogenetik düzeyde kopma noktaları KML'ye benzemektedir (42). ALL vakalarında BCR (Breakpoint Cluster Region)'nin kırılma noktası Major BCR olarak adlandırılan bölgeye yerleşmektedir.

Buna uyan protein p210 proteindir veya minör BCR olarak adlandırılan bölgeye yerleşmektedir ki buna uyan protein de p190 proteindir. Oysa KML vakalarının büyük çoğunluğunda Major BCR bölgesinde kırılma olmakta ve ilgili protein p210 olmaktadır (43,44).

**Tablo 2:** ALL’de Sayısal ve Yapısal Anomaliler ve Prognastik Önemleri (33).

Hiperdiploidi	(51-65 kromozom); en sık rastlanılan sayısal kromozomal anomalidir ve iyi prognoz göstergesidir.
Tetraploidi	(82-94 kromozom); kötü prognoza işaret eder.
Hipodiploidi	(<46 kromozom); kötü prognoza işaret eder.
Psödodiploidi	(yapısal anomali gösteren 46 kromozom); kötü prognoza işaret eder.
t(12;21)	Periatrik öncül B-ALL’lerin %25’i, TEL/AML1 gen değişimi, iyi prognoz, genellikle standart sitogenetik analiz ile yakalanmaz, moleküler yöntemlerle bakılmalıdır.
t(9;22) Ph kromozomu	Pediyatrik ALL’lerin %5’i, erişkin ALL’lerin %30’u, BCR/ABL gen değişimini taşır. Kötü prognoz; sıklıkla miyeloid antijen ekspresyonu ile birlikte dir.
t(1;19)	Pediyatrik ALL’lerin %5’i; B-öncül hücre fenotipi, E2A/PBX1, daha önce kötü prognoza işaret ederken agresif tedavi sonrası prognoza katkısı anlamlılığını yitirmektedir.
t(v;11q23)	Pediyatrik ALL’lerin %4-8’i, MLL gen değişimi; birçok eşdeğeri, infantil ALL’de sıktır (1 yaş); kötü prognoz; sıklıkla CD10, CD15 <sup>+</sup> fenotip
t(8;14), t(2;8), t(8;22)	Pediyatrik ALL’lerin <% 5’i, c-MYC onkogeni; immünoglobulin, Burkitt hücreli lösemi ile ilişkilidir; agresif genleri kemoterapi öncesi dönemde kötü prognoz göstergesiydi; agresif tedavi ile daha az önemli, daha iyi sonuçlar alınır.

#### 2.1.4.1.2. AML: Akut Miyoleid Lösemi

Akut myeloid lösemi (AML) hematopoetik ana hücrelerinin klonal çoğalması ile oluşur. Lenfoid dönüşüm ana hücre gelişiminin değişik evrelerinde ortaya çıkar. Çoğunlukla tek yönlü farklılaşabilen (unipotent) ve az oranda da çok yönlü farklılaşabilen (pluripotent) stem hücrelerinden gelişir. Klonalite ve stem hücrelerinin bozuklukları değişik kromozom teknikleri ile gösterilebilir. Bu tekniklerle AML'de tam bir farklılanma bloğunun söz konusu olmadığı gösterilmiştir. Çok sayıda AML vakasında kromozom anomalilerine rağmen lösemik hücrelerin granülosit, eritrosit, monosit ve megakaryositlere farklılaşmasının devam ettiği görülmektedir. Böylece AML farklılaşma hiyerarşisinin devam ettiği bir malignensi olarak tanımlanır.

Bununla birlikte, stem hücrelerde farklılaşmaya uğramış hücrelerin bir bölümünde değişiklikler olmuştur. AML, değişik hücre serilerinin blastik hücre birikimidir. Lösemik blastlar normal hematopoezi baskılamakta,  $10^{11}$  ile  $10^{12}$  hücre içeren lösemik kitle oluşana kadar hasta anemik, nötropenik veya trombositopenik olmaz. Solukluk, enfeksiyon, kanama en sık rastlanan belirtilerdir. AML'de periferik kan incelemesi çoğu hastada tanı koydurucudur. Lökosit sayısı hastaların % 10-20'sinde normal ve %30 hastada düşük olabilir.

FAB grubu, morfolojik ve sitokimyasal kriterlere dayanan yararlı bir sınıflandırma oluşturmuştur. Kromozomal analizler, monoklonal antikorlar ile immünofenotiplendirme AML'nin sınıflandırmasını geliştirmiştir. Monoklonal antikorlar ile hücre orijini, farklılaşma derecesi ve fonksiyonu ile ilgili özellikler araştırılır.

65 yaş altı AML hastalarında uzun süreli hastalısız yaşam oranı % 40'lar civarındadır. Daha ileriki yaştaki hastalarda ve özellikle sekonder AML olgularında prognoz daha kötüdür. Kromozom analizi, hücre kaynağı, morfolojisi ve muhtemel patogenezi ile ilişkili yapısal anormallikleri ortaya koyar. Bazı kromozomal değişiklikler prognozla ilişki gösterir.

Sitogenetik özelliklerine göre AML tanılı hastalar 3 farklı grupta incelenir.

**İyi prognozlu grup:** t(8;21), t(15;17), inv(16) veya t(16;16) sitogenetik bozuklukları gösteren ve daha önce hematolojik hastalığı bulunmayan ve AML'si tedaviye bağlı gelişmemiş 60 yaş altı hastalar bu gruptadır. Tam remisyon oranları % 85'in üzerindedir.

**Kötü prognozlu grup:** ikiden fazla kromozomda sitogenetik anomali, kromozom 5 veya 7 monozomisi, 5. kromozom uzun kol delesyonu veya 3. kromozomun uzun kolunda anomali gösteren AML'li hastaları kapsar. Bazen kromozom 11q23 (MLL geni) anomalileri de bu grupta sayılır. Tanımlanan bu bozukluklar sıklıkla ileri yaştaki hastalar ve sekonder AML'de bulunur. Tam remisyon oranları düşüktür.

**Standart (orta riskli) prognozlu grup:** İyi ve kötü prognoz grubundaki sitogenetik değişikliklerin dışında karyotip gösterirler (33). Ve yapısal AML'de sayısal ve yapısal anormalliklerin prognostik önemi Tablo 4'de gösterilmiştir.

Ayrıca FAB grubunun AML ile ilgili yaptığı sınıflandırma Tablo 3'de belirtilmiştir.

**Tablo 3:** FAB Grubunun AML Sınıflaması

<b>Alt tip</b>	<b>Özellikler</b>	<b>Yorum</b>
M0: Minimum farklılaşma gösteren grup	Blastların <%3'ünde MPO veya SB pozitifdir.	AML'nin % 5-10'udur, ALL'ye benzer
M1: Olgunlaşma göstermeyen grup	Miyeloid hücrelerin >%90'ı blastik hücrelerden oluşur; blastların >%3'ü MPO ve SB ile boyanır.	AML'nin %10-20 si
M2: Olgunlaşma gösteren AML	Myeloblastların oranı >%30'dur.	AML'nin % 30-45'i T(8;21) %25 olguda pozitifdir
M3: Akut promiyelositer lösemi <ul style="list-style-type: none"><li>Hipergranüler varyant</li><li>Mikrogranüler varyant</li></ul>	Hipergranüler (%75): büyük stoplazmik granüller promiyelositler baskındır. Mikrogranüller (%25): küçük granülleri olan promiyelositler	AML'nin % 5-10'u 17. kromozom üzerindeki RAR-alfa ile ilişkilendirilir.
M4: akut miyelomonositik Alt tip: İlikte anormal eozinofillerin bulunduğu AMML (M4Eo)	Çevresel kanda monositoz hakimdir. M4Eo: kemik iliğinde büyük bazofilik granüllü anormal eozinofiller bulunur.	AML'nin % 15-25'i M4Eo varyant inv(16) veya t(16;16) ile ilişkilendirilmiştir
M5: Akut monositik lösemi <ul style="list-style-type: none"><li>M5A</li><li>M5B</li></ul>	M5A: Kİ hücrelerinin >%80'i monoblastlardan oluşmuştur. M5B: Promonositler ön plandadır.	M5A, AML'nin % 5-8'i M5B, AML'nin % 3-6'i
M6: Akut eritrolösemi	Kİ hücrelerinin >%50'si eritroid öncüllerden >30'u miyeloblastlardan oluşur.	AML'nin %5'i
M7: Akut megakaryositik lösemi	Miyeloblastların >%50'si megakaryositik antijenleri eksprese eder.	AML'nin % 8-10'u

(MPO: miyeloperoksidaz, SB: Sudan Black, Kİ: kemik iliği ) (PDQ Hematoloji, 33)

**Tablo 4:** AML’de Sayısal ve Yapısal Anomaliler ve Prognostik Önemi (33).

Sayısal kromozomal anomaliler	İleri yaşta görülen AML’ler ve sekonder AML’de, kötü prognozlu
Kromozom 7 delesyonu	İleri yaşta görülen AML’ler ve sekonder AML’de, kötü prognozlu
Kromozom 5 veya uzun kolu delesyonu	İleri yaşta görülen AML’ler ve sekonder AML’de, kötü prognozlu
Kromozom 8 anomalisi ve diğerleri	İleri yaşta görülen AML’ler ve sekonder AML’de, kötü prognozlu
t(8;21)	AML1/ETO gen değişimi, AMLM2’de görülür, iyi prognozludur
inv(16), t(16;16)	MYH11 geni 16p üzerindedir. M4Eo’de görülür, iyi prognozludur.
t(15;17)	PML/RAR-alfa gen değişimi, AMLM3 subtipinde görülür, iyi prognozlu
t(11q23;var)	MLL geni 11q23 üzerindedir, AMLM5 subtipinde görülür. Kötü prognozludur.

#### 2.1.4.2. Kronik Lösemiler

##### 2.1.4.2.1. KLL: Kronik Lenfositler Lösemi

Genellikle orta yaşta ve sıklıkla 60 yaşın üstünde görülür. KLL, matür lenfositlerin klonal ekspresyonundan kaynaklanır. Hastaların % 95’inde hastalık B-lenfosit kaynaklıdır. Uzun yaşam süresine sahip, küçük, olgun lenfositlerin kemik iliği, periferik kan ve lenfoid organlarda artmış üretimleri ile lenf bezleri, dalak ve karaciğer dokularında büyüme ve deviyeye infiltrasyon olur.

T hücrelerin yanı sıra B hücrelerin fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak hastalarda hastalık seyrinde humoral ve hücresel immün yetmezlik görülür.

KLL tanısı; birkaç hafta aralıklarla yapılan 2-3 sayımda lökosit sayısının  $10 \times 10^9/L$  veya daha fazla olması ve kemik iliği aspirasyonunda % 30'dan fazla lenfosit saptanmasıyla konur.

Tüm lösemiler arasında en sinsi ve yavaş gidişli lösemi tipidir. KLL, genellikle belirtisizdir. Belirti görüldüğünde ise sıklıkla spesifik olmayan kolay yorulma, iştahsızlık ve kilo kaybı görülebilir. Bakteriyel enfeksiyonlara eğilim artmıştır. Çoğu hasta tanısının konulmasında itibaren 10 yıldan fazla yaşar. Ortalama yaşam süresi 4-6 yıldır.

KLL oluşumu üzerine genetik faktörler, bağışıklık sistemi yetmezilikleri ve kromozomal değişiklikler zemin hazırlar (45). İmmüfenotipik olarak değerlendirildiğinde KLL'nin büyük ölçüde karakteristik bir immüfenotipi vardır. B hücre belirteçlerini; CD19, CD20, CD23 ve T hücre belirteci olan CD5 ekspresyonu gösterilir. Sitogenetik olarak değerlendirildiğinde KLL'de standart sitogenetik analiz yapmak güçtür çünkü hücrelerin mitoz hızı düşüktür. Standart kromozom analizinde olguların yaklaşık yarısında sitogenetik anomaliler görülür. En sık gözlenen bozukluk trizomi 12'dir. Ayrıca del(13q) ve del(14q) bozuklukları da sıkça görülür (33).

### **Sınıflandırma**

Bugün kullanılan Rai ve Binnet (34) sistemlerine göre bir sınıflandırma yapılmıştır. Her iki sistemde de evrelendirme, kan lenfosit ikilenme zamanı, kemik iliği histolojisi veya lösemik hücrelerin karyotipi gibi birbirinden bağımsız prognostik parametreler göz önüne alınmaktadır. Bu evrelendirme sistemlerinden Rai sıklıkla kullanılır.

Rai evrelendirme sistemi (34).

<b>Evre</b>	<b>Klinik Özellikler</b>	<b>Yaşam (Ay)</b>
0	Lenfositoz(kan veya kemik iliği).....	120 aydan fazla
1	Lenfositoz+lenf büyüklüğü.....	95 aydan fazla
2	Lenfositoz+hepatomegali.....	72 aydan fazla
3	Lenfositoz+anemi.....	30 aydan fazla
4	Lenfositoz+trombositopeni.....	30 aydan fazla

#### 2.1.4.2.2. KML: Kronik Myeloid Lösemi

KML hematopoetik kök hücresinin klonal ekspansiyonundan gelişir ve malign klonal bir hastalıktır. Ekspansiyon, myeloid elemanların proliferasyonu - apoptozisin azalması ile birlikte- ve adhezif özelliklerinin kaybı ile karakterize klonal hematopoetik kök hücre hastalığıdır. Genellikle myeloid, monositik, eritroid, megakaryositik, B lenfoid, ve nadiren de T lenfoid serilerinin tümünü içerir.

KML, spesifik karyotipik anomalinin saptandığı ilk hastalıktır. KML tüm lösemilerin % 20'sini oluşturur. Her yaşta görülmekle birlikte özellikle ileri yaş grubu hastalığıdır. Erkeklerde kadınlara göre daha sık görülür (1, 5, 15, 46, 47). Nowel ve Hungerford 1960 yılında KML hastalarında G-grubu kromozom anomalileri tanımlanmıştır. Fledelfya (Philadelphia=Ph) kromozomu olarak adlandırılan bu yeni oluşum 9 ve 22 nolu kromozomlar arasındaki resiprokal translokasyon sonucu oluşur. Bu translokasyonun kromozom 9q34' teki 3' ABL gen bölgesinde gen segmentini, kromozom 22q11' deki 5' BCR gen segmentine ekler. Böylece hibrit BCR-ABL geni oluşur (48, 49). Bu genetik değişiklik 210 kdalton ağırlığında füzyon proteini tirozin kinaz aktivitesine sahip bir proteini kodlar. Genlerin füzyonları ile tirozin kinaz normalden daha uzun sentezlenir. Bu genin oluşturduğu protein ayrıca hemotopoetik hücrelerin değişiminde rol oynar (50, 51). BCR-ABL füzyon proteinlerin yanısıra 190-230 kd uzunluktaki ek proteinler de moleküler olarak gözlemlenmiştir.

Hastalığın klinik seyri stabil veya kronik faz, akselere faz ve blastik faz olarak 3 evreye ayrılabilir. Tanı konulduktan sonra tedavisiz yaklaşık 3-5 yıl sonra akselere veya blastik faza ilerler (52, 53). Bu fazları kısaca açıklarsak;

#### **Kronik Faz**

Periferik kanda lökositöz,  $20 \times 10^3/\text{mm}^3$  ile  $500 \times 10^3/\text{mm}^3$  arasında değişmek üzere genellikle  $130 \times 10^3/\text{mm}^3$  ile  $225 \times 10^9/\text{L}$  arasındadır. Nötrofil seri elemanları ağırlıkta olup özellikle parçalı, bantlı, metamyelosit ve myelosit egemenliği vardır.

Myeloblast oranı % 3'ten azdır. Mutlak bazofili genellikle vardır ve ezonofili de eşlik edebilir. Mutlak monositöz vardır, trombositöz genellikle vardır bazı olgularda  $1000 \times 10^3/\text{mm}^3$ 'ün üzerindedir.



Kemik iliği bulgularında hiperselülerite gözlenir. Megakaryositler artmış ve normalden hafifçe küçük, küme yapmış olarak görülürler. Eritroid seri elemanları normal veya azalmıştır.

Sitogenetik inceleme sonucu Ph kromozomunun varlığı tanıyı doğrular. Standart sitogenetik yöntemler ile hastaların % 85-95'inde Ph kromozomu tespit edilir ve çok nadir hastada Ph kromozomu bulunmaz.

Hastaların % 5-10'unda BCR geninin yeniden düzenlenmesini sağlayan varyant translokasyonlar saptanmıştır.

### **Akselere Faz**

Blastik faza geçiş ani veya yavaş olabilir. Genellikle fazın blastik faza ilerlemesi ilk yıl % 5 ve sonraki yıllarda % 20-25 dir. Periferik kanda blast % 5-30, kemik iliğinde ise % 10-30 arasındadır. Belirgin myelofibrozis vardır. % 20'nin üzerinde bazofili vardır, hemoglobin düzeyi 7 gr/dl altındadır. Trombosit sayısı  $100 \times 10^3 / \text{mm}^3$  altındadır ( $150-400 \times 10^3 / \text{mm}^3$ ) yani anemi ve trombositopeni gelişir (54).

