



**T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**İZOLE 13Q DELESYONU BULUNAN KLL VAKALARINDA  
RETİNOBLASTOMA GENİ DELESYONUNUN  
İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**NUR SENA İNCİ**

**DANIŞMAN**

**DOÇ. DR. BEYHAN DURAK ARAS**

**2018**



**T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**İZOLE 13Q DELESYONU BULUNAN KLL VAKALARINDA  
RETİNOBLASTOMA GENİ DELESYONUNUN  
İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**NUR SENA İNCİ**

**DANIŞMAN**

**DOĐ. DR. BEYHAN DURAK ARAS**

**2018**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Nur Sena İNCİ' nin Yüksek Lisans olarak hazırladığı “İzole 13q Delesyonu Bulunan KLL Vakalarında Retinoblastoma Geni Delesyonunun İncelenmesi” başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirerek “KABUL” edilmiştir.

04.09.2018

Üye : Prof. Dr. Sevilhan ARTAN

Üye : Prof. Dr. Olga Meltem AKAY

Üye.: Doç. Dr. Beyhan DURAK ARAS (Danışman)

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 14.09.2018 tarih ve 188/5892 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasan Veyis GÜNEŞ  
Enstitü Müdürü

## Özet

Kronik lenfositik lösemi (KLL) olgun görünümlü CD5-pozitif B hücrelerin kan, kemik iliği, lenf nodları ve dalakta klonal artışı ve birikimi ile karakterize bir hastalıktır. Kronik lenfositik lösemide prognoz ile ilişkili olan kromozomal anomaliler bulunmaktadır. Trizomi 12 varlığı ve 11q, 13q, 17p delesyonları prognostik değeri olan, hastalık patogenezinde rol oynayan, tedavi stratejilerinde yol gösterici kromozomal anomalilerdir.

On üçüncü kromozomun uzun kolunun delesyonu KLL'de en sık gözlenen sitogenetik anomalidir. Delesyon 13q görülmesi iyi prognostik faktör olarak tanımlanırken, bu alt grupta klinik heterojenite söz konusudur. On üçüncü kromozomda 'Minimal Deleted Region' (MDR) bölgesinde delesyon bulunması ya da Retinoblastoma1 (*RB1*) genini kapsayan daha büyük delesyon bulunması söz konusu olabilir. İzole 13q delesyonu bulunan KLL hastalarında, delesyonun *RB1* genini içeren büyük bir delesyon olmasının prognoz için olumsuz bir etki oluşturacağı tartışılmaktadır.

Çalışmamızın amacı izole 13q delesyonu bulunan KLL vakalarında *RB1* gen delesyonu varlığının FISH yöntemi ile değerlendirilmesi, bunla birlikte hastalık evresi ve tedaviye başlangıç zamanı ile ilişkisinin araştırılmasıdır.

Çalışmamıza izole 13q delesyonu saptanan 40 KLL olgusu dahil edilmiş, interfaz FISH (iFISH) yöntemi kullanılarak *RB1* gen delesyonu bulunup bulunmadığı analiz edilmiştir.

İncelenen örneklerde, %40 oranında hastada *RB1* geninde delesyon saptanırken, %60 oranında hastada bu gen bölgesinde delesyon saptanmamıştır. Retinoblastoma geninin delesyonu saptanan hastalarda medyan sağkalım 144 ay, tedavisiz geçen süre 74 ay, ilk tedaviye kadar geçen zaman 2,5 ay olarak saptanmıştır. Delesyon olmayan hastalarda medyan sağkalım 151 ay, tedavisiz geçen süre 77 ay, ilk tedaviye kadar geçen zaman 30 ay olarak saptanmıştır. Pozitif hasta grubunda genel sağkalım ve tedavisiz izlem süresi daha düşük bulunmuştur ancak anlamlı fark yoktur. Pozitif ve negatif hasta gruplarında ilk tedaviye kadar geçen zaman açısından anlamlı fark bulunmuştur.

Retinoblastoma geninin izole 13q delesyonu bulunan KLL hastalarındaki prognoza etkisini daha iyi belirleyebilmek için, daha fazla hasta sayısının klinik takiplerinin yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: KLL, 13q delesyonu, *RB1* geni, FISH

## Summary

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by increase and accumulation of mature monoclonal CD5+ B cells lymphocytes on blood, lymph nodes and spleen. There are several chromosomal anomalies associated with prognosis of chronic lymphocytic leukemia. Presence of an extra chromosome 12 and 11q, 13q, 17p deletions are chromosomal anomalies that have prognostic significance play an important role in the pathogenesis of the disease and guide to new treatment strategies.

The deletion of the long arm of chromosome 13 is the most common cytogenetic anomaly in CLL. Although 13q deletion is considered as a good prognostic factor, this subgroup reveals clinical heterogeneity. The deletion could take part in the 'Minimal Deleted Region' (MDR) or could be larger deletion including Retinoblastoma1 (*RB1*) gene on the 13th chromosome. It is argued that the presence a large deletion including *RB1* gene in the CLL cases with isolated 13q deletion could have negative impact on the prognosis.

The aim of our study was to assess the presence of *RB1* gene deletion in the CLL cases with isolated 13q deletion by the FISH method, and to investigate the association between of *RB1* gene deletion and the disease stage, time to first treatment (TtFT).

We analyzed the presence of *RB1* gene deletion by using interphase FISH method in 40 CLL patients who was diagnosed with isolated 13q deletion.

Retinoblastoma gene deletion were detected in 40% of the analysed samples and it's not detected in 60%. Patients with *RB1* gene deletion had 144 months median survival, 74 months median treatment free survival and 2,5 months time to first treatment. Patients with non-deleted *RB1* gene had 151 months median survival, 77 months median treatment free survival and 30 months time to first treatment. Median survival and treatment free survival were shorter in patients who had of *RB1* gene deletion, but no statistically significant difference was detected. Time to first treatment was significantly different among two groups.

In order to determine the effect of the prognostic role of *RB1* gene deletion in CLL with isolated 13 deletion better, more patients should be followed-up.

Key Words: CLL, 13q deletion, *RB1* gene, FISH

# İçindekiler

KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
ÖZET	iii
SUMMARY	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLO DİZİNİ	vii
ŞEKİL DİZİNİ	viii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1 GİRİŞ VE AMAÇ	1
2 GENEL BİLGİLER	2
2.1 Lenfoma	2
2.2 Kronik Lenfositik Lösemi	4
2.2.1 Tanı	4
2.2.2 İmmünofenotip	5
2.2.3 Evreleme	6
2.2.4 Prognoz	7
2.2.5 KLL' de Genetik	9
2.3 Tümör Baskılayıcı Genler	11
2.3.1 Retinoblastoma Geni	12
2.4 Floresan In Situ Hibridizasyon Tekniği	14
2.4.1 FISH Tekniğinin Temel Mekanizması	14
2.4.2 Kronik Lenfositik Lösemide Moleküler Sitogenetik	15
3 GEREÇ VE YÖNTEM	16
3.1 Gereç	16

3.1.1 Araştırma Grubu Bireyleri	16
3.1.2 Kullanılan Gereçler	16
3.1.3 Kullanılan Cam Malzemeler	17
3.1.4 FISH Yönteminde Kullanılan Kimyasal Maddeler	17
3.1.5 Periferik Kan Direkt Kültür Solüsyonları	17
3.1.6 13S319 Plus Delesyon Probu ve Retinoblastoma Delesyon Probu	18
3.2 Yöntem	19
3.2.1 Periferik Kan Direkt Kültür	19
3.2.2 Moleküler Sitogenetik Yöntem	20
3.2.2.1 Preperatların Ön Yıkaması	20
3.2.2.2 Prob Denatürasyonu	20
3.2.2.3 Hibridizasyon	20
3.2.2.4 Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar	20
3.2.2.5 Analiz	21
3.2.2.6 Değerlendirme	21
3.2.3 Stok Solüsyonlar	21
3.2.4 İstatistiksel Analiz	22
4 BULGULAR	23
4.1 FISH Analizi Sonuçları	26
4.2 Verilerin İstatistiksel Değerlendirmesi	32
5 TARTIşMA	35
6 SONUÇ VE ÖNERİLER	38
7 KAYNAKLAR	39
8 ÖZGEÇMİş	46

## Tablo Dizini

Tablo 1.1 WHO 2008 sınıflandırmasına göre hematopoetik ve lenfoid neoplazi sınıfları	2
Tablo 1.2 WHO 2008 sınıflandırmasına göre matur B hücreli neoplaziler	3
Tablo 2.1 Kronik lenfositik lösemi ve diğer lenfoproliferatif hastalıklardaki immünofenotip ifadelenmeleri	6
Tablo 2.2 Binet ve Rai evreleme sistemleri	7
Tablo 2.3 KLL'de klasik ve yeni prognostik faktörler	8
Tablo 2.4 KLL'de en sık görülen sitogenetik markerlar	11
Tablo 3.1 Carnoy's fiksatif solüsyonu	21
Tablo 3.2 Preperatların ön yıkama solüsyonu	21
Tablo 3.3 Hibridizasyon sonrası kullanılan solüsyonlar	21
Tablo 3.4 Görüntüleme solüsyonu	22
Tablo 4.1 Çalışma grubunun yaş, cinsiyet, evre dağılımı	24
Tablo 4.2 Çalışma grubunun klinik özellikleri	25
Tablo 4.3. Hastaların Rai evreleme sistemine göre erken evre ve ileri evre olarak dağılımı	25
Tablo 4.4. del(13q14.3) ve <i>RB1</i> geni FISH analiz sonuçları	28
Tablo 4.5. Retinoblastoma delesyonu pozitif olan hastaların Rai evresi, 30 genel sağkalım, ilk tedaviye kadar geçen zaman ve tedavisiz izlem süreleri	30
Tablo 4.6. Retinoblastoma delesyonu negatif olan hastaların Rai evresi, 31 genel sağkalım, ilk tedaviye kadar geçen zaman ve tedavisiz izlem süreleri	31



## Şekil Dizini

Şekil 2.1 Retinoblastoma proteini ve hücre döngüsü	13
Şekil 2.2 Retinoblastoma geninin inaktivasyonunun sonuçları	14
Şekil 3.1 Retinoblastoma1 delesyon probu ve D13S319 delesyon probunun 13. kromozomda işaretlediği bölgeler	18
Şekil 3.2 13q14.3 delesyon probu	19
Şekil 3.3 Retinoblastoma1 delesyon probu	19
Şekil 4.1 Çalışma grubu içinde <i>RB1</i> gen delesyonu saptanan hastaların yüzdelik dağılımı	29
Şekil 4.2 13q14.3 delesyonu saptanan olgu 10'un FISH görüntüsü	29
Şekil 4.3 Retinoblastoma geni için normal hücrelere sahip olgu 9'un FISH görüntüsü	29
Şekil 4.4 Retinoblastoma gen delesyonu saptanan olgu 25'in FISH görüntüsü	30
Şekil 4.5 Olgularda saptanan <i>RB1</i> gen delesyonunun genel sağkalım ile ilişkisi	32
Şekil 4.6 Olgularda saptanan <i>RB1</i> gen delesyonunun ilk tedaviye kadar geçen zaman ile ilişkisi	32
Şekil 4.7. Olgularda saptanan <i>RB1</i> gen delesyonunun tedavisiz izlem süresi ile ilişkisi	33

## Simge ve Kısaltmalar Dizini

ATM	Ataksi Telenjektazi Mutasyon
APC	Adenomatöz Polipozis Koli
BCLPDs	B-hücreli kronik lenfoproliferatif hastalıklar
BRCA1	Meme Kanseri 1
BRCA2	Meme Kanseri 2
CD	Farklılaşma Sınıfı Antijeni
CDKN2A	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör 2A
$C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$	Sodyum sitrat
CLL-IPI	KLL Uluslararası Prognostik İndeks
DAPI	4,6-Diamino-2-Phenylindole / 4,6-Diamino-2-Fenilindol
DLEU1	Deleted in lymphocytic leukemia 1
DLEU2	Deleted in lymphocytic leukemia 2
ESM	Ekstra Selüler Matriks
FISH	Flouresan In Situ Hibridizasyon
iFISH	İnterfaz Flouresan In Situ Hibridizasyon
HKH	Hematopietik Kök Hücre
IgVH	İmmüoglobülin Ağır Zincir Değişken Bölgesi
KCl	Potasyum klorür
$KH_2PO_4$	Potasyum dihidrojen fosfat
Kİ	Kemik iliği
KLL	Kronik Lenfositik Lösemi
LDH	Laktat Dehidrogenaz
MDR	Minimal Deleted Region

miRNA	MikroRNA
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
MMR	DNA Yanlış Eşleşme Tamir Geni
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	di-sodyum hidrojen fosfat dihidrat
NF1	Nörofibromatozis 1
NF2	Nörofibromatozis 2
NK	Doęal Öldürücü Hücre
OS	Genel Sağkalım
PTEN	Fosfataz ve Tensin Homolog
PARP1	Poli (ADP-riboz) Polimeraz 1
RB1	Retinoblastoma 1
sCD23	Serum CD23
SLL	Küçük Lenfositik Lenfoma
SSC	Salin - Sodyum Sitrata
TP53	Tümör Protein 53
TFS	Tedavisiz sağkalım
TtFT	İlk tedaviye kadar geęen zaman
WT1	Wilms Tümör Geni 1
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
XP	Xeroderma Pigmentosum
ZAP-70	Zeta İlişkili Protein

## 1-GİRİŞ ve AMAÇ

Kronik lenfositik lösemi olgun görünümlü CD5-pozitif B hücrelerin kan, kemik iliği, lenf nodları ve dalakta klonal artışı ve birikimi ile karakterize bir hastalıktır. Batı ülkelerinde en sık görülen erişkin lösemi tipidir. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki insidansı 4.1/100.000/yıl sıklıktadır. İlerleyen yaşlarda ortaya çıkan bir hastalıktır, ortalama yaş 67-72 arasındır (Hallek, 2017).

KLL oluşumuna neden olan faktörler tam olarak bilinmemektedir. Ancak genetik yatkınlık üzerinde durulmaktadır (Scarfo, 2016).

Kronik lenfositik lösemi tanısı birçok vakada kan sayımı, periferik yayma ve immünofenotipleme ile yapılır. Periferik kandaki B lenfosit miktarının en az 3 ay boyunca  $\geq 5000/\mu\text{L}$  olması gerekir. Akım sitometri ile immünofenotipik özellikleri doğrulanmalıdır. Klinik evrelendirmede Rai ve Binet evrelendirme sistemleri kullanılır. Ayrıca prognostik markerlar kullanılarak, klinik evreden bağımsız prognostik bilgi sağlanmaktadır. Prognostik parametrelerden en işlevsel olanları, uluslararası kuruluş olan 'CLL International Prognostic Index' (CLL-IPI) tarafından düzenlenmektedir (Hallek, 2017).

