

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ERİŞKİN MYELOİD LÖSEMİ OLGULARININ TANISINDA YÜKSEK ÇIKTILI  
BAC TABANLI MOLEKÜLER FISH ANALİZLERİNİN REAL-TİME PCR  
TEKNOLOJİSİYLE EŞ ZAMANLI KULLANIMI**

**Duygu YAVUZ**

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü  
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ  
2011



T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ERİŞKİN MYELOİD LÖSEMİ OLGULARININ TANISINDA YÜKSEK ÇIKTILI  
BAC TABANLI MOLEKÜLER FISH ANALİZLERİNİN REAL-TİME PCR  
TEKNOLOJİSİYLE EŞ ZAMANLI KULLANIMI**

**Duygu YAVUZ**

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü  
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Naci ÇİNE

KOCAELİ  
2011

## SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: Erişkin Myeloid Lösemi Olgularının tanısında Yüksek Çıktılı BAC Tabanlı Moleküler FISH Analizlerinin RT-PCR Teknolojisiyle Eş Zamanlı Kullanımı

Tez yazarı: Duygu YAVUZ

Tez savunma tarihi:

Tez Danışmanı: Naci ÇİNE

İşbu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ		İMZA
ÜNVANI	ADI SOYADI	
BAŞKAN:		
ÜYE(DANIŞMAN):		
ÜYE:		
ÜYE:		
ÜYE:		

### ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.../.../200..

Prof.Dr. Ümit BİÇER

Enstitü Müdürü

## ÖZET

### Erişkin Myeloid Lösemi Olgularının Tanısında Yüksek Çıktılı BAC Tabanlı Moleküler FISH Analizlerinin Real-Time PCR Teknolojisiyle Eş Zamanlı Kullanımı

Lösemiler kan hücrelerinin sınırsız ve kontrolsüz bir şekilde bölünüp çoğalmaları sonucu meydana gelmektedirler. Myeloid lösemiler arasında, Kronik Myeloid Lösemi (KML) ve Akut Myeloid Lösemi (AML) yer almaktadır. Ph kromozomu KML'nin en belirgin özelliğidir. AML'de ise bazı kromozom düzenlenmelerinin prognostik açıdan önemi büyüktür.

Bu çalışmada, erişkin myeloid lösemi olgularının tanısında RT-PCR ve yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri yöntemlerini aynı zamanda kullanılıp, olgularda genom düzeyinde meydana gelen aberasyonların saptanması amaçlanmıştır.

Çalışmada cinsiyet farkı gözetmeksizin, 18-80 yaş arası 47 AML veya KML tanılı bireyden alınan periferik kan örnekleri RNA düzeyinde RT-PCR yöntemiyle, DNA düzeyinde ise yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri yöntemiyle incelenerek, genetik hasarların en çok hangi bölgelerde yer aldığı taranmıştır. RT-PCR çalışmaları sonucunda; 10 (% 21,3) hastada translokasyon, yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri çalışmaları sonucunda da; 13 (% 27,7) hastada genomun çeşitli bölgelerinde çeşitli boyutlarda aberasyonlara rastlanılmıştır. Hastaların 27'sinde (% 57,4) her iki yöntemle de herhangi bir genetik hasar varlığına rastlanılmamıştır. En sık görülen aberasyon, AML tanılı 3 olguda (% 6,4) gözlenen trizomi 8 ve Y kromozomu kaybıdır.

Lösemi olgularının tanısında bu iki yöntemin bir arada kullanımı, tanının desteklenmesi ve prognozun belirlenmesi açısından hematolojiye yeni bir yaklaşım sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Lösemi, trizomi, delesyon, RT-PCR, yüksek çıktılı FISH analizleri

## **ABSTRACT**

### **The Simultaneous Usage of BAC Based High Throughput FISH Analysis and the Real-Time PCR Technology at the Diagnosis of the Adult Myeloid Leukemia Cases**

Leukemia occurs as a result of limitless and uncontrollable production of the blood cells. Among Myeloid Leukemias, CML and AML take place.

In this study, RT-PCR and FISH Analysis methods are utilized simultaneously at the diagnosis of the adult myeloid leukemia cases and it is aimed to determine the aberrations that occur in the genome level.

In this study, without a gender consideration, peripheral blood samples taken from 47 AML or CML diagnosed individuals between ages 18-80 are examined with the RT-PCR method in the RNA level and with the FISH Analysis method in the DNA level, and scanned to see where most of the genetic damages take place. As a result of the RT-PCR studies; translocation in 10 patients (21,3%), and as a result of the FISH Analysis; aberrations with several sizes in various of the genome in 13 patients (27,7%) were encountered. In 27 patients (57,4 %) no existence of genetic damages were seen with either methods. The most frequent aberration is the trisomy 8 and loss of Y chromosome which was stated in 3 (6,4%) AML cases.

The simultaneous useage of these two methods for the diagnosis of the leukemia cases provides a new approach to hematology in terms of supporting the diagnosis and determine the prognosis.

**Keywords:** Leukemia, trisomy, deletion, RT-PCR, High Throughput FISH Analysis.

## TEŞEKKÜR

Genetik alanında çalıőabilme Őansını bana tanımiő olan ve bilimsel konulardaki engin bilgisiyle bu zorlu yolda ilerlememe yardımcı olan değerli hocam Doç. Dr. Hakan SAVLI'ya; yüksek lisans eğitimim ve tez çalıőmalarım sÜresince tüm bilgi ve tecrÜbesini benimle paylaőan, eősiz sabrıyla en kÖtü anlarımda yardımcı olup, beni motive eden, en yoğun anlarında bile bana vakit ayırıp, her türlü konuda yol gösteren değerli danışman hocam Yard. Doç. Dr. Naci ÇİNE'ye, yüksek lisans eğitimim sÜresince büyük bilgi birikimlerini içtenlikleriyle paylaőan hocalarımla tümüne, tez çalıőmam boyunca her konuda yanımda olduklarını bana hissettiren ve tüm yardımseverlikleriyle her sorunuma destek olan çok değerli arkadaşlarım Uzm. Biyolog Nilüfer ÜZÜLMEZ'e ve Biyolog Bahar DAL'a, hastalıkların değerlendirilmesinde bana her zaman yardımcı olan değerli arkadaşım Uzm. Biyolog Deniz SÜNNETÇİ'ye, başta Nevin ÇALIK olmak üzere çalışma hayatına başladığım andan itibaren yardım severlikleriyle her zaman yanımda olan tüm çalışma arkadaşlarıma, bu günlere beni getiren, her anımda yanımda olup bana güç veren ve her zaman desteklerini benden esirgemeyen, benim için hayattaki en önemli varlıklar olan Sevgili ANNEM ve BABAMA sonsuz teőekkürler...

Saygılarımla

Duygu YAVUZ

## İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1.Hematopoez	3
2.2.Kanser	4
2.2.1. Onkogenler	5
2.2.1. Tümör Baskılayıcı Genler	7
2.3. Lösemi	8
2.3.1. Löseminin Tarihçesi	8
2.3.2. Löseminin Patogenezi ve Etiyolojisi	9
2.3.3.Lösemilerin Sınıflandırılması	9
2.4. Kronik Myeloid Lösemi (KML)	10
2.4.1. Tanım ve Tarihçe	10
2.4.2.Sınıflandırma	11
2.4.3. Epidemiyoloji ve Etiyolojisi	11
2.4.4. Sitokinetiği	12
2.4.5. Sitogenetiği	12
2.4.6.Moleküler Biyolojisi	14
2.4.6.1. ABL Geni	14
2.4.6.2. BCR Geni	15
2.4.6.3. BCR/ABL Füzyon geni ve Füzyon Proteini	17
2.4.6.4. BCR/ABL Sinyal İletim Yolları	18



2.4.7. Klinik Özellikleri	20
2.4.7.1. Kronik Faz	20
2.4.7.2. Akselere Faz	21
2.4.7.3. Blastik Faz	21
2.4.8. Tedavi	22
2.4.8.1. Interferon $\alpha$	23
2.4.8.2. Allojenik Kök Hücre Transplantasyonu	23
2.4.8.3. Imatinib	23
2.5. Akut Myeloid Lösemi (AML)	25
2.5.1. Sınıflandırma	26
2.5.2. Epidemiyoloji ve Etiyolojisi	29
2.5.3. AML'de Prognostik Önemi olan Kromozom Kusurları	30
2.5.3.1. t(8;21)(q22;q22) / AML1-ETO Geni	30
2.5.3.2. t(15;17)(q22;q21) / PML/RAR Geni	32
2.5.3.3. Inv (16)(p13q22) / CBF $\beta$ MYH11 Geni	32
2.5.4. Tedavi	33
2.6. Lösemik Dönüşümün Gösterildiği Metodlar	34
2.6.1. Real-Time PCR Yöntemi	34
2.6.1. Özgül Olmayan Floresan İşaretli Problar	36
2.6.2. Özgül Floresan İşaretli Problar	36
2.6.2. Yüksek Çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM	43
3.1. Yöntem	43
3.1.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu	44
3.1.2. Periferik Kandan RNA İzolasyonu	44
3.1.3. DNA ve RNA'ların Kantite ve Kalite Tayini	45
3.1.4. Yüksek Çıktılı BAC Tabanlı Moleküler FISH Analizi Metodu	46
3.1.4.1. DNA Lekeleme	46
3.1.4.2. DNA' nin Pürifikasyonu	46
3.1.4.3. Örneklerin Kurutulması	47

3.1.4.4. Hibridizasyon	47
3.1.4.5. Yıkama	48
3.1.4.6. Tarama	49
3.1.4.7. Veri Analizi	50
3.1.5. Real-Time PCR Metodu	50
3.1.5.1. cDNA Aşaması	51
3.1.5.2. t(9;22) LightCycler (LC) aşaması	51
3.1.5.3. t(15;17) LightCycler (LC) aşaması	53
3.1.5.4. t(4;11) LightCycler (LC) aşaması	56
4. BULGULAR	59
5. TARTIŞMA	70
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	76
KAYNAKLAR DİZİNİ	77
ÖZGEÇMİŞ	83

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

aCGH: array based Comperative Genomic Hybridization

ALL: Akut Lenfoblastik Lösemi

AKHT: Allojenik Kök Hücre tedavisi

AML: Akut Myeloid Lösemi

BAC: Bacterial Artificial Chromosome

FISH: Fluorescence In Situ Hybridization

Kb: Kilobaz

KLL: Kronik Lenfoblastik Lösemi

KML: Kronik Myeloid Lösemi

M-bcr:Majör-breakpoint cluster region

m-bcr: Minör-breakpoint cluster region

Mb: Megabaz

MDS: Myelodisplastik Sendrom

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Ph: Philadelphia kromozomu

RT-PCR: Real-Time PCR

WHO: World Health Organization

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Pluripotent kök hücrelerinin hematopoez süresince farklılaşması.....	4
Şekil 2.2. Normal 9. ve 22. kromozom ve t(9;22) translokasyonu.....	13
Şekil 2.3. Normal ABL proteinindeki fonksiyonel bölgeler.....	15
Şekil 2.4. Normal BCR proteini ve proteinin fonksiyonel bölgeleri.....	16
Şekil 2.5. Bcr ve Abl genlerindeki kırılma noktaları.....	18
Şekil 2.6. p210 <sup>Bcr-Abl</sup> 'nin sinyal yolları.....	19
Şekil 2.7. İmatinibin etki mekanizması.....	24
Şekil 2.8. AML1- CBF $\beta$ transkripsiyon faktörü.....	31
Şekil 2.9. Tipik bir PCR reaksiyonu.....	35
Şekil 2.10. SYBR Green I boyası.....	36
Şekil 2.11. Taqman Probu.....	37
Şekil 2.12. Moleküler boncuk yöntemi.....	37
Şekil 2.13. Hibridizasyon probu.....	38
Şekil 2.14. aCGH tekniğinin basamakları.....	41
Şekil 3.1. NanoDrop ND-1000.....	45
Şekil 3.2. Yükleme yapılan slaytlar.....	48
Şekil 3.3. HyBex İnkübatörde yıkanan slaytlar.....	49
Şekil 3.4. Tarayıcı kasete yerleştirilen slayt.....	49
Şekil 3.5. Tarayıcı karuseline yerleştirilen slaytlar.....	50
Şekil 4.1. AML tanılı sınıflandırılmayan gruptaki bir hastaya ait aberasyonlar.....	67
Şekil 4.2. AML-M3 tanılı hastaya ait aberasyonlar.....	68
Şekil 4.3. AML M1 tanılı hastaya ait aberasyonlar.....	68
Şekil 4.4. Analiz sonrası herhangi bir aberasyon saptanmayan olguya ait görüntü.....	69

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1.</b> Bazı insan tümörleri ile ilgili onkogenler.....	6
<b>Çizelge 2.2.</b> Bazı bilinen tümör süpressör genler.....	7
<b>Çizelge 2.3.</b> Myeloid neoplazilerde 2008 WHO sınıflandırılması.....	11
<b>Çizelge 2.4.</b> KML’de kronik fazının başlangıç semptom ve bulguları.....	20
<b>Çizelge 2.5.</b> KML ‘nin akselere ve blastik fazlarının tanımında kullanılan WHO kriterleri.....	22
<b>Çizelge 2.6.</b> Akut Myeloid Lösemide FAB Sınıflaması.....	27
<b>Çizelge 2.7.</b> Akut lösemi WHO sınıflaması.....	28
<b>Çizelge 2.8.</b> AML gelişimi ile ilişkili risk faktörleri.....	30
<b>Çizelge 2.9.</b> AML ile ilişkili onkofüzyon proteinleri.....	33
<b>Çizelge 4.1.</b> Cinsiyetin hastalar üzerindeki dağılımı.....	59
<b>Çizelge 4.2.</b> AML-KML tanılı hastaların yaş ortalaması dağılımı.....	59
<b>Çizelge 4.3.</b> Exitus olan hastaların AML alt tiplerine göre dağılımı.....	60
<b>Çizelge 4.4.</b> Hastaların organomegali özellikleri.....	60
<b>Çizelge 4.5.</b> Hastaların kan verilerine ait bulguların ortalaması.....	61
<b>Çizelge 4.6.</b> AML olgularının FAB sınıflamasına göre dağılımı.....	61
<b>Çizelge 4.7.</b> Olgularda saptanan aberasyonların yöntemlere göre dağılımı.....	62
<b>Çizelge 4.8.</b> Aberasyon saptanan olguların dağılımı.....	63
<b>Çizelge 4.9.</b> Olguların tümünde saptanan aberasyonlar.....	63
<b>Çizelge 4.10.</b> AML tanılı sınıflandırılmayan gruptaki hastaların aberasyon verileri.....	64
<b>Çizelge 4.11.</b> AML M1 grubunda bulunan hastalardaki aberasyonlar.....	65
<b>Çizelge 4.12.</b> AML tanılı M2, M3 ve M5 alt tipindeki hastalarda bulunan aberasyonlar.....	65
<b>Çizelge 4.13.</b> KML olgularına ait aberasyonlar.....	66
<b>Çizelge 4.14.</b> bcr-abl varlığı saptanıp, çoklu FISH analizi sonucu normal olan hasta grubu.....	66

## 1. GİRİŞ

Lösemiler kan hücrelerinin sınırsız ve kontrolsüz bir şekilde bölünüp çoğalması sonucu meydana gelen hastalıklar grubunu oluşturmaktadırlar. Kemik iliğinden köken aldığı hücrenin çeşidine göre myeloid veya lenfoid, etkilenen hücrelerin farklılaşma derecesine göre akut veya kronik lösemi olmak üzere gruplandırılmaktadırlar (Wujcik, 2003).

Myeloid lösemiler arasında Kronik Myeloid Lösemi (KML) ve Akut Myeloid Lösemi (AML) yer almaktadır. KML moleküler düzeyde en iyi karakterize edilmiş lösemi tipidir ve aynı zamanda spesifik kromozom anomalisinin (Ph kromozomu) saptandığı ilk hastalıktır. KML tüm lösemi olgularının yaklaşık % 14'ünü, erişkin lösemi olgularının ise yaklaşık % 20'sini oluşturmaktadır (Cardama ve Cortes, 2006). Hastalık her yaşta gözlenebilmektedir. Ancak hastalığa 20 yaş altındaki olgularda sık olarak rastlanılmamaktadır. Hastalık saptandığındaki ortanca yaş ise 45-55 arasında değişmektedir (Faderl et al, 1999). Kromozomal bantlama tekniklerinin gelişimiyle beraber 1973 yılında Ph kromozomu olarak adlandırılan kısalmış kromozom 22'nin; 9. ve 22. kromozomların uzun kolları arasında ki t(9;22)(q34;q11) resiprokal translokasyon sonucu oluştuğu belirlenmiştir (Druker, 2008). Bu translokasyonun moleküler sonucu kimerik BCR-ABL proteinini kodlayan BCR-ABL onkogeninin oluşumudur (Cardama ve Cortes, 2008). Ph kromozom KML'nin en belirleyici özelliğidir ve olguların yaklaşık olarak % 90-95'inde gözlenmektedir (Cardama ve Cortes, 2006). KML'nin klinik seyri, kronik ve blastik faz olmak üzere iki evre göstermektedir fakat bazen bu iki evre arasında akselere fazda yer alabilmektedir. Hastalık başlangıç belirtileri arasında splenomegali, anemi, kilo kaybı ve terleme sıkça yer almaktadır ( Pekçelen, 2003). KML hastalarında tedavinin amacı, BCR-ABL transkriptini içeren hücreleri ortadan kaldırmak ve böylelikle moleküler remisyon sağlamaktır. Bu amaçla kullanılan en etkili ilaç imatinibdir (Jabbour, 2009).

Myeloid lösemiler arasında ki diğer bir hastalık grubu olan AML, myeloid ve monositik farklılaşma gösteren lösemik blast hücrelerinin kemik iliğindeki proliferasyonu ve normal kan hücrelerinin bozulan üretimiyle karakterizedir ( Cheson, 2003). Erişkinlerde görülen en yaygın lösemi tipi olup, yaklaşık olarak bu olgulardaki tüm akut lösemilerin % 80'ini oluşturmaktadır (Lichtman, 2001). Ayrıca tüm lösemi tipleri arasında en düşük yaşam süresi AML' de gözlenmektedir (Deschler, 2006). AML'de hastaya göre farklılık gösteren klinik belirtiler arasında yorgunluk, zayıflık, kolay kanama,

diş eti kanamaları, hepatomegali ve splenomegali yer almaktadır (Lichtman, 2001). İlk kez 1976 yılında Fransız, Amerikan ve İngiliz (FAB) bir grup hematolog tarafından akut lösemilerin sınıflandırılması yapılmış ve bu sınıflandırmada AML 8 patolojik alt tipe ayrılmıştır ( Ali, 2006). AML'de sitogenetik ve moleküler genetik anomalilerinin belirgin hale gelmesi ve bunların prognostik önem taşımalarından dolayı yeni bir sınıflandırmaya ihtiyaç duyulmuş ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) yeni bir sınıflama meydana getirmiştir (Vardiman, 2009). AML'de bazı kromozom yeniden düzenlenmeleri prognostik açıdan oldukça önemlidir. En sık karşılaşılan kromozom anomalileri arasında; trizomi 8, monozomi 7, monozomi ve trizomi 21, kromozom 5 veya kromozom 7'nin bir kısmının veya tamamının delesyonu, X veya Y kromozomunun kaybı yer almaktadır. Bu dengesiz kromozom düzenlenmelerinin yanında, t(8;21), t(15;17) translokasyonları ve inversiyon 16 AML'de prognostik açıdan büyük önem taşımaktadır (Bacher, 2010).

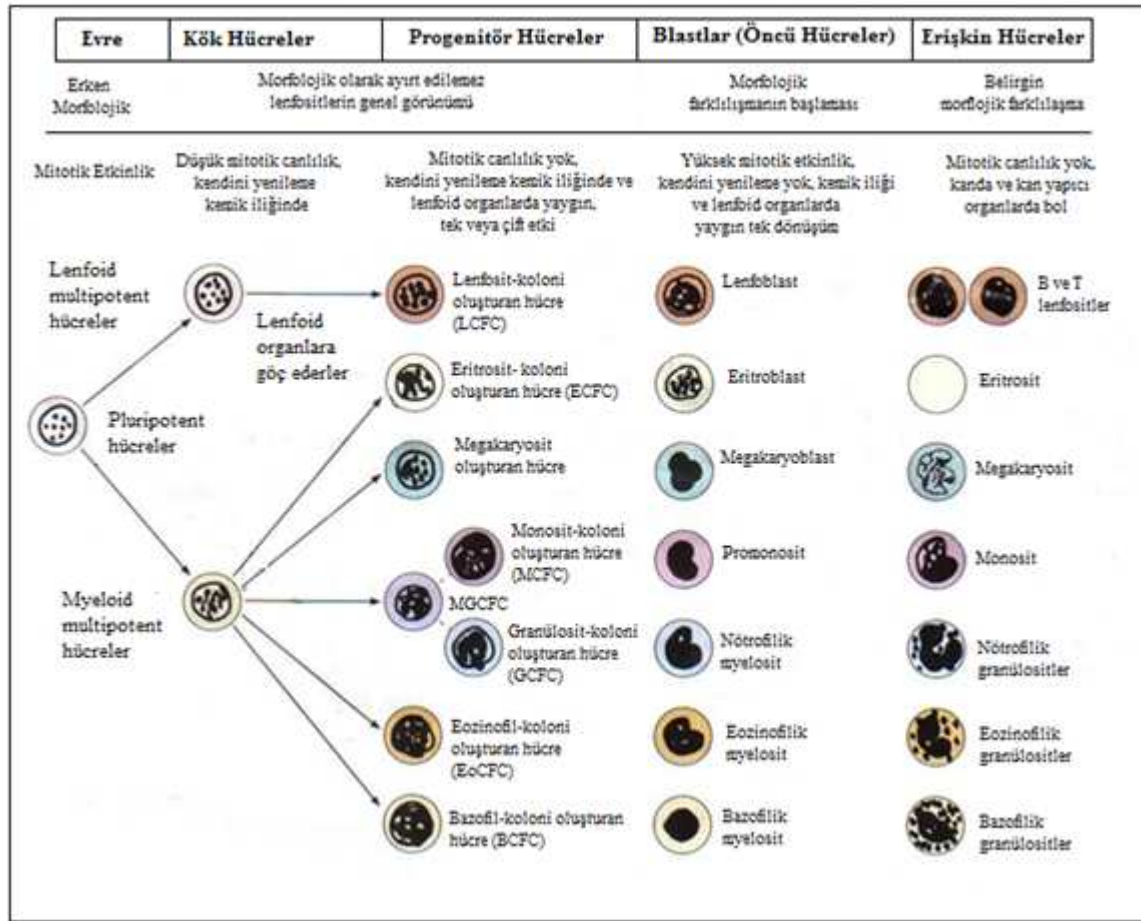
Genetik düzensizliklerin lösemi olgularının tanısındaki önemiyle, bu bozuklukların belirlenmesinde kullanılan yöntemler son yıllarda artış göstermektedir. Real-Time PCR yöntemi lösemi tanısında hassas ve özgül olması sebebiyle kullanılan en duyarlı sistemlerden biri haline gelmiştir. Bu yöntemin gen anlatımı kullanımında doğru duyarlılıkta kantitatif data vermesi ve amplifikasyon sonrası manipülasyona ihtiyaç duymaması sebebiyle diğer yöntemlere göre oldukça üstünlük sağlamaktadır. Lösemiyle ilişkilendirilmiş genlerin düzeylerini saptama bakımından büyük önem taşımaya rağmen bu yöntem bir tarama yöntemi değildir. Tarama yöntemi olarak önerilebilecek en değerli teknolojilerden biri hematolojik olgulara yeni bir yaklaşım sağlayan yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri yöntemidir. Bu yöntem ile konvansiyonel tekniklerden farklı olarak birden çok delesyon-duplikasyon bölgeleri aynı anda taranabilmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Hematopoez

Sağlıklı insanlarda kan hücrelerinin sayıları belli sınırlar içinde bulunmaktadır. Ömürleri sınırlı olan bu hücrelerin sürekli olarak üretilmeleri gerekmektedir. Embriyogenezin erken evrelerinde (0-2 ay) kan hücreleri vitellus kesesi mezoderminden gelişmektedir. Bir süre sonra karaciğer ve dalak geçici hematopoetik dokular olarak görev yapmakta, gebeliğin 24. haftasından sonra kemik iliği en önemli kan yapım yeri haline gelmektedir. Hematopoez çocukluk yaşlarında bütün kemiklerin iliğinde olmasına rağmen erişkin yaşta kafatası, vertebralar, kaburgalar, sternum ve pelvis kemiklerinin iliğinde (kırmızı kemik iliği) yer almaktadır. Bütün kan hücrelerinin kemik iliğinde tek bir hücre tipinden geliştiğine inanılmaktadır. Bu hücre tüm hücre tiplerini oluşturabildiğinden pluripotent kök hücre olarak adlandırılmaktadır. Çoğalma yetenekleri yüksek olan kök hücreler, bu yetenekleri kısıtlanmış yavru hücreleri oluşturmaktadırlar. Bu unipotansiyel veya bipotansiyel progenitör hücreler, morfolojik özellikleri ilk defa dönüşecekleri olgun hücre tiplerini dönüştürecek biçimde farklılık gösterdiği öncü, prekürsör hücreleri (blastlar) oluşturmaktadırlar. Pluripotent kök hücreler bir taraftan lenfoid multipotent bir taraftan da miyeloid multipotent hücrelere farklılaşmaktadırlar. Lenfoid kök hücrelerinin farklılaşmasıyla B ve T lenfositlerini yapmak üzere yönlendirilmiş unipotent lenfoid kök hücreleri oluşur. Myeloid multipotent kök hücreler de farklılaşarak, eritroid, granülositik, monositik ve megakaryositik hücreleri vermek üzere yönlendirilmiş progenitör hücreleri meydana getirmektedirler. Kendi kendini yenileyebilme yetenekleri sınırlı olan progenitör hücrelerde her hücre serisinin morfolojik olarak ayırt edilebilen genç ana hücrelerine (proeritroblast, miyeloblast, megakaryoblast, monoblast, lenfoblast) dönüşmektedirler. Blastik hücreler kendi kendini yenileyebilme yeteneğine sahip değildir ve bu hücrelerin belli aşamalardan geçerek gelişmeleri sonucu olgun kan hücreleri meydana gelmektedir (Aytekin ve Solakoğlu 2006).





**Şekil 2.1.** Pluripotent kök hücrelerin hematopoez süresince farklılaşması (Aytekin ve Solakoğlu 2006)

## 2.2. Kanser

Kanser, hücrelerin normal davranışlarını düzenleyen mekanizmaların bozulması sonucu meydana gelen kompleks ve kalıtsal bir hastalık ailesidir. Normal hücrelerin kanser hücresine dönüşümü, kompleks ve çok aşamalı bir olaydır ve karsinogenez olarak adlandırılmaktadır. Kanserler; başlangıç yaşlarına, büyüme oranlarına, yayılmalarına, evrelerine ve tedaviye verdikleri tepkilere göre çeşitlilik göstermektedirler. Buna rağmen tüm kanserlerin karakteristik temel özellikleri bulunmaktadır. Bunlar;

1. Anormal hücre büyümesi ve bölünmesi (hücre çoğalması)

2. Hücreleri vücudun diğer bölümlerine yayılmasını ve metastazını engelleyen normal sınırlamalardaki anormalliklerdir. (Nussbaum ve McInnes 2005)

Bu temel özelliklerin dışında, kanser hücreleri normal hücrelerden farklı olarak bir takım özellikler kazanmışlardır. Bunlar arasında hücre kültürlerinde kontakt inhibisyonundan kaçabilme, bölünebilmek için sinyallere gereksinim göstermeme, çoğalmayı baskılayıcı

sinyallere duyarsızlık, apoptozisten kaçabilme, anjiyogenezi uyarabilme ve metastaz yapabilme sayılabilmektedir (Çefle, 2009).

Kanser hücrelerini tehlikeli yapan, denetlenemeyen hücre çoğalması ve metastatik yayılmanın birleşimidir. Deride görülen basit siğiller gibi benign tümörler ( iyi huylu tümörler) çevredeki dokuya ya da vücudun uzak bölgelerine yayılmadan oluştukları yerde kalırlar. Fakat tümörler hem çevredeki dokuya, hem de kan ya da lenfatik sistem aracılığıyla vücudun diğer bölgelerine yayıldıklarında malignant ( kötü huylu, tehlikeli tümör) olurlar.

Tüm kanser tiplerinde görülen genetik değişimler, translokasyonlar, inversiyonlar, delesyonlar, duplikasyonlar, amplifikasyonlar, nokta mutasyonları ve kromozomların kaybı ya da artışı şeklinde (aneuploidi) olmaktadır. Genomdaki sayı ve yapı anomalilerine ek olarak çeşitli epigenetik mekanizmalarında kanser oluşumu üzerine etkili olduğu gösterilmiştir. Kanser genetik yapısına bakıldığında, kanserde yer alan genler, onkogenler ve tümör süpressör genler olmak üzere iki temel alt gruba ayrılmaktadırlar (Sakızlı ve Atabey 2006) .

### **2.2.1. Onkogenler**

Onkogenler, hücrenin normal çoğalmasını denetleyen sinyal yollarında görev yapan genlerin (protoonkogen) anormal eksprese olan veya mutant şekilleridir. Protoonkogenlerde gerçekleşen değişiklikler sonucunda, onkogenler anormal hücre proliferasyonuna ve tümör gelişimine yol açmaktadırlar. Onkogenler ilk kez fare, kedi ve maymunlarda kansere neden olan onkogenik retrovirüslerin moleküler analizleri sonucu keşfedilmişlerdir (Sakızlı ve Atabey 2006).

İnsan tümörlerinde gözlenen onkogenlerin bir bölümü daha önce retroviruslarda (RNA tümör virüsü) tanımlanmış olan onkogenlerin homoloğu iken, bir bölümü ilk kez insanlarda tanımlanan yeni onkogenlerdir. Gen transfer deneyleri ile ilk tanımlanan insan onkogeni, Harvey sarkom virüsünün insan homoloğu olan rasH onkogenidir. Ras gen ailesi, hücre zarı ile ilişkilendirilen, hücre büyümesini ve bölünmesini düzenleyen sinyal iletim moleküllerini kodlamaktadırlar. Ras gen ailesinin birbiriyle yakından ilişkili üç üyesi (rasH, rasK ve rasN) insan tümörlerinde en sık görülen onkogenlerdir.

Protoonkogenleri aktiveştiren üç mekanizmadan söz edilmektedir.

1-Nokta mutasyonlar: Tümör dokusundaki onkogenlerin DNA dizilerinin diğer somatik dokularla karşılaştırılması sonucunda spesifik nokta mutasyonlarının farklı tümör tiplerine neden olabileceği görülmüştür.

2-Amplifikasyon: Tümör hücrelerinde, normal hücelere kıyasla bin kattan daha fazla görülen onkogen amplifikasyonu birçok tümörün giderek daha hızlı büyümesine ve daha malign nitelikler kazanmasına neden olmaktadır. Onkogen amplifikasyonunun en tipik örneklerinden biri, nöroblastomlarda (embriyonik sinir hücrelerinden gelişen bir çocukluk çağı tümörü) c-myc geninin benzeri olan N-myc genidir. Bu mekanizmanın görüldüğü diğer protoonkogenler çizelge 2.1.'de gösterilmektedir.

**Çizelge 2.1.** Bazı insan tümörleri ile ilgili onkogenler (Sakızlı ve Atabey 2006)

Onkogen	Kanser Türü	Aktivasyon Şekli
c-myc	Meme ve akciğer karsinomu	Amplifikasyon
L-myc	Akciğer karsinomu	Amplifikasyon
N-myc	Nöroblastom, Akciğer karsinomu	Amplifikasyon
gli	Glioblastom	Amplifikasyon
K-ras	Barsak, akciğer, pankreas, tiroid karsinomu, akut myeloid lösemi	Nokta mutasyonu
H-ras	Mesane	Nokta mutasyonu
N-ras	Akut myeloid ve lenfositik lösemiler, tiroid karsinomu	Nokta mutasyonu
abl	Kronik myeloid ve akut lenfositik lösemi	Translokasyon
bcl-2	Foliküler B hücreli lenfoma	Translokasyon
Cyklin D1	Paratiroid adenomu	Translokasyon
c-myc	Burkitt lenfoması	Translokasyon
Hox-11	Akut T hücreli lösemi	Translokasyon
PDGFR	Kronik myelomonositik lösemi	Translokasyon

3-Kromozomal yeniden düzenlemeler: Birçok kanser türünde kromozom yapısında translokasyon, duplikasyon ve delesyon gibi anormallikler gözlenebilmektedir. Kromozom translokasyonu sonucu onkogen aktivasyonuna ilişkin tanımlanmış ilk örnek c-myc geninin, antikor üreten B lenfositlerin tümörü olan Burkitt lenfomasında ki rolüdür. Bu tümör immünglobulinleri kodlayan genlerin translokasyonu ile tanımlanmaktadır. 8q24 kromozomal lokalizasyondaki MYC proto-onkogeni, 14q32 lokusundaki ağır zincir immunoglobulinin distaline transloke olmaktadır t(8;14). Bu translokasyon, normalde immunoglobulinlerle birlikte ilişkisi olan enhancerları veya sekansı aktive eden transkripsiyonel elementleri MYC geninin yanına taşımaktadır.