### **Blastik Faz**

Beyaz küre sayısı tedavi ile zorlukla kontrol altına alınabilir. Anemi ve trombositopeni derinleşir. İlerleyici splenomegali gözlenir. Kemik iliği periferik kanda myeloblast oranı % 30'u geçer. Periferik kan veya kemik iliğinde bazofil+eozinofil % 20'den fazladır. Devamlı trombositoz veya trombositopeni olabilir. Hastaların % 70-80'inde ikincil kromozom anomalileri gelişir (2. Ph, trizomi 8, iso(17q), +19 ve Y kaybı) (54).

## **2.2. Lösemik Dönüşümün Gösterildiği Metodlar ve Mutasyon Tarama Testleri**

Lösemi olgularında kromozomal anomaliler klasik sitogenetik, Floresan In-Situ Hibridizasyon (FISH), polimeraz zincir reaksiyonu gibi yöntemler ile araştırılmaktadır (55).

### **2.2.1. Klasik Sitogenetik Analiz Yöntem**

Yaşayan ve çekirdeği olan, bölünebilme yeteneğini kaybetmemiş tüm dokular kromozom çalışmalarında kullanılmaktadır. Solid dokularda farklı yapılar tercih edilse de lösemilerde genellikle kemik iliği olmak üzere periferik kandan da inceleme yapılabilmektedir. Sitogenetik çalışmalar için gerekli olan metafaz kromozomlarının eldesi için ya direk yöntem kullanılır ki bunun için spontan mitotik aktivitesi olan kemik iliği hücreleri gibi hücreler tercih edilir yada kültür yöntemi kullanılır. Kültür yönteminde periferik kan ve diğer dokular kullanılabilir. Ancak incelenebilecek metafaz sayısını arttırmaya yönelik olarak periferik kandan da direkt yöntem ile metafazlar elde edilmektedir.

Kültür yönteminde ordamdaki hücreleri (lenfosit) uyararak mitozaya sokmak için Phytohaemagglutinin (PHA) kültür ortamına eklenir. Ve ideal kültür süresi 37°C'de 72 saattir. Kültüre hücrelerin metafazda durdurulması ortama kolşisin ilavesiyle olmaktadır ki bu madde iğ ipliklerin protein yapısını bozmak suretiyle fonksiyon yapmaktadır. Daha sonra hacimce çekirdek ve kromozomları genişletmek için hipotonik solüsyon ile muamele edilen hücreler en son olarak fiksatif ile fikse edilerek daha kaliteli metafazlar elde edilmektedir. Bundan sonraki aşama çeşitli kromozomların çeşitli bantlama teknikleri kullanmak suretiyle farklı açılardan değerlendirilmesini içermektedir. Düz olarak boyanan kromozomlar sadece sayısal anomaliler değerlendirilebilecek iken; GTG (Giemsa-Tripsin–Giemsa), NOR (Nükleer Organiser Region), HRB (High Resolution Bantlama), RBG (Reverse-Banding Giemsa), SCE (Sister Chromatid Exchange) gibi farklı teknikler ile kromozomlar farklı açılardan değerlendirilmektedir.

### **2.2.1.1. GTG Bantlama Tekniği**

Rutin sitogenetik laboratuvarların birçoğunda kullanılan teknik GTG bantlama tekniğidir. Yöntemde, kromozomal proteinler olan histonlar ve nonhistonlar tripsin ile denatüre edilerek açıkta kalan DNA'nın Adenin ve Timin bazlarınca zengin tekrarlarından oluşan bölgelerine Giemsa'nın girmesi sonucu bu bölgeler koyu boyanmakta ve heterokramatin bölgeler olarak adlandırılmaktadır. Boyanmayan bölgeler ise ökromatin bölgelerdir ve yapısal genleri içerir. Bu işlem sonunda her kromozom çiftine özgü açık ve koyu bantlar görünür hale gelmektedir. 1995'deki konferansta kabul edilen ISCN (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature) sınıflandırmasına göre kromozomlar değerlendirilmektedir ve karyotip yazımında aynı toplantıda standardize edilen yazım kuralları ile yapılmaktadır (56, 57).

Bu sitogenetik analiz yöntemi ile genomun genel görünümü belirlenmektedir. Kanser genetiğinde de tanının konulması, takibi, tedavi ve hastalığın ilerlemesi ile ortaya çıkabilecek ikincil kromozomal düzensizliklerin tespitine imkan vermektedir (58).

### **2.2.1.2. Mikronükleus Tekniği**

Yine bir diğer mutasyon tarama testi olan Mikronükleus tekniği de lösemili vakaların değerlendirilmesinde kullanılabilir. KML'li hastalarda mikronükleus analizinin yapıldığı bir doktora tezi çalışmasında, KML'li grupta kontrol grubuna göre daha yüksek oranda mikronükleus tespit edilmiştir (59). Mikronükleus tekniğinde kromozomları görüntülemeye yönelik bir çalışma yapılmamakta, daha kaba bir inceleme yapılmaktadır.

### **2.2.1.3. Kardeş Kromatid Değişimi Tekniği**

Çeşitli mutajen ve karsinojenlerin hem in vivo, hem de in vitro koşullar altında neden olduğu DNA hasarını saptamayı sağlayan sitogenetik yöntemlerden birisi de Kardeş Kromatid Değişimi (KKD)=Sister Chromatid Exchange (SCE)'dir. KKD, DNA'daki çok küçük harabiyetlerin bile hassas göstergesi olarak kabul edilir. DNA hasarının ve indüklenmiş DNA tamirinin gösterilmesinde en basit, duyarlı ve kısa zamanda sonuç veren bir yöntem olarak kullanılmaktadır (60, 61).

KKD yeni mutajenik ajanların duplike olmuş kromatid ve eski kendi kardeş kromatidi arasında kromozom morfolojisi değişmeksizin simetrik olarak özdeş segmentlerin değişimidir (1).

KKD çoğalmakta olan hücrelerde spontan olarak meydana gelmekte, özellikle kromozom hasarı, instabilitesi ve DNA tamir bozukluğu sendromlarında duyarlı bir parametre olarak kullanılmaktadır (60).

Son yıllarda yapılan genetik çalışmalar, kanserin genetik rolünün ağır basan bir hastalık olduğu kabul edilmektedir. Bu hastalığın ortaya çıkmasında kimyasal, fiziksel, viral ve kromozal düzensizlikler gibi birçok faktör de rol oynamaktadır. Kanser dünyadaki ölümlerin % 20'sinden fazlasını oluşturmaktadır. Sitogenetik olarak yapılan çalışmalarda, bazı kanser tiplerine özgü belirli kromozomlarda sayısal ve yapısal anormallikler ve marker kromozomlar bulunmuştur.

Başta hematolojik sistemle ilgili kan hastalıkları ve kanserleri olmak üzere akciğer, serviks, kolon, meme, over, mesane ve rektum kanserlerinde bu yöntemle yapılan çalışmalar sonucunda, kontrollere göre KKD oranlarında artışlar saptanmıştır. Aynı zamanda kanser vakalarında tedavi amaçlı kullanılan radyoterapi ve çeşitli kemoterapötik ilaçların hücrelere verdiği zararın kalıcı etkisi, periferik kan lenfosit hücrelerinde kromozom kırıkları ve KKD'deki değişimler ile gösterilmiştir.

Kardeş kromatid değişim analizi, hassas genotoksik testlerden biridir. Değişik mutajenlere maruz kalan bireylerin periferik kan lenfositlerinde (PBL) *in vivo* ve *in vitro* olarak çok fazla KKD çalışması yapılmıştır. KKD, bireylerde somatik hücrelerde bilinen ya da potansiyel mutajen ve karsinojenlere maruz kalmanın etkilerini saptamada kullanılan bir yöntemdir.

### **Lösemi ve Lenfomalarda Kardeş Kromatid Değişimi**

1.Malign Lenfoma: Kurvik ve arkadaşları 47 malign lenfomalı olgu ve 40 kontrol bireyin periferik kan lenfositlerinde spontan KKD düzeyini araştırmışlar ve malign lenfomalı olgularda kontrollere göre KKD sıklığının oldukça yüksek olduğunu gözlemişlerdir. Terapi gören 13 hastada ise özellikle 15. haftadan sonra KKD'nin oldukça azaldığı saptanmıştır (62). Benzer bir çalışma Crossen ve arkadaşları tarafından yapılmış ve malign lenfomalı olguların periferik kan

lenfositlerinde KKD sıklığı açısından kontrol grubuna göre bir fark gözlenmemiştir (63).

2.Kronik Myeloid Lenfoma (KML): Yapılan bir çalışmada 40 KML’li olguda ve 38 sağlıklı kontrol bireyde kemi iliğinde spontan KKD düzeyine bakılmış ve lösemili bireylerin hücrelerinde KKD sıklığının azaldığı gözlenmiştir (64). Benzer bir çalışma Chang ve arkadaşları tarafından da yapılmış ve KML’li olguların periferal kan lenfositlerinde KKD oranları kontrol grubuna yakın bulunmuştur (65).

3.Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL): Otter ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ALL’li hasta gruplarının periferal kan lenfositlerinde spontan KKD düzeylerine bakılmış ve kontrollere göre oldukça yüksek oran gözlenmiştir (66).

4.Hodgkin’s Hastalığı: Thelma ve arkadaşları 16 Hodgkin’s hastalıklı olgu 8 kontrol birey ve 28 tedavi görmüş olgu ile bir çalışma yapmışlardır. Tedavi gören gruba MVPP (Mustin/Vinblastin/Prednisolon/Prokarbazin) karışımı kombine kemoterapi uygulanmıştır. Grupların periferal kan lenfositlerinde, spontan KKD bakımından bir fark bulunmamıştır. MVPP terapisinin 2. kez uygulanmasından sonra ise maksimum düzeyde KKD gözlemişlerdir (67).

### 2.2.2. Moleküler Sitogenetik Yöntemleri

Belirli bir hücre popülasyonu veya dokudan izole edilen nükleik asitlerin *in vitro* hibridizasyonu farklı DNA ve RNA gruplarının belirlenmesini sağlamakla birlikte, incelenen spesifik dizelerin hücreler arasındaki dağılımları ya da kromozomlar üzerindeki yerleri hakkında bilgi verememektedir. Bunun için hibridasyonunun doku yada hücrede yapılması gerekmektedir. In Situ Hibridizasyon (ISH) adı verilen bu teknikte spesifik DNA veya RNA dizileri doku kesitlerindeki her hücrede kromozom preparasyonlarında veya interfaz hücrelerinde morfolojik olarak göstermektedir. Bu teknik nükleik asitlerin kendi doğal hücre ortamında incelenmesine olanak vermesi ile diğerlerinden ayrılır (68). Sitogenetik ile moleküler genetik arasında köprü oluşturur ve sitogenetiğe tamamlayıcı olarak çok hızlı gelişmiştir. Çok sayıda özgün DNA dizilerinin klonlanması son yıllarda sağlanmış bu sayede belirli bölgelere özgün tek iplikli DNA oligonükleotidleri (prob) elde

edilmiştir. Bu problemlerin radyoaktif yada non-radyoaktif maddeler ile işaretlenerek DNA'nın uygun koşullarda komplementer oluşturma özelliğine dayanarak sitolojik preparatlar üzerinde, interfaz nükleuslarında ya da metafaz kromozomlarında hibridizasyonu sayesinde bu özgün bölgeler görüntülenebilmektedir. Bu teknik gen lokalizasyonunda kullanıldığı gibi bantlama teknikleri ile tanımlanamayan çok sayıda anormal kromozom çeşidinin aydınlatılmasında vazgeçilmez bir teknik haline gelmiştir. 1991 yılında fluoresanlanmış nükleotid analoglarının direkt ve indirekt İn Situ Hibridizasyon yöntemleri ile kullanılmaya başlanması ile Fluoresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) adı verilen bir yöntem geliştirildi. DNA'nın çift sarmal yapısı normal koşullarda stabildir, fakat ısı ve formamid gibi bazı maddelerle etkileşimi sonunda stabil yapısı bozulur ve bazlar arasındaki hidrojen bağları koparak DNA tek zincirli hal alır. Eski koşullar tekrar yerine getirildiğinde ise DNA sarmalı tekrar oluşur. FISH'deki temel prensip; işaretli problemlerin hedef DNA ile hibridizasyonuna dayanmaktadır. FISH, günümüzde tanısal ve araştırma amaçlı olarak kullanılabilir. FISH tekniğinin duyarlılığı; hedef dokunun geçirgenliğine, görüntüleme tekniğine ve probun özelliklerine bağlıdır (69). Kullanılan problemler boyuna ve kullanım alanını göre çok çeşitli olabilmektedir. Tanı amaçlı kullanılan FISH tekniğinin kullanım alanlarından biri de kanser genetiğidir. Çeşitli malignitelerin değişik genetik bulgularla ilişkili olması tekniğin kullanılabilirliğini arttırmıştır. Tekniğin interfaz nükleuslarında da kullanabilmesi, metafaz kromozomlarının ve hücre elde ediliminin zor olduğu kanser olgularında tekniği daha cazip kılmıştır. Özellikle hematolojik kanserlerdeki birçok yapısal ve yapısal patolojinin tanımlanması, tanı konulması ve prognoz değerlendirilmesinde etkili bir teknik olarak kullanılmaktadır.

### **2.2.3. Moleküler Genetik Teknikler**

Konversiyonel sitogenetik ve moleküler sitogenetiğin yetersiz kaldığı durumlarda başvurulan tekniklerdir. Bu teknikler arasında Southern blotting, Northern Blotting, Western Blotting, m-RNA'nın İn-situ hibridasyonu ve PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu; (PZR)'dur. PZR tekniği çok küçük miktardaki DNA'nın kullanımına imkan veren ve oldukça hassas olan bir teknik olması

açısından fazlaca tercih edilmektedir. Bir DNA kaynağında bulunan hedef DNA zincirlerinin hızlı ve çok yönlü olarak çoğaltıldığı *in vitro* bir yöntemdir. DNA'nın amplifikasyonu sonucu hedef dizinin  $10^5$  kopyası elde edilebilmektedir. Teknik ile  $10^4$  ile  $10^8$ 'de 1 ( $1/10^4$ - $10^8$ ) oranında anormal hücre tespit edilebilmektedir. Quantitative PCR ve Reverse Transcriptase PZR (RT-PZR) gibi farklı uygulama tipleri de vardır. RT-PZR özellikle mutasyon taramalarında kullanılır ve teknikte komplementer DNA kullanılmaktadır. Çalışılacak dokudan mRNA izole edilmekte ve bu mRNA'dan reverse transkriptaz enzimleri yardımıyla cDNA'lar elde edilmektedir (70, 71).

Elde edilen cDNA, bundan sonraki PZR için kalıp ödevi görür. Teknik ile hızlı, hassas ve spesifik tetkitle yapılabilir. Amplifikasyon miktarına göre  $10^5$ - $10^6$  normal hücre içindeki 1 Ph(+) hücre tespit edilebilmektedir (72, 73).

### **2.3. Lösemilerde Genetik İnceleme**

#### **Kromozomal Değişim Terminolojisi**

Ayrı ayrı lösemi gruplarını genetik olarak incelemeye önce konuyu daha iyi anlayabilmemiz için gerekli terminolojiyi bilmek gereklidir. Kromozomlar sayısal ve yapısal olarak adlandırılan iki tip düzensizliğe sahip olabilmektedirler. Bunlar ayrı ayrı özel bir terminoloji ile şu şekilde açıklanır.

#### **Kromozom Düzensizlikleri**

Özelliklerin kuşaktan kuşağa değişmeden aktarılmasını sağlayan kromozomlar; şekil, büyüklük ve sayı gibi birçok yönden her canlı türü ve o tür içindeki ait olduğu kişi bakımından sabit ve ayırt edici niteliktedir.

Normalde 46 olan ( $2n=46$ ) insan kromozomları kimi zaman hem sayı, hem şekil hem de yapı bakımından değişiklik gösterebilir. Bu kromozomal düzensizlikler gerek mikroskopik gerekse moleküler boyutta yeni teknikler ile (Bantlama, FISH, RT-PCR) tespit edilebilmektedir.

Kromozom kusurlarını ana hatları ile sınıflandırılacak olursak; kromozom sayısı mutasyonları ve kromozom yapısı mutasyonları şeklinde iki başlık altında özetleyebiliriz.

### 2.3.1. Kromozom Sayısı Mutasyonları

Normal bir mayoz sonucunda oluşan gametler 23 adet kromozom içerirler. Bu sayı insan için haploid ( $n$ ) sayıdır. Vücut hücrelerindeki kromozom sayısı ise haploid sayının iki katı olup, diploid ( $2n=46$ ) olarak adlandırılır. Kromozom sayısı düzensizlikleri de kendi içerisinde 2'ye ayrılır.