Kronik lenfositik lösemide prognoz ile ilişkili olan kromozomal anomaliler bulunmaktadır. Trizomi 12 varlığı ve 11q, 13q, 17p delesyonları prognostik değeri olan, hastalık patogenezinde rol oynayan, tedavi stratejilerinde yol gösterici kromozomal anomalilerdir (Puiggros, 2014).

Çalışmamızın amacı izole 13q delesyonu bulunan KLL vakalarında Retinoblastoma1 gen delesyonu varlığının FISH yöntemi ile değerlendirilmesi, bununla birlikte hastalık evresi ve tedaviye başlangıç zamanı ile ilişkisinin araştırılmasıdır.

## 2-GENEL BİLGİLER

### 2.1-Lenfomalar

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2001 yılında yapmış olduğu, 2008 ve 2016 yıllarında güncellenen sınıflamaya göre hematopoetik ve lenfoid neoplazi sınıfları Tablo 1.1.'de, B hücre kökenli lenfomalar Tablo 1.2.'de gösterilmiştir (Campo, 2011).

Tablo 1.1. WHO 2008 sınıflandırmasına göre hematopoetik ve lenfoid neoplazi sınıfları (Campo 2011'den alınmıştır)

Matür B-hücreli neoplaziler
Matür T- hücreli ve NK-hücreli neoplaziler
Hodgkin Lenfoma
Histositik ve dendritik hücreli neoplaziler
Posttransplant lenfoproliferatif hastalık (PTLH)

Tablo 1.2 WHO 2008 sınıflandırmasına göre matur B hücreli neoplaziler (Campo 2011'den alınmıştır)

Kronik lenfositik lösemi/küçük lenfositik lenfoma
B-hücreli prolenfositik lösemi
Splenik marjinal zon lenfoma
Tüylü hücreli lösemi
Splenik lenfoma/lösemi, sınıflandırılmayan
Splenik diffüz kırmızı pulpa küçük B-hücreli lenfoma
Tüylü hücreli lösemi varyant
Lenfoplazmasitik lenfoma
Waldenström makroglobulinemisi
Ağır zincir hastalıkları
Plazma hücreli miyelom
Kemiğin soliter plazmasitomu
Ekstraosseous plazmasitom
MALT tipi ektranodal marjinal zon lenfoma
Nodal marjinal zon lenfoma
Pediyatrik nodal marjinal zon lenfoma
Foliküler lenfoma
Pediyatrik foliküler lenfoma
Primer foliküler merkezli cilt lenfoması
Mantle hücreli lenfoma
Diffüz büyük B hücreli lenfoma (NOS)
T-hücre/histiositten zengin BBHL
Primer santral sinir sistemi DBBHL
Primer cilt DBBHL, bacak tipi
Yaşlıların EBV pozitif DBBHL
Kronik inflamasyonla ilişkili DDBHL
Lenfomatoid granülomatoz
Primer mediastinal DBBHL
Intravasküler BBHL
ALK-pozitif BBHL
Plazmablastik lenfoma
BBHL, HHV8 ilişkili multisentrik Castleman hastalığı kaynaklı
Primer enfüzyon lenfoması
Burkitt lenfoma
Sınıflanamayan B hücreli lenfoma, DBBHL ve Burkitt lenfomaya benzer özellikler taşıyan
Sınıflanamayan B hücreli lenfoma, DBBHL ve klasik HL ya benzer özellikler taşıyan

## 2.2-Kronik Lenfositik Lösemi

KLL olgun CD5-pozitif hücrelerin kan, kemik iliği, lenf nodları ve dalakta birikimi ile karakterize bir hastalıktır (Hallek, 2007). Batı Avrupa ve Güney Amerika'da erişkinlerde en sık görülen lösemi tipidir, erişkin lösemilerinin yaklaşık %30'unu oluşturur. İnsidansı 4.2/100.000'dir. Görüldüğü ortalama yaş 67-72'dir (Hus & Rolinski, 2015). Hastaların yaklaşık %70'i 65 yaş üstüdür. Erkeklerde kadınlardan iki kat fazla görülür (Goldin, Björkholm, Kristinsson, Turesson, Landgren, 2009). Bilinen tek risk faktörü aile hikayesi olmasıdır (Hus & Rolinski, 2015).

Genellikle asemptomatiktir, sadece tam kan sayımında anomaliler bulunabilir. Daha ileri evrede lenfadenopati, hepatomegali/splenomegali, tekrarlayan enfeksiyonlar, halsizlik, ateş, kilo kaybı gece terlemesi gözlenebilir (Hus & Rolinski, 2015).

Hastalık oldukça değişken bir klinik seyre sahiptir, sağkalım aylardan 20 yıla kadar değişiklik gösterebilir. Bazı hastalarda agresif ilerleyiş görülmekte olup tanıdan kısa süre sonra tedavi gerekirken, diğerleri asemptomatik ve yıllarca tedavi gerektirmeyen hastalığa sahiptirler (Rassenti, 2004).

Rai ve Binet evreleme sistemleri prognozu belirlemede kullanılan basit ve güvenilir yöntemlerdir. Ama hastalığın sürecindeki bireysel riskleri ve erken evrelerdeki (Binet A or Rai 0 ila 2) sağkalımı tahmin etmek için kullanılamazlar (Döhner et al., 2000). Hastalığın değişken klinik seyrinden dolayı prognostik önemi olan klinik ve biyolojik faktörler tanımlanmıştır. Genetik markerlar (11q, 13q, 17p delesyonları, trizomi 12), serum markerları (Timidin kinaz,  $\beta$ 2-mikroglobulin, sCD23), immünoglobülin ağır zincir geni (IgVH) mutasyon durumu ya da IgVH ile korelasyon gösteren markerlar (CD38 ve ZAP-70) gibi ilave incelemelerden yararlanır (Montillo, Hamblin, Hallek, Montserrat, Morra, 2005).

### 2.2.1. Tanı

Kronik lenfositik lösemi'de tanı tam kan sayımı, periferik yayma, periferik kanda immünofenotipleme ile konulmaktadır. Kemik iliği aspirasyonu ve biyopsisi tanıda çoğu zaman gerekli değildir (Rodrigues, 2016).

Tanı için periferik kanda B-lenfosit sayısının en az 3 ay boyunca  $\geq 5000/\mu\text{L}$  olması gereklidir. Akım sitometri ile immünofenotipik özellikleri doğrulanmalıdır. Kan yaymasında küçük, dar sitoplazma ve çekirdeği ayırt edilemeyen yoğun kromatinli lenfoidler görülür. Bu hücreler ile birlikte daha büyük ve atipik hücreler ya da prolenfositler bulunabilir. Prolenfositlerin periferik kanda %55'ten fazla olması durumunda tanı prolenfositik lösemi

olabilir. Kronik lenfositik lösemi'de smudge hücreleri ve Gumprecht lekeleri görülebilir (Hallek ,2017).

KLL'nin ayırıcı tanısında marjinal zone lenfoma, lenfoplazmasitik lenfoma ve mantle cell lenfoma (MCL) vardır. Bu tümör hücreleri B-hücre yüzey antijenleri ekprese eder, MCL ayrıca CD5 ekprese ederken, genellikle CD23 ekprese etmezler. CD23 ekprese edenler için siklin D1 ya da SOX11 ve FISH yöntemi ile t(11;14) tespiti ile MCL tanısı konulabilir. Marjinal zon lenfoma ve lenfoplazmasitik lenfoma, KLL ile karşılaştırıldığında negatif ya da düşük CD43 ekspresyonu gösterir (Eichhorst, 2015).

Lenfadenopati, sitopeniler ya da hastalık ilişkili semptomların bulunmaması, <5000/μL B lenfosit bulunması monoklonal B-hücreli lenfositoz (MBL) olarak tanımlanır. MBL'nin KLL'ye dönüşümü yılda %1-2'dir (Hallek, 2017).

Dünya Sağlık Örgütü sınıflandırmasına göre KLL ve Küçük Lenfositik Lenfoma (SLL) aynı hastalığın farklı bir klinik prezentasyonu olarak sınıflandırılmıştır (Santos, O'Brein, 2012). SLL'de monoklonal B hücreler KLL ile aynı immünofenotip gösterirler ancak lenfadenopati ve/veya splenomegali vardır (Eichhorst, 2015). SLL'de periferik kandaki lenfosit sayısı 5000/μL'yi geçmemelidir. Küçük lenfositik lenfoma tanısı lenf nodundan biyopsi örneği ile doğrulanmalıdır (Hallek, 2017).

Hastalık sürecinde %2-5 oranında hastada diffüz büyük B hücreli lenfomaya ya da Hodgkin lenfomaya dönüşüm gerçekleşebilir. Bu dönüşüm Richter's transformasyonu olarak adlandırılır. Tanı lenf nodundan biyopsi ile konulmaktadır. Kötü prognostik belirteçtir (Eichhorst, 2015).

### **2.2.2. Immünofenotip**

Kronik lenfositik lösemi hücrelerinde T-hücre yüzey antijeni CD5 ve B-hücre yüzey antijenleri CD19, CD20, CD23 ifade edilmektedir. (Ig)-CD20 ve CD79b normal B hücrelerinden daha düşük seviyede ifade edilir (Hallek, 2017).

B-hücreli Prolenfositik lösemi (B-PLL) vakalarının yarısında CD5 ifadenmesi yoktur ve CD20 ve yüzey Ig ifadenmesi yüksektir. Mantle hücreli lenfomada ise CD5 ve B hücre yüzey antijenleri ifadenmesi olurken, genellikle CD23 ifadenmesi yoktur (Hallek, 2017).

Kronik lenfositik lösemi ve diğer lenfoproliferatif hastalıklardaki immünofenotip ifadenmeleri Tablo 2.1.'de gösterilmektedir.



Tablo 2.1. Kronik lenfositik lösemi ve diğer lenfoproliferatif hastalıklardaki immünofenotip ifadelenmeleri (Scarfo, 2016'dan alınmıştır)

Markerlar	KLL	MHL	SMZL	B-PLL
CD19	+	+	+	+
CD5	+	+	+/-	+/-
CD20	sönük	+	+	+
CD23	+	-	+/-	-
FMC7	-	+	+/-	+
Hafif Zincir	sönük	parlak	parlak	parlak
Ağır Zincir	IgM/IgD	IgM/IgD	IgM/IgD	IgM/IgD
CD200	+	-	+/-	+/-

### 2.2.3. Evreleme

Klinik evreleme sistemi olarak kabul görmüş olan Rai ve Binet evreleme sistemleri kullanılmaktadır. Bu 2 evreleme sistemi fiziksel muayene ve standart laboratuvar testlerine dayanmaktadır (Hallek, 2017). Rai ve Binet evreleme sistemlerinde evreleme kriterleri ve risk grupları Tablo 2.2'de gösterilmiştir (Van Bockstaele, Verhasselt, Philippe, 2009).

Rai evreleme sistemi 1975 yılında Rai ve arkadaşları tarafından önerilmiştir (Rai, 1975). Rai evreleme öncelikle 5 prognostik gruptan oluşurken, modifiye Rai evreleme sisteminde 3 grup bulunmaktadır. Rai evreleme sisteminde kan ve kemik iliğinde lenfositöz bulunan hastalar düşük riskli (Rai 0), lenfositöz, herhangi bir alanda büyümüş nodlar, splenomegali ve/veya hepatomegali bulunan hastalar orta-risk (Rai I-II), anemi ve trompositopeni içeren hastalar yüksek-risk (Rai III-IV) olarak tanımlanmıştır (Hallek, 2017).

Binet evreleme sistemi ilk kez 1985 yılında Binet ve arkadaşları tarafından önerilmiştir. Bu evreleme sistemine göre Binet A, B ve C olmak üzere 3 prognostik grup bulunmaktadır (Binet, 1981). Binet evreleme sisteminde çapı 1 cm'den büyük lenf nodları sayısı ve anemi ya da trompositopeni olup olmaması dikkate alınmaktadır (Hallek, 2017).

Tablo 2.2. Binet ve Rai Evreleme Sistemleri (Van Bockstaele, Verhasselt, Philippe, 2009' dan alınmıştır)

	<b>Risk Grubu</b>	<b>Kriterler</b>
<b>Rai Evreleri</b>		
<b>0</b>	Düşük	Lenfositoz
<b>I</b>	Orta	Lenfositoz+lenfadenopati
<b>II</b>	Orta	Lenfositoz+splenomegali / hepatomegali
<b>III</b>	Yüksek	Lenfositoz+anemi
<b>IV</b>	Yüksek	Lenfositoz+trombositopeni
<b>Binet Evreleri</b>		
<b>A</b>	Düşük	< 3 alanda nodül
<b>B</b>	Orta	≥ 3 alanda nodül
<b>C</b>	Yüksek	Anemi ve / veya trompositopeni

#### **2.2.4. Prognoz**

Rai ve Binet evreleme sistemleri en kullanışlı methodlar olmasına karşın, hastalık progresyonundaki bireysel riskleri ve erken evrelerdeki (Binet A ya da Rai evre 0-II) sağkalımı öngörmek için yeterli değildirler. Son yıllarda prognostik markerları belirlemeye yönelik araştırmalar yapılmaktadır (Döhner, 2000). Prognostik faktörler içinde immünoglobülin ağır zincir (IgVH) mutasyon durumu, sitogenetik anomaliler ve gen mutasyonları, CD38 ve ZAP-70 ifadesi, serum  $\beta$ 2-mikroglobulin ( $\beta$ 2M), serum CD23 (sCD23), timidin kinaz1 (TK1) vardır (Robak, 2014).

İmmünoglobülin ağır zincir mutasyonu içeren hastaların klinik seyri, mutasyon içermeyenlere göre daha olumludur. Mutasyon durumundan bağımsız olarak, değişken ağır zincir 3-21 (VH3-21) geninin varlığı olumsuz bir prognostik belirteç olarak belirtilmektedir (Szankasi & Bahler, 2010).

Zeta-chain-associated protein kinaz 70 kD (ZAP-70) ve CD-38 ifadelenmesi, immünoglobülin gen mutasyon durumuyla korelasyon gösterdiğine dair çalışmalar vardır. ZAP-70 ve CD-38 akım sitometri ile ölçülür (Szankasi & Bahler, 2010). ZAP-70 pozitifliği ve IgVH mutasyon durumunu arasında korelasyon olduğunu göstermişleridir (Crespo, 2003;).

Yüksek seviyede CD38 ifadelenmesinin mutasyona uğramamış IgVH ile korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (Damle, 1999; Hamblin, 2002; Del Principe, 2006). Ancak, bazı hastalarda hastalık sürecinde CD38 seviyesinin değişkenlik gösterebilmesi, CD38'in IgVH mutasyon durumu yerine marker olarak kullanılmasını kısıtladığı belirtilmiştir (Hamblin, 2002; Del Principe, 2006).

Meuleman ve arkadaşları tarafından 2008 yılında, Kern ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yapılan çalışmalarda ZAP-70 protein seviyesinin %20'den yüksek olması kötü prognoz olarak rapor edilmiştir (Pashaei, 2016).

Serum  $\beta$ 2-mikroglobulin, timidin kinaz1, serum CD23 serolojik faktörleri de prognoz için belirteç olarak kullanılabilir (Pashaei, 2016).