Bazı protoonkogenlerin translokasyonu da, genlerin protein kodlayan bölgesinde değişikliklere neden olarak, anormal gen ürünlerinin ortaya çıkmasıyla sonuçlanmaktadır. Bu tür translokasyonların en tipik örneği kronik myeloid lösemi olgularında gözlenen, 9. kromozomun uzun kolunda (9q34) yer alan bir tirozin kinaz olan ABL proto-onkogeni ile,

22. kromozomun uzun kolunda (22q11) yer alan BCR geni arasındaki translokasyondur. Sonuçta ortaya çıkan Bcr/Abl füzyon proteininde normal Abl proteininin amino ucu yerine Bcr amino ucuna ait diziler bulunmaktadır. Proteine Bcr dizilerinin eklenmesi, bir tirozin kinaz olan Abl'nin kontrolsüz aktivitesine neden olarak, hücre transformasyonuna yol açmaktadır.

### 2.2.2. Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler hücre çoğalmasının negatif yönde kontrolünü yapan genlerdir. Hücre farklılaşması, proliferasyonu ve diğer temel hücre fonksiyonlarında düzenleyici rol oynamaktadırlar. Normal koşullar altında hücrelerin gereğinden fazla çoğalmasını önleyen tümör baskılayıcı genler herhangi bir şekilde inaktifleşirlerse hücre çoğalması normal sınırlar altında tutulamaz ve bu şekilde kanser ortaya çıkar.

İnsan kanserleri içinde en sık ve tüm kanserlerin %50'sinden fazlasında mutasyona uğradığı gözlenen tümör baskılayıcı gen p53'dür. Bu gen 50'den fazla farklı genin transkripsiyonunu uyararak ya da baskılayan bir transkripsiyon faktörü gibi rol oynayan bir çekirdek proteinini kodlamaktadır. p53 hücre döngüsünün düzenlenmesinin yanı sıra, DNA hasarı sonucunda ortaya çıkan apoptoz için de gereklidir.

İlk tümör baskılayıcı gen (RB1 geni), ender görülen bir çocukluk çağı tümörü olan retinoblastomun incelenmesiyle tanımlanmıştır. Bilinen tümör baskılayıcı genlerin bazıları da çizelge 2.2.'de gösterilmiştir (Nussbaum ve McInnes 2005).

**Çizelge 2.2.** Bazı bilinen tümör süpressör genler (Nussbaum ve McInnes 2005)

Tümör Baskılayıcı Genler	Kromozom	Gen Ürünü ve Olası Fonksiyonu	Hastalıklar	
			Hereditör	Sporadik
RB1	13q	P110 Hücre siklus regülasyonu	Retinoblastoma	Retinoblastoma; küçük hücreli akciğer kanseri
P53	17p	p53 Hücre siklus regülasyonu	Li-Fraumeni	Akciğer ve meme kanseri
NF1	17p	Nörofibromin GTP'azı aktive eden protein	Neurofibromatosis tip 1	Bilinmiyor
NF2	22q	Merlin Hücre yüzey molekülleri ile hücre-iskelet moleküllerinin bağlantısı	Neurofibromatosis tip 2	Sporadik schwannoma ve meningiomalar

### 2.3. Lösemi

Lösemiler kan hücrelerinin sınırsız ve kontrolsüz bir şekilde bölünüp çoğalması sonucu oluşan neoplastik hastalıklar grubudur. Lösemi hücreleri ilk olarak kemik iliği ve lenfoid dokularda çoğalıp, daha sonra periferik kana geçerek diğer dokulara yayılmaktadırlar (Wujcik, 2003).

Hematopoez sürecinde hematopoetik kök hücreler olması gerektiği gibi işlendiğinde periferik kan hücrelerine farklılaşmaktadırlar. Lösemilerde ise, kemik iliği hücrelerinin gelişim aşamalarında, bu hücrelerin çoğalma hızlarının bir nesilde arttığı gözlenir. Bu neoplastik klon kemik iliğinde çoğalır ve diğer kemik iliği hücrelerinin yerini almaya başlar (Rosmarin ve ark., 2005).

Lösemiler; kemik iliğinden köken aldığı hücrenin çeşidine göre myeloid veya lenfoid, etkilenen hücrelerin farklılaşma derecesine göre akut veya kronik olarak sınıflandırılmaktadırlar. Lösemiler genel olarak AML, ALL, KML, KLL ve MDS olarak gruplandırılmaktadırlar (Ruddon, 2007).

#### 2.3.1. Lösemnin Tarihçesi

Lösemi ile ilgili ilk vaka bildirimini 1827 yılında Velpeau tarafından yapılmıştır. Velpeau tarafından tespit edilen hasta; ateş, güçsüzlük, karın şişliği ve idrar yolları taşlarından kaynaklanan ağrılar gibi rahatsızlıklardan dolayı hastaneye başvurmuş, başvurudan kısa bir süre sonrada kaybedilmiştir. Otopside hastanın çok büyük dalak ve karaciğerin yanı sıra, kanının kırmızı şarap renginde, kıvamının ise artmış adeta lapa gibi olduğu bildirilmiştir.

Virchow ve Benett'in 1845 yılındaki raporlarına kadar lösemi çok iyi tanımlanmamıştır. Bu tarihlerde Virchow ve Benett olgularının ayrı otopsilerinde, kanın beyaz rengine dikkat çekmişler ve hastalığı tanımlamışlardır. Bu yüksek lökosit sayısından ötürü beyaz kan terimi (weisses blut) kullanılmış, daha sonra ise Yunanca kökenli beyaz anlamına gelen "leukos" ve kan anlamına gelen "haima" sözcüklerinden "leukemia" (lösemi) terimi türetilerek kullanılmaya başlanmıştır (Williams ve ark., 1991).

Çok fazla çoğalan fakat farklılaşmayan lökositler, kemik iliği başta olmak üzere karaciğer, lenf bezleri, dalak, testis, deri ve merkezi sinir sistemi gibi organ ve sistemleri işgal edebilirler. Gereğinden fazla hücre üretilmesine rağmen, bu hücreler tam olarak farklılaşmadıklarından işlev gören hücre sayısı azaldığından anemi, trombositopeni ve nötropeni oluşmaktadır. Tam olarak farklılaşmamış ve normal fonksiyonlarını yerine getirme yeteneğinden yoksun hücreler 'blast' olarak adlandırılmaktadır. Blastların normal

hücrelere oranı ve yapıları lösemilerin kendi içinde ki alt sınıflamalarında ve fazlara ayırımında rol almaktadır (Piller, 2001).

### **2.3.2. Lösemnin Patogenezi ve Etiyolojisi**

Kan hücreleri kemik iliğinde ki pluripotent kök hücrelerinden gelişmektedirler. Bu hücrelerin farklılaşmasıyla hematopoez süreci tamamlanmaktadır. Lösemi, pluripotent kök hücrelerinin farklılaşp spesifik kan hücrelerini oluşturduğu herhangi bir aşamada gözlenebilmektedir. Hücrelerin lösemik dönüşümü temelde bir mutasyon sonucu meydana gelmektedir. Mutasyona uğrayan hücrelerin çoğu organizma tarafından ortadan kaldırılabilmekte fakat az sayıda hücre aşırı çoğalma özelliği kazanabilmektedir (Williams ve ark., 1991).

Lösemilerin ortaya çıkış nedeni tam olarak bilinmemekle beraber oluşum sebeplerinden de yalnızca tek bir faktör sorumlu değildir. Lösemi oluşumunun meydana gelmesinde rol alan çevresel etkenler arasına kimyasal ajanlar ile virüsler, karsinojenik etkilerinden dolayı girebilmektedirler. Karsinojenlerin dozuna, etki süresine ve kişilerin duyarlılığına bağlı olarak kanser oluşturma riskleri değişmektedir. (Vogel ve Fisher, 1993) Özellikle radyasyon kromozom değişikliklerine neden olduğundan lösemi insidansını arttırmaktadır. Yıllar içerisinde bunların artışıyla lösemi insidansı da artmaktadır. Örnek olarak atom bombasının etkisine direk olarak maruz kalanlarda çok kısa bir süre içerisinde lösemi görülmüş ve görülme oranı sıklığı da gittikçe artmıştır. Kimyasal karsinojenler arasında bulunan benzenin hematopoetik, lenfoid ve akciğer kanserlerine sebep olduğu bildirilmiştir (Moloney 1987).

Lösemi oluşumunda kalıtsal etkenlerde rol almaktadır. Buna herediter lösemi olgularına tahmin edilenden daha sık rastlanması bir delil olarak gösterilebilir. Down sendromlu olgularda da lösemi insidansı, sağlıklı kişilere göre 16-30 kat daha fazla olarak görülmüştür. (Brothman et al. 2003, Ross et al, 2005) Ayrıca Klinifelter ve Turner sendromlu olgularda da fazla ya da eksik kromozomların neden olduğu hormonal ve genetik etkilerden dolayı farklı tiplerde ki kanserlere yakalanma oranının sağlıklı bireylere göre çok fazla olduğu yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir (Gravholta ve ark., 1998, Halse ve ark., 1995).

### **2.3.3. Lösemilerin Sınıflandırılması**

Lösemiler, semptomlarına, köken aldıkları hücre grubuna, klinik seyirlerine, ortaya çıkış ve ilerleme hızlarına göre gruplandırılmaktadırlar. Ortaya çıkış hızlarına göre kronik

veya akut lösemi olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar. Akut lösemiler; kısa süreli semptomları, kemik iliği veya periferik kanda bol miktarda bulunan olgunlaşmamış hücre formlarıyla ve yükselmiş toplam lökosit miktarıyla karakterize edilmektedirler. Kronik lösemiler; uzun süreli semptomları, kısmen ya da tamamen olgun hücrelerin neoplastik proliferasyonu ile karakterize edilmektedirler. Her 2 grupta köken aldıkları hücre grubuna göre; Akut yada Kronik Myeloid Lösemi (AML, KML) ve Akut yada Kronik Lenfositik Lösemi (ALL, KLL) olmak üzere 4 gruba ayrılmaktadır (Pekçelen,2003).

## **2.4. Kronik Myeloid Lösemi (KML)**

### **2.4.1. Tanım ve Tarihçe**

Kronik Myeloid Lösemi (KML) aynı zamanda kronik myelositik lösemi, kronik myelojenik lösemi, kronik granülositik lösemi olarak da adlandırılmaktadır. Myeloproliferatif hastalıklar arasında yer alan kronik myeloid lösemi değişime uğramış primitif pluripotent hücrelerden kaynaklı klonal bir hastalıktır (Pekçelen,2003).

Myeloid, monositik, eritroid, B lenfoid ve nadiren de T lenfoid serilerini içermektedir. Hastalık kendini kemik iliğinde myeloid hücre serisinin sayıca artışıyla, çevre kanında olgun myeloid hücrelerden oluşan yüksek lökosit sayısı ve splenomegali (dalak büyümesi) ile göstermektedir (Faderl et al, 1999). Akut lösemide bulunan patolojik tablonun aksine, lösemi hücreleri farklılaşma yeteneklerini kaybetmemişlerdir (Goldman et al, 2003).

KML spesifik kromozom anomaliliğinin (Philadelphia (Ph) kromozomu) saptandığı ilk hastalıktır. Aynı zamanda biyolojik ajan (interferon) tedavisiyle lösemik klonun baskılandığı ve sağ kalımın uzatıldığı ilk neoplastik hastalıktır. Moleküler düzeyde de en iyi karakterize edilmiş lösemi tipidir (Faderl et al, 1999).

İlk kez 19. yüzyılda tanımlanan KML üzerinde yüzyılı aşkın bir süreden bu yana klinik ve morfolojik özellikleri yönünden araştırmalar yapılmaktadır. KML ilk kez 1845 yılında splenomegali ve lökositozu olan ve splenomegali nedenini açıklayacak başka bir etiyojinin tespit edilemediği 2 hastada tanımlanmıştır. KML patogeneziyle ilgili ilk önemli ipucu 1960 yılında Nowell ve Hungerford tarafından Philadelphia (Ph veya Ph1) kromozomunun saptanmasıyla elde edilmiştir. 1973 yılında Rowley, Philadelphia kromozomunun 9. ve 22. kromozomlar arasındaki resiprokal translokasyon sonucu meydana geldiğini gözlemlemiştir. 1980'li yıllarda da bir dizi araştırmacı BCR-ABL füzyon geninin oluşum mekanizmasını göstermişlerdir (Goldman et al, 2003).

### 2.4.2. Sınıflandırma

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2008 yılında yapmış olduğu sınıflandırmaya göre KML, Myeloproliferatif neoplaziler (MPN) içerisinde sınıflandırılmıştır. KML, klasik morfolojisi, klinik özellikleri, Ph kromozomu veya BCR/ABL füzyon geninin varlığıyla nitelendirilmiştir. Hastaların küçük bir bölümünde, atipik KML (aKML), kronik myelomonositik lösemi (KMML) veya kronik nötrofilik lösemi (KNL) olarak adlandırılan hastalık formları da gözlenebilmektedir. Çocuklarda ise juvenil myelomonositik lösemi (JMML) olarak bilinen hastalık izlenebilmektedir. Fakat bu KML varyantlarının hiçbirinde Ph kromozomuna rastlanmamaktadır (Vardiman et al, 2009).

**Çizelge 2.3.** Myeloid neoplazilerde 2008 WHO sınıflandırılması (Vardiman et al, 2009)

1. Akut myeloid lösemi (AML)
2. Myelodisplastik sendromlar (MDS)
3. Myeloproliferatif neoplaziler (MPN)
  - 3.1. Kronik myeloid lösemi
  - 3.2. Polisitemia vera
  - 3.3. Esansiyel trombositemi
  - 3.4. Primer myelofibrozis
  - 3.5. Kronik nötrofilik lösemi
  - 3.6. Kronik eozinofilik lösemi, başka yerde sınıflanmamış
  - 3.7. Hipereozinofilik sendrom
  - 3.8. Mast hücreli lösemi
  - 3.9. MPH, sınıflandırılmamış
4. MDS/MPN
  - 4.1. Kronik myelomonositik lösemi
  - 4.2. Juvenil myelomonositik lösemi
  - 4.3. Atipik kronik myeloid lösemi
  - 4.4. MDS/MPH, sınıflandırılmamış
5. Eozinofili ve PDGFRA, PDGFRB, veya FGFR1 anormalliği ile ilişkili myeloid maligniteler
  - 5.1. PDGFRA anormalliği ile ilişkili myeloid maligniteler
  - 5.2. PDGFRB anormalliği ile ilişkili myeloid maligniteler
  - 5.3. FGFR1 anormalliği ile ilişkili myeloid maligniteler

### 2.4.3. Epidemiyoloji ve Etiyolojisi

KML, tüm lösemi olgularının yaklaşık % 14 kadarını, erişkin lösemi olgularının ise yaklaşık % 20'sini oluşturmaktadır (Cardama and Cortes, 2006). İnsidansı 100.000'de 0,6 ile 2 arasında değişmektedir ve yaşla birlikte artış gözlenmektedir (Rohrbacher and Hasford, 2009). Türkiye sıklığı ise bilinmemektedir (İlhan,O.). KML erkeklerde kadınlara göre daha sık gözlenmektedir. Erkek kadın oranı 1.3-1.8/1 arasında değişmektedir (Rohrbacher and Hasford, 2009). Hastalık her yaşta görülebilse de 20 yaş altında nadir



olarak gözlenmektedir. Hastaların % 12-30 kadarı 60 yaşın üzerindedir. Hastalık saptandığında ortanca yaş ise 45-55 arasında değişmektedir (Faderl et al, 1999).

KML vakalarının çoğunda; kalıtsal, ailesel, coğrafik, etnik veya ekonomik bir neden, hastalık ile ilişkili olarak saptanmamıştır ve hastalık etiyojisi belli değildir. Vakaların çoğu sporadik olup, etiyojide suçlanan tek bir ajan bulunmamaktadır. KML' ye yakalanma riskinin iyonize radyasyon maruziyetinden sonra artabileceği bildirilmiştir. 1945 yılında Japonya'daki atom bombası patlamasından sonra radyasyona maruz kalanlarda ve ankilozan spondilit nedeniyle radyoterapi alanlarda artmış KML insidansı saptanmıştır (Cardama and Cortes, 2006, Pekçelen, 2003).

#### **2.4.4. Sitokinetiği**

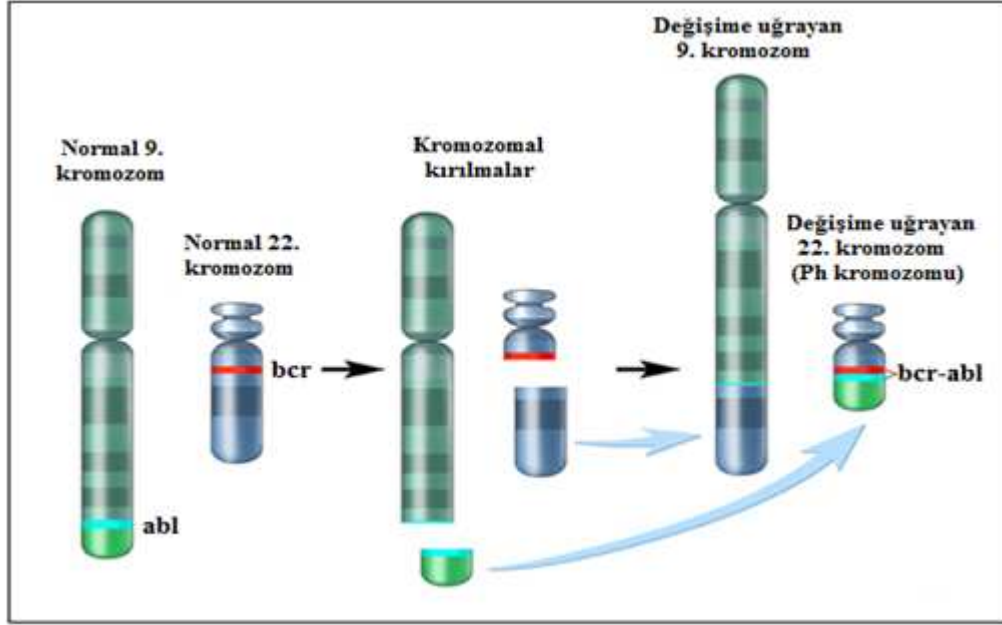
KML gelişiminin genellikle tek bir pluripotent hematopoetik kök hücresinin BCR-ABL füzyon genini taşıyan Ph kromozomunu edinmesi sayesinde olduğuna inanılmaktadır. Lösemi öncü hücrelerine Ph kromozomu çoğalma önceliği kazandırmakta ve böylece aşama aşama normal iliğin yerini lösemik myeloid bir kitle almaktadır. Bu hipotez için, elde edilen moleküler anomalinin hastaların hemen hepsinde aynı şekilde bulunması kanıt olarak verilebilmektedir. Ama bu oluşum mekanizmasının hangi moleküler ve sitogenetik değişiklikler sonucu meydana geldiği ise bilinmemektedir (Goldman and Melo, 2003). Benzer biçimde, kök hücre tarafından elde edilen proliferatif avantajın moleküler temelleri iyi bir şekilde tanımlanmamış olmakla birlikte lösemik progenitör hücrelerin, interlökin-3 (IL - 3) ve granülosit koloni-tetikleyici faktör (G - CSF) başta olmak üzere bu gibi büyüme faktörleri ile sürekli uyarılması ile ilgili olabileceği ileri sürülmüştür (Jiang et all, 1999).

#### **2.4.5. Sitogenetiği**

1960 yılında Philadelphia'da, Peter Nowell ve David Hungerford, KML hastalarında akrosentrik kromozomda, delesyonla oluştuğu düşünülen kalıcı bir kromozomal anomali tanımladılar. Keşfedildiği şehrin onuruna, bu kromozomu Philadelphia (Ph) kromozomu olarak adlandırdılar. Kromozomal bantlama tekniklerinin gelişimiyle beraber 1973 yılında Janet Rowley, Ph kromozomu olarak adlandırılan kısalmış kromozom 22'nin; 9. ve 22. kromozomların uzun kolları arasında ki t(9;22)(q34;q11) resiprokal translokasyon ürünü sonucu oluştuğunu belirlemiştir. Bu durum spesifik bir maligniteyle bağlantılı ilk kromozomal anomaliliğine örnek oluşturmuştur (Druker, 2008).

Ph kromozomu, 9. kromozomun q34.1 bandında ki 3' ABL gen segmentinin, 22. kromozomun q11.2 bandında ki 5' BCR gen segmentine eklenmesiyle meydana gelen dengeli translokasyon sonucu oluşmaktadır (Chase et al, 2001) (Şekil 2.2.). Ph kromozomu

KML'nin en belirleyici özelliğidir ve olguların % 95'inde gözlenmektedir. Aynı zamanda erişkin akut lenfoblastik lösemilerin (ALL) % 15-30'unda ve çocukluk çağı ALL'lerin % 5'inde, yeni tanı almış akut myeloblastik lösemilerin ise % 2'sinde saptanmaktadır (Cardama and Cortes, 2006) .



**Şekil 2.2.** Normal 9. ve 22. kromozom ve t(9;22) translokasyonu  
(<http://pubweb.fccc.edu/philadelphiachromosome/history.html>)

KML hastalarının % 5-10 kadarında varyant Ph kromozomu gözlenmektedir. Varyant Ph kromozomu 9. ya da 22. kromozom ile başka kromozomlar arasında meydana gelen translokasyonlar sonucu oluşmaktadır (Huret, 1990). Varyant Ph translokasyonu 9q34 ve 22q11 ile beraber diğer birkaç genomik bölgeyi de içine almaktadır. Bu genomik bölgelerden en sık olanları: 1p36, 2q11, 3p21, 6p21, 9q22, 11q13, 12p13, 17p13, 17q25, 19p13, 21q22, 22q13'tür. Varyant olguların tümünde BCR-ABL füzyon geni moleküler seviyede tanımlanmıştır. Bu translokasyonu içeren olguların fenotipik ve prognostik özellikleri standart Ph translokasyonu olanlardan farklı değildir (Johansson et al, 2002).

Olguların yaklaşık % 9-16'sında klinik tablo KML ile uyumlu iken sitogenetik olarak Ph kromozomu gözlenmemektedir. Bu olguların yaklaşık % 30-50'sinde Ph kromozomuna rastlanılmamasına rağmen moleküler düzeyde KML için karakteristik olan BCR/ABL füzyon geni tespit edilebilmektedir. Bu durum Ph negatif, BCR/ABL pozitif KML olarak adlandırılmaktadır. BCR-ABL pozitif olgularda Ph kromozomuna sahip olanlar ile olmayanlar arasında prognoz ile ilgili bir fark olmadığına inanılmaktadır (Chase et al, 2001).

#### 2.4.6. Moleküler Biyolojisi

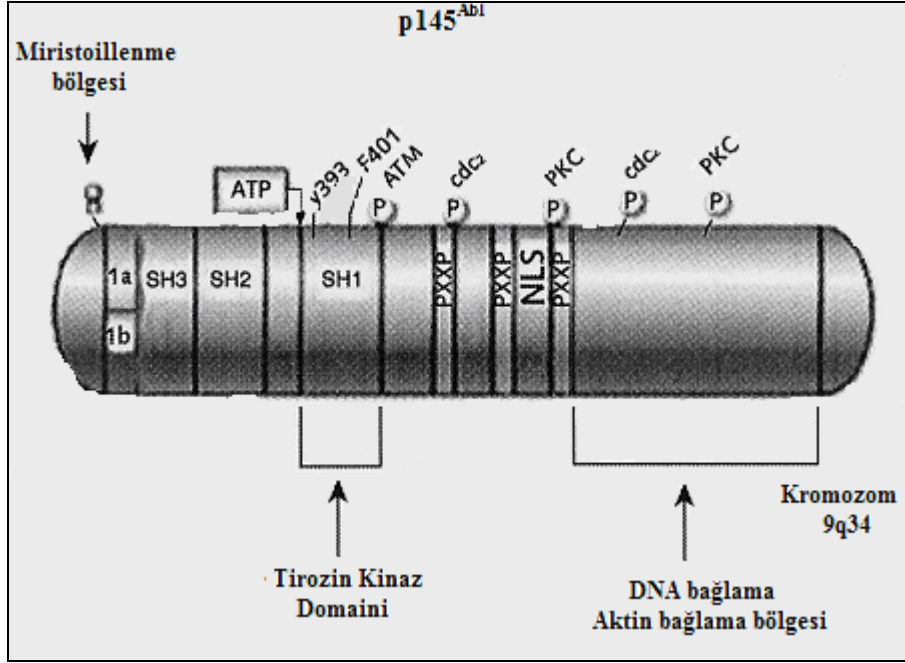
KML'de, t(9;22)(q34;q11) dengeli resiprokal translokasyonunun moleküler sonucu, kimerik BCR-ABL proteinini kodlayan BCR-ABL onkogeninin oluşumudur. Bu gen; apoptotik uyarılara direnç gösterebilen, hücre proliferasyonunu hızlandırabilen ve hücre adezyonunda değişikliklere neden olan yapısal bir kinaz aktivitesi sağlamaktadır (Cardama and Cortes, 2008). Kinazlar yoluyla proteinlerin fosfarilasyonu, sinyal iletim mekanizmasında önemli rol oynamaktadır. Tirozin kinazlar, intraselüler sinyal-ileti yollarını düzenlediklerinden, hücre proliferasyonu ve diferansiasyonu üzerinde önemli role sahiptirler (Chase et all, 2006).

##### 2.4.6.1. ABL Geni

ABL geni Abelson Murine Lösemi virüsünün (A-MuLV) taşıdığı, viral ABL (v-abl) onkogeninin insandaki homoloğu olup non-reseptör tirozin kinaz kodlamaktadır. ABL geni 9. kromozomun uzun kolu üzerinde (9q34.1) bulunmakta olup 11 ekzondan oluşmaktadır. İlk ekzon alternatif olarak iki bölgeye bölünebilmektedir (Ia ve Ib) ve bu bölgelerin transkripsiyonu sonucu sırasıyla 6 kb ve 7 kb boyutlarında iki farklı mesajcı RNA (mRNA) oluşmaktadır. Ph translokasyonunda Abl geninin kırılma noktası genellikle 200 kb uzunluğunda olan ekzon Ib ile ekzon 2 arasında meydana gelmektedir. İkinci kırılma noktası ise ekzon Ia ile ekzon 2 arasındaki 19 kb uzunluğundaki bölgede meydana gelmektedir (Michael ve ark., 2000).

Sürekli olarak eksprese edilen Abl proteini 145 kd boyutunda olup 2 izoformu (Ia ve Ib) ilk ekzonda oluşan alternatif splicing ile meydana gelmektedir. Abl proteini hem sitoplazmada hem de nükleus içerisinde bulunarak iki kompartman arasında geçişe izin vermektedir (Kurzrock ve ark., 2003).

Protein içerisinde birçok yapısal domain tanımlanmıştır. 3 SRC homoloji domaini (SH1-SH3) proteinin NH<sub>2</sub> ucuna doğru konumlanmıştır. SH1 domaini, tirozin kinaz fonksiyonuna sahip iken SH2 ve SH3 domainleri diğer proteinlerle olan etkileşimi sağlamaktadır (Şekil 2.3). Molekülün merkezinde ki proline zengin sekanslar diğer proteinlerin SH3 domainleri ile etkileşime girmektedir (Michael ve ark., 2000).



**Şekil 2.3.** Normal ABL proteinindeki fonksiyonel bölgeler (Kurzrock ve ark., 2003).

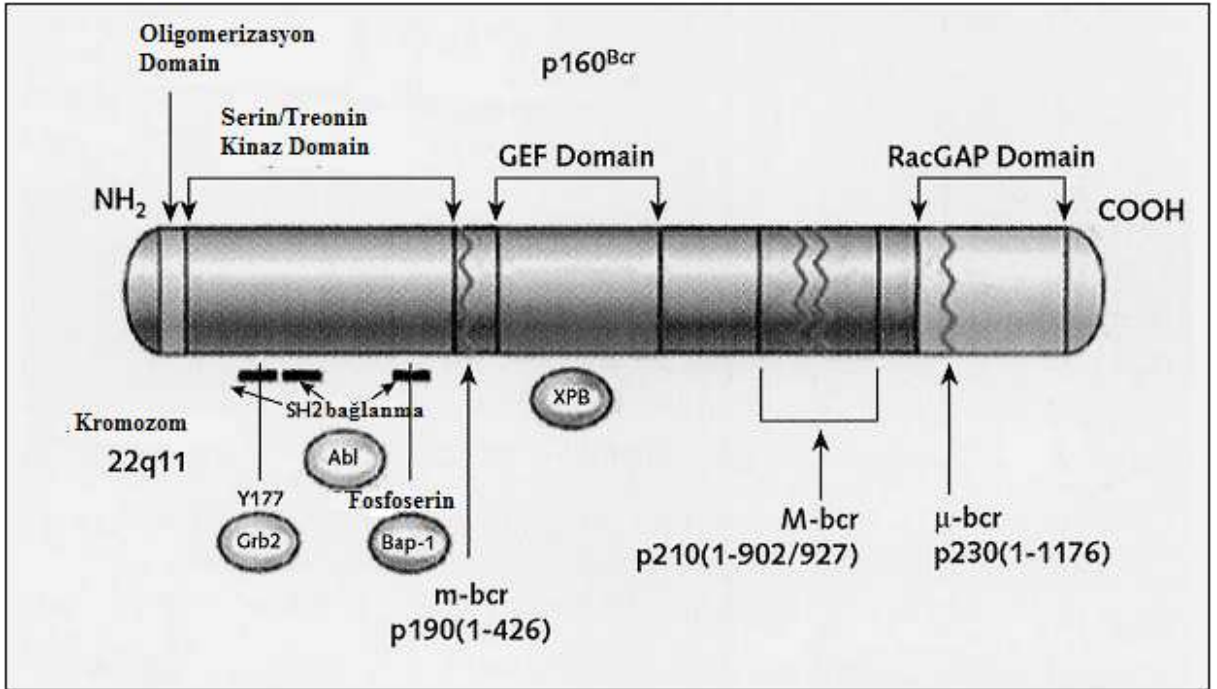
Tirozin kinazlar, tirozin amino asidine fosfat grubu ekleyen enzimlerdir. Katalitik domainleriyle adenosin trifosfatın (ATP) son fosfatını tirozin amino asidinin ucuna transferini katalizlemektedirler. Normal ABL'nin fosforilasyonu sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. ABL proteininin amino ucunda "cap" denen bir yapı bulunmaktadır. Bu yapı ABL proteininin SH3 ve katalitik bölgelerine bağlanarak, proteinin kinaz aktivitesini inhibe etmektedir. BCR-ABL oluşumundaki gibi meydana gelen bu bölgenin kaybı yüksek kinaz enzimatik aktivitesiyle sonuçlanmakta ve bu da ABL proteininin onkogenik potansiyele dönüşümünde anahtar rol almaktadır (Kurzrock ve ark., 2003).

ABL; hücre regülasyonu, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, adhezyon ve hücre ölümü gibi çeşitli hücresel işlevlerden sorumludur. Hücre büyümesini hem hızlandırmakta, hem de inhibe etmektedir. ABL, pasif hücrelerde Retinoblastoma proteinine (RB) bağlanarak inaktif tutulmaktadır. Hücre döngüsünün S fazında bu proteinin fosforillenerek ABL'den ayrılmasıyla ABL aktif hale gelmektedir. Aktivasyon sonrasında ABL diğer genleri aktifleştirmektedir. Bununla beraber bazı çalışmalarda ABL'nin overekspresyonunun hücre siklusunun G1 fazında duraklamasına neden olduğunu göstermiştir (Van Etten, 1999).