Kromozom sayısındaki artış yada azalışlar temel kromozom sayısının ( $n=23$ ) tam katları kadar oluyorsa buna öploidi ve sayıya da öploidi denir. Bu durumda hücrelerdeki kromozom sayısı, o organizma türü için normal olan haploid sayısının tam katı kadar artmıştır. Bir öploidi tipi olan haploidi eşey hücrelerindeki temel kromozom sayısını gösterir ( $n=23$ ). Diğer bir tip; iki eşey hücresinin birleşmesi ile elde edilen kromozom sayısıdır ki bu hücelere diploid hücreler denir ve insan için  $2n=46$  kromozom içerirler. Diğer bir tip triploidi ( $3n=69$ ) olarak adlandırılır ve temel kromozom sayısı üç kat artmıştır. Triploidi hücreler 69 kromozom içerirler. Tetraploidi ( $4n=92$ ) durumunda ise temel kromozom sayısı dört kat artmış olup hücreler 92 kromozom içermektedirler. Kuramsal olarak temel kromozom sayısını sonsuza kadar arttırmak mümkün iken diğer ploidiler insanda gözlenmemektedir. Bazı durumlarda ise mozaik durumlar gözlenebilmektedir. Böyle bir durumda farklı hücrelerde farklı  $n$  sayılarda kromozom bulunabilmektedir bu durum miksploidi olarak adlandırılır (74).

Kromozom sayısındaki artış yada azalışlar temel kromozom sayısının tam katları kadar olmayıp, bir veya birkaç kromozomun eksikliği veya fazlalığı şeklinde ise bu duruma anöploidi ve sayıya da anöploidi denir. Anöploidi olguları öploidi olgularından daha sık gözlenir ve pek çok kromozomal sendromun oluşmasına sebebiyet verirler. Anöploidi, kromozomlardaki artma ya da eksilmeye göre ikiye ayrılır.

Birincisi hiperploidi olup; insanlardaki diploid sayıdan bir yada daha çok sayıda fazla kromozom bulunması durumudur (Örneğin:  $2n+1$ ).



Trizomi en sık rastlanılan hiperploidi tipidir ve insan kromozomlarından herhangi birinin iki yerine üç tane bulunması durumudur yani  $2n+1=47$  kromozomlu bir karyotip söz konusudur. Tetrazomi daha nadir gözlenir. Tetrazomik durum ya belli bir homolog kromozom çiftinden iki yerine dört tane bulunmasıyla ya da iki ayrı homolog çiftin trizomisi ile ortaya çıkar.

İkinci tip hipoploidide; karyotipteki diploid sayıdan bir yada daha çok kromozomun eksilmesidir (Örneğin:  $2n-1$ ).

Hipoploidide kromozom çiftlerinden birinin bulunmaması ( $2n-2$ ) nullizomi olarak adlandırılırken, diploid kromozomdan yalnız bir kromozomun eksik olması ( $2n-1$ ) monozomi olarak adlandırılır (74).

### **2.3.2. Kromozom Yapısı Mutasyonları**

Sayısal düzensizliklerin oluş nedeni hücre bölünmesindeki kusurlar iken yapısal düzensizlerin nedeni aynı ya da değişik kromozomlardaki kırılma ve yeniden düzenlenmelerdir. Yapısal kromozomal değişikliklerin başlıcaları şunlardır:

#### **2.3.2.1.Yer Değiştirme (Translokasyon)**

Bir kromozomdan kopan parçanın diğer bir kromozoma yerleşmesidir. Translokasyonlar üç grup içinde incelenebilir.

- Karşılıklı translokasyon
- Sentrik kaynaşma tipi translokasyon
- İnsersiyonel translokasyon (Transpozisyon)

Karşılıklı translokasyon (resiprokal translokasyon): Bir kırılma sonucu, homolog yada homolog olmayan kromozomlardan kopan parçaların karşılıklı yer değiştirmesine denir.

Sentrik kaynaşma tipi translokasyon: Akrosentrik kromozomlarda görülen özel bir resiprokal translokasyon tipidir. Bu translokasyonda kromozomlardan sentromere yakın kısa kolunda, diğerinde ise yine sentromere yakın fakat uzun kolunda birer kırılma olur. Daha sonra iki kromozomun uzun ve kısa kolu birleşerek translokasyon kromozomlarını oluştururlar. Bu translokasyona Robertsonian tipi translokasyon da denilmektedir (75).

İnsersiyonel translokasyon (Transpozisyon): Homolog olmayan iki kromozomdan birinde iki noktada, diğesinde ise bir noktada kırılma olur. İki kırılma noktası olan kromozomdaki parça tek kırılma olan kromozoma girer ve kaynaşır. Bu kromozomlardan birinde artma diğesinde ise eksilme söz konusudur.

### **2.3.2.2. Eksilme (Delesyon)**

Bir kırılma sonucu, kromozomun küçük bir parçasının kopması demektir. Kopma iki türlü olabilir; ya bir darbe sonucu kırılan kromozom parçası kopar (terminal delesyon), yada iki darbe sonucu kopan parça aradan ayrıldıktan sonra iki parça yeniden kaynaşır (interstisyel delesyon) (74).

### **2.3.2.3. Artma (Duplikasyon)**

Homolog iki kromozomdan birinde çift darbe sonucu kopan parça, diğesinde tek darbe sonucu kopan aralığa girerek kaynaşacak olursa artma yada duplikasyon olgusu ortaya çıkar. Duplikasyon kendini iki tipte gösterir: Homolog kromozomlarda artmada gen duplikasyonu olur. Tandem duplikasyonda genler ard arda dizilmiştir. Ters tandem duplikasyonda artan parça tersine dönerek yine yerine yerleşmiştir (75).

### **2.3.2.4. Ters Dönme (İnversiyon)**

Bir kromozoma iki darbenin gelmesi ve bunun sonucunda kopan parçanın kaybolmadan kendi ekseni çevresinde  $180^0$  dönerek yine eski yerine yapışmasına ters dönme yada inversiyon denir. İki türlü ters dönme olmaktadır:

- Parasentrik inversiyon; sentromerin dışında olan ters dönmelere verilen addır.
- Perisentrik inversiyonda ise; iki darbe uzun ve kısa kollarına gelir, sentromeri içinde bulunan parça kendi çevresinde  $180^0$  dönerek eski yerine yapışırsa perisentrik ters dönme ortaya çıkar (75).

### **2.3.2.5. Halka (Ring) Kromozom**

Bir kromozomun iki ucunda iki darbe sonucu kırıklar olur ve bu kırık uçlara başka bir parça birleşmeden iki uç kaynaşırsa halka şeklinde bir kromozom ortaya çıkar ki buna halka yada ring kromozom denir (75).

#### **2.3.2.6. İzokromozom**

Anafazda birbirinden ayrılarak çekilecek olan kromatidler bazen boylamasına değil enlemesine bölünebilir. Bu durumda yavru hücrelerden birinde yalnızca kromozomun kısa kolları bulunurken, diğerinde yalnızca uzun kollar bulunur. Böyle sentromerin enlemesine bölünmesi sonucu ortaya çıkan median görümlü kromozomlara izokromozom denir (74,75).

## 2.4. Lösemilerde Tedavi

Lösemilerin tedavisi, destekleyici tedavi, kemoterapi ve kemik iliği nakli gibi tedavi yaklaşımlarından oluşur.

1) *Destekleyici Tedavi*: Eritrosit, trombosit süspansiyonları verilmesi, hastaların izolasyonu, enfeksiyonlara karşı profilaksi ve tedavi, hiperlökositoz ve lümör lizis sendromu karşısında uygun tedavi, hasta ve ailesine psiko-sosyal destek verilmesi, ilaç yan etkilerinin tedavi gibi yaklaşımları içerir (76).

2) *Kemoterapi*: Anti-lösemik ilaçlar kullanılır. Tedavi şeması; İndüksiyon (remisyon sağlama), idame (sağlanan remisyonun devamlılığı), konsolidasyon (remisyonu sağlamlaştırma) tedavilerinden oluşmaktadır (77).

3) *Relaps (Nüks)*: Nüks etmiş hastalarda (hastalığın yeniden belirmesi) sağ kalım oranı yeni tanı almış hastalara göre oldukça düşüktür. Nüks tedavisi için genellikle daha önce verilmiş olan tedavi protokolünden daha yoğun bir protokol seçilir (76,77).

4) *Kemik İliği Transplantasyonu (KİT)*: Önce yoğun kemoterapi ve vücut ışınlaması ile lösemik hücrelerin tümü yok edilmeye çalışılır. İliğin reddini önleyici, immunosüpresyonu da sağlayan ön tedaviden sonra otolog veya allojenik şekilde ilik nakli yapılır (76, 77).

### 2.4.1. Kemoterapi

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötikler, duyarlı tümör hücrelerinde çoğalmayı durdurur ve apoptozu indükler (78, 79). İdeal kemoterapi ilacından maksat; kanser hücrelerini hedefleyip onları yok etmek ama bunu yaparken normal hücrelere toksitelerinden ve yan etkilerinden dolayı zarar vermemektir. Kanserli hücreyi öldüren ancak normal hücreye zarar vermeyecek ilaç indeksi maalesef dardır. Bu ilaçlar tablo 5’de verilmiştir (78, 79). Prensip olarak kombine ilaç tedavileri kullanılmaktadır. Çünkü kombine tedavinin kullanılması tedaviyi daha etkin hale getirmektedir. Örneğin; hidroksiürenin alkilleyici ajanlarla ve topoizomeras inhibitör ajanları ile birlikte kullanılması antiproliferatif etkiyi arttırmaktadır (78, 80-83).

Tablo 5: Lösemi tedavisinde kullanılan kemoterapötikler-1 (84).

Sınıf	Ajanın Adı	İlacın Adı	Etkin Olduğu Hastalık	Etki Mekanizması	Hücre Döngüsü
Alkilleyici Ajanlar	Nitrojen Mustardlar	Mekloratamin	Hodgkin hastalığı, non_Hodgkin lenfomalar	DNA çift ipliğini birbirinden ayırarak DNA ve replikasyon zincirlerini alkiler	Non-spesifik
		Siklofosfamid	Akut ve kronik lenfositik lösemiler, Hodgkin Hastalığı, non_Hodgkin lenfomalar, neuroblastoma, multiple miyeloma, meme, over, akciğer kanseri, Wilm's tümörü, serviks, testis kanseri, yumuşak doku sarkomları		
		Melfalan	Multiple miyeloma, meme, over kanseri		
		Klorambusil	Kronik lenfositik lösemi, primer makroglobulinema, Hodgkin lenfomalar		
	Etileniminler ve metilmelaminler	Hekzametilmelamin	Over kanseri		
		Tiyotepa	Mesane, meme, over kanseri		
	Alkil sulfonatlar	Busulfan	Kronik granulositik lösemi		
	Nitrosoureas	Karmustin	Hodgkin Hastalığı, non-Hodgkin lenfomalar, primer beyin tümörleri, multiple miyeloma, malign melanoma		

Sınıf	Ajanın Çeşidi	İlacın Adı	Etkin Olduğu Hastalık	Etki Mekanizması	Hücre Döngüsü
Alkilleyici Ajanlar	Nitrosoureas	Streptozosin	Malign pankreatik insülinoma	DNA çift ipliğini birbirinden ayırarak DNA ve replikasyon zincirlerini alkiler	Non-spesifik
	Triazenler	Dakarbazin	Malign melanoma, Hodgkin Hastalığı, yumuşak doku sarkomları		
Antimetabolitler	Primidin Analogları	Fluorourasil	Meme, kolon ,mide, pankreas, over, baş ve boyun,mesane kanseri	Timidilat sentezini engelleyerek timidin üretimini azaltır	Sentez fazına özgü
		Sitabrin	Akut granülositik ve akut lenfositik lösemiler	DNA polimerazı inhibe eder	
		Gemsitabin	Pankreatik, over kanseri	Timidilat sentezini engelleyerek timidin üretimini azaltır	
	Purin Analogları	Merkaptopurin	Akut lenfositik, akut granulositik ve kronik granulositik lösemiler	Purin sentezini bloke eder	
		Tiyoguanin	Akut lenfositik, akut granulositik ve kronik granulositik lösemiler		
	Purin Anologları	Pentostatin,Kladribin, Fludaribin	Tüylü hücre lösemi, kronik lenfositik lösemi, küçük hücreli lenfoma	Dihidroredüktaza bağlanarak timidilat (primidin) sentezinin engeller	
	Folikasit analogları	Metotreksat	Akut lenfositik lösemi, meme, baş ve boyun, akciğer kanseri, osteogenik sarkoma, mikosiz fungoides		

Tablo 5: Lösemi kemoterapötikleri devamı-2

Sınıf	Ajanın Adı	İlacın Adı	Etkin Olduğu Hastalık	Etki mekanizması	Hücre Döngüsü
Doğal Ürünler	Biyolojik cevabı değiştirenler	İnterferon-alfa, İnterlökin-2	Tüylü hücre lösemisi, Kaposi sarkoma, melanoma, karsinoid, real hücre, over, mesane, non- Hodgkin lenfoma, Multiple miyeloma, kronik granulositik lösemi	Hücre büyümesini engeller.	
Hormon	Adrenokortikosteroidler	prednizone	Akut ve kronik lenfositik lösemiler, meme kanseri, Hodgkin hastalığı, non-Hodgkin lenfoma		
	Progestin	Megestrol asetat	Endometriyum, meme kanseri	Östrojen aktivitesini önler	
	Antiandrojen	Flutamid	Prostat kanseri	Andrjen reseptörüne bağlanır	
	Gonadotropin serbesteyen hormon antagonisti	Löprolid	Prostat kanseri	Gonadotropin salgılanmasını sağlar	
Çok yönlü ajanlar		Hidroksiüre	Kronik granulositik lösemi, polisitemia vera, esansiyel trombositoz, malign melanoma	Ribonukleotid reduktazı inhibe eder	
		Sisplatin	Testis,over, mesane, baş-boyun, akciğer, tiroid,serviks, endometriyum kanseri, nöroblastoma, osteogenetik sarkoma	DNA zincirleri arasına girerek DNA sarmallarının açılmasını engeller	
		Mitoksantron	Akut granülositik lösemi, meme ve prostat kanseri	Topoizomerazın çalışmasını engeller	

Tablo 5 devam-3

## 2.4.2. Kanser Tedavisinde Kullanılan İlaçların Genel Sınıfları ve Etki

### Mekanizmaları

#### 2.4.2.1. Alkilleyici Ajanlar

- a) Nitrojen mustardlar(siklofosfamid)
- b) Etileminler ve metilmelaminler
- c) Alkil sülfonatlar
- d) Nitrosourea
- e) Triazenler

#### 2.4.2.2. Antimetabolitler

- a) Folikasit analogları (metotreksat)
- b) Primidin analogları (sitozin arabinozid, AraC)
- c) Purin analogları (merkaptopurin, tiyoguanin)

#### 2.4.2.3. Doğal Ürünler

- a) Vinka alkaloidler (Vinkristin, vinbristin)
- b) Taksenler
- c) Kamptotkinler
- d) Antibiyotikler
- e) Epipodofilotoksinler (etoposid)
- f) Enzimler (L-asparaginaz)
- g) Biyolojik yanıt düzenleyiciler (interferon- alfa)

#### 2.4.2.4. Çok Yönlü Ajanlar

- a) Yer değişimi yapan üre (hidroksiüre)
- b) Platin kompleksleri
- c) Antrasenediyon
- d) Metilendaidrazin

#### 2.4.2.5. Hormonlar

- a) Adrenokortikosteroidler (prednizon)
- b) Progestinler



c) Östrojenler (84).

Lösemi tedavisinde kullanılan bu ilaçların etki mekanizmaları şu şekilde olmaktadır;

Alkilleyici ajanların en önemli farmakolojik etkisi DNA sentezinin ve hücre bölünmesinin düzenini bozmaktır. Genomu koruma görevi yapan p53 proteini DNA'da meydana gelen hasarı algılar ve apoptozu başlatır (76, 85). İndüklenen p53 proteini BCL-2 ailesi üyesi olan bax'ın (proapoptotik) indüksiyona yol açarak apoptozu başlatır veya Fas ve DR5 gibi hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörlerinin indüksiyonuna neden olarak apoptozu indükler (86-88).

Çoğu antitümör ilaçların tersine alkilleyici ajanların etkileri proliferasyona bağımlı olmasına rağmen alkilleyiciler hücre döngüsünün herhangi bir aşamasında etkili olabilirler. En etkili oldukları faz hücre döngüsünün sentez fazıdır. Hücreler bu ajanlara karşı hücre döngüsünün G<sub>2</sub>, mitoz veya G<sub>1</sub>'in erken dönemlerinde daha az duyarlı iken geç G<sub>1</sub> ve S fazlarında oldukça duyarlıdır. Böylece hücre bölünme aşamasına gelemeden bloke olur (76, 77, 79).