Belirli kromozomal anomalilerin prognostik öneme sahip olduğu gösterilmiştir. Trizomi 12 varlığı ve 11q, 13q, 17p delesyonları prognostik öneme sahip kromozomlardır. Del(11q) ve del(17p) delesyonu kötü prognostik faktör olarak değerlendirilmektedir (Puiggros, 2014).

Hastalık sürecinde %2-5 oranında hastada diffüz büyük B hücreli lenfomaya ya da Hodgkin lenfomaya dönüşüm gerçekleşebilir. Bu dönüşüm Richter's transformasyonu olarak adlandırılır. Tanı lenf nodundan biyopsi ile konulmaktadır. Kötü prognoz ile ilişkilidir (Eichhorst, 2015).

Tablo 2.3.'de KLL'de kullanılan klasik ve yeni prognostik faktörler gösterilmektedir (Robak, 2014).

Tablo 2.3. KLL'de klasik ve yeni prognostik faktörler (Robak, 2014' ten alınmıştır)

<b>Faktör</b>	<b>Pozitif</b>	<b>Negatif</b>
<b>Binet Evresi</b>	A	B, C
<b>Rai Evresi</b>	0	I, II, III, IV
<b>Kemik iliği histolojisi</b>	Nodüler	Diffüz
<b>Lenfositoz x 10<sup>9</sup>/l</b>	≤ 50 x 10 <sup>9</sup> /l	> 50 x 10 <sup>9</sup> /l
<b>Periferik kandaki prolenfositler</b>	≤ 10 %	> 10 %
<b>Lenfosit ikilenme zamanı</b>	> 12 ay	≤ 12 ay
<b>Sitogenetik</b>	Normal, del(13q)	del(11q), del(17p)
<b>IgVH</b>	Mutasyonlu	Mutasyonsuz
<b>CD38 ekspresyonu</b>	≤ 30 %	> 30 %
<b>ZAP-70 ekspresyonu</b>	≤ 20 %	> 20 %
<b>Serum markerları*</b>	Normal	Artmış
* LDH, $\beta$ -2 mikroglobulin, Timidin kinaz; Serum CD23 seviyesi		

### 2.2.5. KLL'de genetik

Kronik lenfositik lösemi'de 11q, 13q, 17p delesyonları ve trizomi 12 varlığı prognostik değeri olan, KLL patogeneğinde, sürecinde ve tedavi stratejilerini belirlemede rol oynayan kromozomal anomalilerdir (Puiggros, Blanco, Espinet, 2014). Kronik lenfositik lösemide en sık görülen sitogenetik anomaliler Tablo 2.4'de yer almaktadır (Van Bockstaele, Verhasselt, Philippe, 2009).

On üçüncü kromozomun uzun kolunun delesyonu, 13q14.3 bandını içerir ve en sık gözlenen sitogenetik anomalidir. Vakaların %50-60'ında gözlenmektedir. Kromozom 13q anomalileri iyi prognoz göstergesidir (Döhner, 2000; Durak, 2009). Delesyon 13q 'Minimal Deleted Region' (MDR) bölgesini içerebilir ya da Retinoblastoma genini içeren daha büyük delesyon olabilir (Puiggros, 2014). On üçüncü kromozomun uzun kolundaki delesyona uğrayan MDR bölgesi kodlanmayan DLEU1 ve DLEU2 genlerini içermektedir (Liu, 1997; Migliazza, 2001). DLEU2'nin intronik bölgesinden miRNA-15 ve miRNA-16 isimli 2 mikroRNA eksprese olmaktadır (Klein, 2010). Bu mikroRNA'lar tümör baskılayıcı gen gibi işlev görürler, genomda belirli bölgelere bağlanarak hedef genlerin ekspresyonunda değişime neden olurlar (Cimmino, 2005). MikroRNA-15a ve mikroRNA-16-1 anti-apoptotik genleri BCL2'nin ekspresyonunu artırır (Chastain & Duncavage, 2015). Bu miRNA'ların patofizyolojik rolü hedef gende delesyon taşıyan farelerde çalışılmış ve monoklonal B-hücreli lenfositöz benzeri hastalık geliştirdiği görülmüştür. MikroRNA-15a ve mikroRNA-16-1'in KLL lökogeneğinde rol oynadığı düşünülmektedir (Hallek, 2017).

Yüksek yüzdelerde 13q delesyonu olması ilk tedaviye kadar geçen sürenin (TtFT) kısa olması ile ilişkili bulunmuştur (Hernandez, 2009; Machiela, 2016). Dal Bo ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptığı çalışmada yüksek yüzdelerde delesyon daha kısa TtFT ile ilişkili bulunmuştur. Ayrıca düşük yüzdeli delesyon ve *RB1* delesyonunun birlikteliği daha kısa TtFT ile ilişkili bulunmuştur (Dal Bo, 2011). Delesyonun monoallelik ya da biallelik olması TtFT ile ilişkili bulunmamıştır (Garg, 2012; Puiggros, 2013).

On birinci kromozomun uzun kolunun delesyonu KLL hastalarında %5-20 oranında bulunur. Kötü prognoz belirteçidir (Zenz, 2007). Delesyon çeşitli boyutlarda olabilir, birçok vakada 20 megabazdan büyüktür ve 11q22.3-q23.1 bandını kapsamaktadır. Burada Ataksi Telenjiektazi Mutasyon (ATM) geni konumlanmıştır (Quilette, 2011). 'Klasik ya da büyük delesyon' (daha yaygındır) ve 'atipik yada küçük delesyon' (yaygın değil ve genellikle ATM gen mutasyonu ile ilişkilidir) olarak sınıflanabilir. Homozigot 11q delesyonu tanımlanmamıştır. ATM geni mutasyonu çoğunlukla 11q delesyonu olan vakalarda görülse de %8-30 oranında 11q delesyonu olmayan vakalarda da görülmektedir. Delesyonun patobiyolojisinde rol oynayan başka genlerin de olduğu düşünülmektedir. BIRC3 bu genlerdendir, ATM geninin yanında, 11q22 bandında yer alır. Tanı sırasında

görülme oranı %4'tür, ancak fludarabin dirençli hastalarda görülme oranı %24'tür (Puiggros, 2014). Delesyon 11q bulunduran hastalarda büyük adenopati, hızlı progresyon, azalmış genelsağkalım görülür (Kay, 2007).

Trizomi 12 KLL hastalarının %15-25'inde bulunmaktadır ve orta dereceli prognoz göstergesidir (Durak, 2009). Sıklıkla tek kromozomal değişim olarak görülmektedir. Delesyon tek olarak bulunabilir, ayrıca delesyonlar (13q, 11q ve 17p), trizomi 18, trizomi 19 ve IGH translokasyonları da eşlik edebilir (Döhner, 2000). Etkilenen bölgenin küçük-kritik bölge yerine tüm kromozom ile ilişkili olmasından dolayı trizomi 12'nin patogeneziyle ilişkili aday genleri tanımlamak zordur. Tüm kromozom boyunca dağılmış P27, CDK4, HIP1R, MYF6, ve MDM2 genlerinin yüksek seviyede ifadesinin trizomi 12 ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Puiggros, 2014).

On yedinci kromozomun kısa kolunun delesyonu yani del(17p) yüksek risk prognostik belirteçdir ve KLL olgularında %5-10 oranında bulunur (Durak, 2009). Delesyon 17p13 bandını içermektedir, bu bantta TP53 tümör baskılayıcı geni konumlanmıştır. Delesyon 17p bulunan hastalarda genotoksik kemoterapiye karşı direnç olmaktadır. Kronik lenfositik lösemi hastalarında %4-37 oranında TP53 mutasyonu bulunur ve kötü prognoz ile ilişkilidir. Delesyon 17p bulunan hastaların çoğunda TP53 mutasyonu vardır. Delesyon 17p bulunmadan TP53 mutasyonu bulunması daha nadirdir, ancak benzer şekilde kemoterapi direnci ve kısa genel sağkalım ile ilişkilidir (Hallek, 2017).

Landau ve arkadaşlarının 17p delesyonu bulunan hastalardaki klinik heterojenite üzerine 2013 yılında yaptığı çalışmada, delesyonun erken evrede (de novo) ortaya çıktığını ya da ikincil değişim olarak gerçekleştiğini belirtilmiştir. De novo 17p delesyonuna sahip olan hastalar daha uzun genel sağkalıma sahipken (4-5 yıl), süreç içinde meydana gelenlerde genel sağkalım daha kısadır (1-1.5 yıl) (Landau, Carter, Stojanov, 2013). Klinik heterojenitede diğer önemli bir faktör de delesyon yüzdesidir. Delesyon yüzdesinin fazla olması genel sağkalım ve tedaviye cevapta negatif etkiye sahiptir (Puiggros,2014).

Ayrıca hastaların %10'unda 6q21 delesyonu, 14q32 translokasyonu, 3q ya da 8q'nun parsiyel trizomisi görülebilmektedir (Montillo, 2005).

Tanı sırasında ya da hastalık sürecinde kompleks karyotip bulunması, tedaviye başlama süresi ve genel sağkalımın kısa olması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Rigolin, 2017).

MikroRNA'ların deregülasyonunun hastalığın biyolojisi ve kliniği ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. MikroRNA'nın genomda bulunduğu bölge kromozomal translokasyon, genomik amplifikasyon, kırılma alanlar ve onkogen-tümör süpresör genlerin kırılma noktaları gibi tümör-ilişkili bölgede olabilir. Bazı miRNA'lar onkogen ya da tümör süpresör gen gibi

özellik gösterirler. miR-155 ve miR-21 onkogen gibi özellik gösterirken, miR-15a, miR-16-1 ve miR-29 tümör süpresör gen gibi özellik göstermektedir. MikroRNA-155 ve miR-21 KLL vakalarında yüksek ifadelenmeye sahipken, miR-15a, miR-16-1, miR-29 ailesi düşük ifadelenmeye sahiptir. MikroRNA-15a ve miR-16-1 KLL vakalarının %68'inde delesyona uğramıştır ya da düşük ifadelenmektedir (Calore & Fabbri, 2011). Delesyon 17p olan KLL hastalarında mikroRNA-223, miR-29b, miR-29c ve miR-181 ailesindeki düşük ifadelenme hastalık ilerlemesi ile ilişkilidir. Trizomi 12 bulunan vakalarda miR-181a'nın yüksek ifadelenmesi daha agresif bir varyant olarak tanımlanmıştır (De Martino, 2009).

Tablo 2.4. KLL'de en sık görülen sitogenetik markerlar (Van Bockstaele, Verhasselt, Philippe, 2009' dan alınmıştır)

<b>Kromozomal Anomali</b>	<b>Sıklık (%)</b>	<b>Genel sağkalım (ay)</b>	<b>Tedavisiz sağkalım (ay)</b>	<b>İçerdiği gen</b>	<b>Özellik</b>
<b>17p13 Delesyonu</b>	~10	32	9	P53	Kemoterapiye direnç
<b>11q22-23 Delesyonu</b>	15-20	79	13	ATM (?)	Yaygın lenfadenopati
<b>Trizomi 12</b>	15-30	114	33	Bilinmiyor	-
<b>13q14 Delesyonu</b>	40-60	133	92	miR15a ve miR16-1 (?)	Normal karyotipten iyi prognoz

### 2.3-Tümör Baskılayıcı Genler

Apoptoz, hücre döngüsü, farklılaşma, hücrelerel sinyal iletimi, hücre adezyonu, genomik bütünlüğün sürdürülmesi ve DNA hatalarının onarılması gibi önemli hücrelerel süreçler tümör baskılayıcı genler tarafından düzenlenir. Bekçi genler ve bakıcı genler olarak 2 ana gruba ayrılmaktadır (Fanale, Bazan, Maragliano, Russo, 2017). Bekçi genler hücre büyümesini doğrudan düzenler. Hücre döngüsünün düzenlenmesi veya hücre-hücre teması ile büyümenin doğrudan engellenmesini sağlarlar. Bakıcı genler genomik bütünlüğün korunmasında ve DNA hasarlarını tamir etmede görev alırlar (Nussbaum, McInnes, Willard, 2005). Adenomatöz Polipozis Koli (*APC*), Retinoblastoma1 (*RB1*), Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör 2A (*CDKN2A*), Nörofibromatozis 1 ve Nörofibromatozis 2 (*NF1,NF2*), Fosfatase ve tensin homolog (*PTEN*), RET, Wilms tümör geni1 (*WT1*), tümör protein 53 (*TP53*) bekçi genlerdendir. Breast cancer 1 ve 2 (*BRCA1 ve BRCA2*), Poly [ADP-ribose] polimerase 1 (*PARP1*), *MMR* (DNA mismatch repair gene), *XP* (Xeroderma Pigmentosum), ataksi telenjiektazi mutasyon geni (*ATM*) bakıcı genlerdendir. Tümör baskılayıcı genlerin mutasyonları, delesyonları ya da

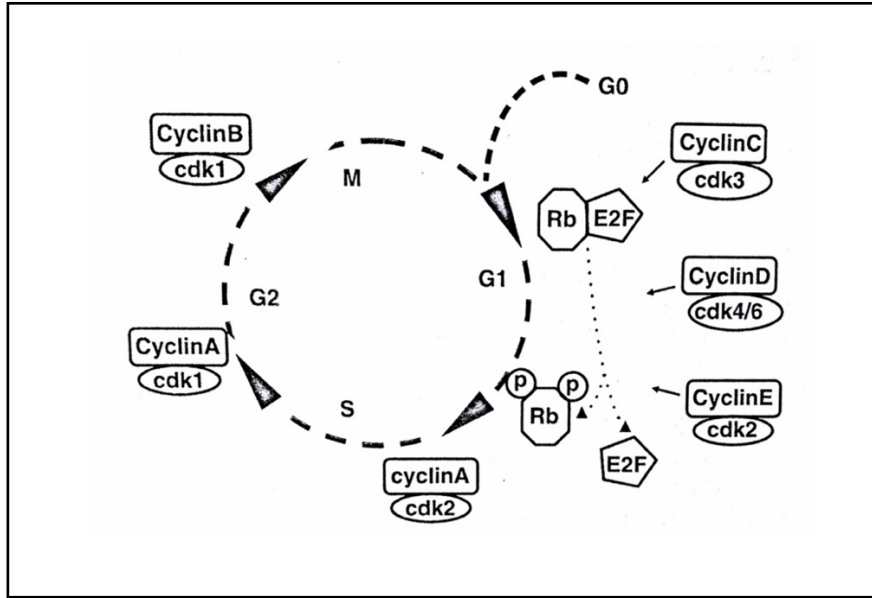
ifadelenme kayıpları tümör başlaması ve gelişmesini içeren süreç ile ilişkilidir (Fanele, 2017).