#### 2.4.6.2. BCR Geni

BCR geni 22. kromozomun uzun kolu (22q11) üzerinde bulunmakta olup 23 ekzondan oluşmaktadır. BCR geninde 4.5 kb ve 7 kb' lik iki farklı transkript sırasıyla 130 kD ve 160

kD büyüklüğündeki 2 majör proteini kodlamaktadır. BCR geninde 3 farklı kırık noktası tespit edilmiştir. KML hastalarında 22. kromozomdaki genomik kırılma noktalarının 5.8 kb'lık bir bölgede kümeleşmiş olarak bulunduğu gösterildi ve bölgeye 'breakpoint cluster region' (BCR), kırılma noktalarının küme bölgesi adı verildi. Sonraki çalışmalarda, bu bölgenin BCR geni olarak bilinen genin orta kısmını oluşturduğu anlaşıldı ve bu bölgenin adı 'majör breakpoint cluster region (M-bcr) olarak değiştirildi. M-bcr kırılma noktası, KML olgularının çok büyük bir kısmında gözlenmekte olup bu kırılma noktası 12. ve 16. ekzonlar arasında meydana gelmektedir. Orijinal olarak bu bölge ekzon b1- b5 olarak adlandırılmaktadır. Diğer kırılma noktası Ph (+) ALL hastaların % 70-80'inde ve nadiren KML olgularında gözlenmekte olup ekzon e1 ve ekzon e2 arasında uzanan intron bölgesine sahip minör breakpoint cluster region (m-bcr) bölgesinde meydana gelmektedir. BCR geninde ki üçüncü kırılma noktası m-bcr bölgesinin 3' ucunda yer alan ekzonlar olan e19 ve e20 arasında meydana gelmekte ve bu bölge  $\mu$ -bcr olarak adlandırılmaktadır (Pane ve ark., 2002) (Şekil 2.4).



**Şekil 2.4.**Normal BCR proteini ve proteinin fonksiyonel bölgeleri (Kurzrock ve ark., 2003)

BCR geni sürekli olarak eksprese edilmektedir. Fare ve insan dokularında mRNA seviyesinin beyin ve hematopöietik hücrelerde yüksek olduğu bulunmuştur. BCR geni birçok farklı fonksiyonel domain içerdiğinden kompleks bir moleküldür. BCR geninin ilk ekzonu büyük bir önem taşımaktadır, çünkü bilinen tüm Bcr-Abl füzyon proteinlerini içermektedir. BCR proteini BCR geninin ilk ekzonu tarafından kodlanan serin/treonin kinaz aktivitesine sahiptir. Ayrıca birkaç Src homoloji-2 (SH2) bağlanma bölgesi domaini

ve oligomerizasyon domainleride BCR geninin ilk ekzonunda bulunmaktadır. SH2 domainleri oldukça korunmuşlardır, fosforillenmiş tirozin içeren 3-5 amino asitten oluşan SH2 bağlanma bölgesini 100 amino asitlik katalize olmayan bölge bağlamaktadır. Bu etkileşim sinyal iletimi komplekslerinin bileşiminde önemlidir. Oligomerizasyon domaini içerisinde ki mutasyonlar Bcr-Abl'nin tirozin kinaz enzimatik aktivitesini azaltmaktadır. Ayrıca Bcr ve Bcr-Abl arasındaki etkileşimi ortadan kaldırmaktadır. BCR'nin merkezi ve karboksi terminal (COOH-terminal) bölgeleri çeşitli seviyelerde G proteinleri ile etkileşim halindedir. Bu proteinler intraselüler sinyal iletimi, hücrel iskeletin düzenlenmesi ve hücrenin normal büyüme ve gelişiminde esas rol almaktadırlar. En iyi çalışılmış G proteinlerinden biri p21 onkogenidir. p21<sup>RAS</sup> COOH-terminal bölgesi Ras için GTP'az aktivitesine sahiptir ve Ras guanozin trifosfat-aktivatör protein (Ras-GAP) domaini olarak geçmektedir. BCR birkaç tirozin rezidüsü üzerinden özellikle tirozin 177 (Y177) üzerinden fosforlanabilmektedir. Y177, Ras yolağının aktivasyonuna karışan önemli adaptör molekül olan Growth factor receptor-bound protein 2 (Grb- 2)'ye bağlanmaktadır (Laurent ve ark., 2001).

#### **2.4.6.3. BCR/ABL Füzyon Geni ve Füzyon Proteini**

9q34.1 bölgesine lokalize olan ABL geni üzerindeki kırılma noktası, 300 kb'lik bölgenin 5' segmentinin herhangi bir yerinde meydana gelebilmektedir. Kırılma için ilk alternatif ekzon Ib'den yukarı doğru, ekzon Ib-Ia arası veya ekzon Ia'dan aşağı doğru olabilmektedir.

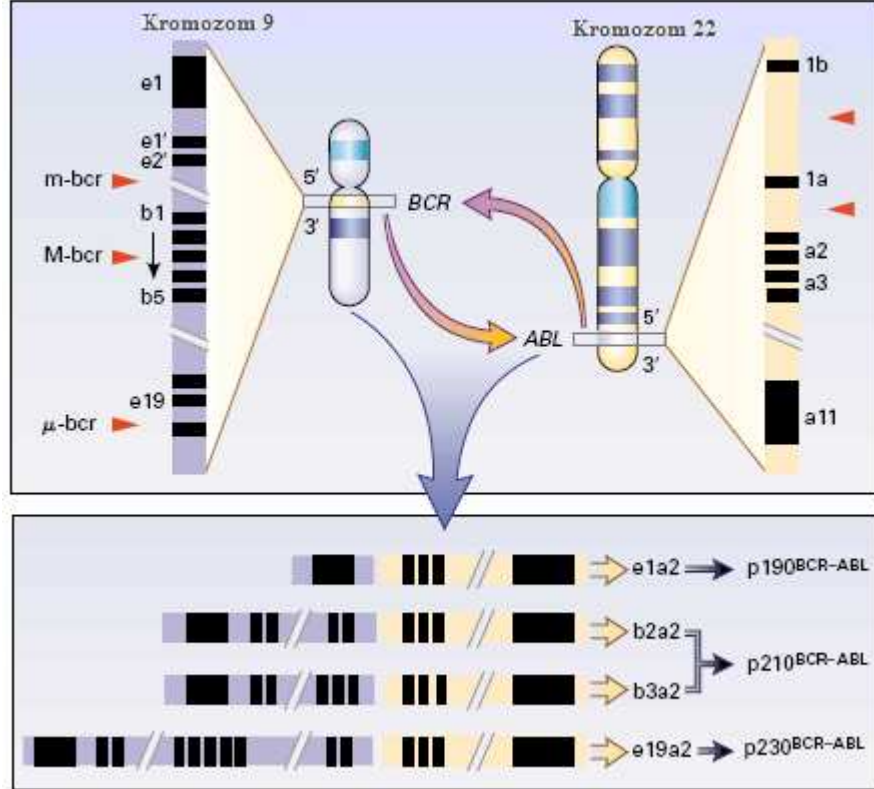
Birçok KML hastasında ve ALL hastalarının 1/3'lük kısmında BCR genindeki kırılma noktası 5,8 kb büyüklüğündeki bölge içinde M-bcr olarak bilinen alanda meydana gelmektedir. Bu bölge gende ki gerçek pozisyonlarına göre ekzon 12'den ekzon16'ya (b1-b5) kadar uzanan 5 ekzondan meydana gelmektedir. BCR-ABL işlemi bcr ekzonlarının abl ekzon a2'ye katılmasıyla oluşmaktadır (Melo, 1996).

M-bcr'de kırılmanın hangi ekzonlar arasında meydana geldiğine bağlı olarak BCR-ABL transkriptinin iki formu tanımlanmıştır. Kırılma b2 ve b3 ekzonları arasında meydana geliyorsa b2a2 mRNA'sı, kırılma b3 ve b5 ekzonları arasında meydana geliyorsa b3a2 mRNA'sı elde edilmektedir. Her iki durumda da meydana gelen füzyon mRNA 8,5 kb uzunluğundadır ve 210 kD ağırlığında p210<sup>Bcr-Abl</sup> olarak adlandırılan füzyon proteinini kodlamaktadır (Laurent ve ark., 2001, Melo, 1996).

ALL hastalarının geri kalan 2/3'lük kısmında, nadiren KML ve AML hastalarında BCR genindeki kırılma noktası 54,4 kb'lık alanda m-bcr olarak adlandırılan bölgede meydana gelmektedir. BCR-ABL geni BCR geninin ilk ekzonunun (e1) ABL geninin

ikinci ekzonu (a2) ile birleşmesinden meydana gelmektedir. Bu genin mRNA'sı e1a2 olarak adlandırılır ve 190 kD ağırlığında p190<sup>Bcr-Abl</sup> füzyon proteinini kodlamaktadır (Melo ve ark., 1994).

BCR genindeki üçüncü kırılma noktası genin 3' ucunda ekzon 19 ve ekzon 20 arasında  $\mu$ -bcr olarak adlandırılan alanda meydana gelmektedir. e19a2 birleşimiyle oluşan transkriptin translasyonu ile 230 kD'luk p230<sup>Bcr-Abl</sup> olarak adlandırılan füzyon proteinini meydana gelmektedir (Melo, 1996).



Şekil 2.5. Bcr ve ABL genlerindeki kırılma noktaları (Faderl ve Ark.,1999)

#### 2.4.6.4. BCR/ABL Sinyal İletim Yolları

Malign transformasyonu BCR/ABL füzyon proteinini 4 temel mekanizma ile gerçekleştirmektedir. Bu mekanizmalar; mitotik bölünmeyi sağlayan sinyal ileti yollarının sürekli aktif olması, hücrelerin adhezyon özelliklerini kaybetmesi, apoptozun engellenmesi ve proteozomların ABL gen aktivitesini engelleyen proteinleri parçalamasıdır.

KML öncü hücreleri, kemik iliği stroma hücrelerine ve ekstraselüler matrikse düşük adhezyon göstermektedirler. Stromaya adhezyon, hücre proliferasyonunu negatif yönde düzenler ve KML hücreleri değişen adhezyon özellikleri ile bu düzenden kaçış göstermektedirler (Michael ve ark., 2000).





#### 2.4.7. Klinik Özellikleri

Hastalık başlangıcı genellikle sessizdir. KML hastalarının büyük kısmı kronik fazda başvurdukları için başlangıç semptom ve bulguların görülme sıklıkları çizelge 2.4.'te görüldüğü gibidir. Günümüzde ilerleyen rutin tetkikler ve fizik muayene sırasında splenomegali ile tesadüfen hastaların % 10 ile % 30'una semptomsuz dönemde tanı konabilmektedir (İlhan,O).

Anemi, kilo kaybı, terleme, kadınlarda menstrüasyon bozuklukları, kemik ve eklem ağrıları da başlangıç belirtileri arasındadır. Tanı sırasında hastaların yaklaşık %10'u akselere faz ve diğer %10'u da blastik krizdedir. İlk kromozomal anomalinin saptanmasından semptomlu döneme kadar geçen süre yaklaşık olarak 6 yıldır. Tanıdan sonra toplam sağ kalım 4-5 yıl, başlangıçtan itibaren ise ortanca 10 yıldır (Pekçelen, 2003).

**Çizelge 2.4.** KML'de kronik fazının başlangıç semptom ve bulguları (İlhan,O).

<b>Semptomlar</b>	<b>(%)</b>
Yorgunluk	83
Kilo kaybı	61
Karında şişlik hissi ve iştahsızlık	38
Kolay berelenme veya kanama	35
Ateş	11
<b>Bulgular</b>	
Splenomegali	95
Sternumda hassasiyet	78
Lenfadenopati	64
Hepatomegali	48
Purpura	27
Retinal Kanama	21

Hastaların laboratuvar bulgularına bakıldığında, lökosit sayılarının genellikle  $1.000.000/mm^3$ 'ün üzerinde olduğu gözlenmektedir. Hastalarda anemi erken bir bulgu değildir fakat trombositoz sıklıkla gözlenmektedir. Hastalığın klinik seyri, kesin bir şekilde kronik faz ve blastik faz olmak üzere iki evre göstermektedir. Bazen bu iki evre arasında akselere faz yer almaktadır (Pekçelen, 2003).

##### 2.4.7.1. Kronik Faz

KML'nin kronik fazı genellikle artmış lökosit sayısı ile birlikte kemik iliği proliferasyonu ve matürasyonu ile karakterizedir. Periferik kan bulgularında; lökosit  $20 \times 10^3/mm^3$  ile  $500 \times 10^3/mm^3$  arasında değişmek üzere, genellikle  $130 \times 10^3/mm^3$  ile  $225 \times 10^3/mm^3$  arasındadır. Myeloblast oranı  $< \% 3$  şeklindedir. Trombositoz genellikle gözlenmekte olup bazı olgularda  $>1000 \times 10^3/mm^3$  şeklindedir.

Kemik iliği bulgularında myeloid seri elemanlarının egemenliği gözlenmektedir. Megakaryositler artmış ve normalden hafifçe küçük ve küme yapmış olarak görölmektedirler. Eritroid seri elemanları ise normal veya azalmış olarak bulunmaktadır. Sitogenetik incelemelerde Ph kromozomu tanıyı doğrulamaktadır. Fakat hastaların % 5-10'unda Bcr geninin yeniden düzenlenmesini içeren varyant translokasyonlar saptanmaktadır. Kronik faz genellikle 2-4 sene sonra akselere veya blastik faza geçmektedir. Blastik faza geçiş ani veya yavaş olabilir. Kronik fazın blastik faza ilerlemesi ilk yıl % 5 ve sonraki yıllarda % 20-25 oranındadır. Blastik faza ilerleyen hastaların morfolojik olarak 2/3'ü AML ve 1/3'ü ALL'dir (İlhan,O).

#### **2.4.7.2. Akselere Faz**

Kronik evrede ki hastalık gidişatı değişir. Hastalık eski tedaviye direnç göstermeye başlar, aneminin derinleşmesi, tedaviye dirençli lökositoz, trombositopeni veya trombositoz gözlenmektedir. WHO'ya göre periferik kanda ve kemik iliğinde ki blast oranı %10-19 arasındadır. %20'nin üzerinde bazofili gözlenebilmektedir (Sessions, 2007).

#### **2.4.7.3. Blastik Faz**

Klinik olarak, KML'nin blastik fazı çeşitli semptomlarla karakterize edilmiştir. Bunlar; gece terlemeleri, kilo kaybı, ateş, kemik ağrısı, anemi, enfeksiyon veya kanama riski artışıdır. Lökosit sayısı zorlukla kontrol altına alınabilmekte ya da alınamamaktadır. Anemi ve trombositopeni derinleşmekte, ilerleyici splenomegali gözlenmektedir. Periferik kan veya kemik iliğinde gözlenen blast oranı % 30 veya daha fazladır. Periferik kan veya kemik iliğinde bazofil+eoziyofil % 20'den fazladır. Devamlı trombositoz veya trombositopeni gözlenebilmektedir. KML'de blast hücreleri genellikle myeloid ve lenfoid olmak üzere iki tiptir. Olguların % 60-80'inde myeloid blast hücreleri, % 20-30 olguda ise lenfoid blast hücreleri gözlenmiştir. Hastaların % 60-80'inde trizomi 8, ikinci Ph, izokromozom 17 (iso(17q)), gibi ek sitogenetik değişiklikler gözlenmektedir. %10'dan daha az olguda trizomi 19, trizomi 21, trizomi 17 gibi kromozomal anomaliler gözlenmektedir. Ayrıca olguların küçük bir kısmında p53 geninde değişiklikler gözlenmiştir. Bazı hastalarda ani bir fibrotik faz görülebilir ve bu durum ya blast fazına geçişte kısa bir dönemi içerebilir ya da hastalar akut lösemiye dönüşmeksizin kaybedilir (Silver, 2009).

**Çizelge 2.5.** KML ‘nin akselere ve blastik fazlarının tanımında kullanılan WHO kriterleri (Vardiman, 2002)

**Akselere Faz Tanı Kriterleri**

Periferik veya kemik iliğinde ki blast oranının %10 ile %19 arasında olması,

Periferik kandaki bazofil oranı  $\geq$  %20,

Tedaviye dirençli trombositopeni  $<100 \times 10^9/L$

Tedaviye cevapsız trombositoz  $>1000 \times 10^9/L$

Artan dalak büyüklüğü ve tedaviye cevapsız lökosit miktarında artış

Klonal evrime sitogenetik kanıt

*Yukarıdaki kriterlerden bir veya birden fazlasının bulunması hastanın akselere faza geçtiğini göstermektedir.*

**Blastik Faz Tanı Kriterleri**

Periferik veya kemik iliğinde ki blast oranının  $\geq$  %20

Ekstramedüller blastik proliferasyon

*Yukarıdaki kriterlerden bir veya birden fazlasının bulunması hastanın blastik faza geçtiğini göstermektedir.*

**2.4.8. Tedavi**

KML hastalarında tedavinin amacı, BCR-ABL transkriptini içeren hücreleri ortadan kaldırmak ve böylelikle moleküler remisyona sağlamaktır. KML tedavisinde başlangıçta ki ilk amaç lökosit sayısını normal değerler seviyesinde tutabilmektir. Bu tedavi konvansiyonel kemoterapi olarak adlandırıldı ve 1980’lere kadar bu tedavide sıklıkla hidroksiüre ve busulfan kullanıldı. Hidroksiüre ve busulfan gibi tek bir ajanla kemoterapi kronik evre boyunca KML’nin denetimini ve lökosit sayısının normal değerler altında tutulmasını sağlayabilmekteydi fakat sağ kalım süresinde anlamlı bir uzama sağlayamamaktaydı (Pekçelen, 2003).

Hidroksiüre olgunlaşmış myeloid öncül hücrelerini hedefleyen, ribonükleotid redüktaz inhibitörü olup DNA sentezini engelleyen bir ajandır. İlaç kısa süre içinde lökosit sayısını hızlıca düşürebilmektedir. Tedaviye 1-2 g ile başlanıp çok yüksek lökosit sayısı olan vakalarda daha yüksek dozlar kullanılabilir. İlaç kesildiğinde etkisi hemen sonlanmaktadır ve ayrıca Ph kromozomunu negatifleştirmemektedir.

Busulfan, etkisi yavaş olan bir ajandır. Hidroksiüre göre en büyük dezavantajı etkisinin geç başlayıp geç sona ermesidir. Başlangıç dozu günlük olarak genellikle 4-8

mg'dır. İlacın yan etkileri arasında; %10 veya daha az hastada mielosüpresyon, akciğer, kalp ve kemik iliği gibi organlarda fibrozu yer almaktadır (Kantarjian, 1993) .

Günümüzde güncel olarak küratif tedavi seçenekleri arasında; interferon- $\alpha$ , imatinib, allojenik kemik iliği transplantasyonu yer almaktadır (Pekçelen, 2003).

#### **2.4.8.1. İnterferon- $\alpha$**

İnterferonlar hücre bölünmesini inhibe ettiklerinden kanser hücrelerinin proliferasyonunu bozdukları bilinmektedir. KML tedavisinde ki anti tümör özelliği dikkat çekicidir. Kronik fazda ki hastalarda kullanıldığında tam bir hematolojik yanıtın % 70, sitogenetik yanıtın ise % 40 oranında olduğu bildirilmiştir. Günlük dozları 3-5 megaünites/m<sup>2</sup>'dir. Doz limiti aşılmadığı takdirde ateş, üşüme, iştahsızlık gibi grip benzeri yan etkilerle ilişkilidir. Imatinib piyasaya sürüldükten sonra kullanımı önemini yitirmiştir (Cardama ve Cortes, 2008).

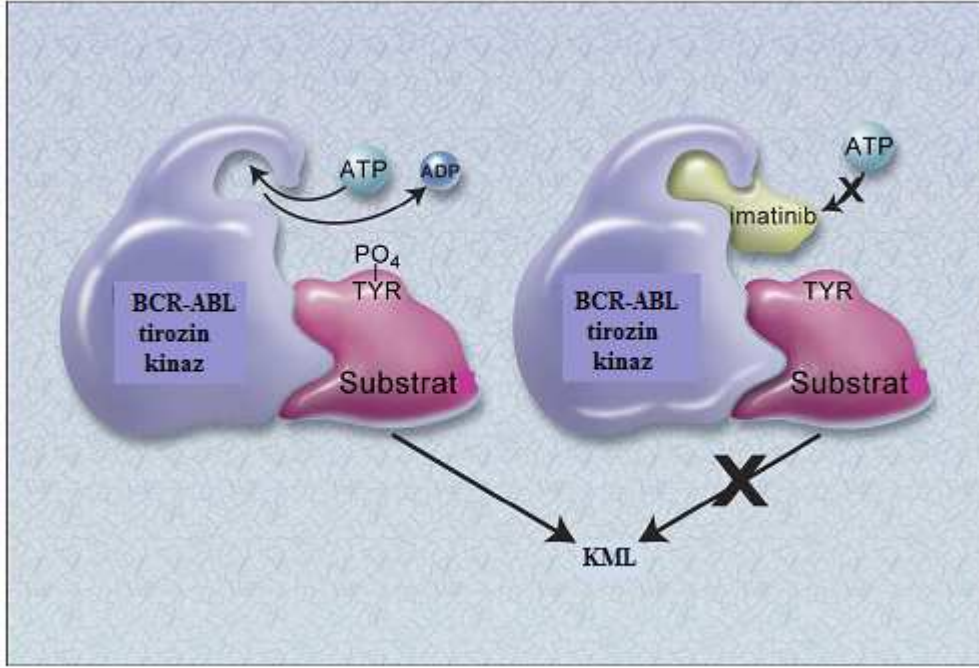
#### **2.4.8.2. Allojenik Kök Hücre Transplantasyonu**

Allojenik kök hücre tedavisi, HLA'sı uygun vericisi olan genç KML hastalarının tedavisinde önemli bir seçenektir. Özellikle erken kronik faz ve iyi risk grubunda ki hastalarda uzun dönem hastalıksız ve toplam sağ kalım görülmektedir. Genellikle elli yaşın üzerinde olan hastalar bu tedaviye alınmamaktadır. Hastaların sadece 1/3 veya 1/2'lik kısmı HLA-uygun kardeş, yaş, yeterli organ fonksiyonu, performans durumu gibi kriterlere sahip olduğundan büyük hasta gruplarında kök hücre tedavisinin uygulanabilirliği engellenmektedir. Tedavi uygulanan hastalarda 5 yıllık sağ kalım oranları akselere fazda % 40-60, blastik fazda % 10-20 oranında gözlenmektedir. Transplantasyona bağlı ölüm % 20, relaps ise % 15 oranında gözlenmektedir. Allojenik kök hücre tedavisinden sonra hastaların % 10-30 kadarında 3 yıl içerisinde relaps meydana gelmektedir. Relaps aşamasında ilk olarak BCR-ABL transkriptlerinin sayısı artar, daha sonra Ph pozitif metafazlar gözlenir, son aşamada ise KML'nin kronik faz hematolojik özellikleri gözlenmektedir. Bu tedaviden sonra hastalar RT-PCR ve sitogenetik olarak gözlem altında tutulmalıdırlar. Günümüzde imatinib tedavisine moleküler cevap tam ise bu tedaviye devam edilmektedir. Fakat genç yaştaki hastalarda eğer % 100 HLA uygun vericisi varsa allojenik kök hücre tedavisi ilk seçeneği oluşturmaktadır (Cardama ve Cortes, 2008, İlhan, O.).

#### **2.4.8.3. İmatinib**

İmatinib mesylate; Gleevec, Glivec veya STI571 gibi diğer isimleriyle de kullanılmaktadır

(Jabbour ve ark., 2009). Kimyasal yapısı bir 2-fenilaminoprimidin olan imatinib bir tirozin kinaz inhibitörüdür. ATP ile Bcr-Abl kinazın bağlanma bölgesine bağlanabilmek için bir yarış içerisindedir. Bcr-Abl proteinine bağlandığı zaman, proteinin ATP-bağlanma bölgesini bloke etmektedir. ATP'den fosfat transferini engelleyip, aşağı yönde sinyal ileti yollarını bloke ederek büyüme duraklamasına veya apoptoza neden olmaktadır (Goldman, 2009).



**Şekil 2.7.** İmatinibin etki mekanizması. Temel olarak BCR-ABL'nin tirozin kinaz fonksiyonu ATP'den fosfatın çeşitli substratlar üzerindeki tirozin rezidüsüne transferiyle gerçekleşmektedir ve bu KML'nin karakteristik myeloid hücrelerinin ek proliferasyonuna yol açmaktadır. İmatinib ATP'nin BCR-ABL tirozin kinaza bağlanmasını bloke eder böylece kinaz aktivasyonunu engeller. (Druker, 2008)

BCR-ABL mutasyonu neredeyse tüm KML hastalarında bulunmaktadır, bu protein lösemik hücrelere özgüdür ve bu hücrelerde yüksek düzeylerde eksprese edilmektedir. Lösemiye indüklemek için mutlaka BCR-ABL'nin tirozin kinaz aktivitesi gereklidir. 1996 yılında Druker ve arkadaşları BCR-ABL içeren ve proliferasyon yapan myeloid hücrelerin imatinib ile inhibe edildiğini veya tamamen öldürüldüğünü fakat normal hücrelere minimal düzeyde zarar verdiğini göstermişlerdir. İmatinib, klinik olarak 1998 yılında kullanıma geçmiştir (Goldman, 2009). KML için dikkate değer aktivitesi ve hafif toksisite profiliyle standart tedavi haline gelmiştir (Cardama ve Cortes, 2006).

Haziran 1998'de Druker ve arkadaşları tarafından imatinibin standart dozunu, etkinliğini, güvenilirliğini saptamak amacıyla bir faz I çalışması düzenlendi. Çalışmaya

KML'nin kronik fazında olan, IFN- $\alpha$  tedavisine cevap vermeyen, tedaviye direnç gösteren veya ilacı tolere edemeyen hastalar alınmıştır. Çalışmanın diğer aşamalarında blast krizinde olan KML hastaları ve Ph kromozomu pozitif olan ALL hastaları çalışmaya dahil edilmiştir. Hastalara 25-1000 mg dozlarında imatinib verilmiştir. 300 mg ve üzeri doz alan 54 hastanın 53'ünde (%98) tam hematolojik yanıt yani normal lökosit ve trombosit sayısı elde edilmiştir. Faz I çalışmalarından elde edilen data lar faz II klinik denemelerinin gerçekleşmesine yol açmıştır. Bu klinik denemeler faz I çalışmasında elde edilen sonuçları konfirme etmektedir. IFN- $\alpha$  tedavisinde başarısız olan kronik fazda ki KML hastalarının % 95'inde tam hematolojik yanıt, % 35'ten fazlasında ise tam sitogenetik yanıt alınmıştır (Druker, 2008).

Multimerkezli, randomize faz III çalışmasının sonucuna göre (International Randomized Study of Interferon and STI571) günlük 400 mg imatinib KML için standart tedavi olarak kabul edilmiştir (Cardama ve Cortes, 2006). Fakat bazı araştırmacılar, günlük 600-800 mg imatinib ile tedaviye başlamanın uzun dönemde daha iyi sonuç vereceğini savunmuşlardır (Goldman, 2009a).

İmatinibin en önemli yan etkileri arasında mide bulantısı, sıvı tutulumu, kilo alımı, kemik ağrıları, döküntü, karaciğer fonksiyonunda bozukluklar yer almaktadır (Goldman, 2009b). KML hastaları imatinibe primer veya sekonder direnç göstermektedirler. Primer direnç; hastaların imatinib tedavisinden cevap alınamaması, sekonder direnç ise; elde edilen cevabın kaybedilmesidir. Tanımlanmış en iyi direnç mekanizması Abl tirozin kinaz domaininde meydana gelen mutasyonların gelişmesidir. Ayrıca BCR-ABL onkoproteininin yüksek ekspresyonu, BCR-ABL geninin amplifikasyonu, ilacın hücrelerden hızlı olarak atılmasını sağlayan P-glikoproteininin yüksek oranda ekspresyonunda bilinen direnç mekanizmaları arasında bulunmaktadır (Cardama ve Cortes, 2006).

## **2.5. Akut Myeloid Lösemi (AML)**

Akut lösemiler genç, olgunlaşmamış (blastik) myeloid ya da lenfoid seri hücrelerinin kemik iliği, çevre kanı ve diğer dokularda birikimi ile karakterize olan hastalıklardır. Akut lösemiler, akut myeloid lösemi (AML) ve akut lenfoblastik lösemi olmak üzere (ALL) iki ana kategoriye ayrılmaktadırlar ( Pekçelen, 2003).

Hematopoetik dokunun malign ve klonal hastalığı olan AML, lösemik blast hücrelerinin özellikle kemik iliğinde ki proliferasyonu ve normal kan hücrelerinin bozulan üretimleriyle karakterizedir (Lichtman, 2001). AML'de malign hücrenin, sürekli

olarak myeloid ve monositik farklılaşma gösteren bir blast olmasından ve hastaların yaklaşık % 5 ile % 10'unda blastların, eritroid veya megakaryositik farklılaşmaya sahip olmalarından dolayı hastalık akut nonlenfoblastik lösemi olarak da adlandırılmaktadır (Cheson ve ark., 1990).

AML ya hematopoetik kök hücrede ya da aşırı derecede farklılaşmış hücrelerde ki somatik mutasyondan kaynaklanmaktadır. Hastaların yaklaşık % 80'inde, somatik mutasyonlar kromozomal translokasyonlardan kaynaklanmaktadır ve bu translokasyonlar protoonkogenlerin kritik bölgelerinde ki yeniden düzenlemelerle meydana gelmektedirler. AML'nin klinik belirti ve semptomları nonspesifiktir ve hastaya göre farklılık göstermektedir. Başlangıç bulgu ve semptomları arasında; solgunluk, yorgunluk, zayıflık, çarpıntı ve eforla nefes darlığı bulunmaktadır ve bunlar anemi gelişimini belirtmektedirler. Kolay kanama, diş eti kanamaları ve deri yaralanmalarında uzun süreli kanamalar trombositopeniyi göstermektedir ve sıklıkla hastalığın erken belirtileri arasındadır. Tanı sırasında birçok hastada ateş mevcut bir özelliktir. Karaciğer (hepatomegali), dalak (splenomegali), deri, lenf nodülleri, (lenfadenopati) kemik (kemik ağrısı) ve merkezi sinir sistemi olmak üzere çeşitli dokularda ki lösemik infiltrasyon, farklı diğer semptomları üretmektedir (Lichtman, 2001).

### **2.5.1. Sınıflandırma**

AML'deki myeloblastlar lenfoblastlardan daha büyük (12-20 mikron çapında) ve sitoplazmaları daha geniş olan hücrelerdir. Sitoplazmada '*Auer cisimleri*' adı verilen azurofil boyanan küçük çomakların varlığı AML için tanı koydurucu bir bulgudur. Bu durum AML vakalarının % 10-20'sinde bulunmaktadır. AML hücrelerine özgü bazı yüzey antijenleri tanımlanmıştır ve immünofenotipleme ile bu antijenlerin belirlenmesi sağlanmaktadır. AML ve ALL' nin ayırıcı tanısı iki hastalığın birbirinden klinik davranış, prognoz ve tedaviye cevap açısından belirgin farklılıklar göstermesinden dolayı önemlidir (Büyüköztürk, 2007) .

Akut lösemilerin sınıflandırılması ilk kez 1976 yılında Fransız, Amerikan ve İngiliz (FAB) bir grup hematolog tarafından oluşturulmuştur. Bu sınıflandırmada AML 8 patolojik alt tipe ayrılmaktadır. Bu ayırım, hakim olan hücrelerin granülosit, monosit, eritrosit ya da megakaryositlere diferansiyasyonu ve maturasyon derecesi temel alınarak yapılmıştır. Fakat, immünofenotipleme, elektron mikroskobu, sitogenetik, moleküler biyolojik tetkik yöntemlerini ve nadir olarak rastlanılan lösemi tiplerini içermeyen bir sınıflandırmadır (Ali, 2006). Bu sınıflandırma çizelge 2.6.'daki gibi tanımlanmıştır.