Alkilleyici ajanlar, nükleik asit ve proteinlere kovalent bağlanabilen kimyasal bileşikler olduklarından dolayı DNA üzerinde zincir kırılması, baz değişimi şeklinde hasarlara neden olmaktadır. Meydana gelen bu hasarlar ve DNA alkilenmesi sonucu hücre ölüme gider, ancak bu hasarlar hücre döngüsünün G<sub>1</sub> kontrol noktasını aktive ederek tamir edilirse hücre ölümü gerçekleşmez (79).

Folikasit analogu olan metotreksat antimetaboliti hücre döngüsünün sentez fazına özgü bir ajandır. Purin ve timidilat sentezi için gerekli folat enzimlerini inhibe eder dolayısıyla DNA sentezini bloke eder (79, 89).

Primidin analogu olarak kullanılan sitozin arabinozid antimetaboliti, nükleik asit fonksiyonlarını veya sentezlenmelerini sağlayan doğal antimetabolitleri taklit etme yeteneğine sahiptir. Primidin analoglarının etki mekanizmaları 3 grupta incelenebilir. Birincisi; DNA polimeraz aktivitesini inhibe ederek DNA zincirinin uzamasına engel olurlar. İkinci olarak; DNA'nın tamiri üzerine etkilidirler. Üçüncüsü ise membran glikoproteinlerinin ve glikolipitlerinin sentezini inhibe ederler. Böylece membran yapısını, antijenitesini ve fonksiyonunu değiştirirler. Sitozin arabinozid (Ara-C) ile muamele edilmiş lösemik hücreler seramid oluşumunu uyarırlar. Seramid membrana bağlı asit sfingomiyelinazın aktivasyonu sonucu oluşan bir ürün olup

apoptozu başlatır. Plazma membranında bir hasar meydana geldiğinde membranda bulunan asit sfingomiyelin sfingomiyelinazın aktivasyonu ile seramid oluşur ve apoptoz başlatılır (79, 86,89).

Purin analogu olarak merkaptopurin ve tiyoguanin antimetabolitleri DNA ve RNA sentezi gerekli çeşitli enzimlerin inhibisyonunda etkilidirler. Ayrıca pirimidin analogları gibi membran glikoproteinlerinin sentezlenmesinde etkin oldukları başka çalışmalarla da gösterilmiştir (76, 78).

Lösemi tedavisinde kullanılan bir diğer ajan grubu ise doğal ürünler sınıfıdır. Vinblastin, vincristin kemoterapötikleri hücre döngüsüne özgü ajanlardan olup hücreyi mikrotübüllerin yapımında rol oynayan proteinlerin polimerleşme yeteneğini bloke ederler. Mitotik aparatta bulunan mikrotübüllerin bozulması hücre bölünmesinin metafaz safhasında durmasını sağlar. Mitotik iğ iplikçiklerinin olmaması stoplazmada kromozomların dağılmasına veya kromozomların top yada yıldız şeklinde gruplaşmasına neden olmaktadır. Bu olayların genetik akışı durdurması hücreyi ölüme götürür. Bu ajanlara aynı zamanda antimitotik ilaçlar da denilmektedir (76-78).

Etoposid, vinca alkaloidlerin tersine hücreleri mitoz bölünmede durdurmayıp DNA topoizomeraz ve DNA ile üçlü kompleks yapılar oluştururlar. Oluşan yapılar çift zincirli DNA ipliği üzerinde kırıklar meydana getirir. Bu ajanlar kırıkların onarılmasını sağlayan DNA topoizomeraz enzimini inhibe eder. Böylece hücrenin ölüme gitmesini sağlar. Etoposid, hücrelerin en hassas oldukları S ve G<sub>2</sub> fazlarında etkilidir (90-92).

Adriamisin (doksorubisin), daunorubisin, idarubisin gibi antibiyotikler antitümör ajanların en önemlileridir. Bu ajanlar, DNA çift zincirinin oluklarına girebilirler. DNA ve RNA sentezi dahil DNA'nın birçok fonksiyonunu etkiler. DNA'nın tek ve çift zincirinde kırılmalar meydana getirirler. İlaç, DNA'nın baz çiftleri arasına girerek DNA-ilaç birleşimini oluştururlar. Bu birleşme sonucunda serbest radikaller meydana gelir ve bu radikaller DNA zincir üzerinde kırıklara neden olacak şekilde hasar verirler. Böylece topoizomeraz II onarma görevini yapmaz ve hücre ölüme gider.

Antrasiklinler ayrıca hücre membranı ile interaksiyona girebilirler ve membran fonksiyonlarını değiştirirler. Bu da antrasiklinlerin antitümörük olaylarda

oldukça önemli rol oynayabileceğinin göstergesidir. Antrasiklinlere maruz kalmış hücreler apoptoza giderler. Bu olayda rol oynayan araçlar, esas olarak DNA’da meydana gelen hasara duyarlı p53 ve kaspazlar yani proteazlardır. Kaspazlar, nükleus ile sitoplazmada bulunur ve apoptoz sinyalzasyonunda sorumludur. Hücre membranında bulunan ölüm reseptörlerinin indüklenmesi ile başlayan apoptozda görev yaparlar (78, 85, 86).

Aynı sınıfa ait diğer bir ilaç L-asparajinaz enzimidir. Normal dokuların bir çoğu protein sentezi için yeterli miktarda L-asparajin sentezler. Belki tümör dokuları dış etkilere bağlı olarak artan miktarda amino asite ihtiyaç duyarlar. L-Asparajinaz; asparajini aspartik asit ve amonyağa hidrolize eder. Lösemik hücreler protein sentezi için gerekli asparaginden yoksun bırakılarak hücrelerin ölüme gitmesi sağlanır. L-asparajinaz, metotreksat, doksorubisin, vincristin ve prednizon ile birlikte ALL tedavisinde kullanılır. Sonuç olarak, hücre döngüsü sırasında L-asparajinaz ile protein sentezi inhibe edilerek hücrelerin döngüde ilerlemesi durdurulur (76-78, 90).

KML tedavisinde kullanılan doğal ürünler sınıfına ait olan interferon-alfa, hücre bölünmesi ve viral uyarılara yanıt olarak üretilen protein ailesinin bir üyesidir. Bu ajanın hücre büyümesinin inhibisyonu, sitokin ekspresyonunun regülasyonu ve immunomodülasyon gibi bilinen çeşitli biyolojik etkilerinin olduğu düşünülmektedir (77, 78).

KML tedavisinde kullanılan diğer bir ilaç da hidroksi üredir. Bu ilaç, ribonükleik asit difosfat redüktaz enzim aktivitesine sahiptir. Bu enzim, DNA biyosentezi sırasında ribonükleotitlerin, deoksiribonükleotidlerin sentezini katalizler. Hidroksi üre hücre döngüsünün S fazına özgü bir ilaçtır ve hedef redüktazın maksimum konsantrasyonlarda bulunduğu G<sub>1</sub>-S fazları arasında hücre döngüsünü durdurur. Hidroksi üre ayrıca DNA’yı hasarlayıcı ajanların antiproliferatif etkisini de artırır (77,78).

Adrenokortikosteroid olan prednizon ilacı lenfatik etkiye ve eritrositlerde mitozu baskılayabilme kapasitesine sahip olduğu bilinmektedir (77,78). Antikarsinojenik ilaçlar sınıflarına göre farklı etkilere sahiptir. Ancak etkilerin ortak sonucu apoptozdur.

Günümüzde Uygulanan Tedavi protokolleri (93)

**Tablo 6:** AML Remisyon İndüksiyon Tedavi Protokolü (3-7 protokolü)

Kemoterapötik ajan	Doz	Uygulama	Günler
Sitozin arabinozid ARA-C	100 mg/m <sup>2</sup>	Intra Venöz	1-7
İdarubisin	12 mg/m <sup>2</sup>	Intra Venöz	1-3

**Tablo 7:** ALL Remisyon İndüksiyon Tedavi Protokolü (CVAD)

**A ŞEMASI**

Kemoterapötik ajan	Doz	Uygulama	Günler
Siklofosamid	1000 mg/m <sup>2</sup>	Intra Venöz	1.gün
Daunorubisin	45 mg/m <sup>2</sup>	Intra Venöz	1., 2., 3. günler
Vincristin	2 mg/gün	Intra Venöz	1., 8., 15., 22. günler
Prednizolon	60 mg/m <sup>2</sup>	Per oral	1-28. günler arası
L-asparajinaz	6000 U/m <sup>2</sup> /gün	Intra Venöz	5. günden sonra haftada 2 kez/toplam 6 doz

**B ŞEMASI**

Kemoterapötik ajan	Doz	Uygulama	Günler
İdarubisin	10 mg/m <sup>2</sup>	Intra Venöz	2., 3. günler
Vincristin	2 mg/gün	Intra Venöz	1., 8., 15., 22. günler
Prednizolon	60 mg/m <sup>2</sup>	Per oral	1-28. günler arası
L-asparajinaz	6000 U/m <sup>2</sup> /gün	Intra Venöz	8. günden sonra haftada 2 kez/toplam 6 doz

**Tablo 8:** KML Remisyon İndüksiyon Tedavi Protokolü

Kemoterapötik ajan	Doz	Uygulama
Hidroksi üre (WBC>20.000 ise)	50 mg/kg/gün	Per oral
İnterferon-alfa( WBC<20.000 ise)	5 mU/m <sup>2</sup>	Cilt altı
Sitozin arabinozid (ARA-C)	20 mg/gün	Per oral

KML’de Son Nokta; Glivec

Glivec (imatinib mesilat STI571) oral yolla uygulana bir bcr-abl tirozin kinaz inhibitörüdür. Anormal bcr-abl gen ürünü, wild-type c-abl’ye kıyasla artmış tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. Glivec ve diğer tirozin kinaz inhibitörleri, selektif olarak lösemik hücre kolonilerin proliferasyonunu engellediği, normal hücreleri ise daha az etkilediği bilinmektedir. Glivec de Ph-pozitif hücrelerin apoptozuna yol açtığı ve sonuçta KML hücrelerinin proliferasyonunu selektif olarak suprese ettiği hem *in vivo* hemde *in vitro* olarak gösterilmesinden sonra klinik çalışmalarda da kullanılmaktadır. Alınan sonuçlar umut vericidir (94, 95).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Gereç**

Tezin gelişim süreci içerisinde kemoterapi ajanları uygulanmakta olmayan lösemi vakaları ile ilgilendik. Bu amaçla tercih edilen hastalar ya indüksiyon kemoterapisini almış ve remisyonu sağlanmış hastalar ya da kemoterapi sürecini tamamlamış ve ilaçsız rutin kontrolde tutulan vakalar tarzındaydı. Çalışma süresince Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahiliye Anabilim Dalı Hematoloji Bölümü ve Çocuk Anabilim Dalı Çocuk Onkolojisi Bölümüne başvuran ve lösemi tanısı konan 30 hastaya ulaşıldı. Hastaların 13'i tedavileri tamamlanmış rutin kontrolde tutulan hastalar iken 17 tanesi indüksiyon tedavisini almış ve tedavisinin ileri aşamaları için takip edilen hastalardı. Ayrıca bu 30 hastaya yaş ve cinsiyetle uyumlu sağlıklı 30 kişilik bir kontrol grubu oluşturuldu.

#### **3.2. Metod**

Sitogenetikte, kromozomların elde edilmesinde kullanılan farklı hücre kültürü yöntemleri vardır. Kısa süreli lenfosit kültürü en sık kullanılan yöntemdir. Periferik kan veya kemik iliğinden alınan materyal üremesi için kültür ortamlarına alındıktan sonra belirli süreler sonunda hasatlanır. Daha sonra elde edilen lenfosit kümeleri preparat haline getirilir ve ilgili boyama yöntemleri ile boyandıktan sonra değerlendirmeye alınır.

##### **3.2.1. Periferik Kan Hücre Kültürü**

###### **3.2.1.1. Zenginleştirilmiş Besiyerinin Hazırlanması**

Besiyerlerinde hücreleri üretebilmek için L-Glutaminli besiyerleri kullanıldı. Ayrıca besiyerini mikrobiyal kontaminasyondan korumak için Penisilin ve Streptomisin gibi antibiyotikler, besin değerini arttırmak için Fetal Calf Serumu ile hücreleri bölünmek için indükleyen Fitohemaglutinin besi ortamı içerisine konulur.

Oluşturulan besiyerinin içeriği ve miktarları şu şekilde ayarlanmıştır;

RPMI 1640 Medium (Biological Industries, BİO1-106-1B )	100 ml
Fetal Calf Serum (Biological Industries, BİO4-001-1B )	30 ml
Fitohemaglutinin Solüsyon (Biological Industries, BİO12-006-1H)	3,3 ml
Penisilin/Streptomisin (Biological Industries, BİO3-031-1B )	2 ml
L- Glutamin (Biological Industries, BİO3-020-1B)	2 ml

Hazırlanan bu karışımdan ağzı kapaklı steril falkon tüplere 6'şar ml aktarıldı.

#### **Fitohemaglutinin solüsyonunun hazırlanması:**

Ticari olarak gelen 5 ml'lik fitohemaglutinin şişesi içinde 5 ml RPMI 1640 Medium ile sulandırıldı.

#### **Fetal Calf Serumun hazırlanması:**

Fetal calf serum çözdürüldükten sonra 65 °C'de 1 saat inaktive edildi.

#### **3.2.1.2 Ekim İşlemleri**

a) Steril disposable 5 ml'lik enjektör önce heparinize (Liquemine Roche) edildi. İşlem için önce steril olarak 0,5 ml boş enjektöre çekildi. Heparinin enjektöre iyice bulaşması sağlanıp ve fazla heparin tekrar şişe içerisine boşaltıldı.

b) Heparinize enjektör ile her olgudan 3-4 ml periferik kan alındı. Alınan kanlar, ağzı kapaklı steril besi ortamına alınan 6'şar ml zenginleştirilmiş besiyeri üzerine sterilizasyonu sağlanarak bebekler için 13 damla (yaklaşık 0,5 ml), yetişkinler için ise 15 damla (0,6-0,8 ml) olacak şekilde ekilir. Tüpler hafifçe karıştırıldıktan sonra her tüpün üzerine olgunun adı, soyadı, besi ortamının cinsi ve tarih not edildi. Biz çalışmamız esnasında hastalarımıza hem GTG (Giemsa-Tripsin-Giemsa) bantlama hem de SCE için ekimler yapacağımız için 3 ayrı tüpe ekimler yaptık. Bunların ikisi GTG bantlama için iken bir tüp SCE içindi. Daha sonra bu tüpler ağızları sıkıca kapatılarak 37 °C'lik etüve kaldırıldı. Günde bir kez tüp yavaşça alt üst edilmek suretiyle 72 saat kültürler etüvede tutuldu.

### **3.2.2. Kromozom Eldesi**

#### **3.2.2.1. Kullanılan solüsyonlar**

##### **Hipotonik solüsyon:**

0.075 M KCl (Merck, 104936) olacak şekilde 0.56 gr KCl tartılarak 100 ml bidistile suda çözüldü, kullanılacağı saatten en az 1 saat önce hazırlanarak 37 °C'lik etüve konuldu.

##### **Fiksatif solüsyonu:**

1 birim glacial asetik asit (Merck, 100056) üzerine 3 birim methanol (Merck, 106008) ilave edilerek iyice karıştırıldı. Karışım kullanılmadan önce ve çalışma aralarında -20 °C'de saklandı.

Her deney aşamasında taze olarak hazırlandı. Bu solüsyonun taze olması içindeki alkolün uçuculuğu açısından önemlidir.

#### **3.2.2.2. Hücrelerin elde edilmesi**

Kromozom preperasyonu için modifiye Moorhead tekniği uygulandı (96). Üreme için 37 °C'deki etüve bırakılan kültür tüplerine, kromozom eldesinden 2 saat önce yani 70. saatte 10 µg/ml olacak şekilde 2 damla (2 ml'lik enjektör kullanıldı) kolçisin ilave edildi ve hafifçe karıştırıldı, tekrar 1 saat 10 dakika süre ile 37 °C'ye ayarlanmış etüve kaldırıldı. Bu süre sonunda etüvden çıkarılan tüpler 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj (Hettich, universal 32R) edildi. Süpernatant kısmı pastör pipeti ile atıldı.