### **2.3.1. Retinoblastoma geni**

Retinoblastoma1 geni, 13. kromozomun q14.2 bandında yer almaktadır. Yirmi yedi ekzondan oluşur, 180 kb'ı kapsar ve 928 amino asit kodlamaktadır (Poznic, 2009). *RB1* geni ilk defa retinadaki malign tümör oluşumu olan retinoblastoma hastalığında tanımlanmıştır. Retinoblastoma gen fonksiyonu birçok tümörde ya mutasyon/delesyonlarla ya da ekspresyon/upstream düzenleyicilerinin aktivitesinin değişmesiyle inaktif olur (Giacinti & Giordano, 2006).

Rb1 proteini hücre döngüsünün düzenlenmesi, apoptoz, farklılaşma, tümör baskılanması, kromatin yapısı, DNA replikasyonu, hücre metabolizmasıyla ilgili fonksiyonları düzenlemektedir (Akdeniz, Tuncer, Yazıcı).

Retinoblastoma proteini (pRB) G1-S kontrol noktası olarak rol oynamaktadır. Retinoblastoma proteini gen ailesinde 'cep proteinleri' olarak isimlendirilen 3 üye bulunmaktadır: Rb/p105, p107, Rb2/p130. Bu proteinler viral onkoproteinlere ve E2F transkripsiyon faktörleri gibi hücre elementlere bağlanmaktadır. Retinoblastoma protein ailesi ve E2F transkripsiyon faktörleri hücre döngüsünün kontrolünde merkezi rol oynar. Retinoblastoma proteini post-translasyonel olarak düzenlenirler ve siklin/siklin bağımlı kinazlar tarafından fosforile edilirler (Giacinti & Giordano, 2006). Retinoblastoma proteini siklinD/cdk4/6, siklinE/cdk2 ve siklinA/cdk2 kinazları ile fosforile olan fosforilasyon bölgelerine sahiptir (Akdeniz, Tuncer, Yazıcı). Retinoblastoma proteini hipofosforile durumdayken, G1-S arasındaki hücre siklusunu engeller. DNA sentezini ilerleten E2F transkripsiyon faktörüne bağlanarak inaktif olmasını sağlar. Böylelikle S fazına geçiş olmaz. Retinoblastoma proteini fosforile olduğunda E2F serbest durumda olur ve hücre S fazına geçer. (Nussbaum, McInnes, Willard, 2005). Şekil 2.1'de Rb proteini ve hücre döngüsündeki yeri gösterilmektedir (Giacinti & Giordano, 2006).



Şekil 2.1. Rb proteini ve hücre döngüsü (Giacinti & Giordano, 2006 'dan alınmıştır.)

Ayrıca pRb, histon deasetilaz 1 (HDAC1), SWI/SNF faktörleri, polikomb grup proteinleri yada metiltransferaz ile nükleozom yapısını etkiler (Giacinti & Giordano, 2006).

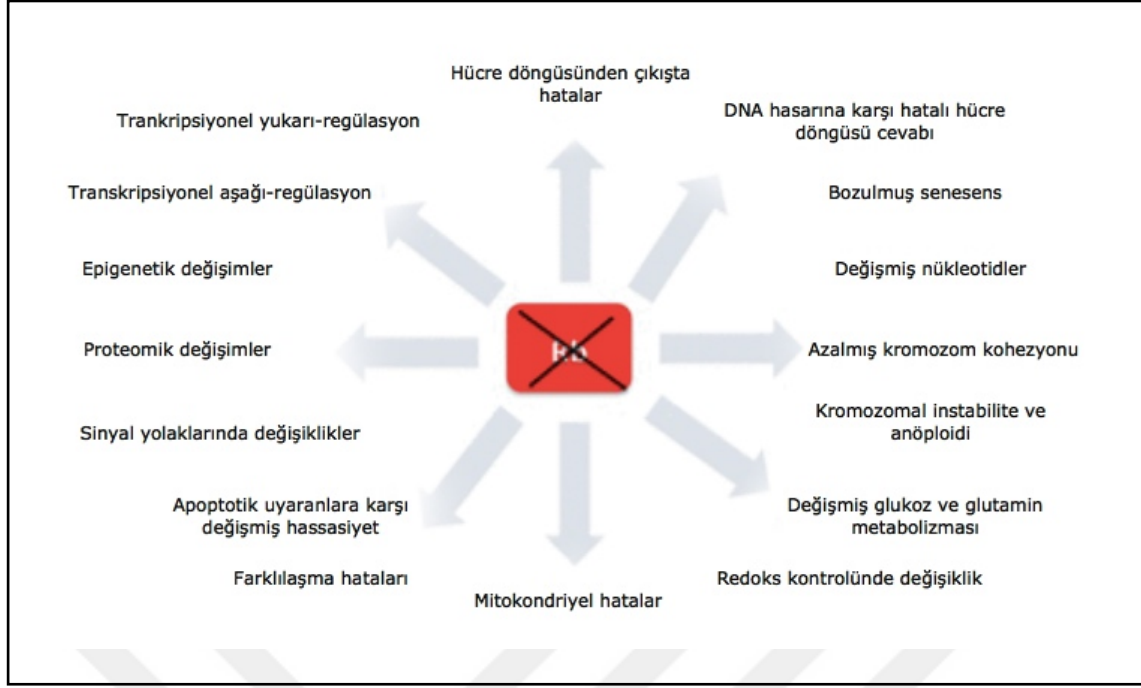
Retinoblastoma proteini göz, lens, beyin, periferik sinir sistemi, epidermis, melanositler, kas, akciğer gibi çeşitli farklılaşma süreçlerinde rol oynar (Giacinti & Giordano, 2006).

*RB1* geninin inaktive olması birçok hücresel süreci etkiler. Bu etkiler oldukça farklı alanlardadır. Tümörögenезis için gerekli olan değişiklikleri de içermektedirler (Nicholas J. Dyson, 2016)(Şekil 2.1).

Retinoblastoma proteini fonksiyon kaybı gerçekleşmesi durumunda proteom, kromatin düzenlenmesi, transkripsiyon kalıbı ve metabolik yollarda değişime neden olduğu gösterilmiştir (Fenale, 2017).

Retinoblastoma1 geni, kalıtsal olmayan ve unilateral retinoblastomaların %60'ında, kalıtsal retinoblastomaların %40'ında %90 oranında mutasyona sahiptir. Somatik *RB1* mutasyonları meme, mesane, küçük hücreli akciğer kanseri, osteosarkom ve glioblastom gibi epitelyal ve mezenşimal tümör çeşitlerinde görülmektedir (Fenale, 2017).





Şekil 2.2. Retinoblastoma geninin inaktivasyonunun sonuçları ( Nicholas J. Dyson, 2016' dan alınmıştır)

## 2.4-Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) Tekniği

### 2.4.1. FISH tekniğinin temel mekanizması

Floresans In Situ Hibridizasyon (FISH) floresan boylarla işaretlenmiş spesifik problemler kullanarak, hücredeki DNA ve RNA dizilerinin tespit edilmesine olanak sağlayan bir hibridizasyon tekniğidir (Werner, 1997). Moleküler sitogenetik metodlar sayesinde (ISH, FISH, CGH) klasik sitogenetik yöntemlerle tanımlanamayan kromozomal anomaliler saptanabilir. Sitogenetikte rutin GTG bantlama tekniğinde 4 Mb üzeri anomaliler tanımlanabilirken, FISH tekniği ile 1-3 Mb arası anomaliler saptanabilmektedir. FISH analizi anomalileri saptamak için hızlı, duyarlı ve güvenilir bir yöntemdir (Durak, 2005).

FISH analizi metafaz kromozomları ve interfaz aşamasında kullanıma olanak sağlayan bir tekniktir. Kanser genetiğinde önemli bir tanı testi olarak kullanılır. Interfaz nükleusunda kromozomlar daha az yoğun ve metafaza göre daha uzundur. Bu yüzden rezolüsyon 100 kilobaza kadar çıkabilir (Durak, 2005).

Hedef DNA/RNA molekülüne komplementer işaretli nükleik asit dizisine 'prob' denir. Florokrom, heptanlar ile işaretli olabilirler. Günümüzde kullanımda florokrom ile işaretli problemler tercih edilmektedir (Durak, 2005).

### **2.4.2. Kronik lenfositik lösemide moleküler sitogenetik**

Kronik Lenfositik Lösemide %50'den fazla vakada geleneksel sitogenetik analizler ya başarılı değildirler ya da anomali bulunan metafazları içermezler. Düşük mitotik aktivite sitogenetik analizleri sınırlar (Durak, 2009).

Floresan In Situ Hibridizasyon tekniği metafaz kromozomlarının yanı sıra hücrenin interfaz safhasında da kullanıma olanak veren bir tekniktir (Döhner, 2000). Floresan In Situ Hibridizasyon tekniği ile KLL vakalarının yaklaşık %80' inde kromozom anomalileri tanımlanmaktadır. Kronik lenfositik lösemide FISH yöntemi ile en sık saptanan anomaliler 13q14.3 delesyonu (%55), 11q22.3 delesyonu (%18), trizomi 12 (%16), TP53 delesyonu (%7), 6q21 (%6), trizomi 8q24 (%5), 14q32 translokasyonları (%4) ve trizomi 3q27 (%3)' tür (Durak, 2009).



## **3-GEREÇ VE YÖNTEM**

### **3.1-Gereç**

#### **3.1.1. Araştırma grubu bireyleri**

Çalışmamız 2015-2018 yılları arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı-Hematoloji Bilim Dalı, Koç Üniversitesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı-Hematoloji Bilim Dalı ve Dokuz Eylül Üniversitesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı-Hematoloji Bilim Dalı'nda takipli hastalar olup bölümümüze refere edilen Kronik Lenfositik Lösemi tanılı ve izole 13q delesyonu bulunan 40 olgunun periferik kan numuneleri ile ESOGÜ Tıbbi Genetik Anabilim Dalı-Kanser Sitogenetiği Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Hastalara gerekli bilgiler verildikten sonra onam formları alınmış, çalışmada kullanılmak üzere periferik kanları elde edilmiştir. Olguların periferik kan örneklerinden moleküler sitogenetik analizler gerçekleştirilmiştir.

#### **3.1.2. Kullanılan gereçler**

- Etüv (WTC binder)
- Floresan mikroskop (Olympus BX-61)
- Image Analyser (Cytovision 3.93)
- Deep-Freeze (Heraeus)
- Vorteks (Heidolph REAX)
- Su banyosu (Nüve)
- Hot Plate (Thermo Brite)
- Kronometre (ISOLAB)
- Mikropipet (Eppendorf)
- pH metre (Jenco)
- Santrifüj (Nüve, NF800)
- Mikrosantrifüj (Eppendorf)
- Hassas terazi (Seuter, Airworth-AA-250)

- Ependorf tüp
- Pipet uęları

### **3.1.3. Kullanılan cam malzemeler**

- Beher (500 ml, 1000 ml)
- Yatay ve Dikey řale
- Erlanmayer (500 ml, 1000 ml)
- Mezr
- Lam ve lamel

### **3.1.4. FISH yönteminde kullanılan kimyasal maddeler**

- SSC (Saline-Sodium Citrate)
- Ethanol (Emsure)
- Tween 20 (Sigma)
- DAPI (Sigma)
- Vectashield
- Rubber Cement (Marabu Fixogum)
- İmmersiyon yağı (Merck)
- NaCl (Emsure)
- NaOH (Merck)
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck)
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (Merck)
- KCl (Merck)
- C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>.2H<sub>2</sub>O (Merck)

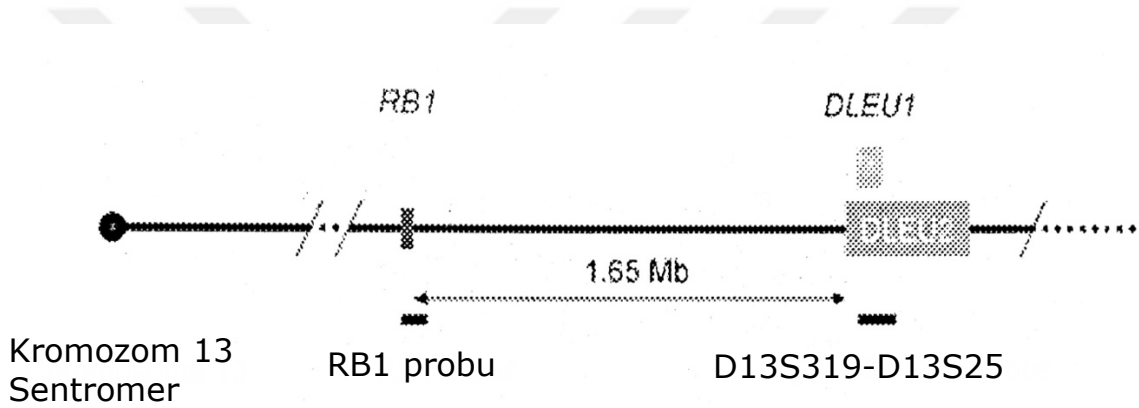
### **3.1.5. Periferik kan direkt kltr solsyonları**

- RPMI 1640 bazal medyum (Biological Industries)

- FBS (Fetal Bovine Serum) (Biological Industries)
- Penisilin
- Hipotpnik solüsyon (KCL) (Merck)
- Carnoy Fiksativ: Methanol:Asetik asit (3:1)

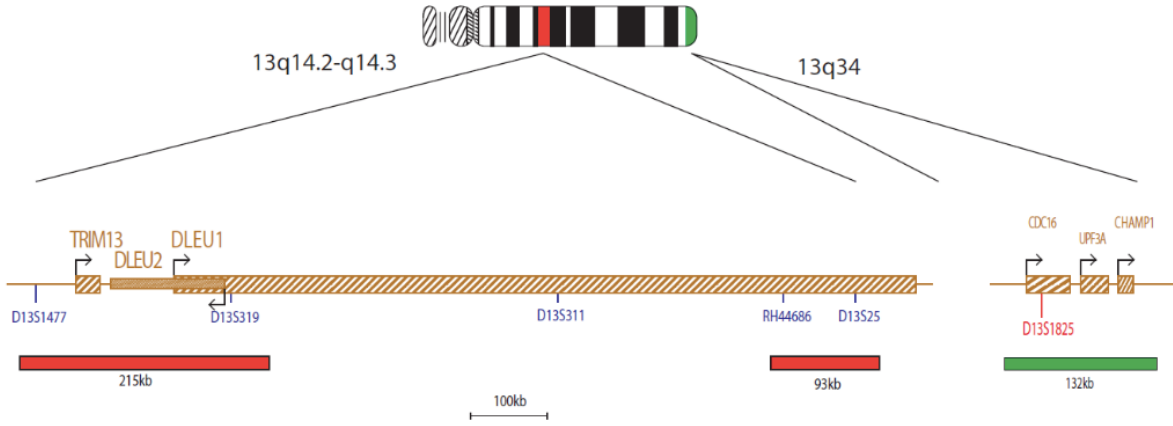
### 3.1.6. 13S319 plus delesyon probu ve retinoblastoma delesyon probu

Retinoblastoma1 delesyon probu ve D13S319 delesyon probunun 13. kromozomda işaretlediği bölgeler Şekil 3.1'de gösterilmektedir (Huang, 2015).