**Çizelge 2.6.** Akut Myeloid Lösemide FAB Sınıflaması (Ali, 2006).

Akut Myeloid Lösemi	
Alt Tip	Tanımlama
<b>M0</b>	Minimal farklılaşma gösteren AML
<b>M1</b>	Olgunlaşma göstermeyen AML
<b>M2</b>	Olgunlaşma gösteren AML
<b>M3</b>	Akut promyelositik lösemi (APL)
<b>M4</b>	Akut myelomonositik lösemi (AMML)
<b>M5</b>	Akut monositik lösemi (AMoL)
<b>M6</b>	Akut eritrolösemi
<b>M7</b>	Akut megakaryoblastik lösemi

**FAB M0 (minimal farklılaşmış AML):** Tüm AML vakalarının % 3'ünü oluşturan M0'daki lösemik hücreler morfolojik yönden farklılaşmamış myeloblastlardır. ALL ile karıştırılabilmektedir. M0 blastları megakaryoblastlara (M7) ve monoblastlara (M5) benzerlik göstermektedir. İmmünofenotiplemede myeloid dizi için özgül olan CD33, CD13 veya myeloperoksidaz pozitifliğinin varlığı ile tanı konmaktadır.

**FAB M1 (Olgunlaşma göstermeyen AML):** AML olgularının % 15-20'sini oluşturmaktadır. Blastlarda Auer cisimleri seyrek ya da hiç yoktur. ALL'den ayrımı için sitokimyasal boyalara gereksinim vardır.

**FAB M2 (Olgunlaşma gösteren AML):** En sık rastlanılan AML alt tipi olup tüm AML vakalarının % 25-30'unu oluşturmaktadır. Ön plandaki hücreler blast veya erken promyelositlerdir. Bu alt tipteki hastaların yaklaşık olarak yarısında t(8;21) kromozom translokasyonu gözlenmektedir. Bu vakalarda standart kemoterapi ile tam remisyona elde etme olasılığı yüksektir.

**FAB M3 (Akut promyelositik lösemi, APL):** Erişkin AML vakalarının % 5-10'unu oluşturmaktadır. Kemik iliğinde veya periferik kanda atipik promyelositlerin varlığı ile karakterizedir. M3 hücrelerinin immünofenotipi farklı özellikler gösterir ve bunlarda genellikle CD34-, HLA-DR, CD14, CD33+'tır. APL lösemi vakalarının % 80'inden fazlasında t(15;17) kromozom translokasyonu saptanmaktadır. Çoğu olguda yaygın damar içi pıhtılaşması ve buna bağlı olarak ağır kanama belirtileri gözlenmektedir.

**FAB M4 (Akut myelomonositik lösemi, AMML):** Tüm AML vakalarının % 20-30'unu meydana getirmektedir. Bu alt tipte lösemik hücreleri myeloid ve monositik farklılaşma gösteren blastik hücrelerden meydana gelmektedir. M4 alt tipinin, anormal eozinofillerle birlikte olan (M4Eo) olarak adlandırılan bir varyantı bulunmaktadır. Bu varyantta myelomonositik blastların yanı sıra <%30 oranında hem morfolojik hem de sitokimyasal



olarak anormal eozinofiller bulunmaktadır. M4Eo, tüm AML vakalarının % 5-10'unu, M4 vakalarının ise yaklaşık olarak 1/3'ünü oluşturmaktadır. Bu varyantta özgül bir karyotipik anomali olan inversiyon 16 (inv(16)) gözlenmektedir. Bu varyantta diğer AMML olgularına kıyasla daha yüksek oranda tam remisyon ve uzun süreli sağ kalım sağlanabilmektedir.

**FAB M5 ( Akut monositik lösemi, AMoL):** Tüm AML olgularının % 2-9'unu oluşturmaktadır. Monositik farklılaşma gösteren hücrelerin hakim olduğu AML alt-tipidir. M5'in az farklılaşmış (M5a) ve iyi farklılaşmış (M5b) olmak üzere iki varyantı vardır. AMoL tanısı için, kemik iliğindeki noneritroid hücrelerin % 80'inden fazlasının monoblast, promonosit veya monositlerden oluşması gerekmektedir.

**FAB M6 (Akut eritrolösemi):** AML vakalarının % 3-5'ini oluşturmaktadır. M6 tanısı için kemik iliğinde myeloblast ve promyelositlerin oranının > %30 olması gerekmektedir. Eritrolösemiye genellikle 50 yaşın üstündeki vakalarda rastlanılmaktadır.

**FAB M7 (Akut megakaryoblastik lösemi):** AML vakalarının % 3-12'sini oluşturmaktadır. Konvansiyonel indüksiyon kemoterapisine yanıt iyi olmamakla beraber hastaların ancak < % 40'ında tam remisyon sağlanmaktadır (Büyüköztürk, 2007, Pekçelen, 2003).

Akut myeloid lösemide sitogenetik ve moleküler genetik anomalilerinin belirgin bir hale gelmesi ve bunların prognostik önem taşımaları sayesinde yeni bir sınıflandırmaya ihtiyaç duyulmuş ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) yeni bir sınıflama yapmıştır. Bu sınıflamada; morfoloji, immünofenotipleme, sitogenetik ve moleküler biyolojik özellikler göz önüne alınmıştır. AML tanısı için kemik iliği veya kandaki blastik hücre sayısı % 30'dan % 20'ye düşürülmüş ve nadir lösemi tipleri de dahil edilmiştir (Vardiman, 2002). Bu sınıflandırma ayrıntıları çizelge 2.7.'de gösterilmektedir.

#### **Çizelge 2.7. Akut lösemi WHO sınıflaması (Vardiman 2009)**

1. Tekrarlayan Genetik Anomalilerle Seyreden AML
  - t(8;21)(q22;q22), ( AML1/ETO ) ile AML
  - inv(16)(p13.1;q22) veya t(16;16)(p13.1;q22), (CBFβ/MYH11) ile AML
  - Akut promyelositer lösemi t(15;17)(q22;q12), (PML/RAR-alfa) ile AML ve varyantları
  - 11q23 (MLL) anomalisi ile AML
2. Çoğul seri displazi ile seyreden AML
  - Önceden miyelodisplastik sendromlu (MDS)
  - Önceden miyelodisplastik sendrom olmadan

### **Çizelge 2.7. (devam) Akut lösemi WHO sınıflaması**

3. Tedaviye ikincil AML ve MDS
  - Alkilleiyici ajanlarla ilişkili
  - Topoizomeraz II inhibitörleri ile ilişkili
4. Tanımlanan gruplara girmeyen AML
  - Minimal farklılaşma gösteren AML
  - Olgunlaşma göstermeyen akut miyeloblastik
  - Akut miyelofibrozis ile panmiyeloz lösemi
  - Granülositik olgunlaşma gösteren akut miyeloblastik lösemi
  - RAR $\alpha$  rearrajmanı göstermeyen akut promiyelositer lösemi
  - Akut miyelomonositik lösemi
  - Akut monoblastik ve monositer lösemi
  - Akut eritrolösemi
  - Akut megakaryoblastik lösemi
  - Akut bazofilik lösemi
  - Miyeloid sarkom

#### **2.5.2. Epidemiyoloji ve Etiyolojisi**

AML, yetişkinlerde görülen en yaygın lösemi tipidir ve tüm lösemi tipleri arasında en düşük yaşam süresi AML' de görülmektedir. Amerika' da 1975-2005 yılları arasında yaşa göre düzeltilmiş insidans oranı yaklaşık olarak 100.000 kişide 3.4'tür (Deschler ve Lübbert, 2006). Çocuklarda tüm akut lösemilerin % 15-20'sini oluştururken, erişkinlerde bu oran % 80'e ulaşmaktadır. Erkeklerde kadınlara oranla daha sık olarak rastlanmaktadır. Yeni tanı almış AML hastalarında medyan yaş 65'tir. Nadir olarak 40 yaş öncesi AML tanısı konmaktadır ve insidansı yaşla birlikte gittikçe artmaktadır.

AML gelişimi çizelge 2.8.'de özetlendiği gibi birçok risk faktörü ile ilişkilidir (Deschler ve Lübbert, 2006). Tek yumurta ikizlerinin birinde lösemi gelişirse; diğer ikizinde 1/5 olasılıkla lösemi gelişebileceği rapor edilmiştir (Lichtman, 2001). Çocuklar arasında genetik bozukluklar ve konstitüsyonel genetik defektler AML ile ilişkili önemli risk faktörleridir. Down sendromu olan bir çocukta akut lösemi gelişimi riski 10 ile 20 kat arasında artmıştır. AML olgularında belirli klonal kromozomal anomaliler % 50 ile % 80 oranında, yaş ile birlikte artan oranda gözlenmektedir. Sıklıkla bulunan anomaliler arasında 5. 7. 9. ve Y kromozomlarındaki delesyon, t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q11) translokasyonları, trizomi 8 ve 21, kromozom 16, 9 ve 11'i içeren anomaliler yer almaktadır (Deschler ve Lübbert, 2006).

Fiziksel ve çevresel faktörler de AML patogeneğinde yer almaktadır. Örneğin iyonize radyasyona maruz kalma AML ile ilişkili olarak bulunmuştur. Japonya' da atom bombası patlamasına maruz kalanlar arasında maruziyetten 5 ile 7 yıl sonra artmış AML insidansı

gözlenmiştir. Alkilleyici ajanlar ve topoizomeraz II inhibitörleri gibi kemoterapötik ajanların AML insidansını arttırdıkları rapor edilmiştir (Jabbour ve ark., 2006).

**Çizelge 2.8.** AML gelişimi ile ilişkili risk faktörleri (Deschler ve Lübbert, 2006).

<b>Genetik Bozukluklar</b>	Down sendromu Klinifelter sendromu Patau sendromu Ataksi telenjektazi Kostman sendromu Nörofibromatozis Fanconi anemisi Li-Fraumeni sendromu
<b>Fiziksel ve kimyasal faktörler</b>	Benzen Pipobroman benzeri ilaçlar Sigara kullanımı Herbisitler
<b>Radyasyon mazuritesi</b>	Nonterapötik ve terapötik radyasyon
<b>Kemoterapi</b>	Alkilleyici ajanlar Topoizomeraz II inhibitörleri Antrasiklinler

### 2.5.3. AML’de Prognostik Önemi Olan Kromozom Kusurları

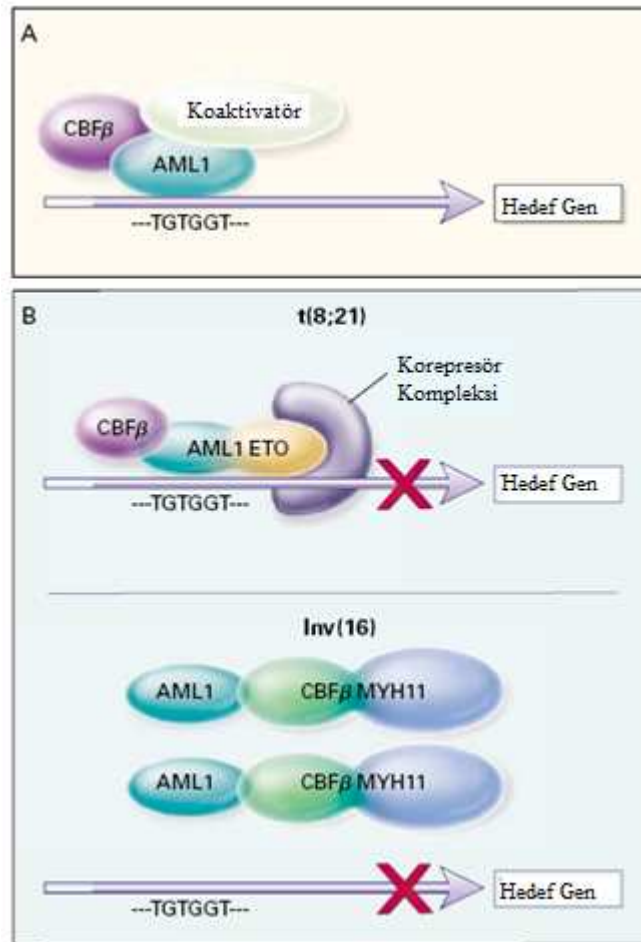
Kromozomların anormal sayılarından veya yapılarından ya da her iki durumdan da kaynaklanan anomaliler AML olgularının yaklaşık % 75’ini oluşturmaktadır (Lichtman, 2001). En sık rastlanılan kromozom anomalileri arasında; trizomi 8, monozomi 7, monozomi 21, trizomi 21, kromozom 5 veya kromozom 7’nin bir kısmının veya tamamının delesyonu, X veya Y kromozomunun kaybı yer almaktadır. Prognostik önemi olan kromozom anomalileri arasında translokasyon 8;21, 15;17 ve inversiyon 16’nın yeri oldukça önemlidir ve bu resiprokal yeniden düzenlemeler AML olgularının yaklaşık olarak % 20’sinde gözlenmektedir. (Bacher ve ark., 2010)

#### 2.5.3.1. t(8;21)(q22;q22) / AML1-ETO Geni

Bu translokasyonda kırılma noktaları, 8q22 kromozomundaki ETO (eight-twenty-one) (sekiz-yirmi bir) veya MTG8 (myeloid translocation gene) (myeloid translokasyon geni) olarak adlandırılan gen ile 21q22 kromozomundaki AML1 (akut myeloid faktör 1) geni arasında meydana gelmektedir. Translokasyon sonucu meydana gelen füzyon protein

genellikle AML1-ETO olarak adlandırılmaktadır. Bu translokasyon AML M2 olgularının yaklaşık olarak % 40'ında, tüm AML olgularının ise, popülasyondakilerin genetik geçmişlerine ve coğrafik yerleşimlerine bağlı olarak % 8 ile % 20'si arasında gözlenmektedir (Peterson ve ark., 2007).

AML1 geni AML1 DNA-bağlayan alt ünitesi ve CBF $\beta$  (core binding factor  $\beta$ ) alt ünitesinden oluşmaktadır. CBF grubunda ki genler birçok dokunun farklılaşmasında rol oynayan çeşitli hedef genlerle heterodimer oluşturarak işlev görmektedir. DNA'ya bağlanarak işlev gören alfa ve DNA'ya bağlanmadan transkripsiyonel aktiviteyi arttıran beta alt üniteleri bulunmaktadır. AML1-CBF $\beta$  transkripsiyonel faktörü bir takım hematopoeze özgü genleri regüle etmektedir ve hematopoetik sistemin normal gelişimi için gereklidir. Şekil 2.8. 'de bu transkripsiyon faktörünün normal işleyişi ve 8;21 translokasyonu sonucu işleyişi gösterilmektedir. t(8;21) erişkinlerde oldukça iyi prognozlu bir AML alt grubudur ve konvansiyonel kemoterapiye, sitozin arabinozide iyi yanıt vermektedir (Löwenberg ve ark. 1999).



**Şekil 2.8.** AML1- CBF $\beta$  transkripsiyon faktörü. A- Normal hücrelerde, AML1- CBF $\beta$  transkripsiyon faktörü kompleksi AML1'in transkripsiyon düzenleyici bölgesinde

**Şekil 2.8.** (devam) AML1- CBF $\beta$  transkripsiyon faktörü. TGTGGT DNA sekansına bağlanmaktadır ve transkripsiyonu aktive etmektedir. B- t(8;21) translokasyonu ile oluşan füzyon proteini bu aktivasyonu sağlamamaktadır. Transkripsiyonun baskılanmasının ETO'nun nükleer korepressör kompleksiyle direkt etkileşimi aracılığıyla ilgili olduğu görülmektedir. Benzer bir şekilde bu durum inv (16)'da da görülmektedir (Löwenberg ve ark. 1999).

### **2.5.3.2. t(15;17)(q22;q21) / PML/RAR Geni**

AML'nin alt türü olan, (AML M3) akut premyeloid lösemi (APL) bol miktarda malignant promyelositik blastların kemik iliğinde bulunmasıyla karakterize edilmiştir. Kendine özgü translokasyon tipi vardır ve yüksek ölçüde tedavi edilebilirliği bulunmaktadır (Goldschmidt Ve ark., 2010).

APL 15. ve 17. kromozomlar arasındaki translokasyonla karakterize edilmiştir ve Rowley tarafından 1977 yılında tanımlanmıştır. Bu translokasyon 15q22 bölgesine lokalize olan promyelositik geni (PML) ile 17q21 bölgesine lokalize olan retinoik asit reseptör alfa geni (RAR $\alpha$ ) arasındaki moleküler yeniden düzenlemeyle oluşmuştur ve myeloid olgunlaşmada promyelositik safha süresince farklılaşmayı blokladığından hastalık patogeneğinde kritik önem taşımaktadır. Bu durum 15;17 translokasyonu sonucu, retinoik asit tarafından sağlanan transaktivasyonun dominant negatif olarak inhibe edilmesiyle gerçekleşmektedir (Chauffaille ve ark., 2001). RAR $\alpha$ 'daki kırılma noktası her zaman 2. intronda meydana gelirken, PML geninde; intron 6, ekzon 6 ve intron 3'te olmak üzere üç olası kırılma noktası bulunmaktadır ve bunun sonucu olarak sırasıyla olası üç PML/RAR $\alpha$  izoformu bcr1, bcr2, bcr3 oluşmaktadır (Goldschmidt Ve ark., 2010).

APL tanısı; klinik, morfolojik, sitogenetik ve moleküler çalışmalara dayanmaktadır. Önceleri antrasiklin ve sitarabin AML tedavisi için bir seçenektir ama 1980'lerin sonunda ATRA'nın (all-trans retinoic acid) kullanılmasıyla remisyon oranında büyük gelişme yakalanmıştır (Nasr, 2010).

### **2.5.3.3. Inv (16)(p13q22) / CBF $\beta$ MYH11 Geni**

AML olgularının yaklaşık olarak % 8'inde inversiyon 16 (inv(16)) görülmektedir. Hücrelerin morfolojisine göre akut myelomonositik lösemi (FAB M4) olarak sınıflandırılmaktadır (Martens ve Stunnenberg, 2010). Moleküler seviyede inv (16)(p13q22); 16q22 bölgesine lokalize olan CBF $\beta$  geninin; 16p13 bölgesine lokalize olan düz kas miyozin ağır zincir 11 (muscle myosin heavy chain: MYH11) geniyle yapmış olduğu füzyon sonucu oluşmaktadır ve bu füzyonla CBF $\beta$ /MYH11 kimerik geni meydana

gelmiştir. CBF $\beta$  ve MYH11 genleri içinde değişken genomik kırılma noktaları bulunmaktadır ve bunun sonucunda 8 farklı CBF $\beta$ /MYH11 füzyon transkripti (tip A'dan H'ye) kodlanmaktadır. En sık rastlanılan füzyon transkripti tip A'dır ve yaklaşık olarak olguların %85'inde görülmektedir (Marcucci ve ark. 2001).

**Çizelge 2.9.** AML ile ilişkili onkofüzyon proteinleri (Martens ve Stunnenberg, 2010).

Translokasyon	Prognoz	FAB	Onkofüzyon-protein	AML'de meydana geliş sıklığı
t(8;21)	İyi prognoz	M2	AML1-ETO	% 10
t(15;17)	İyi prognoz	M3	PML-RAR $\alpha$	%10
inv(16)	İyi prognoz	M4	CBF $\beta$ -MYH11	%5
der(11q23)	Değişken	M4/M5	MLL-füzyon	%4
t(9;22)	Advers	M1/M2	BCR-ABL1	%2
t(6;9)	Advers	M2/M4	DEK-CAN	<%1
t(1;22)	Orta	M7	OTT-MAL	<%1
t(8;16)	Advers	M4/M5	MOZ-CBP	<%1
t(7;11)	Orta	M2/M4	NUP98-HOXA9	<%1
t(12;22)	Değişken	M4/M7	MN1-TEL	<%1
inv(3)	Advers	M1/M2/M4/M6/M7	RPN1-EVII	<%1
t(16;21)	Advers	M1/M2/M4/M6/M7	FUS-ERG	<%1

#### 2.5.4. Tedavi

AML tedavisi, remisyona sokma (remisyon induksiyon) ve remisyon sonrası tedavi olmak üzere 2 kısma ayrılabilir. 1960'larda Freireich tam remisyonun sağlanmasının yaşam süresinin gelişimindeki önemini göstermiştir. Tam remisyon kemik iliği ve kandaki hücre sayısının normale dönmesi ve kemik iliğindeki blast oranının %5'ten düşük olması olarak tanımlanmıştır (Jabbour ve ark., 2006).

AML' de tam remisyon elde etmek için akut premyelositik lösemi (FAB M3) dışındaki diğer tüm FAB alt tiplerinde cytarabin (cytosine-arabinozid) ve antrasiklinlerden oluşan ikili kemoterapi uygulanmaktadır. Cytarabine, hücre siklusu S-fazı için spesifik olan bir antimetabolittir ve DNA sentezini engellemektedir. Antrasiklinler ise DNA'nın kırılmasına yol açan ajanlardır. Cytarabine 100-200 mg/m<sup>2</sup>/gün dozunda 7 gün boyunca verilmektedir. Antrasiklin genellikle 3 gün süreyle uygulanır ve 3. gün cytarabine ile birlikte verilir ve bu tedavi '3+7' tedavisi olarak adlandırılmaktadır (Ravandi ve ark.,2007).

AML remisyon induksiyon tedavisinde bir A vitamini türevi olan 'all trans retinoic acid' ATRA kullanılmaktadır. Bu tedaviyle t(15;17) pozitif (FAB M3) vakalarında lösemi hücrelerinin differansiye olması sağlanır ve sitotoksik tedavi sonucu gelişen

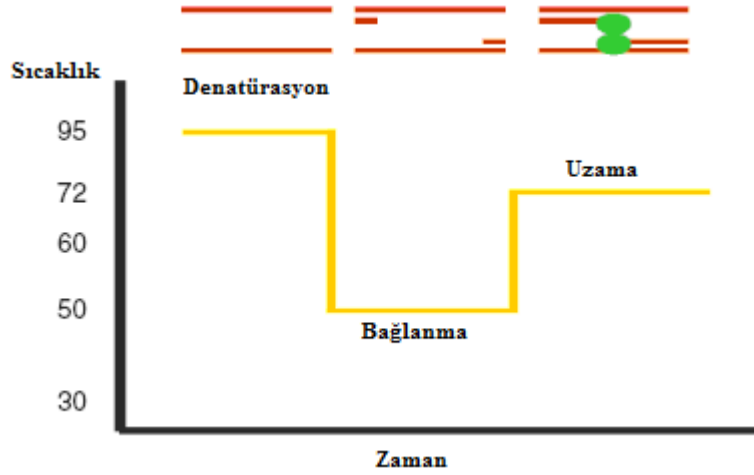
komplasyonlar (örneğin yaygın damar içi pıhtılaşma) genellikle önlenmektedir (Wahab ve Levine, 2010). AML vakalarının yaklaşık olarak 3/4'ü 60 yaşın üzerindedir ve bu yaş grubunda olumsuz prognostik faktörlere sık rastlanılmaktadır. Yaşlı vakalarda genellikle daha ılımlı kemoterapi uygulanmaktadır (Eleni ve ark., 2010).

Remisyon sonrası, hastalığın nüks etmesini önlemek amacıyla, kalan lösemi hücrelerini eradike etmek için AML hastalarının tedavisine devam edilmektedir. Genç hastalarda remisyon sonrası, yoğun kemoterapi, allojenik ya da otolog kök hücre transplantasyonları (AKHT, OKHT) uygulanabilmektedir. Birinci tam remisyon sırasında HLA-uygun kardeşinden AHKT almış vakalarda nüks oranı genellikle %20'den az olarak görülmektedir. OKHT' de AHKT' den farklı olarak hastanın remisyon sırasında toplanmış kendi kök hücreleri kullanılmaktadır (Stone ve ark., 2004).

## **2.6. Lösemik Dönüşümün Gösterildiği Metodlar**

### **2.6.1. Real-Time PCR Yöntemi**

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) 1980'lerin ortalarında Kary Mullis tarafından keşfedilen ve moleküler biyolojide büyük bir devrim yaratan yöntemdir. Mullis bu buluşu ile 1993 yılında Nobel ödülü ile ödüllendirilmiştir. PCR, dizisi bilinen iki bölge arasında yer alan DNA parçasının *in vitro* koşullar altında enzimatik olarak çoğaltılması işlemidir. Bu işlemle DNA'nın herhangi bir bölgesinin; primerler, DNA polimeraz enzimi ve ortama eklenen deoksiribonükleotidler (dNTP) ile uygun koşullar altında inkübe edilmesiyle kısa süre içerisinde milyonlarca kopyası yapılabilmektedir. Tipik bir PCR reaksiyonu 3 basamaktan oluşmaktadır. (Şekil 2.9.) Birinci aşama olan denatürasyon (90-95 °C) aralığında gerçekleşmektedir ve bu aşamada çift zincirli DNA parçası denatüre olmaktadır. Bağlanma aşamasında sıcaklık düşmesiyle primerlerin kalıp DNA'ya bağlanmasına izin verilir. Son aşama olan uzama aşamasında primerler üzerinden uzama gerçekleşmektedir. Bu 3 aşama PCR reaksiyonunda ki 1 siklusu oluşturmaktadır (Günel, 2007, Kubista ve ark., 2006).



**Şekil 2.9.** Tipik bir PCR reaksiyonu (Kubista ve ark., 2006)

PCR tiplerinden biri olan Real-Time PCR metodunda geleneksel PCR yöntemi ile gen analizi birleştirilmiştir. Bu metod, PCR çoğaltımını görünür hale getiren ve monitorize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğalma yöntemidir. RT-PCR'nin temel amacı, örnekte çok düşük miktarda bulunabilen spesifik nükleik asit sekanslarının ölçümlerinin ve ayırt edilmelerinin yapılabilmesidir. Birçok isimlendirme yapılan bu teknolojiye, 'kinetik PCR', 'homojen PCR', 'kantitatif Real-Time PCR' gibi çeşitli adlar altında rastlamak mümkündür (Bustin, 2000).

Biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme ve mRNA'nın düzeyinin sayısal olarak belirleyebilme RT-PCR teknolojisinin en çok kullanılan alanlarını oluşturmaktadır. Bunların yanı sıra, gen ekspresyonunun kantitasyonu, array verifikasyonu, viral kantitasyon, tek nokta mutasyonlarını belirleme, patojen belirleme, DNA hasarı belirleme, metilasyon tespiti, kromozom bozukluklarının tespiti gibi çalışmalarda da çeşitli kullanım alanları bulunmaktadır (Sayitoğlu).

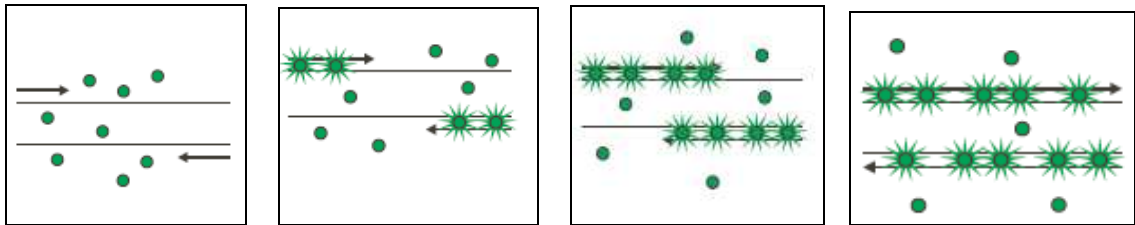
RT-PCR teknolojisinin birçok avantajı bulunmaktadır. Örneğin konvansiyonel PCR 'plato fazında' yani son noktada değerlendirilmesine rağmen, RT-PCR esnasında 'eksponansiyel büyüme fazında' data gözlemlenmesi yapılabilmektedir, konvansiyonel ölçümlerden 1000 kat daha az RNA örneği ile çalışılabilir, PCR işlemi sonrası elektroforeze gerek duyulmamaktadır. Gen ekspresyonu değerlendirilmesinde en hassas, etkili, hızlı uyarlanabilir metoddur. İki kat artmış değişimi bile belirleyebilme hassasiyetine sahiptir. Tüm bu avantajlara rağmen bu metodunda teknik donanım, alt yapı, tecrübe gerektirmesi, yüksek ekipman ihtiyacı, standardizasyon gibi bazı limitasyonları bulunmaktadır (Wong ve ark., 2005).



Günümüzde birçok araştırma ve tanı laboratuvarlarında kullanılan real-time PCR cihazları mevcuttur. Bu cihazlar birbirlerinden reaksiyon kapasiteleri, kanal sayıları ve hızları gibi çeşitli özellikleriyle ayrılmaktadırlar. Yaygın olarak kullanılan sistemler arasında, 'Light Cycler', 'ABI7700, ABI7900 ve ABI7000'(Applied Biosystems), Bio-Rad Instruments'ın 'i-cycler' yöntemi yer almaktadır (Ginzinger, 2002). RT-PCR metodunda kullanılan prob ve floresan teknikleri 2 kategoriye ayrılmaktadır (Stahlber ve ark., 2005).

### 2.6.1.1. Özgül Olmayan Floresan İşaretli Problar

**-Syber Gren I:** En fazla kullanılan boya çeşidi olan SYBR Green I, spesifik olmayan çift zincirli DNA'nın çoğaltımında kullanılmaktadır. Bu yöntemde kullanılan floresan boya sadece çift zincirli DNA'ya bağlandığından çoğalan DNA miktarında ki artışa paralel olarak cihazda okunan floresan miktarıda eş zamanlı olarak artmaktadır. Çoğaltımın başında reaksiyon karışımı içerisinde DNA, primerler ve SYBR Gren I boyası bulunmaktadır. Serbest DNA molekülü başlangıçta çok az bir ışımaya yapmaktadır. Primerler bağlanıp uzama başladığında boya molekülü çift zincirli DNA'nın arasına girer ve floresan yayılımı başlar. Başlangıçta zayıf olan sinyal, ürün miktarıyla paralel olarak artan floresan miktarı artışıyla güçlenmektedir (Şekil 2.10.).



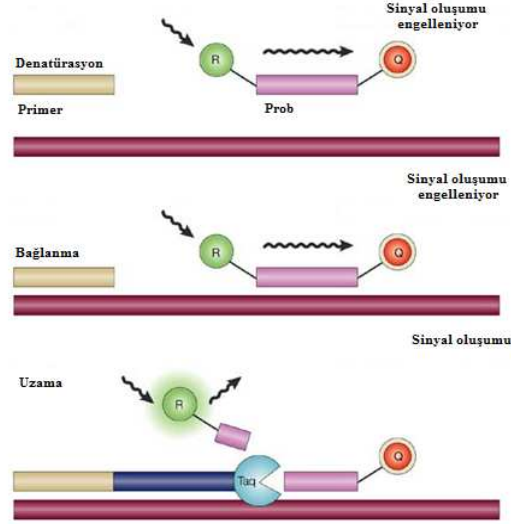
Şekil 2.10. SYBR Gren I boyası (Velden ve ark., 2003)

Maliyeti ucuz olan bu yöntemin bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Bu yöntemde istenmeyen PCR ürünlerinin çoğalmasıyla da floresan açığa çıkacağından bu ışımaya her zaman istediğimiz DNA'nın çoğaldığını göstermez ve böylelikle yanlış pozitif sonuç alınabilir. Ortamda hedef DNA dizisi bulunmadığında primerlerin birbirleri ile bağlanmaları sonucu 'primer dimerleri' olarak adlandırılan çift zincirli DNA bölgelerinin oluşumu ile floresan ışımaya gözlenebilmektedir (Velden ve ark., 2003).

### 2.6.1.2. Özgül Floresan İşaretli Problar

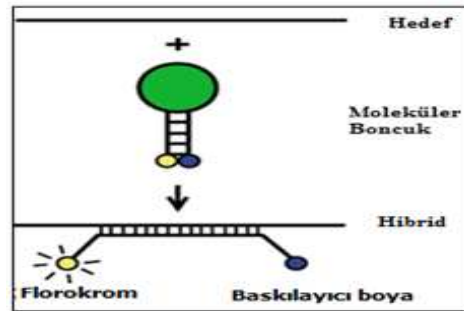
Çoğaltmak istediğimiz DNA parçası spesifik bir bölge ise bu bölgenin saptanmasında özgül floresan işaretli problar kullanılmaktadır.

**-TaqMan Prob Yöntemi:** Çoğaltılmak istenen DNA'ya komplementer olan ve floresan işaretlenmiş tek zincirli bir prob içermektedir. Floresan işaretli bu probun 5' ucunda 'reporter', 3' ucunda ise 'quencher' boya bulunmaktadır. 3' uçtaki baskılayıcı boya, 5' uçtaki boyanın sinyal oluşumunu engellemektedir. Çoğalma sırasında Taq DNA polimeraz enziminin 5'→3' nükleaz aktivitesiyle reporter boya probdan ayrılır ve sinyal oluşturur. Her bir döngüde ürün miktarı arttıkça floresan miktarında da ürüne bağlı olarak artış gözlenmektedir (Şekil 2.11.).



