

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI ve HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ÇOCUK HEMATOLOJİ BİLİM DALI

ÇOCUKLUK ÇAĞI AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİLERİNDE

DNA İNDEKSİ

108071

Yandal Uzmanlık Tezi

Uz.Dr. Hüseyin Gülen

108071

Tez Yöneticisi

Prof. Dr. Gülersu İrken

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

İzmir-2001

İÇİNDEKİLER:

1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Çocukluk Çağı Lösemilerinin Epidemiyolojisi	3
2.2. Genetik Sendromlar, Kromozomal Anomaliler ve Ailesel Özellikler	4
2.3. Tanımlanmış Nedensel Faktörler	4
2.3.1. İyonize Radyasyon	5
2.3.2. Non-iyonize Radyasyon	5
2.3.3. Kimyasal ve Diğer Etkenler	5
2.3.4. İnfant Lösemisi	5
2.3.5. İnfeksiyonlar ve Çocukluk Çağı Lösemisi	6
2.3.6. Genetik Predispozisyon ve Çevresel Etkenler	6
2.4. Blastik Hücrelerin Biyolojik Sınıflandırması	6
2.4.1. İmmüfenotip	6
2.4.2. Genetik özellikler	7
2.4.3. Moleküler Patogenez	8
2.5. Çocukluk çağı ALL'inde prognostik faktörler ve risk grupları	9
2.5.1. Yaş ve lökosit sayısı	9
2.5.2. İmmüfenotip	10
2.5.3. Sitogenetik	11
2.5.3.1. Sayısal kromozom anomalileri	11
2.5.3.2. DNA indeksi	15
2.5.3.3. Yapısal kromozom anomalileri	17
2.5.4. Hücre proliferasyonu ve İlaç duyarlılık testi	20
2.5.5. Farmakolojik özellikler	21
2.5.6. Farmakogenetik özellikler	22
2.5.7. Tedaviye cevap	22
2.5.8. Lösemik hücre yükü	23
2.5.9. Minimal rezidüel hastalık	24
2.6. Lösemi ve tedavisine bağlı geç etkiler	25

2.6.1. Büyüme üzerine etkiler	25
2.6.2. Kognitif fonksiyonlar	25
2.6.3. Üretkenlik üzerine etkileri	25
2.6.4. Kardiyak etkiler	26
2.6.5. İkincil maligniteler	27
2.6.6. Avasküler nekroz	27
2.7. Flow sitometrik DNA analizi	28
2.7.1. Hücre siklüsü analizi	29
2.7.2. Hücre siklüsü Flow sitometri ile nasıl değerlendirilir?	30
3. HASTALAR VE YÖNTEM:	31
3.1. Örneklem	31
3.2. Yöntem	31
3.2.1. Örneklerin Alınması	31
3.2.2. Materyalin Taşınması ve Saklanması	31
3.2.3. Mononükleer hücrelerin izolasyonu	31
3.2.4. Mononükleer hücrelerin dondurulması	34
3.2.5. Mononükleer hücrelerin çözündürülmesi	34
3.2.6. Kontrol mononükleer hücrelerin hazırlanması	35
3.3. Hücre siklüsü ve DNA analizi	36
3.3.1. Test prensibi	36
3.3.2. Kullanılan reaktif, araç ve materyaller	36
3.3.3. Boyama yöntemi	36
3.3.4. Flow sitometrede analiz	37
3.4. İstatistik yöntemler	38
4. BULGULAR	39
4.1.1. Demografik özellikler	39
4.1.2. Hastaların tanı anında klinik ve laboratuvar özellikleri	39
4.1.3. Hastaların tanı anında blastik hücre özellikleri	40
4.1.4. Hastaların erken dönem tedavi yanıtları	41
4.1.5. Hastaların tedavi edildikleri merkezlerde yapılmış risk	42

sınıflaması	
4.2.1. Hastaların risk sınıflamasına göre demografik özellikleri	43
4.2.2. Risk sınıflamasına göre klinik ve laboratuvar özellikleri	43
4.2.3. Risk sınıflamasına göre tanı anında blastik hücre özellikleri	45
4.2.4. Risk sınıflamasına göre tedavi yanıtları	47
4.3.1. Hastaların DNA indekslerine göre demografik özellikleri	48
4.3.2. DNA indekslerine göre klinik ve laboratuvar özellikleri	48
4.3.3. DNA indekslerine göre tanıda blastik hücre özellikleri	49
4.3.4. DNA indekslerine göre tedavi yanıtları	51
4.4.1. Hastaların S fazı oranlarına göre demografik özellikleri	52
4.4.2. S fazı oranlarına göre klinik ve laboratuvar özellikleri	52
4.4.3. S fazı oranlarına göre tanıda blastik hücre özellikleri	53
4.4.4. S fazı oranlarına göre tedavi yanıtları	55
4.5. Hastaların hücre siklüsü dağılımları	55
4.5.1. İmmüfenotipe göre hücre siklüsü dağılımları	55
4.5.2. DNA indekslerine göre hücre siklüsü dağılımları	56
4.5.3. FAB sınıflamasına göre hücre siklüsü dağılımları	56
4.5.4. FAB sınıflamasına göre DNA ploidi	57
4.5.5. FAB ve immüfenotipe göre DNA indeksleri ve anöploidi	57
4.5.6. DNA indeksi ve karyotipik ploidi karşılaştırması	58
4.6. İn vivo prednizolon yanıtlarına göre hastaların değerlendirilmesi	58
4.6.1. İn vivo prednizolon yanıtlarına göre demografik özellikleri	58
4.6.2. Klinik ve laboratuvar özellikleri	59
4.6.3. Blastik hücre özellikleri	59
4.6.4. İn vivo prednizolon yanıtlarına göre indüksiyon	60

tedavisi sonuçları	
4.7. NCI/CTEP risk sınıflamasına göre hastaların değerlendirilmesi	61
4.7.1. Hastaların NCI/CTEP'e göre risk sınıflaması	61
4.7.2. Hastaların demografik özellikleri	61
4.7.3. Klinik ve laboratuvar özellikleri	62
4.7.4. Blastik hücre özellikleri	63
4.7.5. NCI/CTEP risk sınıflamasına göre tedavi yanıtları	65
5. TARTIŞMA	67
6. SONUÇLAR	77
6.1. Tüm hasta grubunun genel özellikleri	77
6.2. Hastaların BFM 95 protokolüne göre değerlendirilmeleri	78
6.3. Hastaların NCI/CTEP risk sınıflamasına göre değerlendirilmeleri	78
6.4. Hastaların DNA indekslerine göre değerlendirilmeleri	79
6.5. Hastaların S fazı oranlarına göre değerlendirilmeleri	80
6.6. Hastaların prednizolon yanıtlarına göre değerlendirilmeleri	81
7. TÜRKÇE ÖZET	82
8. İNGİLİZCE ÖZET	84
9 KAYNAKLAR	86
10. EKLER	101
1. Hastaların demografik, klinik ve laboratuvar verileri	102
2. Hastaların hücre siklusü ve DNA analiz raporları	104

KISALTMALAR

ALL	: "Akut lenfoblastik lösemi"
Hb	: "Hemoglobin"
HLA	: "Human leukocyte antigen"
DNA	: "Deoksiribonükleik asit"
PCR	: "Polymerase chain reaction"
SSS	: "Santral sinir sistemi"
SEER	: "Surveillance, Epidemiology and End Results"
AML	: "Akut myeloblastik lösemi"
FISH	: "Fluorescent In Situ Hybridization"
CTEP	: "Cancer Therapy Evaluation Program"
NCI	: "National Cancer Institute"
DFCI	: "Dana Farber Cancer Institute"
SJCRH	: "St Jude Children's Research Hospital"
CALLA	: "Common ALL antigen"
RNA	: "Ribonükleik asit"
MTT	: "Metil Tiyazol Tetrazolium bromid"
MRD	: "Minimal Residual Disease"
GH	: "Growth Hormone"
CCSS	: "Childhood Cancer Survivor Study"
PI	: "Propidium Iodide"
MNC's	: "Mononuclear Cells"
FCS	: "Fetal Calf serum"
DMSO	: "Dimethyl Sulphoxyde"
PBMNC's	: "Peripheral Blood Mononuclear Cells"
DDM	: "Doublet Discrimination Mode"
CEN	: "Chicken Erythroid Nüclei"
CTN	: "Calf Thymocyte Nüclei"
FAB	: "French-American-British"
RF	: "Risk Faktörü"
CCG	: "Children Cancer Group"
ISCN	: "International System for Human Cytogenetic Nomenclature"

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akut lenfoblastik lösemi, son 40 yılda tedavisinde önemli gelişmeler sağlanmış, çocukluk çağıının en sık görülen malign bir hastalığıdır. Halen ALL'li çocukların 2/3'ünden fazlasında tam kür sağlanabilmektedir. Bu başarı 1940-1950'li yıllarda etkili antineoplastik ajanların tedaviye girmesi, 1960'lı yıllarda kombine kemoterapi ve idame tedavisi, 1970'lerde subklinik santral sinir sistemi lösemisi tedavisinin başlaması ile kazanılmıştır. 1970'li yıllarda klinik ve laboratuvar bulgularından bazılarının prognoza etkili olduğu anlaşılmış, ancak 1980'li yıllarda, prognoz kriterleri özellikle sitogenetik bulgular ile birlikte değerlendirilerek riske göre tedavi gündeme gelmiştir. Yüksek riskli gruplarda allogeneik hematopoetik kök hücre nakli ile kür sağlanabileceği görülmüş, immünfenotipleme, moleküler genetik çalışmalar ile risk kriterleri ve buna uygun tedavi seçimleri ile de kür oranları artmaya başlamıştır. Uzun süreli Olaysız sağkalım, 1965'den önce sadece %5 iken, günümüzde %70'in üzerine çıkmıştır(1-4). Bu yoğun tedavilerle kür oranlarının artmasına karşın, ciddi akut komplikasyonların yanısıra yıllar sonra ortaya çıkabilen önemli geç komplikasyonlar, örneğin ikincil maliy niteler, daha sık olarak görülmeye başlamıştır (3-5). Bu nedenle tedavideki başarıyı azaltmadan komplikasyonların sıklığını azaltmak veya kür için gerektiğinde daha yoğun tedavi protokollerinin kullanılmasını sağlamak amacıyla, aynı tedavileri alan çocuklar arasında prognozla ilişkisi olabilecek ve risk sınıflamasında kullanılabilecek, klinik-biyolojik özellikleri saptamaya yönelik birçok çalışma yapılmış ve halen de yapılmaktadır.

Bu çalışmalarda heterojen bir hastalık olan akut lenfoblastik lösemide cinsiyet, tanı sırasındaki yaş, organomegali ve lenf nodlarının büyüklüğü, santral sinir sistemi tutulumu, mediastende kitle, hemoglobün (Hb), lökosit ve trombosit sayısı, FAB sınıflaması, immünfenotip, immünoglobülin düzeyi, lösemik hücrelerde myeloid antijen ekspresyonu, glukokortikoid reseptör düzeyi, HLA tipi, hastanın nütrisyonel durumu gibi özelliklerin, hastalığın seyrini etkileyen önemli prognostik faktörler olduğu bildirilmiştir (6-14). Tedavideki gelişmelerle birlikte, önceleri prognozda istatistiksel olarak önemli olan bazı klinik özellikler giderek önemini kaybetmiştir. ALL'de hangi prognostik faktör/faktörler en önemlidir ? Risk sınıflamasında ve riske göre tedavide hangileri gözönüne alınmalıdır ? Bu sorulara kesin, net bir cevap vermek halen oldukça güçtür. Birçok merkez, hastalarda risk faktörlerini farklı sınıflamakta ve buna

göre değişik tedavi rejimlerini uygulamaktadır. Farklı sınıflama ve farklı tedavi de prognoz kriterlerinin önemini değiştirebilmektedir.

Son yıllarda, lösemik hücrelerin biyolojik davranışlarının sınıflandırılmasında, genetik özelliklerin çok önemli olduğu gösterilmiş ve bazı spesifik kromozomal translokasyonların varlığında (t (1:19), t (9:22), t (4:11)) prognozun kötü olduğu saptanmıştır (15-20). Bu gibi durumlarda, daha yoğun kemoterapi ve erken kemik iliği transplantasyonu endikasyonları doğmaktadır. Aksine, sitogenetik olarak hiperdiploidinin (tetraploidi hariç) ve flow sitometrik olarak DNA indeksinin 1.16'nın üzerinde saptanmasının, iyi prognoz kriteri olduğu bildirilmiştir (6,21). Bu hastalarda, nispeten daha az toksik olan antimetabolit içerikli kemoterapilerle benzer sonuçlar alınmaktadır.

Risk sınıflamasında en önemli özellikler olan genetik anormalliklerin saptanmasında, sitogenetik ve moleküler analiz yöntemlerini rutin olarak kurmak ve standart bir şekilde uygulamak her yerde mümkün olmamaktadır. Bununla birlikte DNA indeksinin 1.16'nın üzerinde olmasının iyi prognoz kriteri olduğu ve kötü prognoz kriteri olarak bilinen bazı translokasyonlarda (t (9:22), t (1:19)) ise DNA indeksinin <1.16 olduğu bilinmektedir (22-26). Sitogenetik ve moleküler analiz yöntemlerinden her zaman sonuç alınamaması ve maliyetlerinin yüksek oluşu nedeniyle, ilk aşamada Flow sitometrik DNA indeksi ile hastaların risk sınıflandırması yapılabilir. Özellikle DNA indeksi 1.16'nın üzerinde olan hastalar, epipodofilotoksinler, alkilleyici ajanlar ve antrasiklinler gibi kemoterapötiklerden ve bunların ciddi yan etkilerinden kaçınabileceklerdir.

Lösemi tedavisinde risk sınıflaması için DNA indeksinin kullanılmasının, literatüre yeni bir katkısı olmayabilir, ancak bizim gibi gelişmekte olan ülkelerde, sitogenetik ve moleküler analiz yöntemlerinin uygulanamadığı veya yeterli sonuç alınmadığı lösemi tedavi merkezlerinde, flow sitometrik olarak DNA indeksine bakılarak hastaların risk sınıflaması yapılabilir ve uygun vakalarda kemoterapi toksisitesinin yanısıra tedavi maliyetleri de en aza indirilebilir.

Bu nedenle bu çalışmada yeni tanı almış ALL'li hastalarımızda DNA indeksi ile prognoz ilişkisinin araştırılması ve rutin kullanıma sokulması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemileri, son 40 yılda en fazla kanser araştırmaları yapılan ve halen geniş tedavi gruplarının yoğun çalışmalar yaptığı en önemli maliyen hastalıklarından biridir. Tablo 1'de Avrupa ve Amerika'da çeşitli lösemi tedavi merkezlerinin kür oranları görülmektedir (1,2,27) .

Tablo 1. Çocukluk çağı ALL'sinde 11 uluslararası çalışma grubunun tedavi sonuçları.

Çalışma grubu	Hasta sayısı	Olaysız sağkalım (± SE), %
AIEOP ALL 88(1988-1992)	396	66.6 (2.4), 5 yıllık
BFM (1986-1990)	998	72 (2), 6 yıllık
CCG 100 (1983-1989)	3465	67(2), 5 yıllık
Dana Farber 85-01(1985-1987)	220	78(3) 7 yıllık
DFW (1986-1992)	243	66.6 (6.5) 5 yıllık
Dutch (1984-1988)	291	72 (3) 6 yıllık
FRALLE 83 (1983-1987)	559	57 (2) 7 yıllık
MRC UKALL X(1985-1990)	1612	62 (2) 5 yıllık
POG Alinc + T-cell + infant protokolleri (1986-1990)	2404	66.4 (2.4) 4 yıllık
SJCRH XI(1984-1988)	358	71 (4) 8 yıllık
TCCSG L84-11(1984-1989)	490	63.8 (3.2) 7 yıllık

2.1. Çocukluk Çağı Lösemilerinin Epidemiyolojisi

Akut lenfoblastik lösemi, çocukluk çağının en yaygın maliynitesidir, tüm çocukluk çağı kanserlerinin ¼'ünü ve yeni tanı lösemilerin de ¾'ünü oluşturmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde 15 yaş altı çocukluk ALL insidansının ~ 3.4/100 000 ve pik insidansı da 3-4 yaş arasında olduğu bildirilmektedir (28-30).

"Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER)" verilerine göre, ABD'de 1973'den 1991'e kadar çocukluk ALL insidansında % 20'lik kümülatif bir artış olmuştur. Bu artış, çocuk veya ebeveynlerinin çevresel zararlı etkenlere örneğin elektromanyetik alan, diyetteki nitrit içeriği, pestisidler ve iyonize radyasyona daha

fazla maruz kalmasına bağlanmıştır. Ancak günümüzde bu faktörlerin hiçbirisinin ALL gelişimiyle direkt bağlantısı gösterilememiştir (29,30).

Dünyada sıklık, yaş dağılımı ve ALL altgrupları belirgin coğrafik farklılıklar göstermektedir, bu da genetik yatkınlık ve çevresel faktörlerdeki değişkenliğe bağlanmaktadır(27).

2.2. Genetik Sendromlar, Kromozomal Anomaliler ve Ailesel Özellikler

Bazı yapısal genetik defektlerin (trizomi 21, konjenital immün yetmezlik, ataksi telenjiyektazi), çocuklarda ALL insidansını arttırdığı gösterilmiştir (31). Örneğin Down sendromunda, ALL ve AML riski 10-20 kat artmıştır. Ayrıca Bloom sendromu, nörofibromatozis, Schwachman sendromu ve Fanconi anemisinde de bu risklerin arttığı bilinmektedir. Down sendromlu bazı AML vakalarında, kromozom band 21q22 bölgesinde AML-1 geni tanımlanmıştır.

Lösemiler genellikle translokasyon, delesyon ve insersiyonları içeren kazanılmış somatik mutasyonlarla karakterize klonal hemopatilerdir. Akkiz somatik mutasyonlar, sıklıkla normal hematopoezde anahtar rol oynayan proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonunu veya yapılarını bozmaktadır. Translokasyon anomalileri daha sık görülmektedir. Örneğin infantlarda, kromozom band 11q23'deki MLL geni hem AML hem ALL gelişimi ile ilişkiliyken, t(8:21) AML-M2 'de, t(15:17) M3'de, trizomi 8 AML'de ve t(9:22) ve t(1:19) da ALL'de saptanmaktadır (32,33).

Lösemilerdeki ailesel yığılma, kalıtsal predispozan bir faktörden veya ortak çevresel bir faktörden kaynaklanabilir (34). ALL'li çocukların kardeşlerinde, normal popülasyona göre ALL gelişme riski 2-4 kat fazladır ve bu risk monozigotik ikizlerde daha yüksek olup özellikle de hayatın ilk birkaç yılında ortaya çıkmaktadır (2,35,36). Moleküler çalışmalar, monozigotik ikizler arasındaki bu konkordansın kalıtsal genetik bir mutasyondan ziyade ortak plasental dolaşıma bağlı olduğunu göstermektedir. Ortak plasental dolaşım yoluyla intrauterin metastaz varlığı gösterilmiştir. İlginç olarak, identik ikiz çiftinde monoklonal orjinli olan ve sırasıyla 9 ve 11 yaşlarında ortaya çıkan geç başlangıçlı T hücreli lösemi bildirilmiştir (36). Sonuçta, çocukluk çağında lösemnin başlangıcının intrauterin etkilenmeye bağlı olabileceği öne sürülmektedir (2,35,36).

2.3. Tanımlanmış Nedensel Faktörler

Lösemilerin çoğunda neden bilinmemesine rağmen, bazı vakalarda temel nedenler gösterilmiştir. Bunlar iyonize radyasyon, bazı kimyasal maddeler özellikle organik

çözücüler (benzen) ve en azından bir virüs (İnsan T hücreli lösemi/lenfoma virüsü 1)'dür. İn vitro ve hayvan çalışmalarında, bu ajanlarla oluşan DNA hasarı veya hücrel transformasyon ile lökomogenezis arasında ilişki gösterilmiştir. Vakaların çoğunda, genotoksik bir hasar ile hastalığın maksimum riski arasındaki zaman 3 yıl veya daha fazla olmakta ve artmış risk yıllar boyu sürebilmektedir (37).

2.3.1. İyonize Radyasyon

Nedensel mekanizması en iyi gösterilmiş faktördür. Japonya'da Nagazaki ve Hiroşima'da atom bombası sonrası, akut lösemiler ve KML insidansının belirgin arttığı gösterilmiştir. Ayrıca iyonize radyasyonla bireysel etkilenmelerin de (ilk radyologlarda ve radyasyon araştırmacılarında ve maliyn veya non-maliyn hastalık nedeniyle tedavi sırasında iyonize radyasyon alanlarda) lösemi ile ilişkisi gösterilmiştir.

2.3.2. Non-iyonize Radyasyon

Önceki çalışmalarda, çocukluk lösemisi ile manyetik alana (wire-coding) maruz kalma arasında ilişki olduğu, fakat 60 Hz manyetik alan ile lösemi ilişkisinin olmadığı belirtilmekteydi. Yeni yapılan bir meta analiz, çalışmaların çoğunun istatistiksel olarak önemli olmasa da, artmış "odds ratio" bildirdiklerini göstermektedir (34).

2.3.3. Kimyasal ve Diğer Etkenler

Tarımsal amaçlı veya evde kullanılan böcek öldürücüler ve benzen gibi çözücülerle temasın lösemiler ile ilişkisi gösterilmiştir (38). Çiftçiler, orman işçileri, kağıt endüstrisi işçileri ve plastik sanayi işçileri, lösemiden ölüm açısından daha yüksek risk altındadırlar.

2.3.4. İnfant Lösemisi

Yaşamlarının ilk yılında lösemi tanısı alan infantların yaklaşık %80'inde, MLL geni kromozom band 11q23 bölgesinde intrauterin etkilenme sonucu oluşan bir anormallik vardır (ALL vakalarının %85'inde, AML vakalarının ise %65'inde gösterilmiştir). MLL geni anormallikleri, ayrıca tedaviye sekonder AML vakalarında ve primer kanserleri nedeniyle epipodofilotoksin grubu ilaçları (etiposide, teniposide) alan erişkin ve çocuk hastalarda ortaya çıkabilmektedir. Buradan yola çıkarak gebe bir kadının alkol, pestisid, benzen gibi etkenlere maruz kalmasının etoposid benzeri mekanizmalarla topoizomeraz II'yi inhibe ettiği ve bunun da infantil dönemde akut lösemi gelişmesinde rol oynayabileceği belirtilmektedir (39).

2.3.5. İnfeksiyonlar ve Çocukluk Çağı Lösemisi:

Epidemiyolojik verilere dayanarak, özellikle 2-5 yaş arası oluşan lösemilerin yaygın bir enfeksiyona anormal bir immünolojik yanıt sonucu oluştuğu düşünülmektedir. İnfeksiyonun kendisinin patojenitesi düşük olabilmekte, genetik faktörler ya da bireysel duyarlılıklar lösemiye yol açan anormal yanıtı sebep olabilmektedir (40,41,42). ABD ve diğer gelişmiş ülkelerde, 2-5 yaşları arasında çocukluk çağı lösemisinde belirgin bir pik olduğu bilinmektedir.

2.3.6. Genetik Predispozisyon ve Çevresel Etkenler:

Detoksifikasyon görevi olan bir grup enzimin dağılımındaki farklılıkların örneğin glutatyon S-transferaz'ın lösemi prevalansı ile ilişkisi gösterilmiştir. GSTT1 ve GSTM1 yönünden "double-null" genotipinin lösemili zenciler arasında beyazlardan daha sık bulunduğu gösterilmiştir (43).

2.4. Blastik Hücrelerin Biyolojik Sınıflandırması

2.4.1. İmmünofenotip:

Blastik hücrelerin morfolojik ve sitokimyasal boyalarla incelenmesi, genellikle ALL'yi AML'den ayırt ettirmektedir. Bununla birlikte bu metotlar, kesin tanı için gerekli olan hücrenin immünolojik subtipi hakkında fikir vermemektedir. Lösemik hücrelerin çoğu, normal hematopoetik progenitörler ile ortak özellikler taşımaktadırlar. Farklılaşma evrelerine bağlı gen ekspresyon özelliklerinin saptanması ile lösemik hücreler alt gruplara ayrılabilir. Birkaçı dışında hücre diferansiyasyon antijenleri tam olarak diziyeye spesifik olmadığından, immünolojik sınıflama genellikle diziyeye ilişkili bir antikor paneline gösterilen reaktiviteye dayanmaktadır (27,44) (Tablo 2).

Tablo 2. Akut lenfoblastik lösemide immünofenotipik sınıflama

Lösemi tipi	Antijen ekspresyonu	Sıklık (%)
Erken pre-B	CCD22, CD79a, CD19, CD22, clg -(mü), slg -	57
Pre-B	Clg (mü) +	22
Transisyonel pre-B	Clg (mü) +, slg +, slg(kappa) -, slg(lambda) -	4
B	slg +, slg (kappa) +, ya da slg(lambda) +	2
T	CCD3, CD7, CD5 ya da CD2	15

Bu yaklaşımla ALL geniş olarak B ve T olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır. B hücre dizisi kendi içinde 4 farklı alt gruba ayrılabilir; erken pre B, pre B, transisyonel pre B ve matür B. Benzer şekilde T hücre dizisi de timosit diferansiyasyon evrelerine göre ya da T hücre reseptör proteini ekspresyon evresine göre sınıflandırılabilir. Bununla birlikte tedavi yaklaşımı açısından, T hücre ve matür B hücrelerini, prekürsör B hücrelerinden ayırt etmenin yeterli olduğu bildirilmektedir (31,32,44,45).

2.4.2. Genetik Özellikler

Sitogenetik analizler, yüksek rezolüsyonlu bandlama teknikleri, floresan insutu hibridizasyon (FISH) ve hücre kültürü tekniklerindeki gelişmeler, tanısal ve prognostik önemleri daha fazla olan spesifik genetik anomalileri saptayabilmeleri sayesinde, lösemi çalışmalarının en önemli parçalarından olmuştur. Gen değişiklikleri, tüm lösemilerin temeli olduğundan hücresel bir sınıflandırma sistemi belki de tamamen genetik olabilir (46,47).

Anormal karyotip, kullanılan tekniğe bağlı olarak ALL olgularının %70-95'inde saptanmaktadır (47,48). Lökomogenezde temel rol oynadıkları düşünülen bu anormalliklerin birçoğu, özellikle de resiprokal translokasyonlar, moleküler düzeyde de oldukça iyi bir şekilde tanımlanmış ve prognostik önemlerinden dolayı tedavi planlamalarında kullanılmaktadırlar. En sık, sayısal kromozom anomalileri ve translokasyon-delesyon şeklinde yapısal anomaliler görülmektedir. Nonrandom kromozomal anomaliler ve blastik hücrelerin biyolojik özellikleri ile klinik bulgular arasındaki kuvvetli ilişki, bu özelliklerin prognostik önemini göstermiş ve hücre sınıflamasındaki önemlerini artırmıştır. Sonuç olarak, lösemik hücrelerdeki moleküler defektlerin saptanması gerekli olmaktadır. Ayrıca klinik olarak önemli genetik rearanjmanlar, rutin karyotiplemede tecrübeli merkezlerde bile gözden kaçabilmektedir. Örneğin, infant ALL'sinde MLL geni moleküler rearanjmanları (11 q23) yaklaşık %80 oranında bildirilmesine rağmen, karyotiplemede %60 yada daha az oranda 11q23 kromozomal anomalisi saptanabilmektedir. İkincisi; aynı kromozom bölgesini etkileyen rearanjmanlar farklı genleri etkileyip, klinik ve biyolojik olarak farklı özellikler gösterebilirler. Üçüncüsü; moleküler analizler karyotipleme ile görülemeyen birçok kritik submikroskopik genetik değişiklikleri, örneğin TEL-AML1 füzyon geni (ETV6/CBFA2 füzyonu) ve TAL 1 geni (sırasıyla B öncül ve T hücreli ALL'de en sık bulunan anomaliler) saptayabilmektedir. P 16 gibi tümör süpressör gen delesyonları da genellikle sadece moleküler düzeyde saptanabilmektedir (49-53). Sitogenetik ve

moleküler bulguların kombinasyonu ile yeni tanı konan bir ALL hastası, %75 oranında prognostik ve tedavi altgruplarına başarılı bir şekilde ayrılabilir (27)(Tablo 3).

Tablo 3. ALL'de genetik altgruplarla ilişkili klinik ve biyolojik özellikler

Kromozomal anomali	Sıklık	Moleküler genetik değişiklik	İlişkili bulgular	5 yıllık EFS (%)
Hiperdiploidi(>50 krom)	27	Bilinmiyor	Prekürsör B fenotip, düşük lökosit, 1-10 yaş	80-90
t(12:21)	21-24	TEL/AML1 füzyonu (veya ETV6/CBFA2)	Prekürsör B fenotip, psödodiploidi, 1-10 yaş	85-90
t(1:19)	5-6	E2A/PBX1 füzyonu	Pre-B, psödodiploidi, Lökosit sayısı ↑	70-80
t(4:11)	4-8	MLL/AF4 füzyonu	İnfantil yaş grubu, Lökosit sayısı ↑	20-30
t(9:22)	3-4	BCR/ABL füzyonu	İleri yaş (adölesan), Lökosit sayısı ↑	25-35
t(1:14)	2	TAL1 (SCL) rearanjmanı	T fenotip, Lökosit sayısı ↑	60-70
t(8:14)	2	MYC (IgH, Ig(kappa) ya da Ig(lambda)	B hücre fenotipi Erkek cinsiyet, L3 morfoloji	70-80
t(11:14)	1	TTG2/TCR(delta) füzyonu	T hücre, hiperlökositoz, ekstramedüller hastalık	60
dic(9:12)	1	Bilinmiyor	B hücre, erkek cinsiyet	90
Hipodiploidi < 45 krom.	1	Bilinmiyor	Hiçbiri	20-30

2.4.3. Moleküler Patogenez

Lösemi oluşumunda iki genel mekanizma vardır. Birincisi, bir protoonkogenin aktivasyonu ya da onkojenik özelliği olan bir füzyon geninin oluşumudur. Herhangi bir olguda bu anormal genlerin protein ürünleri, sıklıkla transkripsiyon faktörleridir. Bu da hematopoetik büyümeyi ve diferansiyasyonu kontrol eden temel düzenleyici proteinlerdeki değişikliklerin, lösemik transformasyonda major bir rol oynadığını göstermektedir. İkinci mekanizma, lösemi süpressör protein genlerinin kaybı ya da inaktivasyonudur. Protoonkogen aktivasyonu ve tümör süpressör gen kaybı ya

lösemik hücreye proliferatif bir avantaj sağlamakta, ya da onun normal diferansiyasyonunu ve programlı hücre ölümünü engellemektedir (31-33,46,48).

2.5. Çocukluk çağı ALL’inde prognostik faktörler ve risk grupları

ALL tedavisinde modern yaklaşım, başarısızlık riskinin dikkatli bir şekilde değerlendirilmesidir. Böylece yalnızca yüksek riskli vakalara yoğun tedavi verilirken daha düşük riskli vakalara genellikle antimetabolitleri içeren daha az toksik tedavi uygulanabilir.

2.5.1. Yaş ve Lökosit Sayısı:

Çocukluk çağı ALL çalışmalarının hemen tamamında yaş ve lökosit sayısının prognostik öneminin olduğu görülmüştür. Bununla birlikte farklı tedavileri alacak hasta gruplarını tanımlayan kriterler açısından merkezler arasında geniş farklılıklar bulunmaktadır. Bu da, verilerin karşılaştırılmasında sorunlara yol açmıştır. Bu tür sorunları gidermeye yönelik olarak ABD’de 1993 yılında “National Cancer Institute (NCI)-The Cancer Therapy Evaluation Program(CTEP)” in düzenlediği bir workshop’da CCG, Dana Farber Cancer Institute (DFCI), POG ve St Jude Children’s Research Hospital (SJCRH) merkezlerinin katılımıyla verilerin ortak bir havuzda toplanması kararlaştırılmış ve yaş, beyaz küre sayısını içeren basitleştirilmiş risk kriter sistemi geliştirilmiştir (10)(Tablo 4).

Tablo 4. NCI/CTEP Workshop’unda risk grubu tanımlamaları

Risk grubu	Tanım	Sıklık (%)	4 yıllık EFS (%)
Standart	1-9 yaş ve Lökosit < 50x10 ⁹ /L	68	80.3
Yüksek	10 yaş ve üzeri ya da Lökosit ≥ 50x10 ⁹ /L	32	63.9

Buna göre, yaşın 1-9 arasında; lökosit sayısının 50 x10⁹/L’nin altında olması, düşük risk için gerekli minimal kriterler olarak kabul edilmiş, diğer vakalar ise yüksek riskli olarak düşünülmüştür (10). B prekürsör ALL’leri içeren çalışmaların neredeyse tamamında, yaş ve lökosit sayısı, risk sınıflandırmasında kullanılmaya devam etmektedir. Bu kriterler ile prekürsör B vakaların %60-70’i, düşük riskli ve uzun

dönem olaysız sağkalım oranları %70-85 dolaylarındadır. Kalan %30-40'lık vaka grubu ise daha yüksek riskli ve yaşam oranları %50-60'lardadır.

Yaş ve daha az oranda lökosit sayısının prognostik önemleri, bunların spesifik genetik anormalliklerle ilişkisi ile açıklanabilir. Örneğin, 12 ayın altındaki infantlarda genel olarak kötü prognoz, bu yaş grubunda MLL rearanjmanlarının çok yüksek oranda görülmesine bağlıdır (49). Ayrıca 1-9 yaş arası çocukların %70'inin blast hücrelerinde bu veya diğer genetik anomalilerden biri vardır. MLL gen rearanjmanları ve BCR/ABL füzyonları ise, büyük çocuklarda daha yaygın ve tipik olarak başlangıçta yüksek lökosit sayılarıyla ilişkilidir (54).

2.5.2. İmmüfenotip

CD 10'un (common ALL antijen, CALLA) eksprese edilmemesinin, hem infantlar hem de daha büyük B-prekürsör ALL olgularında, tam remisyon ve olaysız sağkalım oranlarının daha düşük olmasıyla ilişkisi gösterilmiştir (12). CD24'ün eksprese edilmemesinin de, B-prekürsör olgularda yine kötü prognozlu olduğu bildirilmiş, fakat CD10 ve CD24'ün T hücreli olgularda prognostik öneminin olmadığı gösterilmiştir. Başlangıçta POG verilerinde CD34 ekspresyonunun B-prekürsör olgularda daha iyi olaysız sağkalım oranlarına sahip oldukları bildirilse de, sonraki geniş çalışmalarda destek görmemiştir (13).

Pre B ALL'de blastların %10'dan fazlası, sitoplazmik immünglobülin (μ zinciri) içermektedir. Başlangıçta, bu fenotipteki hastaların olaysız sağkalım oranlarının daha kötü olduğu bildirilse de, sonradan bu kötü gidişin olguların %25'inden fazlasında bulunan t(1;19) varlığına bağlı olduğu gösterilmiştir (55). Son zamanlarda ise, yoğun antimetabolit tedavi ile bu translokasyonun da prognostik önemi azalmıştır.

Sitoplazmik ve yüzey μ (μ) zinciri varlığı ve kappa-lambda hafif zincir ekspresyonlarının yokluğuyla karakterize olan transisyonel pre-B fenotipi, pre-B ile karşılaştırıldığında beyaz küre sayısının daha düşük ve DNA indeksinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Olgun B hücre özellikleri ise olmayıp (L3 morfoloji, extramedüller bulky kitleler ve 8. kromozomu ilgilendiren translokasyonlar) prognozu iyidir (14).

Normal T lenfositler timusta olgunlaşmaktadırlar, bu matürasyon evreleri T ALL'li hastalarda da gözlenmektedir. CD3 ekspresyonunun iyi prognoz göstergesi olduğu belirtilmektedir. Olgunlaşma evrelerini tanımlamak için CD1 ve CD3 kullanımıyla en iyi prognozun intermediate safhadakilerde, en kötü prognozun da erken evrimleşme

safhalarında olduğu gözlenmiştir (56). Bu gözlemlere rağmen prognostik farklılıkları çok belirgin değildir.

Tipik lenfoblastlar üzerinde myeloid dizi ile ilişkili antijen ekspresyonları varlığı, 10 yılı aşkın süredir bilinmektedir ve çocuk ALL olgularının %6-22'sinde belirgin myeloid antijen ekspresyonu bulunmaktadır. Myeloid antijen pozitifliği ile ilişkili bazı özellikler tanımlanmıştır. L2 morfoloji, T-hücre fenotipi ve prekürsör B hücreli ALL ve özellikle de bunlar bazı spesifik kromozom anomalileri (t(12;21), t(9;22) ya da 11q23 anomalileri) ile birlikteyse daha yüksek oranda myeloid antijen ekspresyonuna rastlanmaktadır (57). Bazı araştırmacılar myeloid antijen pozitif ALL'lerin kötü prognoz ile ilişkili olduğuna inanmasına rağmen diğer gruplar bu tür lösemilerin de riske yönelik tedavi yaklaşımına iyi yanıt verdiğini saptamışlardır (58,59).

2.5.3. Sitogenetik:

İlk kez Secker-Walker ve arkadaşları, tanı anında lösemik hücrelerin kromozom sayılarının(ploidi) prognostik önemi olduğunu bildirmişlerdir. Daha sonraki çalışmalarda diğer sitogenetik bulguların, bunlar içinde kromozomal translokasyonlar da dahil olmak üzere prognoz üzerine kötü etkilerinin olabildiği bildirilmiştir (60-62).

Klonal Anomali Sıklığı:

Sitogenetik analizler başlangıçta oldukça zor ve çoğunda başarısızdı, çünkü standart kromozom işleme teknikleri ile yeterli kalitede metafaz çalışmaları yapılamıyordu. Bantlama metotlarındaki gelişmelerle, 1990'a kadar yapılmış bu çalışmalarda vakaların %55-80'inde, kromozomal anomaliler gösterilebilmişti (63-66). Son yıllarda ise Williams ve arkadaşları, ALL vakalarında %90 oranında klonal kromozomal anormallikleri göstermeye muvaffak olmuşlardır. Benzer oranlar Yunis ve ark.'nın nonlenfoblastik lösemilerdeki çalışmalarında da gösterilmiştir (67,68). Bu gelişmelere rağmen, T hücre fenotipli olguların ¼'ünde, hala kromozomal anomali gösterilememektedir (69). Normal karyotipik özellikler genellikle T lenfoblastlarda olmaktadır, bunlarda yüzey markırları normal T hücre gelişiminin erken basamaklarını göstermektedir (70).

2.5.3.1. Sayısal kromozom anomalileri:

ALL'de kromozom sayısı dağılımı bimodaldır, en önemli pik 46 kromozom düzeyinde olmaktadır (temel olarak psödodiploid karyotip), daha küçük bir pik 55 kromozom sayısındadır ve 50 seviyesinde de bir hiatus olmaktadır (62). Bu görüntü ALL için

karakteristiktir ve diğer tip lösemilerde bulunmamaktadır. Modal kromozom sayısına göre ALL 5 alt gruba ayrılabilir:

- Yüksek hiperdiploidi; > 50 kromozom
- Hiperdiploidi; 47-50 kromozom
- Psödodiploidi; 46 kromozom birlikte yapısal yada sayısal anomaliler
- Diploid; 46 normal kromozom
- Hipodiploid; <46 kromozom

Çocukluk çağı ALL'sinde birkaç major ploidi grubu tanımlanmıştır (69,71-74)(Tablo5).

Tablo 5. Çocukluk çağı ALL'lerinde ploidi gruplarının sıklığı.

Ploidi grubu	Sıklık (%)
Haploidi'ye yakın	< 1.0
Hipodiploidi (30-40)	< 1.0
Hipodiploidi (41-45)	6.0
Psödodiploidi	41.5
Hiperdiploidi (47-50)	15.5
Hiperdiploidi (> 50)	27
Triploidi'ye yakın	<1.0
Tetraploidi'ye yakın	1.0
Normal	8

50 kromozomun üzerinde hiperdiploidi:

Bu hastalar, tüm çocukluk ALL'lerinin %25'ini oluşturmaktadır ve tedaviye en iyi yanıtı verdikleri gösterilmiştir (66,69,75). Bu ploidi grubu doğru bir şekilde flow sitometrik DNA incelemeleri ile saptanabilmektedir (76). Herhangi bir kromozom trizomilere katılabilmesine rağmen, kromozom 4,6,10,14,17,18,20,21 ve X daha sıklıkla katılmaktadır, sonuçta bazı vakalarda kromozom 21'in 4 tane kopyası bulunabilmektedir (62). Yapılan bir çalışmada, 50 kromozom üzerinde olan 134 vakanın sıkı bir şekilde median 55 kromozom civarında oldukları gösterilmiş, yapısal kromozomal anomaliler vakaların %62'sinde, translokasyonlar %20'sinde bulunmuştur(77). Özellikle neden bazı kromozomların eklendiği ve kromozom sayılarının 55 civarında yoğunlaştığı bilinmemektedir. Diğer karyotipik alt gruplarla karşılaştırıldığında 50'nin üzerinde hiperdiploidi olgularının erken pre B ALL olgularında (CD 19+, CD5-, CD7- ve sitoplazmik ve yüzey immünglobülin negatif) ve

diğer iyi prognostik faktörler ile (CD10 ekspresyonu(CALLA, nötral endopeptidaz), düşük lökosit sayısı, düşük LDH, beyaz ırk ve 2-10 yaş arasında olma) birlikteliği bildirilmiştir (69,77). Klinik gidişte bağımsız bir prognostik faktör olduğu bilinen yaşı küçük hastalarda, hiperdiploidiye rastlanmamaktadır (78-80). Yüksek hiperdiploidli olgularda gözlenen iyi prognozun tam mekanizması halen kesin olmasa da, kısmen bu hastalarda lösemik hücre yükünün düşük olmasına, poliglutamaları daha yüksek oranda akümüle etmelerine, antimetabolitlere karşı artmış duyarlılığa ve spontan apoptozis oranında belirgin artışa bağlanmaktadır (81-83). Ito ve arkadaşları bu hiperdiploid hücrelerde apoptozis oranlarının yüksek olmasının iyi prognoz nedenlerinden biri olabileceğini göstermişlerdir (84).

Yine yakın zamanda yapılmış bir çalışmada, 50 kromozom üzerindeki hiperdiploid olguların, T-ALL olgularında oldukça nadir olduğu gösterilmiştir (85). Tek değişkenli analizlerde bazı kromozom trizomilerinin iyi prognozla ilişkileri gösterilmiştir. Bununla birlikte 4. ve 10. kromozomun her ikisinin trizomilerinin olduğu hastalarda, yaş ve beyaz küre sayısından bağımsız olarak olaysız sağkalım oranlarının %95 olduğu, diğer trizomilerin ise multivariat analizlerde ilave bir prognostik önemlerinin olmadığı gösterilmiştir (86).

Modal kromozom sayısına bağlı olarak, hiperdiploid grup içerisinde de heterojenite gözlenmektedir. Yakın zamanda SJRCH'nin bir serisinde, 51-55 kromozomlu hiperdiploid olguların olaysız sağkalım oranları, 56-57 kromozomlu olgulardan daha düşük bulunmuştur (87). Daha önce 50 kromozom üzeri hiperdiploidli hastalarda izokromozom 17q'nun, kötü bir sitogenetik bulgu olduğu gösterilmiştir (88). Daha sonra yine bu hiperdiploid olgularda birlikte yapısal kromozomal anomali varlığında, prognozun yalnızca sayısal anomali olanlara göre kötüleştiği görülmüştür (77). Bu hastaların geliş bulgularında bir farklılık yoktur ve başka türlü ayrımları da mümkün olmamaktadır. Jackson ve arkadaşları, hiperdiploid çocuk ALL'lerde ekstra kromozom 6'nın prognozu iyileştirdiğini belirtmişlerdir, bununla birlikte onların çalışmaları ilave 6. kromozomun nadiren bulunduğu 47-50 kromozomlu hiperdiploidli olguları içermekteydi (89). Bu nedenle ilave kromozom 6'ya bağlanan iyi prognoz, trizomi 6'nın, 50 ve üzeri hiperdiploidi ile yakın ilişkisiyle açıklanabilir.

Psödodiploidi:

Bu grup çocukluk ALL'sinin en geniş grubudur, 46 kromozom sayısı ve yapısal kromozomal anomaliler ile, genellikle de translokasyonların varlığı ile karakterizedir.

Psödodiploid vakalarda sayısal kromozom anomalileri oldukça nadirdir (62). Yüksek lökosit sayısı ve artmış LDH düzeyleri ile ifade edilen başlangıçtaki yüksek lösemik hücre yükü psödodiploid vakalarda daha fazla olmaya eğilimlidir (63,66,71). Erken pre B fenotipinin psödodiploid vakalarda daha nadir olduğu bildirilmiştir (66). Ayrıca daha önceki bazı çalışmalarda L2 morfolojisinin psödodiploid grupta daha sık görüldüğü bildirilmesine karşın diğerlerinde bu tür bir bulgu saptanmamıştır (63,66,71). Kötü prognozlu olduğu belirtilen bu grupta da sonradan intensif kemoterapi programları ile prognozda iyileşmeler elde edilmiştir (61,63,65,66).

Hipodiploidi:

Lösemik hücre başına 46 kromozomun altında kromozom sayısı relatif olarak oldukça nadirdir ve olguların %3-9'unda saptanmaktadır (61,63,90,91). Vakaların %80'den fazlasında, primer lösemik hücre dizisi 45 kromozom içermektedir. En sık kaybedilen kromozom 20'dir ve bazı vakalarda saptanabilir tek anormallik bu olabilmektedir (72). Hipodiploid vakalarda, psödodiploidler ile kıyaslandıklarında kromozomal translokasyonlara daha sık rastlanmakta ve yoğun tedaviye rağmen prognozları kötü olmaktadır (66,72,73). Hipodiploid vakalar sitogenetik ve klinik bulgularına göre üç alt gruba ayrılabilirler: Haploidi'ye yakın, 30-40 hipodiploid ve 41-45 hipodiploid. Haploidi'ye yakın ALL ayrı bir gruptur ve çok az sayıda vaka bildirilmiştir (72,91-93). Bu hastaların blastik hücrelerinde kromozom 8,10,14,18,21 ve sex kromozomlarının iki kopyalarının nonrandom retansiyonları olmaktadır ve genellikle de bu haploidi'ye yakın dizinin iki katı kromozom sayısı içeren ikincil bir hiperdiploid dizi bulunmaktadır (73). 30-40 hipodiploid ve 41-45 hipodiploid vakaların çoğunda yapısal kromozom anomalileri bulunmaktadır (72,73). Haploidi'ye yakın grupta olduğu gibi özellikle kromozom 21 ve sex kromozomlarının retansiyon gösterdikleri gözlenmiştir. Hipodiploid ALL'li olguların başlangıç klinik bulguları geneldeki bulgular ile benzer olmaktadır. Bir istisna haploidi'ye yakın gruptaki hastaların kız cinsiyette olmaları ve 30-40 hipodiploid grup yaş ortalamasının ise daha yüksek olmasıdır (73).

47-50 kromozom hiperdiploidi:

Bu grup ALL'li vakaların yaklaşık %15'ini oluşturmakta ve intermediate prognoz göstermektedir (94). Translokasyonlar vakaların 1/3'ünde bulunmakta ve bu oran 50'nin üzerinde hiperdiploid ve psödodiploid vakalar arasındadır (71). 47,48 49 kromozomlu vakaların karyotiplerinin karşılaştırmasında sabit bir anomali paterni saptanmamıştır. Bu ploidi grubu ile 51 yada daha fazla kromozomlu vakalar arasında

da benzerlik bulunmamıştır. İlk çalışmalarda, 47-50 hiperdiploid vakaların geliş klinik bulgularının, genel olarak gözlenen bulgulardan farklı olmadığı gösterilmiştir.