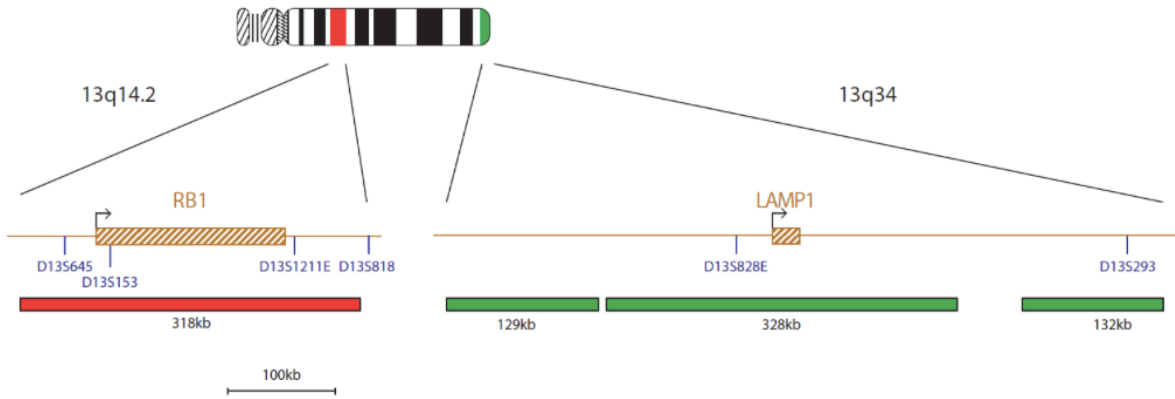
Şekil 3.1. Retinoblastoma1 delesyon probu ve D13S319 delesyon probunun 13. kromozomda işaretlediği bölgeler (Huang, 2015' den alınmıştır)

D13S319 Plus Delesyon probunda 13q14.3 bölgesi kırmızı ile 13q34 bölgesi yeşil ile işaretlenmiştir. Normal nükleusta 2 kırmızı, 2 yeşil sinyal görülür. Delesyon varlığında kırmızı sinyallerden 1 ya da 2'si eksik görülürken, monozomi durumunda 1 kırmızı, 1 yeşil sinyal görülür (Şekil 3.2)(Cytocell).



Şekil 3.2. 13q14.3 Delesyon Probu (FISH Probe Catalogue. Cytocell' den alınmıştır)

*RB1* Delesyon Probu, *RB1* genini içeren 13q14.2 bölgesi kırmızı, 13q34 bölgesi yeşil ile işaretlenmiştir. Normal nükleusta 2 kırmızı, 2 yeşil sinyal görülürken, delesyon varlığında kırmızı sinyallerden 1 ya da 2'si eksik görülür (Şekil 3.3)(Cytocell).



Şekil 3.3. Retinoblastoma1 Delesyon Probu (FISH Probe Catalogue. Cytocell' den alınmıştır)

## 3.2-Yöntem

### 3.2.1. Periferik kan direkt kültür

- Steril ortamda ekim tüplerine 5 ml RPMI besiyeri bölüştürülmüş ve heparinli tüpte bulunan periferik kandan 6 damla tüplere aktarılmıştır.
- Santirfüj edildikten sonra supernatant kısmı atılmış ve pellet üzerine 5 ml KCL eklendikten sonra 37 ° C'de etüvde 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

- Bu süre sonunda tüplere taze hazırlanmış Carnoy's fiksatifinden 5-6 damla eklenerek prefiksasyon aşaması gerçekleştirilmiş ve 1300 rpm'de 8 dakika santrifüj edilmiştir.
- Supernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet üzerine vortekslenerek Carnoy's fiksatifi ilave edilmiştir. Yıkama işlemi temiz bir pellet elde edene kadar, en az 3 kere uygulanmıştır.
- Hazırlanan lamlara 10 µL hücre süspansiyonu yayılmış ve FISH protokolünü uygulamak üzere hazır hale getirilmiştir.

### **3.2.2. Moleküler sitogenetik yöntem**

#### *3.2.2.1. Preperatların ön yıkaması*

Preperatlar 2'şer dakika  $2 \times \text{SSC}$ , %70, %85 ve %100 alkol çözeltilerinden geçirilerek dehidre edilmiştir.

#### *3.2.2.2. Prob denatürasyonu*

Prob, mikropipet ile 5 µL preperata damlatıldıktan sonra lamel ile kapatılmıştır ve  $75^\circ \text{C}$ 'de 2 dk denatüre edilmiştir.

#### *3.2.2.3. Hibridizasyon*

Preperatlar  $37^\circ \text{C}$  ortamda 1 gece hibridizasyona bırakılmıştır.

#### *3.2.2.4. Hibridizasyon sonrası yıkamalar*

- Hibridizasyon tamamlandıktan sonra lamellerin etrafındaki yalıtım maddesi çıkarılmış ve lamel kaldırılmıştır.
- Lameller  $2 \times \text{SSC}$  içerisinde, preperatların üzerinden uzaklaştırılmıştır.
- Preperatlar  $72^\circ \text{C}$ 'deki  $0,4 \times \text{SSC}$  içerisinde 2 dk bekletilmiştir.
- Daha sonra, Tween 20 solüsyonunda 1 dk bekletilmiştir.
- DAPI solüsyonunda 2 dk tutulmuş, üzerine vektashield damlatılıp sinyaller floresan mikroskopta görülmeye uygun hale getirilmiştir.
- Analiz aşamasından önce karanlıkta ve  $-20^\circ \text{C}$ 'de bekletilmiştir.

### 3.2.2.5. Analiz

Preperatlar Olympus BX-61 floresan mikroskopunda uygun filtreler ile incelenmiştir. Her olguya ait FISH analiz verileri incelenmiş ve arşivlenmiştir.

### 3.2.2.6. Değerlendirme

Her olguda çalışılan bölgede 250 hücre sayılarak analiz gerçekleştirilmiştir. *RB1* gen bölgesi için 2 sinyal bulunması normal olarak, 1 sinyal bulunması ise delesyon olarak değerlendirilmiştir. Hiç sinyal görülmemesi biallelik delesyon olarak değerlendirilmiştir.

### 3.2.3. Stok solüsyonlar

Çalışmamızda kullanılan stok solüsyonlar Tablo 3.1, Tablo 3.2 Tablo 3.3 ve Tablo 3.4'te gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Carnoy's Fiksatif Solüsyonu

Metanol	3 birim
Asetik asit	1 birim

Tablo 3.2. Preperatların Ön Yıkama Solüsyonu

<b>20 x SSC Solüsyonu</b>	
NaCl	175,3 gr
Tri Sodyum Sitrat	88,24 gr
Distile su	1000 ml

Tablo 3.3. Hibridizasyon Sonrası Kullanılan Solüsyonlar

<b>0,4 x SSC</b>	
20 x SSC	4 ml
Distile su	196 ml
<b>2 x SSC</b>	
20 x SSC	20 ml
Distile su	180 ml
<b>2 x SSC / Tween-20 Solüsyonu</b>	
Tween-20	100 µL
20 x SSC	20 ml
Distile su	180 ml



Tablo 3.4. Görüntüleme solüsyonu

<b>DAPI / Antifade Solüsyonu</b>	
DAPI	100 µL
2 x SSC	20 ml
Distile su	80 ml

### 3.2.4 İstatistiksel Analiz

Tanımlayıcı istatistikler sürekli veriler için ortalama (minimum-maksimum), kategorik veride ise sıklık (%) olarak verilmiştir. Çalışma gruplarının ve Rai evlerinin yaşam süreleri üzerindeki etkilerinin araştırılması ise Yaşam Analizleri (Kaplan Meier) analizi kullanılmıştır. Çalışmamızda olgulardaki *RB1* geni delesyon oranı, hastalık evresi, genel sağkalım, ilk tedaviye başlangıç zamanı ve tedavisiz geçen sürenin değerlendirilmesi için IBM SPSS Statistics v21.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Anlamlılık seviyesi  $p < 0.05$  olarak alınmış olup,  $p$  değeri  $< 0,05$  olması durumunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## 4-BULGULAR

Çalışmamız, izole olarak 13q delesyonu saptanan KLL tanılı 40 olgunun periferik kan materyalleri ile ESOGÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı-Kanser Sitogenetiği Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızın amacı izole 13q delesyonu bulunan KLL vakalarında Retinoblastoma1 gen delesyonu varlığının FISH yöntemi ile değerlendirilmesi, bununla birlikte hastalık evresi ve tedaviye başlangıç zamanı ile ilişkisinin araştırılmasıdır.

Çalıştığımız olgularda ortalama yaş  $66.23 \pm 9.15$  yıl olarak bulunmuştur. Çalışmaya dahil edilen hastaların 17 (%42.5) tanesi kadın, 23 (%57.5) tanesi erkektir. Çalışma grubumuzun yaş, cinsiyet ve evre bilgileri Tablo 4.1'de, klinik özellikleri Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Çalışma hastalarımız evrelerine göre erken evre (Rai evre 0-I-II) ve ileri evre (Rai evre III-IV) olmak üzere gruplara ayrılarak değerlendirilmiştir. Erken evre ve ileri evreye göre sınıflandırılması Tablo 4.3'te gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Çalışma grubunun yaş, cinsiyet, evre bilgileri

<b>Olgu no</b>	<b>Yaş</b>	<b>Cinsiyet</b>	<b>Rai Evresi</b>
1	68	E	II
2	56	E	-
3	74	E	-
4	75	K	IV
5	65	K	I
6	47	K	I
7	71	E	-
8	63	E	II
9	70	E	II
10	62	E	0
11	64	K	I
12	80	E	0
13	75	K	I
14	68	E	I
15	69	E	-
16	67	E	0
17	56	E	0
18	67	K	III
19	41	K	-
20	53	E	II
21	75	E	I
22	76	K	II
23	62	E	I
24	57	E	0
25	73	K	II
26	79	K	I
27	53	E	0
28	67	K	I
29	68	K	I
30	64	E	I
31	88	K	I
32	62	E	III
33	69	K	III
34	76	E	II
35	46	K	III
36	67	E	IV
37	65	K	II
38	60	K	III
39	65	E	II
40	67	E	I

-: Bilgilere ulaşılamayan bölümler

Tablo 4.2. Çalışma grubunun klinik özellikleri

<b>Ortalama Yaş</b>	66,23 (41-88)
<b>Cinsiyet</b>	
<b>Erkek</b>	23 (% 57,5)
<b>Kadın</b>	17 (% 42,5)
<b>Lökosit (ortalama) 10<sup>3</sup>/µL</b>	46,60 (3,30-328,20)
<b>Lenfosit (ortalama) 10<sup>3</sup>/µL</b>	27,02 (0,50-131,80)
<b>Hb (ortalama) g/dL</b>	12,83 (4,30-16,60)
<b>Plt (ortalama) 10<sup>3</sup>/µL</b>	216,52 (74-360)
<b>LDH (ortalama) µ/L</b>	268,33 (137-1079)
<b>β-2 mikroglobulin</b>	1,50 (0,19-4,35)
<b>Rai Evre</b>	
<b>0</b>	6 (% 17,1)
<b>I</b>	13 (% 37,1)
<b>II</b>	9 (% 25,7)
<b>III</b>	5 (% 14,2)
<b>IV</b>	2 (% 5,9)

Tablo 4.3. Hastaların Rai evreleme sistemine göre erken evre ve ileri evre olarak dağılımı

<b>Erken Evre</b>	<b>n (%)</b>
Rai Evre 0	6 (% 21,4)
Rai Evre I	13 (% 46,4)
Rai Evre II	9 (% 32,2)
<b>İleri Evre</b>	<b>n (%)</b>
Rai Evre III	5 (% 71,4)
Rai Evre IV	2 (% 28,6)

Çalışmaya dahil edilen 40 hastanın, 35 tanesinin hastalık evresinin bilgilerine ulaşıldı. Otuz beş hastadan 28 hasta (%80) Rai Evresi 0-I veya II, 7 hasta (%20) Rai Evresi III veya IV'dü. Hastalardan 5 tanesinin evre bilgilerine ulaşamadı.

Hastalarımızın 13'ü (%37) tedavi almış, 22'ü (%63) tedavisiz izlenmiştir. Tedavi alan hastaların ilk tedaviye kadar geçen zamanı ortanca 10 ay olarak bulunmuştur. Sağkalım verileri Temmuz 2018 tarihinde güncellenen 40 hastanın medyan  $144,00 \pm 36,94$  ay izlem sonunda %91.2'sinin halen yaşadığı, %8,8'inin ise öldüğü saptanmıştır. Beş yıllık sağkalım %93,3 olarak belirlenmiştir.

Evre 0 olan 6 hasta bulunmaktadır. Medyan 23,5 ay (4-73) takipte olan hastalar olup, hastaların birinde 3. ayda tedavi başlanmıştır. Hastaların hepsinde *RB1* geni delesyonu negatif olarak bulunmuştur.

Evre I olan 13 hasta bulunmaktadır. Hastalardan 3'ü tedavi almakta olup, medyan 52 ay (4-143) takipli hastalardır. Hastaların 7 tanesinde *RB1* delesyonu negatifken, diğer 6 hastada %25, %40, %44, %44, %52 ve %79 oranlarında delesyon bulunmuştur.

Evre II olan 9 hastamız bulunmaktadır. Üç tanesi tedavi alan hastalar olup, medyan 26 ay (4-153) takipli hastalardır. İki hasta ex olmuştur. Hastaların 5'inde *RB1* delesyonu negatifken, 4'ünde *RB1* delesyon oranları %69, %70 ve %72 ve %73'tür.

Evre III olan 5 hasta bulunmaktadır. Hastaların 4'ü tedavi almakta olup, medyan 46 ay (19-142) takiplidirler. Hastaların 4'ünde *RB1* gen delesyonu negatif, 1'inde % 32 oranında pozitif olarak saptanmıştır.

Evre IV olan 2 hasta bulunmaktadır. Hastalar medyan 27 (7-47) ay takiplidir. Hastalardan 1'i ex olmuştur. Ex olan hastanın Retinoblastoma1 delesyon oranı %63'dür. Diğer hastanın Retinoblastoma delesyonu negatiftir.

#### **4.1-FISH analizi sonuçları**

Çalışmamızdaki olgularda *RB1* geni bölgesine özgü prob kullanılmış ve sinyaller analiz edilmiştir. Her olguda 250 hücre analiz edilmiştir.

Üretici firma olan Cytocell firması tarafından delesyon problemleri için bildirilen cut-off değerini %8'dir. Laboratuvarımızda cut-off oranı %8-10'un üstündeki değer olarak kabul edilmektedir.

İncelenen örneklerde, 16 hastada (%40) *RB1* geninde delesyon saptanırken, 23 hastada (%60) bu gen bölgesinde delesyon saptanmamıştır. Tablo 4.4'te 13q delesyon yüzdesi, *RB1* genindeki delesyon

durumu ve evreleri verilmiştir. Çalışma hastaları içinde *RB1* geninin delesyonu saptanan hastaların yüzdeleri dağılımı Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Retinoblastoma delesyonu pozitif olan hastaların Rai evresi, genel sağkalım, ilk tedaviye kadar geçen zaman ve tedavisiz izlem süreleri Tablo 4.5’te, Retinoblastoma delesyonu negatif olan hastaların Rai evresi, genel sağkalım, ilk tedaviye kadar geçen zaman ve tedavisiz izlem süreleri Tablo 4.6’da gösterilmiştir.