Çökelti ile üzerinde kalan 0.5 ml'lik sıvı vortekslendi ve bu sırada üzerine yavaşça hipotonik (0.075 M KCl) solüsyon toplam hacim 6 ml olana kadar eklendi. Tüpler 1 saat 37 °C etüvde bekletildi. Süre bitiminde 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi, pastör pipeti ile süpernatant kısmı atıldı. Çökelti ile üzerinde kalan 0.5 ml'lik sıvı vortekslendi ve vorteksleme işlemi devam ederken tüplerin yan duvarından yavaşça fiksatif toplam hacim 6 ml olana kadar ilave edildi. Fiksatif eklendikten sonra tüpler en az 1 saat süreyle -20 °C'de bekletildi. Bu bekleme basamağı sadece ilk fiksatif yıkama için önemlidir, diğer fiksatif aşamalarında bekleme yapılmadan renk şeffaf olana kadar yıkama işlemine devam edildi. Rengi açılan tüplerin üzerinden 4 ml süpernatant kısmı atıldı ve kalan 2 ml kısım yayma için kullanıldı. Kalan miktar yavaş yavaş pipetaj yapılarak karıştırıldı. Bir gün önceden yarı yarıya



bidistile su ve alkolle hazırlanmış lamaların alkol kısmı dökülerek tekrar bidistile su konuldu ve suyun donması için buzluğa kaldırıldı. Yayma sırasında lamalar buz içinden alındı, 45 derecelik açı ile 20 cm yukarıdan pastör pipeti ile soğuk ıslak lam üzerine bırakıldı. Yayma işlemi yapılan preparatlar, kapalı sistem etüvde 37 °C’de 3 gün veya 65 °C’de 1 gece yaşlandırıldı.

### **3.2.3. Giemsa Bantlama Tekniği**

Sitogenetik laboratuvarlarında kromozomları tanımlamada kullanılan en yaygın yöntemdir. İşlem için modifiye Korenberg boyama yöntemi kullanıldı (96).

Her kromozom kendine özgü açık ve koyu bant bölgeleri içerir. Bu bölgeler premetafaz ve metafaz kromozomlarında sayıca farklıdır. İlk defa Paris Kongresi’nde (1971) idiogramları belirlenmiş, en son şekli 1985 ISCN’de yayınlanmıştır (97).

Bu boyama yöntemi kullanılmadan önce (yaymadan hemen sonra) preparatlar 37 °C’lik etüvde 3 gün bekletilerek yaşlandırılır. Alternatif olarak oda ısısında 4 gün veya 56-60 °C de de 1 gece bekletilebilir.

#### **3.2.3.1. Kullanılan solüsyonlar:**

##### **PBS (Phosphate Buffer Saline) solüsyonları:**

1 PBS tableti (Amresco, AIE404-100) 100 ml bidistile suda çözüldü. İkinci PBS solüsyonu yine 100 ml’de 1 PBS çözümlenerek hazırlanır. Ancak bu solüsyon işlem öncesinde soğuk olmalıdır.

##### **Trypsin solüsyonu:**

Çözülerek 37 °C’ye kaldırılan ve 37 °C’ye geldiği hassas termometre ile tespit edilen PBS tampon solüsyonu üzerine 0.05 gr Trypsin eklenerek Trypsin solüsyonu hazırlanır.

##### **Söranson tamponu:**

*A solüsyonu:* 4.537 gr  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck, 104873) 500 ml bidistile suda çözüldü.

*B solüsyonu:* 5.935 gr  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Merck, 106586) 500 ml bidistile suda çözüldü.

Balon jöjeye A solüsyonundan alınarak pH 6.8’e gelinceye kadar B solüsyonu eklenerek 2 solüsyon karıştırıldı (Ortalama olarak 53 ml A solüsyonu 47 ml B solüsyonu ile karıştırılarak hazırlanır).

### **Giemsa boya solüsyonu:**

3 ml Giemsa lösing (Merck, 109204), 97 ml pH 6.8'lik söransan tamponu içine ilave edilerek 100 ml'ye tamamlandı.

### **3.2.3.2. Preparatların Boyama İşlemleri**

a) Mikroskop altında 10X'lik objektifle incelenen preparatlar için tripsinde bekletme süresi kromozomların kondansasyonuna göre ayarlanır. Kromozomlar koyu ve parlak gözükmüşse preparatlar 20-30 saniye, mat ve soluk ise 5 saniye 100 ml'lik beher içinde bulunan tripsin solüsyonuna daldırılır. Kronometre ile saptanan süre boyunca çok yavaş bir tempoda çalkalanır.

b) Süre bitiminde soğuk PBS'de preparatlar çalkalanır. Bu aşama önemlidir. Preparatlar soğuk PBS'den geçirilmezse tripsin aktivasyonu devam eder.

c) % 3'lük Giemsa boya solüsyonunda 3-5 dakika bekletilir. Preparat beherden çıkarılmadan boyanın üst kısmında oluşan parlak tabaka adi kurutma kağıdı ile emdirilir. Musluk suyundan geçirilen preparatlar Whatman 40 kurutma kağıdı arasında kurutularak kapatılır ve mikroskopta incelenir.

### **3.2.4. Dijital Görüntülerin Elde Edilmesi**

Kromozom anomalisi tespit edilen preparatlar ve kontrollerden elde edilen birkaç metafazın 100X objektifle immersiyon yağı altında Zeiss marka mikroskop (Zeiss Imager A1, Germany) ve Canon marka dijital fotoğraf makinesi (Canon PC1049, Japan) kullanılarak fotoğrafları çekildi ve görüntüler bilgisayar ortamına aktarıldı.

### **3.3. İstatistiksel Analizler**

İstatistiksel analizler, Microsoft Windows® uyumlu SPSS® 9.0 programı ile yapıldı. Grupların verileri normal dağılım göstermediğinden istatistik analiz için non-parametrik testlerden Mann-Whitney U testi kullanıldı. Sonuçlar aritmetik ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verildi.  $P < 0.05$  olan değerler anlamlı olarak kabul edildi.

#### 4. BULGULAR

Bu çalışmada Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahiliye Anabilim Dalı Hematoloji bölümüne başvuran ayrıca Pediatri Anabilim Dalı Çocuk Onkolojisi bölümüne başvuran kemoterapisini tamamlamış ya da remisyonu sağlanmış lösemili erişkin ve çocuk hastalar ile çalışılmıştır. 12 post kemoterapötik (kemoterapisi tamamlanan, remisyonda), 18 remisyonunu sağlamış tedavisinin herhangi bir basamağında olan vaka grubu elde edilmiştir. Çalışmaya paralel olarak vakalarla yaş ve cinsiyet olarak uyumlu 30 kontrol bireyi de sitogenetik olarak değerlendirildi. Tüm hasta ve kontrol bireylerden GTG (Giemsa-Tripsin-Giemsa) bantlama tekniği ile preparatlar hazırlandı.

Çalışmada incelenen hastalardan 8 tanesi çocuk, 4'ü adölesan dönemde ve 18 hasta da erişkindi. Hastaların lösemi türlerine göre dağılımı şöyledir: 16 ALL, 4 AML, 5 KLL, 5 KML. Hastaların yaş dağılımı 2-83 arasındadır. Çalışma grubunun yaş ortalaması; 37.8'dir. Grupların yaşları aritmetik ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde; ALL grubunda  $22.6 \pm 16.8$ , KLL grubunda  $67.0 \pm 6.6$ , KML grubunda  $50.8 \pm 5.1$ , AML grubunda  $49.5 \pm 26.6$ 'dır. Hastaların cinsiyet dağılımı 13 kadın ve 17 erkek şeklinde olmuştur.

Hazırlanan yaş ve cinsiyet olarak uyumlu kontrol grubunda sitogenetik olarak herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Vaka grubunda ise 7 hastada sitogenetik anomaliler gözlemlendi. Her hasta için 20 metafaz sayıldı. Gerekli durumda bu sayı 40'a çıkarıldı. Hastalara ait preparatlar, post kemoterapötik vakalarda kaliteli iken, tedavisinin herhangi bir aşamasında olanlarda özellikle kürlerden yeni çıkanlarda preparat kalitesi daha düşük bulundu. Ayrıca çalışma grubundan periferik kan alınmıştır. Oysaki kromozomal boyuttaki değişimler kemik iliğinde başladığından bu değişimin periferik yayılması zaman almakta, bu süre içinde patolojili hücre ömrünü tamamlamakta yada savunma hücreleri tarafından yok edilmektedir. Ayrıca kültür yöntemi ile periferik kanlar 3 gün üretilmektedir. Bu süre zarfında sağlıklı hücreler çok hızlı bir şekilde sayılarını artırırken; patolojili hücreler daha yavaş üreme göstermekte ve sağlıklı çok sayıdaki hücre içinde görülme oranı düşmektedir. Tüm bu nedenlerden dolayı patolojili hücreleri yakalamak bazen 20 metafaz sayımında

mümkün olmamaktadır. Hastalıkla bağlantılı olarak düşük mitotik indeks ve düşük kaliteli metafazlar yüzünden lösemilerde sitogenetik analiz zor olmaktadır. Ancak buna rağmen, hastaların birçoğunda sitogenetik analiz bilgilendirici olmuştur. Kemik iliğinden yapılan sitogenetik analizlerde anormal karyotipi yakalama oranının %80'den fazla olduğu ifade edilmiştir. Sayılan metafazlarda aynı kromozomal patolojiye sahip 2-3 metafazın tespiti yada iki üç hücrenin varlığı anormal bir klonun varlığını söylemektedir ( 97).

**Tablo 9:** Hastaları yaş, cinsiyet, tanı ve evrelerine göre dağılımı

Hasta Sıra No	Hasta Adı	Cinsiyet	Yaş	Tanı	Sitogenetik Bulgu
1	N T	K	7	ALL-Post Kemoterapi	
2	H Ö	E	16	ALL-Post Kemoterapi	
3	D Ö	K	6	ALL-Post Kemoterapi	
4	H U	K	12	ALL-Post Kemoterapi	
5	H Ü	K	47	ALL-Post İndüksiyon	t(12;15)
6	F B	E	12	ALL-Post Kemoterapi	
7	K A	E	12	ALL-Post Kemoterapi	
8	H A	K	21	ALL-L2 Post İndüksiyon	del(17q)
9	N K	K	55	ALL-L3 Post İndüksiyon	
10	Ç S	E	2	ALL-Post İndüksiyon	perisentrik inv(9)
11	M Ç	E	52	ALL- Post İndüksiyon	
12	K Ç	E	22	ALL-Post Kemoterapi	
13	A S	K	19	ALL-Post Kemoterapi	perisentrik inv(1)
14	B Ü	E	16	ALL-Post İndüksiyon	
15	M İ	E	41	ALL-L2 Post İndüksiyon	t(2;5)
16	H K	E	22	ALL Post İndüksiyon	
17	A E	K	33	AML-M3 Post İndüksiyon	
18	H H D	E	24	AML-M2 Post İndüksiyon	
19	S T	E	58	AML- Post İndüksiyon	
20	F A	E	83	AML Post İndüksiyon	
21	H C	K	76	KLL-E4 Post Kemoterapi	
22	K Ç	K	62	KLL-Post İndüksiyon	t(9;22)
23	M Ö	K	68	KLL-E4 Post Kemoterapi	
24	Ali	E	62	KLL Post İndüksiyon	
25	Ü Ç	K	56	KML-Post İndüksiyon	
26	H T	E	56	KML-Post Kemoterapi	
27	H A	K	46	KML-Post İndüksiyon Glivec +	
28	H K	K	52	KML-Post Kemoterapi	
29	NK	E	43	KML-Post İndüksiyon Glivec +	
30	YÇ	E	52	KML Post İndüksiyon Glivec +	t(9;22)

**Tablo 10:** Kontrol grubunun yaş ve cinsiyet olarak dağılımı

Hasta No	Hasta Adı	Cinsiyet	Yaş
1	EDK	K	8
2	İÜ	E	15
3	AK	K	5
4	HY	K	12
5	OU	K	48
6	MA	E	12
7	MU	E	13
8	AA	K	21
9	EA	K	75
10	SK	K	34
11	FA	K	62
12	HD	E	24
13	İÜ	K	56
14	ME	E	3
15	SK	E	55
16	ME	E	50
17	VŞ	K	55
18	BŞ	E	21
19	HD	E	55
20	DD	K	46
21	EY	K	20
22	HU	K	50
23	AY	E	15
24	CA	K	67
25	AU	E	43
26	SU	E	41
27	YU	E	22
28	HA	E	62
29	MT	E	52
30	ŞS	E	83

### **Sitogenetik yöntemle belirlenen kromozom anomalileri**

Çalışmamıza katılan vakaların periferik kan lenfosit kültüründen elde edilen preparatlarda sitogenetik olarak bulunan kromozom anomalilerinin lösemi gruplarına göre dağılımı aşağıdaki gibidir.

### **AML grubu**

AML grubunda 4 hasta bulunmaktadır. Remisyona girmiş evrelerinde yapılan değerlendirmelerde hastalarda herhangi bir patoloji saptanmadı. Hastalardan 2 tanesi remisyon indüksiyon tedavisini almış hastalar ve genel durumları iyi olan hastalardı. 1 hasta ileri yaşta olup remisyon için ilk indüksiyonunu aldıktan sonra kanı alındı. Hastanın beyaz küreleri çok yükselmiş durumdaydı (WBC:  $92.3 \times 10^3/\mu\text{l}$ , NE%: 96.6, RBC: 2.22, HCT: 20.3). Bu hastanın sitogenetik değerlendirilmesinde herhangi bir patoloji gözlemlenmedi. 4. hastadan remisyonunda iken kan alınmıştı. Daha sonra nüks ile gelen hasta öldü.

### **KLL grubu**

KLL grubunda 5 hasta bulunmaktadır. Bu gruptaki hastaların yaş ortalamaları çok yüksektir. Hastalardan sadece 1 tanesinde bir patoloji saptandı. Bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 11). Normalde KML'ye spesifik bir patoloji olan t(9;22) hastanın sayılan 20 metafazından 2 tanesinde pozitif. İleri yaştaki hastanın genel durumu iyiydi. Diğer hastalar sitogenetik açıdan herhangi bir patoloji sergilemediler. Gözlenen t(9;22) şekil 7, 8'de sunulmaktadır.

**Tablo 11.** KLL grubunun kontrol grubuna göre karşılaştırması.

	<b>N</b>	<b>Aritmetik Ortalama ± Standart Sapma</b>
<b>Kontrol</b>	5	0.00 ± 0.00
<b>KLL</b>	5	0.20 ± 0.44

N: Birey sayısı

### **ALL grubu**

Bu gruptaki olguların yaş ortalaması oldukça düşüktür. Buna rağmen patoloji görme olasılığı; bu grupta diğer gruplara göre fazla olmuştur. 5 hastada patoloji gözlemlendi. Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p < 0.035$ , Tablo 12).

Hastalardan 1.si remisyon indüksiyonunu sağlamış bir hastadır. Hiper CVAD tedavisinin Ave B kolunu dönüşümlü olarak almaktadır. Aktif bir şikayeti olmayan hastanın kandeğerlerine bakıldığında beyaz kürelerin çok düştüğü görülmüştür (WBC:  $0.7 \times 10^3/\mu\text{l}$ ). Genel itibariyle kan değerleri düşük olan hastanın ateş

yakınması vardı. Hastanın incelenen sahalarının büyük çoğunluğunda t(2;5) gözlenmiştir (Şekil 4,5). Bunun dışında bir patolojiye sahip olmayan hastanın genel durumu iyiydi.

Hastalardan 2.si 21 yaşında bir vaka idi. Hastalığı nüks ettiği için nakil önerilen bu hasta öldü. Hasta da sitogenetik olarak sayılan 20 metafazın 3 tanesinde del(17q) bulunmuştur (Şekil 3).

Hastalardan 2 tanesinde inversiyon gözlenmiştir. Bunlardan biri remisyona induksiyonunu yeni almış bir hasta iken diğer hastamız post kemoterapötik bir hastadır. Hastalardan biri perisentrik inv(1) (şekil 6), diğeri ise perisentrik inv(9)'a (şekil 10) sahipti. Bu hastalardan biri tam iyileşme sağlamış ilaç tedavisi almamaktadır. Diğer hasta remisyona yeni sağlamış durumda idi.

Diğer bir ALL vakası kaybedilen hastalardan biridir. Hastanın remisyonda olduğu bir dönemde kan alındı. Hastada t(12;15) translokasyonu gözlemlendi. Ancak sayılan 40 metafazdan sadece 1 sahada gözlenen bu durumun anlamlı sayılmaması düşünülmektedir.

**Tablo 12.** ALL grubunun kontrol grubuna göre karşılaştırması.

	<b>N</b>	<b>Aritmetik Ortama ± Standart Sapma</b>
<b>Kontrol</b>	16	0.00 ± 0.00
<b>ALL</b>	16	0.25 ± 0.44

N: Birey sayısı, p<0.035

### **KML grubu**

KML grubunda 5 hasta bulunmaktadır. Hastalardan 3'ü hala Glivec kullanılmaktadır. Glivec kullanımında zorlanan ve ara ara ilaca kesinti veren hastanın 20 metafazının 5'inde t(9;22) pozitif idi (Şekil 9). Diğer hastalarda herhangi bir patoloji saptanmadı. Bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 13).