Triploidi'ye yakın, tetraploidi'ye yakın:

Çocukluk çağı ALL'leri içinde çok nadir görüldüğünden (%1'in altında), prognozu hakkında çok kesin gözlemler yoktur. 1990'da yapılan bir çalışmada, 1971 çocuk ALL içinde saptanan 20 tetraploidi'ye yakın vaka klinik, laboratuvar ve prognostik özellikleriyle sunulmuştur. Bu vakalarda kromozom sayıları 82-94 arasında değişmiş, tüm vakalarda ilave 21. kromozom gözlenmiş ve 5 vakada 4 kopyadan daha fazlasına rastlanmıştır. Morfolojik olarak bu vakaların çoğunluğunun diğer olguların aksine L2 morfolojisine ve kaba, katlantılı nükleus paternine sahip olduğu, %47'sinde T hücre immüfenotipi olduğu ve hastaların ortalama yaşlarının daha yüksek olduğu (median 8.6) belirtilmiştir (74). Literatürde yayınlanmış başka 6 vakanın da yarısında, benzer şekilde T hücre fenotipi mevcuttu ve median yaşları 11 idi (71). T hücre fenotipi ve daha büyük yaş birlikteliği nedeniyle bu vakalar daha kötü prognozlu olabilmektedirler. Bununla birlikte vaka sayılarının yetersizliği nedeniyle bunun prognostik önemi hakkında kesin sonuçlar vermek mümkün olmamaktadır. Aynı şey daha az bilinen triploidi'ye yakın vakalar için de geçerlidir (74,95). Bu olguların da, farklı klinik ve biyolojik bir grup olarak ayrılması veya 50 kromozom üzeri hiperdiploid gruba dahil edilip edilmemesi gerektiği açık değildir.

Normal diploidi:

Tamamen normal hücrelerin(diploid) oranı geniş seriler arasında büyük farklılıklar göstermekteyse de, çoğunda bu alt grubun orta derece bir prognoza sahip olduğu bildirilmiştir (66,94). Sitogenetik tetkikler geliştikçe klonal anormallik içermeyen vakaların oranı azalmaktadır. Bir çalışmada, bu tür olguların oranı% 8.6 bulunmuş ve bunların yarısının da T hücre fenotipine sahip oldukları gözlenmiştir (69). Bu sınıflamaya göre daha önceden bildirilmiş vakalar günümüzde psödodiploid olarak tanımlanmaktadırlar. Lösemik hücrelerin mitotik indeksleri düşük olduğunda bulunan normal karyotip aynı zamanda non-neoplastik rezidüel ilik elemanlarına da bağlı olabilmektedir.

2.5.3.2. DNA indeksi:

Sitogenetik analizleri uygulamadaki teknik zorluklar nedeniyle yakın zamana kadar yeterli kalitede metafaz çalışmaları yapılamıyordu (63-66). Lösemik hücrelerin

kromozom sayısını saptamaya yönelik olarak flow sitometrinin geliştirilmesi, bu problemi çözmeye yönelik özlenen bir yaklaşım olmuştur. Lösemi hücre ploidi, bu metotla hızlı bir şekilde $\pm 2-4$ kromozom hata payıyla saptanabilmekte ve DNA indeksi, lösemik G0/G1 hücrelerin DNA içeriğinin normal diploid hücre DNA içeriğine bölünmesi ile hesaplanabilmektedir (76).

Flow sitometri, hematolojik hastalıkların araştırılmasında ilk kez 1971'de Büchner ve arkadaşları, kısa süre sonra da 1972'de Melamed ve arkadaşları tarafından kullanıldığında, ana amaç bu hastalıkların hücre kinetiklerini saptamak ve sitostatik tedavinin hücre siklusu üzerine olan etkisini incelemektir (96). Flow sistemlerindeki yeni gelişmeler ve hücre hazırlama ve boyama yöntemlerindeki yenilikler, uygulama sahalarını genişletmiştir. Böylece immünofenotiplendirme ve ilk kez 1971'de Büchner ve arkadaşlarının tanımladığı şekilde DNA anöploidilerinin saptanmasında kullanılmıştır. Her iki parametrenin, özellikle çocukluk lösemilerinin prognozunda olduğu kadar sınıflandırılmalarında da klinik önemlerinin olduğu sonraki çalışmalarda da gösterilmiştir (97-100). DNA analizi yaş, beyaz küre sayısı ve kromozomal aberasyonlar gibi faktörlerin tamamlayıcısı ve riske yönelik tedavi stratejilerinin önemli bir parçası olarak kabul edilmiştir. Daha sonraları, lösemik blastların RNA içeriklerinin de lösemi subtiplerinin tanınmasında rolünün ve ayrıca prognozla ilişkisinin olduğu gösterilmiştir (101).

Hiperdiploid vakaların tanımlanmasında, flow sitometrinin klasik karyotipik analizlere üstünlüğü vardır; daha hızlı ve otomatizedir, birçok hasta için uygulanabilir ve ölçümler lösemik hücrelerin proliferasyon hızları ve mitotik indekslerinden etkilenmemektedir (96,102). Yeni teknik ve cihazlara rağmen 44-48 kromozomlu olguların diploid olanlardan tam ayrılamayabilecekleri, fakat bunun da önemli bir sorun teşkil etmeyeceği belirtilmiştir. Çünkü risk gruplarının tanımlanmasında iyi riskli grubu tanımlarken 53 ve üzeri kromozomlu alınmaktadır. Önceden tanımlandığı üzere DNA indeksi <1.16 , <53 kromozom'a, ve ≥ 1.16 ise ≥ 53 kromozoma denk gelmektedir (76). Flow sitometrik analizin en belirgin dezavantajı, hücresel DNA içeriğini etkilemeyen dengeli kromozomal translokasyonların olduğu psödodiploid olguların saptanamamasıdır. Translokasyonlar çocukluk çağı ALL'lerinde önemli kötü prognostik özellikler olmakla birlikte kromozom sayısı 50'nin üzerinde olan vakalarda saptanamamıştır (22-24,103). Bu bulgu DNA indeksi 1.16'nın üzeri olan olguların translokasyon grubu ile çakışmadığını göstermektedir. Sonuçta, karyotip analizi ve Flow sitometrik DNA analizi çocukluk çağı ALL'lerini değerlendirmede birbirlerini

tamamlayıcı tekniklerdir. Bu nedenle yeni bir vakanın incelenmesinde her iki tekniğin de birlikte kullanılması önerilmektedir (76).

2.5.3.3. Yapısal kromozom anomalileri:

Moleküler genetik yöntemler, çocukluk ve erişkin lösemilerinde hastalığın hem karakteristiklerini hem de tedaviye vereceği yanıtı tahmin etmemize imkan sağlamıştır. Akut lenfoblastik lösemilerdeki modern tedavi protokolleri, relaps riskine göre tedavi yoğunluğunu belirlemek için genetik bulguları kullanmaktadırlar (104).

Lösemik hücrelerdeki genetik değişiklikler, eskiden sitogenetik analizler ile tanımlanmaktaydı. Moleküler biyolojideki gelişmelerle floresans insutu hibridizasyon, Southern Blot analizi ve reverse transkriptaz PCR gibi sitogenetikten daha spesifik ve hassas teknikler ortaya çıkmıştır (105). Bunların sayesinde, sitogenetik için uygun olmayan örneklerdeki ve ayrıca sitogenetikle görülemeyen submikroskopik genetik rearanjmanları saptamak mümkün olabilmektedir. Ayrıca, minimal rezidüel hastalığın saptanması için gerekli sensitiviteye de moleküler analizler ile ulaşılabilmektedir (106). Moleküler ve sitogenetik çalışmalarla çocukluk ALL'lerinin yaklaşık %75'inde kromozomal translokasyonlar saptanmaktadır.

TEL-AML1 füzyon geni:

t(12;21)(p13;q22), TEL geninin helix-loop-helix domaininin AML1 geninin DNA-bağlama ve transaktivasyon domainine füzyonuyla oluşmaktadır (107). Bu füzyon sonucunda sıklıkla diğer TEL aleli kaybedilmektedir (108). Sonuçta TEL bir tümör süpressör olabilir. t(12;21) standart sitogenetik ile %0.1'in altında ancak saptanabilirken, moleküler analiz ile pediatrik ALL'deki en sık genetik bozukluk olduğu gösterilmiş ve B öncül vakaların ¼'ünde bulunduğu anlaşılmıştır (109). Bu füzyon geni, çok iyi prognozla ilişkisi gösterilmiş olduğundan moleküler yöntemle tespiti klinik olarak faydalıdır (109-112). TEL-AML1 ekspresyonunun iyi prognozla ilişkisi, prekürsör B lösemiler için tanımlanmış diğer iyi risk faktörlerinden (yaş, lökosit sayısı ve hiperdiploidi) bağımsız olduğundan, TEL-AML1 ekspresyonu klinik bulgularla tanımlanamayan iyi prognozlu vakaları tanımlayabilmektedir (112). Sonuçta bu hastalar erken ve geç sekellerden kaçınılabilecek daha hafif tedavi rejimlerini alabilirler.

BCR-ABL füzyon geni:

Philadelphia kromozomu, t(9;22)(q34;q11) dengeli translokasyonu sonucu oluşmaktadır. Pediatrik ALL'lerde yaygın olmamasına (vakaların %3-5'i) karşılık KML

vakalarının %95'i ve adult ALL'lerin %25'inde bulunmaktadır (113). Bu translokasyon sonucu ABL protoonkogeni 9. kromozomun uzun kolunun distalinden, 22. kromozomun uzun koluna hareket etmekte ve BCR-ABL füzyon genini oluşturmaktadır (114). Pediatrik ALL'de t(9:22) pozitifliğinin daha ileri yaş grubu, yüksek lökosit sayısı ve tanıda SSS tutulumu ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (26). Tüm bunlar kötü prognozla ilişkisini göstermektedir ve uzun dönem EFS oranları %10-30'dur (16). Bu hastaların ilk remisyonda KİT için ele alınmaları önerilmektedir (115).

E2A-PBX1 füzyon geni:

t(1:19) (q23;p13.3) sitoplazmik Ig (+) pre B vakaların %25'inde saptanmakta ve E2A-PBX1 füzyon genini meydana getirmektedir (108). E2A-PBX1'in yol açtığı transformasyon, muhtemelen lenfoid hücrelerde PBX1'in anormal ekspresyonu nedeniyle olmakta ve baskılanmış hedef genlerin transaktivasyonuna yol açmaktadır (116). Pediatrik ALL vakalarında E2A-PBX1'e sık rastlanmakta ve tanıda lökosit sayıları sıklıkla yüksek olmaktadır. Yoğun KT ile EFS yaklaşık %50'lerden (17,18), %80'lere (18,117) çıkmıştır. t (1:19), ayrıca sitoplazmik mü içermeyen erken pre B ALL'lerin yaklaşık %1'inde de gözlenmektedir. Bu olgularda, ne E2A ne de PBX1 etkilenmiştir ve yoğun KT olmaksızın prognozun çok iyi olduğu belirtilmektedir(108).

MLL gen rearanjmanları:

MLL geni kromozom band 11q23'de lokalizedir ve infant ALL'lerin %80'inde (118-122), daha büyük çocuklarda %3 (19,20) ve topoizomerez II ile tedavi edilmiş hastalardaki sekonder AML'lerin de %85'inde saptanmaktadır (123). MLL rearanjmanları da pediatrik vakalarda kötü prognozla ilişkilidir. Yoğun kemoterapiye rağmen, uzun dönem EFS %20'nin altındadır (19,20). Aksine MLL'yi içermeyen 11q23 anomalilerinin prognozu, diğer ALL vakalarına benzerdir (124). Moleküler çalışmalar bu nedenle MLL rearanjmanlarını tanımlamak için kesinlikle gereklidir, çünkü bu hastalar diğer yoğun kemoterapiler veya KİT için adaydırlar.

B-hücreli ALL'de translokasyonlar:

B hücreli ALL yüzey Ig, FAB L3 morfoloji, sık ekstramedüller tutulum ve kromozom 8 band q24'deki MYC genini içeren translokasyonlar ile karakterizedir. Vakaların %80'inde t(8:14)(q24;q32) mevcuttur. Burada MYC geni, immünglobülin ağır zincir geni lokusuna transloke olmaktadır (108). Geriye kalan vakaların yaklaşık tümünde

ise t(2:8)(p12;q24) ya da t(8:22)(q24;q11) bulunmaktadır. Bu translokasyonların hepsi MYC ekspresyonunun regülasyonunu bozmaktadır. MYC proteini ve diğer birkaç transkripsiyon faktörü arasındaki bağlantının değişmesinin lenfoid transformasyona yol açtığı düşünülmektedir.

T hücreli ALL'de translokasyonlar:

B hücreli ALL'dekin aksine buradakiler klinik olarak önemli değildirler. Burada tekrarlayan translokasyonlar, T hücre Beta reseptör lokusunu (7q34) ya da α/δ lokusunu (14q11) değişik transkripsiyon faktör genlerinin üzerine taşımaktadır. Örneğin, t(1:14)(p32;q11)'de TAL1'in TCR α/δ lokusuna translokasyonu sonucu TAL1 ekspresyonunda anormallik olmaktadır (125).

Tümör süpressör genler:

Hücre siklusunda önemli rolleri bulunan Tümör süpressör genlerin inaktivasyonu sonucu kontrolsüz hücre proliferasyonu ile malign transformasyon geliştiği düşünülmektedir. Bu genler içinde en iyi çalışılanı, p53'dür. Lösemi de dahil birçok malignitede, mutasyon ya da delesyonlarına rastlanmıştır. p53 geni bir hücre siklus kontrolörü olarak G1 fazında hücre bölünmesini bloke ederek DNA hasarlarının tamirine imkan vermektedir (126,127). Sadece bir p53 allelindeki kalıtsal mutasyonlar Li-Fraumeni familyal kanser sendromunun bir parçası olarak oluşmaktadır (128). Prekürsör B ya da T hücreli ALL'lerinde tanıda yalnızca %1-2 inaktivasyon saptanmasına rağmen, relaps yapmış T ALL'lerde %25 mutasyon saptanmakta ve ikinci remisyonun kısa sürmesiyle ilişkili olmaktadır (129,130). Bu bulgular p53 inaktivasyonunun, dirençli hastalık gelişiminde rolü olabileceğini göstermektedir. p53 dışında pediatrik lösemilerde prekürsör B ALL'lerde %20-30 ve T ALL'lerde %70-80 oranında homozigot p16 (sikline bağlı kinaz inhibitörü) mutasyonları bildirilmektedir ki bu genin önemli rolü olduğunu düşündürmektedir (131). Bununla birlikte p16 delesyonları diğer lösemilerde oldukça nadirdir, AML'de %10'un altında, KML'de de benzer oranda bildirilmiştir (108).

Tedavinin yönlendirilmesi açısından buradaki genetik özellikler kullanılarak çocukluk prekürsör B ALL'leri üç farklı subgruba ayrılabilir. Düşük riskli ALL vakaları; hiperdiploidili hastalar (> 50 kromozom), TEL/AML 1 füzyonunu ya da dic(9;12)'li hastaları içermektedir. Her üç genetik alt grup antimetabolite dayalı tedaviye çok iyi yanıt vermektedir. Yüksek riskli ALL vakaları ise MLL rearanjmanları, BCR/ABL

füzyonu ve hipodiploidi (< 45 kromozom) olan vakalardır. Kalan vakalar bunlar içinde t (1;19) da dahil olmak üzere orta risk ALL olarak sınıflanabilir.

2.5.4. Hücre proliferasyonu ve ilaç duyarlılık testi:

Pui ve Crist, hastanın ilaçlara vereceği cevabın tam olarak değerlendirilmesinin lösemi tedavisi ile uğraşanların süregelen amaçlarından biri olduğunu belirtmişlerdir (132). Prognoz hakkındaki bilgilerin gelişmesi, toksik etkileri azaltabilir ya da daha yoğun tedavi çalışmalarını artırabilir. Önceden yaş (<1 veya >9 yaş) ve hiperlökositozun ($>50 \times 10^9/L$) kötü prognostik faktör oldukları tanımlanmıştı (132,133). Bazı çalışmalarda, myeloid antijen ekspresyonunun da kötü risk faktörlerinden olduğu bildirilmişti (134). Hücresel ilaç direnci ile indüksiyon tedavisine yanıtızlık ve erken relaps arasında ilişki ise yakın zamanda gösterilmeye başlanmıştır (135,136). Metil tiyazol tetrazolyum (MTT) testinin lösemili hastalarda uygun ve etkili kemoterapi seçimi için uygun bir araç olduğu gösterilmiştir (137). MTT yöntemi, hem proliferen olan hem de olmayan hücrelerdeki total hücre ölümünün hesaplanmasına dayanmakta ve aktüel direnç mekanizmalarının son etkisini değerlendirmektedir. Bu yöntem dominant klonun in vitro ilaç direncini ölçmekte fakat küçük dirençli alt klonları saptayamamaktadır.

Daha önceden lösemik hücrenin kemoterapiye hassasiyetinin DNA hiperdiploidisine, immünolojik belirteçlere veya yaşa bağlı olduğunu gösteren çalışmalar vardı (138-140). Başlangıç kemoterapi yanıtı ile uzun dönem klinik cevap arasında ilişkiyi ilk kez Pieters ve arkadaşları göstermişlerdir (136). Onlar, 42 yeni ALL vakasında tioguanin, daunorubisin ve prednizolona dirençli olgularda uzun süreli remisyon oranlarının diğer vakalara göre oldukça düşük olduğunu, prednizolona duyarlılık azaldıkça prognozun giderek kötüleştiğini göstermişler ve çocukluk çağı ALL'sinde prednizolona hücresel direncin kemoterapinin başarısızlığında çok önemli bir faktör olduğunu vurgulamışlardır. Başka bir çalışmada; 196 çocuk ALL vakasında glukokortikoid (prednizolon, deksametazon) hassasiyeti yanısıra etoposid, vinkristin mitoksantron ve bleomisin duyarlılığının da prognoza etkisinin olduğu görülmüş, ayrıca deksametazon, prednizolon, L-asparaginaz ve vinkristin kombinasyonuna direnç olmasının da indüksiyon başarısızlığı ve erken relapsla çok sıkı ilişkisinin olduğu saptanmıştır (141). Pieters ve arkadaşlarının başka bir çalışmasında immünfenotip ve yaş ile sekiz ilaca karşı invitro duyarlılık araştırıldığında T hücreli ALL olgularının prednizolon, daunorubisin, L-asparaginaz, ARA-C ve 6-tioguanine

pre-B ALL'lerden daha dirençli oldukları, ayrıca 18 ay ve 10 yaş üzeri olguların hücrelerinin de diğer yaş gruplarınıninkine göre daha dirençli oldukları saptanmıştır (139). Myeloid antijen ekspresye eden hücrelerin de, negatif olanlara göre glukokortikoidlere daha dirençli oldukları gösterilmiştir (140). Bu verilere dayanarak, hücresel ilaç direnci paterninin çocukluk çağı ALL'sinde immünfenotip ve yaş'ın prognostik önemini kısmen açıklayabileceği belirtilmiş olsa da, diğer çalışmalarda indüksiyondaki dörtlü ilaca duyarlılığın net olarak böyle bir ilişkiyi göstermediği, ayrı bir prognostik faktör olduğu saptanmıştır (140,141). İlaveten diğer risk kriterleri ile birlikte değerlendirildiğinde, ilaç duyarlılık paterninin standart risk grubu hastalarda çok belirgin olduğu buna karşılık yüksek risk grubunda EFS ile ilişkili olmadığı görülmüştür.

Çoklu ilaç direnci:

Abolhoda ve arkadaşları tarafından, insanlarda kemoterapi sonrası çoklu ilaç direnç geni (MDR1) ekspresyonunun çabuk indüklenebildiği gösterilmiştir (142). Erişkinlerde yapılan çalışmalarda kemoterapiye immünmodulator ilaç eklenmesinin remisyon oranlarını etkilememesine karşılık olaysız yaşam oranlarını artırdığı gösterilmiştir (143).

2.5.5. Farmakolojik özellikler (55):

Günümüzde farklı doz ve kombinasyonlarda kemoterapötik ajanların etkinliğini değerlendirmek mümkün olmaktadır. Tekrarlanan intramusküler metotreksatın, aynı dozda oral kullanıma göre eritrositlerde 2 kat daha fazla konsantrasyonda metotreksat akümülyasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (144). Bununla birlikte küçük bir çalışmada bunun olaysız sağkalım üzerine anlamlı etkisinin olmadığı gösterilmiştir (145). Yine intravenöz 1g/m²/24 saatten uzun süreli metotreksat infüzyonunun da, 6 saat aralarla 30mg/kg toplam 6 doz oral alıma göre lenfoblastlarda 3 kat daha yüksek metotreksat akümülyasyonuna yol açtığı ve olaysız sağkalım oranları ile de ilişkisinin olduğu gösterilmiştir (146,147).

Ayrıca idame tedavisi sırasında, merkaptopürin kullanımı ile ilişkili olarak eritrosit tioguanin nükleotid konsantrasyonları ile relaps oranları arasında ters bir ilişki olduğu da gösterilmiştir (148). Yakın zamanda da hem metotreksat poliglutamaları hem de tioguanin nükleotidlerinin eritrosit konsantrasyonlarının kombine kullanımının olaysız sağkalım açısından daha etkin olduğu gösterilmiştir (149).

Antilösemik ilaçlar, etkilerini spesifik reseptör ve enzimlerle etkileşerek göstermektedirler. Lösemik hücreler ve normal dokularda bu proteinlerin özelliklerinin saptanması, tedaviye daha gerçekçi bir yaklaşım getirebilir. Örneğin steroidler açısından bakıldığında, membrana bağlı glukokortikoid reseptörü tanımlanmıştır. Steroide in vitro ve in vivo yanıtın klasik intrastoplazmik reseptörden ziyade bu membran reseptörünün düzeyi ile daha iyi korelasyon gösterdiği saptanmıştır (150). Bu bilgiler ışığında tedavinin bireyselleştirilmesi bir yandan toksisiteyi azaltırken diğer yandan olumsuz sağkalım oranlarını yükseltebilir.

2.5.6. Farmakogenetik özellikler(104):

Genetik çalışmaların klinik etkilerinin olduğu sahalardan biri de, farmakogenetikdir. Bazı seçilmiş antilösemik ajanların metabolizmasında, kalıtsal farklılıkların tanımlanması toksisite açısından yüksek risk taşıyan hastaların tanımlanmasını mümkün kılmıştır, böylece hasta bazında optimum ilaç dozlarının seçilmesi mümkün olmaktadır. Bu nokta tiopürin metiltransferaz çalışması ile iyi bir şekilde gösterilmiştir. Bu sitozolik bir enzim olup 6-merkaptopürin ve 6-tioguanin'i inaktive etmektedir. Bu enzimin eksik olduğu gösterilen hastalar, standart dozlar ile tedavi edildiklerinde ağır hematolojik toksisite riski taşıdıkları, ama antimetabolite dayalı protokol ile tedaviye de çok iyi yanıt verdikleri gösterilmiştir (151). İlginç olarak, sistemik antimetabolit tedavi alırken kraniyal radyoterapi alan bu hastalarda beyin tümörü gelişme riskinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (152). Günümüzde bu eksikliğin genomik DNA düzeyinde moleküler çalışmalarla tespiti mümkün olmuştur (153). Diğer antikanser ilaçlar için de benzer enzim çalışmalarının yapılmasıyla antilösemik tedavide toksisite azaltılırken etkinlik de artırılabilir.

2.5.7. Tedaviye cevap:

ALL prognozu ile ilişkili birçok faktörden en önemlisi tedavidir. Örneğin kötü prognozla ilişkisi olduğu bildirilen T ve B hücreli ALL'de, intensif kemoterapi kullanımıyla % 70 ve üzeri sonuçlar alındığı bilinmektedir. Çocukluk çağı lösemisinde tedaviye erken yanıt, indüksiyon tedavisinin 28. gününden önce hastalığın regresyon derecesiyle değerlendirilmektedir. Tedaviye yanıt hızının Hodgkin hastalığında, Non-Hodgkin lenfomada, osteosarkomda, Ewing sarkomunda, prostat karsinomunda ve akut nonlenfoblastik lösemide prognostik öneminin olduğu gösterilmiştir. 1973'de Jacquilar ve arkadaşları, VCR, prednizolon ve daunomisinle KT'nin 14. gününden önce remisyona giren ALL çocukların prognozlarının, ilk remisyona geç girenlerden

daha iyi olduğunu göstermişlerdir (154). Daha sonra ABD ve Avrupa'da yapılan çalışmalarda da, tedaviye erken yanıtın önemli bir prognostik faktör olduğu görülmüştür (155-166). Multivariat analizlerde de öneminin korunduğu görülmüştür (155-159,161,166).

Günümüzdeki kombine kemoterapi rejimleri, genellikle tek ajan için in vitro-vivo karşılaştırmalara imkan vermemektedir. Bununla birlikte Alman BFM grubu protokollerine bir haftalık bir terapötik pencere koymuştur. Burada ilk bir hafta tüm hastalar sistemik prednizolon ve bir kez intratekal metotreksat almaktadır. Çalışmalarında, erken dönemde prednizolona yanıtın, kombinasyon kemoterapisi sonrası uzun dönem klinik gidişle ilişkili olduğu görülmüş ve yeni BFM protokollerinde risk grubu oluşturmada kullanılan bir faktör olmuştur (167).

Tedavi sonrası lösemik hücre yükü:

Kemik iliğindeki lösemik hücre yükü total lösemik yükü yansıtmayabilir. Karaciğer, dalak, lenf nodları, ön mediasten, testisler ve santral sinir sistemi belirgin lösemik infiltrasyon gösterebilir. Wasserman ve arkadaşları, indüksiyon sonrası lösemik hücre yükünü PCR'a dayalı Ig ağır zincir gen rearanjmanı saptanmasına dayalı metotla değerlendirdiklerinde; lösemik hücre yükü fazla olanlarda tedavi altındayken hastalısız sağkalım %50 iken, düşük olanlarda bu oranı %92 bulmuşlardır. Tedavi tamamlandıktan sonra ise, relaps açısından anlamlı bulunmamıştır (168). Uçkun ve arkadaşlarının çalışmasında, reindüksiyon sonrası ve KİT öncesi lösemik yükü fazla olanlarda KİT sonrası daha sık relaps olduğu gözlenmiştir (169). Brisco ve arkadaşları çalışmalarında, blast sayısı $1000 \times 10^9/L$ üzerinde olan 88 hastada indüksiyon tedavi sonrası PCR ile saptanabilir lösemisi olanlarda klinik gidişin daha kötü olduğunu göstermişlerdir (170).

2.5.8. Lösemik hücre yükü:

Periferik kandaki blast sayısı ve karaciğer dalak büyüklüğünün boyutundan değerlendirilen, başlangıç lösemik hücre yükü ALL-BFM 70 pilot çalışmasında en önemli prognostik faktördü. ALL-BFM 81, 83 ve 86 çalışmalarında da hastaların lösemik hücre kitlesi, tanıda mm³'deki blast sayısı, karaciğer ve dalak büyüklüğüne göre "Risk faktörü(RF): $0,2 \times \log(\text{Blast sayısı}/\mu\text{L} + 1) + (0,06 \times \text{Karaciğer}(\text{subkostal boyut cm.}) + (0,04 \times \text{Dalak}(\text{subkostal boyut cm.}))$ " formülüyle hesaplanıp tedavinin tabakalandırılması için kullanılmıştı (166). Ancak daha sonra tedavi sonucunu etkileyen en önemli prognostik faktörün bir haftalık prednizolon ve bir kez intratekal

tedavi sonunda periferdeki blast sayısı olduğu ve tedaviye erken cevabın lösemik hücre kitlesinden daha kuvvetli bir prognoz kriteri olduğu gösterilmiştir.

2.5.9. Minimal rezidüel hastalık:

Lösemilerde moleküler analizler, yalnızca hastalığın tanısında değil aynı zamanda hastalığın tedaviye verdiği yanıtları değerlendirmemizi de sağlamaktadır. MRD çalışmaları, füzyon genlerinin oluşturduğu kimerik transkriptlerin saptanmasına ya da klonal T hücre reseptörü ya da immünglobülin ağır zincir gen rearanjmanlarının saptanmasına dayanmaktadır (171-176). T hücre reseptör ve immünglobülin ağır zincir rearanjman yöntemlerini kullanan yeni çalışmalarda, hem MRD varlığının hem de MRD derecesinin klinik gidişle ilişkili olduğu gösterilmiştir (16-176). Özellikle hastalık yükü 1:1000 (10^{-3})'den daha fazla olduğunda relaps riskinin daha yüksek olduğu belirtilmektedir (171,172,174,175).

İmmünfenotip, yaş ve lökosit sayısını da içeren bir multivariat analizde, en önemli prognostik faktörün rezidüel hastalık olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmaların sonuçlarına göre MRD çalışmaları ile yüksek risk taşıyan hastalar saptanabilmektedir. Başka bir çalışmada, indüksiyon sonunda ve konsolidasyon tedavisi öncesi, MRD çalışmalarının kombinasyonu ile hastaların üç farklı risk grubuna ayrılabilceği gösterilmiştir (172). Diğer birçok çalışma da kemoterapi alan ALL hastaları için KT sırasında saptanabilir MRD bulunmasının yaşam oranlarıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (173-175). Yeni bir çalışmada, MRD tedavinin yönlendirilmesinde kullanılmakta ve indüksiyon tedavisi sonrası immünolojik ve moleküler olarak remisyonunda (1/10000 hücreden az) olmayan vakalarda yoğunlaştırılmış tedaviye geçmektedirler (177).

Benzer şekilde kemik iliği transplantasyonu yapılmış ALL hastaları için de, MRD durumu faydalı bir prognostik faktör olabilir. Knechtli ve ark. kemik iliği transplantasyonu öncesi ve sonrası MRD düzeylerinin relaps riski açısından önemli olduğunu göstermişlerdir (176). Yöntem açısından immünolojik ve moleküler tekniklerin klinik olarak önemli derecedeki MRD'lerin saptanmasında eşit değerde oldukları ve benzer sonuçlar verdikleri gösterilmiştir (178).

MRD sonucuna göre tedavinin yönlendirilmesi:

Bu çalışmaların sonuçlarına dayanarak bazı gruplar, remisyonunda iken MRD pozitif olan hastalarda yoğunlaştırılmış tedavi protokollerine geçmektedirler. İki farklı zamanda MRD pozitif olan hastaların $\frac{3}{4}$ 'ünde relaps gözleendiğinden bu hastalar morfolojik olarak remisyonunda iken allogeneik kök hücre nakillerinden faydalanabilirler.

Bu tür yaklaşımlar sayesinde daha az oranda relaps görülmesi sağlanabilir ve relaps riski düşük olan hastalar yoğun tedavinin yan etkilerinden kaçınabilirler.

2.6. Lösemi ve tedavisine bağlı geç etkiler:

ALL'de kür oranlarındaki belirgin artma ile birlikte son 30 yılda, tedavide kullanılan kemoterapi ve radyoterapinin geç etkilerini bildiren birçok yayına rastlanmıştır (5).

2.6.1. Büyüme üzerine etkiler:

Lineer büyüme ve sonuçta erişkin nihai boyun, kranial RT veya TBI alanlarda azaldığı gösterilmiştir. Bu problemin ana nedeni, GH sekresyonunda santral bozukluktur. Tedavi zamanında 5 yaşın altında olan çocuklar, özellikle bu yan etkilere duyarlıdır ve doz attıkça GH eksikliği gelişmesi için gerekli süre kısaltılmaktadır (179). ALL'de dozun 2400 cGy'den 1800 cGy'ye çekilmesi bu yan etkide önemli azalma sağlamıştır (180). Fakat bu dozlarda bile hipotalamik-hipofizer aks bozuklukları bildirilmektedir (181). Radyasyon, ayrıca direkt olarak kemik ve yumuşak dokulara hasar vermektedir. Lineer büyümedeki bozulma yanısıra kemik kitlesinde azalma da bildirilmiş ve hastaların sonraki yaşamlarında osteoporotik fraktürler açısından riskli oldukları bildirilmiştir (182).

2.6.2. Kognitif fonksiyonlar:

Çocukluk çağında ALL nedeniyle tedavi gören çocukların zeka düzeyinde ve okul başarılarında düşüklükler olduğu bilinmektedir (5). Yaş ve cinsiyetin bu etkide önemli olabileceği söylenmiş ve 5 yaşın, özellikle de 3 yaşın altında RT alanların kognitif fonksiyonlarında daha belirgin azalmalar saptanmıştır (182). Ayrıca erkeklere göre kızlarda, bu etkilerin daha belirgin olduğunu vurgulayan yayınlar mevcuttur (183). Geç kognitif bozuklukları önlemenin en etkili yolu, son ALL protokollerinde olduğu gibi kranial RT yerine daha fazla sayıda intratekal tedavi ve sistemik kemoterapinin kullanılmasıdır. Ancak daha yoğun bu tedavinin kognitif bozukluklara yol açıp açmayacağı gündeme gelmektedir. Yakın zamanda yapılan bir infant ALL çalışmasında, SSS profilaksisi amacıyla yüksek doz sistemik metotreksat ve intratekal Mtx ve ARA-C kullanılmasıyla nörolojik gelişim testlerinde yaşlılarına göre bir gerilik saptanmamıştır (184).

2.6.3. Üretkenlik üzerine etkileri:

Kanser tedavisi sonrası üretkenlik üzerine olumsuz etkiler, KT ya da RT'nin gonadlar üzerine direkt toksik etkisi veya RT'nin hipotalamik-hipofizer aksa olan olumsuz etkisi

sonucu olabilmektedir. Erkek ALL vakalarının yaklaşık %6'sında, tanı veya relapsda testislerde lösemik tutulum vardır. Gerek direkt tedavi amacıyla olsun gerekse kraniyal RT amacıyla olsun testisler RT almaktadır ve germ hücre fonksiyonları radyasyona çok duyarlı olduğundan 100cGy'lik bir doz bile oligo-azospermi yapabilmektedir. Leydig hücreleri daha dirençlidir. Sklar ve ark., kür olan 60 ALL vakasında FSH yüksekliği ve testis volümlerinin küçük olmasıyla tanımlanan belirgin germ hücre disfonksiyonu saptamışlardır (185). Yakın zamanda, gerek KİT için hazırlık rejimlerinde, gerekse primer kemoterapi rejimlerinde, siklofosamid kullanımının giderek arttığı görülmektedir. Bu ajanın primer gonad hasarı yaptığı bilinmektedir ve uzun dönemde hastaların üretkenlik kapasitesini etkileyebilir. Diğer çalışmalarda yüksek doz CPM ile tedavi edilen kızların genelde menarşa girdikleri ve menslerinin devam ettiği görülmüş, fakat menopoza daha erken girdikleri saptanmıştır (186)

2.6.4. Kardiyak etkiler:

Antrasiklinlerin, hem akut olarak hem de tedaviden yıllar sonra kardiyak toksisite yaptıkları bilinmektedir. Toksisite insidansı kümülatif doz, mediastinal RT veya diğer kemoterapotik ajanların (siklofosamid, ifosfamid) kullanımı ile ilişkili olarak 350-400mg/m² arasında değişmektedir (5). Doz yoğunluğu, kız cinsiyet ve tanıda yaşın küçük olmasının kardiyak toksisite riskini artırdığı gözlenmiştir (187,188). Subklinik kardiyak hasarın tahmin edilenden daha fazla olduğu belirtilmektedir. Steinherz ve arkadaşları, median 450 mg/m² antrasiklin almış 201 ALL hastasının median 7 yıllık takip süresinde, %23'ünde ekokardiyografik anormallik saptamışlardır (189). Sonrasında Lipschultz ve ark., tedaviden 1-15 yıl sonra 115 çocuğu incelediklerinde hastaların %57'sinde artmış afterload (sol ventrikül duvar kalınlığında azalma) ya da kontraktilitede azalma saptamışlar ve bunun antrasiklin kümülatif dozuyla ilişkisi olduğunu göstermişlerdir (190). Antrasiklinlerin kardiyak toksisitesini azaltmaya yönelik yaklaşımlar, uygulama dozlarının değiştirilmesi ve daha az toksik analogların bulunmasıdır. Dozların sürekli infüzyonla veya daha sık aralıklarla daha düşük dozlarda uygulanmasının, pik serum seviyelerinde aşırı yükseklikleri engelleyerek etkinliği azaltmadan kardiyak toksisiteyi azalttığı görülmektedir. İlaveten birlikte kardiyak koruyucuların örneğin dexrazoksan kullanımı, klinik çalışma altındadır(5).

2.6.5. İkincil maligniteler:

Çocukluk çağı kanserlerinin tedavisinin en önemli yan etkilerindendir. Childhood Cancer Survivor Study (CCSS)'nin ilk verilerinde, 1970-1986 arasında 25 merkezden yaşları 21'den küçük tanı almış 13254 kanser hastasında, lösemi tanısından 15 yıl sonra kümülatif ikincil kanser insidansı %1.6, 20 yıl sonra ise %3.3 bulunmuştur (191). En sık olarak da SSS tümörleri gelmektedir (192,193). Neglia ve ark., ALL nedeniyle tedavi görmüş 9720 hastanın median 6 yıl takipleri sonunda 43 tanesinde ikincil kanser geliştiğini ve bunların 24'ünde SSS tümörü olduğunu saptamışlardır (193). Yakın zamanda yapılan bir araştırmada, ALL nedeniyle KİT yapılan 3182 çocuktan median 3.6 yılda 25 solid tümör olgusu gözleendiği, bunların yarıdan fazlasının da SSS ve tiroid kanserleri olduğu bildirilmiştir (194). Lösemi ve SSS tümörleri arasında Li-Fraumeni gibi bilinen genetik ilişkilerin yanısıra yeni bir yayında radyasyon, antimetabolit tedavi ve genetik predispozisyon arasında da bir ilişki bildirilmiştir. Relling ve ark., yoğun antimetabolit tedavi gören 52 hastanın 6'sında(%12.8), ikincil beyin tümörü saptamışlardır (195).

Hem alkilleyici ajanlar hem de epipodofilotoksinlerin, sekonder AML gelişiminde etkili oldukları belirtilmektedir. Alkilleyici ajanlara sekonder gelişenlerde median süre 5.5 yıl ve öncesinde myelodisplastik bir faz olduğu ve sıklıkla 5 ve 7. kromozomlarda anormallikle beraber olduğu gösterilmiştir. Aksine epipodofilotoksinlerde intervalin daha kısa olduğu, myelodisplastik faz bulunmadığı ve 11q anomalileri ile seyrettiği belirtilmektedir (196).

2.6.6. Avasküler nekroz:

Yeni verilere göre, prednizon yerine deksametazon kullanımı ALL'de EFS oranlarını yükseltmiştir(5). Fakat bu potent steroidin kullanımı, lösemi tedavisinin kronik komplikasyonu olarak avasküler nekroz oranlarında artışa yol açmıştır. Bu yan etki steroid doz ve süresiyle ilişkili olarak %3'den %25'lere kadar bildirilmiş ve adölesanların prepubertallerden daha yatkın oldukları görülmüştür(5). Sıklıkla tedavi sırasında veya yıllar sonra femur başı gibi yük binen eklemlerde ortaya çıkmaktadır (197). Klinik bulgular, ağrıların kaybolmasından ciddi fonksiyon kayıplarına kadar geniş bir yelpazededir. Bazı hastalarda eklem replasmanı gerekebilmektedir .

Sonuç olarak, lösemi tedavisi görmüş çocuk ve adölesan olgular geri kalan yaşamları boyunca aktif bir şekilde takip edilmeli ve klinik çalışmaların bir alt grubu dahilinde izlenmelidirler. Bu, araştırmacılara lösemi tedavisinin etkinliğinin korunurken, uzun

sürelili yaşamlarında da kalitenin bozulmaması ve geç sekellerin önlenmesi için, mevcut tedavilerin modifikasyonunda yol gösterici olmalıdır.

2.7. Flow sitometrik DNA analizi (198):

DNA analizi iki çalışma sahasından oluşmaktadır. Birincisi; DNA içeriğinin hesaplanması yani normal ya da anormal hücre popülasyonunun ploidisini ya da DNA miktarını saptamaktır. Normal hücreler (öplöid ya da diploid) genellikle normal DNA içeriğine sahiptir ve 2N olarak ifade edilmektedir. Aksine malign hücreler, sıklıkla anormal DNA içeriğine sahiptir (anöplöid).

İkincisi; hücre siklusü kinetiği çalışmalarıdır ve hücre döngüsünün farklı evrelerindeki hücrelerin dağılımlarının hesaplanmasıyla yapılmaktadır. Hücre döngüsü çalışmaları, ilgilenilen hücre popülasyonunun proliferatif aktivitesi hakkında bilgi vermekte ve malign hücrelerin proliferatif aktivitesi yüksek olabileğinden kanser tanısında, prognozunda ve tedavinin izlenmesinde faydalı olmaktadır.

DNA analizi, flow sitometrinin ilk uygulama alanlarından biridir ve günümüzde oldukça geniş kullanım sahasları olan hassas, hızlı, otomatize bir sistem olarak klinik laboratuvarlarda yerini almıştır. DNA analizi için kullanıldığında birkaç dakika içinde 100000'den fazla hücrenin analizine imkan vermektedir. Otoradyografik analizler ile kıyaslandığında oldukça "cost effective" ve zaman kazandırıcıdır.

DNA analiz çalışmalarının temel göstergeleri, DNA indeksi (DI) ve proliferatif indeks (198). DNA indeksi anöplöidin varlığının ve/veya derecesinin bir ölçümüdür. Proliferatif indeks, hücre döngüsünün istirahat fazı dışında olan ve replike olan hücrelerin yüzdesini göstermektedir.

Flow sitometri kullanılarak DNA içeriğinin hesaplanması, bazı flüoresan boya ların uygun boyanma koşullarında DNA'ya bağlanabilme kabiliyetlerine dayanmaktadır. Tipik olarak hücreler yada ekstrakte nükleuslar, çift sarmallı DNA'ya stokiometrik olarak bağlanan Propidium Iodide(PI) gibi flüoresan boya larla boyanmaktadır. PI'ya ilaveten Hoechst, DAPI ve etidium bromid gibi diğer boya lar da bu amaç için kullanılabilir. Flow sitometri ile ölçüldüğünde PI kullanımı ile integre kırmızı flüoresan'ın yoğunluğu boya ile bağlı DNA miktarıyla doğrudan ilişkilidir. Normal diploid DNA içeren hücrelerin flüoresan intensitesi ile analiz edilen hücrelerin intensitesi karşılaştırılarak relatif DNA içerikleri hesaplanabilir.

Boyalı hücreler ya da nükleuslar bir eksitatör ışık kaynağından yani flow sitometrinin lazerinden geçmekte ve DNA içerikleri ile orantılı olarak flüoresan emisyonu

vermektedirler. PI 300-380 ve 440-580 nm'de eksite olmakta ve 560-680 nm'de emisyon vermektedir. Nükleus'a bağlı boya tarafından saçılan kırmızı flüoresans saptanarak bir histogram grafikde gösterilmektedir. DNA anöploidisi gösteren hücre popülasyonları, DNA anormalliği olmayanlardan ayrılabilir (199). Anöploid hücre popülasyonunun flüoresan intensitesinin, diploid DNA içeren hücrelerin flüoresan intensiteleri ile karşılaştırılmasıyla (histogramda G0G1 piki) anöploid popülasyonun relatif DNA miktarı saptanabilir. Bu anöploid hücre dizisinin DNA indeksi'dir. Histogramda anöploid bir popülasyon saptanırsa hasta örneğinin DNA indeksi, anöploid popülasyonun G0G1 pikinin ortalama kanal sayısının, normal diploid popülasyona ait G0G1 pikinin ortalama kanal sayısına bölünmesi ile hesaplanmaktadır (DI:Anöploid G0G1 / Diploid G0G1) .

Her bir kromozomun iki kopyasını içeren normal hücreler diploiddir. DNA indexinin 1.0 olması durumunda diploid olduğu söylenir. Sonuç 1.0'e eşit değil ise, anöploid olarak tanımlanmaktadır (200).

2.7.1. Hücre siklüsü analizi:

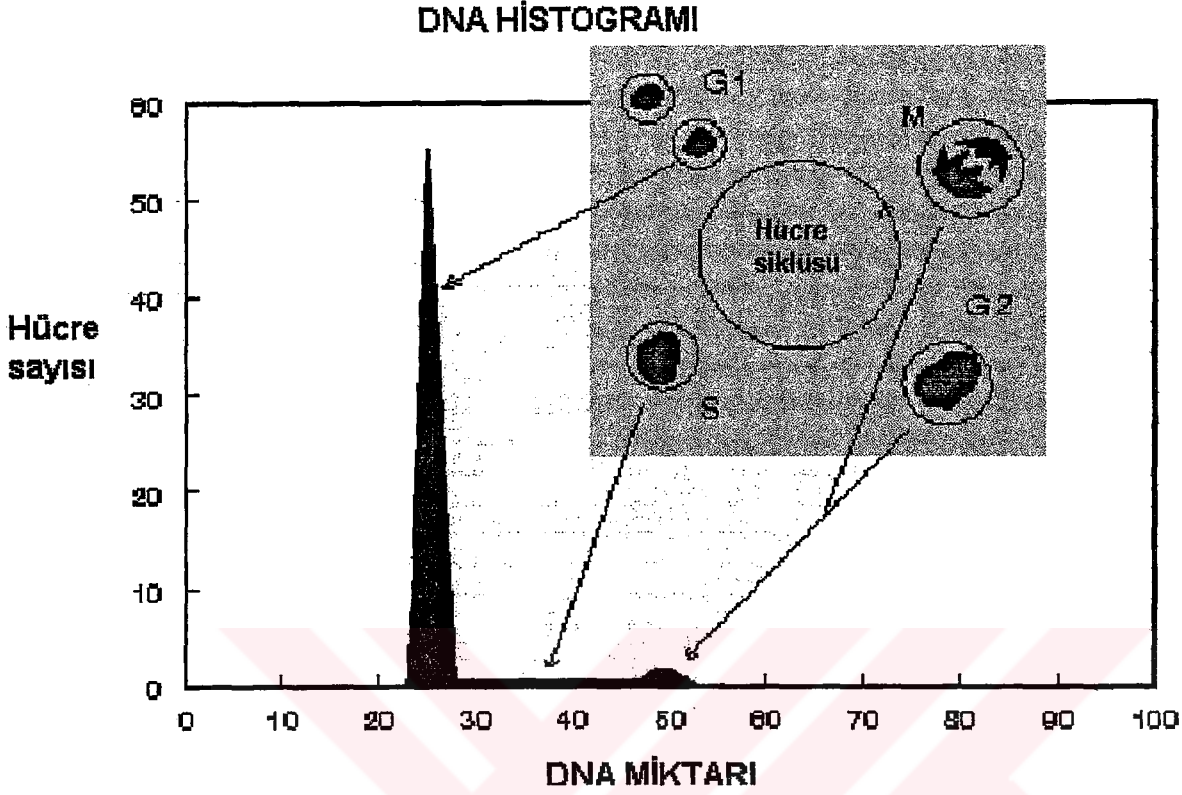
Hücrenin ardışık büyüme ve bölünme olaylarının hepsine birden, hücre siklüsü denmektedir. Hücre siklüsü, sıklıkla beş faz'a ayrılmaktadır. Bunlardan 4'ü:

- 1- G1(gap 1), DNA replikasyonu öncesi büyüme periyodunu ifade etmektedir.
- 2- S (sentez), DNA'nın replike olduğu fazdır;
- 3- G2(gap 2); DNA replikasyonunu takibeden büyüme periyodudur;
- 4- M(mitoz), hücrenin bölünme periyodu.