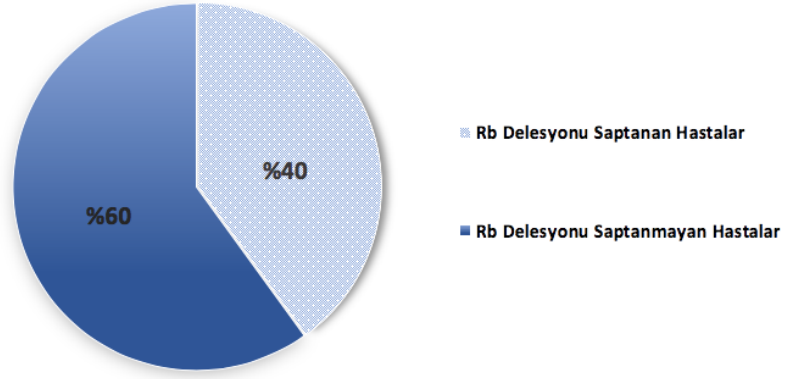
Çalışmamızda 13q delesyonu bulunan, *RB1* geninde delesyon olmayan ve *RB1* geninde delesyon olan hastalardan bazılarının ait FISH görüntüleri Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4’te gösterilmiştir.



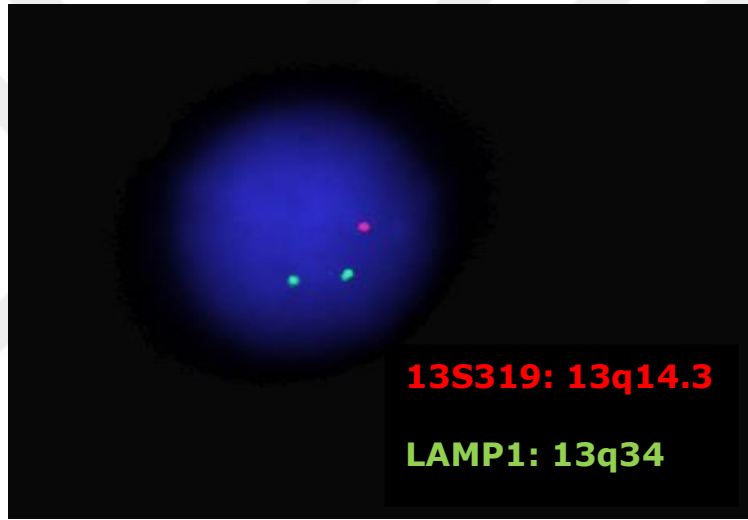
Tablo 4.4. del(13q14.3) ve *RB1* geni FISH analiz sonuçları

Olgu No	13q Delesyon Yüzdesi (%)	<i>RB1</i> Geni Delesyon Durumu (anomalı oranı %)	Rai Evresi
1	31	Negatif	II
2	83	Negatif	-
3	88	Pozitif (10)	-
4	57	Pozitif (63)	IV
5	61	Pozitif (25)	I
6	32	Pozitif (44)	I
7	22	Pozitif (38)	-
8	42	Negatif	II
9	16	Negatif	II
10	27	Negatif	0
11	88	Negatif	I
12	68	Negatif	0
13	10	Negatif	I
14	40	Pozitif (40)	I
15	13	Pozitif (23)	-
16	15	*	0
17	30	Negatif	0
18	54	Negatif	II
19	91	Pozitif (13)	-
20	70	Pozitif (70)	II
21	15	Negatif	I
22	67	Negatif	II
23	61	Negatif	I
24	50	Negatif	0
25	78	Pozitif (72)	II
26	45	Pozitif (79)	I
27	37	Negatif	0
28	47	Pozitif (52)	I
29	18	Negatif	I
30	26	Negatif	I
31	11	Negatif	I
32	-	Pozitif (32)	III
33	74	Negatif	III
34	74	Pozitif (69)	II
35	94	Negatif	III
36	99	Negatif	IV
37	90	Negatif	II
38	14	Negatif	III
39	93	Pozitif (73)	II
40	80	Pozitif (44)	I

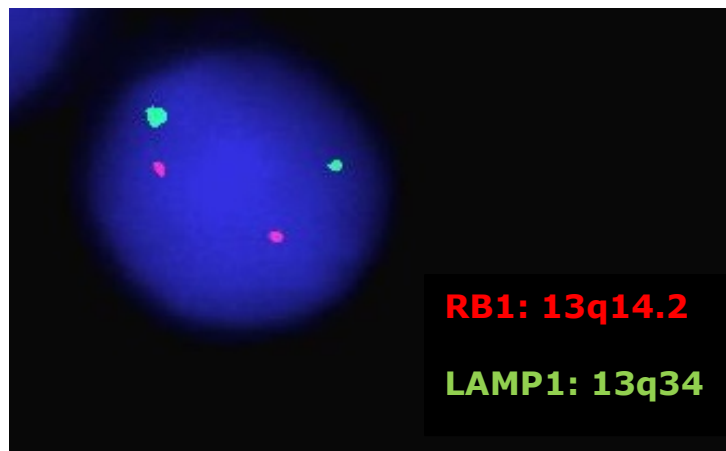
\*: Analiz gerçekleştirilemeyen bölümler  
 -: Bilgilere ulaşılamayan bölümler



Şekil 4.1. Çalışma grubu içinde *RB1* gen delesyonu saptanan hastaların yüzdeleri dağılımı

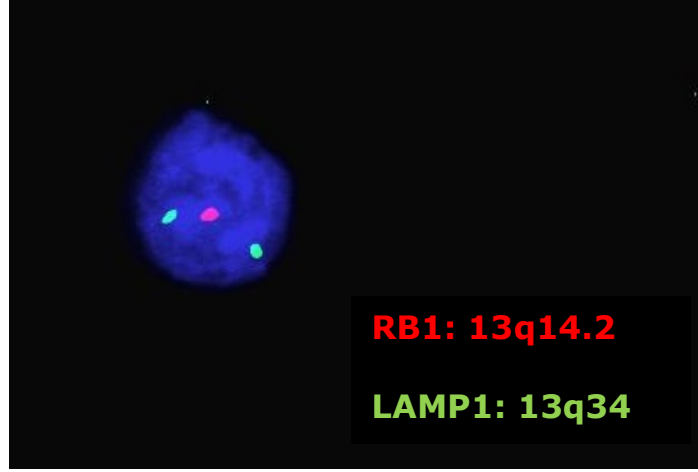


Şekil 4.2. 13q14.3 delesyonu saptanan olgu 10'un FISH görüntüsü



Şekil 4.3. Retinoblastoma geni için normal hücrelere sahip olgu 9'un FISH görüntüsü





Şekil 4.4. Retinoblastoma gen delesyonu saptanan olgu 25'in FISH görüntüsü

Tablo 4.5. Retinoblastoma delesyonu pozitif olan hastaların Rai evresi, genel sağkalım ve ilk tedaviye kadar geçen zaman ve tedavisiz izlem süreleri

<b>RB1 Delesyonu Pozitif Hastalar (Hasta No)</b>	<b>Rai Evresi</b>	<b>Genel Sağkalım (ay)</b>	<b>İlk Tedaviye Kadar Geçen Zaman (ay)</b>	<b>Tedavisiz İzlem Süresi (ay)</b>
3	-	-	-	-
4	IV	47 (ex)	2,5	2,5
5	I	11	TEDAVİSİZ İZLEM	11
6	I	72	44	44
7	-	-	-	-
14	I	52	TEDAVİSİZ İZLEM	52
15	-	-	-	-
19	-	-	-	-
20	II	20	TEDAVİSİZ İZLEM	20
25	II	14	TEDAVİSİZ İZLEM	14
26	I	91	TEDAVİSİZ İZLEM	91
28	I	12	TEDAVİSİZ İZLEM	12
32	III	142	TANI ANINDA TEDAVİ	0
34	II	144 (ex)	1	1
39	II	4	TEDAVİSİZ İZLEM	4
40	I	4	TEDAVİSİZ İZLEM	4

-: Bilgilere ulaşılabilen bölümler

Tablo 4.6. Retinoblastoma delesyonu negatif olan hastaların Rai evresi, genel sağkalım ve ilk tedaviye kadar geçen zaman ve tedavisiz izlem süreleri

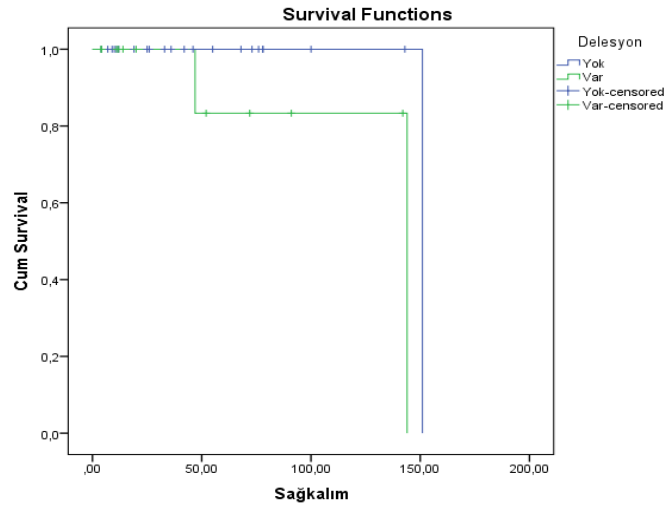
<b>RB1 Delesyon Negatif Hastalar (Hasta No)</b>	<b>Rai Evresi</b>	<b>Genel Sağkalım (ay)</b>	<b>İlk Tedaviye Kadar Geçen Zaman (ay)</b>	<b>Tedavisiz İzlem Süresi (ay)</b>
1	II	26	TEDAVİSİZ İZLEM	26
2	-	-	-	-
8	II	33	TEDAVİSİZ İZLEM	33
9	II	78	33	33
10	0	36	TEDAVİSİZ İZLEM	36
11	I	76	TEDAVİSİZ İZLEM	76
12	0	68	TEDAVİSİZ İZLEM	68
13	I	100	TEDAVİSİZ İZLEM	100
17	0	11	TEDAVİSİZ İZLEM	11
18	III	19	6	6
21	I	42	10	10
22	II	151 (ex)	77	77
23	I	55	TEDAVİSİZ İZLEM	55
24	0	73	3	3
27	0	10	TEDAVİSİZ İZLEM	10
29	I	9	TEDAVİSİZ İZLEM	9
30	I	12	TEDAVİSİZ İZLEM	12
31	I	143	45	45
33	III	25	30	30
35	III	78	73	73
36	IV	7	TANI ANINDA TEDAVİ	0
37	II	4	TEDAVİSİZ İZLEM	4
38	III	46	TEDAVİSİZ İZLEM	46

-: Bilgilere ulaşamayan bölümler

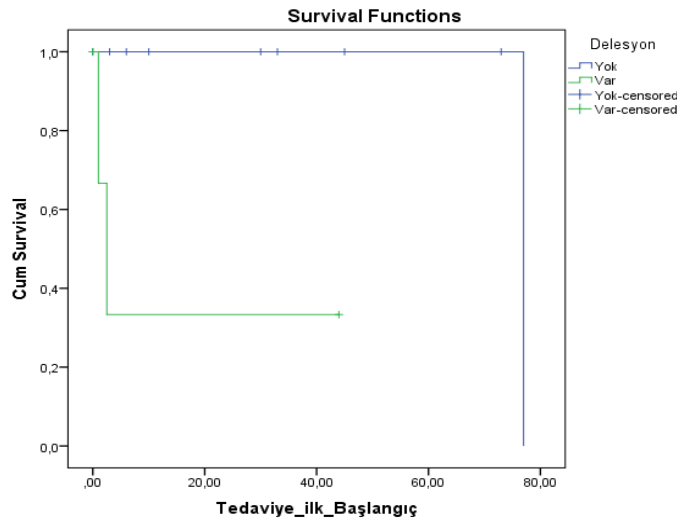
## 4.2- Verilerin İstatistiksel Değerlendirmesi

Retinoblastoma delesyonu pozitif olan 16 hastanın medyan yaşı 65 (41-79), E/K: 9/7 iken; *RB1* delesyonu negatif olan 23 hastanın medyan yaşı 67 (47-80), E/K: 13/10 şeklinde bulundu. İki grup arasında yaş ve cinsiyet açısından anlamlı fark saptanmadı ( $p>0,05$ ).

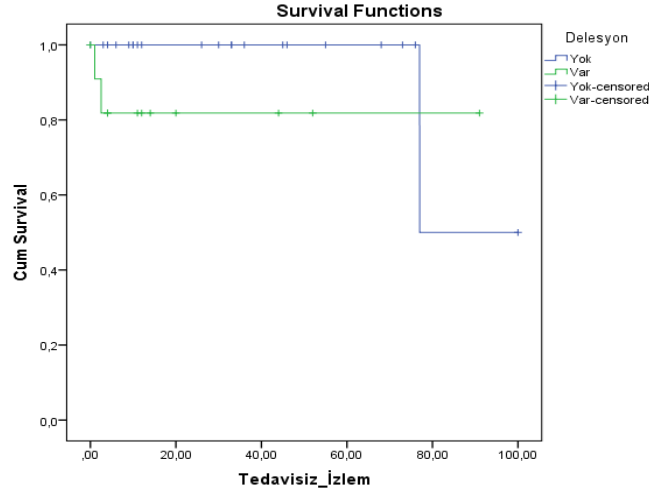
Tüm hastalarda medyan sağkalım 144 (4-151) ay, medyan tedavisiz izlem süresi 86 (0-100) ay, medyan ilk tedaviye kadar geçen zaman 10 (0-77) ay olarak bulunmuştur.



Şekil 4.5. Olgularda saptanan *RB1* gen delesyonunun genel sağkalım ile ilişkisi ( $p=0,116$ )



Şekil 4.6. Olgularda saptanan *RB1* gen delesyonunun ilk tedaviye kadar geçen zaman ile ilişkisi ( $p=0,011$ )



Şekil 4.7. Olgularda saptanan *RB1* gen delesyonunun tedavisiz izlem süresi ile ilişkisi ( $p=0,220$ )

Retinoblastoma geninin delesyonu saptanan hastalarda medyan sağkalım 144 ay olduğu görülmüştür. Tedavisiz izlem süresi 74 ay olarak saptanmıştır. Delesyonu pozitif olan hastalarda ilk tedaviye kadar geçen zaman 2.5 ay olarak bulunmuştur. Delesyonu pozitif olan 16 hastadan 6 tanesinin evreleri Rai evresi I, 4 hastanın Rai evresi II, 1 hastanın Rai evresi III, 1 hastanın Rai evresi IV olarak belirlenmiştir, 4 hastanın Rai evre bilgisine ulaşılamamıştır. Hastaların 10'u (%83,3) erken Rai evresinde bulunmaktayken, 2'si (%16,7) ileri Rai evresinde bulunmaktadır.