**Tablo 13.** KML grubunun kontrol grubuna göre karşılaştırması.

	<b>N</b>	<b>Aritmetik Ortama ± Standart Sapma</b>
<b>Kontrol</b>	5	0.00 ± 0.00
<b>KML</b>	5	0.20 ± 0.44

N: Birey sayısı

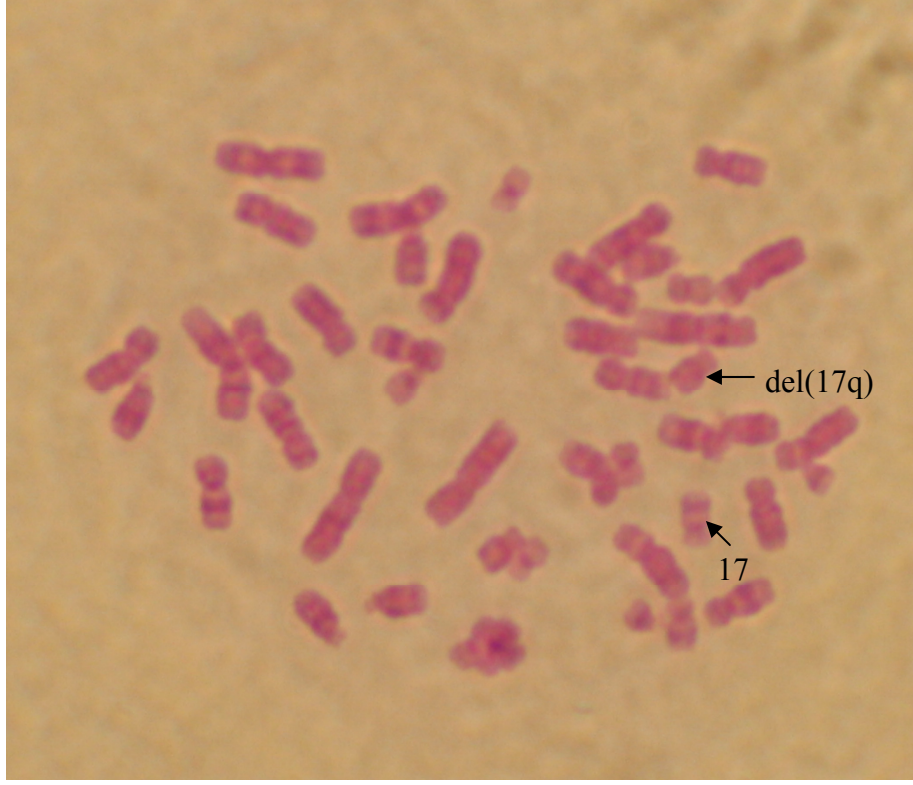




**Şekil 1:** Kontrol grubuna ait bir fotoğraf

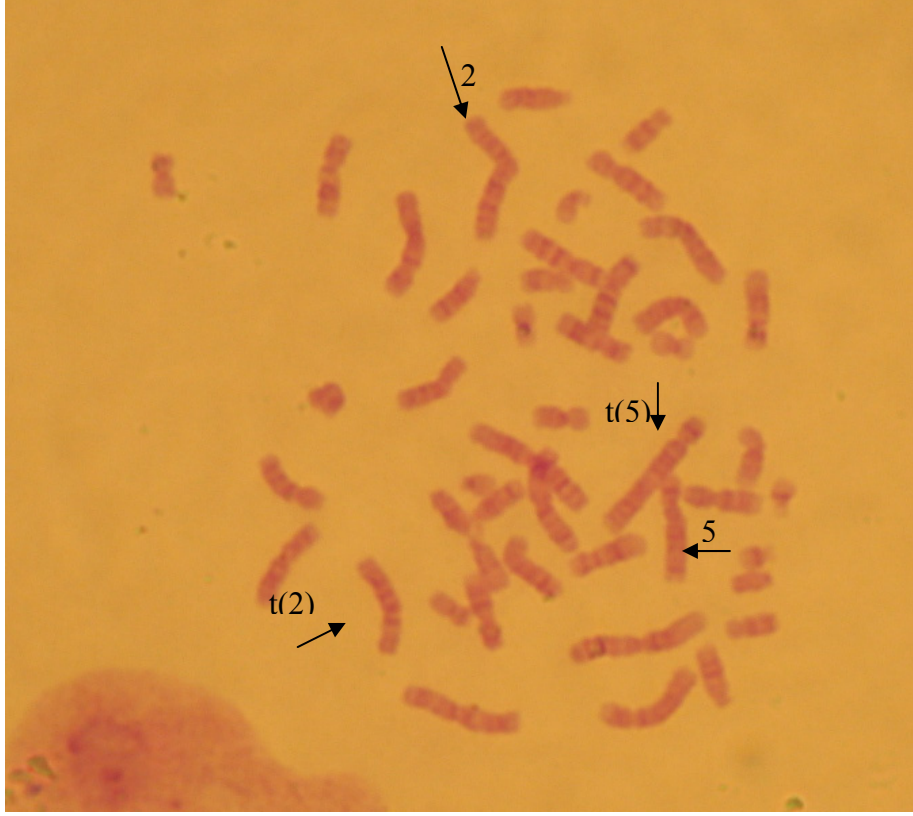


**Şekil 2:** Kontrol grubundan 46, XX karyotipli bir olgu

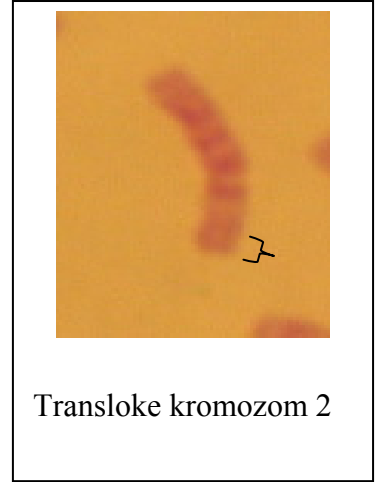
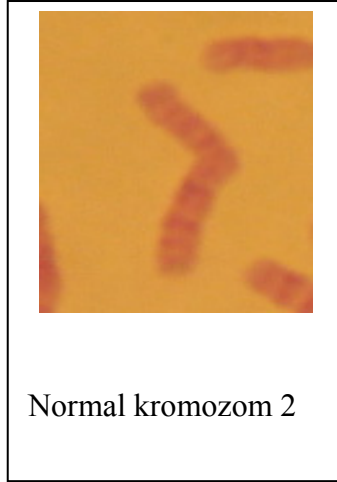
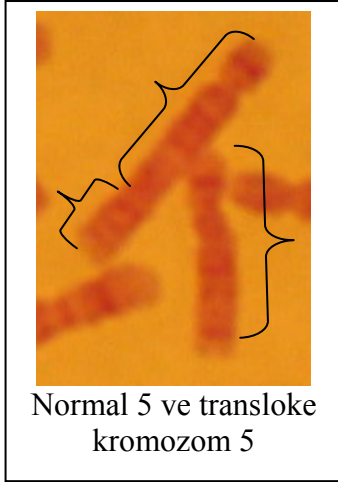


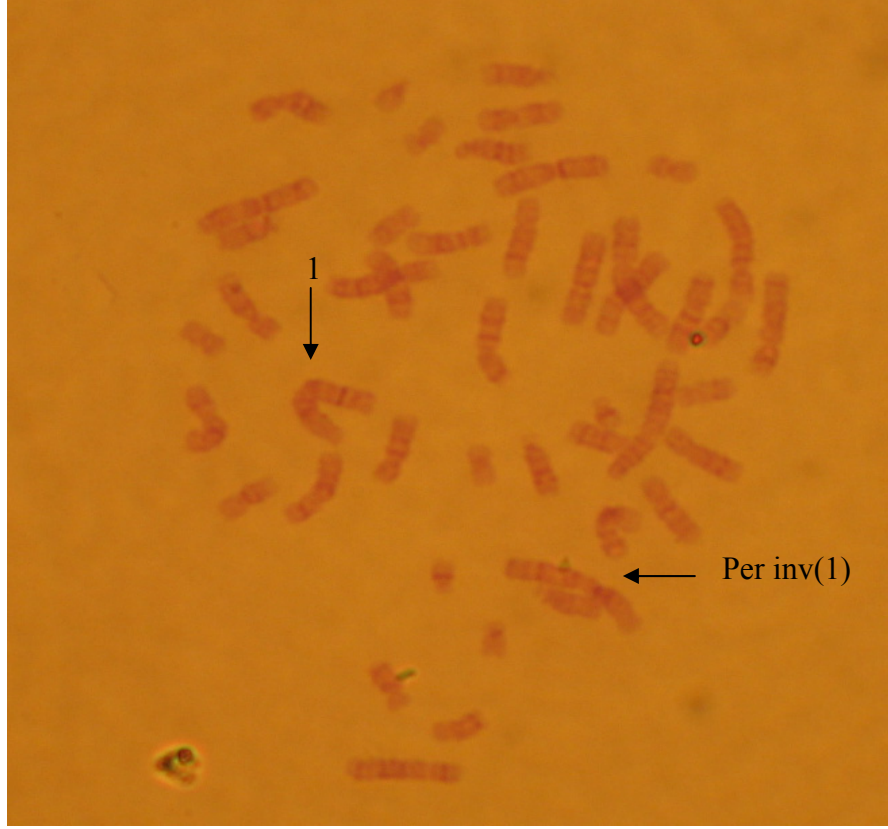
**Şekil 3: del(17q) gösteren ALL vakasına ait bir fotoğraf (vaka 8)**



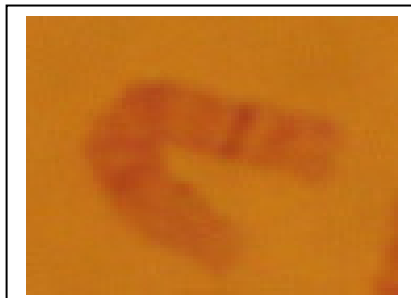


Şekil 4: t(2;5) translokasyonunu gösteren ALL vakası (vaka15)

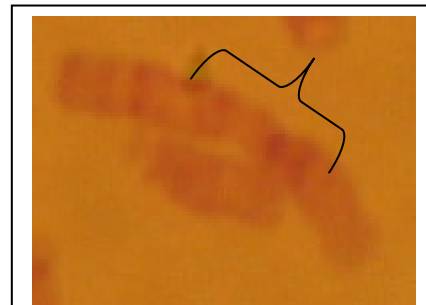




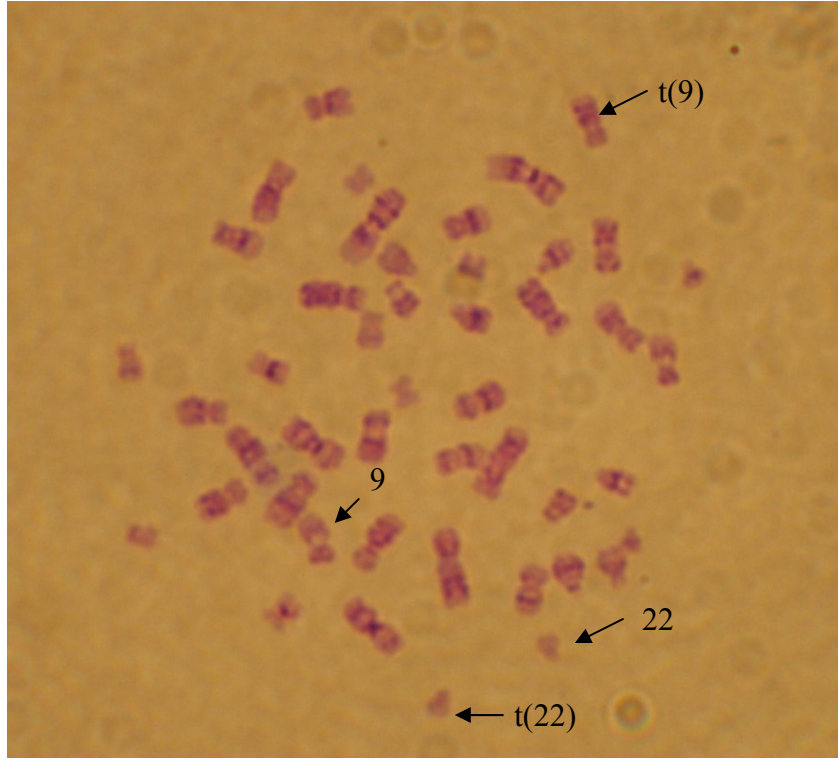
Şekil 5: perisentrik inv(1) gösteren vaka (vaka 13)



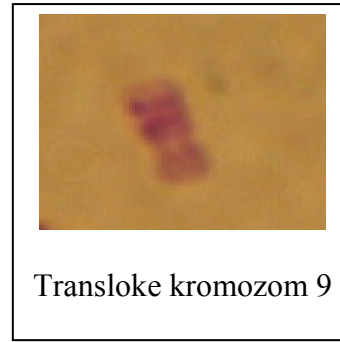
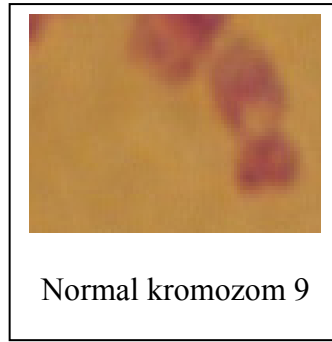
Normal 1 nolu kromozom

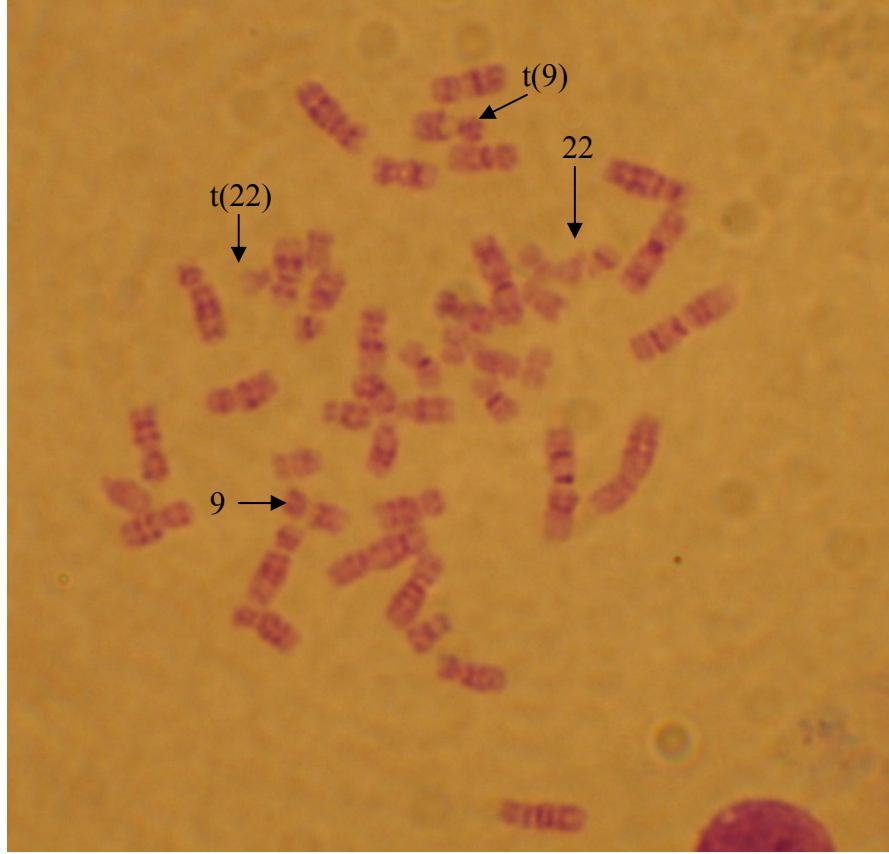


Perisentrik inversiyonlu 1

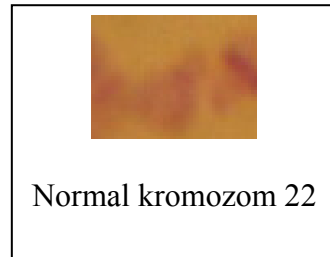
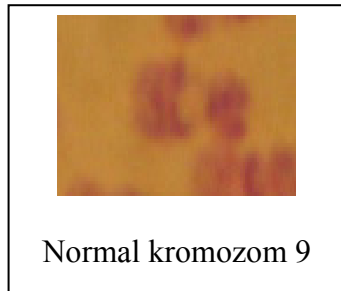
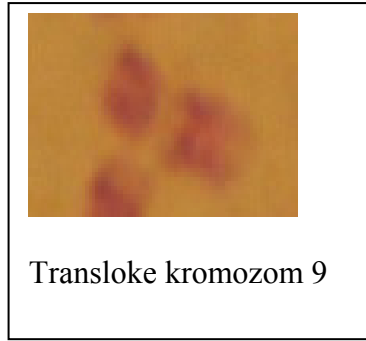


Şekil 6: KLL vakasında t(9;22) gösteren saha (vaka 22)



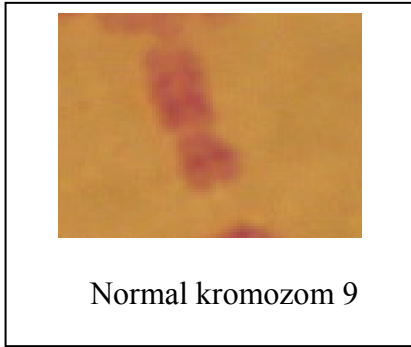


Şekil 7: t(9;22) gösteren KML vakasından metafaz örneği (vaka 30)

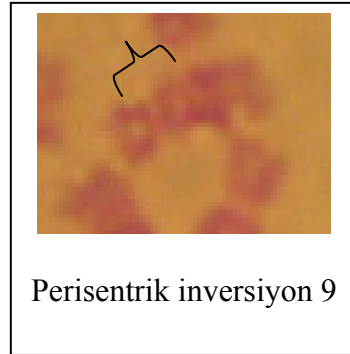




**Şekil 8: Perisentrik inv(9) gösteren ALL vakası (vaka 10)**



Normal kromozom 9



Perisentrik inversiyon 9

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Lösemiye; kan hücrelerinin çoğalması, farklılaşması ve programlanmış ölümleri (apoptosis) arasındaki dengeyi sağlayan mekanizmalarda görev alan genlerdeki somatik mutasyonlar sebep olmaktadır. Lösemilerde olası genetik değişiklikler, hücre biyolojisini dolayısıyla hastalığın klinik seyri ve prognozunu yansıtmaktadır. Bu sebeple, genetik anomalilerin tanımlanması için kırık noktalarının tespiti ve bununla bağlantılı olarak bu noktadaki genlerin lösemi ile bağlantısı son yıllarda üzerinde yoğunlaşılacak konuları oluşturmaktadır.