Mitozu takiben, kardeş hücreler tekrardan G1 fazına girebilirler, ya da 5. faz olarak bilinen, büyüme ve replikasyonun durduğu G0 fazına girerler. G0 fazındaki hücrelere, istirahat halindeki hücreler de denmektedir. Bu hücreler tekrardan G1 fazına girebilmektedirler ya da ölmektedirler. *Hücresel çoğalma başladığı zaman, hücreler hücre siklüsünün G₁ fazına girer. Bu faz sırasında RNA ve protein sentezi oluşmaktadır, ancak hücresel DNA içeriği 2N'de sabit kalmaktadır(200)*

2.7.2. Hücre siklusu Flow sitometri ile nasıl değerlendirilir?

Döngüdeki hücrelerin flow sitometrik örnek görüntüsü şekil 1’de verilmiştir.



Şekil 1. Hücre siklüsündeki normal hücreler ve flow sitometrik görüntüleri

Grafikteki horizontal aks, relatif olarak hücre başına düşen DNA miktarını gösterirken vertikal aks, her DNA miktarı başına saptanan hücre sayısını ifade etmektedir. Bu görünüm, histogram olarak bilinmektedir. Histogram içine dahil edilen şekil ise, hücre siklüsünü göstermektedir. Bu örnekte G1 fazındaki hücreler 25. kanalda pik yapmaktadır. G2 ve M fazındaki hücreler ise DNA miktarları replike olduklarından dolayı iki katı yani 50.kanal düzeyinde pik yapmaktadır. Bu iki pik arasında da G1 ve G2 fazlarında değişik miktarlarda DNA (2N-4N) içeren hücrelerin oluşturduğu bir plato izlenmekte olup S fazının karakteristiğidir. Her pik yada bölgenin yüksekliğine dikkat edilmelidir. Flow sitometrinin bilgisayarı her hücre popülasyonunun, fraksiyonunu ya da miktarını verebilmektedir. Tipik olarak hücrelerin çoğunluğu G1 fazındadır. G0 fazındaki hücrelerin DNA miktarları da, G1 fazı ile aynıdır. Bu teknikle bu fazlar birbirlerinden ayıramadıklarından G0/G1 olarak ifade edilmektedir.

Diferansiye vücut hücrelerinin %95'inden fazlası bu fazdadır ve 2N DNA içeren diploid hücrelerdir. S ve G2/M fazlarının da değerlendirilmesiyle, hücre popülasyonunun çoğalması hakkında fikir edinilebilmektedir. DNA replikasyonunun tamamlandığı S fazı sonundan mitozla kadar geçen süre G2 fazıdır ve birlikte değerlendirilerek G2M fazı denmektedir. Bu hücrelerde DNA içeriği en yüksektir (4N) ve histogramda tek bir pik olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bu histogramlar, yalnızca anöploid popülasyon varlığını göstermek için kullanılmamakta, aynı zamanda farklı hücre sikluslarındaki hücrelerin oranlarını da vermektedir. Y aksı hücre sayısını, X aksı ise flüoresan yoğunluğunu yani DNA miktarını vermektedir.

Vücutta barsak epitel hücreleri, kemik iliği ve deri hücreleri gibi sadece birkaç tip hücre sık mitozla gitmektedir. Normal farklılaşmış hücrelerde mitotik aktivite düşüktür. Maliyn hücrelerin mitotik aktiviteleri daha yüksek olmaya meyillidir ve S fazı indeksi ölçümleriyle hesaplanabilmektedir (201). S fazı ölçümleri, tümör ağırlığı göstergesi olması yanı sıra tümör rekürrens riski ve/veya genel hasta yaşamını tahmin etmede kullanılmaktadır.

S faz fraksiyonu: S fazındaki hücreler (%) / S fazı popülasyonunun %'si x 100

Proliferatif indeks: Hücre döngüsündeki total hücre popülasyonunda, S ve G2M fazlarının toplamını göstermektedir ve hücrelerin proliferatif aktivitesini göstermektedir (202). Proliferatif indeks: S + G2M fazı hücreler / total hücre popülasyonu formülüyle hesaplanır.

Bu teknik, kanser hücre çalışmalarında oldukça geniş bir şekilde kullanılmaktadır. Prognozla ilişkisinin olduğu bilinen lösemilerde, tedavi stratejilerinin seçiminde ve sıklıkla da ilaçların hücre büyüme ve bölünmeleri üzerine olan etkilerinin incelenmesinde kullanılmaktadır.

3. HASTALAR ve YÖNTEM

3.1. Örneklem

Çalışma Kasım 1999 – Ocak 2001’de 0-18 yaş grubu yeni tanı almış ALL’li hastaların kemik iliği aspirasyon örneklerinde yapıldı. Vakaların 12’si Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Bilim Dalı, 4’ü Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Hematoloji Bilim Dalı, 5’i İzmir Tepecik SSK Hastanesi Çocuk Kliniği, 4’ü İzmir Dr. Behçet Uz Çocuk Hastanesinde izlenmekteydi.

3.2. Yöntem

3.2.1. Örneklerin Alınması :

Hastaların ilk tanıda morfolojik, sitogenetik ve immünofenotipleme amacıyla yapılan kemik iliği aspirasyonu esnasında, flow sitometrik hücre siklusü ve DNA analizi için, kemik iliği aspirasyon örneği ayrıldı. Hastaların demografik özellikleri, klinik bulguları, laboratuvar tetkiklerinden tam kan sayımları, blastik hücrelerin morfolojik, sitogenetik, immünofenotipik özellikleri, DNA indeksi ve hücre döngüsü analiz sonuçları kaydedildi.

3.2.2 Materyalin Taşınması ve Saklanması :

Hastalardan alınan 2-3 ml kemik iliği aspirasyon örnekleri, EDTA’lı tüplerde toplandı. Diğer merkezlerden alınan örnekler ise, 2 saat içinde çalışma laboratuvarına ulaştırıldı.

3.2.3. Mononükleer Hücrelerin İzolasyonu :

Boyum tarafından 1968 yılında, periferik kan ve kemik iliği aspirasyonundaki mononükleer hücrelerin (MNCs) izolasyonu için tanımlanan metodlara göre yapıldı (203). Bu yöntemlerde, polisakkarit ve radiopak kontrast ortamın karışımları kullanılmaktadır. Histopaque-1077 \pm 0.001 g/ml’ye ayarlanmış polysucrose ve sodyum diatrizoate solüsyonudur. Antikoagülanlı kemik iliği aspirasyon materyali Histopaque-1077 üzerine tabakalandırılır. Santrifügasyon sırasında, eritrositler ve nötrofiller polysucrose ile aggregate olarak hızla çöker. Böylece mononükleer hücreler plazma ve Histopaque-1077 arasında kalmaktadır. Trombositlerin çoğu ise, yıkama basamakları sırasında düşük devirde santrifügasyonla uzaklaştırılmaktadır.

Gerekli araç ve materyaller ;

1. Histopaque-1077, Sigma Diagnostics Inc. / Katalog no: 1077-1.
2. Polipropilen dibi konik doku kültür tüpü, Greiner Labortechnik / Katalog no: 164160.
3. 3-4 ml'lik serolojik pastör pipeti.
4. Mikroskop, lam , lamel ve enjektör.
5. %0.4'lük trypan-blue solüsyonu (canlılık testi).
6. Fötal calf serum (FCS), Biological Industries / Katalog no: 04-001-1B.
7. RPMI-1640 medium, Biological Industries / Katalog no: 01-100-1A.
8. Beckman J6-MI soğutmalı santrifüj, Beckman Instruments, Inc., CA 94304, USA.
9. Yıkama solüsyonu (%10 FCS içeren RPMI-1640 ortamı).

Örneğin Hazırlanması ;

Kemik iliği aspirasyon örneği, hücre sayısına bağlı olarak örnek 1:2 veya 1:4 dilüe edildi.

Y ö n t e m ;

1. Dibi konik doku kültür tüpüne, oda ısısına getirilmiş 3.0 ml Histopaque-1077 ilave edildi.
2. Yaklaşık 3-4 ml dilüe edilen kemik iliği aspirasyon örneği Histopaque-1077 üzerine dikkatli olarak tabakalandırıldı.
3. Oda ısısında tam olarak 20 dakika 400 x g'de santrifüj edildi.
4. Santrifüjden sonra dikkatli olarak pastör pipeti ile opak interfazdaki mononükleer hücre tabakası aspire edilerek toplandı.
5. Opak interfaz tabakası yeni doku kültür tüpüne transfer edildi.
6. Bu tüpe 8-10 ml yıkama solüsyonu ilave edilerek hücreler karıştırıldı.
7. 250 x g'de 10 dakika santrifüj edildi.
8. Santrifüj sonrası süpernatantı aspire edilerek atıldı (Ficollpaque-1077'in tamamen ortamdan uzaklaştırılması).
9. Hücre pelleti, 1.0 ml yıkama ortamında süspansedildi ve son hacim 10 ml'ye tamamlandı.
10. 250 x g'de 10 dakika santrifüj edildi.
11. Sekiz ve dokuzuncu basamaklar tekrar edildi. Son yıkama işleminden sonra 2.0 ml yıkama solüsyonunda hücreler tekrar süspansedildi.

12. Bu yöntem ile elde edilen mononükleer hücre topluluğunun canlılığı, %0.4'lük trypan-blue ile muamele edilerek kontrol edildi (204). Canlılığın %98-99 olduğu saptandı.

3.2.4. Mononükleer Hücrelerin Dondurulması :

Hücre döngüsü ve DNA analizi için kullanılan kitin çözündürüldükten sonraki kullanım süresinin bir ay gibi kısa olması nedeni ile, yeterli sayıda örnek çalışabilmesi amacıyla elde edilen MNCs'in dondurularak depolandı (205).

Gerekli araç ve materyaller ;

1. 1.8 ml'lik dondurma tüpleri, Nalge Nunc Cryo Tube vials / Katalog no: 375418.
2. Dimethyl sulphoxide (DMSO), Sigma Diagnostics Inc. / Katalog no: D 2650.
3. Föetal calf serum (FCS), Biological Industries / Katalog no: 04-001-1B.
4. RPMI-1640 medium, Biological Industries / Katalog no: 01-100-1A.
5. Dondurma solüsyonu (%10 FCS ve %20 DMSO içeren RPMI-1640 ortamı).
6. Heraeus Sepatech derin dondurucu (-80°C).

Y ö n t e m ;

1. Enjektörde 2.0 ml'lik dondurucu ortamı hazırlandı ve 4°C'ye kadar soğutuldu.
2. Enjektörde 2.0 ml'lik MNC süspansiyonu 4°C'ye kadar soğutuldu.
3. Eşit hacim ve 4°C'ye kadar soğutulan MNC süspansiyonu ile dondurucu ortam karıştırıldı.
4. İki adet Nunc Cryo tüpüne eşit miktarda ilave edildi.
5. Cryo tüpleri derin dondurucuya transfer edilerek çalışma öncesine kadar depolandı.

3.2.5. Mononükleer Hücrelerin Çözündürülmesi :

Hücre döngüsü ve DNA analizi için saklanan kemik iliği aspirasyonu MNC örnekleri, 5'li gruplar halinde çözündürülerek çalışıldı (205).

Gerekli araç ve materyaller ;

1. Su banyosu, Thermed 5001 electronic benmari.
2. Polipropilen dibi konik doku kültür tüpü, Greiner Labortechnik / Katalog no: 164160.
3. Mikroskop, lam , lamel, enjektör ve buz parçaları.

4. %0.4'lük trypan-blue solüsyonu (canlılık testi).
5. Yıkama solüsyonu (%10 FCS içeren RPMI-1640 ortamı).
6. Fosfat tampon solüsyonu (Phosphate buffer saline-PBS).
7. 12x75 mm, 5 ml'lik polystrene tüpler, Falcon / Katalog no: 352052, Becton Dickinson Lab.

Yöntem ;

1. Su banyosu 37°C'ye kadar ısıtıldı. Hücreleri 4°C'de tutabilmek için beher içinde buz parçacıklarından oluşan bir buz banyosu hazırlandı.
2. 8 ml'lik %10 FCS içeren RPMI-1640 yıkama ortamı buz banyosuna konularak soğutuldu.
3. Derin dondurucudan çıkarılan örnekler, 37°C'ye getirilmiş su banyosunda hızlıca çözündürüldü. Örnekler, hemen buz banyosunda soğutulmuş yıkama ortamının içine transfer edildi. Hücreler, bu ortamda yaklaşık olarak 20 dakika kadar bekletildi.
4. 250 x g'de 10 dakika santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrası süpernatantı aspire edilerek atıldı (DMSO'nun uzaklaştırılması).
6. Hücre pelleti, 1.0 ml yıkama ortamında süspansiyon edildi ve son hacim 10 ml'ye tamamlandı.
7. 250 x g'de 10 dakika santrifüj edildi.
8. Altı ve yedinci basamaklar tekrar edildi. Son yıkama işleminden sonra 2.0 ml PBS ilave edilerek hücreler tekrar süspansiyon edildi.
9. Çözündürülen MNC topluluğunun canlılığı, %0.4'lük trypan-blue ile muamele edilerek kontrol edildi (204). Canlılığın %97-98 olduğu saptandı.
10. Hemocounter'da hücre sayımı yapıldı ve hücre konsantrasyonları 1×10^6 /ml'ye ayarlandı.

3.2.6. Kontrol Mononükleer Hücrelerin Hazırlanması:

Test örneklerimizin DNA indeksinin hesaplanması ve flow sitometri cihazında G0/G1 pikinin kanal değerinin doğru olarak saptanması amacıyla, periferik kan mononükleer hücreleri izole edildi.

1. Sağlıklı kişilerden 4-5 ml EDTA'lı venöz kan alındı.
2. Mononükleer hücre izolasyon yönteminde belirtildiği gibi, periferik kandan mononükleer hücreler (PBMNCs) izole edildi.

3. Hemocounter'da hücre sayımı yapıldı ve hücre konsantrasyonu tampon solüsyonunda 1×10^6 /ml'ye ayarlandı.

3.3. Hücre Siklüsü ve DNA Analizi

Hastaların kemik iliği mononükleer hücrelerinin hücre döngüsü ve DNA analizleri için, CycleTEST DNA reagent kiti (Becton Dickinson-BD / Katalog no: 340242) kullanıldı. Kit, taze veya dondurularak saklanmış hücre süspansiyonlarından elde edilen hücre çekirdeklerinin izole edilmesini ve boyanmasını sağlayan reaktifleri içermektedir.

3.3.1. Testin prensibi ;

Yöntem, non-iyonik deterjanlar ile hücre membran lipid tabakasının çözündürülerek hücre sitoplazmasının geçirgenliğinin sağlanmasını, tripsin ile hücre proteinlerinin yok edilerek bir enzimle hücre RNA'nın sindirilmesini ve sperminle de nükleer kromatinin stabilize edilmesini içermektedir (206,207).

İzole edilen nükleusların tamamı propidium iodide (PI) ile boyanmaktadır. Boyanmış hücreler, daha sonra elektronik olarak çiftli hücreleri birbirinden ayırt edebilme yeteneğine "Doublet Discrimination Mode (DDM)" sahip flow sitometride analiz edilmektedir (208,209).

3.3.2. Kullanılan Reaktif, Araç ve Materyaller ;

1. Solüsyon A (10 ml'lik spermin tetrahidroklorik tamponda tripsin içermektedir).
2. Solüsyon B (Tripsin inhibitörü ve Ribonükleaz-A içermektedir).
3. Solüsyon C (Propidium iodide içermektedir).
4. Tampon solüsyonu (Sodyum-sitrat, sukroz ve DMSO içermektedir).
5. Alüminyum folyo (boyanan hücrelerin ışıktan korunması).
6. Ayarlanabilir otomatik mikropipet ve pipet uçları.
7. DNA QC partkülleri, BD Labware / Katalog no: 349523.
8. 12x75 mm, 5 ml'lik polystyrene tüpler, Falcon / Katalog no: 352052, BD Labware.
9. 40 μ m'lik naylon süzgeç, Cell Strainer BD Labware / Katalog no: 352340.
10. FACSCalibur flow sitometri, BD Immunocytometry Systems / Seri no: E1914, June 1998.

3.3.3. Boyama Yöntemi ;

1. Hücre döngüsü ve DNA analizinde boyama yöntemi için toplam 5×10^5 hücre gereklidir. Bu nedenle kontrol olarak kullanmak için bir tüpe sadece PBMNC

- süspansiyonundan 5×10^5 hücre ilave edildi. Diğer tüpe ise test edilecek kemik iliği MNCs ile PBMNCs 2/1 oranında ve toplam 5×10^5 hücre olacak şekilde ilave edildi.
2. Hücre süspansiyonları, oda ısısında, 400 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Hücre pelletini bozmadan dikkatli olarak süpernatant aspire edildi.
 3. Solüsyon A (tripsin tamponu) ve solüsyon B (tripsin inhibitörü - RNase tamponu) oda ısısına getirildi. Her tüpe 250 µl solüsyon A ilave edildi ve tüp vortekslenmeden yavaşça elle vurularak karıştırıldı.
 4. Solüsyon A (tripsin tamponu) ile reaksiyona girmesi için, oda ısısında 10 dakika inkübe edildi.
 5. Her tüpe solüsyon A'yı dökmeyen 200 µl solüsyon B (tripsin inhibitörü - RNase tamponu) ilave edildi. Tüp vortekslenmeden yavaşça elle vurularak karıştırıldı.
 6. Oda ısısında 10 dakika inkübe edildi.
 7. Her tüpe solüsyon A ve B atılmadan soğuk ($2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$) 200 µl solüsyon C (propidium iodide boyama solüsyonu) ilave edildi. Yukarıdaki basamaklarda olduğu gibi yavaşça karıştırıldı.
 8. Buz banyosunda veya buzdolabında ($2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$), karanlık ortamda 10 dakika inkübe edildi.
 9. Her tüp ayrı ayrı 12x75 mm'lik tüplere 40 µm'lik naylon süzgeç kullanılarak filtreden geçirildi ve flow sitometrede analiz etmek için hazır hale getirildi.
 10. Hazırlanmış tüpler flow sitometrede analiz edilinceye kadar karanlık ortamda, $2^{\circ}\text{C}-8^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Örnekler, solüsyon C ilave edildikten sonra 3 saat içinde flow sitometrede analiz edildi.

3.3.4. Flow Sitometrede Analiz ;

1. Örneklerin flow sitometreden geçirilmesi, Macintosh CellQUEST software ve DNA Experiment Document programları kullanılarak gerçekleştirildi.
2. DNA analizinde kullanılan flow sitometrenin cihaz performansını ve kalite kontrolünün sağlanması amacıyla DNA QC partikülleri (Becton Dickinson/Katalog no:349523) kullanıldı.
3. Tavuk eritrosit nükleusları (CEN) ile cihazın voltaj ayarları sağlanarak lineer bir cevap oluşturulması sağlandı.

4. Calf timus nükleusları (CTN), hücre siklusünün bütün fazlarına sahip stabil bir kaynak oluşturmaktadır. CTN, flow sitometrenin DDM işlemini tam olarak değerlendirdiğini göstermek için kullanılmaktadır.
5. Flow sitometre cihazının kalibrasyonları tamamlandıktan sonra, sadece PBMNCs'i içeren örnek cihazdan geçirilerek sadece 2N miktarda DNA içeren G0/G1 histogram pikinin kanal değeri ve yeri ayarlandı.
6. Daha sonra sırasıyla test edilecek kemik iliği MNCs ile PBMNCs'i içeren tüpler cihazdan geçirilerek bilgiler elde edildi. Bu örneklerde minimum 20000 hücre sayıldı.
7. Elde edilen veriler ModFit LT 2.0 Cycle Analysis Software (BD, Verity Software House, Inc., katalog no: 34013081) kullanılarak değerlendirildi.

3.4. İstatistik yöntemler:

"SPSS for MS Windows Release 8.0" istatistik programı kullanılarak sayısal değişkenler için gruplararası ikili karşılaştırmalar öncesi, farklılığın önemliliği "Kruskal-Wallis 1-way Anova" varyans analizi yöntemiyle değerlendirildi. Sonrasında ikili karşılaştırmalar "Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W Test" ile yapıldı. Gruplararasıdaki farklılığın önemliliği "Pearson Q Square" testi ve gözlerden birinde 5'den küçük gözlenen değer olduğunda "Fisher's Exact Test" ile belirlendi. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi. Tüm anlamlılık değerleri, iki yönlü değerler olarak alındı.

4. BULGULAR

4.1.1. Demografik özellikler

Çalışmaya alınan hastaların bazı özellikleri tablo 6'da görülmektedir. Kasım 1999-Ocak 2001 tarihleri arasında 1,5 – 16 yaşında, 21'i erkek (%76) ve 7'si kız (%24), toplam 25 yeni tanı akut lenfoblastik lösemi hastası çalışmaya alındı. Hastaların %60'ı kullanılan ALL BFM-95 tedavi protokolü kriterlerine göre standart ve orta risk grubu olarak kabul edilen 1-6 yaş arası hastalardı. %40'ı ise 6 yaş ve üzerinde idi.

Tablo 6. Hastaların yaş, cins ve tedavi gördükleri merkezlere göre dağılımı

	n	%
Cinsiyet		
Erkek	19	76
Kız	6	24
Yaş		
< 1	-	-
1-6	15	60
≥ 6	10	40
Tedavi gördüğü merkez		
DEÜTF	12	48
SSK Tepecik H.	5	16
EÜTF	4	20
Behçet Uz Ç.H.	4	16

4.1.2. Hastaların tanı anında klinik ve laboratuvar özellikleri

Hastaların yaş ortalaması $6,0 \pm 3,9$ yıl idi. Tanı anında 19 hastada (%76) hepatomegali ($3,0 \pm 2,6$ cm), 15'inde (%60) splenomegali ($3,3 \pm 4,0$ cm) ve bir hastada (%4) mediasten genişlemesi saptandı. Hastaların hiçbirisinde santral sinir sistemi tutulumu tespit edilmedi. Laboratuvar bulgularından ortalama hemoglobin değerleri $7,2 \pm 2,4$ g/dl (3,6-13,2), hematokrit $\%22,4 \pm 7,6$ (10,3-38,5), trombositleri $73,3 \pm 81 \times 10^9/L$ (6,0-355), lökosit sayısı $35,9 \pm 53,7 \times 10^9/L$ (1,3-222) ve periferik yaymada blast oranı $\% 52,1 \pm 34,7$ (1-95) idi. Protokole göre 11 hastanın (%44) tanıdaki lökosit sayısı kötü risk grubuna ($\geq 20 \times 10^9/L$) giriyordu. Lösemik hücre yükü (RF) ortalama $1,1 \pm 0,4$ (0-1,7) ve yedi hastada (%28) RF<0,8, sekizinde (%32) 0,8-1,2 arasında, dokuzunda (%36) 1,2 - <1,7 ve bir hastada da(%4) $\geq 1,7$ idi (Tablo 7 ve 8).

Tablo 7. Hastaların klinik ve laboratuvar bulguları (1)

	Ortalama \pm SD	Min - Max
Yaş	6,0 \pm 3,9	1,5-14
Hepatomegali (cm)	3,0 \pm 2,6	0-9,0
splenomegali (cm)	3,3 \pm 4,0	0-15,0
Lösemik hücre yükü (RF)	1,1 \pm 0,4	0-1,7
Hb (g/dl)	7,2 \pm 2,4	3,6-13,2
Hct (%)	22,4 \pm 7,6	10,3-38,5
Trombosit ($\times 10^9/L$)	73,3 \pm 81	6,0-355
Lökosit ($\times 10^9/L$)	35,9 \pm 53,7	1,3-222
PY'de blast (%)	52,1 \pm 34,7	1-95

Tablo 8. Hastaların klinik ve laboratuvar bulguları (2)

	n	%
SSS tutulumu	-	-
Mediasten genişlemesi	1	4
Splenomegali	15	60
Hepatomegali	19	76
Lökosit		
<20 $\times 10^9/L$	14	56
$\geq 20 \times 10^9/L$	11	44
Lösemik hücre yükü (RF)		
< 0.8	7	28
0.8-1.2	8	32
1.2-<1.7	9	36
≥ 1.7	1	4

4.1.3. Hastaların tanı anında blastik hücre özellikleri

Tanı aşamasında kemik iliğinden elde edilen mononükleer hücrelerin morfolojik, immünofenotipik ve sitogenetik özellikleri tablo 9' da görülmektedir.

Hastaların 21'inin (%84) L1 ve dördünün (%16) L2 morfolojisinde olduğu görüldü.

İmmünofenotipik incelemelerinde 8'i (%32) Pre-pre-B, 15'i (%60) pre-B ve 2'si (%8) T hücreli idi. 20'sinde (%80) CALLA (+)'liği saptanırken, 3 hastanın (%12) myeloid antijenlerden (CD13, CD33) en az birini eksprese ettiği saptandı. Flowsitometrik DNA incelemelerinde hastaların birinde (%4) DNA indeksi <1,0, 20'sinde (%80) DI 1.0 – 1.15 arasında ve dördünde (%16) ≥ 1.16 idi.

Sitogenetik çalışmalarında 21 hastada (%84) kromozom analizi yapılabildi. Sadece 10'unda (%48) metafaz elde edilebildi, fakat bunların da hiçbirinde 20'nin üzerinde metafaz yoktu. Analiz edilen hastaların 10'u da (%100) diploid saptandı. PCR'ye dayalı moleküler analiz çalışmaları t(4:11), t(9:22) ve t(12:21) varlığını saptamaya yönelik olarak 14 hastada yapılabildi. Bir hastada (%7,1) t(4:11), üç hastada (%21,4) t(12:21) saptanırken, t(9:22) pozitif olguya rastlanmadı.

Tablo 9. Tanıda blastların morfolojik, immünfenotipik ve sitogenetik özellikleri

	Sayı	%*
FAB		
L1	21	84
L2	4	16
İmmünfenotip		
Prepre B	8	32
Pre B	15	60
T	2	8
CALLA		
(+)	20	80
(-)	5	20
Myeloid Ag		
(+)	3	12
(-)	22	88
DNA indeksi		
<1.0	1	4
1-1.15	20	80
≥1.16	4	16
Ploidi (n:10)		
Diploid	10	100
Hiperdiploid	-	-
Hipodiploid	-	-
Genotip (n:14)		
t(4:11)	1	7,1
t(9:22)	-	-
t(12:21)	3	21,4

* Her grup içinde kolon yüzdesi

4.1.4. Hastaların erken dönem tedavi yanıtları

Çalışmanın bir yıl içinde başvuran yeni tanı almış hastaları içermesi nedeniyle takip süreleri oldukça kısıtlı idi. Hastalar ortalama olarak 7.3 ± 4.5 ay (1-15 ay) takip

edildiler. Bu süre içinde relaps veya ölüm olayına rastlanmadı. Fakat sürenin kısıtlılığı nedeniyle prednizolon tedavisine erken yanıt ve remisyona girme özellikleri değerlendirildi. Hastaların 8 günlük steroid ve bir kez intratekal metotreksat tedavisine yanıtları ile ilk remisyon özellikleri değerlendirildiğinde; 22'sinde (%88) 8. gündeki blast sayısı $< 1000/\mu\text{L}$ iken üç hastada (%12) $\geq 1000/\mu\text{L}$ idi. Tedavinin 15. ve 33. günlerinde indüksiyon tedavisine yanıt özellikleri araştırıldığında beş hastanın (%20) 15. günde remisyona girdiği, 19 hastanın (%76) 33. günde remisyona girdiği saptandı. 33. günde remisyon kabul edilen bu olguların sadece birinde 15. günkü blast oranı $>5\%$ (%10) idi. Bir hasta (%4) ancak 45. gün remisyon elde edilebilirdi. Remisyona girmeyen hasta yok idi (Tablo 10).

Tablo 10. Hastaların erken dönem tedavi yanıtları

	Sayı	%
Prednizolona yanıt		
Blast $< 1000/\mu\text{L}$	22	88
" $\geq 1000/\mu\text{L}$	3	12
Remisyon		
15. gün	5	20
33. gün	19	76
45. gün	1	4

4.1.5. Hastaların tedavi edildikleri merkezlerde yapılmış risk sınıflaması

Her hastanın risk sınıflaması takip edildiği merkezde değerlendirildi. Buna göre 7 hasta (%28) standart risk, 16 hasta (%64) orta risk ve 2 hasta (%8) yüksek risk grubundaydı (Tablo 11). Risk sınıflaması yapılırken bazı merkezlerin orijinal BFM-95 protokolüne uymadığı görüldü; tanıda lökosit sayısı protokole göre yüksek iki hastaların erken dönem steroid yanıtları göz önüne alınarak orta risk yerine standart risk grubuna alındıkları saptandı.

Tablo 11. Hastaların BFM-95 risk sınıflamasına göre dağılımı

Risk grubu	n	%
SRG	7	28
MRG	16	64
HRG	2	8

4.2.1. Hastaların risk sınıflamasına göre demografik özellikleri

Çalışmaya alınan hastalar BFM-95 risk gruplarına göre değerlendirildiklerinde; standart risk grubundaki hastaların altısı (%85,7) 1-6 yaşlarında, birisi de (%14,3) 6 yaşın üzerinde idi. Bunların üçü (%42,9) erkek, dördü (%57,1) kız idi. Ortalama takip süreleri 4.9 ± 4.3 ay (1-13 ay) idi ve bu sürede relaps veya ölüm görülmedi.

Orta risk grubundaki hastaların yedisi(%43,8) 1-6 yaşlarında, dokuzu (%56,3) 6 yaş ve üzerinde idi. Bunların 15'i (%93,8) erkek, birisi (%6,3) kız idi. Ortalama takip süreleri 8.2 ± 4.4 ay (1-15 ay) idi. Bu grupta da bu süre içerisinde herhangi bir olay gözlenmedi.

Yüksek risk grubundaki hastaların ikisi de(%100) 1-6 yaş grubundaydı. Bu gruptaki hastaların ortalama takip süresi 8.5 ± 3.5 ay (6-11 ay) idi ve burada da herhangi bir olay gözlenmedi.

Risk gruplarına göre yaş ve cinsiyet özellikleri karşılaştırıldığında; yaş gruplarının dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmezken (p:0,08), cinsiyet açısından değerlendirildiğinde kızların standart risk grubunda daha fazla olduğu görüldü (p:0,02) (Tablo 12).

Tablo 12. BFM-95 risk sınıflamasına göre hastaların yaş ve cinse göre dağılımı

	Standart risk		Orta risk		Yüksek risk		Toplam		p
	n	%*	n	%*	n	%*	n	%*	
Cinsiyet									
Erkek	3	42,9	15	93,8	1	50	19	76	0,02
Kız	4	57,1	1	6,3	1	50	6	24	
Yaş									
< 1	-	-	-	-	-	-	-	-	
1-6	6	85,7	7	43,8	2	100	15	60	0,08
≥ 6	1	14,3	9	56,3	-	-	10	40	
Toplam**	7	28	16	64	2	8	25	100	

* Her grup içinde kolon yüzdesi, ** Satır toplamı ve yüzdeleri

4.2.2. Hastaların risk sınıflamasına göre klinik ve laboratuvar özellikleri

Standart risk grubundaki tanı anında beş hastada (%71,4) hepatomegali, dördünde (%57,1) splenomegali vardı. Mediasten genişlemesi saptanmadı. Hastaların hiçbirisinde santral sinir sistemi tutulumu tespit edilmedi.

Protokole göre tanıdaki lökosit sayısı orta-yüksek risk grubuna giren ($\geq 20 \times 10^9/L$) iki hasta (%28,6) vardı. Lösemik hücre yükleri açısından incelendiklerinde; iki hastada (%28,6) $RF < 0,8$, dördünde (%57,1) 0,8-1,2 arasında, bir hastada (%14,3) 1,2 - <1,7 arasındaydı. $RF \geq 1,7$ olan hasta saptanmadı (Tablo 13).

Orta risk grubundaki tanı anında 12 hastada (%75) hepatomegali, 11'inde (%68,8) splenomegali vardı. Mediasten genişlemesi bir hastada (%6,3) saptandı. Hastaların hiçbirisinde santral sinir sistemi tutulumu tespit edilmedi. Laboratuvar bulgularından lökosit sayısı $\geq 20 \times 10^9/L$ olan sekiz hasta (%50) vardı. Lösemik hücre yükü (RF) dört hastada (%25) $RF < 0,8$, üçünde (%18,7) 0,8-1,2 arasında, sekiz hastada (%50) 1,2 - <1,7 arasındaydı. $RF \geq 1,7$ olan bir hasta (%6,3) saptandı (Tablo 13).

Yüksek risk grubundaki 2 hastada (%100) hepatomegali saptandı. Bu gruptaki hastaların hiçbirisinde splenomegali, mediasten genişlemesi ve santral sinir sistemi tutulumu tespit edilmedi. Laboratuvar bulgularından lökosit sayısı $\geq 20 \times 10^9/L$ olan bir hasta (%50) vardı. Lösemik hücre yükü bir hastada (%50) $RF < 0,8$, diğerinde (%50) 0,8-1,2 arasındaydı. RF 1,2-<1,7 ve $\geq 1,7$ olan hasta yoktu (Tablo 13).

Tablo 13. BFM-95 risk sınıflamasına göre hastaların klinik ve laboratuvar bulguları

	Standart risk		Orta risk		Yüksek risk		p
	n	%*	n	%*	n	%*	
SSS tutulumu	-	-	-	-	-	-	-
Mediasten genişlemesi (+)	-	-	1	6,3	-	-	0,7
Hepatomegali (+)	5	71,4	12	75	2	100	0,7
Splenomegali (+)	4	57,1	11	68,8	-	-	0,1
Lökosit							
< $20 \times 10^9/L$	5	71,4	8	50	1	50	0,6
$\geq 20 \times 10^9/L$	2	28,6	8	50	1	50	
RF							
< 0,8	2	28,6	4	25	1	50	0,4
0,8-1,2	4	57,1	3	18,7	1	50	
1,2-<1,7	1	14,3	8	50	-	-	
$\geq 1,7$	-	-	1	6,3	-	-	
Toplam**	7	28	16	64	2	8	

* Her grup içinde kolon yüzdesi, ** Satır toplamı ve yüzdeleri

4.2.3. Hastaların risk sınıflamasına göre tanı anında blastik hücre özellikleri

Tanı aşamasında kemik iliğinden elde edilen mononükleer hücrelerin hasta risk gruplarına göre morfolojik, immünofenotipik ve sitogenetik özellikleri tablo 14'de görülmektedir.

Standart risk grubundaki hastaların morfolojik incelemelerinde tümünün L1 morfolojisinde olduğu görülmektedir. İmmünofenotiplendirmelerinde ikisi (%28,6) Pre-pre-B, beşi (%71,4) pre-B idi. Altısında (%85,7) CALLA (+)'liği saptanırken, myeloid antijen ekspresyonuna rastlanmadı. Flowsitometrik DNA incelemelerinde DNA indeksi <1,0 hasta yoktu, altısında (%85,7) DI 1.0 – 1.15 arasında ve birinde (%14,3) ≥ 1.16 idi. S fazı incelemelerinde hastaların üçünde (%42,9) < 6.8 ve dördünde (%57,1) ≥ 6.8 idi. Sitogenetik çalışmalarında üç hastada (%43) kromozom analizi yapılabildi. Analiz edilen hastaların üçü de (%100) diploid saptandı. Hiperdiploidi ve hipodiploidi saptanmadı. PCR'ye dayalı moleküler analiz çalışmaları t(4:11), t(9:22) ve t(12:21) varlığını saptamaya yönelik olarak iki hastada yapılabildi. Pozitif olguya rastlanmadı (Tablo 14).

Orta risk grubundaki hastaların morfolojik incelemelerinde 12'si (%75) L1, dördü (%25) L2 morfolojisinde idi. İmmünofenotipik incelemelerinde altısı (%37,5) Pre-pre-B, sekizi (%50) pre-B ve ikisi (%12,5) T hücreli idi. 13'ünde (%81,3) CALLA (+)'liği saptanırken, birinde de (%6,3) myeloid antijen pozitifliği gözlemlendi. Flowsitometrik DNA incelemelerinde DNA indeksi <1,0 olan bir hasta (%6,2) vardı. 12'sinde (%75) DI 1.0 -1.15 arasında ve üçünde (%18,8) ≥ 1.16 idi. S fazı hastaların 11'inde (%68,8) < 6.8 ve beşinde (%31,2) ≥ 6.8 idi. Sitogenetik çalışmalarında yedi hastada (%100) kromozom analizi yapılabildi. Analiz edilen hastaların hepsi diploid saptandı. Hiperdiploidi ve hipodiploidi saptanmadı. PCR'ye dayalı moleküler analiz çalışmaları t(4:11), t(9:22) ve t(12:21) varlığını saptamaya yönelik olarak 10 hastada yapılabildi, üç hastada (%30) t(12:21) saptandı (Tablo 14).

Yüksek risk grubundaki hastaların morfolojik incelemelerinde iki hastanın da (%100) L1 olduğu görüldü. İmmünofenotiplendirmelerinde ikisi de (%100) pre-B idi. Pre-pre-B ve T fenotipine rastlanmadı. Bir hastada (%50) CALLA (+)'liği saptanırken, myeloid antijen ekspresyonu ikisinde de (%100) pozitif idi. Flowsitometrik DNA indeksi her ikisinde de 1.0 – 1.15 arasındaydı. S fazları da < 6.8 idi.

Sitogenetik çalışmalarında hiçbirinde de metafaz elde edilememesi nedeniyle kromozom analizi yapılamadı. PCR'ye dayalı moleküler analiz çalışmaları t(4:11), t(9:22) ve t(12:21) varlığını saptamaya yönelik olarak ikisinde de yapılabildi. Birinde (%50) t(4:11) saptandı (Tablo 14).

Tablo 14. BFM-95 risk sınıflamasına göre blastların morfolojik, immünofenotipik, genetik ve hücre siklüsü özellikleri.

	Standart risk		Orta risk		Yüksek risk		p
	n	%*	n	%*	n	%*	
FAB							
L1	7	100	12	75	2	100	0,2
L2	-	-	4	25	-	-	
İmmünofenotip							
Prepre B	2	28,6	6	37,5	-	-	
Pre B	5	71,4	8	50	2	100	0,5
T	-	-	2	12,5	-	-	
CALLA (+)	6	85,7	13	81,3	1	50	0,5
Myeloid Ag (+)	-	-	1	6,3	2	100	<0,001
DNA indeksi							
<1.0	-	-	1	6,2	-	-	
1-1.15	6	85,7	12	75	2	100	0,9
≥1.16	1	14,3	3	18,8	-	-	
DNA indeksi							
< 1,16	6	85,7	13	81,2	2	100	0,8
≥ 1.16	1	14,3	3	18,8	-	-	
Genotip (n:14)							
t(4:11)	-	-	-	-	1	50	
t(9:22)	-	-	-	-	-	-	0,01
t(12:21)	-	-	3	30	-	-	
S fazı							
< 6,8	3	42,9	11	68,8	2	100	0,2
≥ 6,8	4	57,1	5	31,2	-	-	
Toplam**	7	28	16	64	2	8	

* Her grup içinde kolon yüzdesi, ** Satır toplamı ve yüzdeleri

4.2.4. Hastaların BFM-95 risk sınıflamasına göre tedavi yanıtları

Hastaların 8 günlük steroid ve bir kez intratekal metotreksat tedavisine verdikleri yanıt ve remisyon özellikleri risk gruplarına göre değerlendirildiğinde;

Standart risk grubundaki hastaların tümünde (yedi hasta) 8. gündeki blast sayısı <1000/ μ L idi. Tedavinin 33. gününde indüksiyon tedavisine yanıt özellikleri araştırıldığında yine tümünün remisyona girdiği saptandı (Tablo 15).

Orta risk grubundaki hastaların 14'ünde (%87.5) 8. gündeki blast sayısı <1000/ μ L iken ikisinde (%12.5) \geq 1000/ μ L idi. Tedavinin 33. gününde indüksiyon tedavisine yanıt özellikleri araştırıldığında tümünün remisyona girdiği saptandı (Tablo 15).

Yüksek risk grubundaki hastaların birinde (%50) 8. gündeki blast sayısı <1000/ μ L iken diğerinde (%50) \geq 1000/ μ L idi. Tedavinin 33. gününde indüksiyon tedavisine yanıt özellikleri araştırıldığında bir hastanın (%50) remisyona girdiği ve diğer hastanın(%50) henüz remisyonda olmadığı saptandı(Tablo 15).

Risk grupları arasında erken dönem steroid yanıtları arasında fark yok gibi görünse de(p:0,15), 33.gündeki remisyon değerlendirmesinde yüksek riskli hastalarda remisyona girmeme oranları daha yüksek izlendi (p:0,003)

Tablo 15. BFM-95 risk sınıflamasına göre erken dönem tedavi yanıtları

	Standart risk (n:7)		Orta risk (n:16)		Yüksek risk (n:2)		Toplam	p
	n	%*	n	%*	n	%*		
Prednizolona yanıt								
<1000/ μ L	7	100	14	87,5	1	50	22 (88)	0,15
\geq 1000/ μ L	-	-	2	12,5	1	50	3 (12)	
33. gün Ki								
<%5 blast	7	100	16	100	1	50	24 (96)	0,003
\geq %5 blast	-	-	-	-	1	50	1 (4)	
Toplam**	7	28	16	64	2	8	25 (100)	

* Her grup içinde kolon yüzdesi, ** Satır toplamı ve yüzdeleri

4.3.1. Hastaların DNA indekslerine göre demografik özellikleri

Çalışmaya alınan hastalar DNA indekslerine göre değerlendirildiklerinde;

3,5 yaşında bir erkek hastada $DI < 1.0$ idi.

DI 1.0-1.15 olan 20 hastanın 11'i(%55) 1-6 yaş arası, dokuzu (%45) 6 yaş ve üzerinde idi. Bunların 14'ü (%70) erkek, altısı (%30) kız idi.

$DI \geq 1.16$ olan dört hastanın üçü (%75) 1-6 yaş arası, birisi (%25) 6 yaş ve üzerinde olup hepsi erkek idi.

DNA indekslerine göre yaş ve cinsiyet özellikleri karşılaştırıldığında; istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı ($p:0,3$ ve $p:0,5$) (Tablo 16).

Tablo 16. DNA indekslerine göre hastaların bazı özellikleri

	DNA indeksi						Toplam	p
	<1		1-1.15		≥ 1.16			
	n	%*	n	%*	n	%*		
Cinsiyet								
Erkek	1	100	14	70	4	100	19 (76)	0,3
Kız	-	-	6	30	-	-	6 (24)	
Yaş								
< 1	-	-	-	-	-	-	-	
1-6	1	100	11	55	3	75	15 (60)	0,5
≥ 6	-	-	9	45	1	25	10 (40)	
Toplam**	1	4	20	80	4	16	25 (100)	

* Her grup içinde kolon yüzdesi, ** Satır toplamı ve yüzdeleri

4.3.2. Hastaların DNA indekslerine göre klinik ve laboratuvar özellikleri

$DI < 1.0$ hasta 3.5 yaşındaydı. Tanı anında hepatomegali, splenomegali ve mediasten genişlemesi vardı. Santral sinir sistemi tutulumu tespit edilmedi. Laboratuvar bulgularından hemoglobün değeri 9,7 g/dl, hematokrit %28 , trombosit $19 \times 10^9/L$, lökosit sayısı $14,3 \times 10^9/L$ idi. Protokole göre tanıdaki lökosit sayısı iyi risk grubuna giriyordu ($< 20 \times 10^9/L$). Lösemik hücre yükü (RF) 1,49 olarak hesaplandı (Tablo 17).

DI 1.0-1.15 olan hastaların tanı anında 15'inde (%75) hepatomegali, 12'sinde (%60) splenomegali vardı. Mediasten genişlemesi ve santral sinir sistemi tutulumu tespit edilmedi. Sekizinde lökosit sayısı $\geq 20 \times 10^9/L$ (%40) idi. Lösemik hücre yükü (RF)

incelendiğinde; altı hastada (%30) RF<0,8, altısında (%30) 0,8-1,2 arasında ve sekiz hastada (%40) 1,2 - <1,7 arasındaydı. RF≥1,7 olan hasta saptanmadı (Tablo 17).

DI ≥ 1.16 olan hastaların üçünde (%75) hepatomegali, ikisinde (%50) splenomegali saptandı. Hastaların hiçbirisinde, mediasten genişlemesi ve santral sinir sistemi tutulumu tespit edilmedi. Lökosit sayısı üç hastada(%75) ≥20 x10⁹/L idi. Lösemik hücre yükü (RF) incelendiğinde; bir hastada (%25) RF<0,8, ikisinde (%50) 0,8-1,2 arasında ve birinde(%25) ≥1,7 idi (Tablo 17).

Tablo 17. DNA indekslerine göre hastaların klinik ve laboratuvar özellikleri

	DNA indeksi						Toplam	p
	<1		1-1.15		≥1.16			
	n	%*	n	%*	n	%*		
Lökosit								
<20 000	1	100	12	60	1	25	14 (56)	0,3
≥20 000	-	-	8	40	3	75	11 (44)	
SSS tutulumu	-	-	-	-	-	-	-	-
Mediasten genişlemesi	1	100	-	-	-	-	1 (4)	0,000
Splenomegali	1	100	12	60	2	50	15 (60)	0,6
Hepatomegali (RF)	1	100	15	75	3	75	19 (76)	0,8
< 0.8	-	-	6	30	1	25	7 (28)	
0.8-1.2	-	-	6	30	2	50	8 (32)	0,1
1.2-1.7	1	100	8	40	-	-	9 (36)	
≥ 1.7	-	-	-	-	1	25	1 (4)	
Toplam**	1	4	20	80	4	16	25 (100)	

* Her grup içinde kolon yüzdesi, ** Satır toplamı ve yüzdeleri

4.3.3. Hastaların DNA indekslerine göre tanı anında blastik hücre özellikleri

Tanı aşamasında kemik iliğinden elde edilen mononükleer hücrelerin DNA indekslerine göre morfolojik, immünofenotipik ve sitogenetik özellikleri tablo 18'de görülmektedir.

DI <1.0 grubundaki hastanın morfolojik incelemesi L1, immünofenotipi pre-B idi.. CALLA (+)'liği saptanırken, myeloid antijen ekspresyonuna rastlanmadı. Sitogenetik çalışma ve moleküler analiz yapılamadı (Tablo 18).

DI 1-1.15 grubundaki hastaların morfolojik incelemelerinde 17'sinin (%85) L1, üçünün(%15) L2 olduğu görüldü. İmmünofenotiplendirmesinde altısı (%30) Pre-pre-B,

12'si (%60) pre-B, ve ikisi (%10) T hücreli idi. 16'sında (%80) CALLA (+)'liği saptanırken, üçünde de (%15) myeloid antijen pozitifliği gözlemlendi. Sitogenetik çalışmalarında dokuzunda (%45) kromozom analizi yapılabildi. Analiz edilen hastaların hepsi de (%100) diploid saptandı. PCR'ye dayalı moleküler analiz çalışmaları t(4:11), t(9:22) ve t(12:21) varlığını saptamaya yönelik olarak 12 hastada yapılabildi. Bir hastada(%8) t(4:11) ve iki hastada (%16) t(12:21) saptandı (Tablo 18). DI ≥ 1.16 grubundaki hastaların 3'ü (%75) L1, 1'i (%25) L2 morfolojisindeydi.