Retinoblastoma geninin delesyonu saptanmayan hastalarda medyan sağkalım 151 ay, tedavisiz izlem süresi 77 aydır. İlk tedaviye başlangıç zamanı 30 aydır. Delesyon saptanmayan 23 hastadan 5 tanesi Rai evre 0, 6 tanesi Rai evre I, 5 tanesi evre II, 4 tanesi evre III, 1 tanesi Rai evre IV olarak belirlenmiştir, 1 hastanın Rai evre bilgisine ulaşılamamıştır. Hastaların 18'i (%81,8) erken Rai evresinde bulunmaktayken, 4'i (%18,2) ileri Rai evresinde bulunmaktadır.

Delesyonu pozitif hastalarda ortanca genel sağkalım 144 ay iken; negatif hastalarda 151 ay olup düşük bulunmuştur ( $p=0,116$ ). Pozitif hastalarda ortanca tedavisiz izlem süresi 74 ayken, negatif hastalarda 77 ay olup daha düşüktür ( $p=0,220$ ). Pozitif olan hastalarda ortanca ilk tedaviye kadar geçen zaman 2,5 ayken, negatif hastalarda 30 aydır ( $p=0,011$ ). Pozitif ve negatif hasta grupları arasında ilk tedaviye kadar geçen zaman için anlamlı fark saptanmış olup, genel sağkalım ve tedavisiz izlem süresi için istatistiksel olarak anlamlı fark saptanamamıştır.

Erken evrede bulunan pozitif hastaların sağkalımı 144 ay, negatif hastaların sağkalımı 151 ay bulunmuştur. Pozitif hastalarda tedavisiz izlem süresi 22 ay, negatif hastalarda 77 ay bulunmuştur. İlk tedaviye başlangıç süresi ise pozitif hastalarda 78 ay, negatif hastalarda 86'dır.

İleri evrede bulunan hastaların sağkalımı, tedavisiz izlem süresi ilk tedaviye kadar geçen zaman ise ölmüş olan hasta sayısının az olması nedeniyle istatistiksel olarak hesaplanamamıştır.

Yirmi üç hastada  $\beta$ 2-mikroglobulin çalışıldığı görülmüştür.  $\beta$ 2 mikroglobulinin üst sınırı 2,5 mg/L'dir.  $\beta$ 2-mikroglobulin düzeyi *RB1* delesyonu pozitif olan 8 hastanın 3'ünde (%37,5)  $\geq$ 2,5 mg/L, 5'inde (%62,5)  $<$ 2,5 mg/L olduğu görülmüştür. *RB1* delesyonu negatif olan 15 hastanın 5'inde (%33,3)  $\geq$ 2,5 mg/L, 10'unda (%66,7)  $<$ 2,5 mg/L olduğu belirlenmiştir. *RB1* delesyonu pozitif grup ve negatif grubu karşılaştırmak için p değeri hesaplanamamıştır.

Tedavi alan hastalarda tedaviye 2 yıl içinde başlanma durumu incelenmiştir. *RB1* delesyonu pozitif hastalarda tedavi alan 4 hasta olup 4'üne (%100) 2 yıl içinde tedavi başlanmıştır. *RB1* delesyonu negatif hastalarda tedavi alan 9 hasta vardır, 7'sine (%77,8) 2 yıl içinde tedavi başlanmış olup, 2'sine (%22,2) 2 yıldan sonra tedavi başlanmıştır, p değeri için hesaplama yapılamamıştır.

13q delesyonu %60'tan fazla olan 14 hasta olup, hastaların medyan sağkalımları 151 ay, tedavisiz izlem süreleri 77 ay, tedaviye başlama zamanları 77 aydır. Delesyonu %60'tan az olan 21 hastanın medyan sağkalımları 140 ay, tedavisiz izlem süreleri 88 ay, tedaviye başlama zamanları - aydır. Genel sağkalımları ve tedavisiz izlem süreleri için anlamlı fark yoktur ( $p=0,951$ ,  $p=0,373$ ). İlk tedaviye başlama zamanı için istatistiksel hesaplama yapılamamıştır.

13q delesyonu %60'tan fazla ve *RB1* gen delesyonu birlikteliği olan 6 hasta olup, hastaların medyan sağkalımları 144 ay, tedavisiz izlem süreleri 86 ay, tedaviye başlama zamanları 63 aydır. Delesyonu %60'tan az olan 21 hastanın medyan sağkalımları 151 ay, tedavisiz izlem süreleri 88 ay, tedaviye başlama zamanları 77 aydır. İstatistiksel açıdan ilk tedaviye kadar geçen zaman için anlamlı fark saptanmış olup, sağkalım ve tedavisiz izlem süreleri için anlamlı fark saptanmamıştır ( $p=0,438$ ;  $p=0,225$ ;  $p=0,002$ ).

## 5-TARTIŞMA

B-hücreli kronik lenfositik lösemi yetişkinlerde görülen en yaygın lösemi tipidir. Oldukça değişken klinik sürece sahip olan bir hastalık olup bazı hastalar tanı aldıktan sonraki aylar içinde ölürken, bazılarında yaşam süresi 20 yıl ve daha fazla süreye çıkabilmektedir. Binet ve Rai evreleme sistemleri, hastalığın evresinin belirlenmesini sağlayan en kullanışlı yöntemlerdir ancak hastalık progresyonu için bireysel riskleri ve erken evrede bulunan hastaların (Binet evre A ve Rai evre 0 ila 2) sağkalımını tahmin etmek için yeterli değildirler. Bu durumları öngörebilmek için çeşitli prognostik faktörler kullanılmaktadır. Prognoz için tahminde bulunmayı sağlayan kromozomal anomaliler bulunmaktadır. Prognostik öneme sahip sitogenetik anomaliler 13q14.3 delesyonu, 11q23 delesyonu, 17p13 ve trizomi 12' dir. En sık görülen kromozomal değişiklik %55 oranıyla 13q14.3 delesyonudur (Döhner, 2000).

On üçüncü kromozomun kısa kolunun delesyonu izole olarak saptandığında iyi prognoz göstergesidir. Ancak bu delesyonun izole olarak saptandığı hastaların bazılarında beklendiği gibi olumlu bir prognoz görülmemiştir. Delesyona uğrayan bölgenin q14.2 bandını kapsayacak büyüklükte olması ve burada konumlanmış olan Retinoblastoma tümör baskılayıcı genini içermesi hastalık seyrini olumsuz etkileyen bir faktör olabileceği düşünülmektedir. Retinoblastoma genindeki delesyonun bu durumdaki rolünü belirleyebilmek klinik heterojenite nedenlerini aydınlatma konusunda yardımcı olacaktır.

Retinoblastoma1 geni, 13. kromozomun q14.2 bandında yer alan, yirmi yedi ekzondan oluşan bir tümör baskılayıcı gendir (Poznic, 2009). Retinoblastoma1 proteini hücre döngüsünün düzenlenmesi, apoptoz, farklılaşma, tümör baskılanması, kromatin yapısı, DNA replikasyonu, hücre metabolizmasıyla ilgili fonksiyonları düzenlemektedir (Akdeniz, Tuncer ,Yazıcı). Bu tümör baskılayıcı genin işlev yapamaması birçok farklı mekanizma ile ilgili hücresel süreçleri etkiler (Nicholas J. Dyson, 2016).

Tümör baskılayıcı bir gen olan *RB1* geninin inaktivasyonu ile prognozun olumsuz seyretmesi arasındaki bağlantının açıklanabilmesi, hasta grubundaki heterojenite nedenlerini belirlemek için yol gösterici olacaktır. Çalışmamızda iyi prognostik faktör olarak değerlendirilen izole 13q delesyonu bulunan KLL vakalarında *RB1* gen delesyonu varlığının FISH yöntemi ile değerlendirilmesi, bunla birlikte hastalık evresi ve tedaviye başlangıç zamanı ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışma grubumuza bakıldığında, 13q delesyonuna sahip olgularda *RB1* delesyonu görülme oranı %40 olarak saptanmıştır. On üçüncü kromozomun uzun kolunun delesyonu bulunan vakalarda Retinoblastoma delesyon oranı Dal Bo ve arkadaşları tarafından %39, Quillette ve

arkadaşları tarafından %40 olarak bulunmuştur. Çalışmamızdaki oran literatür ile benzerlik göstermektedir.

Retinoblastoma delesyonu saptanan 16 olgudan 12'sinin evre bilgisine ulaşılmıştır. Retinoblastoma delesyonu olan olgulardan 6'sı Rai evresi I, 4 hasta Rai evresi II, 1 hasta Rai evresi III, 1 hasta Rai evresi IV olarak belirlenmiştir. Rai evresi I olan 6 olgulardan 5'i tedavisiz izlem altındayken, 1'i tedavi almaktadır, tedaviye 44. ayda başlanmıştır. Rai II evresindeki hastaların 3'ü tedavisiz izlem altındayken, 1 hasta tedavi almaktadır, tedaviye 1.ayda başlanmıştır, hasta ex olmuştur. Rai III evresindeki hastaya tanı anında tedavi başlanmıştır. Rai evresi IV olan olguda TtFT 2,5 ay olup, genel sağkalım 47 aydır, hasta ex olmuştur. Quillette ve arkadaşlarının 2008 yılındaki çalışmasında Tip II delesyon olarak kategorize edilen, *RB1* lokusunu kapsayan büyük delesyonun ileri Rai evresine sahip hastalarda görüldüğü bildirilmiştir. Bu çalışmanın devamı niteliğinde olan 2011 yılındaki çalışmalarında *RB1* geni delesyonu olan hastaların daha kısa genel sağkalıma sahip olduğu ancak ilk tedaviye kadar geçen zaman üzerinde etkisi olmadığı gösterilmiştir (Quillette 2008; Quillette 2011).

Mian ve arkadaşlarının izole 13q delesyon ya da normal karyotip bulunan 169 hastada, del(13q14.3) uzunluklarını belirlemek üzere yaptığı çalışmada daha büyük delesyona sahip olanların, *RB1* delesyonu olmayanlardan daha kısa tedaviye başlangıç zamanı ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Mian, 2012).

Biz çalışmamızda *RB1* geni delesyonu bulunan hastaların genel sağkalım süresi ve tedavisiz izlem süresinin daha kısa olduğunu belirledik, ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir. İlk tedaviye kadar geçen zaman *RB1* pozitif hastalarda daha kısadır, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Retinoblastoma geni pozitif ve negatif olan hasta grupları arasında erken ve ileri Rai evrelerinde bulunmaları açısından olgu dağılımları uygun olmadığı için istatistiksel hesaplama yapılamamıştır.

Parker ve arkadaşlarının 2011 yılında 13q14 delesyonunda genomik profili belirlemek amacıyla 224 KLL hastası ile yapmış oldukları çalışmada *RB1* genini içeren delesyonun hastalık progresyonu için artmış risk olduğu belirlenmiştir. İlerleyici hastalık görülen hastalarda daha büyük 13q delesyonu görüldüğü belirtilmiştir.

Dal Bo ve arkadaşlarının 13q14 delesyonunun boyutu ve yüzdesinin prognoza etkisi üzerinde FISH yöntemi ile 2011 yılında yapılan araştırmada 13q delesyon oranının <%70 ve *RB1* genini kapsamayan delesyon olması daha uzun TtFT ile ilişkili, delesyon oranının <%70 olup *RB1* genini kapsamaması ya da >70 oranında delesyon olması (*RB1* genini kapsayan ya da kapsamayan) daha kısa TtFT ile ilişkili bulunmuştur (Dal Bo, 2011). Huang ve arkadaşlarının 13q14 delesyonunun boyutu ve yüzdesi prognoza etkisini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada >=%60 oranında 13q delesyonuna sahip hastalarda daha kısa TFS ve daha kısa genel sağkalım

ile ilişkili olduğu, ancak *RB1* lokusundaki delesyonun etkisinin olmadığı belirtilmiştir. Delesyon yüzdesi ve boyutunun birlikte etkisi TFS için ilişkili bulunurken, genel sağkalım için ilişkili bulunmamıştır (Huang, 2016). Çalışma grubumuzda yüksek 13q delesyon yüzdesi ( $\geq 60\%$ ) ve *RB1* delesyonu birlikteliği olan 6 hasta bulunmaktadır. İstatistiksel açıdan ilk tedaviye kadar geçen zaman için anlamlı fark saptanmış olup, sağkalım ve tedavisiz izlem süreleri için anlamlı fark saptanmamıştır ( $p=0,438$ ;  $p=0,225$ ;  $p=0,002$ ).

Yi ve arkadaşları 2017 yılında KLL ve diğer B-hücreli lenfoproliferatif hastalıklarda çalışma gerçekleştirmiştir. BCLPDs'ta 13q delesyonunun farklı boyutlarının prognoza etkisini araştırmıştır. Kronik lenfositik lösemi hariç diğer BCLPDs'lerde 13q delesyonunda büyük delesyonun daha kısa TtFT ve genel sağkalım ilişkili bulunmuştur. Kronik lenfositik lösemi hastalarında TtFT, OS ve PFS açısından ilişkili bulunmamıştır.

Çalışmamızda *RB1* delesyonu bulunan olgularda genel sağkalım ve tedavisiz izlem süresinin daha kısa olduğu ancak anlamlı olmadığı görülmüştür, ilk tedaviye kadar geçen zaman anlamlı daha kısa bulunmuştur. 13q delesyonu  $\geq 60$  ve *RB1* delesyonu bulunan hastalarda ilk tedaviye kadar geçen zaman anlamlı daha kısa bulunmuştur. Ancak bu durumda *RB1* pozitif ve tedavi alan hasta sayısının az olması, *RB1* negatif ve tedavi alan sayısının yüksek olması durumu etki etmiş olabilir. Bu yüzden daha geniş hasta grubu ile yapılacak ileri çalışmalar daha sağlıklı olacaktır.



## 6-SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda iyi prognostik faktör olarak değerlendirilen izole 13q delesyonu bulunan KLL vakalarında *RB1* gen delesyonu varlığının FISH yöntemi ile değerlendirilmesi, bunla birlikte hastalık evresi ve tedaviye başlangıç zamanı ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışma grubumuzda bulunan 40 olgunun periferik kan numuneleri ile moleküler sitogenetik analizler gerçekleştirilmiştir. İncelenen gendeki delesyon durumu analiz edilip, hasta grubunda delesyonun bulunma oranları elde edilmiş, delesyon saptanan grubun ve saptanmayan grubun genel sağkalımları, ilk tedaviye kadar geçen zaman, tedavisiz izlem süreleri karşılaştırılmıştır. Rai evreleri için hasta gruplarındaki dağılımın homojen olmaması nedeniyle karşılaştırma yapılamamıştır.

Olguların 16'sında (%40) *RB1* geninde delesyon saptanırken, 23'ünde (%60) bu gen bölgesinde delesyon saptanmamıştır.