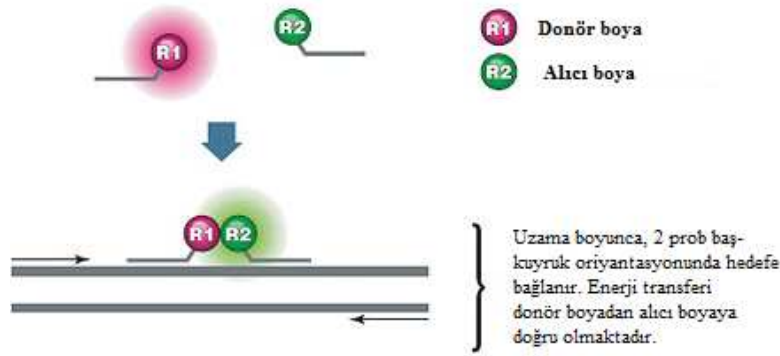
**Şekil 2.11.**TaqMan probu

**-Moleküler Boncuk Yöntemi:** Saç tokası şeklinde olan yapının yuvarlak uç kısmı çoğaltılacak DNA ile komplementer tek zincirli DNA dizisini içermektedir. Bu yapının uç kısımlarında 2 adet florokrom boya bulunmaktadır. Baskılayıcı olan boya diğer boyanın floresanını engellemektedir. Çoğaltılmak istenilen DNA bölgesi PCR reaksiyonu ile çoğalmaya başladığında hedef DNA dizisine göre dizayn edilen probun bu bölgeyle karşılaşması sırasında konformasyonu değişir ve düz çift zincirli hale geçmektedir. Moleküler boncuğun yapısının değişmesiyle boyalar birbirlerinde uzaklaşır ve floresan miktarı artar (Şekil 2.12.).



**Şekil 2.12.** Moleküler boncuk yöntemi

**-Hibridizasyon prob yöntemi:** Bu yöntem ‘LightCycler PCR’ cihazında kullanılmak üzere geliştirilen bir yöntemdir. Hibridizasyon prob sistemi floresan boya ile işaretli iki oligonükleotidden oluşmaktadır. Farklı olarak dizayn edilmiş olan problemlerin 3’ ucunda floresan işaretli boya (donör) , 5’ ucunda alıcı boya (acceptor) bulunmaktadır. PCR reaksiyonu sırasında hedef nükleik asit dizisine bağlanan bu iki prob birbirine yaklaştığında bir enerji yayılımı gerçekleşir (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer). Enerji transferi ‘donör’ boyadan ‘acceptor’ boyaya doğru transfer olmaktadır. Enerji transferi sonucunda oluşan floresan miktarı PCR süresince oluşan ürün miktarı ile doğru olarak artmaktadır (Şekil 2.13) (Velden ve ark., 2003, Cacherill ve ark., 2001).



Şekil 2.13. Hibridizasyon probu

## 2.6.2. Yüksek Çıktılı BAC Tabanlı Moleküler FISH Analizleri

Yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri, FISH ve mikroarray tekniklerini temel alan bir yöntemdir.

Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH), kromozom üzerinde ki spesifik DNA sekanslarının varlığını ya da yokluğunu belirleme ve lokalize etmede kullanılan bir tekniktir. Southern blot tekniğinin bir analogudur. FISH, nükleik asit problemleri aracılığıyla preparat üzerinde bulunan hücresel ya da kromozomal DNA veya RNA'nın incelenmesi temeline dayanan bir tekniktir. Floresan işaretlerle etiketlenen, tamamlayıcı DNA'ya, bu DNA dizilerinin yerleşimini görebilmek için hibridizasyona uğrayan veya bağlanan tek zincirli DNA kısa dizilerini (prob) gerektiren bir yöntemdir (Raap, 1997). FISH yönteminde, hedef DNA/RNA molekülüne komplementer, işaretli nükleik asit dizisine ‘prob’ denilmektedir. Günümüzde, pratik olmaları ve ticari olarak bulunabilmelerinden ötürü direkt ve florokromlarla işaretli problemler kullanılmaktadır. Moleküler tekniklerin sitolojik preparatlara uygulanabileceği gerçeği ilk kez 1969 yılında Gall ve Pardue tarafından ortaya atılmıştır. İlk dönemlerde radyoaktif maddelerin kullanılması bu tekniğin

yavaş ilerlemesine yol açmıştır fakat prob işaretlenmesinde radyoaktif olmayan maddelerin kullanılabileceği ve sinyal güçlendirilmesinde immünokimyasal ajanlardan yararlanılabileceği saptandıktan sonra bu teknikte hızlı bir ilerleme gözlenmiştir. (Levsky ve Singer, 2003)

Tümör hücrelerinde metafaz kromozomu eldesi oldukça güçtür. Elde edilen bu metafaz kromozomlarının morfolojileri, klasik sitogenetik yöntemlerle özellikle yapısal anomalileri ortaya koymakta yetersiz kalabilmektedir. FISH yöntemi interfaz nükleusunda da analizi olanaklı kılması sayesinde kanser genetiğinde kullanılan en önemli tekniklerden birini oluşturmuştur. Bu yöntemle 1-3 Mb boyutları arasındaki aberasyonlar saptanabilmektedir (Durak).

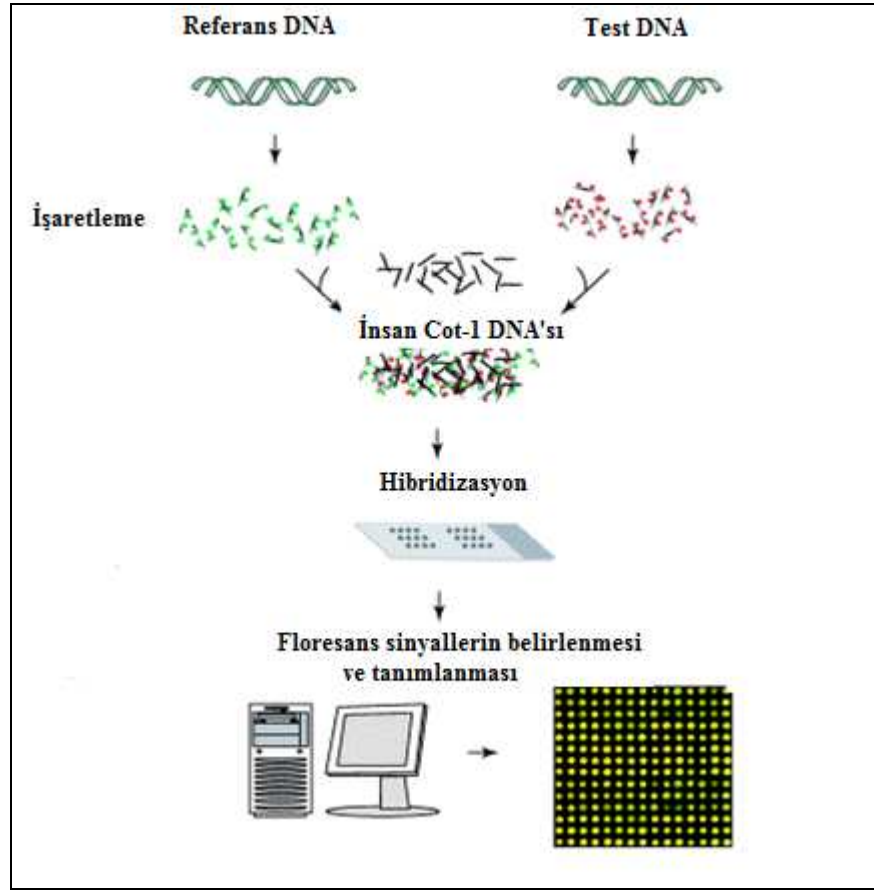
DNA Mikroarray'i, moleküler biyolojide kullanılan multipleks bir teknolojidir. "Features" olarak adlandırılan, her biri prob olarak bilinen pikomol ( $10^{-12}$  mol) seviyesindeki spesifik DNA sekanslarından oluşan binlerce mikroskopik DNA oligonükleotid noktacığının dizilenmiş serilerinden oluşmaktadır. Bu problemler yüksek kararlılık altında cDNA veya cRNA örneğini (hedef olarak bilinen) hibridize etmede kullanılan kısa bir gen parçası veya diğer DNA elementi olabilmektedir. Bir array on binlerce prob içerdiğinden, mikroarray uygulaması birçok genetik testte paralel olarak başarı sağlamaktadır. Bu nedenle array'ler birçok keşfin hızlandırılmasını sağlamışlardır.

Mikroarray teknolojisi fragmente DNA'nın bir substrata tutturulup, bilinen bir gen veya fragment ile problemlenmesi mantığıyla işleyen Southern Blot yönteminden geliştirilmiştir. Mikroarray yöntemindeki temel prensip, iki DNA ipliği arasındaki hibridizasyondur yani; birbirleriyle spesifik olarak, baz çiftleri arasında hidrojen bağları oluşturarak eşleşen komplementer nükleik asit sekanslarının yapısıdır. Nükleotid sekansındaki yüksek sayıdaki komplementer baz çiftleri, iki iplik arasında sıkı bir non-kovalent bağın bulunması anlamına gelmektedir. Nonspesifik olarak bağlanan sekansların yıkanmasından sonra, sadece hibridizasyonda kuvvetlice eşleşen iplikler kalmaktadır. Böylece bir prob sekansına bağlanan floresan işaretli hedef sekanslar, eşleşen bazların sayısı ile belirlenen hibridizasyon gücüne, hibridizasyon şartlarına (sıcaklık gibi) ve hibridizasyon sonrası yıkamaya bağlı olarak sinyal oluşturmaktadır. Bir noktacıktan (feature) gelen toplam sinyal gücü, bu noktacığın üzerinde bulunan problemlere bağlanan hedef örneğin miktarına bağlıdır. Standart mikroarray'lerde problemler, katı bir yüzeye kovalent bağ yardımıyla yüzey mühendisliği yolu ile bağlanmaktadır. Katı yüzeyler; cam veya silikon çipten oluşabilmektedir.

DNA mikroarray'leri ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerin ölçülmesi, SNP'lerin belirlenmesi, mutant genomları sekanslamada veya genotiplemede kullanılmaktadırlar. Kullanım alanlarının önemi, yeni mikroarray platformlarının gelişimine yol açmıştır. Array tabanlı karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (aCGH) teknolojisi de bunlardan biridir. Klasik CGH ile ilgili bazı limitasyonların üstesinden gelmek için araştırmacılar, CGH prensibini mikroarraylerin kullanımı ile birleştirmişlerdir. aCGH'nin temelleri ilk kez 1997 yılında Solinas-Toldo ve arkadaşları tarafından atıldı. İlk olarak hastalıklarla ilişkili spesifik kromozomal bölgelerdeki segmental değişimlerin belirlenmesi amacıyla kullanıldı. Konvansiyonel CGH metodunun üzerine kurulmuş gibi görünsede duyarlılık alanı açısından çok daha ileride olan bir yöntemdir. Bu alandaki gelişmeleri, 1999 yılında Pollack ve arkadaşları tarafından array platformu üzerine cDNA dizisini (hedef) immobilize edilmesi ve DNA kopya sayısındaki değişimleri genom düzeyinde ortaya çıkarılması izlemiştir (Lockwood ve ark., 2006).

aCGH metodunda ilk basamağını, iki genomik DNA örneğinin (test edilecek ve referans olacak örnek) farklı renkte florokromlarla: Siyanin 3 (Cy3) ve Siyanin 5 (Cy5) işaretlenmesi oluşturmaktadır. Art arda tekrarlanan bölgelerden kaynaklanabilecek hatalı eşleşmeler Cot-1 DNA ile bloke edilmektedir. Bu aşamayı, çeşitli türevlerde olan problemlerin cam matris üzerine immobilizasyonu takip etmektedir. Uygun sıcaklık ve sürede gerçekleşen hibridizasyon aşamasından sonra bilgisayar ortamında çeşitli analiz programları ile floresan sinyaller tanımlanarak sonuçlar yorumlanmaktadır. (Şekil 2.14) (Redon ve ark., 2009). aCGH metodunda metafaz kromozomları kullanmak yerine, prob olarak bilinen küçük DNA segmentlerinin düzenli bir şekilde yerleştirilmesiyle tasarlanan slaytlar kullanılmaktadır (Lucito ve ark., 2003).

aCGH metodunda kullanılan platformlar oligonükleotidler (yaklaşık 60 baz çifti) ve büyük genomik DNA klonları olmak üzere iki esas kategoriye ayrılmaktadır (Strefford ve Parker, 2009). Bakteri yapay kromozomu (Bacterial Artificial Chromosomes; BAC) büyük genomik DNA klonları arasında yer almaktadır. Prob olarak kullanılan bakteri yapay kromozomlarının uzunluğu 150-200 kb arasında değişmektedir (Ylstra ve ark. 2006). Farklı aCGH platformlarının genomik çözünürlüğü, DNA problemlerinin aralık ve uzunlukları ile belirlenmektedir. BAC platformları yaklaşık olarak 1 Mb'lık rezolüsyona sahiptirler. Yani genomda ki 1.000.000 baz çiftini örtmektedirler. Tüm genomun yaklaşık olarak 3 milyar bazdan oluştuğunu düşünürsek genomun 1/3000' ini BAC aCGH metodunda görebiliriz (Strefford ve Parker, 2009).



**Şekil 2.14.** aCGH tekniğinin basamakları

Bu metodun temel avantajları arasında tekrarlanabilirliğinin yüksek olması, hibridizasyon aşamasının kolay bir şekilde gerçekleşmesi ve yüksek işaretleme başarısı yer almaktadır (Cowell, 2004).

FISH ve BAC aCGH metodlarını baz alan, yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri tekniğinde, hedef genlerdeki genomik değişikliklerin bulunması ve haritalanması BAC problemleri sayesinde, FISH metodu esas alınarak sağlanmaktadır ve bu teknik hematolojik malignitelerin tanısına yeni bir yaklaşım sağlamaktadır. Bu metod konvansiyonel yöntemlere göre oldukça hızlı ve kolay analiz olanağı sağladığından lösemi olgularının tanısı ve takibinde önem taşıyan genomik değişikliklerin izlenmesinde oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Konvansiyonel tekniklerden farklı olarak bu yöntemle, birden çok delesyon-duplikasyon bölgeleri aynı anda taranabilmekte ve hematolojik bir yaklaşım sağlamaktadır. Bu nedenle bu metod yüzlerce FISH analizine eş değer bir methodur (Horsley ve ark., 2006, Suela ve ark., 2007).

Yüksek Çıktılı FISH Analiz platformları hematolojik malignitelerle ilişkili somatik kromozomların 31 bölgesini (1p34, 1p13, 1q12, 1q21, 1q22, 1q43-44, 2p24, 3p24.2, 4q12, 5q13, 5q31, 6q23.3, 7q22, 7q32, 7q34, 8q24, 9p21, 9q34, 11q13, 11q22.3, 11q23.3, 12q15, 13q12.2, 13q14.3, 13q14, 17p13.1, 17q21.1, 20q12-q13.12, 20q12, 21q22, 22q11.2.) içermektedir. Bu yöntemin temel dezavantajı ise dengeli düzenlenmeleri saptayamamasıdır.

### 3. GEREÇ-YÖNTEM

#### 3.1. Yöntem

Çalışmada, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Genetik laboratuvarına rutin tanı amaçlı genetik inceleme için Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji Servis ve Polikliniğinden ve Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Onkoloji Servis ve Polikliniği tarafından gönderilen 47 hasta yer aldı. Çalışmadaki hastalar; cinsiyet farkı gözetmeksizin 18-80 yaş arası KML veya AML tanısı/ön tanısı almış olanlar arasından seçilmiştir. Her bir hastadan mor kapaklı EDTA'lı hemogram tüpüne yaklaşık 3 ml. periferik kan alındı ve kan materyalinin 500 uL kadarı Yüksek Çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizi çalışması için genomik DNA izolasyonunda kullanıldı. DNA izolasyonu için MagNA Pure Compact Nükleik Asit İzolasyon Kiti I (Roche Diagnostic GmbH Germany) kullanıldı. DNA kalitesi agaroz jel elektroforezi ile kantitesi ise spektrofotometre (NanoDrop ND-1000; NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) kullanılarak tayin edildi. Yüksek Çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizi platformu olarak CytoChip Focus Haematology (BlueGnome Limited, Cambridge, UK) slaytı kullanıldı. Yeterli kalite ve kantiteye sahip hasta DNA'sı ve referans DNA (Human Genomic DNA: Male/Female; Promega Corporation, Madison, USA) CytoChip protokolüne uygun olarak lekelendi. Lekelenen hasta DNA'sı ile referans DNA birleştirildi ve protokole uygun olarak CytoChip Focus High Throughput FISH analysis (BlueGnome Limited, Cambridge, UK) formatındaki slaytlar ile 47°C' lik su banyosunda ( GFL®, 1003, Germany) 16-21 saat hibridizasyona bırakıldı. Hibridizasyon süresi sonunda CytoChip protokolüne uygun olarak yıkanan slaytlar, Agilent Mikroarray G2505B tarayıcı (Agilent Microarray Scanner; Agilent Technologies, Palo Alto, CA) ile tarandı. Görüntü yoğunluğu verileri kaydedildi ve BlueGnome'un BlueFuse Multi v2.0 (BlueGnome Limited, Cambridge, UK) analiz programı kullanılarak analiz edildi. Analiz sonrası elde edilen görüntü ve gen listesi kaydedildi. Hastalardan alınan periferik kan örneğinin 500 uL kadarı Real-Time PCR çalışması için RNA izolasyonunda kullanıldı. RNA izolasyonu için High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) kullanıldı. RNA kantitesi spektrofotometre (NanoDrop ND-1000; NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) kullanılarak tayin edildi. Yeterli kalite ve kantiteye sahip hasta RNA'larından cDNA sentezlendi (LightCycler<sup>®</sup> t(9;22) Quantification Kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Elde edilen cDNA örneklerinden t(9;22) (LightCycler<sup>®</sup> t(9;22) Quantification Kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim,



Germany), t(15;17) (PML-RAR Kit, Way2Gene Tibmolbiol Syntheselabor GmbH, Berlin, Germany) ve t(4;11) (Way2Gene Tibmolbiol Syntheselabor GmbH, Berlin, Germany) translokasyonları LightCycler 1.5 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) cihazında saptandı ve LightCycler Software v3.5 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) yazılım programında kantifikasyon ve erime eğrisi analizleri gerçekleştirildi. Çalışmanın etik açıdan uygunluğu, Kocaeli Üniversitesi Etik Kurulu tarafından değerlendirildi ve onaylandı. Çalışmada yer alan her hasta, aydınlatılmış onam formunu imzalamış ve çalışmada yer almayı kabul etmiştir.

### **3.1.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu**

Toplanan örneklerden MagNA Pure Compact Instrument cihazı kullanılarak magnetik yöntem ile DNA elde edildi. Çalışmada DNA eldesi için MagNA Pure Compact Nükleik Asit İzolasyon Kit I (Roche Diagnostics GmbH, Germany) kullanıldı. İzolasyon kitinin kartuşu cihazın yuvasına yerleştirildikten sonra hastanın 500 µL örneği 2 ml'lik ependorf tüpe konularak cihazda ilgili yerlere yerleştirildi. Son olarak DNA toplanacak (elution) tüpler cihaza yerleştirildikten sonra cihaz çalıştırılarak 25 dakika içinde 100 µL izole edilmiş DNA elde edildi. 260 ve 280 nm dalga boyundaki absorbanslar spektrofotometre (NanoDrop, ND-1000 ) kullanılarak ölçüldü.  $A_{260}/A_{280}$  oranı 1,7 ile 2.0 arasında olan DNA'lar çalışmaya alındı.

### **3.1.2. Periferik Kandan RNA İzolasyonu**

Toplanan örneklerden High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) kullanılarak RNA izolasyonu işlemi gerçekleştirildi.

1. 1,5 mL'lik ependorf tüpe 1000 µl Red Blood Cell Lysis Buffer ve 500 µl kan veya kemik iliği pipetlendi.
2. Karışım 15-25 C° de 10 dakika çalkalandı.
3. Sonrasında karışım 2500 rpm, 15-25 C° de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatant atıldı. Pelletin üzerine 1000 µl Red Blood Cell Lysis Buffer eklendi.
4. Karışım 2500 rpm, 15-25 C° de 3 dakika santrifüj edildi. Supernatant atıldı. Pellet üzerine 200 µl PBS ve 400 µl Lysis/Binding Buffer eklenip karışım 15 saniye vortekslendi.
5. Karışımın tümü High-Pure Filter kolonuna eklenip 8000 g'de 15 saniye santrifüj edildi.
6. Kolonun dibinde toplanan sıvı atıldı. Filtre yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne konuldu.
7. Filtreye 500 µl Wash Buffer I eklendi ve 8000 g'de 15 saniye santrifüj edildi.
8. Kolonun dibinde toplanan sıvı atıldı. Filtre yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne konuldu.

9. Filtreye 500 µl Wash Buffer II eklendi ve 8000g'de 15 saniye santrifüj edildi.
10. Kolonun dibinde toplanan sıvı atıldı. Filtre yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne konuldu.
11. Filtreye 200 µl Wash Buffer II eklendi ve maksimum devirde 2 dakika santrifüj edildi.
12. Kolonun dibinde toplanan sıvı atıldı.
13. Tüp boş olarak maksimum devirde 1 dakika santrifüj edildi.
14. Filtre 1,5 ml'lik eppendorf tüp içine yerleştirildi ve üzerine 50 µl Elution Buffer eklendi.
15. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildikten sonra 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Filtre atıldı. Elde edilen RNA miktarı 260 ve 280 nm dalga boyundaki absorbanlar spektrofotometre (NanoDrop, ND-1000 ) kullanılarak ölçüldü.  $A_{260}/A_{280}$  oranı 1,8 ile 2,0 arasında olan RNA'lar çalışmaya alındı.

### 3.1.3. DNA ve RNA'ların Kantite ve Kalite Tayini

DNA ve RNA'ların kantitesi NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) cihazında DNA için DNA-50, RNA için RNA-40 opsiyonu kullanılarak yapıldı. DNA ve RNA'ların 260/280 oranlarının 1,8-2,0 arası; 260/230 oranlarının ise 2,0 ve üzeri olmasına dikkat edildi.



**Şekil 3.1.** NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE)

DNA ve RNA'ların kalite tayinleri agaroz jel elektroforez yöntemi ile yapıldı. Ön işlem olarak 1XTBE hazırlandı. Bu işlem için 100 mL 10XTBE (Tris, Borik Asit, EDTA- AppliChem, Germany) 900 mL distile su içinde çözüldü. % 1'lik agaroz jel hazırlamak için 0.5 g agaroz tartılıp 50 ml 1XTBE içerisinde kaynatılarak çözüldü. Çözünen agaroz jelin içine 2 µL etidyum bromid eklenerek jel içinde homojen olarak dağılması sağlandı. Katılaşmayacak kadar soğutulan agaroz çözeltisi tarak içeren jel tablasına dökülerek jelin

polimerleşmesi beklendi. Jel içine yerleştirilmiş tarak çıkartıldıktan sonra oluşan kuyuların ilkinde markır yüklendi. Örnek ürün miktarı 80-100 ng olacak şekilde, 1,5 µL yükleme boyası, 5 µL nükleaz içermeyen su ile karıştırılarak pipetlendi. Jel elektroforez tankı güç kaynağına bağlandı ve 50 amper, 100 voltta 60 dakika yürütüldü. Jelde yürütülen ürünler UV transillüminatör ile görüntülenip, fotoğrafı çekilerek değerlendirildi.

### 3.1.4. Yüksek Çıktılı BAC Tabanlı Moleküler FISH Analizi Metodu

#### 3.1.4.1. DNA Lekeleme

1. 0,2 mL'lik PCR tüplerine DNA miktarı 50 µl de 400 ng olacak şekilde nükleaz içermeyen su ve genomik DNA konuldu. DNA ve nükleaz içermeyen su miktarı 23 µl olacak şekilde ayarlandı.
2. Lekeleme karışımı aşağıda verildiği gibi hazırlandı ve genomik DNA üzerine eklendi.

Lekeleme Karışımı	Miktar
Reaction buffer	10 µl
Cy3-dCTP veya Cy5-dCTP	1 µl
Primer solution	10 µl
dCTP-Labelling Mix	5 µl
Toplam Hacim	26 µl

3. Örnekler 94 C°'de 5 dakika inkübe edilip, süre sonunda buz üstünde 5 dakika bekletildiler.
4. Karışımın üzerine 1 µl Klenow enzimi eklendi.
5. 2000 g' de 30 saniye santrifüj edildi.
6. Karışım 37 C° 'de 16-20 saat inkübasyona bırakıldı.
7. İnkübasyon sonrası karışıma 5 µl EDTA solüsyonu pipetlendi.
8. 2000 g' de 30 saniye santrifüj edildi.

#### 3.1.4.2. DNA' nin Pürifikasyonu

Pürifikasyon aşamasının ilk basamağını Autoseq™ G50 kolonlarının hazırlanması işlemi oluşturdu.

1. Kolonlar vortekslendi.
2. Kolonların kapakları ¼ oranında açılıp dip kısımdaki kapak kırıldı.
3. Kolonlar 2 ml'lik toplama tüplerine yerleştirilip 2000 g' de 1 dakika santrifüj edildiler.
4. Toplama tüpleri atıldı. Kolonlar 1,5 ml'lik eppendorf tüplere yerleştirildi.

5. Örnekler kolonlara yüklenip 2000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
6. Kolonlar atıldı. Pürifiye olmuş örnekler NanoDrop, ND-1000 cihazı kullanılarak A<sub>260</sub> nm (DNA), A<sub>550</sub> (Cy3) ve A<sub>650</sub> (Cy5) absorbans değerleri ölçüldü. DNA miktarının 180-325 ng / µl ve boya katılım miktarının 6-15 pmol / µl olmasına dikkat edildi.

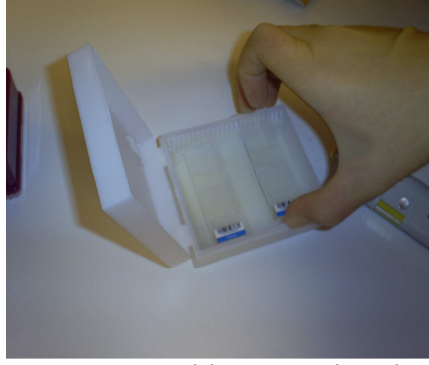
### 3.1.4.3. Örneklerin Kurutulması

1. Her bir hasta DNA'sı ile Referans DNA'sı aynı tüpte birleştirildi.
2. Birleşimin üzerine 25 µl COT-I Human DNA eklendi.
3. 60 C°'de, yüksek vakumda, 60 dakika örnekler kurutuldu.

### 3.1.4.4. Hibridizasyon

Hibridizasyon işlemine geçmeden önce 20XSSC (Sodyum Salin Sitrat) ve 2XSSC + %50 formamid karışımı hazırlandı. 20XSSC; 175,3 gr NaCl (3M'lik) ve 88,2 gr Sodyum Sitratın tartılıp 1000 ml'ye kadar deiyonize suyla tamamlanmasıyla hazırlandı. Bu karışımın çözünmesi magnetik karıştırıcı kullanılarak sağlandı. Elde edilen 20X SSC'nin pH'ı 7 olarak ayarlandı. 2XSC + %50 formamid karışımı; 1ml 20X SSC (pH: 7), 5 ml formamid ve 4 ml deiyonize su konularak hazırlandı. Daha sonra slayt kutusu içerisine kurutma kağıtları yerleştirildi ve 2XSSC + % 50 formamid karışımı ile kurutma kağıtlarının çok iyi ıslanması sağlandı. Bu ön hazırlıklardan sonra aşağıdaki basamaklara geçildi.

1. Kurutulan örnekler üzerine 75 °C'de ısıtılmış Dekstran Sülfat (DS) Hibridizasyon solüsyonundan 21 µl eklendi.
2. Örnekler 75 °C'de 10 dakika denatüre edildi. Pelletin iyice çözünmesi elle karıştırılarak sağlandı.
3. Örnekler tekrar 75 °C'de 10 dakika denatüre edildi.
4. Her örnekten 19 µl CytoChip Focus High Throughput FISH analysis slaytlarına yükleme yapıldı.
5. Yükleme yapılan slaytlar önceden hazırlanmış olan slayt kutusunun içerisine yerleştirildi ve slayt kutusu parafinle sarıldı (Şekil 3.2.).



**Şekil 3.2.** Yükleme yapılan slaytlar

6. İçerisinde yükleme yapılan slaytlar olan slayt kutusu 47 °C' lik su banyosunda 16-21 saat hibritlenmeye bırakıldı.

### 3.1.4.5. Yıkama

Yıkama işlemine geçmeden önce aşağıda gösterilen solüsyonlar hazırlandı.

<b>2XSSC + %0,05 Tween20 Karışımı Hazırlanışı</b>	
• 100 ml 20XSSC (pH=7)	
• 0,5 ml Tween20	→ 1000 ml' ye tamamlandı
<b>1XSSC Hazırlanışı</b>	
• 25 ml 20XSSC (pH=7)	→ 500 ml'ye tamamlandı.
<b>0,1XSSC Hazırlanışı</b>	
• 5 ml 20XSSC (pH=7)	→ 1000 ml' ye tamamlandı.

1. 3 adet 1000 ml'lik cam kap ve 1 adet şale çıkarıldı.

2. Yıkama işlemine geçmeden önce HYBEX Incubator içerisine 0,1XSSC solüsyonu koyulup sıcaklığın 60 C°'ye çıkması sağlandı.

3. Yıkama işlemi aşağıdaki koşullar altında gerçekleştirildi.

	Yıkama Solüsyonu	Koşul	İşlem
Şalede	2xSSC + %0,05 Tween 20	Oda sıcaklığı	2 dakika içerisinde lamellerin düşmesi sağlandı
1.Kap	2xSSC + %0,05 Tween 20	Oda sıcaklığı 10 dakika manyetik karıştırıcı ile	CytoChip Focus High Throughput FISH analysis slaytları yıkandı
2.Kap	1xSSC	Oda sıcaklığı 10 dakika manyetik karıştırıcı ile	CytoChip Focus High Throughput FISH analysis slaytları yıkandı

HYBEX İnkübatör	0,1x SSC	HYBEX İnkübatör içerisinde 5 dakika bekletildi	CytoChip Focus High Throughput FISH analysis slaytları yıkandı
3.Kap	0,1xSSC	Oda sıcaklığında 1 dakika bekletilir	CytoChip Focus High Throughput FISH analysis slaytları yıkandı

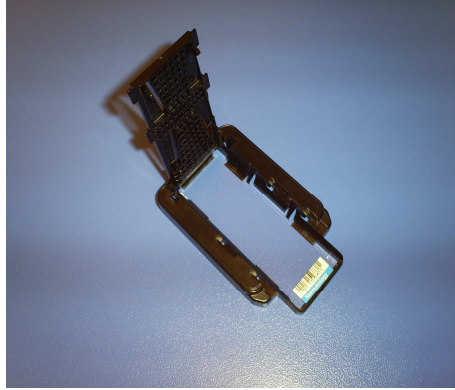


**Şekil 3.3.** HyBex İnkübatörde yıkanan slaytlar

4. Yıkanan slaytlar falkon tüpe yerleştirildi.
5. 200 g'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra hızlı bir şekilde çıkartılıp, tarama işlemine geçildi.

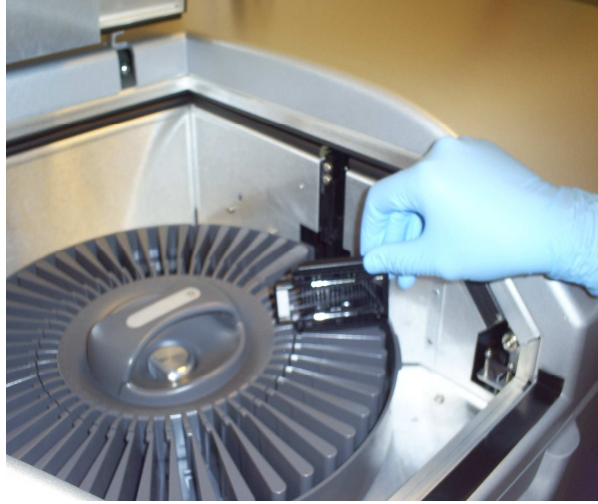
#### **3.1.4.6. Tarama**

1. Slaytlar Haematology kısımları üste gelecek şekilde tarayıcı kasetlerine yerleştirildi.



**Şekil 3.4.** Tarayıcı kasete yerleştirilen slayt

2. Tarayıcı karuselinde "Home" pozisyonu haricindeki numaralı her yere slayt'lar yerleştirilebilir (Şekil 3.5.).



**Şekil 3.5.** Tarayıcı karuseline yerleştirilen slaytlar

3. Agilent tarayıcı yazılım programı, masa üstündeki “Agilent Scan Control” ikonu yardımıyla açıldı.
4. Tarama işlemi aşağıdaki ayarlara göre yapıldı.