İmmüfenotiplendirmelerinde ikisinin (%50) Pre-pre-B ve diğer ikisinin (%50) pre-B olduğu bulundu. 3'ünde (%75) CALLA (+)'liği saptanırken, myeloid antijen negatif idi. Sitogenetik çalışmalarında üç hastada (%75) kromozom analizi yapılabildi fakat ikisinde metafaz elde edilemedi, birinde(%33.3) diploid saptandı. PCR'ye dayalı moleküler analiz çalışmaları t(4:11), t(9:22) ve t(12:21) varlığını saptamaya yönelik olarak iki hastada(%50) yapılabildi, birinde (%50) t(12:21) saptandı (Tablo 18).

Tablo 18. DNA indekslerine göre blastik hücrelerin morfolojik, immüfenotipik ve sitogenetik özellikleri

	DNA indeksi						p
	<1		1-1.15		≥ 1.16		
	n	%*	n	%*	n	%*	
FAB							
L1	1	100	17	85	3	75	0,8
L2	-	-	3	15	1	25	
İmmüfenotip							
Prepre B	-	-	6	30	2	50	0,8
Pre B	1	100	12	60	2	50	
T	-	-	2	10	-	-	
Myeloid Ag ekspresyonu							
CALLA (+)	1	100	16	80	3	75	0,8
S fazı							
< 6,8	-	-	14	70	2	50	0,3
$\geq 6,8$	1	100	6	30	2	50	
Genotip (n:14)			(n:12)		(n:2)		
t(4:11)	-	-	1	8	-	-	0,8
t(9:22)	-	-	-	-	-	-	
t(12:21)	-	-	2	16	1	50	
Toplam**	1	4	20	80	4	16	

* Her grup içinde kolon yüzdesi, ** Satır toplamı ve yüzdeleri

4.3.4. Hastaların DNA indekslerine göre tedavi yanıtları

Hastaların 8 günlük steroid ve bir kez intratekal metotreksat tedavisine verdikleri yanıt ve remisyon özellikleri DNA indekslerine göre değerlendirildiğinde;

DI <1.0 grubundaki hastanın 8. gündeki blast sayısı < 1000/ μ L idi. indüksiyon tedavisi sonunda remisyonda olduğu izlendi (Tablo 19).

DI 1-1.15 grubundaki hastaların 17'sinin (%85) 8. gündeki blast sayısı < 1000/ μ L bulundu.. Tedavinin 33. gününde indüksiyon tedavisine yanıt özellikleri araştırıldığında 19'unun(%95) remisyona girdiği saptandı. Remisyona girme hızları incelendiğinde; üç hastanın (%15) 15. günde, 16 hastanın (%80) 33. günde ve bir hastanın da (%5) 45. günde remisyona girdiği saptandı (Tablo 19).

DI \geq 1.16 olan hastaların hepsinin 8. gündeki blast sayısı <1000/ μ L bulundu.. Tedavinin 33. gününde indüksiyon tedavisine yanıt özellikleri araştırıldığında yine tümünün remisyona girdiği saptandı. Remisyona girme zamanları incelendiğinde ikisinin (%50) 15. günde, diğer ikisinin de(%50) 33. günde remisyona girdiği saptandı (Tablo 19).

Tablo 19. Hastaların DNA indekslerine göre erken dönem tedavi yanıtları

	DNA indeksi						Toplam*	p
	<1		1-1.15		\geq 1.16			
	n	%*	n	%*	n	%*		
Prednizolon yanıtı								
< 1000/ μ L	1	100	17	85	4	100	22 (88)	0,6
\geq 1000/ μ L	-	-	3	15	-	-	3 (12)	
Remisyon (n:25)								
15. gün	-	-	3	15	2	50	5 (20)	0,5
33. gün	1	100	16	80	2	50	19 (76)	
45. gün	-	-	1	5	-	-	1 (4)	
33. gün KI								
< %5 blast	1	100	19	95	4	100	25 (96)	0,9
\geq %5 blast	-	-	1	5	-	-	1 (4)	
Toplam**	1	4	20	80	4	16	25 (100)	

*Her grup içinde kolon yüzdesi, ** Satır toplamı ve yüzdeleri

4.4.1. Hastaların S fazı oranlarına göre demografik özellikleri

Çalışmaya alınan hastalar S fazı oranlarına göre değerlendirildiklerinde;

S fazı $\leq 6,8$ olan grupta 12 erkek(%75), dört kız(%25) hasta vardı, bunların 10'u(%62,5) 1-6 yaş grubunda, altısı (%37,5) 6 yaş üzeri grupta idi (Tablo 20).

S fazı $> 6,8$ olan grubun ise yedisi (%77,8) erkek, ikisi (%22,2) kız hasta idi.

Hastaların beşi'i(%55,6) 1-6 yaş arası, dördü (%44,4) 6 yaş ve üzerinde idi (Tablo 20). S fazı oranlarına göre yaş ve cinsiyet özellikleri karşılaştırıldığında; anlamlı farklılık saptanmadı (p:0,7 ve p:0,9).

Tablo 20. S fazı oranlarına göre hastaların bazı özellikleri

	S fazı (% ortalanca)				Toplam	p
	≤ 6.8		> 6.8			
	n	%*	n	%*		
Cinsiyet						
Erkek	12	75	7	77,8	19 (76)	0,9
Kız	4	25	2	22,2	6 (24)	
Yaş						
< 1	-	-	-	-	-	
1-6	10	62,5	5	55,6	15 (60)	0,7
≥ 6	6	37,5	4	44,4	10 (40)	
Toplam**	16	64	9	36	25 (100)	

* Her grup içinde kolon yüzdesi, **Satır toplamı ve yüzdeleri

4.4.2. Hastaların S fazı oranlarına göre klinik ve laboratuvar özellikleri

S fazı $\leq 6,8$ olan grupta tanı anında 13 hastada (%81,3) hepatomegali , dokuzunda (%56,3) splenomegali vardı. Mediasten genişlemesi ve santral sinir sistemi tutulumu tespit edilmedi. Lökosit sayısı dokuz hastada(%56,2) $\geq 20 \times 10^9/L$ idi. Lösemik hücre yükleri incelendiğinde; beş hastada (%31,3) $RF < 0,8$, dördünde (%25) 0,8-1,2 arasında, altı hastada (%37,5) 1,2 - $< 1,7$ arasındaydı. $RF \geq 1,7$ olan bir hasta(%6,3) saptandı (Tablo 21).

S fazı $> 6,8$ olan altı hastada (%66,7) hepatomegali ve splenomegali saptandı. Mediasten genişlemesi bir hastada (%11,1) gözlemlendi. Hastaların hiçbirisinde santral sinir sistemi tutulumu tespit edilmedi. Lökosit sayısı iki hastada (%22,2) $\geq 20 \times 10^9/L$ idi. Lösemik hücre yükleri; iki hastada (%22,2) $RF < 0,8$, dördünde (%44,4) 0,8-1,2 ve

üçünde (%33,3) RF 1,2-<1,7 arasındaydı (Tablo 21). S fazı grupları arasında klinik ve laboratuvar bulgular açısından anlamlı farklılık saptanmadı.

Tablo 21. S fazı oranlarına göre hastaların klinik ve laboratuvar özellikleri

	S fazı (% ortanca)				Toplam*	p
	≤ 6.8		> 6.8			
	n	%*	n	%*		
Lökosit						
<20 x10 ⁹ /L	7	43,8	7	77,8	14 (56)	0,2
≥20 x10 ⁹ /L	9	56,2	2	22,2	11 (44)	
SSS tutulumu	-	-	-	-	-	-
Mediasten genişlemesi	-	-	1	11,1	1 (4)	0,3
Hepatomegali	13	81,3	6	66,7	19(76)	0,6
Splenomegali	9	56,3	6	66,7	15 (60)	0,7
RF						
< 0.8	5	31,3	2	22,2	7 (28)	0,7
0.8-1.2	4	25	4	44,4	8 (32)	
1.2-<1.7	6	37,5	3	33,3	9 (36)	
≥ 1.7	1	6,3	-	-	1 (4)	
Toplam**	16	64	9	36	25 (100)	

* Her grup içinde kolon yüzdesi, ** Satır toplamı ve yüzdeleri

4.4.3. Hastaların S fazı oranlarına göre tanı anında blastik hücre özellikleri

S fazı ≤6,8 grubundaki hastaların morfolojik incelemelerinde 14'ünün (%87,5) L1, ikisinin(%12,5) L2 olduğu görüldü. İmmünofenotipik incelemelerinde yedisi (%43,8) Pre-pre-B, yedisi (%43,8) pre-B ve ikisi(%12,4) T hücreli idi. 13'ünde (%81,2) CALLA (+)'liği saptanırken, üçünde de (%18,8) myeloid antijen pozitifliği gözlemlendi. DNA indeksleri bakımından incelendiklerinde 14 hastada (%87,5) DI:1-1.15 arasında, iki hastada(%12,5) ise ≥1.16 idi. DI <1.0 olan hasta yoktu. Sitogenetik çalışmalarında sekiz hastada(%50) kromozom analizi yapılabildi. Analiz edilen hastaların hepsi de diploid saptandı. PCR'ye dayalı moleküler analiz çalışmaları t(4:11), t(9:22) ve t(12:21) varlığını saptamaya yönelik olarak 11 hastada yapılabildi. Bir hastada(%9) t(4:11) ve iki hastada (%18) t(12:21) saptandı (Tablo 22).

S fazı > 6,8 grubundaki hastaların morfolojik incelemelerinde yedisinin (%77,8) L1, ikisinin(%22,2) L2 olduğu saptandı. İmmünofenotiplendirmelerinde birinin (%11,1)

L2	2	12,5	2	22,2	4 (16)	
İmmünfenotip						
Prepre B	7	43,8	1	11,1	8 (32)	0,08
Pre B	7	43,8	8	88,9	15 (60)	
T	2	12,5	-	-	2 (8)	
CALLA(+)	13	81,2	7	77,8	20 (80)	0,8
Myeloid Ag ekspresyonu	3	18,8	-	-	3 (12)	0,2
DNA indeksi						
<1.0	-	-	1	11,1	1 (4)	
1-1.15	14	87,5	6	66,7	20 (80)	0,3
≥1.16	2	12,5	2	22,2	4 (16)	
Ploidi						
Diploid	8	100	2	100	10 (40)	0,6
Hiperdiploid	-	-	-	-	-	
Hipodiploid	-	-	-	-	-	
Genotip						
t(4:11)	1	9	-	-	1 (7,2)	0,3
t(9:22)	-	-	-	-	-	
t(12:21)	2	18	1	33,3	3 (21,4)	
Toplam**	16	64	9	36	25 (100)	

* Her grup içinde kolon yüzdesi, ** Satır toplamı ve yüzdeleri

4.4.4. Hastaların S fazı oranlarına göre tedavi yanıtları

S fazı $\leq 6,8$ grubundaki hastaların 13'ünün (%81) 8. gündeki blast sayısı $< 1000/\mu\text{L}$ bulundu. Tedavinin 33. gününde indüksiyon tedavisine yanıt özellikleri araştırıldığında 15'inin(%93,8) remisyona girdiği saptandı. Remisyona girme zamanları incelendiğinde beşhastanın (%31,3) 15. günde, 10 hastanın (%62,5) 33. günde ve bir hastanın da (%6,2) 45. günde remisyona girdiği saptandı (Tablo 23).

S fazı $> 6,8$ olan hastaların hepsinin 8. gündeki blast sayısı $< 1000/\mu\text{L}$ bulundu.. Tedavinin 33. gününde indüksiyon tedavisine yanıt özellikleri araştırıldığında dokuzunun da(%100) remisyona girdiği saptandı. Remisyona girme zamanları incelendiğinde tamamının (%100) 33. günde remisyona girdiği saptandı (Tablo 23).

Tablo 23. S fazı oranlarına göre hastaların erken dönem tedavi yanıtları

	S fazı (% ortanca)				Toplam*	p
	≤ 6.8		> 6.8			
	n	%*	n	%*		
Prednizolona yanıt						
< 1000/ μL	13	81	9	100	22 (88)	0,28
$\geq 1000/\mu\text{L}$	3	19	-	-	3 (12)	
Remisyon özelliği						
15. gün	5	31,3	-	-	5 (20)	0,1
33. gün	10	62,5	9	100	19 (76)	
45. gün	1	6,2	-	-	1 (4)	
33. gün Kİ						
< %5 blast	15	93,8	9	100	24 (96)	0,4
\geq %5 blast	1	6,2	-	-	1 (4)	
Toplam**	16	64	9	36	25 (100)	

* Her grup içinde kolon yüzdesi, ** Satır toplamı ve yüzdeleri

4.5. Hastaların hücre siklüsü dağılımları

4.5.1. Blastik hücrelerin immünofenotiplerine göre hücre siklüsü dağılımları

Hastaların immünofenotipik özelliklerine göre hücre siklüsü dağılım oranları median ve min-max değerler olarak Tablo 24'de görülmektedir. İmmünofenotipik özellikler açısından hücre siklüsü dağılım oranlarında farklılık saptanmadı (p:0,6, p:0,4, p:0,5).

Tablo 24. Blastik hücrelerin immünofenotiplerine göre hücre siklus dağılımları

	G0/G1	p	S	p	G2M	p
Toplam	92,4 (44,2-98,8)		5,9 (0,36-5,6)		1,6 (0,01-6,1)	
İmmünofenotip						
Prepre B n:8	93,9 (44,2-98,1)		4,9 (1,8-55,6)		1,1 (0,01-6,1)	
PreB n:15	92,2 (67,6-98,8)	0,6	7,2 (0,3-3,0)	0,4	1,8 (0,01-4,8)	0,5
T n:2	91,1 (89,7-92,5)		6,1 (5,8-6,4)		2,7 (1,6-3,7)	

4.5.2. DNA indekslerine göre hücre siklus dağılımları

Hastaların DNA indekslerine göre hücre siklus dağılım oranları median ve min-max değerler olarak Tablo 25'de görülmektedir. DNA indeksleri açısından hücre siklus dağılım oranlarında farklılık saptanmamıştır (p:0,1, p:0,3, p:0,7)

Tablo 25. DNA indekslerine göre hücre siklus dağılımları

	G0/G1	p	S	p	G2M	p
DNA indeksi						
<1.0 n:1	67,6		30,7		1,5	
1-1.15 n:20	93,0 (44,2-98,8)	0,1	5,6 (0,3-55,6)	0,3	1,6 (0,01-4,8)	0,7
≥1.16 n:4	90,5 (82,8-92,2)		7,0 (5,3-15,1)		2,1 (0,01-6,1)	

4.5.3. FAB sınıflamasına göre hücre siklus dağılımları

Hastaların FAB morfolojik özelliklerine göre hücre siklus dağılım oranları median ve min-max değerler olarak Tablo 26'da görülmektedir. FAB morfolojik özellikleri açısından hücre siklus dağılım oranlarında farklılık saptanmamıştır (p:0,4, p:0,3, p:0,6)

Tablo 26. FAB sınıflamasına göre hücre siklüsü dağılımları

	G0/G1	p	S	p	G2M	p
FAB						
L1	92,5 (44,2-98,8)	0,4	5,5 (0,3-55,6)	0,3	1,6 (0,01-6,1)	0,6
L2	87,9 (82,8-96,4)		8,7 (3,14-15,1)		1,8 (0,43-4,8)	

4.5.4. FAB sınıflamasına göre DNA ploidi dağılımı

DNA ploidiğine göre FAB morfoljik özellikleri karşılaştırıldığında hipodiploid, diploid ve hiperdiploid olgular açısından da farklılık gözlenmemiştir (p:0,8)(Tablo 27).

Tablo 27. DNA Ploidisine göre FAB gruplarının karşılaştırılması

	< 1	1,0	> 1	Toplam
FAB				
L1	1 (100)	14 (82,4)	6 (85,7)	21 (84)
L2	-	3 (17,6)	1 (14,3)	4 (16)
Toplam	1 (4)	17 (68)	7 (28)	28 (100)

p:0,8

4.5.5. FAB ve immünofenotipe göre DNA indeksleri ve anöploidisi

FAB sınıflaması ve immün fenotipik özelliklere göre DNA anöploidisi sıklıkları ve DNA indeks ortancaları karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptanmamıştır (p:0,7 ve p:0,6)(Tablo 28).

Tablo 28. ALL alt tiplerine göre DNA anöploidisi sıklığı ve DNA indeksi dağılımı

	n	DNA anöploidisi (%)	p	DNA indeksi		p
				Median	Range	
FAB						
L1	21	7 (33,3)	0,7	1,0	0,91 - 1,17	0,7
L2	4	1 (25)		1,0	1,0 - 1,71	
İmmünofenotip						
Prepre B	8	3 (37,5)		1,0	1,0 - 1,17	
Pre B	15	5 (33,3)	0,6	1,0	0,91 - 1,71	0,5
T	2	-		1,0	1,0	

4.5.6. DNA indeksi ve karyotipik ploidi karşılaştırması

Hem sitogenetik analiz hem de DNA indeks analizi yapılabilen hastalarda ploidi oranları karşılaştırıldığında iki metot arasında anlamlı farklılık saptanmadı (p:0,3). DNA indeksine göre diploid saptanan 9 hastanın hepsi de, sitogenetik analize göre diploid idi. DNA indeksine göre hiperdiploidi saptanan yalnızca bir hastada ise sitogenetik analizinde diploidi saptandı (Tablo 29).

Tablo 29. DNA indeksi ve karyotipik ploidi

	DNA indeksi				Toplam	p
	< 1.0	1.0	1.01-1.15	≥ 1.16		
Ploidi						
Diploid	-	9 (100)	-	1 (100)	10 (100)	
Hiperdiploid	-	-	-	-	-	0,3
Hipodiploid	-	-	-	-	-	
Toplam	-	9 (90)	-	1 (10)	10 (100)	

4.6. İn vivo prednizolon yanıtlarına göre hastaların değerlendirilmesi

4.6.1 İn vivo prednizolon yanıtlarına göre hastaların yaş, cinsiyet dağılımları

Hastalar 8. günde prednizolon yanıtına göre incelendiğinde;

Erkek hastaların tümünün, kız hastaların %84.2'sinin prednizolona yanıt verdiği, yaş grupları açısından 1-6 yaş olanların %80'inin, ≥ 6 olanların tümünün 8. günde prednizolon yanıtlarının olduğu ve istatistiksel anlamlı farklılık olmadığı bulundu (p:0,2 ve p:0,5)(Tablo 30).

Tablo 30. İn vivo prednizolon yanıtlarına göre hastaların bazı özellikleri.

	Prednizolon yanıtı (8. gün blast / μ L)				Toplam*	p
	< 1000/ μ L		≥ 1000/ μ L			
	n	%*	n	%*		
Yaş						
< 1	-	-	-	-	-	p:0,2
1-6	12	80	3	20	15 (60)	
≥ 6	10	100	-	-	10 (40)	
Cinsiyet						
K	6	100	-	-	6 (24)	p:0,5
E	16	84,2	3	15,8	19 (76)	
Toplam**	22	88	3	12	25 (100)	

* Her grup için kolon yüzdesi, ** Satır yüzdesi

4.6.2. İnvivo prednizolon yanıtlarına göre hastaların klinik ve laboratuvar özellikleri

Hastalar tanıda lökosit sayısı ve lösemik hücre yükü (RF) kriterlerine göre prednizolona verdikleri yanıt açısından karşılaştırıldıklarında anlamlı farklılık saptanmadı (p:0,5, p:0,9 ve p:0,8)(Tablo 31).

Tablo 31. İnvivo prednizolon yanıtlarına göre hastaların klinik ve laboratuvar özellikleri

	Prednizolon yanıtı (8. gün blast / μ L)				Toplam**	p
	< 1000/ μ L		\geq 1000/ μ L			
	n	%*	n	%*		
Lösemik hücre yükü (RF)						
< 0.8	6	85,7	1	14,3	7 (28)	
0.8-1.2	7	87,5	1	12,5	8 (32)	0,9
1.2-<1.7	8	88,9	1	11,1	9 (36)	
\geq 1.7	1	100	-	-	1 (4)	
Lösemik hücre yükü (RF)-2						
< 1,2	13	86,7	2	13,3	15 (60)	0,8
\geq 1,2	9	90	1	10	10 (40)	
Lökosit						
<20 x10 ⁹ /L	13	92,9	1	7,1	14 (56)	0,5
\geq 20 x10 ⁹ /L	9	81,8	2	18,2	11 (44)	
Toplam*	22	88	3	12	25 (100)	

*Satır toplamı ve yüzdeleri, ** Her grup içinde kolon yüzdesi

4.6.3. İnvivo prednizolon yanıtlarına göre blastik hücre özellikleri

Hastalar 8. gündeki prednizolon yanıtları açısından FAB morfolojisi ve immünofenotip özelliklerine göre karşılaştırıldıklarında farklılık göstermediler (p:0,4 ve p:0,8). Fakat myeloid antijen ekspresyonunun prednizolona yanıt vermeyen hastalarda diğerlerine göre belirgin yüksek olduğu görüldü (p:0.02). CALLA ekspresyonu açısından ise belirgin bir farklılık izlenmedi (p:0,09) (Tablo 32).

DNA indeksleri açısından incelendiğinde prednizolona erken dönem yanıtı açısından anlamlı bir farklılık saptanmadı (p:0.6). Aynı şekilde S fazı oranları yönünden de belirgin bir farklılık izlenmedi (p:0.2) (Tablo 32).

Tablo 32. FAB, immüfenotipik ve DNA analizi özelliklerine göre in vivo prednizolon yanıtı.

	Prednizolon yanıtı (8. gün blast / μ L)				Toplam*	p
	< 1000/ μ L		\geq 1000/ μ L			
	n	%*	n	%*		
FAB						
L1	19	90,5	2	9,5	21 (84)	p:0,4
L2	3	75	1	25	4 (16)	
İmmüfenotip						
Prepre B	7	87,5	1	12,5	8 (32)	p:0,8
Pre B	13	86,7	2	13,3	15 (60)	
T	2	100	-	-	2 (8)	
CALLA(+)	19	95	1	5	20 (80)	p:0,09
Myeloid Ag ekspresyonu (+)	1	33,3	2	66,7	3 (12)	p:0,02
DNA indeksi						
<1.0	1	100	-	-	1 (4)	p:0,6
1-1.15	17	85	3	15	20 (80)	
\geq 1.16	4	100	-	-	4 (16)	
DNA indeksi						
<1,16	18	85,7	3	14,3	21 (84)	p:0,5
\geq 1.16	4	100	-	-	4 (16)	
S fazı						
<6,8	13	81,2	3	18,8	16 (64)	p:0,2
\geq 6,8	9	100	-	-	9 (36)	
Toplam*	22	88	3	12	25 (100)	

* Satır yüzdesi, ** Her grup içinde kolon yüzdesi

4.6.4. İn vivo prednizolon yanıtlarına göre indüksiyon tedavisi sonuçları

Hastaların 8. gündeki prednizolon yanıtları ile indüksiyon tedavisi sonrası remisyona durumları karşılaştırıldığında 8. günde blast oranı yüksek üç hastadan(%12) ikisinin 33. günde, diğerinin 45. günde remisyona girdiği izlendi.

Hastaların tamamı remisyona girdiğinden bu açıdan farklılık saptanmasa da remisyona giriş zamanları açısından farklılık saptandı. Erken prednizolon yanıtı olanların daha erken dönemde remisyona girdikleri izlendi (p:0,01).

Tablo 33. İn vivo prednizolon yanıtına göre indüksiyon tedavisi sonuçları.

	Prednizolon yanıtı (8. gün blast / μ L)				Toplam**	p
	< 1000/ μ L		\geq 1000/ μ L			
	n	%*	n	%*		
Remisyon						
15. gün	5	22,7	-	-	5 (20)	
33. gün	17	77,3	2	66,7	19 (76)	p:0,01
45. gün	-	-	1	33,3	1 (4)	
Toplam	22	88	3	12	25 (100)	

* Satır yüzdesi, ** Kolon yüzdesi

4.7. NCI/CTEP risk sınıflamasına göre hastaların değerlendirilmesi

Hastalar BFM-95 protokolü dışında, NCI/CTEP kriterlerine göre de risk gruplarına ayrılıp bazı özellikleri açısından karşılaştırıldı.

4.7.1. Hastaların NCI/CTEP kriterlerine göre yapılmış risk sınıflaması

NCI/CTEP bildirisinde 1-9 yaş ve lökosit sayısı $50 \times 10^9/L$ sınırları baz alınarak yapılan risk sınıflamasına göre 13 hasta(%52) düşük riskli ve 12 hasta (%48) yüksek riskli gruba girdi(Tablo 34).

Tablo 34. Hastaların NCI/CTEP risk sınıflamasına göre dağılımı

Risk grubu	n	%
Düşük	13	52
Yüksek	12	48

4.7.2. Hastaların risk sınıflamasına göre demografik özellikleri

Çalışmaya alınan hastalar NCI/CTEP risk gruplarına göre değerlendirildiklerinde; düşük risk grubundaki hastaların 13'ü (%100) 1-9 yaş arası hastalardı. Bunların sekizi (%61,5) erkek, beşi (%38,5) kız idi.

Yüksek risk grubundaki hastaların beşi (%41,7) 1-9 yaş arasında, yedisi (%58,3) ise ≥ 10 yaş üzeri gruptaydı. Bu hastaların 11'i (%91,7) erkek, 1'i (%8,3) kız idi.

Risk gruplarına göre yaş ve cinsiyet özellikleri karşılaştırıldığında; yaş gruplarının dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenirken (p:0,002), cinsiyet açısından değerlendirildiğinde istatistiksel farklılık saptanmadı (p:0,1) (Tablo 35).

Tablo 35. NCI/CTEP risk sınıflamasına göre hastaların bazı özellikleri

	Düşük risk		Yüksek risk		Toplam		p
	n	%*	n	%*	n	%*	
Cinsiyet							
Kız	5	38,5	1	8,3	6	24	0,1
Erkek	8	61,5	11	91,7	19	76	
Yaş							
< 1	-	-	-	-	-	-	
1-9	13	100	5	41,7	18	72	0,002
≥ 10	-	-	7	58,3	7	28	
Toplam**	13	52	12	48	25	100	

* Her grup içinde kolon yüzdesi, ** Satır toplamı ve yüzdeleri

4.7.3. Hastaların NCI/CTEP risk sınıflamasına göre klinik ve laboratuvar özellikleri

Düşük risk grubundaki tanı anında 10 hastada (%76,9) hepatomegali, sekizinde (%61,5) splenomegali vardı. Bir hastada (%7,7) mediasten genişlemesi saptandı. Hastaların hiçbirisinde santral sinir sistemi tutulumu tespit edilmedi.

Lösemik hücre yükleri açısından incelendiklerinde; dört hastada (%30,8) RF<0,8, beşinde (%38,5) 0,8-1,2 arasında, üç hastada (%23,1) 1,2 - <1,7 arasındaydı. RF≥1,7 olan bir hasta (%7,6) saptandı (Tablo 36).

Yüksek risk grubunda tanı anında dokuz hastada (%75) hepatomegali, yedisinde (%58,3) splenomegali vardı. Mediasten genişlemesi ve santral sinir sistemi tutulumu tespit edilmedi. Laboratuvar bulgularından lökosit sayısı <50 x10⁹/L olan altı hasta (%50) vardı. Lösemik hücre yükü (RF) üç hastada (%25) RF<0,8, üçünde (%25) 0,8-1,2 arasında ve altı hastada (%50) 1,2 - <1,7 arasındaydı (Tablo 36).

Tablo 36. NCI/CTEP risk sınıflamasına göre hastaların klinik ve laboratuvar bulguları

	Düşük risk		Yüksek risk		Toplam*	p
	n	%*	n	%*		
SSS tutulumu	-	-	-	-	-	-
Mediasten genişlemesi (+)	1	7,7	-	-	1 (4)	0,3
Hepatomegali (+)	10	76,9	9	75	19 (76)	0,9
Splenomegali (+)	8	61,5	7	58,3	15 (60)	0,9
Lökosit						
<50 x10 ⁹ /L	13	100	6	50	19 (76)	0,005
≥50 x10 ⁹ /L	-	-	6	50	6 (24)	
RF						
< 0.8	4	30,8	3	25	7 (28)	0,4
0.8-1.2	5	38,5	3	25	8 (32)	
1.2-<1.7	3	23,1	6	50	9 (36)	
≥ 1.7	1	7,6	-	-	1 (4)	
Toplam**	13	52	12	48		

* Her grup içinde kolon yüzdesi, ** Satır toplamı ve yüzdeleri

4.7.4. Hastaların NCI/CTEP risk sınıflamasına göre tanı anında blastik hücre özellikleri

Düşük risk grubundaki hastaların morfolojik incelemelerinde 12'sinde (%92,3) blastların L1, birinde (%7,7) L2 morfolojisinde olduğu görüldü. İmmünofenotiplendirmelerinde altı hasta (%46,2) Pre-pre-B,yedisi (%53,8) pre-B idi. 10 hastada (%77) CALLA (+)'liği saptanırken, myeloid antijen ekspresyonu iki hastada(%15,4) pozitif idi.

Flow sitometrik DNA incelemelerinde bir hastada (%7,7) DNA indeksi <1,0 saptandı, dokuzunda (%69,2) DI 1.0 – 1.15 arasında ve üç hastada (%23,1) ≥1.16 idi. S fazı incelemelerinde hastaların sekizinde (%61,8) < 6.8 ve beşinde (%38,5) ≥6.8 bulundu. Sitogenetik çalışmalarında 10 hastada (%77) kromozom analizi yapılabildi fakat

beşinde (%38.5) metafaz elde edilebildi ve hepsi de (%100) diploid olarak değerlendirildi. Hiperdiploidi ve hipodiploidi saptanmadı. PCR'ye dayalı moleküler analiz çalışmaları t(4:11), t(9:22) ve t(12:21) varlığını saptamaya yönelik olarak 7 hastada yapılabildi. Bunların birinde(%14,2) t(4:11) ve ikisinde ise t(12:21) (%24,4) saptandı (Tablo 37).

Yüksek risk grubundaki hastaların morfolojik incelemelerinde 9'u (%75) L1, 3'ü(%25) L2 morfolojisinde idi.

İmmüfenotipik incelemelerinde 2'si (%16,7) Pre-pre-B, 8'i (%66,6) pre-B ve 2'si (%16,7) T idi. 10'unda (%81.3) CALLA (+)'liği saptanırken, 1'inde de (%8,3) myeloid antijen pozitifliği gözlemlendi.

Flow sitometrik DNA incelemelerinde DNA indeksi <1,0 olan hasta yoktu. 11 hastada (%91,7) DI 1.0 – 1.15 arasında ve bir hastada (%8,3) ≥1.16 idi. S fazı incelemelerinde hastaların 8'inde (%66,7) < 6.8 ve 4'ünde (%33,3) ≥6.8 idi. Sitogenetik çalışmalarında 11 hastada (%91,6) kromozom analizi yapılabildi fakat beşinde (%41.6) metafaz elde edilebildi. Analiz edilebilen hastaların hepsi diploid saptandı. Hiperdiploidi ve hipodiploidi saptanmadı. PCR'ye dayalı moleküler analiz çalışmaları t(4:11), t(9:22) ve t(12:21) varlığını saptamaya yönelik olarak 7 hastada yapılabildi, 1 hastada(%14,2) t(12:21) saptandı (Tablo 37, tablo 38).

Tablo 37. NCI/CTEP risk sınıflamasına göre blastik hücrelerin morfolojik, immüfenotipik özellikleri.

	Düşük risk		Yüksek risk		Toplam	p
	n	%*	n	%*		
FAB						
L1	12	92,3	9	75	21 (84)	0,3
L2	1	7,7	3	25	4 (16)	
İmmüfenotip						
Prepre B	6	46,2	2	16,7	8 (32)	
Pre B	7	53,8	8	66,6	15 (60)	0,1
T	-	-	2	16,7	2 (8)	
CALLA (+)	10	77	10	83,3	20 (80)	0,7
Myeloid Ag (+)	2	15,4	1	8,3	3 (12)	0,6
Toplam**	13	52	12	48	25 (100)	

* Her grup içinde kolon yüzdesi, ** Satır toplamı ve yüzdesi

Tablo 38. NCI/CTEP risk sınıflamasına göre blastik hücrelerin genetik ve hücre siklusü özellikleri.

	Düşük risk		Yüksek risk		Toplam	p
	n	%*	n	%*		
DNA indeksi						
<1.0	1	7,7	-	-	1 (4)	0,3
1-1.15	9	69,2	11	91,7	20 (80)	
≥1.16	3	23,1	1	8,3	4 (16)	
DNA indeksi						
< 1,16	10	77	11	91,7	21 (84)	0,6
≥ 1.16	3	23	1	8,3	4 (16)	
Genotip						
Negatif	4	57,2	6	85,8	10 (71,4)	0,6
t(4:11)	1	14,3	-	-	1 (7,1)	
t(9:22)	-	-	-	-	-	
t(12:21)	2	28,6	1	14,2	3 (21,5)	
S fazı						
< 6,8	8	61,5	8	66,7	16 (64)	0,8
≥ 6,8	5	38,5	4	33,3	9 (36)	
Toplam**	13	52	12	48	25 (100)	

* Her grup içinde kolon yüzdesi, ** Satır toplamı ve yüzdeleri

4.7.5. Hastaların NCI/CTEP risk sınıflamasına göre tedavi yanıtları

Hastaların 8 günlük steroid ve bir kez intratekal metotreksat tedavisine verdikleri yanıt ve remisyon özellikleri risk gruplarına göre değerlendirildiğinde;

Düşük risk grubundaki hastaların 12'sinde (%92,3) 8. gündeki blast sayısı < 1000/ μ L idi. Tedavinin 33. gününde indüksiyon tedavisine yanıt özellikleri araştırıldığında ise tümünün remisyona girdiği saptandı. Remisyona girme hızları incelendiğinde üç hastanın (%23) 15. günde, 10 hastanın (%77) ise 33. gün remisyona girdiği görüldü (Tablo 39).

Yüksek risk grubundaki hastaların 10'unda (%83,3) 8. gündeki blast sayısı < 1000/ μ L iken ikisinde (%16,7) \geq 1000/ μ L idi. Tedavinin 33. gününde indüksiyon tedavisine yanıt özellikleri araştırıldığında 11 hastanın (%91,7) remisyona girdiği saptandı. İki

hastanın (%16.7) 15. gün, dokuz hastanın (%75) 33. gün ve bir hastanın (%8.3) ise 45 günde remisyona girdiği görüldü (Tablo 39).

NCI/CTEP risk grupları arasında erken dönem steroid yanıtları, 33. gündeki remisyon oranları ve remisyona girme hızları arasında istatistiksel olarak fark saptanmasa da (p:0,6, p:0,5 ve p:0,5) düşük risk grubunda daha yüksek oranlar dikkati çekmektedir.

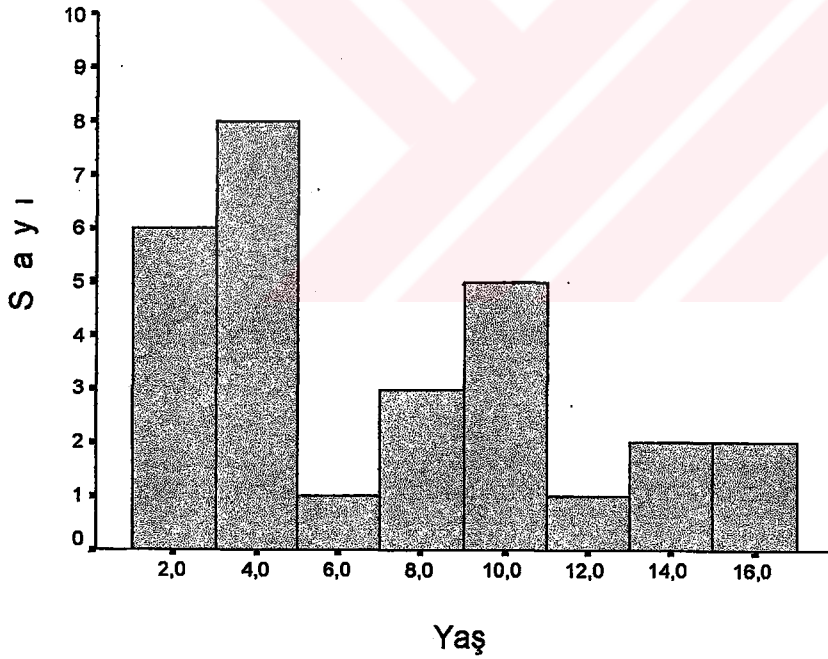
Tablo 39. NCI/CTEP risk sınıflamasına göre erken dönem tedavi yanıtları

	Düşük risk		Yüksek risk		Toplam*	p
	n	%*	n	%*		
Prednizolona yanıt						
< 1000/ μ L	12	92,3	10	83,3	22 (88)	0,6
\geq 1000/ μ L	1	7,7	2	16,7	3 (12)	
Remisyon						
15.gün	3	23	2	16,7	5 (20)	
33.gün	10	77	9	75	19 (76)	0,5
>33.gün	-	-	1	8,3	1 (4)	
33. gün KI						
< %5 blast	13	100	11	91,7	24 (96)	0,5
\geq %5 blast	-	-	1	8,3	1 (4)	
Toplam**	13	52	12	48	25 (100)	

* Her grup içinde kolon yüzdesi, ** Satır toplamı ve yüzdeleri

5. TARTIŞMA

Lösemiler ABD'de tüm kanserlerin %2.5'ini ve kanserden ölüm nedenlerinin de %3.5'ini oluşturmaktadır (1). Çocukluk çağı kanserleri içinde lösemiler, gelişmiş ülkelerde olduğu gibi Türkiye'de de ilk sırayı almaktadır. Amerika ve Avrupa ülkelerinde çocukluk çağı kanserleri arasında lösemilerin görülme sıklığı %34, ülkemizde de beş pediyatrik onkoloji merkezinden (Hacettepe, Cerrahpaşa, Ege, İstanbul, Ankara Tıp Fakülteleri) elde edilen verilere göre %32 olarak bildirilmiştir (210). Lösemi insidansının 1920-1960 arasında hızlı bir artış gösterdiği bu yıllardan sonra ise nispeten daha stabil bir seyir gösterdiği bildirilmektedir (34). 15 yaş altındaki lösemi olgularında pik insidansın 3-4 yaşları arasında olduğu ve cinsiyet dağılımı açısından erkeklerde kızlara oranla daha fazla (1.2:1) görüldüğü bildirilmektedir (27,28). Bu çalışmada erkek hastaların fazlalığı daha belirgin bir şekilde dikkati çekmektedir (3.2:1). Yaş dağılımlarına bakıldığında 1-6 yaş grubunun daha yüksek oranda olduğu (1.5:1) gözlemlendi (Şekil 2).



Şekil 2. Hasta grubunun tanıdaki yaşlarına göre dağılımı.

Bugüne kadar yapılmış birçok çalışmada yaş ve cinsiyetin (kız) çocukluk çağı lösemisinin prognozunu etkileyen önemli faktörler olduğu gösterilmiştir. Çalışma grupları arasında prognostik kriter olarak yaş gruplarının tanımlanmasında farklılıkların olmasına

karşın düşük risk için yaşın 1-9 (10) veya 1-6 arasında olması gerektiği kabul edilmektedir. Bu çalışmada hastaların tümünde ALL BFM 95 kemoterapi protokolü uygulandığından sadece yaş göz önüne alındığında hastaların %60'ı standart-orta riskli grupta olmaktadır. Yüksek risk kriterlerinden birisi olarak 1 yaşın altında olan hastamız yoktu. Ayrıca kız hastaların erkeklere oranla literatürde belirtilenden daha düşük oranda oldukları saptandı. Hasta sayısının az ve takip süresinin kısa olması nedeniyle yaş ve cinsiyetin prognostik etkileri değerlendirilemedi.

Bununla birlikte literatürde kızlarda prognozun daha iyi olduğunu gösteren birçok çalışma vardır. Sather ve arkadaşları 1981'deki çalışmalarında erkek ALL hastalarında klinik gidişin daha kötü seyrettiğini bildirmişlerdir (211). Daha yakın zamanda Lanning ve arkadaşlarının 1992'de Kuzey Avrupa ülkelerini kapsayan çalışmasında tanıda lökosit sayısı yüksek hastalarda cinsiyet faktörünü değerlendirdiklerinde erkeklerde prognozun daha kötü seyrettiğini göstermişlerdir (212). Benzer şekilde CCG dahilinde Tubergen ve arkadaşlarının 1993'de standart riskli hastalarda ve Gaynon ve arkadaşlarının da yüksek riskli hastalarda yaptıkları çalışmalarda klinik gidişin kızlarda daha iyi seyrettiği gösterilmiştir (213, 214). 1992'de SJCRH 'de Pui ve arkadaşlarının çalışmasında da cinsiyet açısından aynı sonuçlar bildirilmiştir (215). Bunların yanısıra 1991'de SJCRH'den Rivera, Alman BFM grubu ve DFCI'den Niemeyer ve arkadaşlarının çalışmalarında yeni, yoğun kemoterapi protokollerinin, geç intensifikasyon tedavilerinin ve örneğin antrasiklinler gibi ilaçların da kullanımı ile cinsiyetin prognoza olan etkisinin kalktığı gösterilmiştir (117,166, 216).

Risk sınıflaması yapılırken yaş ve cinsiyet gibi en basit ve geçerli kriterlerden birisi de lökosit sayısıdır. Hastalarımıza uygulanan ALL BFM-95 tedavi protokolünde lökosit sayısı $20 \times 10^9/L$ kriter alınmaktadır. Hastalarımızın %56'sında lökosit sayısı $20 \times 10^9/L$ 'nin altındadır. Yaş ve lökosit sayısını birlikte değerlendirildiğinde olguların %28'i standart-orta riskli gruba girmektedir. Bu oran ABD kaynaklı verilerle karşılaştırıldığında daha düşük oranda kalmaktadır (10). Bununla birlikte risk sınıflamasındaki diğer kriterler (prednizolona yanıt, indüksiyon tedavisi sonrası remisyon durumları ve sitogenetik özellikler) gözönüne alındığında ise hastaların tedavi edildikleri merkezlerde yapılan sınıflamaya göre %8'i yüksek riskli, %64'ü orta riskli ve %28'i standart (iyi) riskli gruba dahil edilmiştir. Fakat risk sınıflaması yapılırken merkezler arasında bazı farklılıkların da

olduğu ve protokole göre tanıda lökosit sayısı yüksek olan iki hastanın erken dönem steroid yanıtları göz önüne alınarak orta risk yerine standart risk grubuna alındıkları saptandı. Bu durumda standart risk grubu hastaların oranı %20 ve orta risk grubu ise %72 olacaktır.

Yaş sınırlarının belirlenmesinde olduğu gibi prognostik önemi olan lökosit sayısı sınırlarının belirlenmesinde de değişiklikler vardır. BFM grubu $20 \times 10^9/L$ üzerini yüksek risk kriteri olarak belirlerken, ABD'deki lösemi tedavi merkezleri (CCG, DFCl, POG ve SJCRH) $50 \times 10^9/L$ lökosit sayısını sınır kabul etmektedir ve bu kriterlere göre yalnızca yaş ve lökosit sayısı birlikte değerlendirildiğinde prekürsör B hücreli ALL hastalarının %60-70'i düşük riskli gruba girmektedir (10). Sınıflamayı NCI/CTEP'in yukarıdaki kriterlerine göre yapacak olursak hastalarımızın %52'si düşük risk, %48'i yüksek riskli gruba girmektedir.

Bu çalışmada yaş grupları arasında lökosit sayısı, immünfenotipik, sitogenetik ve moleküler genetik özellikler açısından farklılık saptanmazken, T ve pre-pre-B hücreli ALL hastalarında lökosit sayılarının daha yüksek olduğu saptandı(p:0.01). Yaş ve lökosit sayısının prognostik önemleri bunların spesifik genetik anomalilerle birlikteliğine bağlanmaya çalışılmış ve 1 yaş altında MLL rearanjmanlarının sık görüldüğü, bcr/abl füzyonlarının ise büyük çocuklarda görüldüğü ve yüksek lökosit sayısıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir (16,27,217,218).

Literatürde lökosit sayısıyla ve organ tutulumuyla ilişkili olarak Alman BFM grubunun kullandığı lösemik hücre yükünün de prognozdeki etkisini gösteren çalışmalar vardır (166). Bu çalışmalarda risk faktörünün 0.8'in üzerinde olan hastalarda prognoz daha kötü seyrettiği belirtilmiştir. Bu değer baz olarak alındığında hastaların %28'inde RF iyi risk olarak öngörülen 0.8 değerinin altında bulundu. Bu oran Reiter ve arkadaşlarının çok merkezli BFM grubu sonuçlarını bildiren çalışmasındaki oranlarla(%30) benzerlik göstermektedir (166). Çalışmamızda uzun süreli sağkalım üzerine etkisi değerlendirilememiş olsa da erken dönem tedavi yanıtına etkisinin olmadığı saptandı. BFM grubunun yukarıdaki çalışmasında iyi klinik seyirle ilişkili faktörler olarak 1-5 yaş, lösemik hücre yükünün 0.8'in, lökosit sayısının $20 \times 10^9/L$ 'nin altında olması ve DNA indeksinin ≥ 1.16 olması gösterilmiştir (166).

Prognoza etkisi bilinen bir diğer özellik de blastik hücrelerin yüzey antijen ekspresyonlarına göre yapılan immünofenotipik sınıflamadır. Çalışmamızda pre-preB hastalar %32, preB %68 ve T hücreliler %8 oranında bulundu. Literatürde ise; ABD'de SJCRH'da 1993-96 arasında 200 yeni çocukluk ALL olgusunda yapılan çalışmada olguların %57'sinin pre-pre B, %22'sinin preB, %4'ünün transisyonel pre B, %2'sinin olgun B ve %15'inin T hücre immünofenotipik özelliklerini taşıdığı bildirilmiştir (44).

Diğer immünofenotipik özelliklerden CD10(CALLA) ekspresyonunun da önemi giderek azalmasına karşın iyi prognostik özelliklerden olduğu ifade edilmektedir. bizim hastalarımızda CD 10 ekspresyonu %80 oranında saptandı.

Lenfoblastlar üzerinde myeloid antijen ekspresyonlarının da olabileceği bilinmektedir. Bizim olgularımızda da literatürde belirtilen sınırlarda %12 oranında myeloid antijen ekspresyonuna rastlandı. Çalışmalarda myeloid antijen aberan ekspresyonu %6-22 gibi oranlarda bildirilmektedir. Bunların bazılarında myeloid antijen ekspresyonunun prognozu kötüleştirdiği bildirilmiş olsa da diğerlerinde riske yönelik tedavi programı ile etkisinin kaybolduğu belirtilmektedir (55,58,59,219,220).

Çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemilerinde B öncül hücreli alt grubunda prognoza etkisi iyi bilinen ve bu çalışmanın da temelini oluşturan nokta blastik hücrelerin flowsitometrik DNA indeksleri yani ploidleridir. Tedaviye yanıt ve prognoz ile lösemik hücrelerin plöidisi arasında kuvvetli bir ilişki olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (21,22,24,66,229). Kromozom sayısı 50'nin üzerinde (veya DNA indeksi ≥ 1.16) olan çocukluk ALL'lerinde (tetraploid vakalar:82-94 kromozom hariç) iyi prognozla ilişkisinin yanı sıra, hipodiploidinin de(<46 kromozom veya DNA indeksi <1.0) kötü prognozla ilişkisi bilinmektedir (22,72,222,223).