Çalışmamızda değişik türden lösemi hastaları ele alınmıştır. Seçilen vakalar hastanemiz bünyesinde tanı konulmuş, remisyonu sağlamış fakat tedavisine devam eden grup veya tedaviyi tamamen tamamlamış takipteki hastalardan oluşmaktadır.

Kromozom anomalilerin belirlenmesi, hastalığın tanısındaki şüpheleri ortadan kaldırarak, hastalığın alt tipi tanısının konulması, prognozunun iyi veya kötü olduğunun belirlenmesi, hastalığın hangi safhada seyrettiğinin kontrolü ve tedavi protokollerinin etkin olup olmadığı yönünde hekime yönlendirmektedir.

Bu çalışmada incelenen hastaların yaş dağılımı 2-83 arasındaydı. Lösemilerin alt grupları ise; 16 ALL, 4 AML, 5 KLL ve 5 KML şeklinde idi. Bu çalışmada AML gurubunu oluşturan 4 hastadan hiç birinde kromozomal bir patoloji gözlenmemiştir. Literatüre bakıldığında AML’li olgularda t(8;21), t(16;16), t(15;17), t(11q23;v) ve inv(16) yapısal anomalileri ile kromozom materyalinde artışa ve kayba yol açan sayısal anomaliler AML’de bulunmakta ve prognostik öneme sahip değişimler olarak belirtilmektedir. AML’de en sık gözlenen primer sayısal kromozom anomalileri trizomi 13, 21, 8 ve 4 ile trizomi 11’dir (98,99). Ancak çalışma grubumuzda herhangi bir sayısal ve yapısal anomali bulunmamıştır.

Diğer bir alt grup olan ALL’de 16 hastanın 5 tanesinde yapısal patoloji tespit edilmiştir. Bunlar t(2;5), perisentrik inv(1), perisentrik inv(9), del(17q), t(12;15)’dir. t(2;5) translokasyonuna sahip hasta immünofenotiplendirmeye göre ALL-2 tanısı konmuş ve indüksiyon terapisini almış remisyonda bir hastadır. Literatür incelemelerinde bu translokasyon büyük oranda anaplastik large cell lenfomalarda,



Hodgkin's ve non-Hodgkin's lenfomalarda görülüp ALK/NPM1 gen değişimi ile bu yeni hibrit gen 5'NPM-3'ALK derivatif 5 uç üzerinde yerleşmektedir (100-102).

Burada ayrıca belirtmek istediğimiz bir nokta da genomu değerlendirirken, FISH yöntemi ile yapılan incelemelerde kromozomların sınırlı patolojileri düşünülerek patoloji tespiti yapılırken, GTG bantlama ile genomu bütünü ile inceleme imkanı elde edilmiştir.

İnversiyonlar lösemide çok çeşitli kromozomları kapsayabilmektedir. 9. kromozomu kapsayan inversiyon (perisentrik inv(9)) normal olarak popülasyonda görülen genel bir heteromorfizmdir. Perisentrik inv(9)'lu 2 vakanın sunulduğu bir çalışmada kazanılmış inv(9)'un önemi bilinmemektedir. Lösemi oluşumuna katkısı hakkında bir bilgi verilmemiştir (103). Diğer bir çalışmada 6 vaka incelenmiştir ve burada da prognostik bir öneme sahip olup olmadığından bahsedilmemiştir.(104).

Bizim perisentrik inv (1) vakamız, kemoterapi tedavisini 2 yıl önce tamamlamış ve hastada genel durum iyiydi. Yapılan kontrollerinde herhangi bir anormallik bulunmamıştır. İlgili inversiyon hakkında yapılan araştırmada Glivec kullanan bir KML hastasında bu durumun tedavi sonrasında oluştuğu gözlenmiştir (105). Ancak ALL'li hastamızda inversiyon perisentrik tarzda iken belirtilen literatürde parasentrik tarzda idi. Bu inversiyonun löseminin bu tipinde anlam ifade edip etmediğini gösterir herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Delesyonlar da lösemi sitogenetiğinde çok çeşitli kromozomların, çok değişik bölgelerini kapsayabilmektedir. Çalışmada rastladığım 17. kromozomun uzun kolundaki delesyona rastladığım hasta nüks ALL ile kaybedilmiştir. Nüksün bu delesyon ile bir bağlantısının olup olmadığı ya da ilgili delesyonun nüks ile oluşmuş sekonder bir kromozom anomalisi olup olmadığı hastadan daha önce kan alınamadığı için kıyaslanmasına imkanımız olmamıştır. del (17q)'nun rapor edildiği bir çalışmada, bu delesyon kompleks bir delesyon ile birlikte görülmektedir. Yayındaki hasta Akut promiyelositik lösemidir ve hastalığın seyrini zorlaştıran genetik değişim kompleks translokasyona bağlanmaktadır (106). Erişkin ALL vakaların birinde gözlenen bir translokasyon bulunmaktadır. Sayılan 40 metafazın yalnız bir tanesinde tespit edilen t(12;15) anlamlı olarak kabul edilmemiştir. İndüksiyon terapisi sonrası hasta kaybedilmiştir.

Lösemide özellikle KML'de kilit rol oynayan t(9;22) 2 vakada bulunmuştur. Vakalardan biri KLL iken diğer hasta KML'dir. KML vakası Glivec tedavisini almakta güçlük çeken bir hastadır ve periferik kan preparatlarında anlamlı olacak şekilde bu translokasyona rastlanmıştır. KLL vakalarında bu translokasyon anlam ifade etmemektedir. Mevcut patoloji kemoterapi ajanları etkisiyle oluşabilen sekonder bir anomali olabilir. KML vakalarında anlam ifade eden bu patoloji iyi prognoz belirteçidir (48, 49, 50, 51, 52, 53).

t(9;22) bilindiği üzere KML'de sitogenetik açıdan teşhis kriteridir. Lösemi vakalarında periferik kan metaryali ile de klinikleri yönlendirici bulgular vermeyi amaçladığımız tezde 30 hastanın 7 tanesinde kromozomal olarak patoloji saptandı. 7 vakadan iki tanesi tez süresince kaybedildi. Lösemi vakalarında kemik iliği materyali sitogenetik analiz için kullanılmaktadır. Ve ancak ileri safhalarda periferik kana ilgili sitogenetik değişimler yansımaktadır.

Patoloji gözlenen vakaların 5 tanesi ALL grubundan, 1 tanesi KML'de, 1 tanesi de KLL grubundadır. Buradan ALL grubunda patoloji görülme oranının diğer gruplara oranla daha fazla olduğunu görüyoruz (ALL: % 31.25, KML: %20, KLL: %20).

Sonuç olarak; klasik sitogenetik metod ile periferik kandan lösemi vakaları hakkında bulgular elde edilmiştir. Bulgular hastanın klinik seyri hakkında bilgi verebilecektir. Ayrıca çalışmamızda düşündüğümüz gibi post kemoterapik vakalar incelenerek; kemoterapinin genetik boyuttaki etkisi yorumlanabilecektir. Yani tedavinin değerlendirilmesinde klasik sitogenetik metod ile periferik kandan yorum yapabileceğiz.

## ÖZET

Bu çalışmada Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahiliye Anabilim Dalı Hematoloji bölümü ve Pediatri Anabilim Dalı Çocuk Onkolojisi bölümüne başvuran kemoterapi başlanmış, remisyondaki veya post-kemoterapi dönemindeki lösemili erişkin ve çocuk hastalar ile çalışılmıştır. Ayrıca hastalarla yaş ve cinsiyet olarak uyumlu sağlıklı kontrol grubu da oluşturulmuştur. Lösemi grubu 12 post-kemoterapik, 18 remisyonunu sağlamış ve tedavisinin herhangi bir basamağında olan hastalardan oluşmuştur. Çalışmaya paralel olarak hastalarla yaş ve cinsiyet olarak uyumlu 30 kontrol birey de sitogenetik olarak değerlendirildi. Tüm hasta ve kontrol bireylerden GTG (Giemsa-Tripsin-Giemsa) bantlama tekniği ile preparatlar hazırlandı. Lösemi alttiplerine ve tedavinin evresine göre tespit edilen patolojilerin dağılımı şu şekildedir:

16 ALL hastasının 5'inde patoloji tespit edilmiş olup,

- t(12;15) translokasyonlu vaka post-indüksiyon tedavisinde,
- del(17q) delesyonlu vaka post-indüksiyon tedavisinde,
- Perisentrik inversiyon(9) patolojisini taşıyan hasta post-indüksiyon tedavisinde,
- Perisentrik inversiyon(1) patolojisini taşıyan hasta post-kemoterapi döneminde,
- t(2;5) translokasyonlu vaka post-indüksiyon tedavisindeydi.

5 KLL hastasının 1'inde patoloji tespit edilmiş olup,

- t(9;22) translokasyonlu hasta post-indüksiyon döneminde değerlendirildi.

5 KML hastasının 1'inde patoloji tespit edilmiş olup,

- t(9;22) translokasyonlu bir vaka post-indüksiyon döneminde idi.

ALL hastaları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, gözlemlenen kromozom anomalileri bakımından anlamlı fark gözlemlendi. Diğer hasta grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark gözlemlenmedi.

Sonuç olarak; lösemi tedavi protokollerinden biri olan kemoterapi kromozomal boyutlarda değişimlere neden olabilmektedir. Bu değişim mevcut bir patolojiyi düzeltme yönünde olabileceği gibi, tedavi bağımlı yeni klonların oluşması şeklinde de olabilir. Periferik kandan GTG bantlama yöntemi ile kısa sürede hastanın tedavisi

hakkında fikir verebileceğini, hem ekonomik ve hem de kolay uygulanabilirlik açısından tercih edilebileceğini düşünmekteyiz.

**Anahtar kelimeler:** lösemi, GTG bantlama, kemoterapi, kromozom, periferik kan.

## SUMMARY

Adult and children patients with leukemia, who have admitted to Hematology and Pediatric Oncology departments of Suleyman Demirel University School of Medicine during remission or post-chemotherapy periods, were included in this study. All patients were given chemotherapy. A control group which is coherent with the patient group by means of age and gender was also constituted. There were 30 patients of whom 12 were in post-chemotherapeutic and 18 were in remission periods with any stage of the treatment in leukemia group. In parallel to the study, 30 healthy individuals in control group were evaluated cytogenetically. Blood samples were collected and metaphase plaque samples were prepared via using GTG (Giemsa-Tyripsine-Giemsa) banding method. The distribution of the pathologic evidence was as follows, according to the leukemia subtypes and stage of the treatment:

in 5 of 16 patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL), there was,

- one t(12;15) translocation case receiving post – induction treatment,
- one del(17q) case receiving post – induction treatment,
- one pericentral inversion (9) case receiving post – induction treatment,
- one pericentral inversion (1) case in post – chemotherapeutic term,
- one t(2;5) translocation case receiving post – induction treatment.

in 1 of 5 patients with chronic myeloblastic leukemia (CML), there was,

- one t(9;22) translocation case in post – induction term.

in 1 of 5 patients with chronic lymphoblastic leukemia (CLL), there was,

- one t(9;22) translocation case in post – induction term.

Matched with control group, ALL patients showed significant difference in respect of observed chromosome abnormalities ( $p < 0.05$ ). Other patient groups, matched with control groups didn't show significant differentiation.

As a result, we can say that chemotherapy, which is a leukemia treatment protocol, can lead to some changes in chromosomal extent. This change may correct a present pathology or can represent itself as emerging of new treatment-induced clones. We think that GTG banding method can give idea about the course of treatment and it can also be preferred as it is an affordable and easy method.

**Key words:** leukemia, GTG banding, chemotherapy, chromosome, periferic blood.

## KAYNAKLAR

1. Özkınay C. Kromozomlarda KKD. Ege Üni. Tıp Fak. Dergisi, 1982; Cilt 21 Sayı 1:1-4.
2. Tuna M. Akut lösemi olgularında kromozom ve kardeş kromatid değişimi analizi, yüksek lisans tezi. Bursa, 1992.
3. Lynch AM, Parry JM. The Cytochalasin-B micronucleus/kinetochore assay in vitro studies 10 suspected aneuploides. Mutat. Res. 1993; 287:71-76.
4. Wang Y, Hopwood VL, Hu P, Lennon A, Osterberger J, Glassman A. Determination of secondary chromosomal aberrations of chronic myelocytic leukemia. Cancer Genet Cytogenet 2004; 153:53-56.
5. Albayrak A. Hematopoetik sistemin neoplastik hastalıkları, Atatürk Üniversitesi Yayınları, Erzurum, 1983.
6. Willams WS, Beutler E., Litchman MA., Coler BS., Kippt S., Mauner AM. Willam's Hematology, 5. Edition, McGraw Hill Company, New York, 1991; 2209-2349.
7. Fialkow PJ, Demmon AM, Jacobson RJ. Chronic myelocytic leukemia. Journal of clinical investigation, 1978; 62:823-825.
8. Aksoy M. Akut Lösemileri de içeren malignitelerin oluşumunda bazı kimyasal maddelerin rolleri, Doğa Tıp ve Eczacılık, TÜBİTAK, 1983; 3:190-197.
9. Fırat D, Akdaş A, Atakan IA, Baltalı E, Berk Ö, Berkardo B, Bilge N, Büyükpamukcu M, Çevik N. (Çeviri):Klinik Onkoloji, Dördüncü baskı, Sağlık Bakanlığı Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Ortak Yayını, 1990.
10. Oski FA, Nathan DG. Hematology of infancy and childhood, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1987.
11. Sayılı BS. Medikal Sitogenetik, Ankara, 1986.
12. Başaran N. Tıbbi Genetik, Bilim Teknik Yayınevi, 3. Baskı, İstanbul, 1985.
13. Sen P, Bailey NM, Hagemester FB, Liang ŞC. Induction of chromosome breaks and sister chromatid exchanges in patients with Hodgkin's disease by two

combination chemotherapy regimens of different leukemogenic potential. *Cancer Res.* 1990; 50:558-562.

14. Celep F. Çernobil reaktör kazası sonrası Doğu Karadeniz bölgesindeki radioaktif kirlenmenin muhtemel sonuçlarının sitogenetik seviyede incelenmesi. Yüksek Lisans. Karadeniz Teknik Üniversitesi, 1994.

15. Arrighi F, Rao PN. *Genes, Chromosomes and Neoplasia*, Raven Pres. New York, 1980.

16. Müftüoğlu E. *Klinik Hematoloji*, Şahin Basım, Diyarbakır, 1995; 13:363-376.

17. Özalp Ü. Kimyasal Karsinojen Maddeler ve Moleküler ve Hücresel Etkinlikleri, *Acta Oncologica Turcica*, 1988; 21:166-192.

18. Kayaalp S.O. *Tıbbi Farmakoloji*, 3. Baskı, Ankara, 1984; 657:166-192.

19. Aksoy M, Erdem Ş, Dinçol G. Leukemia in showerers exposed chronically to benzene. *Blood*, 1974; 44:837-43.

20. Cohen T, Crager WP. Acute myeloid leukemia following seven years of aplastic anemia by cloramfenikol. *Am J Med.* 1967; 43:462-471.

21. Niemeyer MC, Sallan SE. Acute lymphoblastic leukemia. Editors: Nathan DG, Oski FA, Niemeyer MC, Sallan SE, Nathan & Oski. *Hematology Infancy & Childhood*, 4. edition. W.B. Saunders Co. 1993; 4:1249-1268.