Çalışmamızda gen bölgesi için delesyon bulunan olguların genel sağkalımları ve tedavisiz izlem süreleri daha kısa bulunmuştur. İlk tedaviye başlangıç sürelerinin literatür ile benzer şekilde anlamlı olarak daha kısa olduğu görülmüştür. Ancak hasta grubundaki dağılımın bu durum üzerine etkisi olabileceği ve bu yüzden çalışmanın daha geniş popülasyonlar ile yapılmasının sağlıklı olacağını düşünmekteyiz.

## 7-KAYNAKLAR

- Binet JL., Auquier A., Dighiero G., (1981). A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, 48-198-206
- Calore F., Fabbri M., (2011). MicroRNAs and Cancer  
<http://atlasgeneticsoncology.org//Deep/MicroRNAandCancerID20101.html> 4 Mayıs 2018 DOI : <https://doi.org/10.4267/2042/47272>
- Campo E., Swerdlow S., Harris N., Pileri S., Stein H., Jaffe E., (2011). The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*, 117(19):5019-5032.
- Chastain E.C., Duncavage E.J., (2015). Clinical prognostic biomarkers in chronic lymphocytic leukemia and diffuse large B-cell lymphoma. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 139(5):602-7.
- Crespo M., Bosch F., Villamor N., Bellosillo B., Colomer D., Rozman M., . . . , Montserrat E., (2003). ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 348:1764-1775
- Cimmino A., Calin GA., Fabbri M., Iorio MV., Ferracin M., Shimizu M., . . . , Croce CM., (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 102 (39):13944-9
- Dal Bo M., Rossi F.M., Rossi D., Deambrogi C., Bertoni F., Giudice I.D., Palumbo G., Nanni M., Rinaldi A., Kwee I., Tissino E., Corradini G., Gozzetti A., Cencini E., Ledetto M., Coletta A.M., Luciano F., Bulian P., Pozzato G., Laurenti L., Forconi F., Di Raimondo F., Marasca R., Del Poeta G., Gaidano G., Foa R., Guarini A. & Gattei V., (2011). 13q14 Deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 50(8):633-43.
- Damle R.N., Wasil T., Fais F., Ghiotto F., Valetto A., Allen SL., Burchbinder A., Budman D., Dittmar K., Kolitz J., Lichtman S.M., Schulman P., Vinciguerra V.P., Rai K.R., Ferrarini M., Chiorazzi N., (1999). Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 15;94(6):1840-7.

## KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- De Martino I., Visone R., Fedele M., Petrocca F., Palmieri D., Hoyos JM., Forzati F., Croce CM and Fusco A., (2009). Regulation of microRNA expression by HMGA1 proteins. *Oncogene* 28;1432–1442
- Del Principe M.I, Del P.G., Buccisano F., Maurillo L., Venditti A., Zucchetto A., Marini R., Nisccola P., Consalvo M.A., Mazzone C., Ottaviani L., Panetta P., Bruno A., Bomben R., Suppo G., Degan M., Gattei V., Fabritiis P., Cantonetti M., Coco F., Del Principe D., Amadori S., (2006). Clinical significance of ZAP-70 protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 108:853-861
- Döhner H., Stilgenbauer S., Benner A., Leupolt E., Kröber A., Bullinger L., Döhner K., Bentz M., Lichter P., (2000). Genomic Aberrations and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia, *The New England Journal of Medicine*, 343:1910-1916
- Durak B., (2005). Hematolojide FISH, *Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi Temel Moleküler Hematoloji Kurs Kitapçığı*. 12-13
- Durak B., Akay O.M., Aslan V., Özdemir M., Şahin F., Artan S., Gülbaş Z., (2009). Prognostic impact of chromosome alterations detected by FISH in Turkish patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 15;188(2):65-9.
- Dyson N.J., (2016). *RB1*: a prototype tumor suppressor and an enigma. *Genes & Dev.*, 30: 1492-1502
- Eichhorst B., Robak T., Montserrat E., Ghia P., Hilmen P., Hallek M., Buske C., (2015). Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 26(5):78–84,
- Fanale D., Maragliano R., Bazan V., Russo A., (2017). *Caretakers and Gatekeepers*.  
<https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0006048.pub2>  
10 Mart 2018. DOI: 10.1002/9780470015902.a0006048.pub2
- FISH Probe Catalogue. Cambridge, UK: Cytocell; 2014/2015.
- Garg R., Wierda W., Ferrajoli A., Abruzzo L., Pierce S., Lerner S., Keating M., O’Brein S., (2012).The prognostic difference of monoallelic versus biallelic deletion of 13q in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, 15;118(14):3531-7

## **KAYNAKLAR (Devam Ediyor)**

- Giacinti C. & Giordano A., (2006). RB and cycle progression. *Oncogene*, 28;25(38):5220-7.
- Goldin L.R., Björkholm M., Kristinsson S.Y., Turesson I., Landgren O., (2009). Elevated risk of chronic lymphocytic leukemia and other indolent non-Hodgkin's lymphomas among relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, 94:647-653.
- Hallek M., (2017). Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *American Journal of Hematology*, 92(9):946-965
- Hamblin T.J., Orchard J.A., Ibbotson R.E., Davis Z., Thomas P.W., Stevenson F.K., Oscier D.G., (2002). CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood*, 1;99(3):1023-9.
- Hernandez J.A., Rodriguez A.E., Gonzalez M., Benito R., Fontanillo C., Sandoval V., Romero M., Martin-Nunez G., Coca A.G., Fisac R., Galende J., Recio I., Ortuna F., Garcia J.L., Rivas J., Gutierrez N.M., San Miguel J.F., Hernandez J.M., (2009). A High Number Of Losses In 13q14 Chromosome Band Is Associated With A Worse Outcome And Biological Differences In Patients With B-Cell Chronic Lymphoid Leukemia. *Haematologica*, 94: 364-371
- Huang S., Gillan T., Gerrie A., Hrynychak M., Karsan A., Ramadan K., Smith A., Toze C. and Bruyere H., (2016). Influence of clone and deletion size on outcome in chronic lymphocytic leukemia patients with an isolated deletion 13q in a population-based analysis in British Columbia, Canada. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 55:16-24
- Hus I., Rolinski J., (2015). Current concepts in diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Contemporary Oncology*, 19(5): 361-367
- Kay N.E., O'Brien S.M., Pettitt A.R., Stilgenbauer S., (2007). The role of prognostic factors in assessing 'high-risk' subgroups of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 21(9):1885-91.

## KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Klein U, Lia M., Crespo M., Siegel R., Shen Q., Mo T., . . . , Dalla-Favera R., (2010). The *DLEU2/miR-15a/16-1* Cluster Controls B Cell Proliferation and Its Deletion Leads to Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Cell*, 19;17(1):28-40.
- Landau D.A., Carter S.L., Stojanov P., McKenna A., Stevenson K., Lawrence M.S., Sougnez C., Stewart C., Sivachenko A., Wang L., Wan Y., Zhang W., Shukla S.A, Vartanov A., Fernandes S.M., Saksena G., Cibulskis K., Tesar B., Gabriel S., Hacohen N., Meyerson M., Lander E.S.,
- Neuberg D., Brown J.R., Getz G., Wu C.J., (2013). Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*, 152(4):714-726
- Liu Y, Corcoran M, Rasool O, Ivanova G., Ibbotson R., Grander D., Iyengar A., . . . , Oscier D., (1997). Cloning of two candidate tumor suppressor genes within a 10 kb region on chromosome 13q14, frequently deleted in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene*, 15:2463-73.
- Machiela M.J., Zhou W., Caporaso N., Dean M., Gapstur S.M., Goldin L., Stevens V.L., Yeager M., Chanock S.J., (2016). Mosaic 13q14 deletions in peripheral leukocytes of non-hematologic cancer cases and healthy controls. *Journal of Human Genetics*, 61, 411-418
- Mian M., Rinaldi A., Mensah A.A, Rossi D., Ladetto M., Forconi F., Marasca R., Gattei V., Zucca E., Cavalli F., Gaidano G., Kwee I., Bertoni F., (2012). Del(13q14.3) length matters: an integrated analysis of genomic, fluorescence in situ hybridization and clinical data in 169 chronic lymphocytic leukaemia patients with 13q deletion alone or a normal karyotype. *Hematol Oncol*, 30: 46-49
- Migliazza A, Bosch F, Komatsu H, Cayanis E., Martinotti S., Toniato E., . . . , Dalla-Favera R., (2001). Nucleotide sequence, transcription map, and mutation analysis of the 13q14 chromosomal region deleted in B- cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 97:2098-104.
- Montillo M., Hamblin T., Hallek M., Montserrat E., Morra E., (2005). Chronic Lymphocytic Leukemia: Novel Prognostic Factors And Their Relevance For Risk-Adapted Therapeutic Strategies, *Haematologica*, 90: 391-399
- Nussbaum R.L., McInnes R.R., Willard H.F., (2005). *Thompson & Thompson, 6.baskı*. Ankara: Güneş Kitapevi

## **KAYNAKLAR (Devam Ediyor)**

- Parker H., Rose-Zerilli M., Parker A., Chaplin T., Wade R., Gardiner A., Griffiths M., Collins A., Young BD., Oscier DG. And Strefford JC., (2011). 13q deletion anatomy and disease progression in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 25; 489-49
- Pashaei M., Shokrollahi M., Kokhaei P., (2016). Somatic Mutation in Immunoglobulin Gene Variable Region in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia and Prognostic Impact. *Basic & Clinical Cancer Research*, 8(4):29-36.page:33
- Poznic M., (2009). Retinoblastoma protein: a central processing unit. *Journal of Biosciences*, 34(2):305-312
- Puiggros A., Delgado J., Rogriguez-Vicente A., Callodo R., Aventin A., Luno E., Grau J., Hernandez J.A., Marugan I., Ardanaz M., Gonzalez T., Valiente A., Osma M., Calasanz M.R., Sanzo C., Carrio A., Ortega M., Santacruz R., Abrisqueta P., Abella E., Bosch F., Carbonell F., Sole F., Hernandez J.M., Espinet B., (2013). Biallelic losses of 13q do not confer a poorer outcome in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of 627 patients with isolated 13q deletion. *British Journal of Haematology*, 163(1):47-54.
- Puiggros A., Blanco G. & Espinet B., (2014). Genetic Abnormalities in Chronic Lymphocytic Leukemia: Where We Are and Where We Go. *BioMed Research International*, p:13.
- Quillette P., Erba H., Kujawski L., Kaminski M., Shedden K. And Malek S., (2008). Integrated Genomic Profiling of Chronic Lymphocytic Leukemia Identifies Subtypes of Deletion 13q14. *Cancer Res*, 15;68(4):1012-21.
- Quillette P., Collins R., Shakhan S., Li J., Peres E., Kujawski L., Talpaz M., Kaminski M., Cheng L., Shedden K & Malek S.N., (2011). Acquired genomic copy number aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Journal List*, 118(11): 3051–3061.
- Rai KR., Sawitsky A., Cronkite EP., Channa AD., Levy RN., Pasternack BS., (1975). Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 46:219-34
- Rassenti L.Z., Huynh L., Toy T.L., Chen L., Keating M.J., Gribben J.G., Neuberg D.S., Flinn I.W., Rai K.R., Byrd J.C., Kay N.E., Greaves A., et al., (2004). ZAP-70 Compared with Immunoglobulin Heavy-Chain Gene Mutation Status as a Predictor of Disease Progression in Chronic

## KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

Lymphocytic Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 351:893-901

Rigolin G.M., Formigaro L., Cavallari M., Quaglia F.M., Lista E., Urso A., Guardalben E., Martinelli S., Saccenti E., Bassi C., Lupini L., Bardi M.A., Volta E., Tammiso E., Melandri A., Negrini M., Cavazzini F., Cuneo A., (2017). An extensive molecular cytogenetic characterization in high-risk chronic lymphocytic leukemia identifies karyotype aberrations and *TP53* disruption as predictors of outcome and chemorefractoriness. *Oncotarget*, 25; 8(17): 28008–28020.

Robak T., (2014). Staging and Prognostic Factors in Chronic Lymphocytic Leukemia: Current Status. *J Leuk*, 2:5

Rodrigues C.A., Gonçalves M.V., Ikoma V., Lonard-Metze I., Pereira A.D., Farias D., Chauffaille M., Schaffel R., Ribeiro E., Rocha T., Buccheri V., Vasconcelos Y., Figueiredo V., Chiattonne., Yamamoto M., (2016). Diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: recommendations from the Brazilian Group of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Revista Brasileira de Hematologia de Hemoterapia*, 38(4): 346–357.

Santos FP., O'Brein S., (2012). Small lymphocytic lymphoma and chronic lymphocytic leukemia: are they same disease? *Cancer Journal*, 18(5):396-403.

Scarfo L., Ferrari A.J.M., Ghia P., (2016). Chronic lymphocytic leukaemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 104 169–182

Szankasi P. & Bahler D.W. (2010). Clinical Laboratory Analysis of Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region Genes for Chronic Lymphocytic Leukemia Prognosis. *Journal of Molecular Diagnostic*, 12(2): 244–249.

Ural A.U., (2012). 7. Ulusal Kemik İliği Transplantasyonu ve Kök Hücre Tedavileri Kongresi, 09-10 Mart 2012, Antalya

Van Bockstaele F., Verhasselt B., Philippe J., (2009). Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: A comprehensive review. *Blood Reviews* 23, 25–47.

Werner M., Wilkens L., Aubele M., Nolte M. Zitzelsberger H., Komminoth P., (1997). Interphase cytogenetics in pathology: principles, methods, and applications of fluorescence in situ hybridization (FISH). *Histochemistry and Cell Biology*, 108(4-5):381-90.

Yi S., Li H., Li Z., Xiong W., Liu H., Liu W., . . ., Qiu L., (2017). The prognostic significance of 13q deletions of different sizes in patients with B-cell chronic lymphoproliferative disorders: a retrospective study. *Int J Hematol*, 106:418-425

Zenz T., Döhner H., Stilgenbauer S., (2007). Genetics and risk-stratified approach to therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol*, 20:4





## Özgeçmiş

### Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Nur Sena İnci  
Doğum tarihi ve yeri : 21.05.1990  
Uyruğu : T.C.  
Medeni durumu : Bekar  
İletişim adresleri : sen\_4\_10@hotmail.com

### Eğitim Durumu

1997-2004: İlköğretim, Dumlupınar İlköğretim Okulu  
2004-2007: Lise, Tayfur Bayar Y.D.A. Lisesi  
2009-2012: Lisans, Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü  
2015-2018: Y.Lisans, ESOGÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Genetik  
A.B.D.

**Yabancı Dil:** İngilizce - İyi

**Mesleki Deneyim** :

**Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar:**

**Yayınlar** :  
(Makale, Sözlü Bildiri, Poster Bildiri, Kitap, Kitap Bölümü vd.)

### Bilimsel Etkinlikler

Burslar :  
Ödüller :  
Projeler :  
Sözlü Konferans veya Seminerler :  
Kurslar ve Eğitim Programları :