Çalışmamızda DNA indeksi ≥ 1.16 olan hastalar %16 bulundu. Hipodiploid hasta oranı %4 idi. DNA indeksi 1.0-1.15 olanlar ise %80 oranındaydı. Diploid hasta oranı (DNA indeksi:1.0) ise %68 idi. Hastaların takip süreleri kısa olduğu ve halen bir kısmı indüksiyon ve konsolidasyon safhasında oldukları için sağkalım oranları karşılaştırılmamış, erken dönem tedavi yanıtları açısından değerlendirilmiştir. DNA indekslerine göre hastalar arasında 8. gün prednizolon yanıtları(p:0.6), remisyona girme zamanları (p:0.5) ve 33. gündeki remisyon oranları (p:0.9) açısından istatistiksel farklılık saptanmamıştır. Bununla birlikte DNA indeksi ≥ 1.16 olan 4 hastanın tamamının

prednizolona yanıt verdikleri gözlenirken, DNA indeksi 1.0-1.15 arasında olan hastaların %85'inde prednizolona yanıt saptanmıştır. Hipodiploidisi olan bir hastanın da prednizolon yanıtının olduğu görülmüştür.

DNA indeksi konusunda yapılan en geniş katılımlı çalışma Trueworthy ve arkadaşlarının, POG grubu dahilinde 61 merkezin katılımıyla 1986-90 arasında 1535 hastayı içeren çalışmalarıdır (21). Çalışmalarında 1204 hastada flow sitometrik DNA analizi yapılabilmiş ve bunların da 1192'sinde (%99) sonuç alınabilmıştır. Bu hastaların %20'sinde DNA indeksinin 1.16'dan yüksek ve yaşlarının da 1'in üzerinde olduğu ve antimetabolit tedavi ile prognozlarının çok iyi olduğu(4 yıllık EFS %90) bildirilmiştir. Ayrıca DNA indeksi 1.16'dan düşük hastalar için yaş ve beyaz küre sayısının da eklenmesiyle orta ve yüksek riskli hastaların gruplandırılmasının yapılabildiği, diğer klinik ve biyolojik özelliklerin risk sınıflamasına etkilerinin olmadığını göstermişlerdir. Bu çalışmanın en önemli sonucu DNA indeksinin hastanın yaşı ve başlangıçtaki lökosit sayısı ile kombine edilerek riske yönelik tedavi planlamalarında pratik kullanılabilir ve relatif olarak ucuz bir yaklaşım getirmesidir. Bu kriterlere göre kendi çalışmalarında düşük riskli grup (DNA indeksi >1.16) %20, orta riskli grup (DNA indeksi ≤ 1.16 , yaş ≤ 11 ve lökosit $\leq 50 \times 10^9/L$) hastaların %53'ünü ve yüksek riskli grup (DNA indeksi ≤ 1.16 , yaş ≥ 11 ve/veya lökosit $\geq 50 \times 10^9/L$) hastaların %27'sini oluşturmuştur.

Bu konuda yapılmış ikinci en geniş katılımlı çalışma ise 1985'de Look ve arkadaşlarının 1985'deki çalışmasıdır. 205 çocukluk ALL olgusunu içeren çalışmalarında hipodiploidi %1.95, hiperdiploidi (DNA indeksi >1.0) %34.6, diploid-psödodiploid ise %63.5 bulunmuştur. Bu çalışmada iyi prognoz göstergesi olarak DNA indeksi ≥ 1.16 değerinin bulunmasının yanısıra DNA indeksinin prognostik öneminin lökosit sayısı $\leq 25 \times 10^9/L$ olan hastalarda en belirgin olduğu vurgulanmıştır. Lökosit sayısı $>25 \times 10^9/L$ olan hasta grubunda DNA indeksi ≥ 1.16 ile 1.0-1.15 olanlar arasında belirgin bir fark gözlenmediği belirtilmiştir (76).

Tsurusawa ve arkadaşlarının 1988'de 74 çocuk ALL hastasında yaptıkları çalışmada hiperdiploidi (DI >1.0) %36.1 oranında saptanmış ve DNA indeksinin median 1,21 (1.04-1.82) olduğu bildirilmiştir. Çalışmalarında, hasta sayısının azlığı nedeniyle prognostik önemi açısından DNA indeksi 1.0 ile >1.0 olgular karşılaştırılmış ve yaş-beyaz küre

sayısına göre standart ve yüksek riskli gruplar için ayrı ayrı değerlendirildiğinde olaysız sağkalım oranlarının $DI > 1.0$ olanlarda belirgin şekilde yüksek olduğu gösterilmiştir (224). Bunun yanısıra literatürdeki diğer bazı çalışmalarda farklı sonuçlar da bildirilmiştir; örneğin Buchner ve arkadaşları yaş ve beyaz küre sayısına göre düşük riskli grupta yer alan hastalarda DNA anöploidisinin istatistiksel olarak öneminin olmadığı göstermişlerdir (225). Tedavi protokollerindeki farklılıklar, ırk, örnek büyüklüğü, risk sınıflaması ve istatistiksel metotlardaki farklılıkların buna yol açabileceği belirtilmektedir.

Türkiye’de Patıroğlu’nun yaptığı çalışmada, flow sitometrik DNA indeksi ile hastalarda %33.3 anöploidi, %16.6 hipodiploidi ve %16.6 hiperdiploidi saptanmıştır (226).

Çocukluk ALL’lerinde hastalar anöploidi yönünden değerlendirildiklerinde klasik sitogenetik tetkikler ile anöploidi sıklığı %35-89 arasında değişmektedir (76,100, 227,228). Çalışmamızda hem flow sitometrik DNA indeksine göre hem de sitogenetik analiz yapılabilen (10 olgu, %40) hastaların bulgularına göre anöploidi sıklığı sırasıyla %10 ve %0 oranlarında saptanmıştır, fakat iki değer arasındaki farklılık istatistiksel öneme ulaşmamıştır. Tüm hastalar genelinde ise DNA indeksine göre anöploidi sıklığı %32’dir. DNA indeksine göre saptanan anöploidi sıklığımız sitogenetik bulgulara kıyasla literatür verilerine daha yakındır. Bununla birlikte sitogenetik analiz yapılabilen olgularda incelenen metafaz alanlarının, hiçbir hastada 20’nin üzerinde olmadığını bir kez daha vurgulamak gerekir. Buradaki farklılığın nedeni yetersiz metafaz elde edilmesi nedeniyle optimum kalitede sitogenetik inceleme yapılamaması olabilir. Çünkü “International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN)” kriterlerine göre klonal bir anomali varlığını gösterebilmek için en azından 20 veya daha fazla hücrenin tam olarak analiz edilmesi ve saptanabilir klonal bir anomalisi olan hastalarda sekonder değişiklikleri ekarte edebilmek için de en azından 10 metafaz alanının incelenmesi gerektiği belirtilmektedir (229). Sonuçta uygulanan konvansiyonel sitogenetik yöntemin buradaki kromozomal anomalileri saptamadaki başarısızlığın çok yüksek olduğu ve flow sitometrik DNA indeksinin uygulanmasındaki gereklilik açıkça görülmektedir. Sitogenetiğin kanser hastalarındaki yeri konusunda çok çalışma vardır. Bunlarda hastalık çeşidine göre kromozomal analiz başarısı ve kromozomal anomali insidansı farklı oranlarda bildirilmektedir. Örneğin Grimwade ve arkadaşlarının 1938 AML’li hastada %83 oranında başarılı sitogenetik çalışma oranları bildirilirken (230), Olah ve

arkadaşlarının çalışmasında 1993-1995 arasında 187 ALL hastasının 140'ına (%75) kromozom analizi yapıp, 78 hastada (%55.7) başarılı olduğu bildirilmektedir. Onların çalışmalarında anormal karyotip %46.1 (36 hasta), hiperdiploidi % 16,6 (13 hastada) saptanırken, flow sitometri ile %22.5 (31 hasta) 1,16'nın üzerinde hiperdiploidi saptandığı bildirilmekte ve daha yüksek oranın gözlenmesi nedeniyle iki metodun aynı anda kullanımının önemine dikkat çekilmektedir (231). Literatürde anöploidi ile blastik hücre morfolojisi arasında ilişki olduğunu bildiren çalışmalar vardır. Çalışmamızda ise FAB alt grupları arasında anöploidi sıklığı açısından farklılık saptanmadı (L1 grubunda anöploidi sıklığı %33,7, L2 grubunda ise %25) (p:0.6). Borgstrom ve arkadaşları 35 hastayı içeren çalışmasında hastaların %83'ünün L2, %3'ünün L1 ve %14'ünün L3 morfolojisinde olduğunu ve L2 morfolojisinde hastalarda %42 oranında anöploidi saptadıklarını belirtmişlerdir (228). Suarez ve arkadaşları 111 çocukluk çağı ALL hastasında FAB morfolojisi ile hücre siklüsü özelliklerini araştırdıklarında; L2 morfolojisindeki blastlarda anöploidi sıklığını L1 olanlara göre belirgin yüksek bulmuşlardır (%71'e karşı %34) (100).

Hiperdiploidinin çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemilerinde iyi klinik gidişle ilişkili diğer klinik ve biyolojik faktörlerle birlikteliği bilinmesine rağmen prognoz üzerine bağımsız etkisinin olduğu açıkça gösterilmiştir (232). Ayrıca kötü prognozla ilişkili olan translokasyonlar da dahil olmak üzere yapısal kromozomal anomalilerin hiperdiploidisi olan hastalarda daha az olduğu bildirilmektedir (71). Çalışmamızda flow sitometrik DNA indekslerine göre hastaların blastik morfoloji, immünofenotip, sitogenetik ve moleküler genetik özellikleri (t(4:11), t(9:22), t(12:21) açısından) farklılık saptanmamıştır (p:0.8, p:0.8 ve p:0.8). Ayrıca hastaların risk sınıflandırmasına kullanılan yaş grubu ve lökosit sayısı dağılımları açısından da anlamlı farklılık saptanmamıştır (p:0.5 ve p:0.3). Lösemik hücre yükleri açısından bakıldığında hiperdiploidili hastalarda RF daha düşük görünmesine karşın istatistiksel öneme ulaşmamıştır (p:0.1). Hasta sayısının az ve takip sürelerinin kısa olması nedeniyle yorum yapmak güç olsa da, prognoza etkisi bilinen yukarıdaki faktörlerle ilişkisinin saptanamamış olması hiperdiploidinin bilinen prognostik etkisinin bağımsız bir kriter olduğu görüşünü desteklemektedir.

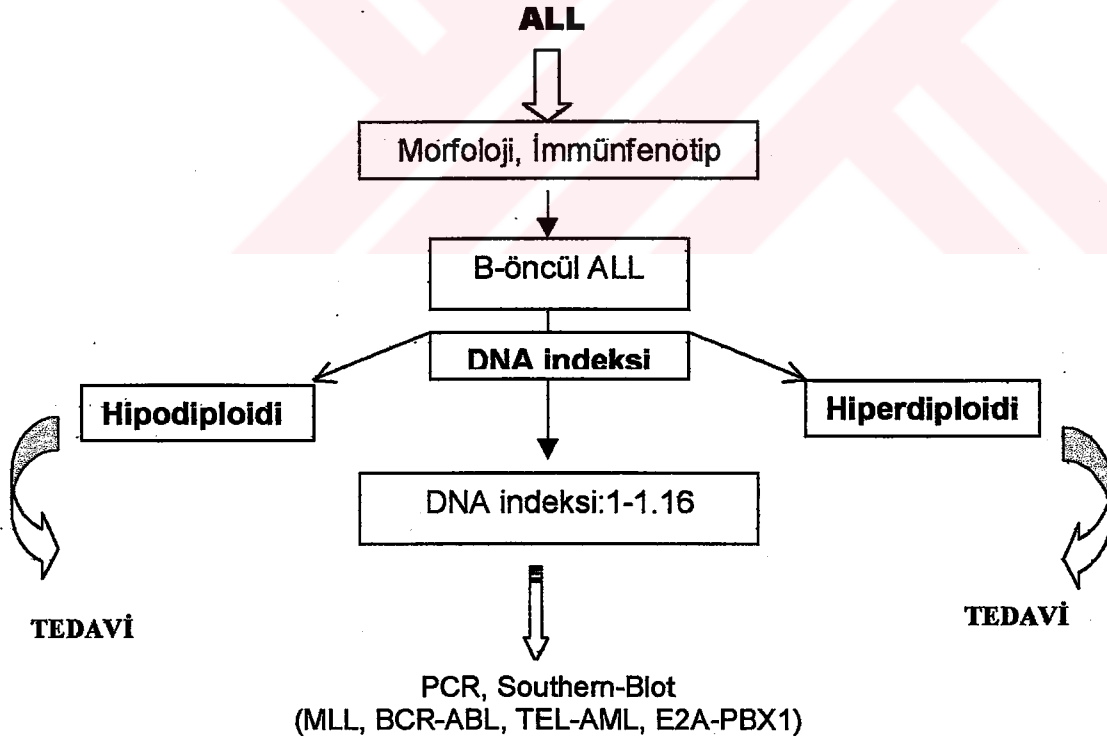
Hücre siklüsü analizlerinde DNA indeksi dışında, S fazı oranlarının da düşük olmasının indüksiyon tedavisine yanıtızlık ile ilişkisinin olduğu bazı erişkin ALL çalışmalarında

gösterilmiştir (233,234,235). Look ve arkadaşları çocukluk çağı ALL'lerini içeren çalışmasında, diğer özellikleri ile standart riske girmiş hastalarda S fazı oranlarının %6.8'den düşük olmasının indüksiyon tedavisine yanıtızlıkla ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Fakat bu değerin altında S fazı oranlarına sahip, remisyona girmiş hastaların da varlığı nedeniyle prognostik bir değışken olarak prospektif olarak kullanılamamıştır. Açıklama olarak antineoplastik ilaçların çoğunun proliferen olan hücrelere sitotoksik olduğu bu nedenle bu hastalarda ilaca dirençli mutant hücrelerin aşırı çoğalmasından ziyade yavaş çoğalan hücrelerin persistansından dolayı indüksiyon tedavisinin sonunda yanıtızlığın ortaya çıkabileceğini belirtmektedirler (76).

Çalışmamızda S fazlarına göre yaş grubu ve cinsiyet dağılımları açısından farklılık gözlenmedi (p:0.7 ve p:0.9). Başlangıç lökosit sayıları açısından da istatistiksel anlamlı farklılık izlenmemesine karşılık (p:0.2) S fazı yüksek (>6.8) olan hastalarda lökosit sayılarının daha düşük olduğu izlendi. Blastik hücrelerin morfolojik, immünfenotipik, sitogenetik ve moleküler genetik özellikleri açısından da anlamlı farklılık saptanmadı (p:0.6, p:0.08 ve p:0.3). Fakat prognozu daha iyi olan pre B fenotipinde S fazı oranlarının daha yüksek olmaya meyilli olduğu söylenebilir (p:0.08).

Son 20 yıl içinde çocukluk çağı ALL'sinde kür oranlarının %5'lerden %80lerin üzerine çıkması yaygın kanserlerin başarılı tedavisine en iyi örneği teşkil etmektedir. Bununla birlikte tedavi sürecinde ve sonrasında ciddi bazı sekellerin de görülmesi mümkündür. Bunların bazıları tedaviden yıllar hatta dekatlar sonra ortaya çıkabilmektedir. Bu geç etkilerin önemi çocukluk çağı için özellikle önemli olmaktadır. Bu nedenlerle aynı tedaviyi alan çocuklarda prognozla ilişkisi olabilecek başlangıç klinik ve biyolojik özellikleri araştırmaya yönelik birçok çalışmalar yapılmıştır. yaş, lökosit sayısı, ırk, cinsiyet ve blast hücre morfolojik, immünfenotipik ve genetik özelliklerinin prognozla ilişkisinin olduğu bildirilmektedir. Bunlar ve diğer klinik prognostik faktörler tedavi başarısızlığına ait farklı riskli altgrupları tanımlamada faydalı olsalar da bireysel olarak hangi hastanın kesin olarak tedavisinde başarısız olunacağını saptayacak faktör yada faktör kombinasyonu yoktur. Yinede mevcut olanaklar dahilinde hastaların yaşam şanslarını kısıtlamadan uygun tedavi programlarını almaları sağlanmalıdır. Bu tür yaklaşımla hastaların yaşam şanslarının artırılması yanında, ileriki dönemlerde ortaya çıkabilecek ve hastanın yaşam kalitesini kısıtlayacak komplikasyonlardan da kaçınılabilecektir.

Hasta ve ailesi açısından olayın diğer bir yönü de hastalığın tedavi maliyetidir. Risk grubu yükseldikçe tedaviye bağlı olarak hem erken-geç komplikasyonlar artmakta hem de bunlara bağlı olarak tedavi maliyetleri önemli oranda artmaktadır. Tüm bu nedenler hastanın risk grubunun doğru bir şekilde belirlenmesinin önemini ortaya koymaktadır. Ülkemizde risk sınıflaması için sitogenetik ve moleküler analiz yöntemlerinin günümüz koşullarında her merkezde ve her hastaya uygulanması mümkün olmamaktadır. Bundan dolayı uluslararası alanda kabul görmüş daha basit ve kullanılabilir kriterlerden faydalanmak, kazançları düşünüldüğünde akılcı bir yaklaşım olacaktır. Pinkel'in çalışmasında da başlangıçta ışık mikroskopi ve immünfenotipik markerler ve DNA indeksi açısından flow sitometrik inceleme ile rölatif olarak basit ve zaman kazandırıcı bir sınıflama verilmiştir. Bu sınıflamaya göre bir ALL hastasında (T ve matür B dışında) hiperdiploidi ya da hipodiploidi saptanırsa ileri çalışmalara gerek olmadığı bildirilmekte, şayet hasta B öncül ve DNA indeksi 1.0-1.16 bulunursa; TEL-AML1, MLL, E2A-PBX ya da BCR-ABL rearanjmanlarının saptanması için bir merkezi referans laboratuvarında Southern blot ya da PCR ile araştırılması önerilmektedir (236) (Şekil 3).



Şekil 3. Çocukluk çağı B-öncül ALL'leri için basitleştirilmiş risk sınıflaması

Fakat bu genotipik sınıflamaya ilaveten ailenin maddi durumu, sağlık sigortası, etnik kökeni, beslenme, infeksiyon, hijyenik koşullar, lösemi tedavi merkezine yakınlık tedavinin seçiminde ve prognozunda önemini korumaktadır.

Bu çalışmada da sitogenetik ve moleküler analiz yöntemlerine göre relatif olarak daha ucuz ve pratik olan DNA indeksi çalışması yapılmış ve ilk aşamada İzmir'de Dokuz Eylül Üniversitesi dışındaki lösemi tedavi merkezlerinden de hastalar alınarak bu teknik öncelikle ilimizde hizmete sunulmuştur. Altyapı olarak gerekli donanıma sahip merkezimizde bu hizmetin daha da genişletilmesi düşünülebilir.

Ancak risk sınıflaması ve tedavi seçiminde DNA indeksinin kullanılabilmesi için ortak çalışmalarla vaka sayılarının artırılıp uzun süreli takiplerinin yapılması ve uygulanan tedavi protokollerinde DNA indeksinin prognostik öneminin araştırılması gerekmektedir. Bu çalışmalar sonucunda ülkemizde her merkezde kullanılacak ortak bir risk sınıflaması ve tedavi protokolü geliştirilebilir.



6. SONUÇLAR

6.1. Tüm hasta grubunun genel özellikleri:

- Araştırmaya giren hastaların çoğunluğu erkek ve 1-6 yaş grubu idi (sırasıyla %76,4 ve %60).
- Tanı anında lökosit sayısı hastaların %56'sında BFM-95 protokolüne göre iyi prognoz kriteri olarak alınan değerlerde yani $<20 \times 10^9/L$ idi.
- Lösemik hücre yükü (RF) hastaların %60'ında <1.2 idi.
- Hastaların %84'ü L1 ve %60'ı pre-B idi. CALLA pozitifliği %80 ve myeloid antijen ekspresyonu ise %12 saptandı.
- DNA indeksine göre hastalarda hipodiploidi oranı %4, 1.16'nın üzerindeki hiperdiploidi oranı ise %16 bulundu. B öncül ALL olgularının %65,3'ü DNA indeksine göre diploid olarak saptandı.
- Sitogenetik incelemede olguların sadece 10'unda (%40) metafaz elde edilebilirdi. Fakat hiçbirinde 20'nin üzerinde metafaz alanında inceleme yapılamadı. Değerlendirilen olguların tamamında diploidi saptanırken, hiperdiploidi ve hipodiploidi'ye rastlanmadı.
- Yüksek risk kriterleri olarak tanımlanan t(4:11) ve t(9:22) ve iyi prognostik özellik olarak bildirilen t(12:21) anomalilerini saptamaya yönelik olarak 14 hastada moleküler genetik analiz çalışması yapılabildi. Bunların %21,4'ünde (3 hasta) t(12:21), %7,1'inde (1 hasta) t(4:11) saptandı.
- Prognostik ve tedavi alt gruplarının değerlendirilmesinde rolü olan in vivo prednizolon yanıtları değerlendirildiğinde 8. gün periferik blast sayısı $<1000/\mu L$ olan hastalar %88 oranındaydı.
- 15. ve 33. gün yapılan remisyon değerlendirmelerinde %20'sinin 15. gün, %76'sının 33. günde remisyonla girdiği ve kümülatif remisyon oranının %96 olduğu gözlemlendi. 1 hastanın (%4) ise 45. gün remisyonla girdiği saptandı.
- Hastaların tedavi grubu olarak %64'ünün orta risk grubuna, %28'inin standart risk grubuna ve %8'inin yüksek risk grubuna dahil edildiği gözlemlendi.

6.2. Hastaların BFM 95 protokolüne göre değerlendirilmeleri:

- Risk gruplarına göre hastalar incelendiğinde; kız olguların özellikle standart risk grubunda yoğunlaştığı saptandı (SR grubunun %57.1'i ve tüm kız hastaların da %57.1'i). Yaş grupları incelendiğinde BFM-95 protokolüne göre risk kriteri olarak kötü olan 6 yaş üzeri 1 hastanın (%14.3) standart risk grubuna sokulduğu saptandı.
- Risk gruplarına göre hastaların klinik ve laboratuvar özellikleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli farklılık saptanmadı. Gruplar arasında lösemik hücre yükleri (RF) açısından da farklılık saptanmadı.
- Risk gruplarına göre blastik hücre özellikleri araştırıldığında morfolojik, immünofenotipik, sitogenetik ve moleküler genetik bulguları yönünden anlamlı farklılık göstermedi. Fakat yüksek riskli grupta myeloid antijen ekspresyonunun daha yüksek oranda olduğu bulundu (p:0.001). DNA indeksi açısından yüksek riskli grupta hiçbir hastada 1.16'nın üzerinde DNA indeksi saptanmamasına rağmen gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılığa ulaşmaması vaka sayısının az olmasına bağlı olabilir. S fazı oranları açısından bakıldığında da risk grubu yükseldikçe S fazları <6.8'den küçük olan hastaların oranı artmasına karşın istatistiksel anlamlı düzeye ulaşmadı.
- Tedaviye erken dönem yanıt oranları değerlendirildiğinde yine risk grubu yükseldikçe yanıt oranı giderek düşmesine karşılık istatistiksel olarak önemli düzeye ulaşmadı. Standart risk grubuna dahil edilenlerin tamamının prednizolona yanıt veren hastalar olduğu görüldü.

6.3. Hastaların NCI/CTEP kriterlerine göre değerlendirilmeleri:

- Risk gruplarına göre hastalar incelendiğinde; kız olguların özellikle standart risk grubunda yoğunlaştığı saptandı(%83,3). Yaş grupları incelendiğinde ise düşük risk kriteri olan 1-9 yaşında 5 hastanın (%41.7) diğer özellikleri nedeniyle yüksek risk grubuna girdiği görüldü.
- Risk gruplarına göre hastaların klinik özellikleri karşılaştırıldığında farklılık saptanmadı. Lökosit sayısı <50 x10⁹/L olan 6 hastanın (%50) diğer özellikleri nedeniyle yüksek risk grubuna girdiği görüldü ve lökosit sayıları arasında farklılık saptandı. Fakat gruplar arasında lösemik hücre yükleri (RF) açısından farklılık saptanmadı.

- Risk gruplarına göre blastik hücre özellikleri araştırıldığında morfolojik, immünofenotipik, sitogenetik ve moleküler genetik bulguları yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu. BFM sınıflamasının aksine myeloid antijen ekspresyonu açısından da farklılık saptanmadı. Yine BFM sınıflamasında yüksek riskli grupta hiçbir hastada 1.16'nın üzerinde DNA indeksi saptanmamasına rağmen NCI/CTEP sınıflamasına göre yüksek riskli grupta istatistiksel farklılık izlenmese de bir hastada DNA indeksi 1.16'nın üzerinde idi. S fazı oranları yönünden de istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı.

- Tedaviye erken dönem yanıt oranları değerlendirildiğinde yüksek risk grubunda yanıt oranları düşük olmasına karşılık istatistiksel anlamlı düzeye ulaşmadı.

6.4. Hastaların DNA indekslerine göre değerlendirilmeleri:

- Hastalar DNA indekslerine göre (prognostik önemi bilinen DNA indeksi gruplarına göre) değerlendirildiklerinde cinsiyet ve yaş dağılımı açısından hipodiploid, diploid ve hiperdiploid hastalar açısından farklılık gözlenmedi.

- DNA indeksi ile lökosit sayısı arasında ilişki saptanmadı

- Hepatosplenomegali varlığı açısından farklılık yok görünse de hipodiploidi saptanan olguda ayrıca mediasten tutulumu da saptandı ve istatistiksel olarak da anlamlı bulundu.

- Lösemik hücre yükü hiperdiploidilerde daha düşük görünmesine karşın istatistiksel anlamlılığa ulaşmadı.

- DNA indeksi gruplarına göre blastik hücre özellikleri araştırıldığında morfolojik, immünofenotipik, sitogenetik ve moleküler genetik bulguları yönünden anlamlı farklılık saptanmadı.

- Myeloid antijen ekspresyonu ve CALLA ile ilişki saptanmadı.

- Sitogenetik analiz ile diploid saptanıp flow sitometrik DNA analizi ile hiperdiploid saptanan bir hasta vardı.

- DNA indekslerine göre erken tedavi yanıtları değerlendirildiğinde prednizolona erken dönem yanıtı, remisyon oranları ve remisyona girme hızları açısından istatistiksel anlamlı farklılık saptanmasa da DNA indeksi yüksek hastalarda erken dönem yanıt ve remisyon oranları daha yüksek görünmektedir.

6.5. Hastaların hücre siklüsü S fazı oranlarına göre değerlendirilmeleri:

- Hastalar S fazı oranlarına göre değerlendirildiklerinde cinsiyet ve yaş dağılımı açısından farklılık gözlenmedi.
- S fazı oranı ile lökosit sayısı arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı fakat S fazı >6.8 olanların lökosit sayıları daha düşük oranda izlendi.
- Hepatosplenomegali ve mediasten tutulumu ile S fazı oranları yönünden ilişki saptanmadı.
- Lösemik hücre yükü ile S faz ilişkisi de yoktu.
- S fazı oranlarına göre blastik hücre özellikleri araştırıldığında morfolojik, immünofenotipik, sitogenetik ve moleküler genetik bulguları yönünden anlamlı farklılık saptanmadı. Fakat prognozu daha iyi olan pre-B fenotipinde S fazı oranlarının daha yüksek görüldüğü söylenebilir (pre B'de %53.8, pre-pre B'de %12.5 ve T'de %0).
- Myeloid antijen ekspresyonu ve CALLA ile ilişki saptanmadı.
- S fazı oranlarına göre erken tedavi yanıtları değerlendirildiğinde prednizolona erken dönem yanıtı, remisyon oranları ve remisyona girme zamanları açısından farklılık saptanmadı. Fakat S fazı >6.8 olanların tamamı 33. günde remisyonda iken, S fazı <6.8 olanların %93.8'i remisyonda idi.
- Hücrelerin immünofenotipik özelliklerine göre hücre siklüsü dağılımları incelendiğinde G0G1, S ve G2M oranları açısından farklılık saptanmadı.
- DNA indekslerine göre de hücre siklüsü dağılımları açısından farklılık saptanmadı.
- FAB morfolojik gruplar açısından da hücre siklüsü farklılığı saptanmadı.
- DNA ploïdisine göre FAB morfolojik grupları arasında anlamlı farklılık saptanmadı.
- Ayrıca anöploïdi sıklığı açısından bakıldığında da FAB ve immünofenotipik alt gruplar arasında da farklılık yoktu.
- DNA indeksi ile sitogenetik analiz anöploïdi açısından kıyaslandığında her iki tetkik arasında farklılık saptanmadı. Sonuçlar uyumludur. Sadece bir hastada sitogenetik ile diploïdi saptanmasına karşılık DNA indeksi ile hiperdiploïdi saptandı.

6.6. Hastaların İn vivo prednizolon yanıtlarına göre değerlendirilmesi:

- İn vivo erken prednizolon yanıtına göre yaş ve cinsiyet açısından karşılaştırma yapıldığında farklılık izlenmedi (p:0,2, p:0,5).
- Lökosit sayısı ve lösemik hücre yükü (RF) açısından prednizolona yanıt oranları değerlendirildiğinde de anlamlı farklılık saptanmadı.
- Blastik hücrelerin morfolojik, immünofenotipik, sitogenetik ve hücre siklusu özellikleri prednizolona yanıt açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak sadece myeloid antijen ekspresyonu olanlarda yanıtızlık oranlarının yüksekliği anlamlı bulunsa da DNA indeksi 1.16 üzerinde olan hastaların da tamamının prednizolona yanıtlarının tam olduğu görüldü.
- Prednizolona yanıt veren ve vermeyen hastalar remisyon açısından karşılaştırıldıklarında prednizolona yanıt verenlerin remisyona daha erken dönemde girdikleri bulundu(p:0,01).

7-ÖZET

ÇOCUKLUK ÇAĞI AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİLERİNDE DNA İNDEKSİ

Amaç: Akut lenfoblastik lösemi, tedavisinde önemli gelişmeler sağlanmış çocukluk çağının en sık görülen malign bir hastalığıdır. Risk kriterlerinin, özellikle sitogenetik ve moleküler genetik değişikliklerin tanımlanması ile uygun tedavi seçimleri sonucu kür oranları artmaya başlamıştır. Kür oranlarının artmasına karşın tedaviye bağlı çeşitli komplikasyonların da daha sık olarak görüldüğü bilinmektedir. Tedavideki başarıyı azaltmadan bu gibi komplikasyonların sıklığını azaltmak ancak hastaların risk sınıflamalarının ve tedavilerinin uygun şekilde yapılmasıyla mümkün olabilir. Burada risk sınıflamasında geçerliliğini koruyan ve diğer sitogenetik tetkiklere kıyasla ucuz ve pratik olan flow sitometrik DNA indeksinin çalışılması ve risk sınıflamasında kullanılması amaçlandı.

Hastalar ve yöntem: Çalışmaya Kasım 1999 – Ocak 2001 tarihlerinde DEÜTF Çocuk Hematoloji Bilim Dalı'ndan 12, EÜTF Çocuk Hematoloji Bilim Dalı'ndan 4, İzmir Tepecik SSK Hastanesi Çocuk Kliniğinden 5 ve İzmir Dr. Behçet Uz Çocuk Hastanesinden 4 olmak üzere toplam 25 yeni ALL hastası alındı. DNA indeks çalışması için alınan antikoagülanlı kemik iliği aspirasyon örnekleri çalışılmak üzere uygun şartlarda donduruldu. Daha sonra örnekler uygun koşullarda tekrar çözündürülerek flow sitometrik hücre siklusü ve DNA analizleri yapıldı. Hastaların hepsi tedavi edildikleri merkezlerde ALL BFM 95 tedavi protokolüne göre tedavi edildiklerinden sınıflamaları, klinik, biyolojik özellikleri, tedaviye yanıtları bu protokole göre değerlendirildi.

Bulgular: Hastaların çoğunluğu (%76.4) erkek ve 1-6 yaş grubundan (%60) idi. Tanıda lökosit sayıları %56'sında protokole göre iyi prognoz kriteri olarak belirtilen değerdedi ($< 20 \times 10^9/L$). Morfolojik ve immünofenotipik incelemelerinde %84'ü L1, %16 L2 ve %60 pre-B, %32 pre-pre-B ve %8 T hücreliydi. Moleküler genetik çalışma 14 hastada (%56) yapılabildi, bunların %21.4'ünde t(12:21) ve %7.1'inde t(4:11) saptandı. Konvansiyonel sitogenetik incelemede hastaların ancak %40'ında metafaz elde edilebildi ve diploid olarak değerlendirildi. Fakat bunların hiçbirinde yeterli sayı ve kalitede metafaz yoktu. Flow sitometrik DNA indekslerine göre ise hastaların %4'ünde hipodiploidi, %68'inde diploidi, %16'sında ≥ 1.16 hiperdiploidi ve %12'sinde

1-1.15 hiperdiploidi bulundu. Hasta sayısı ve takip sürelerinin kısıtlı olması nedeniyle DNA indeksinin prognostik etkisi araştırılmadı. Fakat erken dönem steroid yanıtı ve remisyon özellikleri üzerine etkisi değerlendirildiğinde, istatistiksel anlamlı bir ilişki saptanmadı. Tedavinin 33. günü yapılan değerlendirmelerinde %96'sının remisyonda olduğu, bir hastanın (%4) 45. gün remisyona girdiği görüldü.

Sonuç: Çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemilerinin risk sınıflamasında ve prognozunda sitogenetik özellikler en önemli faktördür. Çalışmamızda da görüldüğü gibi bizim gibi gelişmekte olan ülkelerdeki lösemi tedavi merkezlerinin çoğunda bu pahalı ve deneyimli ekip isteyen teknikleri kurmak ve uygulamakta zorluklar olabilmektedir. Burada da konvansiyonel sitogenetik tetkiklerin yerine kullanılabilecek daha pratik ve ucuz olan flow sitometrik DNA analiz yöntemi başarıyla uygulanmıştır. Bu yöntemin katkısıyla hastaların risk sınıflaması daha doğru bir şekilde yapılarak, gereksiz yüksek doz tedaviler ve komplikasyonlarından korunmaları mümkün olacaktır.

Günümüzde lösemili hastaların yaşam oranlarından ödün verilmeden tedavi edilmesi, uygun şekilde risk sınıflamalarının yapılması ile mümkündür. Ülkemiz koşulları gözönüne alındığında, risk sınıflaması ve tedavi seçiminde DNA indeksinin kullanılabilmesi için ortak çalışmalarla vaka sayılarının artırılıp uzun süreli takiplerinin yapılması ve uygulanan tedavi protokollerindeki prognostik öneminin araştırılması gerekmektedir. Bu çalışmalar sonucunda her merkezde kullanılabilecek ortak bir risk sınıflaması ve tedavi protokolü geliştirilebilir.

8-SUMMARY

DNA INDEX in CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIAS

Acute lymphoblastic leukemia is the most common and probably most successfully treated malignant disorder in children. In recent years, as a result of risk directed therapy based on some risk factors such as age, leukocyte count, immunophenotyping, cytogenetic and molecular findings, the cure rates have significantly increased. Along with marked improvements in cure rates, however, the increasing number of survivors has led to a heightened appreciation of the late complications of treatment caused by both radiation and chemotherapy. The frequency of these complications may be reduced when the patients are classified and treated appropriately according to the known risk factors. In this report, we wanted to investigate the DNA index as a risk factor, which is relatively practical and inexpensive when compared to conventional karyotyping.

Patients and methods:Total 25 newly diagnosed pediatric ALL cases, of 12 from "Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Division of Pediatric Hematology", five from "İzmir Tepecik SSK Teaching Hospital, Department of Pediatrics", four from "Ege University, Faculty of Medicine, Division of Pediatric Hematology", and four from "İzmir Dr. Behçet Uz Children's Hospital" were entered to the study. Anticoagulated bone marrow specimens obtained from patients at diagnosis were frozen at -70°C . Then, these samples were thawed in appropriate conditions and studied for cell cycle and DNA analysis. All the patients were classified and treated according to ALL BFM 95 protocol.

Results: Most of the patients were male (76.4 %) and one to six years-old (60%). Leukocyte count at diagnosis was in good risk category for 56 % of the patients according to ALL BFM 95 criteria ($< 20 \times 10^9/\text{L}$). Morphological and immunophenotyping examinations revealed 84% of L1, 16% of L2, and 60% pre-B cell, 32% pre-pre-B cell, and 8% Tcell respectively. Molecular genetic analysis for t(4:11), t(9:22), and t(12:21) was available for 14 patients (56%) and revealed 21.4% t(12:21), and 7.1% t(4:11) positivity. Conventional karyotyping could be done only in 40 % of patients and showed diploidy. However, in all these patients, the number of

metaphases were insufficient (<20). On the other hand, flow cytometric DNA analysis showed 4% hypodiploidy, 68% diploidy, 16% hyperdiploidy with $DI \geq 1.16$, and 12% hyperdiploidy with $DI: 1.0-1.15$. The prognostic effect of DNA index couldn't be evaluated because of small patient population and short follow-up. In the 33rd day evaluation, 24 patients (96%) were in remission. The relationships between DNA index and early prednisolone response, remission rates were found statistically insignificant.

Conclusion: Flow cytometric DNA analysis could be performed successfully in all patients in this study. So it can be used as a cheaper and more practical method in the risk classification of childhood lymphoblastic leukemias when compared to the conventional cytogenetic methods.

In the present, the modern and effective treatment of leukemia is possible with appropriate risk classification. According to our conditions in Turkey, to use DNA index in risk assessment and choice of treatment, it is necessary to design collaborative studies and to evaluate the effect of DNA index on prognosis. Then, it may be used as a risk factor and affect the classification of treatment protocols in Turkey.

9. KAYNAKLAR

- 1- Parkin DM, Stiller GA, Draper GJ, Bieber CA. The international incidence of childhood cancer. *Int J Cancer* 1988;42:511-520.
- 2- Pui CH. Acute leukemia in children. *Curr Opin Hematol* 1996;3:249.
- 3- Pendergrass TW. Epidemiology of acute lymphoblastic leukemia. *Semin Oncol* 1985;12:80-91.
- 4- Miller RW. Ethnic differences in cancer occurrence: genetic and environmental influences with particular reference to neuroblastoma. In: Mulvihill JJ, Miller RW et al(eds) *Genetics in Human Cancer*. New York: Raven Press, 1977,pp1-39.
- 5-Shusterman S, Meadows AT. Long term survivors of childhood leukemia. *Curr Opin Hematol* 2000;7:217-222.
- 6- Neglia J, Robison L. Epidemiology of childhood leukemias. *Pediatr Clin North Am* 1988;35:675-692.
- 7- Caldwell GG. Twenty-two years of cancer cluster investigations at the Centers for Disease Control. *Am J Epidemiol* 1990;132(suppl 1):S43-S47.
- 8- Draper GJ, Heaf MM, Kennier-Wilson LM et al. Occurrence of childhood cancers among sibs and estimation of familial risk. *J Med Genet* 1977;14:81-90.
- 9- Miller RW. Deaths from childhood leukemia and solid tumors among twins and other sibs in The United States. *J Natl Cancer Inst* 1971;46:203-209.
- 10-Smith M, Arthur D, Camitta B et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1996;14:18-24.
- 11- Malkin D, Li FP, Strong LC et al. Germline p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas and other neoplasms. *Science* 1990;250:1233-1238.
- 12- Pui CH, Rivera GK, Hancock ML et al. Clinical significance of CD10 expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1993;7:35-40.
- 13- Borowitz MJ, Shuster JJ, Civin CL et al. Prognostic significance of CD34 expression in childhood B precursor acute lymphocytic leukemia: A Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1990;8:1389-1398.
- 14- Koehler M, Behm FG, Shuster J et al. Transitional pre-B acute lymphoblastic leukemia of childhood is associated with favorable prognostic features and an excellent outcome: A Pediatric Oncology Group study. *Leukemia* 1993;7:2064-2068.
- 15- Li FP, Fraumeni JF, Mulvihill JJ et al. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res* 1988;48:5358-5362.
- 16- Roberts WM, Rivera GK, Raimondi SC et al. Intensive chemotherapy for Philadelphia-chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 1994;343:331-2.
- 17- Crist WM, Carroll AJ, Shuster JJ et al. Poor prognosis of children with pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia is associated with the t(1;19)(q23;p13):a Pediatric Oncology Group Study. *Blood* 1990;76:117-122.

- 18- Raimondi SC, Behm FG, Roberson PK et al. Cytogenetics of pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia with emphasis on prognostic implications of the t(1;19). *J Clin Oncol* 1990;8:1380-8.
- 19- Rubnitz JE, Behm FG, Downing JR. 11q23 rearrangement in acute leukemia. *Leukemia* 1996;10:74-82.
- 20- Rubnitz JE, Behm FG, Pui CH et al. Genetic studies of childhood acute lymphoblastic leukemia with emphasis on p16, MLL, and ETV6 gene abnormalities: Results of St. Jude Total therapy Study XII. *Leukemia* 1997;11:1201-6.
- 21-Trueworthy R, Shuster J, Look T et al. Ploidy of lymphoblasts is the strongest predictor of treatment outcome in B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia of childhood: A Pediatric Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 1992;10:606-613.
- 22- Williams DL, Tsiatis A, Brodeur GMG et al. Prognostic importance of chromosome number in 136 untreated children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1982;60:864-872.
- 23- Third International Workshop of Chromosomes in Leukemia, 1980(1981). Clinical significance of chromosomal abnormalities in acute lymphoblastic leukemia, Lund, Sweden. *Cancer genet Cytogenet* 1980;4:96.
- 24- Secker-Walker LM. The prognostic implications of chromosomal findings in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1984;11:233.
- 25- Crist WM, Carroll AJ, Shuster JJ et al. Poor prognosis of children with pre B acute lymphoblastic leukemia is associated with the t(1;19)(q23;p13): A Pediatric Oncology Group Study. *Blood* 1990;76:117-122.
- 26- Crist WM, Carroll AJ, Shuster JJ et al. Philadelphia chromosome-positive childhood acute lymphoblastic leukemia: Clinical features and outcome. A Pediatric Oncology Group (POG) Study. *Blood* 1990;76:489-494.
- 27- Pui C-H. Acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am, Ped Oncol* 1997; 44(4): 831-846.
- 28- Gurney JG, Severson RK, Davis S et al. Incidence of cancer in children in the United States. *Cancer* 1995;75:2186.
- 29- Ries LAG, Miller BA, Hankey BF. SEER Cancer Statistics Review 1973-1991: Tables and Graphs. Bethesda, MD:National Cancer Institute, 1994,publication,NIH-2789.
- 30-Sandler DP. Recent studies in leukemia epidemiology. *Curr Opin Oncol* 1995;7:12.
- 31- Pui CH. Childhood leukemias. *N Eng J Med* 1995;332:1618.
- 32- Gilliland DG: Molecular genetics of human leukemia. *Leukemia* 1998;2(suppl):7-12.
- 33- Rubnitz JE, Look AT: Molecular basis of leukomogenesis. *Curr Opin Hematol* 1998;5:264-270.
- 34- Bhatia S, Robison LL. Epidemiology of leukemia and lymphoma. *Curr Opin Hematol* 1999;6:201-204.

- 35- Ford AM, Bennett CA, Price CM, Bruin MC, Van Wering ER, Greaves M: Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:4584-4588.
- 36- Ford AM, Pombo-de-Oliveira MS, McCarthy KP et al. Monoclonal origin of concordant T-cell malignancy in identical twins. *Blood* 1997;89:281.
- 37- Smith MT, Zhang L. Biomarkers of leukemia risk: benzene as a model. *Environ Health Perspect*. 1998;106(suppl4):937-946.
- 38- Zahm SH, Ward MH, Blair A. Pesticides and cancer. *Occup Med* 1997;12:269-289.
- 39- Greaves MF. Workshop report. Infant leukemia biology, etiology and treatment. *Leukemia* 1996;10:372-377.
- 40- Alexander FE, Boyle P, Carli PM et al. Spatial clustering of childhood leukemia: summary results from the EUROCLUS project. *Br J Cancer* 1998;77:818-824.
- 41- Lehtinen T, Lehtinen M. Common and Emerging infectious causes of hematological malignancies in the young. *APMIS* 1998;106:585-597.
- 42- Greaves MF. Aetiology of acute leukemia. *Lancet* 1997;349:344.
- 43- Chen H, Sandler DP, Taylor JA, Shore DL, Liu E, Bloomfield CD, Bell DA. Increased risk for myelodysplastic syndromes in individuals with glutathione S-transferase theta1(GSTT1) gene defect. *Lancet* 1996;347:295-297.
- 44- Pui CH, Behm FG, Crist WM et al. Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1993;82:343.
- 45- Campana D, van Dongen JJM, Mehta A et al. Stages of T cell receptor protein expression in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1991; 77:1546.
- 46- Cline MJ. The molecular basis of leukemia. *N Eng J Med* 1994;330:328.
- 47- Pui CH, Crist WM, Look AT. Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1990;76:1449.
- 48- Baruchel A, Leblanc T and Schaioson G. Pathology of acute lymphoblastic leukemias. In: *Pediatric Hematology*. Ed: Lilleyman J, Hann I and Blanchette V. Second edition, Churchill Livingstone, Harcourt publishers limited, London, 1999. Chapter 26:519-537.
- 49- Rubnitz JE, Behm FG, Downing JR. 11q23 rearrangement in acute leukemia. *Leukemia* 1996;10:74.
- 50- Pui CH, Raimondi SC, Hancock ML. Immunologic, cytogenetic, and clinical characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia with the t(1:19)(q23:p13) or its derivative. *J Clin Oncol* 1994;12:2601.
- 51- Shurtlef SA, Buijs A, Behm FG et al. TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12:21) is the most common genetic lesion pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia* 1995;9:1985.

- 52- Bash RO, Hall S, Timmons CF et al. Does activation of the TAL1 gene occur in a majority of patients with T cell leukemia? A Pediatric Oncology Group Study. *Blood* 1995;85:3005.
- 53- Okuda T, Shurtleff SA, Valentine MB et al. Frequent deletion of p16^{INK4a}/MTS1 and p15^{INK4b}/MST2 in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995;85:2321.
- 54- Behm FG, Raimondi SC, Frestedt JL et al. Rearrangement of the MLL gene confers a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia, regardless of presenting age. *Blood* 1996;87:2870.
- 55- Camitta BM, Pullen J, Murphy S. Biology and treatment of acute lymphocytic leukemia in children. *Semin Oncol* 1997;24(1):83-91.
- 56- Ludwig WD, Harbott J, Bartram CR et al. Incidence and prognostic significance of immunophenotypic subgroups in childhood acute lymphoblastic leukemia: Experience of the BFM study 86, in Ludwig WD, Thiel E (eds): *Recent Advances in Cell Biology of Acute leukemia: Impact on Clinical Diagnosis and Therapy*, Berlin, Springer, Verlag, 1993:269-282.
- 57- Baruchel A, Gayuela JM, Ballerini P et al. The majority of myeloid antigen positive(My+) childhood B -cell precursor acute lymphoblastic leukemias express TEL/AML1 fusion transcripts. *Br J Haematol* 1997;90:28-35.
- 58- Fink FM, Köller U, Mayer H et al. Prognostic significance of myeloid-associated antigen expression on blast cells in children with acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol* 1993;21:340.
- 59- Borowitz MJ, Shuster JJ, Land VJ et al. Myeloid antigen expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Eng J Med* 1991;325:1379.
- 60-Secker-Walker LM, Lawler SD, Hardisty RM. Prognostic implications of chromosomal findings in acute lymphoblastic leukemia at diagnosis. *Br Med J* 1978;2:1529.
- 61- Bloomfield CD, Lindquist LL, Arthur D et al. Chromosomal abnormalities in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 1981;4:111.
- 62- Williams DL, Harber J, Murphy SB et al. Chromosomal translocations play a unique role in influencing prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1986;68:205.
- 63- Third International Workshop of Chromosomes in Leukemia. Chromosomal abnormalities and their clinical significance in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 1983;43:868.
- 64- Uçkun FM, Gajl-Peczalska KJ, Provisor AJ, Heerema NA. Immunophenotype-karyotype associations in human acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1989;73:271.
- 65- Fletcher JA, Kimball WM, Lynch E et al. Prognostic implications of cytogenetic studies in an intensively treated group of children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1989;74:2130.
- 66- Secker -Walker LM, Chessells JM, Stewart EL et al. Chromosomes and other prognostic factors in acute lymphoblastic leukemia: A long term follow-up. *Br J hematol* 1989;72:336.