22. Sakallı Çetin E. Ökse otu (*Viscum album L.*)'nun kardeş kromotid değişimi üzerine etkisi, Isparta, 2005.

23. Heinonen K, Mrozek K, Lawrence D, Arthur DC, Pettaneti JM, Stramberg J, Qumsiyeh BM, Verma SR, Bloomfield DC. Clinical characteristics of patients with de novo AML and isolated trisomy 11: a cancer and leukemia group B study. *British Journal of Haematology*, 1998; 101:513-520.

24. Raimondi SC, Shurtleff SA, Downing JR, Rubnitz J, Mathew S, Rivera KG, Grosveld CG, Behm GF. 12p abnormalities and the TEL gene (ETV6) in childhood ALL. *Blood*, 1997; 90(11):4559-4566.

25. Westbrook CA. The role of molecular techniques in the clinical management of leukemia. *Cancer Supplement.* 1992; 70(6):1695-1700.



26. Uckun MF, Nachman BJ, Sather NH, Sensel GM, Kraft P, Steinherz GP, Lange B, Hutchinson R, Reagman HG, Gaynon SP, Heerama AN. Clinical significance of Philadelphia chromosome positive pediatric ALL in context of contemporary intensive therapies. A report from the Children's Cancer Group. American Cancer Society. 1998; 83(9):2030-2039.
27. Cohen F.L. Clinical genetics in nursing practise, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 1984; 17:285-302.
28. Brothman A.R, Ghosn C, Werner E. Pentosomy 21q in a neonatal case of acute myeloblastic leukemia, Cancer Genet. Cytogenet. 1990; 47:135-137.
29. Ohyashiki K, Ohyasiki JH, Hojo H, Ohtaka M, Toyoma K, Sugita K, Nakazawa K, Nakazawa T, Enomoto Y, Watanabe Y. Cytogenetic findings in adult leukemia and myeloproliferative disorders with an involvement of megakaryocyte lineage, Cancer, 1990; 65:940-948.
30. Say B. The role of genetics in hematology, Journal of Medical Sciences, 1995; 24:171-175.
31. Erdem H. Minimal reziduel hastalıkta tanı yöntemleri, Medikal Biyoteknoloji ve Moleküler Tıp Dergisi, 1996; 1(2):60-65.
32. Second MIC Cooperative Group. Morphologic, immunologic and cytogenetic (MIC) working classification of AML and ALL. Br J Haematol 68:487-494.
33. Kern WF. Çeviri:Ferhanoğlu B. PDQ Hematoloji 1. Baskı 2005.
34. Travade P, Chastang C, Dighiero G, Binet JL, Cooperative Group on CLL of Societe Française d'hematologie. New trends in CLL treatment. Blood Cells, 1987; 12:485-496.
35. Johanson B, Mertens F, Heim S, Kristofferson V, Mandahl N, Nilsson PG, Mitelman F. Cytogenetic findings in acute megakaryoblastic leukemia (ANLL-M<sub>7</sub>), Cancer Genet. Cytogenet., 1990; 48:119-123.
36. Kadam PR, Advani SH, Bhijey AN. Studies on sister chromatid exchanges in patients with Hodgkin's disease, Cancer Genet. Cytogenet., 1985; 22:265-274.

37. Becher R, Qiv JY, Parr A, Wendehorst E, Schmidt CG. Seven variants including four new Philadelphia translocations, *Cancer Genet. Cytogenet.*, 1990; 44:181-186.
38. Clare MG, Blain EA, Taylor SH. Sister chromatid exchanges in human lymphocytes treated with combinations of cytotoxic drugs, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 1982; 18:533-544.
39. Clare MG, Taylor SH, Blain E, Jones WG. The Quantitation of sister chromatid exchanges in lymphocytes of cancer patients of interval after cytotoxic chemotherapy, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 1983; 19:1509-1515.
40. Chosh PK, Ghosh R. Effect of hyperthermia on the frequency of sister chromatid exchanges in patients with cancer of cervix uteri, *Mutation Research*, 1988; 208:143-147.
41. Malcom S. Chromosome rearrangements and cancer, *Molecular Medicine*, 1984; 1:79-93.
42. Bacher U, Haferlach T, Hiddemann W, Schnittger S, Kern W, Schoch C. Additional clonal abnormalities in Ph(+) ALL and CML demonstrate a different cytogenetic pattern at diagnosis and follow different pathways at progression. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2005; 157:53-61.
43. Rieder H, Ludwig WD, Gassmann W, Maurer J, Janssen J, Gökbaget N, Schwarz S, Thiel E, Löffler H, Bartram C, Hoelzer D, Fonatsch C. Prognastic significance of additional chromosome abnormalities in adult patients with Ph chromosome positive ALL. *Br J Haematol* 1996; 95:678-91.
44. Taberero MD, Bortoluci AM, Aaejos I, Lopez Berges MC, Rasillo A, Garcia Sanz R, Garcia M, Sayagues JM, Gonzalez M, Mateo G, San Miguel JF, Orfao A. Adult precursor B-ALL with BCR/ABL gene rearrangements displays a unique immunophenotyped on the pattern of CD10, CD34, CD13 and CD38 expression. *Leukemia* 2001; 15:406-14.
45. Gale RP, Kanti RR. New insight into a chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 1987; 1:667-679.

46. Hooberman AL, Westbrook CA. Molecular methods to detect the Philadelphia chromosome. *Clinics and Laboratory Medicine* 1990; 10(4):839-850.
47. Glassman A, Talpaz M, Arlinghaus B. Comparison of bcr-abl protein expression and Philadelphia chromosome analysis in chronic myelogenous leukemia patients. *Hematopathology* 1996; 106:442-446.
48. Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in CML identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973; 243:290-3.
49. Spechia G, Minini D, Guerrasia A, Palumbo G, Pastore D, Liso V. Ph(+) ALL in adults: molecular and clinical studies. *Leuk. Lymphoma*. 1995;18 (1):37-42.
50. Heim S, Mitelman F. Chronic myelogenous leukemia. *Cancer Cytogenetics* 2<sup>nd</sup> Edition. 1989; 4:41-69.
51. Sanberg AA. Chromosome changes in lymphomas. *Human Pathology* 1981; 12:531-539.
52. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of the chronic leukemias. *N Eng J Med*. 1999; 341:164-172.
53. Kantarjian H, Dixon D, Keating MJ. Characteristics of accelerated disease in CML. *Cancer* 1988; 61:14-41.
54. İlhan O. Kronik myelositer lösemi ([www.osmanilhan.com/kronik\\_miyelosit.pdf](http://www.osmanilhan.com/kronik_miyelosit.pdf)).
55. Poirel H, Radford-Weiss I, Rack K, et al. Detection of chromosome 16 CBF beta-MHY11 fusion transcript in myelomonocytic leukemias. *Blood*, 1995; 85:1313-1322.
56. Gilliland DG, Blanchard KL. Clonality in myeloproliferative disorders: Analysis by means of the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991; 88:6848-6852.
57. Mitelman F. An International system for human cytogenetic nomenclature. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 1995.
58. Kurzrock R, Talpaz M. *Molecular biology in cancer medicine*. Martin Dunitz Ltd. 1999.

59. Koç Basar D. Kronik myelösiter lösemi (KML)'li hastalarda mikronükleus analizi, Ankara-1996.
60. Öztürk A. Meme kanserli hastaların lenfosit hücrelerinde KKD sıklığı. Yüksek Lisans Tezi, 1995.
61. Acar A. Ferrokrom fabrikasında çalışan işçilerde sitogenetik çalışmalar, Doktora Tezi, 1985.
62. Kurvink K, Blommfield CD, Keeman KM, Levitt S, Cervenka J. SCE in lymphocytes from patients with malignant lymphoma. *Human Genetics*, 1978; 44:137-144.
63. Crossen PE, Fitzgerald PN, Colls BN. Normal sister chromatid exchanges and cell cycle progression in cultured lymphocytes from patients with malignant lymphoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1981; 67:821-28.
64. Bernard B, Zimmer G, Prescher G, Schmidt CG. Spontaneous SCE in normal bone marrow and Ph-positive chronic myelocytic leukemia, *Cancer Research*, 1998; 48:745-750.
65. Cheng WS, Mulvihill JJ, Green MH, Pickle LW, Tsai S, Whangpeng JJ. SCE and chromosomes in chronic myelogenous leukemia and cancer families, *Int. J. Cancer*, 1979; 23:8.
66. Otter N, Palmer CG, Baehner RL. SCE in lymphocytes from patients with acute lymphoblastic leukemia. *Hum. Genet.*, 1979; 52:185-92.
67. Thelma B, Dowsson AA, King DJ, Bullock I, Watt JL. Variation of Sister chromatid exchanges frequency in lymphocyte cultures from patients with Hodgkin's Disease before, during and after treatment. *Cancer Genet. Of Cytogenet.*, 1986; 20:53-61.
68. Başaran N. Teorik ve pratik Floresan In Situ Hibridizasyon:FISH, Eskişehir, 1996.
69. Karaman B. DNA spesifik problemlerin kullanımı ile yapısal seks kromozom anomalilerinin araştırılması. Tıbbi Genetik Doktora Tezi, İÜ. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1999.

70. Roth MS, Antin Jh, Bingham EL, Ginsburg D. Detection of Philadelphia chromosome-positive cells by the polymerase chain reaction following bone marrow transplant for CML. *Blood*, 1989; 74(2):882-885.
71. Strachan T and Read AP. *Human Molecular Genetics*. BIOS Scientific Publishers Limited, 1996.
72. Dobrovic A, Trainor KJ, Morley AA. Detection of molecular abnormality in Chronic Myeloid Leukemia by use of polymerase chain reaction. *Blood*, 1981; 12(5):2063-2065.
73. Jonas D, Lübbert M, Kawasaki ES. Clonal analysis of bcr-abl rearrangement in T lymphocytes from patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 1992; 79(4):1017-1023.
74. Klug WS, Cummings MR. *Genetik Kavramlar (Çeviri:Öner C.)* İstanbul, 2002.
75. Özçelik N. *Tıbbi Biyoloji*, Isparta, 2005.
76. Brecks HM, Berkow R, Bogin MR, Fletcher JA. *The Merck manual of diagnosis and therapy*. 17th edition, division of Merck & Co., Inc., Whitehouse station, N.J. 1999.
77. Tunalı A. *Kan hastalıkları*. Editör:Prof. Dr. Öbek A. İç hastalıkları, 4. baskı, Bursa, 1990.
78. Hardman GJ, Limbird EL, Gilman GA. *The pharmacological basis of therapeutics*. 10th edition Mc Graw Hill Co., Inc., USA, 2001.
79. Larsen KA. *Mechanism of anticancer drugs*. European School of oncology course book. Türkiye, 2005.
80. Yamauchi S, Kudoh S, Kimura T, Hirata K, Yoshikawa J. Additive effects of amrubisin with cisplatin on human lung cancer cell lines. *Journal of Clinical Oncology*, 2002; 20:3637-3543.
81. Klejman A, Rushen L, Morrione A, Slupianek A, Skorski T. Phosphatidylinositol-3 kinase inhibitors enhance the anti-leukemia effect of STI571. *Oncogene*. 2002; 21:5868-5876.

82. Scappini B, Onida F, Kantarjian Hm, Dong L, Verstovsek S, Keating Mj, Beran M. Invitro effects of STI571-containing drug combinations on the growth of Philadelphia-positive chronic myelogenous leukemia cells. *Cancer*. 2002; 10:2653-2662.
83. Guilhot F, Chastang C, Michallet M, Guerci A, Harousseau JI, Maloisel F, Bouabdallah R, Guyatat D, Cheron N, Nicolini F, Abgrall JF, Tanzer J. Interferon alfa-2b combined with cytabrine versus interferon alone in choronic myelogenous leukemia. *The New England journal of Medicine*. 1997; 337:223-229.
84. Hardman GJ, Limbird EL, Gilman GA. *The farmocological basis of therapeutics*. 10<sup>th</sup> edition, Mc Grow Hill Co. Inc. USA, 2001 P:1381-1457.
85. Clinical Molecular Genetics Society Courses. Apopitosis. MRC path preparation course 1999-2000 Cancer genetics assaignments 1999.
86. Wyllie A. Apopitosis and carcinogenesis. *British Journal of Cancer*. 1999; 80:34-37.
87. Evke E. Çeşitli lösemi tiplerinde tedavi öncesi ve sonrasında kromozom analizlerinin GTG bantlama tekniği ve ABL-BCR füzyon gen ekspresyonunun RT-PCR yöntemi ile tespiti. Doktora tezi. Uludağ Üniversitesi, 2003.
88. Gorlick R, Goker E, Trippett T, Waltham M, Banerjee D, Bertino J. Intrinsic and acquired resistance to methotrexate in acute leukemia. *The New England Journal of Medicine*. 1996; 335 (14):1041-1047.
89. Herr I, Debatın MK. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood*. 2001; 98:2603-2614.
90. Salmon SE, Sartorelli Ac. *Cancer chemotherapy*. Editor: Katzung Bg; Basic and clinical pharmacology, Appleton and Lange, Stanford, 1998; p:881-991.
91. Coleman LW, Rohr LR, Bronstein IB, Holden JP. DNA topoisomerase I:an anticancer drug target present in human sarcomas. *Human Pathology*. 2002; 33(6):599-607.
92. Cortes F, Pastor N. DNA topoisomerasin cancer chemottherapy. *Cytobios*. 2001; 106 (2):217-227.

93. Çetiner M. Hematolojik maligniteler ve kemikiliği transplantasyonunda tanı ve tedavi prokolleri, Deniz ofset matbaacılık, İstanbul, 2002, s:30-41.
94. Dinçol G, Pekçelen Y, Atamer T, Sargın D, Nalçacı M, Aktan M, Beşışık S. Klinik Hematoloji, İstanbul, 2003.
95. Roberto L, Massimo B, Ida C, Chiara S, Enrico M, Antonio C, Rosa DC, Eleonora R, Giacomina MS, Francesca B, Antonio S, Franco M, Giuliana A, Fiammetta N. Elderly patients with Ph(+) CML:results of imatinib mesylate treatment, 2005; 29:287-291.
96. Lüleci G, Başaran S, Bağcı G, Keser İ. Sitogenetik uygulama yöntemleri. Meteksan 1990:22-31.
97. Karger S. ISCN. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. 1995:1-114.
98. Mrozek K, Heinonen K, Bloomfield CD. Clinical importance of cytogenetics in acute myeloid leukemia. Best Practise & Research Clinical Haematology, 2001; 14 (1):19-47.
99. Ralmondi SC, Chang MN, Ravindranath Y, Behm FG, Gresik VM, Stueber PC, Weinstein JH, Carroll JA. Chromosomal abnormalities in 478 children with Acute Myeloid Leukemia:clinical characteristics and treatment outcome in a cooperative pediatric oncology group study. Blood, 1999; 94(1):3707-3716.
100. Wellmann A, Otsuki T, Vogelbruch M, Clark HM, Jaffe ES, Raffeld M. Analysis of the t(2;5)(p23;q35) translocation by reverse transcription-polymerase chain reaction in CD30+ anaplastic large-cell lymphomas, in other non-Hodgkin's lymphomas of T-cell phenotype, and in Hodgkin's disease. Blood. 1995 15; 86(6):2321-8.
101. Yee HT, Ponzoni M, Merson A, Goldstein M, Scarpa A, Chilosi M, Menestrina F, Pittaluga S, de Wolf-Peeters C, Shiota M, Mori S, Frizzera G, Inghirami G. Molecular characterization of the t(2;5) (p23; q35) translocation in anaplastic large cell lymphoma (Ki-1) and Hodgkin's disease. Blood, 1996 1; 87(3):1081-8.
102. Lamant L, Meggetto F, al Saati T, Brugieres L, de Paillerets BB, Dastugue N, Bernheim A, Rubie H, Terrier-Lacombe MJ, Robert A, Rigal F, Schlaifer D, Shiuta

M, Mori S, Delsol G. High incidence of the t(2;5)(p23;q35) translocation in anaplastic large cell lymphoma and its lack of detection in Hodgkin's disease. Comparison of cytogenetic analysis, reverse transcriptase-polymerase chain reaction, and P-80 immunostaining. *Blood*, 1996 Jan 1;87(1):284-91.

103. Jaime L. Betz, Ahmed S. Behairy, Rabionet P, Tirtorahardjo B, Moore MW, Cotter P. Acquired inv(9):what is its significance?, *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 2005; 160:76-78.

104. Keung YK, Knovich MA, Powell BL, Buss DH, Pettanati M. Constitutional pericentric inversion of chromosome 9 and acute leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 2003; 145:82-85.

105. Herens C, Baron F, Croisiu C, Tassin F, Bours V. Clonal chromosome aberrations in Philadelphia-negative cells from chronic myelocytic leukemia patients treated with imatinib:reportt of two cases, *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 2003; 147:78-80.

106. Liu S, Li Q, Pang W, Bo L, Qin S, Liu X, Teng Q, Qian L, Wang J. A new complex variant t(4;15;17) in acute promyelocytic leukemia:FISH confirmation and literature review, *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2001; 130:33-37.