Slayt	Slayt’lar karusel üzerinde kaç numaralı pozisyonlarda yerleştirilmişse işaretlendi
Tarama alanı (Scan Region)	52 x 19.50 mm
Channels (Kanallar)	Red&Gren
Resolution (Rezolüsyon)	10 um
TIFF	16 bit
PMT	%100
XDR	İşaretlenmeyecek
Browse	Tarayıcıdan çıkan görüntünün kayıt yeri seçildi

5. Ayarlama işlemi bitince “Scan Slot” ikonuna basıldı ve tarama işlemi başlatıldı.

#### **3.1.4.7. Veri Analizi**

Tarama işleminden sonra elde edilen veriler TIF uzantılı dosyalardır. Bu dosyadan, Feature Extraction yazılım programı ile txt, xml, pdf gibi uzantısı olan ve slayt hakkında çeşitli bilgiler içeren dosyalar oluşturuldu. Bu dosyalardan pdf uzantılılar kalite kontrol (QC-Quality Control) dosyaları olup hibridizasyonun kalitesi hakkında çeşitli parametreler sunmaktaydı. Sonuçların doğruluğu için kalite kontrol dosyalarındaki parametreler kontrol edildi. Veriler BlueFuse Multi v2.0 analiz programı aracılığıyla analiz edildi. Analiz aşamasından sonra elde edilen görüntü ve gen listesi kaydedildi.

#### **3.1.5. Real-Time PCR Metodu**

### 3.1.5.1. cDNA Aşaması

1. t(9;22) (Light cyclers t(9;22) quantification kit) kitinin içerisinde çıkan üç standart (9a, 9b ve 9c), pozitif kontrol, negatif kontrol ve hastalar için birer 0,2 ml'lik PCR tüpleri hazırlandı.
2. Her bir hasta için hazırlanmış olan PCR tüplerine 10µL hasta RNA'sı pipetlendi. Thermal cyclers (Applied Biosystems 2720) da 65 °C'de 10 dakika denatüre edildi.
3. Tüp sayısı kadar aşağıda gösterilmiş olan cDNA karışımı hazırlandı.

Materyal	Reaksiyon Başına
H <sub>2</sub> O	4,4 µl
RT Buffer	4,0 µl
Random Primer p(dN) <sub>6</sub>	0,2 µl
AMV Reverse Transcriptase	0,4 µl
RNase Inhibitor	0,6 µl
Deoxynucleotid mix	0,4 µl

4. Karışımından 0,2 ml'lik tüplere 10'ar µl pipetlendi.
5. Thermal cyclers cihazında aşağıda verilen PCR protokolü uygulandı.

Sıcaklık (°C)	Süre (Dakika)
37°C	60 dakika
65°C	10 dakika
4°C	∞

6. Elde edilen cDNA örneği -20°C'de muhafaza edildi.

### 3.1.5.2. t(9;22) LightCycler (LC) aşaması

cDNA eldesinden sonra LC aşaması için aşağıda verilen 2 farklı karışım hazırlandı.

G6PDH Karışımı		BCR-ABL Karışımı	
Materyal	Reaksiyon başına	Materyal	Reaksiyon başına
H <sub>2</sub> O	9,2 µl	H <sub>2</sub> O	6,8 µl
Reaction mix, 10x	2 µl	Reaction mix, 10x	2 µl
G6PDH Detection mix	3,8 µl	t (9;22) Detection mix	6,2 µl



1. Her bir örnek için 2 tane LC kapiller tüpü kullanıldı.
2. Hastaya ait cDNA örneğinden 5µL kapiller tüpü içerisine pipetlendi.
3. cDNA'lar üzerine 15µL G6PDH ve BCR-ABL karışımı pipetlendi.
4. Kapiller tüpler LightCycler® 1.5 (Roche Diagnostic GmbH, Germany) cihazına yüklendi ve aşağıda gösterilen programlarda çalışma gerçekleşti.

<b>Denatürasyon</b>	
Döngü program verileri	Değer
Döngü sayısı	1
Analiz modu	Yok
Sıcaklık Hedefi	Segment 1
Hedef Sıcaklık (C°)	95
İnkübasyon Zamanı	00:30
Sıcaklık Değişim Hızı (C° /saniye)	20.0
Basamak Ölçüsü	0
Basamak Gecikmesi (Döngülerde)	0
Kazanım modu	Yok

<b>Amplifikasyon</b>			
Döngü program verileri	Değer		
Döngü sayısı	45		
Analiz modu	Kantifikasyon		
Sıcaklık Hedefi	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Hedef Sıcaklık (C°)	95	64	72
İnkübasyon Zamanı	00:00:01	00:00:10	00:00:26
Sıcaklık Değişim Hızı (C° /saniye)	20.0	20.0	2.0
Basamak Ölçüsü	0.0	0.0	0.0
Basamak Gecikmesi (Döngülerde)	0	0	0
Kazanım modu	Yok	Tek	Yok

<b>Erime Eğrisi</b>			
Döngü program verileri	Değer		
Döngü sayısı	1		
Analiz modu	Yok		
Sıcaklık Hedefi	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Hedef Sıcaklık (C°)	95	42	80
İnkübasyon Zamanı	00:01:00	00:02:00	00:00:00
Sıcaklık Değişim Hızı (C° /saniye)	20.0	20.0	0.1
Basamak Ölçüsü	0.0	0.0	0.0
Basamak Gecikmesi (Döngülerde)	0	0	0
Kazanım modu	Yok	Yok	Devam

<b>Soğutma</b>	
Döngü program verileri	Değer
Döngü sayısı	1
Analiz modu	Yok
Sıcaklık Hedefi	Segment 1
Hedef Sıcaklık (C°)	40
İnkübasyon Zamanı	00:00:60
Sıcaklık Değişim Hızı (C° /saniye)	20.0
Basamak Ölçüsü	0.0
Basamak Gecikmesi (Döngülerde)	0
Kazanım modu	Yok

5. Çalışma bittikten sonra kantifikasyon analizi yapıldı.
6. Analiz sonrası bcr-abl değeri olanlar pozitif, olmayanlar negatif kabul edildi.
7. Pozitif olanlara sonuçlar verilirken bcr-abl değeri G6PDH değerine bölünerek füzyon değeri hesaplandı.

### 3.1.5.3. t(15;17) LightCycler (LC) aşaması

cDNA eldesinden sonra LC aşaması için aşağıda verilen 2 farklı karışım hazırlandı

G6PDH Karışımı		PML-RAR Karışımı	
Materyal	Reaksiyon başına	Materyal	Reaksiyon başına
H <sub>2</sub> O	9,2 µl	H <sub>2</sub> O	7 µl
Reaction mix, 10x	2 µl	Tib Molbiol 16x PML-RAR	4 µl
G6PDH Detection mix	3,8 µl	LC FastStart DNA Master HybProbe	4 µl

1. Her bir örnek için 2 tane LC kapiller tüpü kullanıldı.
2. Hastaya ait cDNA örneğinden 5µL kapiller tüpü içerisine pipetlendi.
3. cDNA'lar üzerine 15µL G6PDH ve PML-RAR karışımı pipetlendi.
4. Kapiller tüpler LightCycler® 1.5 cihazına yüklendi ve aşağıda gösterilen programlarda çalışma gerçekleşti.

Denatürasyon	
Döngü program verileri	Değer
Döngü sayısı	1
Analiz modu	Yok
Sıcaklık Hedefi	Segment 1
Hedef Sıcaklık (C°)	95
İnkübasyon Zamanı	00:10:00
Sıcaklık Değişim Hızı (C° /saniye)	20.0
Basamak Ölçüsü	0.0
Basamak Gecikmesi (Döngülerde)	0
Kazanım modu	Yok

Amplifikasyon			
Döngü program verileri	Değer		
Döngü sayısı	45		
Analiz modu	Kantifikasyon		
Sıcaklık Hedefi	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Hedef Sıcaklık (C°)	95	59	72
İnkübasyon Zamanı	00:00:05	00:00:15	00:00:10
Sıcaklık Değişim Hızı (C° /saniye)	20.0	20.0	20.0
Basamak Ölçüsü	0.0	0.0	0.0
Basamak Gecikmesi (Döngülerde)	0	0	0
Kazanım modu			

<b>Erime eğrisi</b>			
Döngü program verileri	Değer		
Döngü sayısı	1		
Analiz modu	Yok		
Sıcaklık Hedefi	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Hedef Sıcaklık (C°)	95	40	85
İnkübasyon Zamanı	00:00:20	00:00:20	00:00:00
Sıcaklık Değişim Hızı (C° /saniye)	20.0	20.0	0.2
Basamak Ölçüsü	0.0	0.0	0.0
Basamak Gecikmesi (Döngülerde)	0	0	0
Kazanım modu	Yok	Yok	Devam

<b>Soğutma</b>	
Döngü program verileri	Değer
Döngü sayısı	1
Analiz modu	Yok
Sıcaklık Hedefi	Segment 1
Hedef Sıcaklık (C°)	40
İnkübasyon Zamanı	00:00:30
Sıcaklık Değişim Hızı (C° /saniye)	20.0
Basamak Ölçüsü	0.0
Basamak Gecikmesi (Döngülerde)	0
Kazanım modu	Yok

5. Çalışma bittikten sonra erime eğrisi analizi işlemi gerçekleştirildi.

### 3.1.4.4. t(4;11) LightCycler (LC) aşaması

cDNA eldesinden sonra LC aşaması için aşağıda verilen 2 farklı karışım hazırlandı.

t(4;11) Karışımı	
Materyal	Reaksiyon başına
H <sub>2</sub> O	3,4 µl
Mg	1,6 µl
TEL-C primer	2 µl
AML1 primer	2 µl
FL prob	2 µl
LC prob	2 µl
M mix	2 µl

G6PDH Karışımı	
Materyal	Reaksiyon başına
H <sub>2</sub> O	9,2 µl
Reaction mix, 10x	2 µl
G6PDH Detection mix	3,8 µl

1. Her bir örnek için 2 tane LC kapiller tüpü kullanıldı.
2. Hazırlanan iki karışım kapiller tüplerine 15µL olacak şekilde pipetlendi.
3. Karışımlar üzerine hastalara ait olan 5µL cDNA örneği ilave edildikten sonra 20 µl'lik son reaksiyon hacmi standardize edildi.
4. Kapiller tüpler LightCycler® 1.5 cihazına yüklendi ve aşağıda gösterilen programlarda çalışma gerçekleştirildi.

Denatürasyon	
Döngü program verileri	Değer
Döngü sayısı	1
Analiz modu	Yok
Sıcaklık Hedefi	Segment 1
Hedef Sıcaklık (C°)	95
İnkübasyon Zamanı	00:10:00
Sıcaklık Değişim Hızı (C° /saniye)	20.0
Basamak Ölçüsü	0.0
Basamak Gecikmesi (Döngülerde)	0
Kazanım modu	Yok

<b>Amplifikasyon</b>			
Döngü program verileri	Değer		
Döngü sayısı	45		
Analiz modu	Kantifikasyon		
Sıcaklık Hedefi	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Hedef Sıcaklık (C°)	95	55	72
İnkübasyon Zamanı	00:00:10	00:00:10	00:00:30
Sıcaklık Değişim Hızı (C° /saniye)	20.0	20.0	20.0
Basamak Ölçüsü	0.0	0.0	0.0
Basamak Gecikmesi (Döngülerde)	0	0	0
Kazanım modu	Yok	Tek	Yok

<b>Erime eğrisi</b>			
Döngü program verileri	Değer		
Döngü sayısı	1		
Analiz modu	Erime eğrisi		
Sıcaklık Hedefi	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Hedef Sıcaklık (C°)	95	40	85
İnkübasyon Zamanı	00:01:00	00:02:00	00:00:00
Sıcaklık Değişim Hızı (C° /saniye)	20.0	20.0	0.2
Basamak Ölçüsü	0.0	0.0	0.0
Basamak Gecikmesi (Döngülerde)	0	0	0
Kazanım modu	Yok	Yok	Devam

<b>Soğutma</b>	
Döngü program verileri	Değer
Döngü sayısı	1
Analiz modu	Yok
Sıcaklık Hedefi	Segment 1
Hedef Sıcaklık (C°)	40
İnkübasyon Zamanı	00:00:30
Sıcaklık Değişim Hızı (C° /saniye)	20.0
Basamak Ölçüsü	0.0
Basamak Gecikmesi (Döngülerde)	0
Kazanım modu	Yok

5. Çalışma bittikten sonra erime eğrisi analizi işlemi gerçekleştirildi.

#### 4. BULGULAR

Çalışmada, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Genetik laboratuvarına Şubat 2010 – Nisan 2011 tarihleri arasında rutin tanı amaçlı genetik inceleme için Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji Servis ve Polikliniğinden ve Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Onkoloji Servis ve Polikliniği tarafından gönderilen 47 hasta yer aldı. Toplam 47 hastanın 36'sı (% 77) AML, 11'i (% 23) KML tanısı almıştı. Çalışmadaki toplam kadın sayısı 24 (% 51), erkek sayısı ise 23 (% 49) idi. AML tanılı kadın ve erkek hasta sayısı birbirine eşit olmak üzere 18'er (% 50) kişiydi. KML tanılı kadın hasta sayısı 6 (% 54,5), erkek hasta sayısı 5 (% 45,5) idi. Çalışmadaki toplam erkek/kadın oranı 0,96, AML tanılı hastalarda erkek/kadın oranı 1, KML tanılı hastalarda erkek/kadın oranı 0,83 idi. Çalışmaya dahil edilen hastaların cinsiyet dağılımı çizelge 4.1.'de özetlenmiştir.

**Çizelge 4.1.** Cinsiyetin hastalar üzerindeki dağılımı

	Tanı			
		AML (n=36)	KML (n=11)	Toplam (n=47)
Cinsiyet (n,%)	Erkek	18 (%50)	5 (%45,5)	23 (%49)
	Kadın	18 (%50)	6 (%54,5)	24 (%51)

Çalışmaya katılan tüm hastaların yaş ortalaması  $47,2 \pm 14,4$  (22-81), erkek hastaların yaş ortalaması  $47,9 \pm 12,8$  (31-79), kadın hastaların yaş ortalaması  $45,9 \pm 16,1$  (22-81) olarak hesaplandı. AML ve KML tanılı hastaların cinsiyetlerine göre yaş ortalaması dağılımları çizelge 4.2'de özetlenmiştir.

**Çizelge 4.2.** AML-KML tanılı hastaların yaş ortalaması dağılımı

	Tanı			
		AML	KML	Toplam
Yaş (Ortalama $\pm$ SS) (Alt - Üst Değer)	Erkek	$47,5 \pm 11,9$ (31-67)	$49,2 \pm 17,1$ (36-79)	$47,9 \pm 12,8$ (31-79)
	Kadın	$46,3 \pm 15$ (26-81)	$44,8 \pm 20,6$ (22-72)	$45,9 \pm 16,1$ (22-81)
	Toplam	$46,9 \pm 13,3$ (26-81)	$46,8 \pm 18,3$ (22-79)	$47,2 \pm 14,4$ (22-81)



Çalışmaya katılan AML hastalarından 12'si (% 33,3) tedavileri sırasında exitus oldu. Exitus olanlar çalışmaya katılan tüm hastaların % 25,5'ini oluşturmaktadır. Exitus hastaların yaş ortalaması  $45,8 \pm 13,1$  (26-67) olarak hesaplandı. Toplam 12 hastanın 6'sı (% 50) kadın, 6'sı (%50) erkek idi. Exitus olan 12 hastanın 4'ü (% 33,3) sınıflandırılmayan grupta, 3'ü (%25) M3 alt tipinde, 2'si M2 (%16,7), diğer 2'si (%16,7) MDS'den AML dönüşüm göstermiş, 1'i ise (% 8,3) M5 alt tipindeydi. (Çizelge 4.3.)

**Çizelge 4.3.** Exitus olan hastaların AML alt tiplerine göre dağılımı

Alt Tip	N	%
Sınıflandırılmayan Grup	4	% 33,3
M3	3	% 25
M2	2	%16,7
MDS→AML	2	% 16,7
M5	1	% 8,3
Toplam	12	% 100

Hastaların hastaneye başvurusundaki şikâyetleri arasında; birinci sırada halsizlik (% 67), ikinci sırada ateş (% 31), daha sonra yorgunluk (% 25), burun kanaması (% 17) ve nefes darlığı (% 11,1) görüldü. Diğer şikâyetler arasında bacakta morarma, bulantı, kusma, kilo kaybı, sık enfeksiyon geçirme yer almıştır.

Organomegali bilgisine ulaşılan 32 hastanın 2'sinde (% 6,3) yalnızca hepatomegali, 5'inde (%15,6) yalnızca splenomegali, 14'ünde ise (% 43,8) hepatosplenomegali tespit edilmiştir. Hastaların organomegali özellikleri çizelge 4.4'te özetlenmiştir.

**Çizelge 4.4.** Hastaların organomegali özellikleri

Organomegaliler	Görülen Kişi Sayısı
<b>Hepatomegali</b> n=32	2 (%6,3)
<b>Splenomegali</b> n=32	5 (%15,6)
<b>Hepatosplenomegali</b> n=32	14 (%43,8)

Hastaların tanı ve tedavi anındaki lökosit, hematokrit, hemoglobin, trombosit ve Laktik Dehidrogenaz (LDH) düzeyleri verilerine ulaşıldı. AML hastalarının lökosit ortalaması  $50,6 \pm 39,8 \times 10^3 \mu\text{L}$ , hemoglobin ortalaması  $9 \pm 2,4 \text{ g/dl}$ , hematokrit ortalama

değeri  $26 \pm 7,4$ , trombosit ortalaması  $80,6 \pm 100,4 \times 10^3 \mu\text{L}$ , laktik dehidrogenaz değeri ortalaması  $625,1 \pm 440 \text{ U/L}$  olarak bulunmuştur. Verisine ulaşılabilen KML hastalarının lökosit ortalaması  $77,3 \pm 64,9 \times 10^3 \mu\text{L}$ , hemoglobin ortalaması  $10,3 \pm 1,6 \text{ g/dl}$ , hematokrit ortalama değeri  $29,7 \pm 5,9$ , trombosit ortalaması  $336,4 \pm 263 \times 10^3 \mu\text{L}$ , laktik dehidrogenaz değeri ortalaması  $519,6 \pm 279,2 \text{ U/L}$  olarak bulunmuştur. Hastaların kan verilerine ait bulgular çizelge 4.5.'te özetlenmiştir.

**Çizelge 4.5.** Hastaların kan verilerine ait bulguların ortalaması

	<b>AML</b>	<b>KML</b>	<b>Toplam</b>
	Ort $\pm$ SS (Alt –Üst Değer) n	Ort $\pm$ SS Alt –Üst Değer N	Ort $\pm$ SS Alt –Üst Değer N
Lökosit $\times 10^3 \mu\text{L}$	$50,6 \pm 39,8 \times 10^3 \mu\text{L}$ (0,98-152) 36	$77,3 \pm 64,9 \times 10^3 \mu\text{L}$ (6,2-182) 9	$44,4 \pm 48,9 \times 10^3 \mu\text{L}$ (0,98 – 182) 45
Hemoglobin g/dl	$9 \pm 2,4 \text{ g/dl}$ (4,31 -12,7) 36	$10,3 \pm 1,6 \text{ g/dl}$ (7,53- 12,8) 8	$9,2 \pm 2,3 \text{ g/dl}$ (4,31-12,8) 44
Hematokrit %	$26 \pm 7,4$ (12,3- 39,3) 36	$29,7 \pm 5,9$ (22,4- 39) 8	$26,6 \pm 7,2$ (12,3-39,3) 44
Trombosit $\times 10^3 \mu\text{L}$	$80,6 \pm 100,4 \times 10^3 \mu\text{L}$ (10,8-529) 35	$336,4 \pm 263 \times 10^3 \mu\text{L}$ (21,4-739) 9	$132,9 \pm 178,1 \mu\text{L}$ (10,8-739) 44
Laktik Dehidrogenaz U/L	$625,1 \pm 440 \text{ U/L}$ (147-1824) 36	$519,6 \pm 279,2 \text{ U/L}$ (250-973) 8	$606 \pm 414,5 \text{ U/L}$ (147-1824) 44

AML olgularının FAB sınıflamasına göre dağılımı M0 % 5,6 (n=2), M1 % 11,1 (n=4), M2 % 22,2 (n=8), M3 % 22,2 (n=8), M4 % 2,8 (n=1), M5 % 2,8 (n=1), M7 %2,8 (n=1) oranında bulundu. Olguların 3'ünde (% 8,3) MDS'den AML'ye dönüşüm gözlemlendi. Olguların 8'i (%22,2) ise sınıflandırılmamıştır. FAB sınıflamasına göre olgularının hiç birinde M6 alt tipi gözlenmemiştir. Bu sınıflandırma özeti çizelge 4.6.'da özetlenmiştir.

**Çizelge 4.6.** AML olgularının FAB sınıflamasına göre dağılımı

<b>Alt Tip</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
M0	2	% 5,6
M1	4	% 11,1
M2	8	% 22,2
M3	8	% 22,2
M4	1	% 2,8

**Çizelge 4.6.** (Devam) AML olgularının FAB sınıflamasına göre dağılımı

Alt Tip	N	%
M5	1	% 2,8
M6	-	-
M7	1	% 2,8
MDS→AML	3	%8,3
Sınıflandırılmayan Grup	8	%22,2
Toplam	36	%100

Yapılan yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri (Çoklu FISH analizleri) sonucu toplam 13 (% 27,7) hastada genomun çeşitli bölgelerinde, çeşitli boyutlarda aberasyonlar saptanmıştır. Bu 13 hasta içerisindeki 3 (% 6,4) olguda bulunan aberasyonlara ek olarak RT-PCR yöntemi ile bcr-abl füzyon geni varlığı saptanmıştır. RT-PCR yöntemi ile 7 (% 14,9) hastada bcr-abl füzyon geni varlığı saptanırken, yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri sonucu genom düzeyinde bu hastalarda aberasyona rastlanılmamıştır. Hastaların 27'sinde (% 57,4) hem yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri sonucu herhangi bir aberasyonun varlığına, hem de RT-PCR yöntemiyle herhangi bir translokasyonun varlığına rastlanılmamıştır (Çizelge 4.7).

**Çizelge 4.7.** Olgularda saptanan aberasyonların yöntemlere göre dağılımı

Yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri sonucu aberasyon; saptanan olgular: (+) saptanmayan olgular: (-)	RT-PCR yöntemi sonucu translokasyon; saptanan olgular:(+) saptanmayan olgular: (-)	Kişi Sayısı (n)	Toplam hasta sayısına göre yüzde (%)
+	+	3	% 6,4
+	-	10	% 21,3
-	+	7	% 14,9
-	-	27	% 57,4
Toplam		47	% 100

Yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri sonucu aberasyon saptanan 13 hastadan 11'i (% 84,6) AML, 2'si (% 15,4) ise KML tanılı hastaları oluşturmaktadır. 11 aberasyonlu AML hastası tüm AML olgularının % 30,6'sını, aberasyona sahip 2 KML hastası ise tüm KML olgularının % 18,2'sini oluşturmaktadır. Aberasyona sahip AML

hastalarının 5'i (% 45,4) sınıflandırılmayan grupta, 3'ü (% 27,3) M1 alt tipinde, diğer 3 (%9,1) hastada sırayla M2, M3 ve M5 alt tiplerine göre dağılmaktadır (Çizelge 4.8.).

**Çizelge 4.8.** Aberasyon saptanan olguların dağılımı

Yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizine göre aberasyon saptanan AML alt tipleri	Kişi Sayısı (n)	Yüzde (%)
Sınıflandırılmayan Grup	5	% 45,4
M1	3	% 27,3
M2	1	% 9,1
M3	1	% 9,1
M5	1	% 9,1
Toplam	11	% 100

Olguların tümünde saptanan aberasyonlar Çizelge 4.9.'da özetlenmiştir.

**Çizelge 4.9.** Olguların tümünde saptanan aberasyonlar

Saptanan Aberasyon	Aberasyonun görüldüğü hasta sayısı ve yüzdesi
Y kromozomu kaybı	3 (% 6,4)
Trizomi 8	3 (% 6,4)
Trizomi 5	1 (% 2,1)
Trizomi 6	1 (% 2,1)
Trizomi 10	1 (% 2,1)
Trizomi 21	1 (% 2,1)
Monozomi 20	1 (% 2,1)
X kromozomu kazanımı	1 (% 2,1)
del 13q14.2-q14.3	1 (% 2,1)
del 3p26.3-p14.2	1 (% 2,1)
del 5q13.2-q35.3	1 (% 2,1)
del 12p13.33-p11.2	1 (% 2,1)
del 14q32.33	1 (% 2,1)
del 22q13.2-q13.31	1(% 2,1)
del 1q24.1-q44	1 (% 2,1)
del 1p36.33-p36.22	1 (% 2,1)
dup 1q25.1-q44	1 (% 2,1)
dup 8q21.2-q24.3	1 (% 2,1)
dup 2p23.2-p22.1	1 (% 2,1)
dup 3q13.31-q25.1	1 (% 2,1)
dup Xp11.1	1 (% 2,1)
dup 9q21.2-q34.12	1 (% 2,1)

AML hastalarının sınıflandırılmayan grubunda olan 4 olguda multiple aberasyonlar saptanmıştır. Bu gruptaki ilk olguda 5. , 8. , 10. ve 21 kromozomlarda trizomi gözlenmiştir. Aynı zamanda bcr-abl füzyon geni varlığı saptanmıştır. İkinci olguda trizomi 8 ve 22q13.2-q13.31 bölgesinde yaklaşık olarak 3.9 Mb boyutunda delesyon saptanmıştır. Bu olguda bcr-abl varlığına saptanılmamıştır. 3. olguda 1p36.33-p36.22 ve 1q24.1-q44 bölgelerinde sırasıyla yaklaşık olarak, 8.2 Mb ve 101 Mb boyutlarında delesyon varlığı saptanmıştır. Bu olguda bcr-abl varlığına saptanılmamıştır. 4. olguda Y kromozomu kaybı, X kromozomu kazanımı ve 3q13.31-q25.1 bölgesinde 151,8 Mb boyutunda duplikasyon varlığı saptanmıştır. Bu olguda bcr-abl varlığına saptanılmamıştır. 5. olguda Y kromozomu kaybı saptanmıştır. Bu olguda t(15;17) gözlenmemiştir. Bu hasta grubuna ait bilgiler çizelge 4.10.'da özetlenmiştir.

**Çizelge 4.10.** AML tanılı sınıflandırılmayan gruptaki hastaların aberasyon verileri

Olgu	Cinsiyet	Yaş	Çoklu FISH analizi sonucu	RT-PCR sonucu	Sağ kalım
1	Erkek	41	- trizomi 5 - trizomi 8 - trizomi 10 - trizomi 21	bcr-abl varlığı saptanmıştır	Exitus oldu
2	Kadın	61	- trizomi 8 - del(22)(q13.2- q13.31) Boyut: 3,9 Mb	bcr-abl varlığı saptanmamıştır	Exitus oldu
3	Kadın	58	- del(1)(p36.33-p36.22) Boyut: 8,2 Mb - del(1)(q24.1-q44) Boyut: 101 Mb	bcr-abl varlığı saptanmamıştır	Hayatta
4	Erkek	66	- Y kromozomu kaybı - X kromozomu kazanımı - dup(3)(q13.31-q25.1) Boyut:151,8 Mb	bcr-abl varlığı saptanmamıştır	Hayatta
5	Erkek	35	Y kromozomu kaybı	t(15;17) negatif	Hayatta

AML M1 alt tipinde olan 3 hastadan ilkinde multiple aberasyonlar saptanmıştır. Bu hastada Y kromozomu kaybı, 13q14.2-q14.3 bölgesinde 5 Mb boyutunda delesyon ve bcr-abl varlığı saptanmıştır. İkinci olguda 2p23.2-p22.1 bölgesinde 11,5 Mb boyutunda duplikasyon varlığı saptanmıştır. Bu olguda bcr-abl ve t(4;11) varlığına saptanılmamıştır.

Üçüncü olguda Xp11.1 2,2 Mb duplikasyonu saptanmış, bcr-abl varlığı ise saptanmamıştır. Bu hasta grubuna ait bilgiler çizelge 4.11.'de özetlenmiştir.

**Çizelge 4.11.** AML M1 grubunda bulunan hastalardaki aberasyonlar

Olgu	Cinsiyet	Yaş	Çoklu FISH analizi sonucu	RT-PCR sonucu	Sağ Kalım
1	Erkek	44	- Y kromozomu kaybı - del(13)(q14.2-q14.3) Boyut: 5 Mb	bcr-abl varlığı saptanmıştır	Hayatta
2	Kadın	67	- dup(2)(p23.2-p22.1) Boyut: 11,5 Mb	- bcr-abl varlığı saptanmamıştır - t(4;11) negatif	Hayatta
3	Kadın	36	- dup(X)(p11.1) Boyut: 2,2 Mb	- bcr-abl varlığı saptanmamıştır	Hayatta

AML M2 alt tipine sahip 1 hastada 8q21.2-q24.3 bölgesinde 60,1 Mb boyutunda duplikasyon varlığı saptanmıştır. Bu olguda t(15;17) ve t(4;11) gözlenmemiştir. AML M3 alt tipindeki hastada multiple aberasyonlara rastlanılmıştır. Bu aberasyonları sırasıyla 3p26.3-p14.2 bölgesinde 62 Mb, 5q13.2-q35.3 bölgesinde 110 Mb, 12p13.33-p11.2 bölgesinde 28,6 Mb ve 14q32.33 bölgesinde 2,4 Mb boyutlarındaki delesyonlar ve monozomi 20 oluşturmaktadır. Bu hastada t(15;17) ise gözlenmemiştir. AML M5 alt tipindeki hastada da multiple aberasyonlara rastlanılmıştır. Bu hastada 6. ve 8. kromozomlarda trizomi ve 1q25.1-q44 bölgesinde 73 Mb boyutunda duplikasyon saptanmıştır. Bu olguda bcr-abl varlığı saptanmamıştır. Bu olgulara ait bilgiler çizelge 4.12'de özetlenmiştir.

**Çizelge 4.12.** AML tanılı M2, M3 ve M5 alt tipindeki hastalarda bulunan aberasyonlar

Alt Tip	Cinsiyet	Yaş	Çoklu FISH analizi sonucu	RT-PCR sonucu	Sağ Kalım
AML M2	Kadın	26	- dup(8)(q21.2-q24.3) Boyut: 60,1 Mb	- t(4;11) negatif - t(15;17) negatif	Exitus oldu
AML M3	Kadın	81	- del(3)(p26.3-p14.2) Boyut: 62 Mb - del(5)(q13.2-q35.3) Boyut: 110 Mb - del(12)(p13.33-p11.2) Boyut: 28,6 Mb - del(14)(q32.33) Boyut: 2,4 Mb - monozomi 20	- t(15;17) negatif	Hayatta
AML M5	Kadın	37	- trizomi 6, -trizomi 8 - dup(1)(q25.1-q44) Boyut: 73Mb	- bcr-abl varlığı saptanmamıştır	Exitus oldu

Aberasyon saptanan KML tanılı bir hastada 3q11.2 duplikasyonu (0.6 kb) saptanmıştır. Bu hastada ayrıca bcr-abl varlığına rastlanılmıştır (füzyon transkript:  $5,7 \times 10^3$ ). Atipik KML tanılı diğer hastada 9q21.2-q34.12 bölgesinde 61,82 Mb boyutunda duplikasyon varlığını saptanmıştır. Bu olguda bcr-abl varlığı saptanmamıştır. Bu olgulara ait bilgiler çizelge 4.13'te özetlenmiştir.