- 67- Williams DL, Harris A, Williams KJ, Brosius MJ, Lemonds W. A direct bone marrow chromosome technique for acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1984;13:239.
- 68-Yunis JJ, Brunning RD, Howe RB, Lobell M. High-resolution chromosomes as an independent prognostic indicator in adult acute nonlymphocytic leukemia. *N Eng J Med* 1984;311:812.
- 69-Pui CH, Williams DL, Roberson PK et al. Correlation of karyotype and immunophenotype in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1988;6:56.
- 70-Raimondi SC, Behm FG, Roberson PK et al. Cytogenetics of childhood T-cell leukemia. *Blood* 1990;72:1560.
- 71- Pui CH, Crist WM, Look TA. Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1990;76(8):1449-1463.
- 72- Pui CH, Williams DL, Raimondi SC et al. Hypodiploidy is associated with a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1987;70:247-253.
- 73-Pui CH, Carroll AJ, Raimondi SC et al. Clinical presentation, karyotypic characterization, and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with a near-haploid or hypodiploid <45 line. *Blood* 1990;75:1170.
- 74- Pui CH, Carroll AJ, Head D et al. Near-triploid and near-tetraploid acute lymphoblastic leukemia of childhood. *Blood* 1990;76(3):590-596.
- 75- Michael PM, Garson OM, Ekert H et al. Prospective study of childhood acute lymphoblastic leukemia: Hematologic, immunologic, and cytogenetic correlations. *Med Pediatr Oncol* 1988;16:153.
- 76-Look T, Roberson PK, Williams DL et al. Prognostic importance of blast cell DNA content in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1985;65(5):1079-1086.
- 77- Pui CH, Raimondi SC, Dodge RK et al. Prognostic importance of structural chromosomal abnormalities in children with hyperdiploid(>50 chromosome) childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1989;73:1963.
- 78-Pui CH, Crist WM. High-risk lymphoblastic leukemia in children. Prognostic factors and management. *Blood Rev* 1987;1:25.
- 79- Reaman G, Zeltzer P, Bleyer WA et al. Acute lymphoblastic leukemia in infants less than one year of age: A cumulative experience of the childrens Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 1985;3:1513.
- 80- Crist W, Pullen J, Boyett J et al. Clinical and biologic features predict a poor prognosis in acute lymphoid leukemias in infants: A Pediatric Oncology Group Study. *Blood* 1986;67:135.
- 81- Synold TW, Relling MV, Boyett JM. Blast cell methotrexate-polyglutamate accumulation in vivo differs by lineage, ploidy and methotrexate dose in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest* 1994;94:1996-2001.
- 82- Kaspers GJ, Smets LA, Pieters R, Van Zantwijk CH, Van wering ER, Veerman AJP. Favorable prognosis of hyperdiploid common acute lymphoblastic leukemia may be explained by sensitivity to antimetabolites and other drugs. results of an in vitro study. *Blood* 1995;85:751-756.

- 83- Kumagai M, Manabe A, Pui CH. Stroma-supported culture in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia cell predicts treatment outcome. *J Clin Invest* 1996;97:755-760.
- 84- Ito C, Kumagi M, Manabe A et al. Hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia with 51-65 chromosomes: a distinct biological entity with a marked propensity to undergo apoptosis. *Blood* 1999;93:315-320.
- 85- Heerema N, Sather HN, Sensel MG, et al. Frequency and clinical significance of cytogenetic abnormalities in Pediatric T-lineage acute lymphoblastic leukemia; a report from the Children's Cancer Group. *J Clin Oncol* 1998;16:1270-1278.
- 86- Harris MD, Shuster JJ, Carroll AJ et al. Trisomy of chromosomes 4 and 10 identifies children with a very low risk of treatment failure. A Pediatric Oncology Group study. *Blood* 1992;79:3316-3324.
- 87- Raimondi SC, Pui CH, Hancock ML, Behm FG, Filatov L, Rivera GK. Heterogeneity of hyperdiploid (51-67) childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1996;10:213-224.
- 88- Pui CH, Raimondi SC, Williams DL: Isochromosome 17q in childhood acute lymphoblastic leukemia: An adverse cytogenetic feature in association with hyperdiploidy? *Leukemia* 1988;2:222.
- 89- Jackson JF, Boyett J, Pullen J et al. Favorable prognosis associated with hyperdiploidy in children with acute lymphoblastic leukemia correlated with extra chromosome 6. A Pediatric Oncology Group Study
- 90- Swansbury GJ, Secker-Walker LM, Lawler SD et al. Chromosomal findings in acute lymphoblastic leukemia of childhood: An independent prognostic factor. *Lancet* 1981;2:249.
- 91- Oshimura M, Freeman AI, Sandberg AA. Chromosomes and causation of human cancer and leukemia. XXIII, near haploidy in acute leukemia. *Cancer* 1977;40:1143.
- 92- Kaneko Y, sakurai M. Acute lymphocytic leukemia(ALL) with near-haploidy-A unique subgroup of ALL?. *Cancer Genet Cytogenet* 1980;2:13.
- 93- Nordenson I, Adrian BA, Holmgren G et al. Near haploidy in childhood leukemia: A high risk component. *Pediatr Hematol Oncol* 1988;5:309.
- 94- Bloomfield CD, Secker-Walker LM, Goldman AI et al. Six-year follow up of the clinical significance of karyotype in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer genet Cytogenet* 1989;40:171.
- 95- Ohtaki K, Abe R, Tebbi CK et al. Near-triploid Ph-positive leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1985;18:113.
- 96- Hiddemann W, Wörmann B, Messerer D, Springefeld R, Büchner Th. Analysis of the cellular DNA and RNA content in acute leukemias by flow cytometry. *J Cancer Res Clin Oncol* 1990;116:507-512.
- 97- Hiddemann W, Wörmann B, Ritter J et al. Frequency and clinical significance of DNA aneuploidy in acute leukemia. *Ann NY Acad Sci* 1986b;468:227-240.
- 98- Look T, Melvin SL, Williams DL et al. Aneuploidy and percentage of S-phase cells determined by flow cytometry correlate with cell phenotype in childhood acute leukemia. *Blood* 1982;60:959-967.

- 99- Smets LA, Slater RM, Behrendt H, Van't Veer MB, Homan-Blok J. Phenotypic and karyotypic properties of hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia of childhood. *Br J Hematol* 1985;61:113-123.
- 100- Soares C, Miller DR, Steinherz PG, Melamed MM, Andreeff M. DNA and RNA determination in 111 cases of childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL) by flow cytometry: correlation of FAB classification with DNA stemline and proliferation. *Br J Hematol*, 1985;60:677-686.
- 101- Andreeff M, Darzynkiewicz Z, Sharpless TK, Clarkson BD, Melamed MR. Discrimination of human leukemia subtypes by flowcytometric analysis of cellular DNA and RNA. *Blood* 1980;55:282-293.
- 102- Barlogie B, Raber MN, Schumann J et al. Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Res* 1983;43:3982.
- 103-Williams DL, Look AT, Melvin SL, Roberson PK, Dahl G, Flake T, Stass S. New chromosomal translocations correlate with specific immunophenotypes of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cell* 1984;36:101.
- 104-Rubnitz JE, Pui CH. Molecular diagnostics in the treatment of leukemia. *Curr Opin Hematol* 1999;6:229-235.
- 105- Okuda T, Fisher R, Downing JR. Molecular diagnostics in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Molecular Diagnosis* 1996;1:39-51.
- 106- Roberts WM, Estrov Z, Ouspenskaia MV et al. Measurement of residual leukemia during remission in childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1997;336:317-23.
- 107- Romana SP, Mauchauffe M, Le Coniat M et al. The 12:21 translocation involving TEL and deletion of the other TEL allele : two frequently associated alterations found in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1996;87:2891-9.
- 108- Rubnitz JE, Look AT. Molecular genetics of childhood leukemias. *J Ped Hematol Oncol* 1998;20(1):1-11.
- 109- Shurtleff SA, Buijs A, Behm FG et al. TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12:21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia* 1995;9:1985-9.
- 110- McLean TW, Ringold S, Neuberg D et al. TEL/AML1 dimerizes and is associated with a favorable outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1996;88:4252-8.
- 111- Rubnitz JE, Shuster JJ, Chen JS et al. case-control study suggests a favorable impact of TEL rearrangement in patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia treated with antimetabolite-based therapy.: A Pediatric Oncology Group Study. *Blood* 1997;89:1143-6.
- 112- Rubnitz JE, Downing JR, Pui CH et al. TEL gene rearrangement in acute lymphoblastic leukemia: A new genetic marker with prognostic significance. *J Clin Oncol* 1997;15:1150-7.
- 113- Pui CH. Childhood leukemias. *N Engl J Med* 1995;332:1618-1630.
- 114- Kurzrock R, Gutterman JU, Talpaz M. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* 1988;319:990-8.

- 115- Appelbaum FR. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute leukemia. *Semin Oncol* 1997;24:114-23.
- 116- LeBrun DL, Cleary ML. Fusion with E2A alters the transcriptional properties of the homeodomain protein PBX1 in t(1:19) leukemias. *Oncogene* 1994;9:1641-7.
- 117- Rivera GK, Raimondi SC, Hancock ML et al. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukaemia with reinforced early treatment and rotational combination chemotherapy. *Lancet* 1991;337:61-66.
- 118- Chen C-S, Sorensen PHB, Domer PH et al. Molecular rearrangements on chromosome 11q23 predominate in infant acute lymphoblastic leukemia and are associated with specific biologic variables and poor outcome. *Blood* 1993;81:2386-93.
- 119- Cimino G, Lo Coco F, Biondi A, et al. ALL-1 gene at chromosome 11q23 is consistently altered in acute leukemia of early infancy. *Blood* 1993;82:544-6.
- 120- Pui CH, Behm FG, Downing JR et al. 11q23/MLL rearrangement confers a poor prognosis in infants with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1994;12:909-15.
- 121- Cimino G, Rapanotti MC, Rivolta A et al. Prognostic relevance of ALL-1 gene rearrangement in infant acute leukemias. *Leukemia* 1995;9:391-5.
- 122- Taki T, Ida K, Bessho F et al. Frequency and clinical significance of the MLL gene rearrangement in infant acute leukemia. *Leukemia* 1996;10:1303-7.
- 123- Pui CH, Behm FG, Raimondi SC et al. Secondary acute myeloid leukemia in children treated for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 1989;321:136-42.
- 124- Behm FG, Raimondi SC, Frestedt JL et al. Rearrangements of the MLL gene confers a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia, regardless of presenting age. *Blood* 1996;87:2870-7.
- 125- Begley CG, Aplan PD, Davey MP et al. Chromosomal translocation in a human leukemic stem-cell line disrupts the T-cell antigen receptor delta-chain diversity region and results in a previously unreported fusion transcript. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2031-5.
- 126- Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994;266:1281-8.
127. Levine AJ. P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88:323-31.
- 128- Malkin D, Li FP, Strong LC et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 1990;250:1233-8.
- 129- Wada M, Bartram CD, Nakamura H, et al. Analysis of p53 mutations in a large series of lymphoid hematologic malignancies of childhood. *Blood* 1993;82:3163-9.
- 130- Hsiao MH, Yu AL, Yeargin J et al. Nonhereditary p53 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia are associated with the relapse phase. *Blood* 1994;83:2922-30.
- 131- Qesnel B, Preudhomme C, Philippe N et al. P16 gene homozygous deletions in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995;85:657-63.
- 132- Pui Ch, Crist WM. Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr* 1994;124:491.

- 133- Pui CH. Childhood leukemias. *N Engl J Med* 1995;332:1618.
- 134- Wiersma SR, Ortega J, Sobel E, Weinberg KI. Clinical importance of myeloid antigen expression in acute lymphoblastic leukemia of childhood. *N Engl J Med* 1991;324:800.
- 135- Bosanquet AG. Correlations between therapeutic response of leukaemias and in-vitro drug sensitivity assay. *Lancet* 1991;337:711.
- 136- Pieters R, Huismans DR, Loonen AH, Hahlen K, van der Does-van den Berg A, van Wering ER, Veerman ALP. Relation of cellular drug resistance to long term clinical outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 1991;338:399.
- 137- Hongo T, Fujii Y, Igarashi Y. An in vitro chemosensitivity test for the screening of anti-cancer drugs in childhood leukemia. *Cancer* 1990;65:1263.
- 138- Kaspers GJL, Smets LA, Pieters R, van Zantwijk CH, van Wering ER, Veerman ALP. Favorable prognosis of hyperdiploid common acute lymphoblastic leukemia may be explained by sensitivity to antimetabolites and other drugs: Results of an in-vitro study. *Blood* 1995;85:751.
- 139- Pieters R, Kaspers GJL, van Weering ER, Huismans DR, Loonen AH, Hahlen K, Veerman ALP. Cellular drug resistance profiles that might explain the prognostic value of immunophenotype and age in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1993;7:392.
- 140- Kaspers GJL, Kardos G, Pieters R et al. Different cellular drug resistance profiles in childhood acute lymphoblastic and non-lymphoblastic leukemia. A preliminary report. *Leukemia* 1994;8:1224.
- 141- Hongo T, Yajima S, Sakurai M, Horikosgi Y, Hanada R. In vitro drug sensitivity testing can predict induction failure and early relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1997 ; 89(8):2959-2965.
- 142- Abolhoda A, Wilson AE, Ross H, Danenberg PV, Burt M, Scotto KW. Rapid activation of MDR1 gene expression in human metastatic sarcoma after in vivo exposure to daunorubicin. *Clin Cancer Res* 1999;5:3352-3356.
- 143- List AF, Kopecky KJ, Willman CL, et al. Benefit of cyclosporin(CsA) modulation of anthracycline resistance in high risk AML: A Southwest Oncology Group (SWOG) study. *Blood* 1998;92(suppl1):213.
- 144- Kamen BA, Holcenberg JS, Turo K, et al. Methotrexate and folate content of erythrocytes in patients receiving oral vs. intramuscular therapy with methotrexate. *J Pediatr* 1984;104:131-133.
- 145- Chessells JM, Leiper AD, Tiedemann K, et al. Oral methotrexate is as effective as intramuscular in maintenance therapy of acute lymphoblastic leukemia. *Arch Dis Child* 1987;62:172-176.
- 146- Synold TW, Relling MV, Boyett JM, et al. Blast cell methotrexate-polyglutamate accumulation in vivo differs by lineage, ploidy, and methotrexate dose in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest* 1994;94:1996-2001.
- 147- Whitehead VM, Vuchich MJ, Lauer SJ, et al. Accumulation of high levels of methotrexate polyglutamates in lymphoblasts from children with hyperdiploid(greater than 50 chromosomes) B-lineage acute lymphoblastic leukemia: A Pediatric Oncology Group study. *Blood* 1992;80:1316-1323.

- 148- Koren G, Ferranzini G, Sulh H, et al. Systemic exposure to mercaptopurine as a prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia in children. *N Engl J Med* 1990;323:17-21.
- 149- Schmiegelow K, Schroder H, Gustaffsson G, et al. Risk of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia is related to RBC methotrexate and mercaptopurine metabolites during maintenance chemotherapy. *J Clin Oncol* 1995;13:345-351.
- 150- Gametchu B, Watson CS. Plasma membrane associated glucocorticoid hormone receptor in human acute leukemic patients: clinical implication, in Gametchu B(ed): *Glucocorticoid Receptor Structure and Leukemic Cell Responses*. Austin, TX, R.G. Landes, 1995:163-176.
- 151- Relling MV, Hannock ML, Boyett JM, Pui CH, Evans WE. Prognostic importance of 6-mercaptopurine dose intensity in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1999;93:2817-2823.
- 152- Relling MW, Rubnitz JE, Rivera GK et al. High incidence of secondary brain tumors in children with acute lymphoblastic leukemia related to antimetabolite therapy. *Blood* 1998;92(suppl1):607.
- 153- Krynetski EY, Evans WE. Pharmacogenetics of cancer therapy: getting personal. *Am J Hum Genet* 1998;63:11-16.
- 154- Jacquilar C, Weil M, Gemon M-F et al. Combination therapy in 130 patients with acute lymphoblastic leukemia (Protocol 06 LA 66-Paris). *Cancer Res* 1973;33:3278-84
- 155- Miller DR, Leikin S, Albo V et al. Use of prognostic factors in improving the design and efficiency of clinical trials for childhood leukemia: Childrens Cancer Study Group report. *Cancer Treat Rep* 1980;64:381-92.
- 156- Miller DR, Leikin S, Albo V, Sather H, Karon M, Hammond D. Prognostic factors and therapy in acute lymphoblastic leukemia of childhood: CCG-141 report from Children's Cancer Study Group. *Cancer* 1983;51:1041-9.
- 157- Hammond D, Sather H, Nesbit M et al. *Med Pediatr Oncol* 1986;14:124-34.
- 158- Miller DR, Coccia PF, Bleyer WA et al. Early response to induction therapy as a predictor of disease free survival and late recurrence of childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from Children's Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 1989;7:1807.
- 159- Steinherz BG, Gaynon PS, Breneman JC et al. Cytoreduction and prognosis in acute lymphoblastic leukemia: the importance of early marrow response. Report from the Children's Cancer Group. *J Clin Oncol* 1996;14:389-98.
- 160- Hutchinson R, Bertolone S, Cooper H et al. Early marrow response predicts outcome for patients with low-risk ALL: results of CCG-1881(abstract 1051). *Proc Am Soc Clin Oncol* 1994;13:319.
- 161- Chessells JM, Bailey C, Richards SM. Intensification of treatment and survival in all children with lymphoblastic leukemia: results of the UK Medical Research Council trial UKALL X. *Lancet* 1995;345:143-8.
- 162- Gaynon PS, Bleyer WA, Steinherz PG et al. Day 7 marrow response and outcome for children with acute lymphoblastic leukemia and outcome for children

with acute lymphoblastic leukemia and unfavorable presenting features. *Med Pediatr Oncol* 1990;18:273-9.

163- Rautonen J, Hovi I, Siimes MA. Slow disappearance of peripheral blast cells; an independent risk factor indicating poor prognosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1988;71:989-91.

164- Riehm H, Feickert HJ, Schrappe M, Henze G, Schellong G. Therapy results in five ALL-BFM studies since 1970: implications of risk factors for prognosis. *Hematol Bluttransfus* 1987;30:139-46.

165- Arico M, Basso G, Mandelli F et al. Good steroid response in vivo predicts a favorable outcome in children with T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 1995;75:1684-93.

166-Reiter A, Schrappe M, Ludwig WD et al. Chemotherapy in 998 unselected acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86. *Blood* 1994;84(9):3122-3133.

167-Schrappe M, Reiter A, Riehm H. Cytoreduction and prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1996;14:2403.

168- Wasserman R, Galili N, Ito Y et al. Residual disease at the end of induction therapy as a predictor of relapse during therapy in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1992;10:1879-88.

169- Uçkun FM, Kersey JH, Haake R, Weisdorf D, Nesbit ME, Ramsay NKC. Pretransplantation burden of leukemic progenitor cells as a predictor of relapse after bone marrow transplantation for acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1993;329:1296-1301.

170- Brisco MJ, Condon J, Hughes E et al. Outcome prediction in childhood acute lymphoblastic leukemia by molecular quantification of residual disease at the end of induction. *Lancet* 1994;343:196-200.

171- Cave H, van der Werff ten Bosch, Suciú S et al. For the European Organization for Research and Treatment of Cancer-Childhood Leukemia Cooperative Group. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1998;339:591-598.

172-van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Lancet* 1998;352:1731-1738.

173- Evans PA, Short MA, Owen RG et al. Residual disease detection using fluorescent polymerase chain reaction at 20 weeks of therapy predicts clinical outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1998;16:3616-3627.

174- Gruhn B, Hongeng S, Yi H, Hancock ML, Rubnitz JE, Neale GA, Kitchingman GR. Minimal residual disease after intensive induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia predicts outcome. *Leukemia* 1998;12:675-681.

175- Goulden NJ, Knechtli CJ, Garland RJ, Langlands K, Hancock JP, Potter MN. Minimal residual disease analysis for the prediction of relapse in children with standard-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1998;100:235-244.

- 176- Knechtli CJ, Goulden NJ, Hancock JP et al. Minimal residual disease status as a predictor of relapse after allogeneic bone marrow transplantation for children with standard risk acute lymphoblastic leukemia. *Br J Hematol* 1998;102:860-871.
- 177- Pui CH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1998;339:605-614.
- 178- Neale GA, Coustan-Smith E, Pan Q et al. Detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia with immunologic disease in childhood acute lymphoblastic leukemia with immunologic and molecular methods: a comparative study. *Blood* 1998;92(suppl1):394.
- 179- Birkebaek NH, Fisker S, Clausen N et al. Growth and endocrinological disorders up to 21 years after treatment for acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Med Pediatr Oncol* 1998;30:351-356.
- 180- Stubberfield TG, Bryne GC, Jones TW et al. Growth and growth hormone secretion after treatment for acute lymphoblastic leukemia in childhood, 18-Gy versus 24-Gy cranial irradiation. *J Pediatr Hematol Oncol* 1995;17:167-171.
- 181- Leiper AD, Stanhope R, Kitching P et al. Precocious and premature puberty associated with treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Arch Dis Child* 1987;62:1107-1112.
- 182- Smibert E, Anderson V, Godber T et al. Risk factors for intellectual and educational sequela of cranial irradiation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Br J Cancer* 1996;73:825-830.
- 183- Waber DP, Tarbell NJ, Kahn CM et al. The relationship of sex and treatment modality to neuropsychologic outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1992;10:810-817.
- 184- Kaleita TA, Reaman GH, MacLean WE et al. Neurodevelopmental outcome of infants with acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group report. *Cancer* 1999;85:1859-1865.
- 185- Sklar CA, Robison LL, Nesbit ME et al. Effects of radiation on testicular function in long term survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. a report from the Children's Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 1990;8:1981-1987.
- 186- Mills JL, Fears TR, Robison LL et al. Menarche in a cohort of 188 long term survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr* 1997;131:598-602.
- 187- Silber JH, Jakacki RI, Larsen R et al. Increased risk of cardiac dysfunction after anthracyclines in girls (comments). *Med Pediatr Oncol* 1993;21:477-479.
- 188- Lipshultz SE, Lipsitz SR, Mone SM, et al. Female sex and drug dose as risk factors for late cardiotoxic effects of doxorubicin therapy for childhood childhood cancer (comments). *N Engl J Med* 1995;332:1738-1743.
- 189- Steinherz LJ, Steinherz PG, Tan C. Cardiac failure and dysrhythmias 6-19 years after anthracycline therapy: a series of 15 patients. *Med Pediatr Oncol* 1995;24:352-361.
- 190- Lipshultz SE, Colan SD, Gelber RD et al. Late cardiac effects of doxorubicin therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood (comments). *N Engl J Med* 1991;324:808-815.

- 191- Neglia J, Mertens A, Yasui Y et al. Risk of second primary neoplasms (SPNs) in survivors of childhood cancer: initial analysis of the childhood cancer survivor study (CCSS). In proceedings of the American Society of Clinical Oncology 1999. Atlanta GA: American Society of Clinical Oncology, 1999:557.
- 192- Walter AW, Hancock ML, Pui CH et al. Secondary brain tumors in children treated for acute lymphoblastic leukemia at St Jude Children's Research Hospital. *J Clin Oncol* 1998;16:3761-3767.
- 193- Neglia JP, Meadows AT, Robison LL, et al. Second neoplasms after acute lymphoblastic leukemia in childhood. *N Engl J Med* 1991;325:1330-1336.
- 194- Socie G, Curtis RE, Deeg HJ, et al. New malignant disease after allogeneic bone marrow transplantation for childhood acute leukemia. *J Clin Oncol* 2000;18:348-357.
- 195- Reling MW, Rubnitz JE, Rivera GK. High incidence of secondary brain tumors after radiotherapy and antimetabolites. *Lancet* 1999; 354:34-39.
- 196- Bhatia S, Davies SM, Robison LL. Leukemia. In *Multiple Primary Cancers*. Edited by Neugut AI, Meadows AT, Robison E. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, Inc. 1999:257-275.
- 197- Ojala AE, Paakko E, Lanning FP, et al. Osteonecrosis during the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia: a prospective MRI study. *Med Pediatr Oncol* 1999;32:11-7.
- 198- DNA measurement by flow cytometry: Improved by automated sample preparation techniques. In: *Technical Monograph Cytometry*, Coulter Corporation, USA, 1991.
- 199- Koss LG, Greenbaum E. Measuring DNA in human cancer. *JAMA* 1986;255:3158-3159
- 200- Cycle TEST™ Plus DNA reagent Kit technical monograph. Becton Dickinson Immunocytometry Systems (BDIS), 1994, San Jose, California.
- 201- Lovett EJ. Application of flow cytometry to diagnostic pathology. *Lab Invest* 1984;50(20):115-140.
- 202- Riley RS, Mahin EJ. Clinical applications of human solid tumors. ASCP workshop-9072, ASCP National Meeting, Fall 1989, Washington, D.C.
- 203- Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Invest.* 21 (Suppl.97); 77, 1968.
- 204- Bone Marrow and Stem Cell Processing: A Manual of Current Techniques, Areman, Sacher, Deeg, F.A. Davis Company, 1992.
- 205- Barile MF. In: *Cell Culture and its Applications*; R Acton, JD Lynn, et al.; Academic Press, New York, pp 291, 1975.
- 206- Vindelov LL, Christensen IJ, Nissen NI. A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry*, 1983; 3 : 323-327.
- 207- Vindelov LL, Christensen IJ, Jensen G, Nissen NI. Limits of detection of nuclear DNA abnormalities by flow cytometric DNA analysis. Results obtained by a set of methods for sample-storage, staining, and internal standardization. *Cytometry*, 1983;3 : 332-339.

- 208- Humason, GL. Staining hematologic elements and related tissues. In: Bartlett AC, ed. *Animal Tissue Techniques*. San Francisco: W.H. Freeman & Company; 1979: 229-230.
- 209- Martens, et al. The fluorescence intensity of propidium iodide bound to DNA depends on the concentration sodium chloride. *Cytometry*, 1981; 2 : 24-25.
- 210- Çevik N, Olgun N. IX Ulusal Kanser ve VI Pediatrik Tümörler Kongresi kayıtları, 2-7 Haziran 1991, İzmir.
- 211-Sather H, Miller D, Nesbit M, Heyn R and Hammond DG. Differences in prognosis for boys and girls with acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 1981;i:741-743.
- 212- Lanning M, Garwicz S, Hertz H et al. Superior treatment results in females with high-risk acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Acta Paediatrica Scandinavica* 1992;81:66-68.
- 213- Tubergen DG, Gilchrist GS, O'Brien RT et al. Improved outcome with delayed intensification for children with acute lymphoblastic leukemia and intermediate presenting features: Childrens Cancer Group phase III trial. *J Clin Oncol* 1993;11:527-537.
- 214- Gaynon PS, Steinherz PG, Bleyer WA et al. Improved therapy for children with acute lymphoblastic leukemia and unfavourable presenting features: a follow-up report on the Children's Cancer Group Study CCG-106. *J Clin Oncol* 1993;11:2234-2242.
- 215- Pui CH, Simone JV, Hancock ML et al. Impact of three methods of treatment intensification on acute lymphoblastic leukemia in children: long term results of St Jude Total Therapy Study X. *Leukemia* 1992;6:150-157.
- 216- Niemeyer CM, Reiter A, Riehm H, Donnelly M, Gelber RD, Sallan SE. Comparative results of two intensive treatment programs for childhood acute lymphoblastic leukemia: the Berlin-Frankfurt-Munster and Dana-Farber Cancer Institute protocols. *Ann Oncol* 1991;2:745-749.
- 217- Crist W, Carroll A, Shuster J, et al. Philadelphia chromosome positive childhood acute lymphoblastic leukemia. Clinical and cytogenetic characteristics and treatment outcome. A Pediatric Oncology Group Study. *Blood* 1990;76:489.
- 218- Pui CH, Frankel LS, Carroll AJ, et al. Clinical characteristics and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with the t(4:11)(q21;q23): A collaborative study of 40 cases. *Blood* 1991;77:440.
- 219- Wiersma SR, Ortega J, Sobel E et al. Clinical importance of myeloid-antigen expression in acute lymphoblastic leukemia of childhood. *N Engl J Med* 1991;324:800.
- 220- Pui CH, Schell MJ, Raimondi SC, et al. Myeloid-antigen expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1991;325:1378.
- 221- Pui CH, Carroll AJ, Raimondi SC et al. Clinical preparation, karyotypic characterization and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with a near-haploid or hypodiploid <45 line. *Blood* 1990;75:1170-1177.

- 222- Secker-Walker LM, Lawler SD, Hardisty LM. Prognostic implication of chromosomal findings in acute lymphoblastic leukemia at diagnosis. *Br Med J* 1978;2:1529-1530.
- 223- Pui Ch, Carroll AJ, Head D, et al. Near-triploid and near-tetraploid acute lymphoblastic leukemia of childhood. *Blood* 1990;76:590-596.
- 224-Tsurusawa M, Katano N, Kawai S, Fujimoto T, Maeda M. Prognostic implication of cellular DNA content in acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1988;10(1):75-80.
- 225- Buchner TH, Bloomfield CD, Hiddemann W et al. Tumor aneuploidy. Berlin:Springer – Verlag, 1985:53-69.
- 226- Patıroğlu T. Çocukluk çağı lösemilerinde DNA miktarı ve sentez faz fraksiyonunun prognozla ilişkisi. II. Ulusal Pediatrik Hematoloji Kongresi, 4-6 Ekim 1999, Antalya.
- 227- Stray J, Hrodek O, Hausner P, Petrakova A, Goetz P, Kreuger A. The importance of blast cell DNA content for prognosis of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Neoplasma* 1990;37(3):293-299.
- 228- Borgstrom GH, Teerenhovi L, Vuopio P, Anderson LC, Knuutila S, Elonen E, De La Chapelle A. Chromosome studies in acute lymphoblastic leukemia. *Scand J Hematol* 1981 ;26:241-251.
- 229- Mitelman F. ISCN: International system for human cytogenetic nomenclature. Basel, Switzerland, Karger, 1995).
- 230- Grimwade D, Walker H, Oliver F et al. Prognostic significance of cytogenetics in AML. *Blood* 1998;92(7):2322-2333),
- 231- Olah E, Balogh E, Kajtar P, Pajor L, Jakab Z, Kiss C. Diagnostic and prognostic significance of chromosome abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ann N Y Acad Sci* 1997 Sep 17;824:8-27)
- 232- Ciampi A, Hogg SA, Kates L. Stratification by stepwise regression, corresponding analysis, and recursive partitioning: A comparison of three models of survival analysis with covariates. *Comput Stat Data Anal* 1986;4:185-204.
- 233- Hart JS, George SL, Frei E III, Bodey GP, Nickerson RC, Freireich EJ. Prognostic significance of pretreatment proliferative activity in adult acute leukemia. *Cancer* 1977;39:1603.
- 234- Dosik GM, Barlogie B, Smith TL, Gehan EA, Keating MJ, McCredie KB, Freireich EJ. Pretreatment flow cytometry of DNA content in adult acute leukemia. *Blood* 1980;55:474.
- 235- Barlogie B, Keating MJ, McCredie KB, Freireich EJ. Biological and prognostic implications of bone marrow DNA and RNA cytometry in adult acute leukemia. *Blood* 1982; 60(suppl1):408.
- 236- Pinkel D. Genotypic classification of childhood acute lymphoid leukemia. *Leukemia* 1999;13(suppl 1):90-91.

EKLER

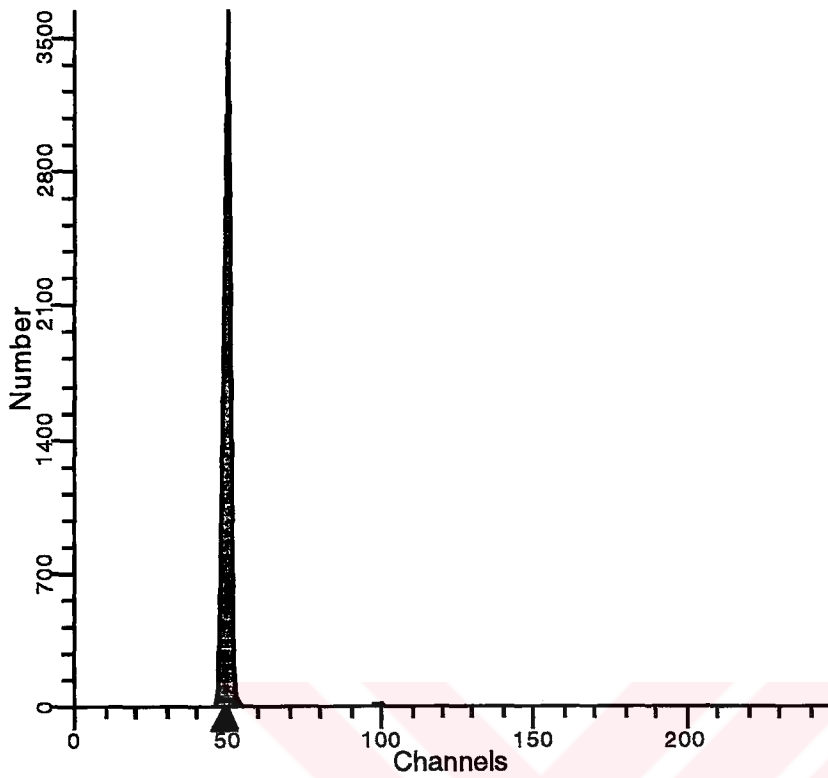
Ek 1- Hastaların demografik, klinik ve laboratuar verileri

Ek 2- Hastaların hücre siklüsü ve DNA analizi raporları



Hasta	Yaş	Cinsiyet	Kurum	Hepatomegali	KC boyutu (cm)	Splenomegali	Daak boyutu (cm)	RF	Redüslasyon bulguları	SSS bulguları	Hemoglobin (g/dl)	Hematokrit (%)	Leukosit (x10 ⁹ /L)	Trombosit (x10 ⁹ /L)	FAB	İmmünofenotip	Sitogenetik	Metafaz sayısı	Pr'de blast (%)	Moleküler analiz	Rifit grubu	Predefinisyon yöntemi	S gün Blast (mm ³)	İlk tanımlama	DNA İndeksi	Güçü
E.S.	4.50	Erkek	DEÜTF	Var	3.00	Var	4.00	1,15	Yok	Yok	13.20	38.50	21,9	11828	L1	Pre-pte B	Diploid	10	54.00	t(12;21)	MIRG	var	42	15. gün	1.17	92.26
A.T.T.	3.50	Erkek	DEÜTF	Var	6.00	Var	8.00	1,48	Yok	Yok	9.70	28.00	14,3	12155	L1	Pre B	.	.	85.00	.	MIRG	var	28	33. gün	.91	67.62
F.D.	4.50	Kız	DEÜTF	Var	2.00	Var	1.00	0,91	Yok	Yok	5.20	14.50	12,5	5625	L1	Pre-pte B	Diploid	11	45.00	Negatif	SRG	var	84	33. gün	1.00	84.99
S.P.	9.00	Erkek	DEÜTF	Var	6.50	Var	4.00	1,41	Yok	Yok	3.60	10.30	23,1	20790	L1	Pre-pte B	Metafaz yok	0	90.00	t(12;21)	MIRG	var	44	15. gün	1.00	95.67
E.Y.	6.00	Erkek	DEÜTF	Var	2.00	Var	3.00	1,18	Yok	Yok	7.00	19.80	60,9	52374	L1	Pre-pte B	Diploid	3	86.00	Negatif	MIRG	var	64	15. gün	1.00	92.90
A.Ö.	3.00	Erkek	DEÜTF	Yok	.00	Yok	.00	0,37	Yok	Yok	8.00	24.50	7,6	76	L2	Pre-pte B	Diploid	6	1.00	Negatif	MIRG	yok	1360	33. gün	1.00	86.43
D.G.	10.00	Kız	DEÜTF	Var	9.00	Var	11.00	1,28	Yok	Yok	10.00	34.40	1,3	26	L1	Pre B	Diploid	12	2.00	Negatif	MIRG	var	0	33. gün	1.00	93.21
K.Y.	11.00	Erkek	DEÜTF	Var	1.00	Yok	.00	0,7	Yok	Yok	7.80	24.50	4,2	1680	L2	Pre B	Diploid	3	40.00	Negatif	MIRG	var	64	33. gün	1.00	92.23
E.A.	10.60	Erkek	DEÜTF	Var	5.00	Var	7.00	1,1	Yok	Yok	4.90	19.30	5,4	432	L2	Pre B	Metafaz yok	0	8.00	t(12;21)	MIRG	var	0	33. gün	1.00	83.86
E.S.	3.75	Erkek	DEÜTF	Var	5.00	Yok	.00	1,24	Yok	Yok	9.20	26.80	60,1	54090	L1	T hücre	Diploid	11	90.00	Negatif	MIRG	var	105	15. gün	1.00	92.53
S.E.A.	3.00	Kız	DEÜTF	Var	1.00	Yok	.00	0,55	Yok	Yok	6.40	20.00	3,95	316	L1	Pre B	Metafaz yok	0	8.00	t(4;11)	HRG	var	19	33. gün	1.13	94.60
E.G.	3.75	Erkek	DEÜTF	Var	6.00	Var	8.00	1,7	Yok	Yok	6.60	19.30	27,1	21860	L1	Pre-pte B	Metafaz yok	0	80.00	Negatif	MIRG	var	80	15. gün	1.17	86.60
F.I.	2.50	Erkek	EÜTF	Var	1.00	Yok	.00	0,78	Yok	Yok	7.80	25.20	21,2	4240	L1	Pre-pte B	Metafaz yok	0	20.00	.	SRG	var	30	33. gün	1.00	98.15
O.Ö.	1.50	Erkek	EÜTF	Var	2.00	Yok	.00	1,14	Yok	Yok	4.50	15.40	14,4	136800	L1	Pre B	Metafaz yok	0	95.00	Negatif	HRG	yok	30000	45. gün	1.00	96.88
H.P.	13.00	Erkek	EÜTF	Yok	.00	Var	15.00	1,68	Yok	Yok	5.80	17.00	22,2	210800	L1	T hücre	Metafaz yok	0	95.00	.	MIRG	var	100	33. gün	1.00	89.78
A.Y.	10.00	Erkek	EÜTF	Yok	.00	Yok	.00	0,47	Yok	Yok	11.70	35.00	7,5	225	L2	Pre B	Metafaz yok	0	3.00	.	MIRG	var	10	33. gün	1.71	82.89
E.G.	4.00	Erkek	SSK	Yok	.00	Var	4.00	0,93	Yok	Yok	7.80	22.00	16,8	7560	L1	Pre B	Metafaz yok	0	45.00	.	SRG	var	0	33. gün	1.00	92.44
A.R.C.	10.00	Erkek	SSK	Yok	.00	Yok	.00	0,52	Yok	Yok	7.90	34.30	4,3	430	L1	Pre B	Diploid	8	10.00	.	MIRG	var	210	33. gün	1.00	93.29
H.A.Ş.	7.00	Erkek	SSK	Var	2.00	Var	4.00	1,3	Yok	Yok	8.60	24.50	13,3	126350	L1	Pre-pte B	Metafaz yok	0	95.00	Negatif	MIRG	var	248	33. gün	1.14	44.21
G.D.	14.00	Erkek	SSK	Var	4.50	Var	4.50	1,25	Yok	Yok	8.40	27.10	16,8	10920	L1	Pre B	.	.	65.00	.	MIRG	var	150	33. gün	1.15	70.90
S.D.	2.00	Erkek	SSK	Var	5.00	Yok	.00	1,1	Yok	Yok	4.60	17.80	20	11000	L1	Pre B	.	.	55.00	.	SRG	var	130	33. gün	1.16	91.50
İ.K.	8.00	Kız	BUÇH	Var	5.00	Var	6.00	1,21	Yok	Yok	4.30	13.60	5	2400	L1	Pre B	.	.	48.00	.	SRG	var	160	33. gün	1.00	95.52
E.D.	2.00	Kız	BUÇH	Var	5.00	Var	3.00	1,17	Yok	Yok	6.60	18.20	7,1	5680	L1	Pre B	Diploid	5	80.00	Negatif	SRG	var	590	33. gün	1.00	89.81
N.O.	2.50	Kız	BUÇH	Yok	.00	Yok	.00	0,61	Yok	Yok	3.60	10.40	6,1	1220	L1	Pre B	Diploid	3	20.00	.	SRG	var	600	33. gün	1.00	86.73
O.D.	1.50	Erkek	BUÇH	Var	4.00	Var	1.00	1,2	Yok	Yok	6.50	19.10	50,6	41998	L1	Pre B	Metafaz yok	0	83.00	.	MIRG	yok	1498	33. gün	1.00	98.28

Hafta	3 Hafta	GZE	CV	RCS	Debris	Agregat	Hücre sayıları	KT protokolü	CALLA	Myxobolus Arifian	13 gün K1	relaps	Farklı süreler (ay)	Son durum
E.S.	5.52	2.22	1.36	1.39	.06	1.56	19188	BFM-95	negatif	negatif	remisyon	yok	6.00	sağ
A.T.T.	30.79	1.59	2.98	2.68	.00	1.54	24140	BFM-95	pozitif	negatif	remisyon	yok	1.00	sağ
F. D.	4.46	.55	1.51	2.64	.10	3.75	18631	BFM-95	pozitif	negatif	remisyon	yok	8.00	sağ
S. P.	2.07	2.26	2.42	4.61	.15	1.84	18360	BFM-95	pozitif	negatif	remisyon	yok	14.00	sağ
E.Y.	5.44	1.66	1.57	2.11	.08	4.02	18418	BFM-95	pozitif	negatif	remisyon	yok	10.00	sağ
A. Ö.	3.14	.43	1.49	2.03	.10	4.22	18681	BFM-95	negatif	pozitif	remisyon	yok	12.00	sağ
D.G.	6.14	.65	1.89	2.92	.11	1.78	23375	BFM-95	pozitif	negatif	remisyon	yok	15.00	sağ
K.Y.	5.93	1.84	2.31	3.91	.08	.80	18742	BFM-95	pozitif	negatif	remisyon	yok	14.00	sağ
E. A.	11.53	4.81	2.72	3.60	.07	1.97	22848	BFM-95	negatif	negatif	remisyon	yok	12.00	sağ
E.S.	5.88	1.59	2.27	2.41	.00	1.73	23925	BFM-95	pozitif	negatif	remisyon	yok	10.00	sağ
S.E.A.	2.29	3.11	1.41	3.50	.09	3.01	18379	BFM-95	pozitif	pozitif	remisyon	yok	11.00	sağ
E.G.	5.30	6.11	1.79	5.27	.24	1.58	17514	BFM-95	pozitif	negatif	remisyon	yok	3.00	sağ
F.İ.	1.65	.01	2.40	4.84	.51	9.04	17086	BFM-95	pozitif	negatif	remisyon	yok	4.00	sağ
O.Ö.	.36	.78	2.42	1.41	.03	.63	24220	BFM-95	negatif	pozitif	remisyon yok	yok	6.00	sağ
H.P.	6.43	3.79	1.75	1.76	.13	.00	18819	BFM-95	pozitif	negatif	remisyon	yok	6.00	sağ
A.Y.	15.18	1.94	3.21	4.51	.35	3.38	17844	BFM-95	pozitif	negatif	remisyon	yok	7.00	sağ
E. G.	7.21	.36	2.54	2.98	.22	4.01	17977	BFM-95	pozitif	negatif	remisyon	yok	5.00	sağ
A. R.C.	5.09	1.61	2.39	4.48	.18	1.73	18236	BFM-95	pozitif	negatif	remisyon	yok	3.00	sağ
H.A.Ş.	55.89	.10	3.42	4.31	.29	3.49	16972	BFM-95	pozitif	negatif	remisyon	yok	4.00	sağ
G.D.	26.36	2.72	1.56	9.90	.33	3.93	16976	BFM-95	pozitif	negatif	remisyon	yok	5.00	sağ
S.D.	8.48	.01	5.80	2.75	.18	.00	24232	BFM-95	pozitif	negatif	remisyon	yok	1.00	sağ
İ.K.	.58	3.90	2.42	4.89	.05	.00	18177	BFM-95	pozitif	negatif	remisyon	yok	1.50	ek
E.D.	7.24	2.65	1.94	1.76	.12	1.93	19290	BFM-95	pozitif	negatif	remisyon	yok	1.50	sağ
N.O.	10.23	3.04	2.57	2.31	.56	.00	24139	BFM-95	negatif	negatif	remisyon	yok	13.00	sağ
O.D.	1.11	.81	1.53	2.23	.20	6.49	18866	BFM-95	pozitif	negatif	remisyon	yok	10.00	sağ



Date acquired: 9-Jan-1
 File: Control MNCs.001
 Source: PBMNCs-09.01.01
 Case: Normal
 Analysis type: Automatic analysis
 Prep: Fresh/Frozen

DIPLOID: 100.00 %
 Dip G0-G1: 98.32 % at 49.77
 Dip G2-M: 0.61 % at 99.53
 Dip S: 1.07 % G2/G1: 2.00
 Dip %CV: 1.80

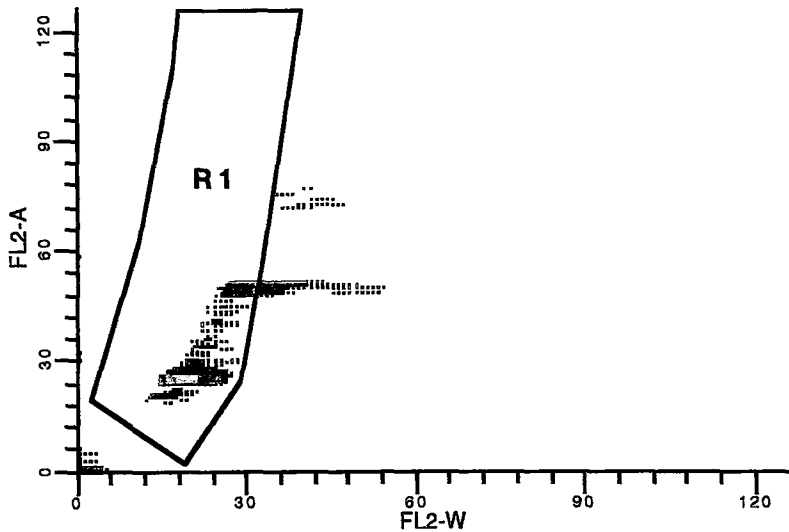
Total S-Phase: 1.07 %

Extra Pop: %
 Debris: 0.42 %
 Aggregates: 0.00 %
 Modeled Events: 9470
 RCS: 0.811

Diploid B.A.D.: 0.07 % no aggs

S-Phase Assessment:

Tissue Type: Kidney
 Model type: Diploid
 Diploid S: Low
 Calculated p-value: $p < 0.01$
 S-phase Boundaries: 5.0 and 10.0



Data acquired: 16-Jan-1
File: E.S. + MNCs
Source: E.S. + MNCs
Case: E.S.
Analysis type: Manual analysis
Prep: Fresh/Frozen

DIPLOID: 27.45 %
Dip G0-G1: 100.00 % at 49.71
Dip G2-M: 0.00 % at 99.43
Dip S: 0.00 % G2/G1: 2.00
Dip %CV: 1.63
ANEUPLOID 1: 72.55 %
An1 G0-G1: 92.26 % at 58.28
An1 G2-M: 2.22 % at 115.68
An1 S: 5.52 % G2/G1: 1.98
An1 %CV: 1.36
An1 DI: 1.17

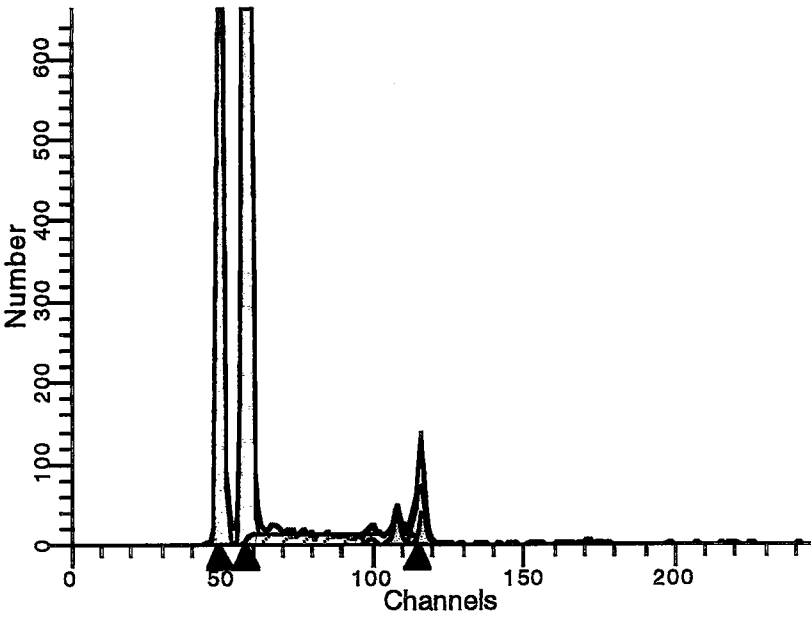
Total S-Phase: 4.00 %

Extra Pop: %
Debris: 0.06 %
Aggregates: 1.56 %
Modeled Events: 19188
RCS: 1.397

Diploid B.A.D.: 0.07 %

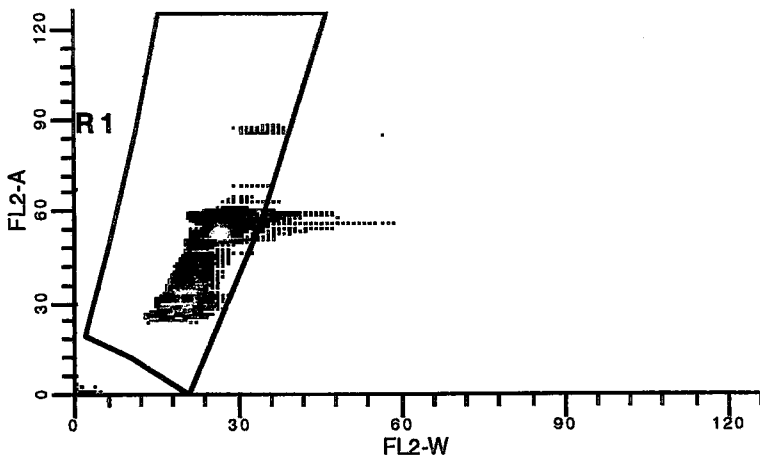
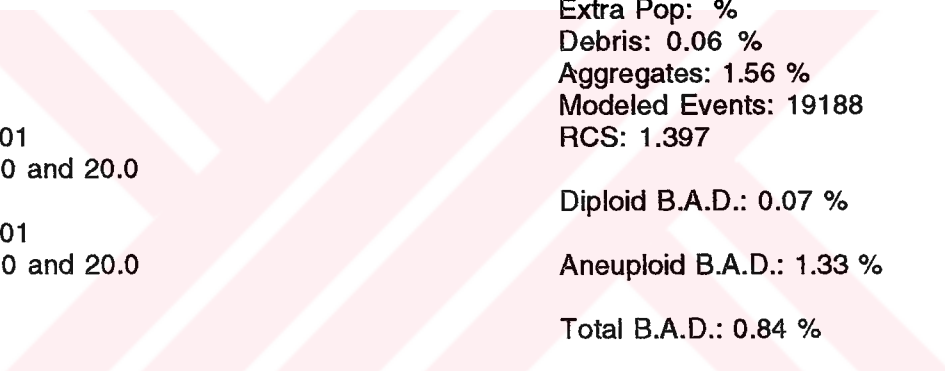
Aneuploid B.A.D.: 1.33 %

Total B.A.D.: 0.84 %



S-phase Assessment:

Issue Type: BMMNCs
Model type: Aneuploid
Aneuploid S: Low
Calculated p-value: $p < 0.01$
S-phase Boundaries: 10.0 and 20.0
Total S: Low
Calculated p-value: $p < 0.01$
S-phase Boundaries: 10.0 and 20.0



S-Phase Assessment:

Tissue Type: BMMNCs

Model type: Aneuploid

Aneuploid S: High

Calculated p-value: $p < 0.01$

S-phase Boundaries: 10.0 and 20.0

Total S: Low

Calculated p-value: $p < 0.01$

S-phase Boundaries: 10.0 and 20.0

Extra Pop: %

Debris: 0.00 %

Aggregates: 1.54 %

Modeled Events: 24140

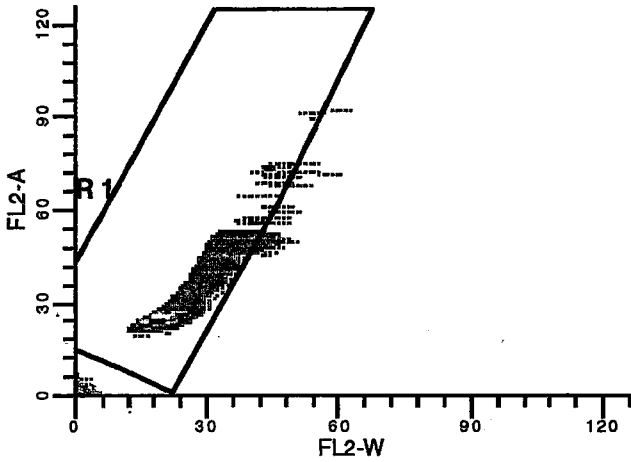
RCS: 2.686

Diploid B.A.D.: 1.28 %

Aneuploid B.A.D.: 0.12 %

Total B.A.D.: 0.16 %

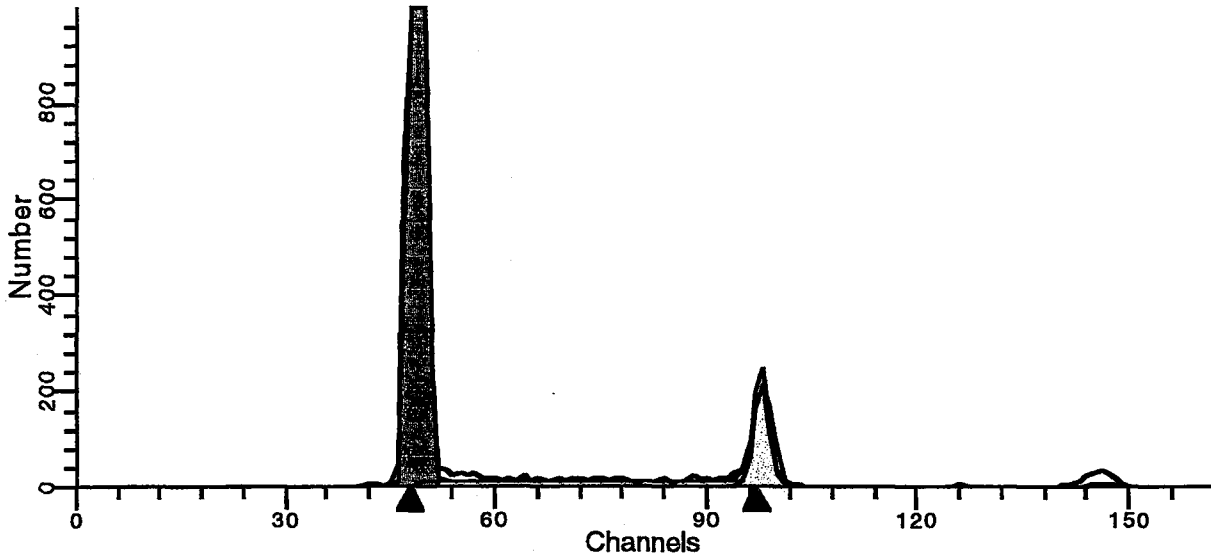
Apoptosis: 0.22 % Mean: 45.15



ModFILT V2.0(PMac)

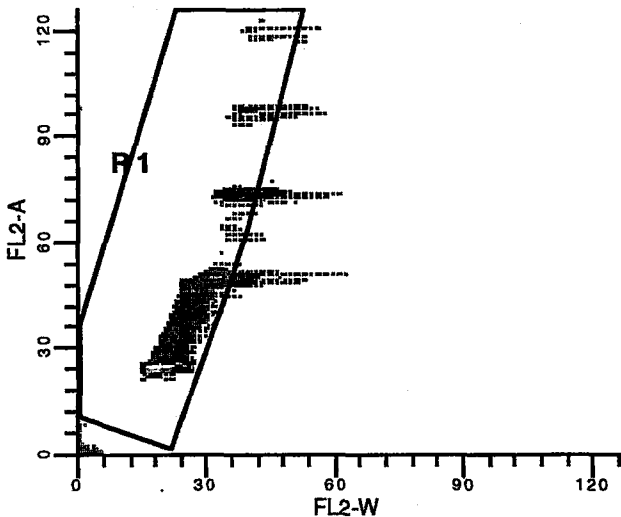
DOKUZ EYLUL UNIVERSITESI

Hematoloji-Onkoloji Laboratuvarı



S-Phase Assessment:
Tissue Type: BMMNCs
Model type: Diploid
Diploid S: Low to Intermediate
Calculated p-value: $p < 0.01$
S-phase Boundaries: 5.0 and 10.0

Data acquired: 22-Jan-1
File: F.D.+ MNCs
Source: F.D.+ MNCs
Case: F.D.
Analysis type: Manual analysis
Prep: Fresh/Frozen

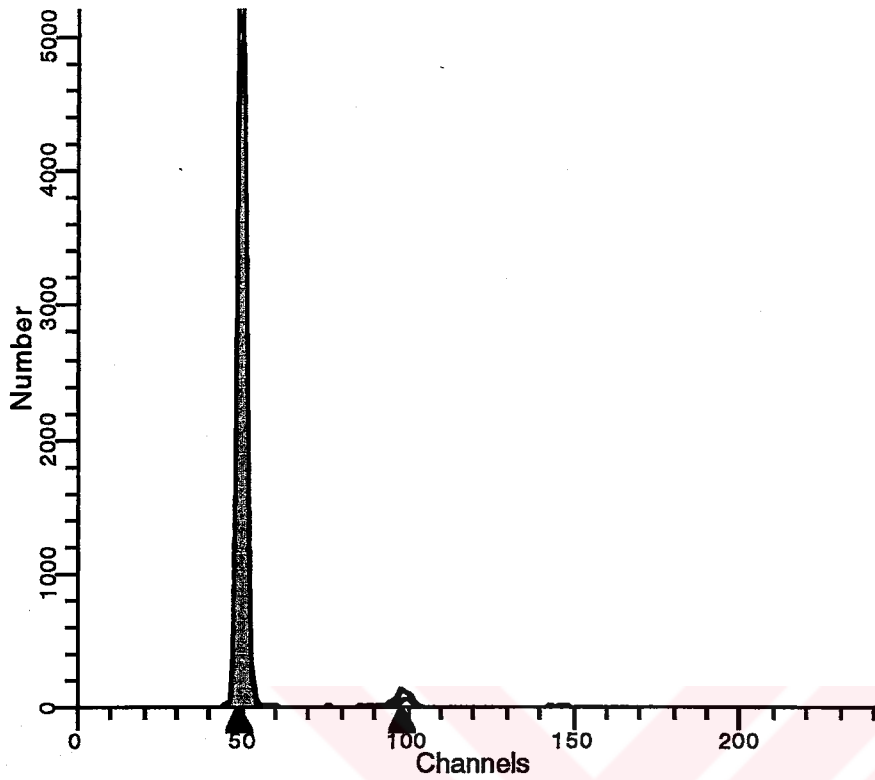


DIPLOID: 100.00 %
Dip G0-G1: 94.99 % at 48.87
Dip G2-M: 0.55 % at 97.74
Dip S: 4.46 % G2/G1: 2.00
Dip %CV: 1.51

Total S-Phase: 4.46 %

Extra Pop: %
Debris: 0.10 %
Aggregates: 3.75 %
Modeled Events: 18631
RCS: 2.642

Diploid B.A.D.: 1.40 %



Data acquired: 13-Jan-1
File: S.P.+ MNCs
Source: S.P.+ MNCs
Case: S.P.
Analysis type: Manual analysis
Prep: Fresh/Frozen

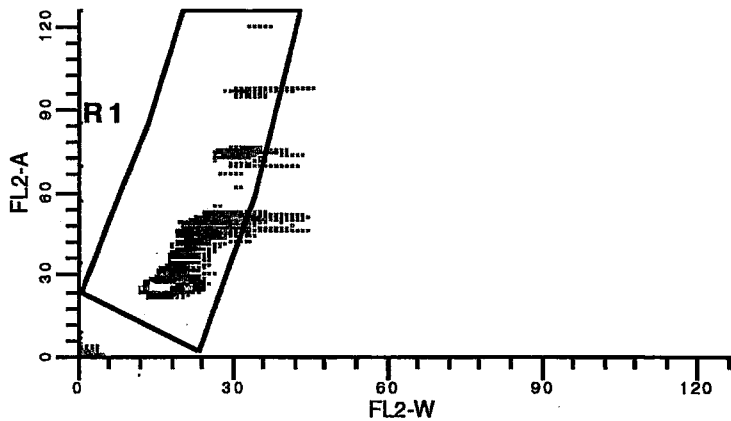
DIPLOID: 100.00 %
Dip G0-G1: 95.67 % at 49.86
Dip G2-M: 2.26 % at 98.33
Dip S: 2.07 % G2/G1: 1.97
Dip %CV: 2.42

Total S-Phase: 2.07 %

Extra Pop: %
Debris: 0.15 %
Aggregates: 1.64 %
Modeled Events: 18360
RCS: 4.614

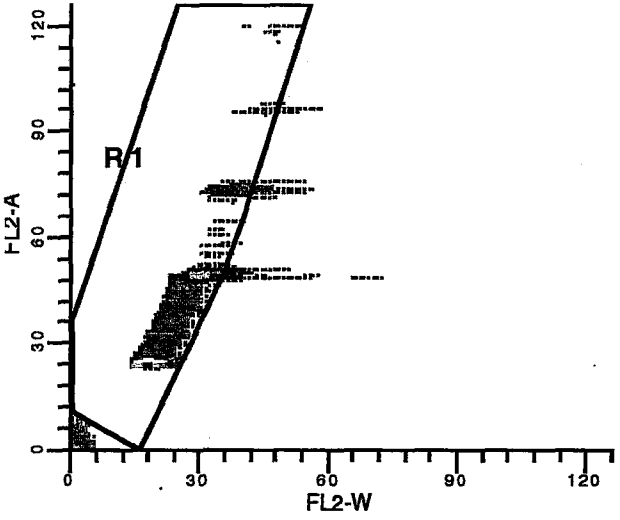
Diploid B.A.D.: 0.44 %

S-Phase Assessment:
Tissue Type: BMMNCs
Model type: Diploid
Diploid S: Low
Calculated p-value: $p < 0.01$
S-phase Boundaries: 5.0 and 10.0



Model type: Diploid
Diploid S: Intermediate
Calculated p-value: $p < 0.01$
S-phase Boundaries: 5.0 and 10.0

E.Y.+ JS
Source: E.Y.+ MNCs
Case: E.Y.
Analysis type: Manual analysis
Prep: Fresh/Frozen



DIPLOID: 100.00 %
Dip G0-G1: 92.90 % at 48.86
Dip G2-M: 1.66 % at 97.72
Dip S: 5.44 % G2/G1: 2.00
Dip %CV: 1.57

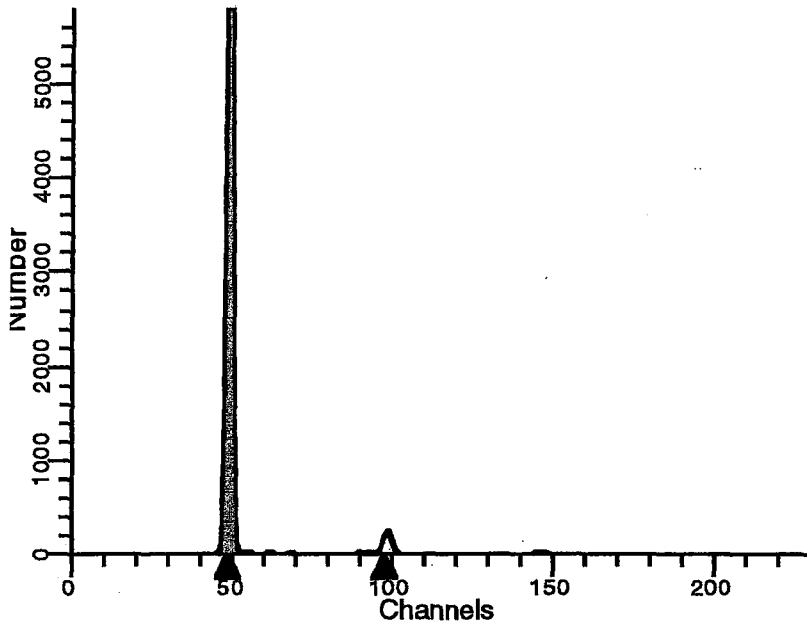
Total S-Phase: 5.44 %

Extra Pop: %
Debris: 0.08 %
Aggregates: 4.02 %
Modeled Events: 18416
RCS: 2.119

Diploid B.A.D.: 1.48 %

ModFILT V2.0(PMac)

Data acquired: 16-Jan-1
File:A.Ö.+ MNCs
Source: A.Ö.+ MNCs
Case: A.Ö.
Analysis type: Manual analysis
Prep: Fresh/Frozen



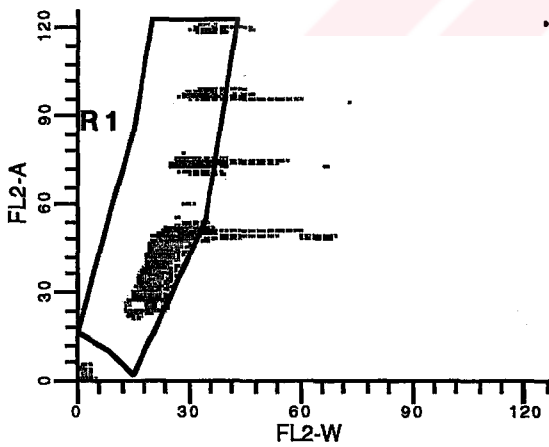
DIPLOID: 100.00 %
Dip G0-G1: 96.43 % at 49.48
Dip G2-M: 0.43 % at 100.48
Dip S: 3.14 % G2/G1: 2.03
Dip %CV: 1.49

Total S-Phase: 3.14 %

Extra Pop: %
Debris: 0.10 %
Aggregates: 4.22 %
Modeled Events: 18681
RCS: 2.038

Diploid B.A.D.: 3.71 %

S-Phase Assessment:
Tissue Type: BMMNCs
Model type: Diploid
Diploid S: Low
Calculated p-value: $p < 0.01$
S-phase Boundaries: 5.0 and 10.0



DOKUZ EYLUL UNIVERSITESI
Hematoloji-Onkoloji Laboratuvarı

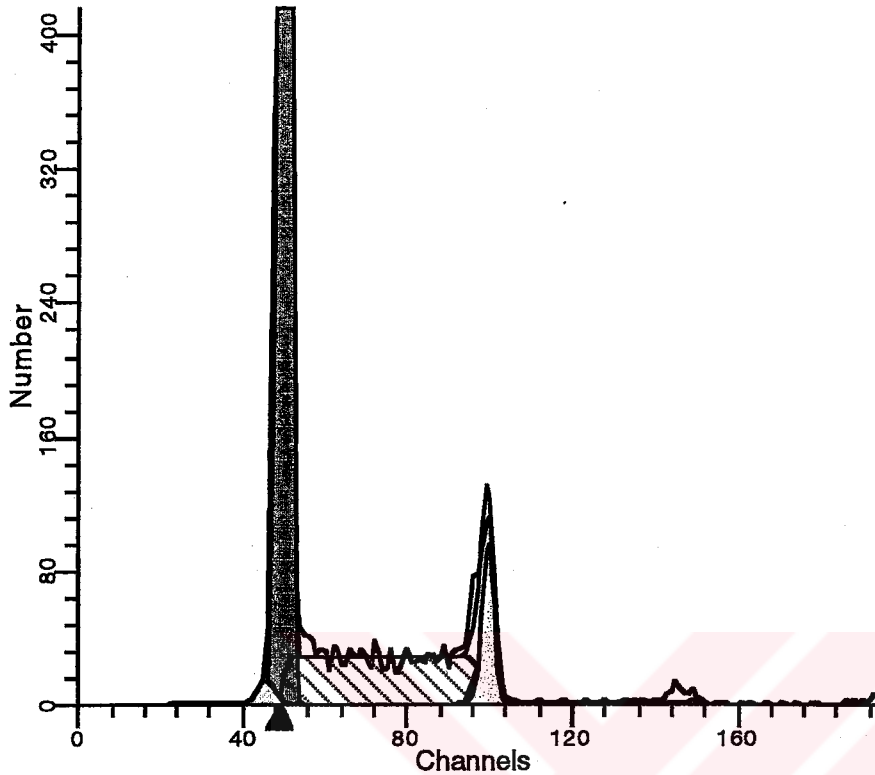
Data acquired: 26-Jan-1
 File:D.G.+ MNCs
 Source: D.G.+ MNCs
 Case: D.G.
 Analysis type: Manual analysis
 Prep: Fresh/Frozen

DIPLOID: 100.00 %
 Dip G0-G1: 93.21 % at 49.72
 Dip G2-M: 0.65 % at 98.39
 Dip S: 6.14 % G2/G1: 1.98
 Dip %CV: 1.89

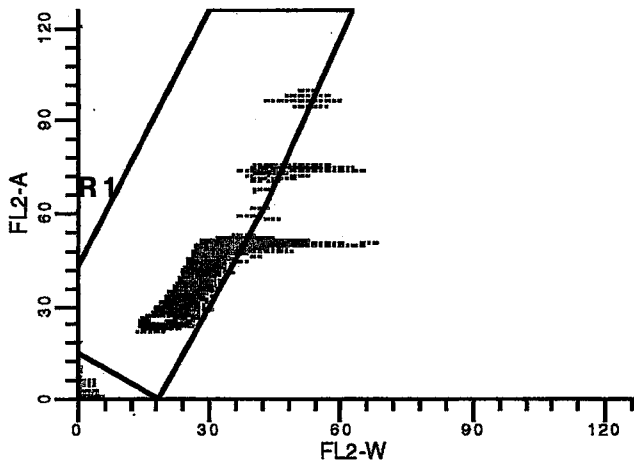
Total S-Phase: 6.14 %

Extra Pop: %
 Debris: 0.11 %
 Aggregates: 1.78 %
 Modeled Events: 23375
 RCS: 2.920

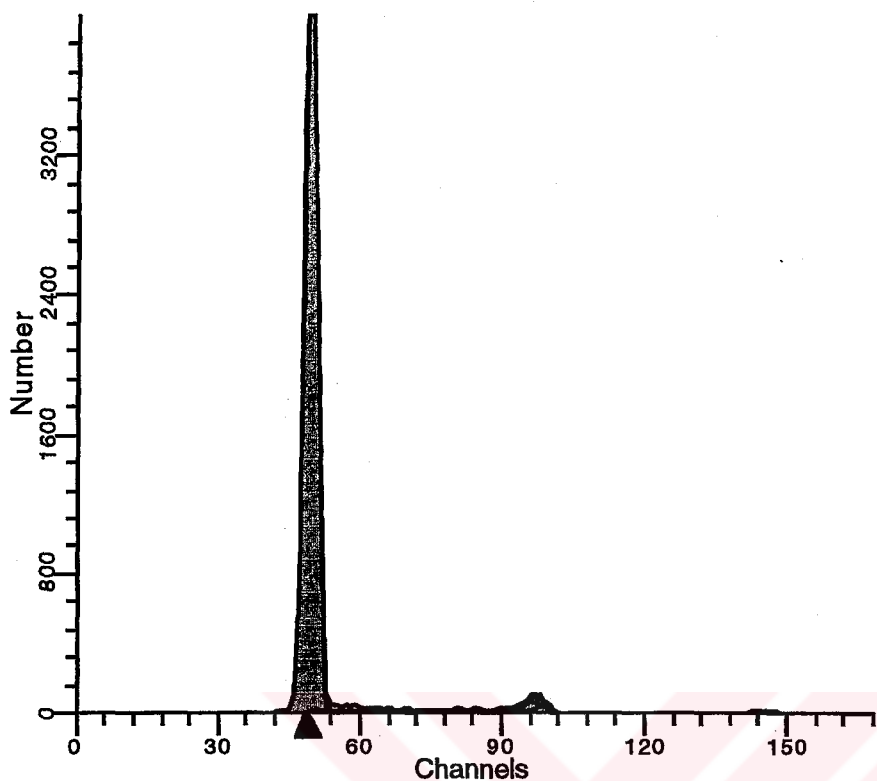
Diploid B.A.D.: 0.43 %
 Apoptosis: 0.34 % Mean: 45.72



S-Phase Assessment:
 Tissue Type: BMMNCs
 Model type: Diploid
 Diploid S: Intermediate
 Calculated p-value: $p < 0.01$
 S-phase Boundaries: 5.0 and 10.0



ModFitLT V2.0(PMac)



Data acquired: 13-Jan-1
File:K.Y.+ MNCs
Source: K.Y.+ MNCs
Case: K.Y.
Analysis type: Manual analysis
Prep: Fresh/Frozen

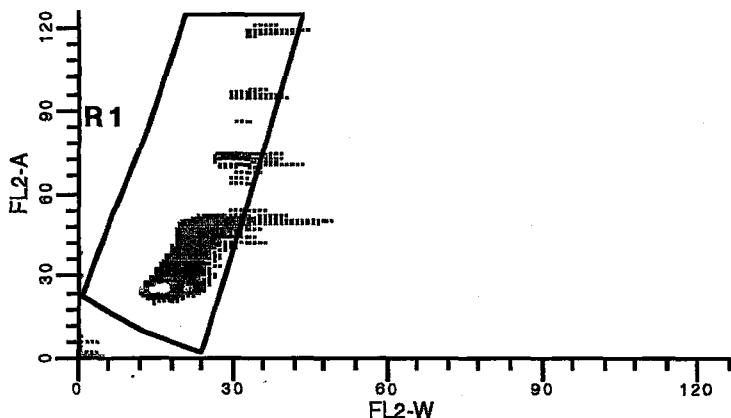
DIPLOID: 100.00 %
Dip G0-G1: 92.23 % at 49.38
Dip G2-M: 1.84 % at 96.58
Dip S: 5.93 % G2/G1: 1.96
Dip %CV: 2.31

Total S-Phase: 5.93 %

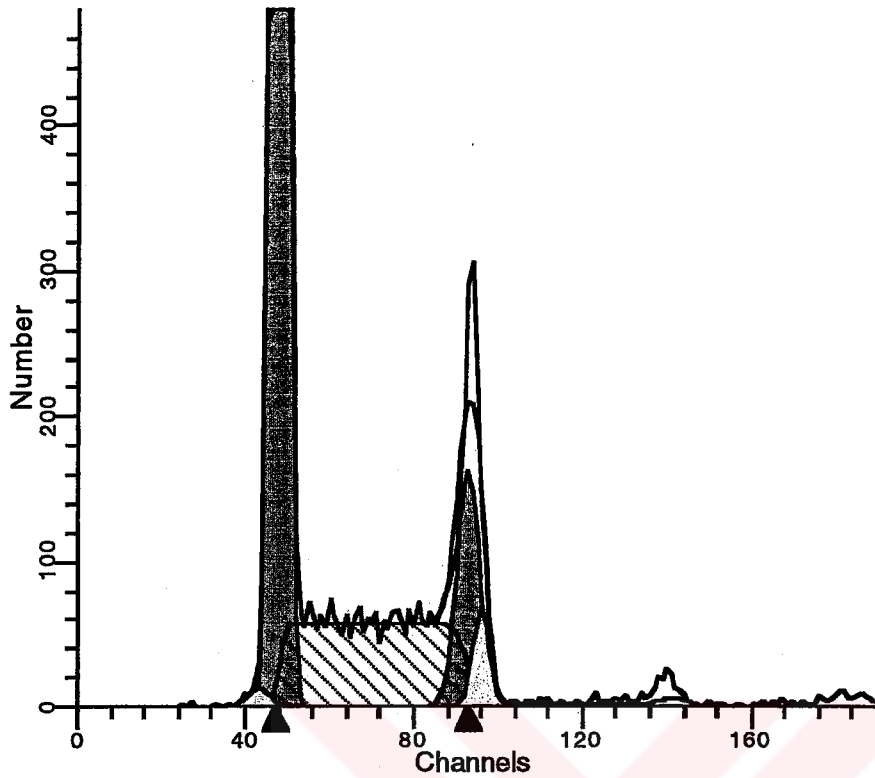
Extra Pop: %
Debris: 0.08 %
Aggregates: 0.80 %
Modeled Events: 18742
RCS: 3.916

Diploid B.A.D.: 0.07 %

S-Phase Assessment:
Tissue Type: BMMNCs
Model type: Diploid
Diploid S: Intermediate
Calculated p-value: $p < 0.01$
S-phase Boundaries: 5.0 and 10.0



DOKUZ EYLUL UNIVERSITESI
Hematoloji-Onkoloji Laboratuvarı



Data acquired: 26-Jan-1
File: E.A.+ MNCs
Source: E.A.+ MNCs
Case: E.A.
Analysis type: Manual analysis
Prep: Fresh/Frozen

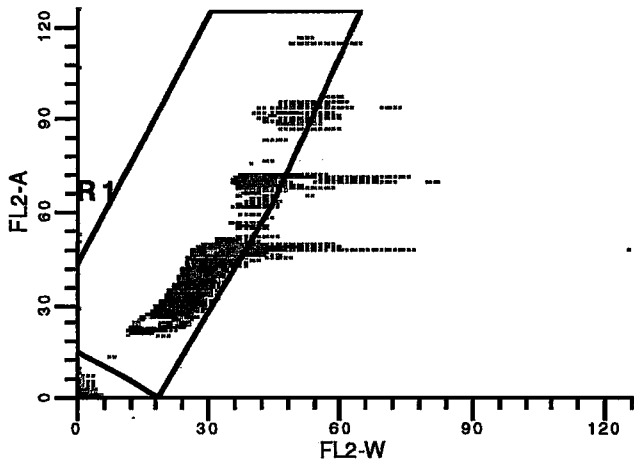
DIPLOID: 100.00 %
Dip G0-G1: 83.66 % at 47.97
Dip G2-M: 4.81 % at 92.82
Dip S: 11.53 % G2/G1: 1.93
Dip %CV: 2.72

Total S-Phase: 11.53 %

Extra Pop: %
Debris: 0.07 %
Aggregates: 1.97 %
Modeled Events: 22848
RCS: 3.905

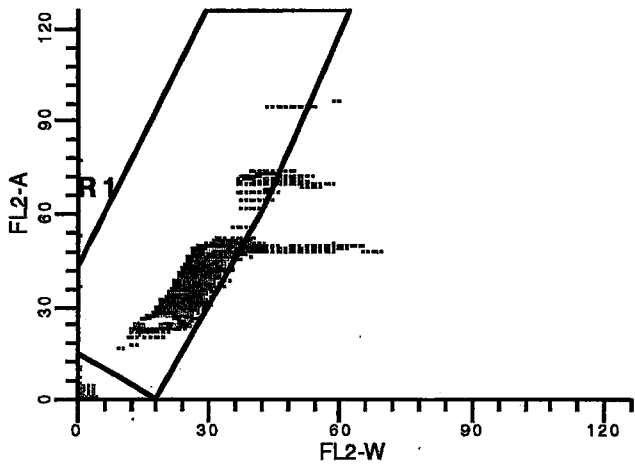
Diploid B.A.D.: 0.06 %
Apoptosis: 0.36 % Mean: 43.11

S-Phase Assessment:
Tissue Type: BMMNCs
Model type: Diploid
Diploid S: High
Calculated p-value: $p < 0.01$
S-phase Boundaries: 5.0 and 10.0



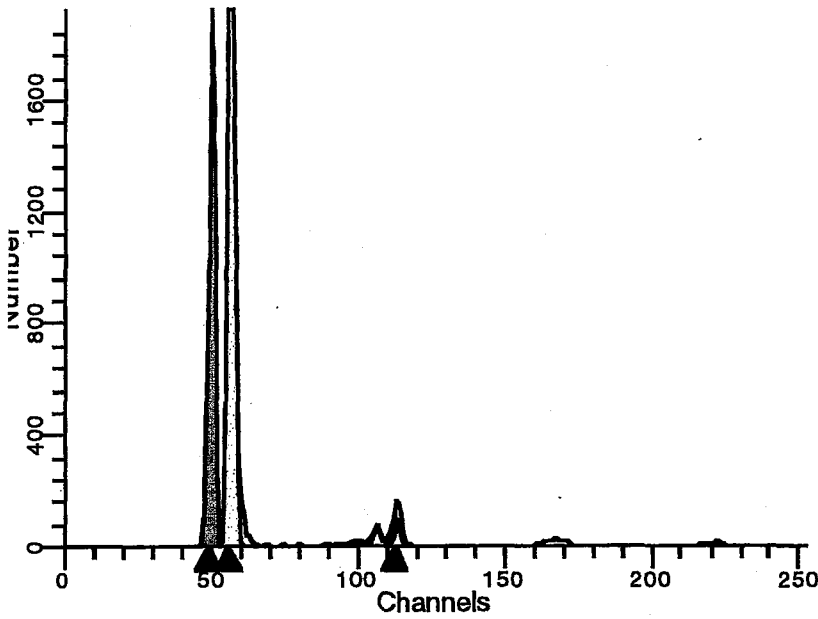
ModFitLT V2.0(PMac)

S-Phase Assessment:
Tissue Type: BMMNCs
Model type: Diploid
Diploid S: Intermediate
Calculated p-value: $p < 0.01$
S-phase Boundaries: 5.0 and 10.0



ModFILT V2.0(PMac)

Data acquired: 16-Jan-1
File: S.E.A.+ MNCs
Source: S.E.A.+ MNCs
Case: S.E.A.
Analysis type: Manual analysis
Prep: Fresh/Frozen



DIPLOID: 30.40 %
Dip G0-G1: 100.00 % at 50.14
Dip G2-M: 0.00 % at 100.28
Dip S: 0.00 % G2/G1: 2.00
Dip %CV: 1.62
ANEUPLOID 1: 69.60 %
An1 G0-G1: 94.60 % at 56.86
An1 G2-M: 3.11 % at 113.30
An1 S: 2.29 % G2/G1: 1.99
An1 %CV: 1.41
An1 DI: 1.13

Total S-Phase: 1.59 %

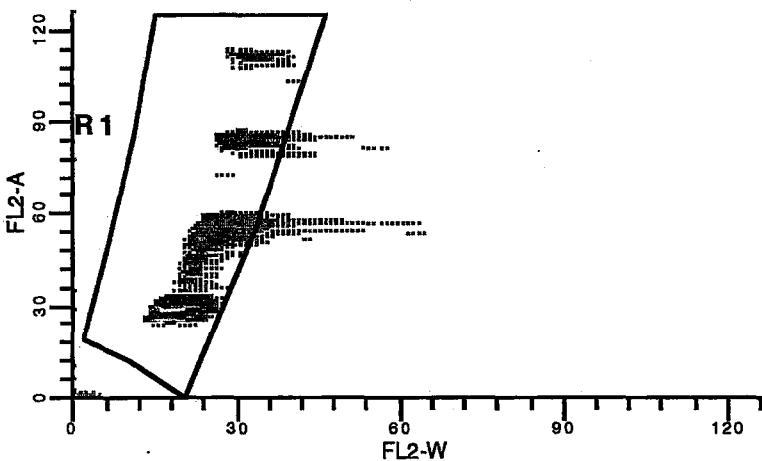
Phase Assessment:
Issue Type: BMMNCs
Model type: Aneuploid
Aneuploid S: Low
Calculated p-value: $p < 0.01$
S-phase Boundaries: 10.0 and 20.0
Total S: Low
Calculated p-value: $p < 0.01$
S-phase Boundaries: 10.0 and 20.0

Extra Pop: %
Debris: 0.09 %
Aggregates: 3.01 %
Modeled Events: 18379
RCS: 3.505

Diploid B.A.D.: 0.17 %

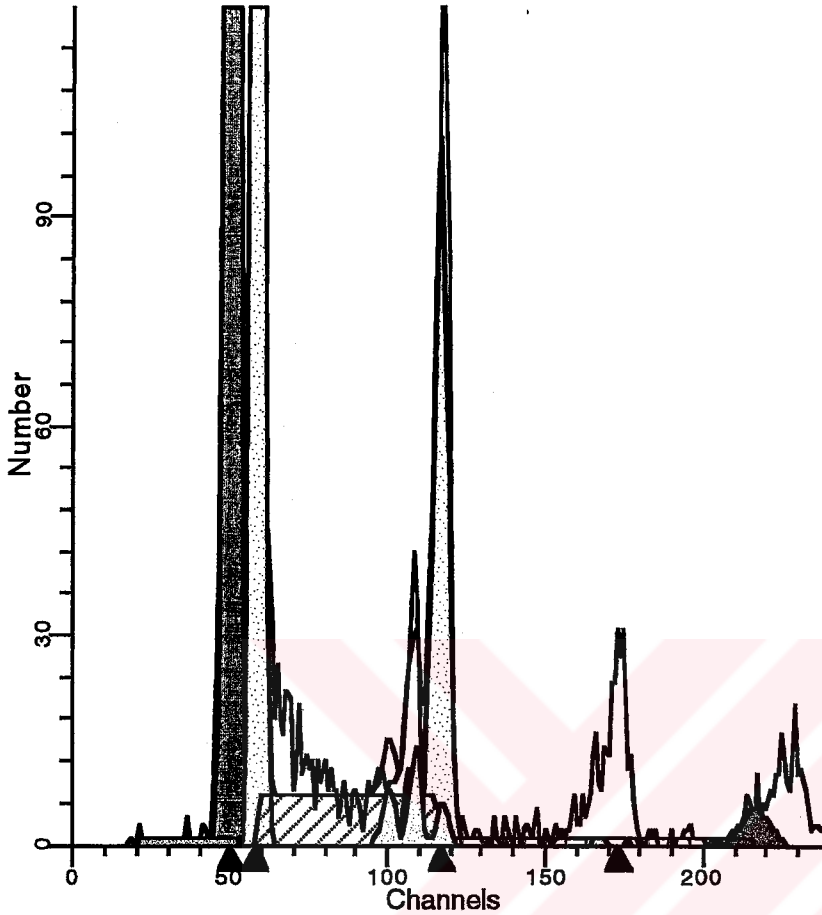
Aneuploid B.A.D.: 2.84 %

Total B.A.D.: 2.04 %



DOKUZ EYLUL UNIVERSITESI

Hematoloji-Onkoloji Laboratuvarı



Data acquired: 24-Jan-1
File: E.G.+ MNCs
Source: E.G.+ MNCs
Case: E.G.
Analysis type: Manual analysis
Prep: Fresh/Frozen

DIPLOID: 51.11 %
Dip G0-G1: 100.00 % at 50.15
Dip G2-M: 0.00 % at 100.29
Dip S: 0.00 % G2/G1: 2.00
Dip %CV: 2.56
ANEUPLOID 1: 47.68 %
An1 G0-G1: 88.62 % at 58.66
An1 G2-M: 6.14 % at 116.73
An1 S: 5.23 % G2/G1: 1.99
An1 %CV: 1.87
An1 DI: 1.17
ANEUPLOID 2: 1.20 %
An2 G0-G1: 28.44 % at 107.50
An2 G2-M: 26.00 % at 216.44
An2 S: 45.56 % G2/G1: 2.01
An2 %CV: 1.93
An2 DI: 2.14

Total S-Phase: 3.04 %

Extra Pop: %
Debris: 0.22 %
Aggregates: 0.80 %
Modeled Events: 17571
RCS: 5.069

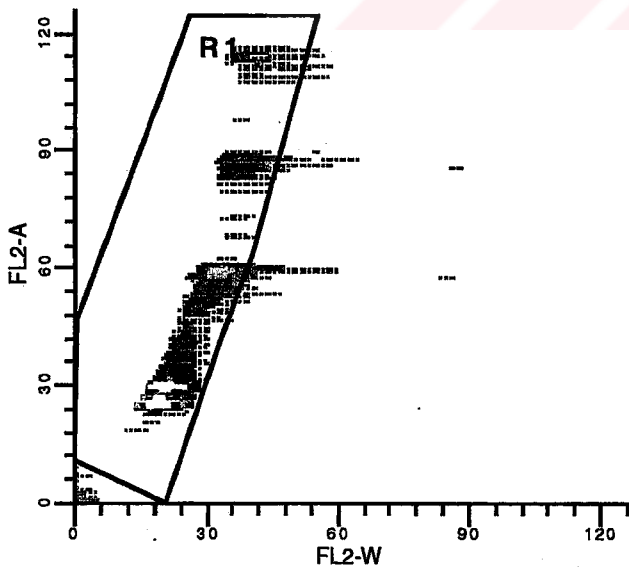
Diploid B.A.D.: 0.17 %

Aneuploid1 B.A.D.: 1.45 %

Aneuploid2 B.A.D.: 7.51 %

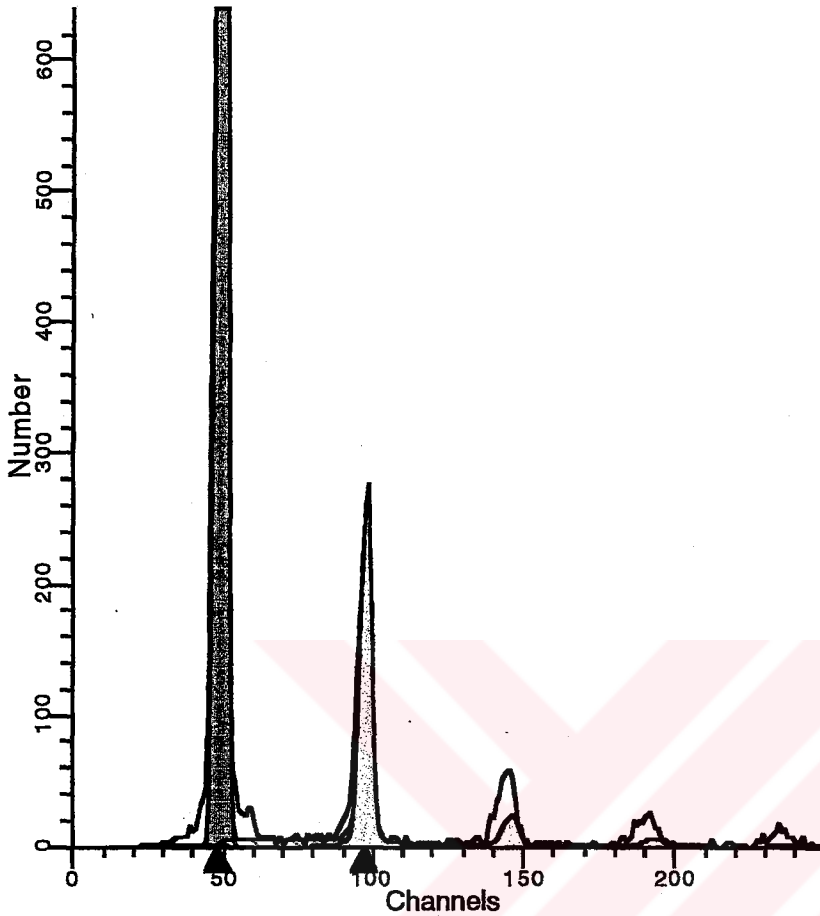
Total B.A.D.: 0.86 %

S-Phase Assessment:
Tissue Type: BMMNCs
Model type: Two Aneuploid Populations
Aneuploid S: Low
Calculated p-value: $p < 0.01$
S-phase Boundaries: 10.0 and 20.0
Total S: Low
Calculated p-value: $p < 0.01$
S-phase Boundaries: 10.0 and 20.0



DOKUZ EYLUL UNIVERSITESI

Hematoloji-Onkoloji Laboratuvarı



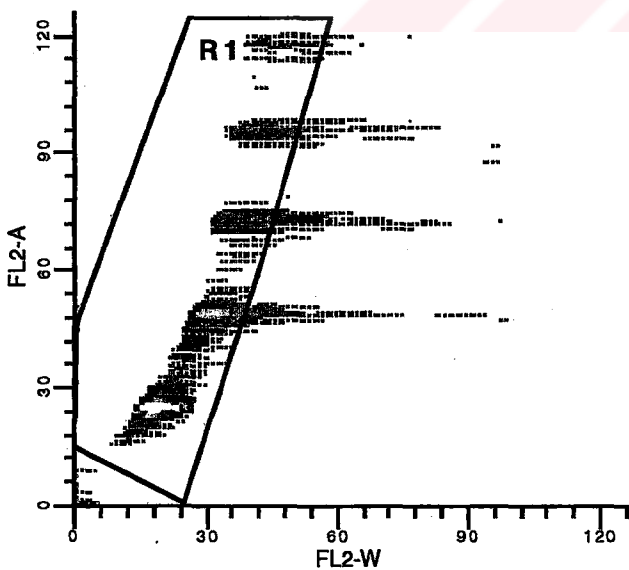
Data acquired: 24-Jan-1
File: F.I.+ MNCs
Source: F.I.+ MNCs
Case: F.I.
Analysis type: Manual analysis
Prep: Fresh/Frozen

DIPLOID: 100.00 %
Dip G0-G1: 98.15 % at 48.80
Dip G2-M: 0.00 % at 96.86
Dip S: 1.85 % G2/G1: 1.98
Dip %CV: 2.40