**Çizelge 4.13.** KML olgularına ait aberasyonlar

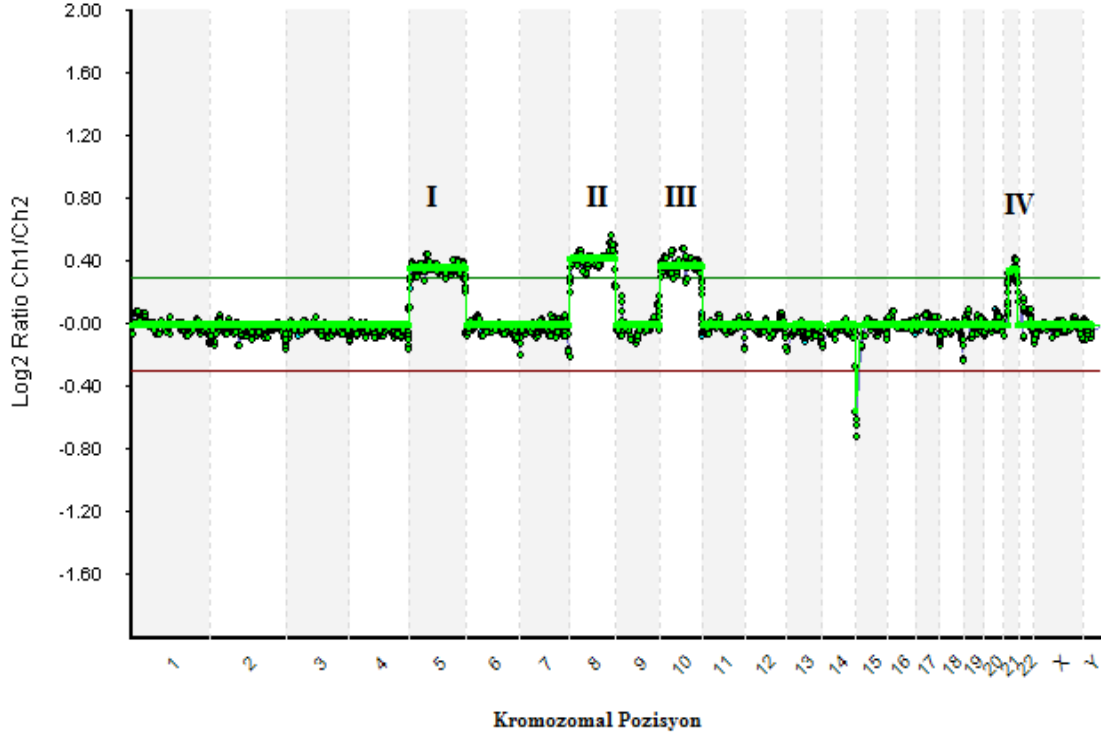
Tanı	Cinsiyet	Yaş	Çoklu FISH analizi Sonucu	RT-PCR sonucu	Sağ Kalım
KML	Kadın	30	- dup(3)(q11.2) Boyut: 0,6 kb	- bcr-abl varlığı saptanmıştır Füzyon Transkript: $5,7 \times 10^3$	Hayatta
atipik KML	Erkek	79	- dup(9)(21.2-34.12) Boyut:61,82	- bcr-abl varlığı saptanmamıştır	Hayatta

Toplam 7 (% 14,9) hastanın genomunda yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri sonucuna göre herhangi bir bölgede aberasyona rastlanılmamasına rağmen RT-PCR yönteminde bcr-abl varlığına rastlanılmıştır. Bu 7 hastanın 5'i (%71,4) KML, 1'i (% 14,3) AML-M0, 1'ide (%14,3) AML-M7 tanılı hastalardan oluşmaktadır. Bu hastalara ait bilgiler çizelge 4.14.'te özetlenmiştir.

**Çizelge 4.14.** bcr-abl varlığı saptanıp, çoklu FISH analizi sonucu normal olan hasta grubu

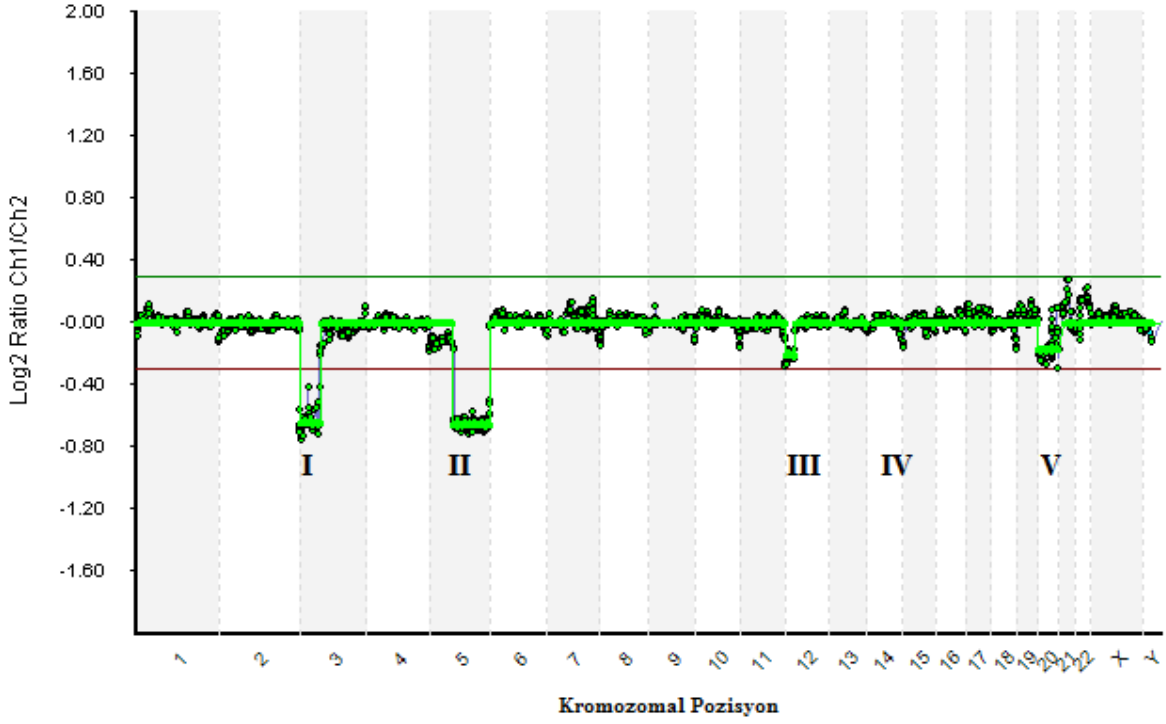
Olgu/Tanı	Cinsiyet	Yaş	Çoklu FISH analizi Sonucu	RT-PCR sonucu	Sağ Kalım
1-KML	Kadın	42	Normal	- bcr-abl varlığı saptanmıştır Füzyon Transkript: $1,6 \times 10^0$	Hayatta
2-KML	Erkek	40	Normal	- bcr-abl varlığı saptanmıştır Füzyon Transkript: $2,8 \times 10^2$	Hayatta
3-KML	Kadın	68	Normal	- bcr-abl varlığı saptanmıştır Füzyon Transkript: $8,5 \times 10^3$	Hayatta
4-KML	Kadın	35	Normal	- bcr-abl varlığı saptanmıştır Füzyon Transkript: $1,7 \times 10^1$	Hayatta
5-KML	Kadın	22	Normal	- bcr-abl varlığı saptanmıştır Füzyon Transkript: $4,6 \times 10^2$	Hayatta
6- AML M0	Erkek	39	Normal	- bcr-abl varlığı saptanmıştır Füzyon Transkript: $1,6 \times 10^2$	Hayatta
7- AML M7	Erkek	33	Normal	- bcr-abl varlığı saptanmıştır Füzyon Transkript: $1,1 \times 10^0$	Hayatta

Toplam 27 (% 57,4) hastanın genomunda, yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri sonucuna göre herhangi bir bölgede aberasyona rastlanılmamış aynı zamanda RT-PCR yöntemiyle de herhangi bir translokasyon varlığı saptanmamıştır. Yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri sonucu, bazı hastalarda saptanan aberasyonlar ait görüntüler aşağıdaki şekillerde gösterildiği gibidir.

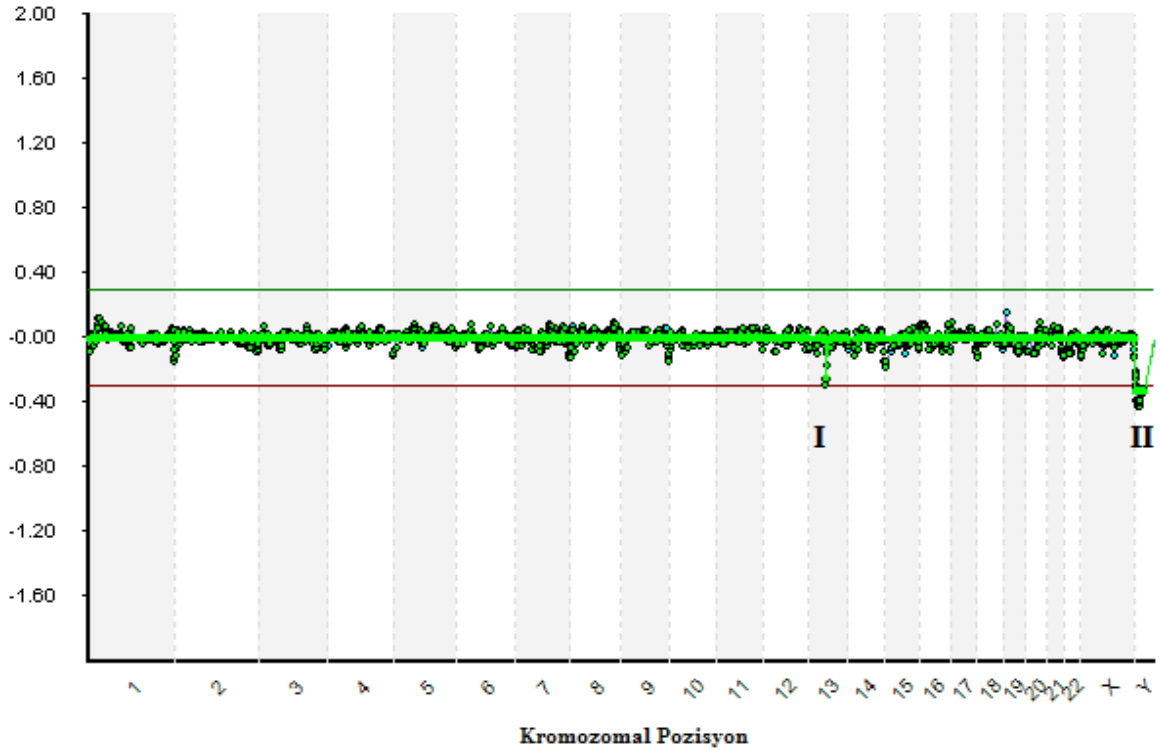


**Şekil 4.1.** AML tanılı sınıflandırılmayan gruptaki bir hastaya ait aberasyonlar. I: trizomi 5, II: trizomi 8, III: trizomi 10, IV: trizomi 21.

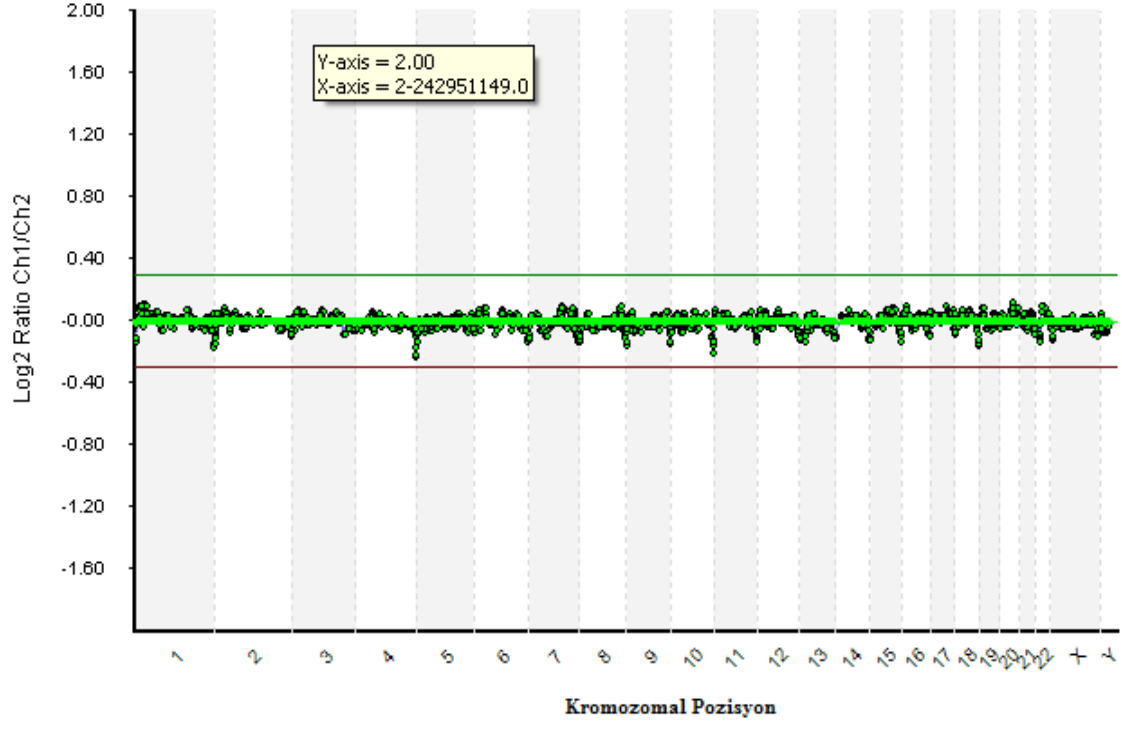




**Şekil 4.2.** AML-M3 tanılı hastaya ait aberasyonlar. I:del 3p26.3-p14.2, II: del 5q13.2-q35.3, III: del 12p13.33-p11.2, IV:del 14q32.33, V: monozomi 20.



**Şekil 4.3.** AML M1 tanılı hastaya ait aberasyonlar. I: del 13q14.2-q14.3, II: Y kromozomu kaybı.



Şekil 4.4. Analiz sonrası herhangi bir aberasyon saptanmayan olguya ait görüntü

## 5. TARTIŞMA

Lösemiler kan hücrelerinin sınırsız ve kontrolsüz bir şekilde bölünüp çoğalmasıyla karakterize olan hastalıklar grubunu oluşturmaktadırlar (Wujcik, 2003). Lösemilerin moleküler genetiği tekrarlayıcı kromozom anomalilerinin bu hastalıkta tanımlanmasıyla başlamıştır (Özbek). Myeloid düzensizlikler 3 majör sitogenetik alt gruba ayrılmaktadır. İlki dengeli kromozom aberasyonları (AML olgularının % 20'sinde gözlenmekte), ikincisi olguların normal karyotipe sahip olması, üçüncüsü olgularda genomda artış (duplikasyon) veya azalış (delesyon) şeklinde gözlenen dengesiz kromozom anomalileridir (AML olgularının % 35-40'ında gözlenmekte) (Suela ve ark., 2007).

Yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri ile, birçok dengesiz kromozom anomalisi kısa bir süre içerisinde aynı anda tespit edilebilmektedir. Tanı ve prognostik açıdan belirgin dengeli kromozom anomalilerinin saptanmasında da RT-PCR yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır. Çalışmamızda, AML tanılı 36 hasta ve KML tanılı 11 hasta üzerinde gerçekleştirdiğimiz yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri sonucu, bazı hastalarda genom düzeyinde çeşitli aberasyonlara rastladık.

Grimwade ve arkadaşlarının AML tanılı 1612 hasta üzerinde yapmış oldukları çalışmada, AML tanısında önemli olan sitogenetik sonuçlar özetlenmiştir. Hastalardan t(8;21), t(15;17) ve inv(16) translokasyonlarını taşıyanlar, düşük oranda ilk ilaç direncine ve azalmış relaps riskiyle ilişkili artmış hayatta kalma ile karakterize olan iyi prognostik grubu oluşturdukları bildirilmiştir. Diğer taraftan kompleks karyotip, kromozom 5 ve 7'nin total kaybı, kromozom 5 ve 3'ün uzun kol kaybı (q) ve 11q23 yeniden düzenlenmelerinin kötü prognostik grubu oluşturduğu rapor edilmiştir. Normal kromozoma sahip olgular, trizomi 8, 21 ve 22, kromozom 7 ve 9'un q kolu kaybının ve diğer yapısal ve sayısal anomalilerin ortalama prognostik grubu oluşturdukları bildirilmiştir. Çalışmada normal karyotipe sahip hasta sayısı 680 (% 42) olarak bildirilmiştir (Grimwade ve ark., 1998).

Bizim çalışmamızda AML hastalarının arasında t(15;17) translokasyonunu taşıyan bir olguyla karşılaşılmadı. Kötü prognostik grubu oluşturan kromozom 5q delesyonuna olgularımız arasında 1 hastada rastladık. Ortalama prognostik grubu oluşturdukları düşünülen trizomi 8 ve trizomi 21'e olgularımız arasında sırasıyla 3 ve 1 kişide rastladık.

Bizim çalışmamızda normal karyotipe sahip hasta sayısı oranı % 69'dur. Grimwade ve arkadaşlarının çalışmasına göre bizim çalışmamızda normal karyotipe sahip hasta oranının yüksek oluşunu, çalışmamızdaki hasta sayısının sınırlı oluşuna ve hastaların bir kısmının tedavi sırasında başvurmalarından dolayı kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Trizomi 8, AML olgularında tek başına veya diğer kromozom aberasyonlarıyla oluşan, en sık olarak gözlenen sayısal anomalidir (Schoch ve ark., 2006). AML'de en sık karşılaşılan sayısal anomali olmasına rağmen patogenetik etkisi hakkında sahip olunan bilginin oldukça az olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda olgularda trizomi 8'in tek başına % 5-7 oranında, diğer aberasyonlarla beraber % 10-15 oranında gözlendiği bildirilmiştir. Tek başına gözlendiğinde iyi prognostik faktör olurken, kompleks karyotiple beraber kötü prognostik özellik sergilediği bildirilmiştir (Schoch ve ark., 2006, Wolman ve ark., 2002). Trizomi 8'in tek bir anomali olarak yeniden gelişen AML veya MDS olgularında organik solvante maruziyetten sonra oluşabileceği ve yüksek oranda yaşlı AML olgularında gözlendiği rapor edilmiştir (Paulson ve ark., 2006). Trizomi 8 FAB sınıflamasına göre AML olgularının tümünde gözlenmesine rağmen M5'te yüksek oranda gözlendiği bildirilmiştir (Paulsson ve Johansson, 2007). Çalışmamızda sınıflandırılmayan AML grubunda 2, AML-M5 tanılı 1 olguda olmak üzere toplam 3 olguda (% 6,4) trizomi 8 varlığını saptadık. Her 3 olguda bu aberasyona ek olarak genom düzeyinde farklı aberasyonlara da rastladık. Wolman ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada 434 kişide trizomi 8'e ek olarak diğer klonal aberasyonlara rastlanılmıştır (Wolman ve ark., 2002). Bu hasta grubunun yaş ortalaması 55 olarak rapor edilmiştir. Bizim çalışmamızda trizomi 8 saptanan 3 olgunun yaş ortalaması ise 46 olarak hesaplanmıştır. Wolman ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, olguların lökosit değerleri 0.5 ile  $262 \times 10^3 \mu\text{L}$  aralığında, hemoglobun ortalamaları 9,1 g/dl ve platelet ortalamaları  $45 \times 10^3 \mu\text{L}$  olarak rapor edilmiştir. Çalışmamızda 3 olgunun lökosit değerleri 1,2 ile 101 aralığında, hemoglobun ortalamaları 8,9 g/dl ve platelet ortalamaları 41  $\mu\text{L}$  şeklinde hesaplanmıştır. Çalışmadaki hasta sayısı arttırıldığında literatür bilgisiyle ilişkili olan bu hematolojik verilerin tam uyumlu olacağını düşünmekteyiz.

AML olgularında trizomi 8 ile yapılan çalışmalarda, bu aberasyonu taşıyan vakalarda hayatta kalma süresinin düşük oluşu vurgulanmıştır. Bizim çalışmamızda da trizomi 8 ve buna ek olarak çeşitli aberasyonlar saptanan 3 olguda yaklaşık 12 aylık zaman dilimi içerisinde exitus olmuşlardır.

Çalışmamızda AML'de sınıflandırılmayan grupta olan bir olguda trizomi 8; trizomi 5, trizomi 10 ve trizomi 21 ile birlikte gözlenmiştir ve hasta exitus olmuştur. Literatür incelendiğinde AML'li hastalarda böyle bir olgunun rapor edilmesine rastlayamadık. Trizomi 21 AML ve MDS'de trizomi 8'den sonra en yaygın olarak gözlenen trizomi olmasına rağmen bu karyotipik anomalinin myeloid düzensizlikler içerisindeki klinik ve prognostik yeri tam olarak karakterize edilmemiştir (Wan ve ark., 1999). Diğer sayı anomalilerine

göre trizomi 5'in AML olgularında ender olarak gözleendiği bildirilmiştir. Kromozom 5'te gözlenen artışlar genellikle diğeri sitogenetik aberasyonlarla ilişkili olmasına rağmen çok nadir durumlarda tek başına anomali olarak gözleendiği bildirilmiştir. Trizomi 5'in FAB sınıflamasına göre M3 alt tipi hariç, diğeri alt tiplerin tümünde gözleendiği bildirilmiştir. Trizomi 5 ve 8'in birlikte görülmesinin monositik farklılaşmayı gösterdiğinden olguya M4 veya M5 tanısı koyulabileceği rapor edilmiştir. Bu ilişkinin biyolojik önemi tayin edilmelidir (Ma ve ark., 1998). AML'de trizomi 10'un tek başına gözlenmesinin oldukça nadir olduğu ve tanıda farklı olarak kötüden kısmen iyiye uzandığı ama çok küçük sayıdaki olgularda rapor edildiğinden bu sonucun çıkarılmasının zor olduğu bildirilmiştir. (Llewellyn ve ark. 1999)

Çalışmamızda yer alan AML-M5 tanılı bir olguda, trizomi 8, trizomi 6 ve 1. kromozomun q25.1-q44 bölgeleri arasında 73 Mb'lık bir duplikasyonla birlikte gözlenmiştir. Trizomi 6'nın, hematolojik düzensizliklerde oldukça düşük oranda tek başına gözlenmiş olduğu rapor edilmiş ve trizomi 8'le bir arda gözleendiği olgulara literatürde rastlanılmıştır (Mohamed ve ark. 1998). Bu aberasyonlara ek olarak 1. kromozomda saptadığımız duplikasyon AML olgularında ilk defa gösterilmektedir. Bu bölgede yer alan genlerle ilgili ileriki aşamalarda ayrıntılı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Sınıflandırılmayan AML grubundaki bir olguda trizomi 8, 22. kromozomdaki q13.2-q13.31 bölgesindeki 3,9 Mb boyutunda bir delesyonla beraber gözlenmiştir. Delesyon saptanan bu bölgede Ku proteininin alt tipi olan Ku70 proteini lokalizedir (Koike, 2002). Bu proteinin birçok hücresel süreçte; DNA tamirinde, transkripsiyonun regülasyonunda, kromozom bakımında anahtar rol oynadığı bildirilmiştir (Koike, 2002). Bu proteinin foksiyonundaki bozukluk sonucu, normal hücrelerin kanserli hücrelere dönüşümü Ph pozitif lösemilerde gözleendiği bildirilmiştir (Skorokhod ve ark. 2006). Olgumuzda da Ph varlığı saptandığından, bulduğumuz verilerin literatür ile uyum içerisinde olduğunu görmekteyiz.

AML'de sayısal aberasyonlar arasında trizomiden sonra ikinci sırada, kromozomun tümünü kapsayan kayıplar olan monozomilere sık olarak rastlanıldığı bildirilmiştir. Tek kromozom kayıpları arasında Y ve 7. kromozom monozomileri AML'deki en sık karşılaşılan grubu oluşturdukları rapor edilmiştir. Bu monozomileri 5, 9 ve 21. kromozom monozomilerinin takip ettiği bildirilmiştir (Mrozek ve ark. 2001). Hematolojik hastalıklarda Y kromozomu kaybının yaşla birlikte gelişerek arttığı bildirilmesine rağmen, yapılan çalışmalarda, bu aberasyonun hastanın yaşam süresiyle veya önceki tedavisiyle ilişkili olduğu bildirilmemiştir (Wong ve ark., 2008, Zhang ve ark, 2007).

Wiktor ve arkadaşlarının hematolojik hastalıklarla ilişkili 571 kişi üzerinde yapmış oldukları çalışmada, 97 AML tanılı hastanın 3'ünde (% 3,1) tek başına Y kromozomu kaybına rastladıklarını rapor etmişlerdir (Wiktor ve ark. 2000). Bakshi ve arkadaşlarının 270 AML tanılı hasta üzerinde yapmış oldukları çalışmada 17 (% 6,3) hastada Y kromozomu kaybına ek olarak farklı aberasyonlara da rastlamışlardır. Ayrıca AML-M1 tanılı 44 yaşındaki bir olguda Y kromozomu kaybı gözlenmiş fakat bu olguda t(8;21) translokasyonu ile beraber gerçekleştiği rapor edilmiştir (Bakshi, 2004).

Çalışmamızda AML-M1 tanılı 1 ve AML tanılı sınıflandırılmayan grupta olan 2 olguda olmak üzere toplam 3 kişide (% 6,4) Y kromozomu kaybına rastladık. AML' nin sınıflandırılmayan grubundaki 1 olguda (% 2,1) yalnızca Y kromozomu kaybı gözlenmiş, diğer 2 olguda (% 5,5) bu aberasyona ek olarak farklı aberasyonlarda saptanmıştır.

Hematolojik malignitelerde gözlenen genetik olaylar arasında en yaygın olarak kromozomal delesyonlar gözlenmektedir. Myeloid maligniteler arasında 13q delesyonuna rastlanılmaktadır. Hücre siklusu regülasyonunda rol alan bir tümör süpresör gen olan RB1 (Retinoblastoma) geni 13. kromozomda 13q14 bandına lokalizedir (Starza ve ark., 1998).

Yapılan çalışmalarda KLL olgularının yarısından çoğunda 13q14 kromozomal bandında delesyona rastlanılmaktadır. Starza LA ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, 54 AML olgusunun 5'inde 13q14 delesyonu saptanmıştır (Starza ve ark., 1998). Tümör süpresör genlerin lösemi üzerindeki etkilerinin önemine ait çalışmalara daha çok yoğunluk verilebilir. Çalışmamızda, Y kromozomu kaybı olan 44 yaşındaki AML-M1 tanılı olguda bu aberasyona ek olarak kromozom 13'te q14.2-q14.3 bölgeleri arasında 5 Mb boyutunda bir delesyon saptanmıştır.

Y kromozomu kaybı olup sınıflandırılmayan gruptaki diğer olguda da bu aberasyona ek olarak X kromozomu kazanımı ve 3. kromozomun q13.31-q25.1 bölgeleri arasında 151,8 Mb boyutunda duplikasyon saptanmıştır. Böyle bir olguya literatürde rastlayamadık. Az sayıdaki bildiriye 3q'daki artışın AML ve MDS'nin ilerleyişiyle ilişkili olduğu belirtilmiştir. (Mehtaa ve ark., 2010)

Myeloid malignitelerde kromozom 1 anomalilerinin daha az yaygın olduğu, AML ve MDS'de % 5'ten daha az oranda gözlendiği bildirilmiştir (Caramazza ve ark., 2009). Çalışmamızda AML tanılı 36 hastanın 1'inde (% 2,1), 1. kromozomda p36.33-p36.22 ve q24.1-q44 bölgeleri arasında sırasıyla 8,2 Mb ve 101 Mb boyutlarında delesyon saptanmıştır. Tek hastada saptanan bu anomali yüzdesi literatür bilgisiyle uyum içerisindedir.

Myeloid neoplazilerde gözlenen, dengesiz yapısal kromozom yeniden düzenlenmelerinde 5q delesyonunun en çok MDS olgularında, bunu takiben AML olgularında gözleendiği bildirilmiştir. AML'de 5q delesyonunun hem yeni tanı alanda hem de tedavi sırasında gözlenebileceği belirtilmiştir. AML'de genellikle kompleks karyotip ile ilişkilendirilmiştir. AML'de 5q delesyonu veya kromozom 5'in tümünün kaybı, kötü prognostik değere, hastalığın hızlı bir şekilde ilerleyişine ve hayatta kalımın düşük oluşuyla karakterize edilmiştir. En sık gözlenmiş olan 5q delesyonları, q12-31-q13-35 bantları arasında bulunduğu 200 üzeri hastada yapılan çalışmalarda gözlenmiştir. 5q delesyonunun en sık olarak monozomi 7, 20, 13, trizomi 8 ve 12p'deki anomalilerle beraber görülmüştür (Grimwade ve ark., 1998, Grimwade ve ark., 2001). Çalışmamızda AML-M3 tanılı olgumuzda 5q13-q35 bölgeleri arasında 110 Mb boyutunda ki delesyon; monozomi 20, 12p13-p11 bölgeleri arasında 28,6 Mb boyutunda ki delesyon, 3p ve 14q'daki delesyonlarla beraber gözlenmiştir. Olguda gözlenen bu kompleks aberasyonlar, AML'deki sitogenetik değişikliklerde literatür bilgisi ile uyum içerisinde bulunmuştur. Çalışmamızdaki diğer 3 olguda sırasıyla 2p23.2-p22.1, Xp11.1 ve 8q21.2-q24.3 bölgeleri arasında farklı boyutlarda duplikasyon saptanmıştır. Bu kromozomlar üzerinde meydana gelen aberasyonlara yapılan farklı çalışmalarda rastlanılmıştır ( Mrozek ve ark., 2001).

Myeloid lösemiler arasında olan KML hematopoetik kök hücrenin klonal ve malign bir hastalıdır. KML, kromozom 9 ve 22'nin uzun kolları arasında gerçekleşen dengeli resiprokal translokasyon sonucu; t(9;22)(q34;q11) ortaya çıkan Ph kromozomu ile karakterizedir. Ph kromozomu KML olgularının yaklaşık olarak % 90-95'inde gözlenmektedir. Bu translokasyonun moleküler sonucu olarak oluşan Bcr-Abl füzyon proteini lösemik transformasyondan sorumlu tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. Erişkin lösemi olgularının yaklaşık olarak % 20'sini oluşturmaktadır. Çalışma grubumuzda 47 olgunun 11'i (% 23) KML tanılı hastalardan oluşmaktaydı. 11 olgunun 6'sında (% 55) RT-PCR yöntemiyle Bcr-Abl varlığı saptanmıştır. Oranın literatür bilgisine göre oldukça düşük olmasının nedeni olarak, olguların bir kısmının tedavi sürecinde olması ve tedaviye olumlu yanıt vermelerinden dolayı kaynaklandığını düşünmekteyiz.. KML'de kronik fazdan blastik faza ilerleme süreci genellikle ek sitogenetik anomaliliklerle beraber gelmektedir. Blastik fazdaki yaklaşık % 75 hastada Ph kromozomuna ek olarak ekstra Ph kromozomu, trizomi 8 veya i(17q) gözlenmektedir. Bunlardan başka daha az sıklıkta 17, 19 ve 21. kromozom trizomileri ve monozomi 7'de gözlenmektedir (Chase ve ark., 2001).

Yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizi sonucu, 11 KML tanılı hastanın 2'sinde (% 18,2) genom düzeyinde aberasyonlar saptadık. İlk olguda Bcr-Abl varlığına ek

olarak 3q11.2 bölgesinde yaklaşık 0,6 kb'lik duplikasyon saptadık. Literatürde 3q11.2 bölgesinde 0,6 kb kadar küçük bir duplikasyon varlığıyla karşılaşılmamıştır. Diğer olgu atipik KML (aKML) tanılıdır ve bu olguda Bcr-Abl varlığına rastlanılmamış, 9q21.2-9q34.12 bölgeleri arasında 61,82 Mb boyutunda bir duplikasyon saptanmıştır. Klinik ve hematolojik bulguları KML'ye benzer olan aKML Ph kromozomu ve Bcr-Abl transkriptinin olmayışıyla karakterizedir (Kurzrock ve ark., 2001). Herhangi bir spesifik sitogenetik değişiklik aKML ile ilişkilendirilmemesine rağmen yaklaşık % 50- 65 hastada sitogenetik anomaliliklere rastlanılmıştır. Hernandez J. M. ve arkadaşlarının 11 aKML tanılı hastada yapmış oldukları çalışmada en sık trizomi 8 olmak üzere, 5q, 13q, 17p, 12q delesyonlarına ve ekstra 21. kromozoma rastladıklarını rapor etmişlerdir. Çalışmamızda saptamış olduğumuz 9q21-q34 bölgelerini kapsayan duplikasyon varlığına literatürde aKML tanılı hastalarda rastlayamadık. Bu duplikasyonun aKML tanılı hastalarda yeni bir veri olduğunu ve ileriki çalışmalarda klinik etkisinin araştırılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Lösemi tanısında bilinen en duyarlı sistemlerden biri olan RT-PCR yöntemi dinamik hassas ve özgül olması sebebiyle sıklıkla kullanılan bir yöntem haline gelmiştir. Gen anlatımında RT-PCR kullanımı, doğru duyarlılıkta kantitatif data vermesi ve amplifikasyon sonrası herhangi bir manipulasyona ihtiyaç duymaması ile diğer yöntemlere göre bir üstünlük sağlamıştır. Bu yöntem lösemiyle ilişkilendirilmiş genlerin düzeylerini saptama açısından oldukça önemlidir fakat bu bir saptama yöntemidir, tarama yöntemi değildir. Bir tarama yöntemi olarak önerilebilecek en değerli teknolojilerden biri, yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri yöntemidir. Hematopoetik tümörleri, çoklu sitogenetik aberasyonlar vermesi ve kültüre edilmelerindeki güçlük nedeniyle klasik karyotip analizinin çok zor olarak gerçekleştiği dokulardır. Hematolojide kullanılan bu yeni yöntemle, konvansiyonel tekniklerden farklı olarak birden çok delesyon-duplikasyon bölgeleri aynı anda taranabildi ve sonuçlar hematolojik bir yaklaşım sağladılar. Konvansiyonel yöntemlere göre daha hızlı ve kolay analiz olanağı sağlayan bu yeni yöntem, lösemilerde hem ön tanı belirlenmesinde hem de takipteki olguların genomik değişikliklerinin izlenmesinde önemli sonuçlar ortaya çıkarmıştır. Bu yöntemin lösemideki değerinin gerçek sınırlarının tespiti için geniş hasta gruplarını içeren konfirmatif çalışmalar gerekmektedir.



## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmada yer alan 47 hastanın 36'sı AML, 11'i ise KML tanısı almış hastalardan oluşmaktaydı. Yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri sonucu 13 (% 27,7) hastada genomun çeşitli bölgelerinde, çeşitli boyutlarda aberasyonlar saptanmıştır. Bu 13 hastanın 3'ünde (% 6,4) bulunan aberasyonlara ek olarak RT-PCR yöntemi ile, bcr-abl füzyon geni varlığı saptanmıştır. Hastaların 7'sinde (% 14,9) ise yalnızca bcr-abl füzyon genine, toplamda ise 10 (% 21,3) hastada bu füzyon genin varlığına rastlanılmıştır. Çalışmada yer alan hastaların 27'sinde (% 57,4) her iki yöntemle de herhangi bir genetik değişiklik gözlemlenmemiştir.

Çalışmada, yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri sonucunda en sık olarak gözlenen aberasyonlar; AML tanılı 3 (% 6,4) olguda saptanan trizomi 8 ve AML tanılı diğer 3 (% 6,4) olguda saptanan Y kromozomu kaybıdır. AML'de prognostik açıdan oldukça önemli olan bu aberasyonlar, lösemi ile ilişkili diğer sayısal anomalilerle beraber gözlemlenmiş, ayrıca yapılan analizler sonucunda farklı kromozomlarda lösemi ile ilişkilendirilebilecek delesyon ve duplikasyon bölgelerine de rastlanılmıştır. RT-PCR yöntemi ile, KML tanısında çok büyük önem taşıyan bcr-abl füzyon genine çalışmaya katılan 11 KML tanılı hastanın 6'sında (%54,5) rastlanılmıştır.

Sonuç olarak, lösemi olgularının tanısında her iki yöntemin bir arada kullanımı, tanının desteklenmesine ve prognozun belirlenmesi bakımından hematolojiye yeni bir yaklaşım sağlayabilecektir. Elde edilen verilerin ileriki çalışmalarda genişletilmesiyle, klinisyenlere hastalığın seyri ve takibi açısından yardımcı olabilecek sonuçlar elde edilebilir.

## KAYNAKLAR

- Aytekin, Y., Solakoğlu, S. (2006) Temel Histoloji, 249-261. Nobel Tıp Kitapevleri
- Ali, R. (2006) Akut lösemilerde WHO sınıflandırması ve nadir akut lösemi tipleri. Türk Hematoloji Derneği Akut Lösemi Kursu
- Bacher, U., Schnittger, S., Haferlach, T. (2010) Molecular genetics in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol*, 22(6):646-655
- Bakshi S.R., Kakadia, P.M., Brahmhatt, M.M., Trivedi, P.J., Rawal, S.M., Bhatt, S.S., Parikh B.J., Patel K.M., Shukla S.N., Shah, P.M. (2004) Loss of sex chromosome in acute myeloid leukemia. *Indian Journal of Human Genetics*, 10(1):21-25.
- Brothman, A.R., Ghosn, C., Welner, E. (2003) Pentosomy 21q in a neonatal case of acute myeloblastic leukemia. *Cancer Genetic and Cytogenetics*, 47(1):135-137.
- Bustin, S.A. (2000) Absolute quantification of mRNA using real time reverse transkription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25:169-193.
- Büyükoztürk, K. (2007) Akut Myeloid Lösemi. İç Hastalıklar cilt 1. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul 667-674.
- Cacherill, F.R. (2001) Application and challenges of Real-Time PCR for The Clinical Microbiology Laboratory. In: Reischl, U., Wittwer, C., Cockerill, F.R., eds. *Rapid Cycle Real-Time PCR. Methods and Applications*, p.11.
- Caramazza, D., Hussein, K., Siragusa I, S., Pardanani, A., Knudson, R. A., Ketterling, R.P., Tefferi A. (2009) Chromosome 1 abnormalities in myeloid malignancies: a literature survey and karyotype-phenotype associations. *European Journal of Haematology* 84:191-200.
- Cardama, A.Q., Cortes, J. (2008) Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood*, 113(8):1619-1630.
- Cardama, A.Q., Cortes, J.E. (2006) Chronic myeloid leukemia: Diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc*, 81(7):973-988
- Chase, A., Cross, N.C., (2006) Signal transduction therapy in haematological malignancies: identification and targeting of tyrosine kinases. *Clin Sci (Lond)*, 111(4):233-249
- Chase, A., Huntly, B.J., Cross, N.C. (2001) Cytogenetics of chronic myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*, 14(3):553-571.
- Chauffaille, M.L.L.F., Figueiredo, M.S., Beltrani, R., Antunes, S.V., Yamamoto, M., Kerbauy, J. (2001) Acute promyelocytic leukemia: the study of t(15;17) translocation by fluorescent in situ hybridization, reverse transcriptase-polymerase chain reaction and cytogenetic techniques. *Braz J Med Biol Res* 34(6):735-743
- Cheson, B.D., Cassileth, P.A., Head, D.R., Schiffer, C.A., Bennett, J.M., Bloomfield, C.D., Brunning, R., Gale, R.P., Grever, M.R., Kreating, M.J., et al. (1990) Report of the National Cancer Institutesponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*, 8(5):813-819
- Cowell, J.K. (2004) High throughput determination of gains and losses of genetic material using high resolution BAC arrays and comparative genomic hybridization. *Comb Chem High Throughput Screen* 7(6):587-596.
- Çefle, K. (2009) Kanser Genetiği. Klinik Gelişim
- Deschler, B., Lübbert, M. (2006) Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology. *Cancer*, 107(9):2099-2107

- Druker, B.J. (2008) Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood*, 112(13):4808-4817.
- Durak, B. Hematolojide FISH. Temel moleküler hematoloji kursu, 15-18.
- Eleni, L.D., Nicholas, Z.C., Alexandros, S. (2010) Challenges in treating older patients with acute myeloid leukemia. *Journal of Oncology*.
- Faderl, S., Talpaz, M.D., Estrov, Z., O'Brien, S., Kurzrock, R., Kantarjian, H.M. (1999) The biology of Chronic Myeloid Leukemia. *N Eng J Med.*, 341:164-172.
- Ginzinger, D.G. (2002) Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 30:503-512.
- Goldman, J.M. (2009a) Treatment strategies for CML. *Best Pract Res Clin Haematol*, 22(3):303-313
- Goldman, J.M. (2009b) Initial treatment for patients with CML. *Hematology*, 453-460
- Goldman, J.M., Melo, J.V. (2003) Chronic Myeloid Leukemia-Advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med*, 349:1451-1464.
- Goldschmidt, N., Gafni, O.Y., Abeliovich, D., Slyusarevsky E., Rund, D. (2010) Interstitial insertion of RARA gene into PML gene in a patient with acute promyelocytic leukemia (APL) lacking the classic t(15;17). *Hematology*, 15(5):332-337
- Gravholta, C.H., Juulb, S., Naeraac, R.W., Hansend, J. (1998) Morbidity in urner Syndrome, 51(2):147-158.
- Grimwade, D., Walker, H., Harrison, G., Oliver, F., Chatters, S., Harrison, C.J., Wheatley, K., Burnett, A.K., Goldstone, A.H. (2001) The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood*, 98:1312-1320.
- Grimwade, D., Walker, H., Oliver, F., Wheatley, K., Harrison, C., Harrison, G., Rees, J., Hann, I., Stevens, R., Burnett, A., Goldstone, A. (1998) The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: Analysis of 1612 patients entered into MRC AML 10 trials. *Blood*, 92(7): 2322-2333.
- Günel, T. (2007) Gen anlatımının kantitatif analizi 'Real-Time PCR'. *Türkiye Klinikleri* 27:763-767.
- Hasle, H., Mellempgaard, A., Nielsen, J., Hansen, J. (1995) Cancer incidence in men with Klinefelter syndrome, 71(2): 416-420.
- Horsley, S.W., Mackay, A., Iravani, M., Fenwick, K., Valgeirsson, H., Dexter, T., Ashworth, A., Kearney, L. (2006) Array CGH of fusion gene-positive leukemia-derived cell lines reveals cryptic region of genomic gain and loss. *Genes, Chromosomes&Cancer*, 45:554-564.
- Huret, J.L. (1990) Complex translocations, simple variant translocations and Phnegative cases in chronic myelogenous leukaemia. *Hum Genet*, 85(6):565-568.
- Inokuchi, K. (2006) Chronic myelogenous leukemia: from molecular biology to clinical aspects and novel targeted therapies. *J Nippon Med Sch*, 73(4):178-192.
- Jabbour, E., Fava, C., Kantarjian, H. (2009) Advances in the biology and therapy of patient with chronic myeloid leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol*, 22(3):395-407
- Jabbour, E.J., Estey, E., Kantarjian, H.M. (2006) Adult acute myeloid leukemia. *Mayo Clin Proc*, 81(2):247-260
- Jiang, X., Lopez, A., Holyoake, T., Eaves, A., Eaves, C. (1999) Autocrine production and action of IL-3 and granulocyte colony-stimulating factor in chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 12804-12809.

- Johansson, B., Fioretos, T., Mitelman, F. (2002) Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. *Acta Haematol*, 107(2):76-94.
- Kantarjian, H.M., Deisseroth, A., Kurzrock, R., Estrov, Z., Talpaz, M. (1993) Chronic myelogenous leukemia: a concise update. *Blood*, 82:691-703.
- Koike, M. (2002) Dimerization, translocation and localization of Ku70 and Ku 80 proteins. *J. Radiat. Res*, 43:223-236.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., et al. (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, 27:95-125
- Kurzrock, R., Bueso-Ramos, C.E., Kantarjian, H., Freireich, E., Tucker, S.L., Siciliano, M., Pilat, S., Talpaz, M. (2001) BCR Rearrangement–Negative Chronic Myelogenous Leukemia Revisited. *Journal of Clinical Oncology*, Vol 19(11):2915-2926
- Kurzrock, R., Kantarjian, H.M., Druker, B.J., Talpaz, M. (2003) Philadelphia chromosome positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Ann Intern Med* 138(10):819-830.
- Laurent, E., Talpaz, M., Kantarjian, H., Kurzrock, R. (2001) The Bcr gene and Philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. *Cancer Res*, 61(6): 2343-2355
- Levsky, J.M., Singer, R.H. (2003) Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *Journal of Cell Science*, 116:2833-2838.
- Lichtman, M.A., Liesveld, J.L. (2001) Acute Myelogenous Leukemia. In Beutler, E., Coller, B.S., Lichtman, M.A. (eds). *Williams Hematology*, Sixth edition, McGraw-Hill: New York, 1047-1083
- Llewellyn, I.E., Morris, C.M., Stanworth, S., Heaton, D.C., Spearing, R.L. (1999) Trisomy 10 in acute myeloid leukemia: Three new cases. *Cancer Genet Cytogenet* 118:148–150.
- Lockwood, W.W., Chari, R., Chi, R., Lam, W.L. (2006) Recent advances in array comparative genomic hybridization technologies and their applications in human genetics. *Eur J Hum Genet*, 14(2):139-148.
- Löwenberg, B., Downing, J.R., Burnett, A. (1999) Acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 341(14):1051-1062.
- Lucito R, Healy J, Alexander, J., Reiner, A., Esposito, D., Chi, M., Rodgers, L., Brady, A., Sebat, J., Troge, J., West, J.A., Rostan, S., Nguyen, K.C.Q., Powers, S., Ye, K.Q., Olshen, A., Norton, L., Wigler, M. (2003) Representational oligonucleotide microarray analysis: A high-resolution method to detect genome copy number variation. *Genome Research* 13, 2291–2305.
- Ma S.K., Wan T.S.K., Au W.Y., Chan L.C. (1998) Trisomy 5 in two cases of acute monocytic leukemia with hyperdiploid clones. *Leukemia* 22:961-964
- Marcucci, G., Caligiuri, M.A., Döhner, H., Archer, K.J., Schlenk, R.F., Döhner, K., Maghaby, E.A., Bloomfield, C.D. (2001) Quantification of CBFb/MYH11 fusion transcript by Real Time RT-PCR in patients with INV(16) acute myeloid leukemia. *Leukemia* 15,1072–1080.
- Martens, J.H.A., Stunnenberg, H.G. (2010) The molecular signature of oncofusion proteins in acute myeloid leukemia. *FEBS Letters* 584:2662–2669
- Mehtaa, P.A., Harris, R.A., Davies, S.M., Kimb, M.O., Muellera, R., Lampkina, B., Moc, J., Myers, K., Smolarek, T.A. (2010) Numerical chromosomal changes and risk of development of myelodysplastic syndrome in acute myeloid leukemia in patients with Fanconi anemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 203:180-186.
- Melo, J.V. (1996) The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood*, 88(7): 2375-2384.

- Melo, J.V., Myint, H., Galton, D.A., Goldman, J.M. (1994) P190BCR-ABL chronic myeloid leukaemia: the missing link with chronic myelomonocytic leukaemia. *Leukemia* 8(1): 208-211.
- Michael, W.N., Deininger, J.M., Melo, G., Melo, H. (2000) The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*, 96(10):3343-3356
- Mohamed, A.N., Varterasian, M.L., Dobin, S.M., McConnell T.S., Wolman, S.R., Rankin, C., Willman, C.L., Head, D.R., Slovak, M.L. (1998) Trisomy 6 as a Primary Karyotypic Aberration in Hematologic Disorders. *Cancer Genet Cytogenet* 106:152–155.
- Moloney, W.C., (1987) Radiogenic Leukemia Revisited. *Blood*, 70(4):905-908.
- Mrozek, K., Heinone, K., Bloomfield, C.D. (2001) Clinical importance of cytogenetic in acute myeloid leukemia. *Best Practice&Research Clinical Haematology*, 14(1):19-47.
- Nasr, R. (2010) Eradication of acute promyelocytic leukemia-initiating cells by PML/RARA-targeting. *Int J Hematol*, 91:742–747.
- Nussbaum, R.L., McInnes R.R., Willard, H.F. (2005) Thompson& Thompson Tıbbi Genetik, 311-330. Güneş Kitabevi
- Pane, F., Intrieri, M., Quintarelli, C., Izzo, B., Muccioli, G.C., Salvatore, F. (2002) BCR/ABL genes and leukemic phenotype: from molecular mechanism to clinical correlations. *Oncogene* 21, 8652-8667
- Paulsson, K., Johansson, B. (2007) Trisomy 8 as the sole chromosomal aberration in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Pathologie Biologie*, 55:37–48.
- Paulsson, K., Heidenblad, M., Strömbeck, Staaf, J., Jönsson, G., Borg, A., Fioretos, T., Johansson, B. (2006) High-resolution genome-wide array-based comparative genome hybridization reveals cryptic chromosome changes in AML and MDS cases with trisomy 8 as the sole cytogenetic aberration. *Leukemia*, 20:840-846.
- Pekçelen, Y. (2003) Lösemiler. *Klinik Hematoloji*, 167-226. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi.
- Peterson, L.F., Boyapati, A., Ahn, E.Y., Biggs, J.R., Okumura, A.J., Lo, M.C., Zhang, M.Y., Zhang, D.E. (2007) Acute myeloid leukemia with the 8q22;21q22 translocation: secondary mutational events and alternative t(8;21) transcripts. *Blood*, 110(3):799-805
- Piller, G.J. (2001) Leukemia- a brief historical review from ancient times to 1950. *British Journal of Haematology*, 112:282-292.
- Raap, A.K. (1997) Overview of fluorescence in situ hybridization techniques for molecular cytogenetics. *Current Protocols in Cytometry*, 8.1.1-8.1.6.
- Ravandi, F., Bunnett, A.K., Agura, E.D., Kantarjian, H.M. (2007) Progress in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. *Cancer*, 110(9):1900-1910
- Redon, R., Fitzgerald, T., Carter, N.P. (2009) Comparative genomic hybridization: DNA labelling, hybridization and detection. *DNA microarrays for biomedical research: Methods Mol Biol* 529:267-278.
- Rohrbacher, M., Hasford, J., (2009) Epidemiology of chronic myeloid leukemia (CML). *Best Pract Res Clin Haematol* 22(3):295-302
- Rosmarin, G.A., Yang, Z., Resendes, K.K. (2005) Transcriptional regulation in myelopoiesis: Hematopoietic fate choice, myeloid differentiation, and leukemogenesis. *Experimental Hematology*, 33(2):131-143.
- Ross, J.A., Spector, L.G., Robinson, L.L., Olshan, A.F. (2005) Epidemiology of leukemia in children with Down syndrome, 44(1):8-12.
- Ruddon, R.W. (2007) *Cancer Biology*, Fourth Edition, 75-85. Oxford University press, New York.
- Sakızlı, M., Atabey, N. ed. (2006) *Hücre: Moleküler Yaklaşım*. İzmir Tıp Kitabevi, İzmir.

- Sayitoğlu, M.A. Hematoloji'de Real-Time PCR. Temel Moleküler Hematoloji Kursu.
- Schoch, C., Kohlmann, A., Dugas, M., Kern, W., Schnittger, S., Haferlach, T. (2006) Impact of trisomy 8 on expression of genes located on chromosome 8 in different AML subgroups. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 45:1164–1168
- Sessions, J. (2007) Chronic myeloid leukemia in 2007. *Am J Health-Syst Pharm*, 64:54-59
- Silver, R.T. (2009) The blast phase of chronic myeloid leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 22(3):387-394
- Skorokhod, O.M., Kravchuck, I.V., Teleheiv, H.D., Maliuta, S.S. (2006) Role of Ku protein in normal and cancer cell. *Ukr Biokhim Zh*, 78(5):5-15.
- Stahlberg, A., Zoric, N., Aman, P., Kubista, M. (2005) Quantitative real-time PCR for cancer detection: the lymphoma case. *Expert Rev. Mol. Diagn* 5(2)
- Starza, R.L., Wlodarska, I., Aventin, A., Falzetti, D., Crescenzi, B., Martelli, M.F., H., Mecucci, C. (1998) Molecular Delineation of 13q Deletion Boundaries in 20 Patients With Myeloid Malignancies. *Blood*, 91:231-237.
- Stone, R.M., O'Donnell, M.R., Sekeres, M.A. (2004) Acute myeloid leukemia. *Hematology*, 98-114.
- Strefford, J.C., Parker, H. (2009) Array-based comparative Genomic Hybridization as a tool for analyzing the leukemia genome. *Meth Mol Biol*, 538:151-177
- Suela, J., Alvarez, S., Cigudosa, J.C. (2007) DNA profiling by arrayCGH in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Cytogenet Genome Res*, 118(2-4):304-309.
- Van Etten, R.A. (1999) Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl. *Trends Cell* 9(5):179-186
- Vardiman, J.V., Harris, N.L., Brunning, R.D. (2002) The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasm. *Blood*, 10(7): 2292-2302
- Vardiman, J.W. (2009) The WHO classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: An overview with emphasis on the myeloid neoplasm. *Chemico-Biological Interaction* 184:16-20
- Vardiman, J.W., Thiele, J., Arber, D.A., Brunning, R.D., Borowitz, M.J., Bloomfield, C.D., Porwit, A., Harris, N.L., Le Beau, M.M., Lindberg, E.H., Tefferi, A., Bloomfield, C.D. (2009) The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 114: 937-951
- Velden, V.H., Hohhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: Principles, approaches and laboratory aspects. *Leukemia* 17:1013-1034.
- Vogel, V.G., Fisher, R.E. (1993) Epidemiology and etiology of leukemia. *Curr Opin Oncol*, 5(1):26-34.
- Wahab, O.A., Levine, R.L. (2010) Recent advances in the treatment of acute myeloid leukemia. *F1000 Med Rep*, 2:55
- Wiktor, A., Rybicki, B.A., Piao, Z.S., Shurafa, M., Barthel, B., Maeda, K., Dyke, D.L.V. (2000) Clinical Significance of Y Chromosome Loss in Hematologic Disease. *Genes, Chromosomes & Cancer* 27:11–16.
- Willams, W.S., Beutler, E., Litchman, M.A., Coler, B.S., Kippt, S., Mauner, A.M. (1991) *Willam's Hematology*, Fifth Edition, 2209-2349). McGraw Hill Company, New York.

Wolman, S.R., Gundacker, H., Appelbaum, F.R., Slovak, M.L. (2002) Southwest Oncology Group. Impact of trisomy 8 (+8) on clinical presentation, treatment response, and survival in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study.

Wong, M.L., Medrano, J.F. (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39:75-85.

Wong, A.K., Fang, B., Zhang, L., Guo X., Lee S., Schreck, R. (2008) Loss of the Y Chromosome. *Arch Pathol Lab Med*, Vol:132, 1329-1332.

Wujcik, D. (2003) Molecular biology of leukemia. *Semin Oncol Nurse* 19(2):83-89

Ylstra, B., Ijssel, P., Carvalho, B., Brakenhoff, R.H., Meijer, G.A. (2006) BAC to the future! or oligonucleotides: a perspective for micro array comparative genomic hybridization (array CGH). *Nucleic acids Research*, 34(2): 445-450.

Zhang, L.J., Shin, E.S., Zhong-xing, Y.U., Shi-bo, L. (2007) Molecular genetic evidence of Y chromosome loss in male patients with hematological disorders. *Chin Med J*, 120(22):2002-2005.

[http://en.wikipedia.org/wiki/DNA\\_microarray](http://en.wikipedia.org/wiki/DNA_microarray)

<http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence-in-situ-hybridization>

<http://f1000scientist.com/article/display/13720/>

<http://pubweb.fccc.edu/philadelphiachromosome/history.html>

[http://www.nature.com/nrd/journal/v3/n9/fig\\_tab/nrd1496\\_F1.html](http://www.nature.com/nrd/journal/v3/n9/fig_tab/nrd1496_F1.html)

İhan, O. Kronik Miyelositer Lösemi. [http://www.osmanilhan.com/kronik\\_miyelosit.pdf](http://www.osmanilhan.com/kronik_miyelosit.pdf). (Ulaşım 18 Ocak 2011)

## ÖZGEÇMİŞ

### 1. Bireysel Bilgiler

- Adı Soyadı: Duygu YAVUZ
- Doğum yeri ve tarihi: İSTANBUL 13.07.1986
- Uyuşu: T.C.
- Medeni Durumu: Bekar
- Çalıştığı kurum: Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik A.D.
- İletişim Adresi ve telefonu: Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Binası Tıbbi Genetik A.D. 41380 İzmit-KOCAELİ Tel: (262) 303 88 40

### 2. Eğitimi

#### EĞİTİM DURUMU

- 2004- 2008 : Ege Üniversitesi  
Biyoloji Bölümü
- 1998-2004 : Gölcük Atatürk Anadolu Lisesi

#### STAJLAR

- 15/ 06/2007- 15/ 07/2007 : Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji A.D.
- 19/ 06/2006- 07/ 07/2006 : Kocaeli Devlet Hastanesi Araştırma  
Laboratuvarı

#### YABANCI DİL

İngilizce

#### ALDIĞI EĞİTİMLER ve SERTİFİKALAR

- 27/04/2009- 27/04/2010 : İngilizce Dil Eğitimi (Advanced)  
Wall Street Institute- Kocaeli
- 15/05/2009- 17/05/2009 : ISO 9001:2008 İç Denetçi Sertifikası  
Metodd Danışmanlık- Kocaeli
- 09/05/2009- 10/05/2009 : ISO 9001:2008 Kalite Yönetim Sistemi  
Metodd Danışmanlık- Kocaeli
- 17/05/2008- 18/05/2008 : KAI-ZEN Sürekli İyileştirme Sistemi  
Ege Üniversitesi



26/04/2008- 27/04/2008 : ISO22000 HACCP Gıda Güvenliği  
Yönetim Sistemi Sertifikası  
Ege Üniversitesi

14/05/2007- 17/05/2007 : DNA Hasarı, Onarımı ve Hastalıklarla  
İlişkisi- Dokuz Eylül Üniversitesi

### 3. Unvanları

2008- : Biyolog

### 4. Mesleki Deneyimi

- Kan, doku, idrar, vücut sıvıları ve nükleik asit taşıma ortamından DNA, RNA veya toplam nükleik asit izolasyonu (Manuel ve MagNa Pure Compact System).
- Agaroz jel elektroforezi ve jel görüntüleme, kaydetme, yorumlama.
- Thermal Cyclers'da PCR uygulamaları.
- NanoDrop ile nükleik asitlerin ve proteinlerin kalite ve kantite açısından incelenmesi.
- LightCycler 1,5 cihazı uygulamalarının yapılması.
- LightCycler 480 cihazı uygulamalarının yapılması.
- Dizi Analizi uygulamaları.
- Yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizi uygulamaları .

### 5. Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

### 6. Bilimsel Etkinlikler

#### Kongre Bildiri Kitaplarında Yer Alan Yayınlar

- **D Yavuz**, N Cine, Z Ilkay, B Dal, N Uzulmez, D Sunnetci, E Gumuslu, B Enguzel, S Eren, R Akkoyunlu, H Savli. *Mutations frequency of the thrombosis risk factor genes in habituel abortus patients in the region of Kocaeli.* (Poster Sunum) 9. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi-2010- İstanbul
- Z Ilkay, N Cine, **D Yavuz**, B Dal, N Uzulmez, D Sunnetci, E Gumuslu, B Enguzel, S Eren, RU Akkoyunlu, H Savli. *Detection of MEFV gene mutation frequency patients Familial Mediterranean Fever (FMF) in Kocaeli region.* (Poster Sunum) 9. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi-2010- İstanbul
- H Savli, D Sunnetci, N Uzulmez, E Gumuslu, **D Yavuz**, S Eren, B Enguzel, R Akkoyunlu, Z Ilkay, N Cine. *Yüksek Çıktılı FISH Paneli (High – Throughput Fish Analysis) Analizleri: Hematolojik Malignite Analizinde Hassas Yeni Bir Tarama Seçeneği.* (Poster Sunum) 36. Ulusal Hematoloji Kongresi-2010-Antalya
- N Cine, N Uzulmez, D Sunnetci, E Gumuslu, B Enguzel, S Eren, Z Ilkay, **D Yavuz**, R Akkoyunlu, H Savli. *High-throughput FISH analyses (HTFA): A new*

*sensitive approach to screen hematological malignancies.* (Poster Sunum) 9. Ulusal Tibbi Genetik Kongresi-2010- İstanbul

- B Enguzel, N Cine, S Eren, D Sunnetci, E Gumuslu, Z Ilkay, **D Yavuz**, N Uzulmez, RU Akkoyunlu, H Savli. *Comparison of a-CGH and conventional cytogenetics in a primary amenorrhea case.* (Poster Sunum) 9. Ulusal Tibbi Genetik Kongresi-2010- İstanbul
- B Enguzel, N Cine, S Eren, D Sunnetci, E Gumuslu, Z Ilkay, **D Yavuz**, N Uzulmez, RU Akkoyunlu, H Savli. *Diagnostic value of a-CGH method for recurrent miscarriage and implantation failures.* (Poster Sunum) 9. Ulusal Tibbi Genetik Kongresi-2010- İstanbul
- N Cine, RU Akkoyunlu, E Gumuslu, D Sunnetci, N Uzulmez, B Enguzel, S Eren, **D Yavuz**, Z Ilkay, H Savli. *Value of array CGH in the evaluation of microdeletion syndromes.* (Poster Sunum) 9. Ulusal Tibbi Genetik Kongresi-2010- İstanbul
- E Gumuslu, N Cine, B Kara, D Sunnetci, N Uzulmez, B Enguzel, S Eren, R Akkoyunlu, Z Ilkay, **D Yavuz**, H Savli. *Application of array CGH method in two 18q21.31-q23 deletion patients.* (Poster Sunum) 9. Ulusal Tibbi Genetik Kongresi-2010- İstanbul
- H Savli, D Sunnetci, N Uzulmez, E Gumuslu, **D Yavuz**, S Eren, B Enguzel, R Akkoyunlu, Z Ilkay, N Cine. *Diagnostic use of targeted array CGH platforms: 2009-2010 Kocaeli University experience.* (Poster Sunum) 9. Ulusal Tibbi Genetik Kongresi-2010- İstanbul



T.C.  
**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**KAPSAM DIŞI ARAŞTIRMALARI DEĞERLENDİRME KURULU**

ARAŞTIRMA ONAY FORMU

<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	PROJE NO/ TEZ, AKADEMİK	2010/17	Tez
	ARAŞTIRMANIN ADI	Erişkin Myeloid Lösemi Olgularının tanısında Yüksek çıktılı BAC tabanlı Moleküler FISH analizlerinin Real-Time PCR Teknolojisiyle eş zamanlı kullanımı	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI	Duygu Yavuz	
	DANIŞMAN	Yrd.Doç.Dr.Naci ÇİNE	
<b>DEĞERLENDİRİLEN BELGELER</b>	ARAŞTIRMANIN YERİ	KOÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ 1. Koleksiyon materyal kullanılacak 2. Rutin hizmetlerden üretilecek 3. Dosya kayıtları incelenecek 4. Diğer.....	Rutin hizmetlerden üretilecek	
	GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME FORMU	—	
	AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU	—	
ARAŞTIRMANIN BÜTÇESİ	—		

<b>KARAR BİLGİLERİ</b>	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelikte Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik (11 Mart 2010 tarih ve 27518 Sayılı Resmî Gazete) 2. Madde (aa) bendine göre kapsam dışı olan araştırma değerlendirilmiş ve onaylanmasına karar verilmiştir.  23.09.2010
------------------------	---

<b>ÖNERİ</b>	
--------------	--

KAPSAM DIŞI ARAŞTIRMALARI DEĞERLENDİRME KURULU BİLGİLERİ					
<b>ÇALIŞMA ESASLARI</b>	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelikte Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik (11 Mart 2010 tarih ve 27518 Sayılı Resmî Gazete)				
<b>ÜYELER</b>					
Unvanı /Adı Soyadı	Uzmanlık	Kurumu	Cins	İlişki	Katılım/İmza
Prof. Dr. Arzu Arslan	Radyoloji	Tıp Fakültesi Dekan Yardımcısı	K		
Prof. Dr. Nermin Ersoy	Deontoloji	Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Etik AD.	K		
Prof. Dr. B.Faruk Erden	Farmakoloji	Tıp Fakültesi Farmakoloji AD.	E		