Total S-Phase: 1.85 %

Extra Pop: %
Debris: 0.51 %
Aggregates: 9.04 %
Modeled Events: 17086
RCS: 4.849

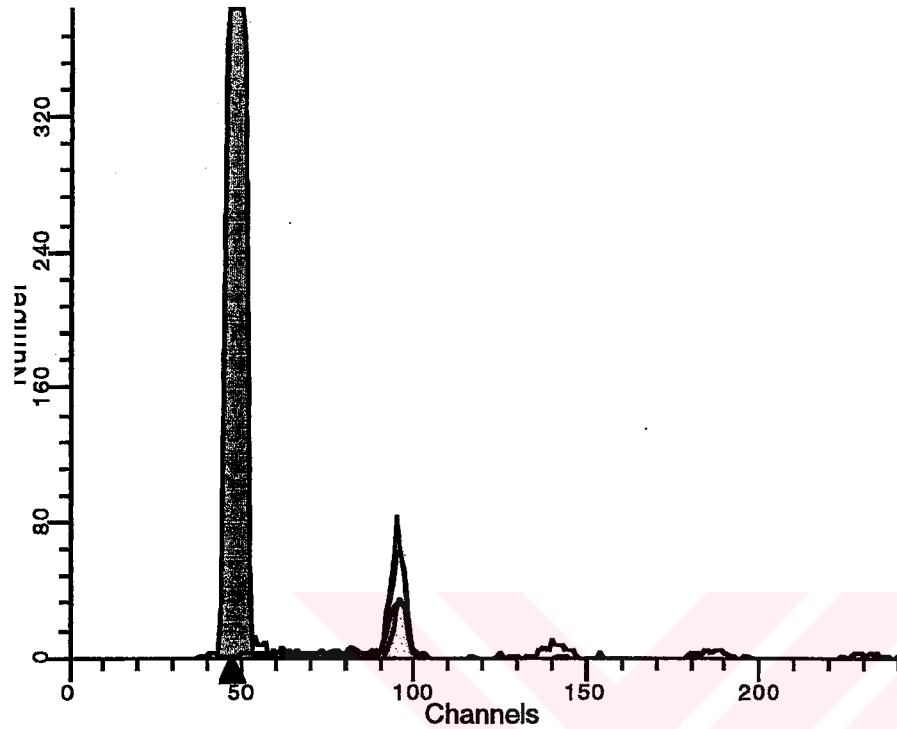
Diploid B.A.D.: 2.44 %



S-Phase Assessment:
Tissue Type: BMMNCs
Model type: Diploid
Diploid S: Low
Calculated p-value: $p < 0.01$
S-phase Boundaries: 5.0 and 10.0

DOKUZ EYLUL UNIVERSITESI

Hematoloji-Onkoloji Laboratuvarı



Data acquired: 26-Jan-1
File: O.Ö.+ MNCs
Source: O.Ö.+ MNCs
Case: O.Ö.
Analysis type: Manual analysis
Prep: Fresh/Frozen

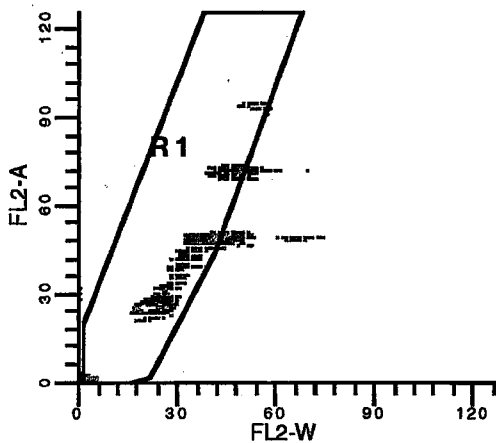
DIPLOID: 100.00 %
Dip G0-G1: 98.88 % at 48.01
Dip G2-M: 0.76 % at 94.91
Dip S: 0.36 % G2/G1: 1.98
Dip %CV: 2.42

Total S-Phase: 0.36 %

Extra Pop: %
Debris: 0.03 %
Aggregates: 0.63 %
Modeled Events: 24220
RCS: 1.415

Diploid B.A.D.: 0.16 %
Apoptosis: 0.03 % Mean: 41.89

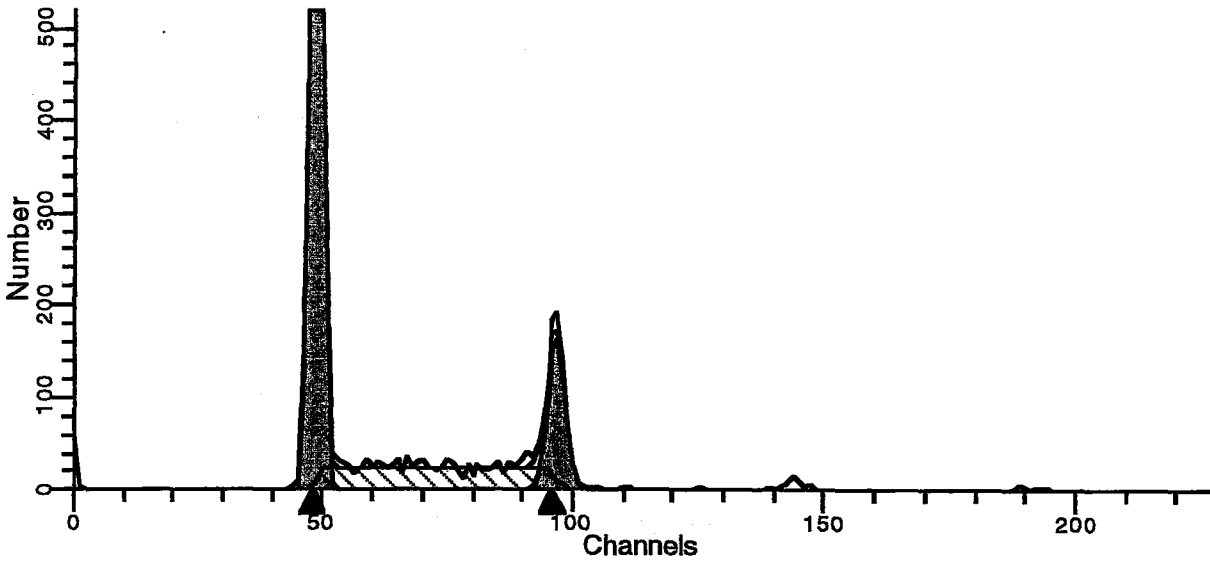
S-Phase Assessment:
Tissue Type: BMMNCs
Model type: Diploid
Diploid S: Intermediate
Calculated p-value: $p < 0.01$
S-phase Boundaries: 5.0 and 10.0



ModFitLT V2.0(PMac)

DOKUZ EYLUL UNIVERSITESI

Hematoloji-Onkoloji Laboratuvarı



S-Phase Assessment:
Tissue Type: BMMNCs
Model type: Diploid
Diploid S: Intermediate
Calculated p-value: $p < 0.01$
S-phase Boundaries: 5.0 and 10.0

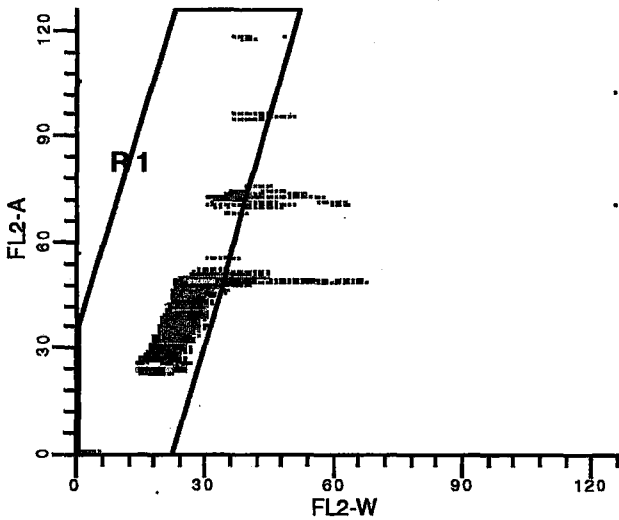
Data acquired: 22-Jan-1
File: H.P.+ MNCs
Source: H.P.+ MNCs
Case: H.P.
Analysis type: Manual analysis
Prep: Fresh/Frozen

DIPLOID: 100.00 %
Dip G0-G1: 89.78 % at 48.63
Dip G2-M: 3.79 % at 96.70
Dip S: 6.43 % G2/G1: 1.99
Dip %CV: 1.75

Total S-Phase: 6.43 %

Extra Pop: %
Debris: 0.13 %
Aggregates: 0.00 %
Modeled Events: 18819
RCS: 1.765

Diploid B.A.D.: 0.00 % no aggs



Data acquired: 16-Jan-1
File:A.Y.+ MNCs
Source: A.Y.+ MNCs
Case: A.Y.
Analysis type: Manual analysis
Prep: Fresh/Frozen

DIPLOID: 89.86 %
Dip G0-G1: 94.60 % at 50.16
Dip G2-M: 1.48 % at 100.33
Dip S: 3.91 % G2/G1: 2.00
Dip %CV: 1.88
ANEUPLOID 1: 10.14 %
An1 G0-G1: 82.89 % at 85.74
An1 G2-M: 1.94 % at 171.47
An1 S: 15.18 % G2/G1: 2.00
An1 %CV: 3.21
An1 DI: 1.71

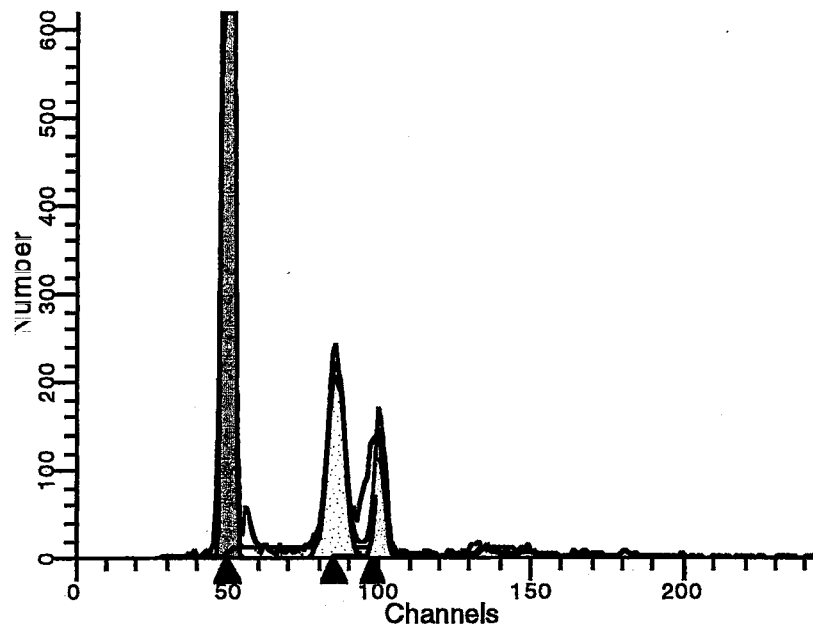
Total S-Phase: 5.05 %

Extra Pop: %
Debris: 0.35 %
Aggregates: 3.38 %
Modeled Events: 17844
RCS: 4.517

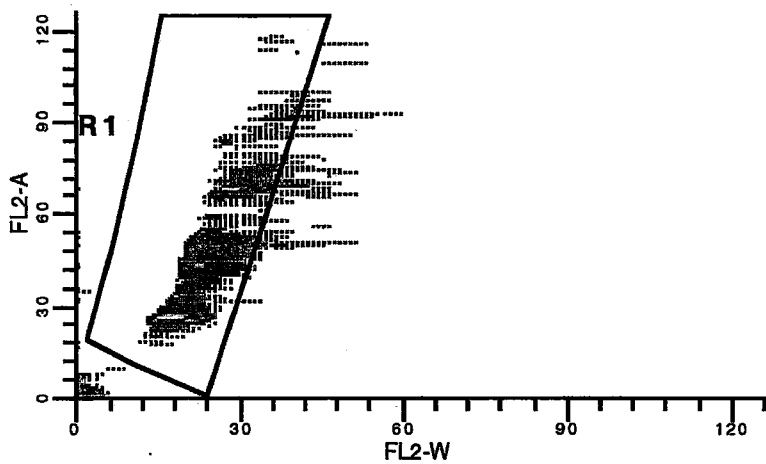
Diploid B.A.D.: 1.65 %

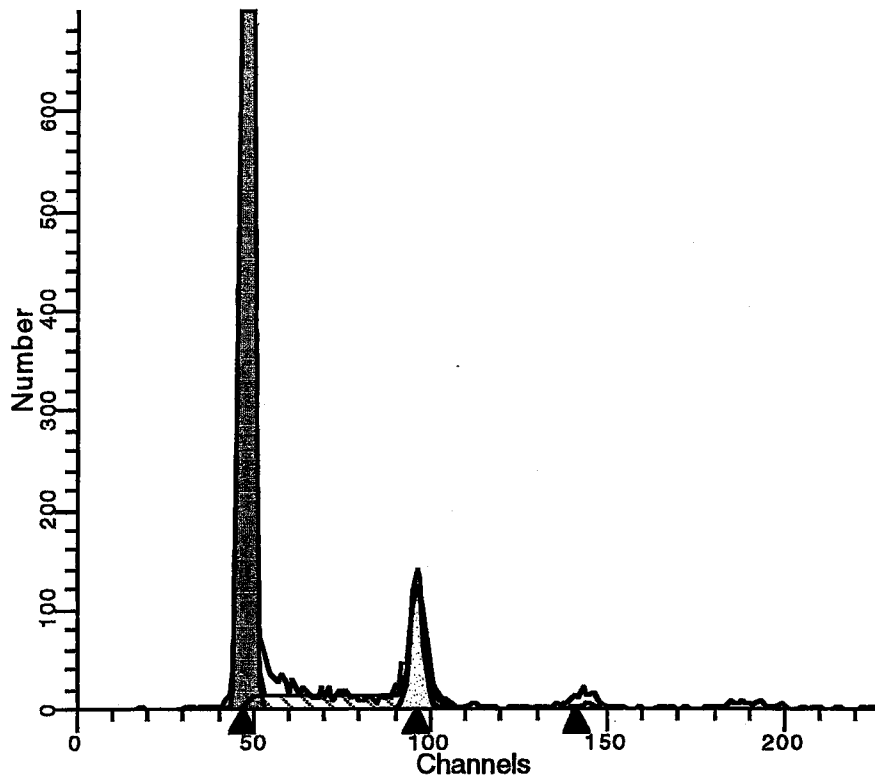
Aneuploid B.A.D.: 21.47 %

Total B.A.D.: 3.79 %



-Phase Assessment:
Issue Type: BMMNCs
Model type: Aneuploid
Aneuploid S: Intermediate
Calculated p-value: $p < 0.01$
S-phase Boundaries: 10.0 and 20.0
Total S: Low
Calculated p-value: $p < 0.01$
S-phase Boundaries: 10.0 and 20.0





Data acquired: 9-Jan-1
 File: E.G.+ MNCs
 Source: E.G.+ MNCs
 Case: E.G.
 Analysis type: Manual analysis
 Prep: Fresh/Frozen

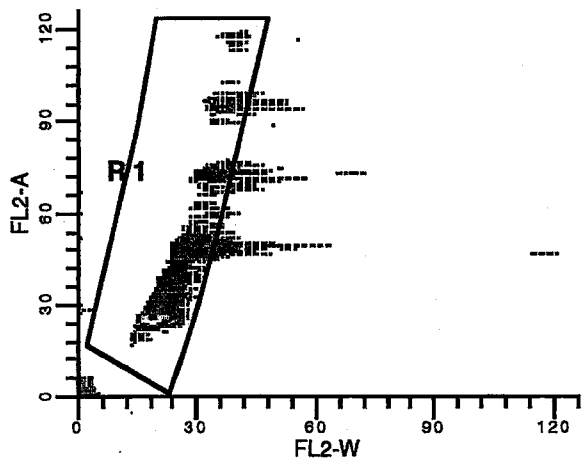
DIPLOID: 100.00 %
 Dip G0-G1: 95.17 % at 48.04
 Dip G2-M: 0.56 % at 100.20
 Dip S: 4.28 % G2/G1: 2.09
 Dip %CV: 2.42

Total S-Phase: 4.28 %

Extra Pop: %
 Debris: 0.24 %
 Aggregates: 3.48 %
 Modeled Events: 18097
 RCS: 2.482

Diploid B.A.D.: 4.18 %

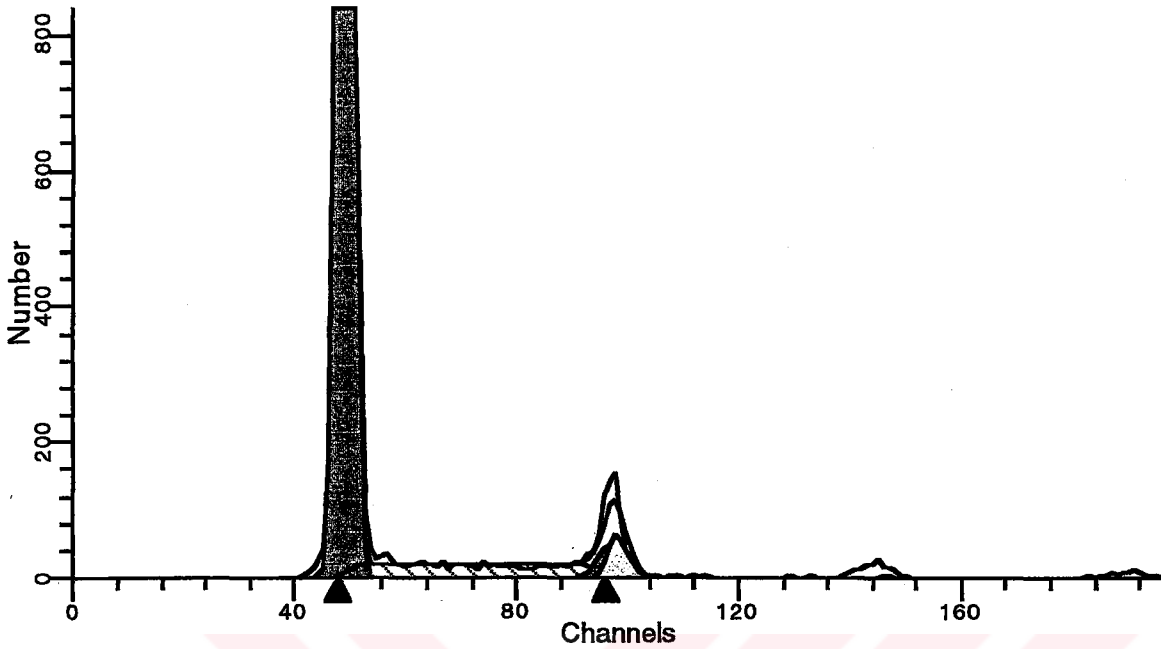
S-Phase Assessment:
 Tissue Type: BMMNCs
 Model type: Diploid
 Diploid S: Low
 Calculated p-value: $p < 0.09$
 S-phase Boundaries: 5.0 and 10.0



ModFILT V2.0(PMac)

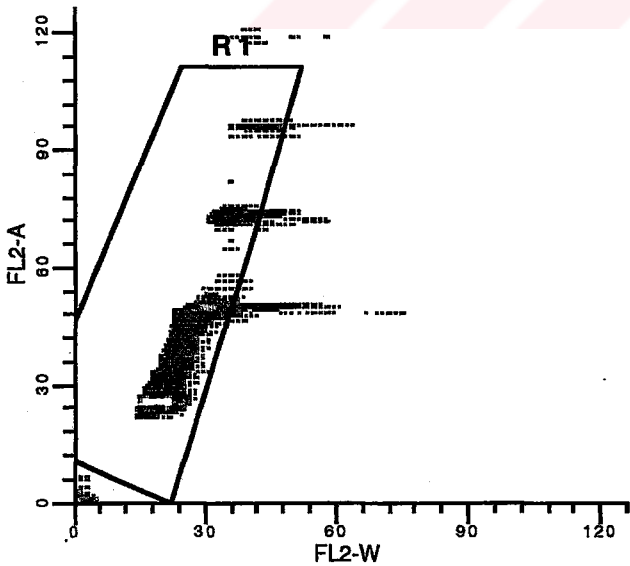
DOKUZ EYLUL UNIVERSITESI

Hematoloji-Onkoloji Laboratuvarı



S-Phase Assessment:
Tissue Type: BMMNCs
Model type: Diploid
Diploid S: Intermediate
Calculated p-value: $p < 0.01$
S-phase Boundaries: 5.0 and 10.0

Data acquired: 24-Jan-1
File: A.R.C.+ MNCs
Source: A.R.C.+ MNCs
Case: A.R.C.
Analysis type: Manual analysis
Prep: Fresh/Frozen



DIPLOID: 100.00 %
Dip G0-G1: 93.29 % at 49.18
Dip G2-M: 1.61 % at 97.18
Dip S: 5.09 % G2/G1: 1.98
Dip %CV: 2.39

Total S-Phase: 5.09 %

Extra Pop: %
Debris: 0.18 %
Aggregates: 1.73 %
Modeled Events: 18236
RCS: 4.484

Diploid B.A.D.: 0.61 %

Data acquired: 16-Jan-1
File: H.A.Ş.+ MNCs
Source: H.A.Ş.+ MNCs
Case: H.A.Ş.
Analysis type: Manual analysis
Prep: Fresh/Frozen

DIPLOID: 94.57 %
Dip G0-G1: 99.93 % at 49.31
Dip G2-M: 0.07 % at 98.62
Dip S: 0.00 % G2/G1: 2.00
Dip %CV: 1.67
ANEUPLOID 1: 5.43 %
An1 G0-G1: 43.68 % at 56.01
An1 G2-M: 8.56 % at 105.74
An1 S: 47.76 % G2/G1: 1.89
An1 %CV: 3.52
An1 DI: 1.14

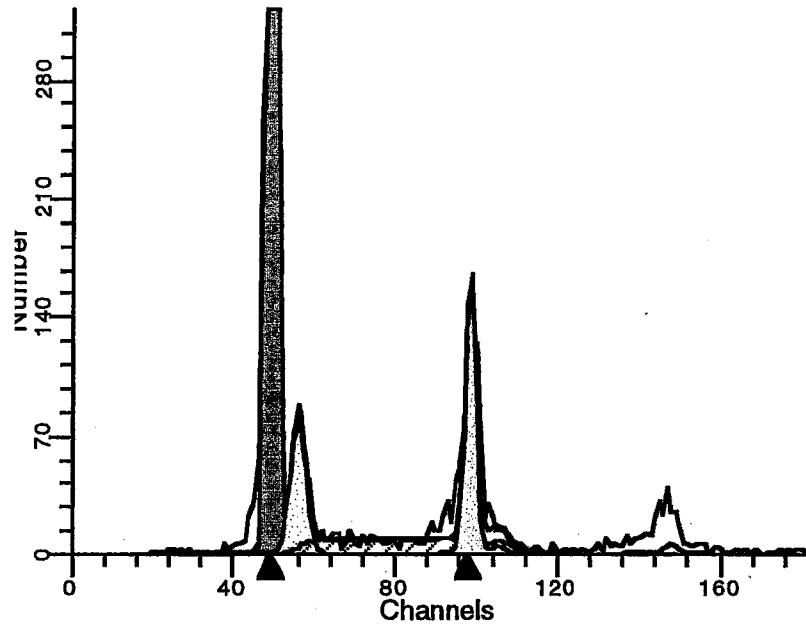
Total S-Phase: 2.59 %

Extra Pop: %
Debris: 0.30 %
Aggregates: 3.44 %
Modeled Events: 16984
RCS: 4.219

Diploid B.A.D.: 1.64 %

Aneuploid B.A.D.: 38.07 %

Total B.A.D.: 3.53 %
Apoptosis: 0.00 % Mean: 57.80



S-Phase Assessment:

Tissue Type: BMMNCs

Model type: Aneuploid

Aneuploid S: High

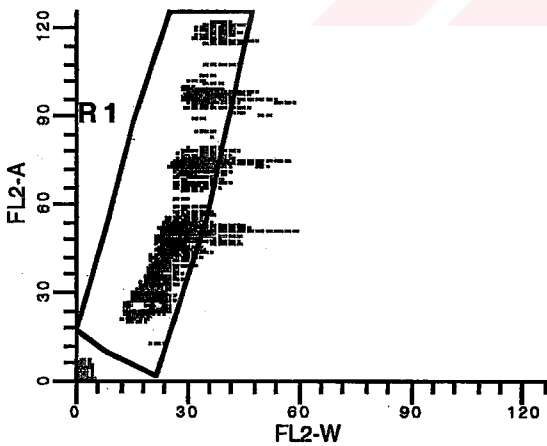
Calculated p-value: $p < 0.01$

S-phase Boundaries: 10.0 and 20.0

Total S: Low

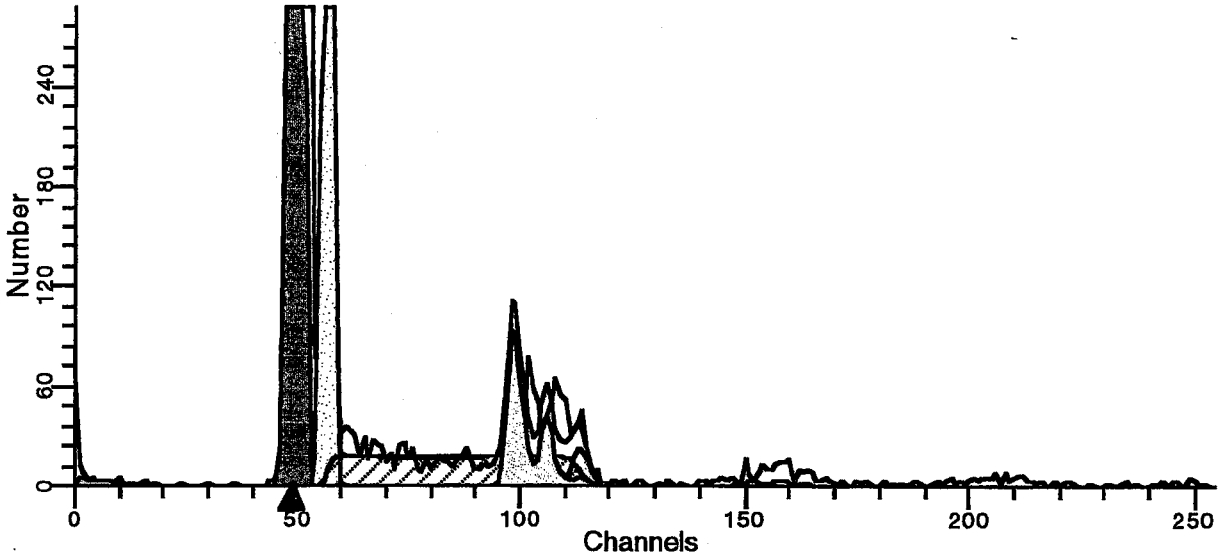
Calculated p-value: $p < 0.01$

S-phase Boundaries: 10.0 and 20.0



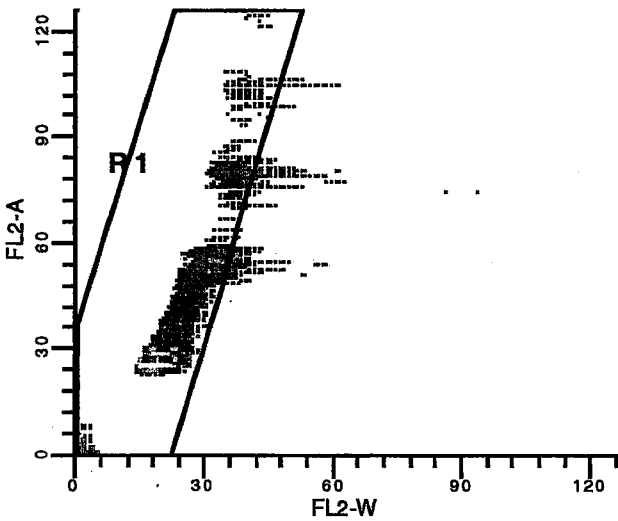
DOKUZ EYLUL UNİVERSİTESİ

Hematoloji-Onkoloji Laboratuvarı



S-Phase Assessment:
Tissue Type: BMMNCs
Model type: Aneuploid
Aneuploid S: High
Calculated p-value: $p < 0.01$
S-phase Boundaries: 10.0 and 20.0
Total S: Low

Data acquired: 22-Jan-1
File: G.D.+ MNCs
Source: G.D.+ MNCs
Case: G.D.
Analysis type: Manual analysis
Prep: Fresh/Frozen



DIPLOID: 76.33 %
Dip G0-G1: 100.00 % at 49.44
Dip G2-M: 0.00 % at 98.87
Dip S: 0.00 % G2/G1: 2.00
Dip %CV: 2.03
ANEUPLOID 1: 23.67 %
An1 G0-G1: 70.90 % at 56.69
An1 G2-M: 2.72 % at 113.39
An1 S: 26.38 % G2/G1: 2.00
An1 %CV: 1.56
An1 DI: 1.15

Total S-Phase: 6.24 %

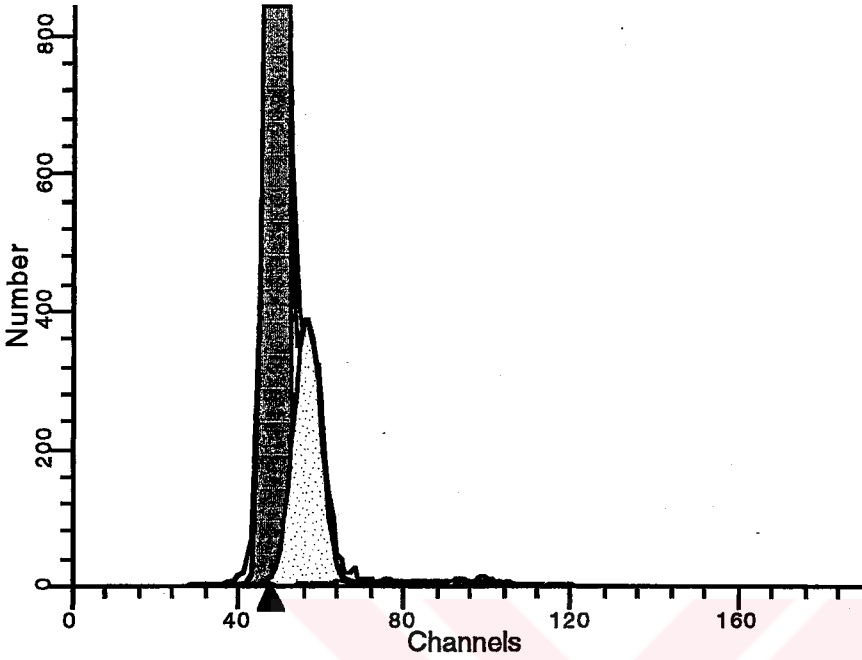
Extra Pop: %
Debris: 0.33 %
Aggregates: 3.93 %
Modeled Events: 16976
RCS: 9.902

Diploid B.A.D.: 1.08 %

ModFITLT V2.0(PMac)

DOKUZ EYLUL UNIVERSITESI

Hematoloji-Onkoloji Lab.



Data acquired: 31-Jan-1
File: S.D.+ MNCs
Source: S.D.+ MNCs
Case: S.D.
Analysis type: Manual analysis
Prep: Fresh/Frozen

DIPLOID: 85.46 %
Dip G0-G1: 99.83 % at 48.88
Dip G2-M: 0.17 % at 97.77
Dip S: 0.00 % G2/G1: 2.00
Dip %CV: 3.50
ANEUPLOID 1: 14.54 %
An1 G0-G1: 91.52 % at 56.56
An1 G2-M: 0.00 % at 109.81
An1 S: 8.48 % G2/G1: 1.94
An1 %CV: 5.80
An1 DI: 1.16

S-Phase Assessment:
Tissue Type: BMMNCs
Model type: Aneuploid
Aneuploid S: Low
Calculated p-value: $p < 0.07$
S-phase Boundaries: 10.0 and 20.0
Total S: Low
Calculated p-value: $p < 0.01$
S-phase Boundaries: 10.0 and 20.0

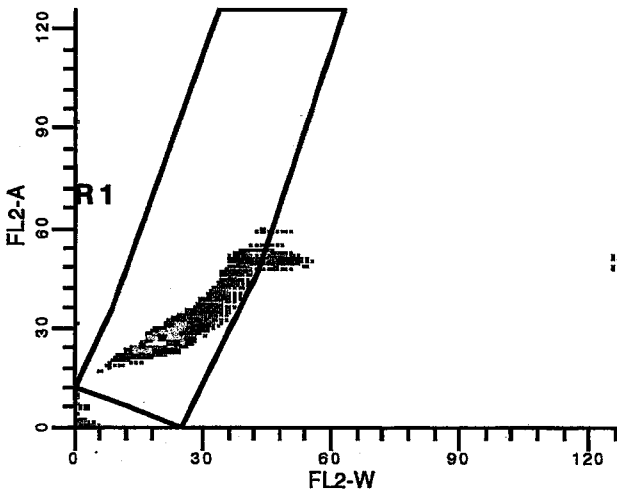
Total S-Phase: 1.23 %

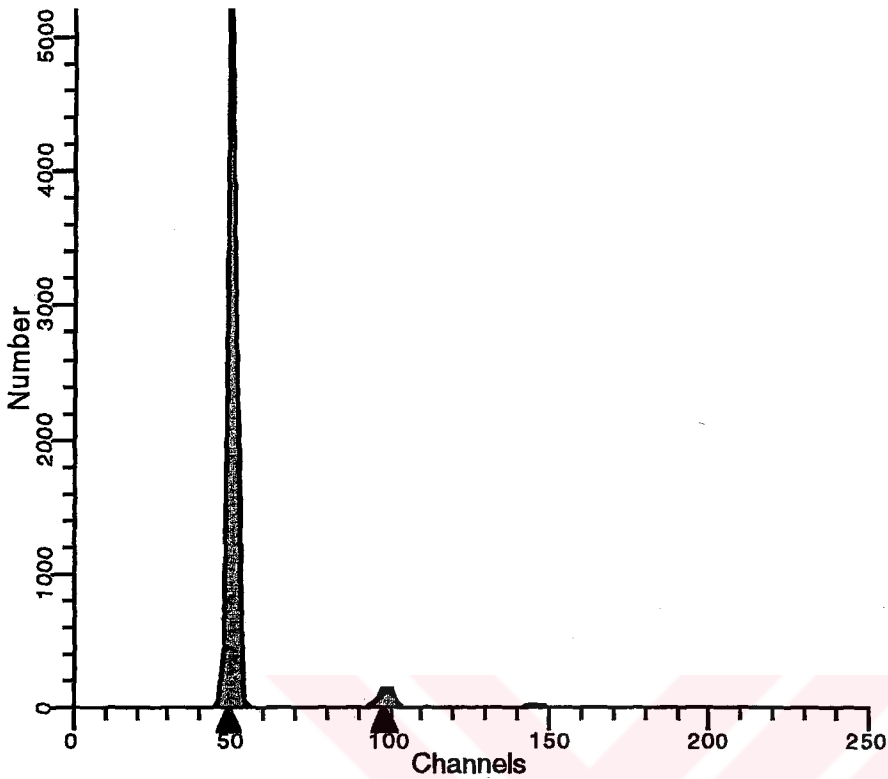
Extra Pop: %
Debris: 0.19 %
Aggregates: 0.00 %
Modeled Events: 24232
RCS: 2.751

Diploid B.A.D.: 0.02 % no aggs

Aneuploid B.A.D.: 0.00 % no aggs

Total B.A.D.: 0.02 % no aggs





Data acquired: 13-Jan-1
File: I.K.+ MNCs
Source: I.K.+ MNCs
Case: I.K.
Analysis type: Manual analysis
Prep: Fresh/Frozen

DIPLOID: 100.00 %
Dip G0-G1: 95.52 % at 49.79
Dip G2-M: 3.90 % at 98.74
Dip S: 0.58 % G2/G1: 1.98
Dip %CV: 2.42

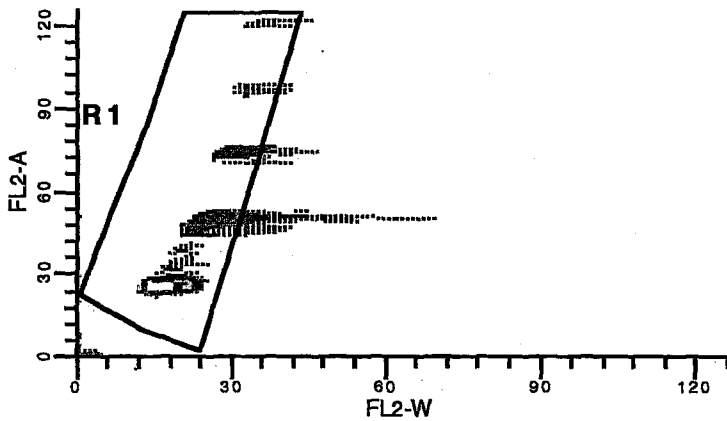
Total S-Phase: 0.58 %

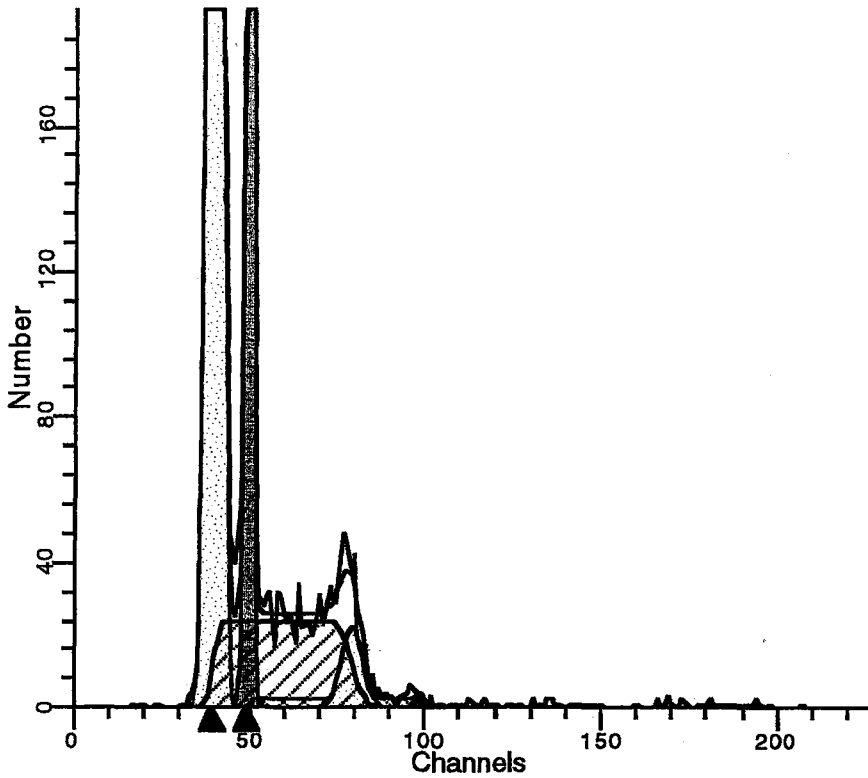
Extra Pop: %
Debris: 0.05 %
Aggregates: 0.00 %
Modeled Events: 18177
RCS: 4.898

Diploid B.A.D.: 0.00 % no aggs

S-Phase Assessment:
Tissue Type: BMMNCs
Model type: Diploid
Diploid S: Low

Calculated p-value: $p < 0.01$
S-phase Boundaries: 5.0 and 10.0





Data acquired: 9-Jan-1
 File: E.D.+ MNCs
 Source: E.D.+ MNCs
 Case: E.D.
 Analysis type: Manual analysis
 Prep: Fresh/Frozen

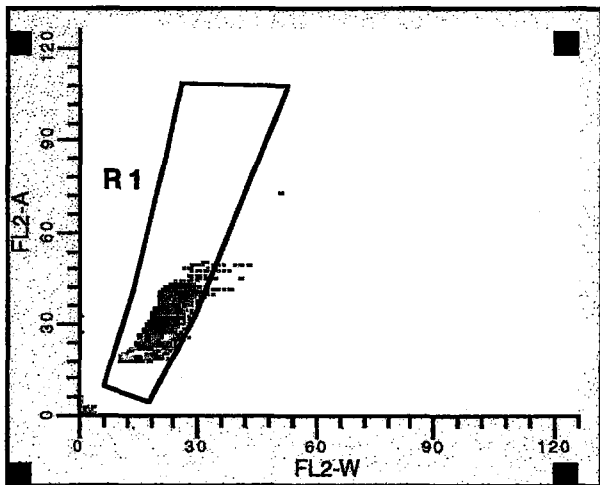
DIPLOID: 20.51 %
 Dip G0-G1: 94.21 % at 49.61
 Dip G2-M: 0.52 % at 99.22
 Dip S: 5.27 % G2/G1: 2.00
 Dip %CV: 1.70
 ANEUPLOID 1: 79.49 %
 An1 G0-G1: 85.00 % at 39.67
 An1 G2-M: 2.15 % at 79.34
 An1 S: 12.85 % G2/G1: 2.00
 An1 %CV: 3.67
 An1 DI: 0.80

Total S-Phase: 11.30 %

Extra Pop: %
 Debris: 0.12 %
 Aggregates: 0.00 %
 Modeled Events: 9515
 RCS: 0.832

S-Phase Assessment:
 Tissue Type: BMMNCs
 Model type: Aneuploid
 Aneuploid S: Intermediate
 Calculated p-value: $p < 0.01$
 S-phase Boundaries: 10.0 and 20.0
 Total S: Intermediate
 Calculated p-value: $p < 0.01$
 S-phase Boundaries: 10.0 and 20.0

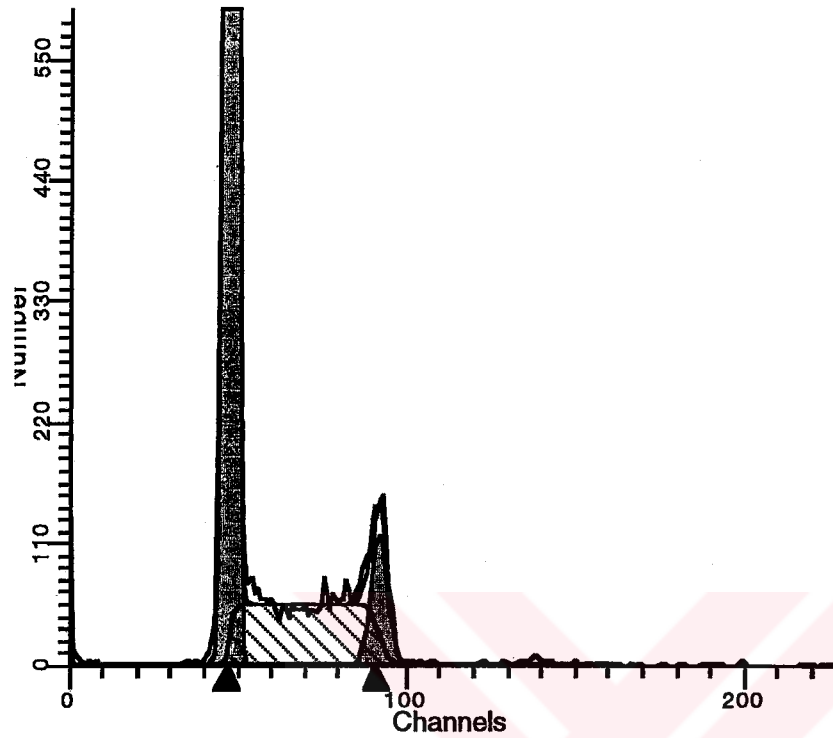
Diploid B.A.D.: 0.00 % no aggs
 Aneuploid B.A.D.: 0.00 % no aggs
 Total B.A.D.: 0.00 % no aggs



ModFitLT V2.0(PMac)

DOKUZ EYLUL UNIVERSITESI

Hematoloji-Onkoloji Laboratuvarı



Data acquired: 25-Jan-1
File: N.O.+ MNCs
Source: N.O.+ MNCs
Case: N.O.
Analysis type: Manual analysis
Prep: Fresh/Frozen

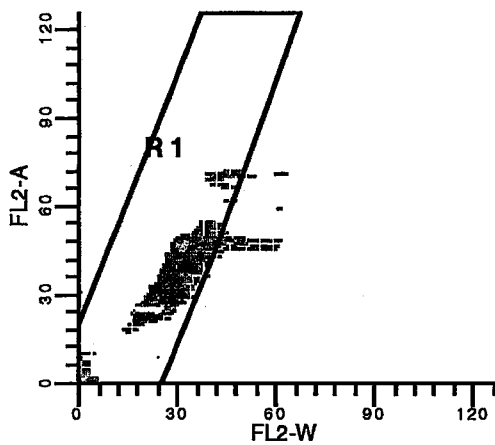
DIPLOID: 100.00 %
Dip G0-G1: 86.73 % at 47.62
Dip G2-M: 3.04 % at 91.97
Dip S: 10.23 % G2/G1: 1.93
Dip %CV: 2.57

Total S-Phase: 10.23 %

Extra Pop: %
Debris: 0.56 %
Aggregates: 0.00 %
Modeled Events: 24139
RCS: 2.317

Diploid B.A.D.: 0.00 %
Apoptosis: 0.86 % Mean: 80.90

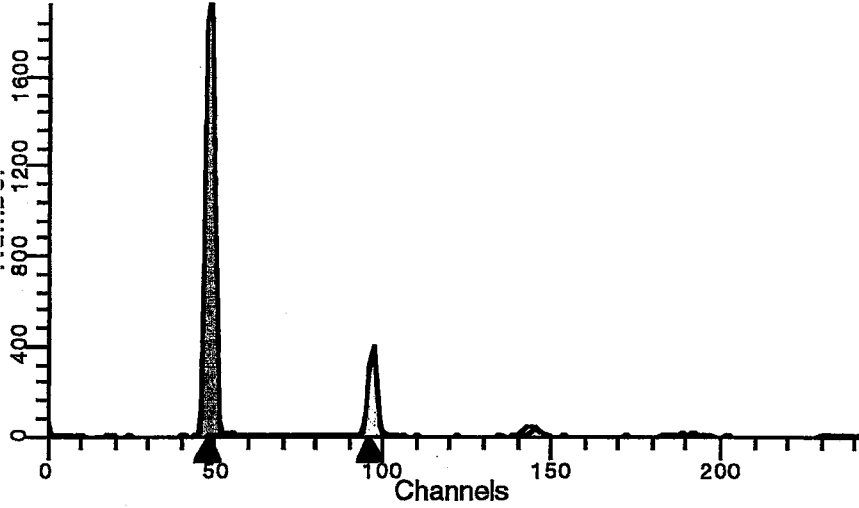
S-Phase Assessment:
Tissue Type: BMMNCs
Model type: Diploid
Diploid S: High
Calculated p-value: $p < 0.01$
S-phase Boundaries: 5.0 and 10.0



ModFitLT V2.0(PMac)

DOKUZ EYLUL UNIVERSITESI

Hematoloji-Onkoloji Laboratuvarı

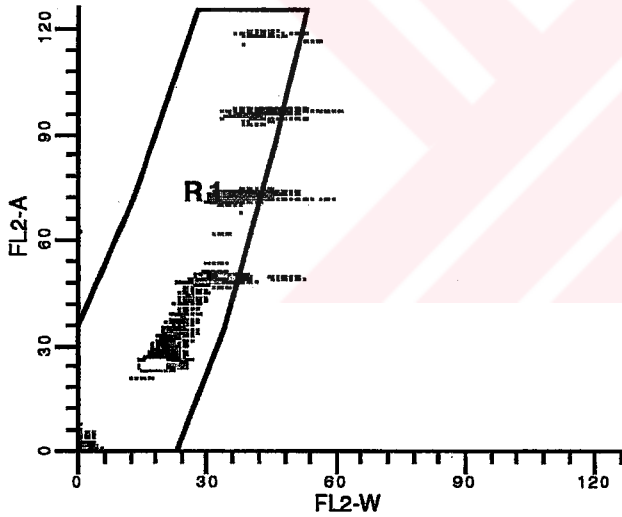


Data acquired: 22-Jan-1
File: O.D.+ MNCs
Source: O.D.+ MNCs
Case: O.D.
Analysis type: Manual analysis
Prep: Fresh/Frozen

DIPLOID: 100.00 %
Dip G0-G1: 98.28 % at 48.40
Dip G2-M: 0.61 % at 97.27
Dip S: 1.11 % G2/G1: 2.01
Dip %CV: 1.53

S-Phase Assessment:
Tissue Type: BMMNCs
Model type: Diploid
Diploid S: Low

Calculated p-value: $p < 0.01$
S-phase Boundaries: 5.0 and 10.0



Total S-Phase: 1.11 %

Extra Pop: %
Debris: 0.20 %
Aggregates: 6.49 %
Modeled Events: 18866
RCS: 2.236

Diploid B.A.D.: 4.70 %