

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANA BİLİMDALI

UZMANLIK TEZİ

HODGKİN DIŞI LENFOMALI
OLGULARDA GENOMİK
İNSTABİLİTENİN SİTOGENETİK
BİYOMARKERLERLE
ARAŞTIRILMASI

DR. OKTAY PERDECİ

DANIŞMAN

PROF DR. ŞÜKRÜ ÖZTÜRK

İÇ HASTALIKLARI ABD BAŞKANI

PROF DR. KERİM GÜLER

İSTANBUL 2008

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin tüm aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim

Dr. Oktay Perdeci

TEŞEKKÜR

Bu tez İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Genetik Bilim Dalı'nda “Hodgkin Dışı Lenfomalı olgularda genomik instabilitenin sitogenetik biyomarkerlerle araştırılması” İsimli uzmanlık tez projesi olarak hazırlanmıştır.

Çalışma sırasında bilimsel katkıları, bilgi ve deneyimi ile bana yardımcı olan Danışman Hocam Sayın Prof Dr. Şükrü Öztürk'e

Araştırma süresince büyük yardımlarını gördüğüm Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'ndan Dr. Davut Pehlivan ve İç Hastalıkları AD, Tıbbi Genetik Bilim Dalı'ndan Bio. Başak Sevinç'e

Desteği ve yardımlarından dolayı Dr. Fulya Coşan'a

Hayatımın her anında yanımda olan ve desteğini esirgemeyen Sevgili Eşim'e

İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Kerim Güler şahsında eğitimime katkıda bulunan tüm öğretim üyelerimize ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulundan onay almıştır (03.08.2005 tarih ve 2005/1028 sayılı dosya, 08 sayılı toplantıda).

İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-726/13092005 .

KISALTMALAR

ATLL: Erişkin T Hücre Lösemi lenfoması

BCR: Breakpoint Cluster Region

BrdU: Bromo-Deoxy-Uridine

CHOP: Siklofosfamid+Doksorubisin+Oncovin+Prednison

CNS: Santral Sinir Sistemi

C(M)OPP: Siklofosfamid+ Oncovin+ Prednison+ Prokarbazin

CYT B: Cytochalasin B

CVP: Siklofosfamid+ vinkristin+ prednison

DNA: Deoxyribonükleic Asid

FCS: Fetal Kalf Serum

GTG: Giemsa-Tripsin-Giemsa

GTL: Giemsa-Tripsin-Leishman

HDL: Hodgkin Dışı Lenfoma

KKD: Kardeş Kromatid Değişimi

KT: Kemoterapi

MALT: Mucosa-associated lymphatic tissue

M: Molar

Mb: Megabaz

mg: Miligram

mM: Milimolar

µl: Mikrolitre

MN: Mikronükleus

ISCN: An international System for Human Cytogenetic Nomenclature

p: Kromozomun kısa kolu

Ph1: Philadelphia

PHA: Phytohaemagglutinin

RNA: Ribonucleic Acid

RT: Radyoterapi

q: Kromozomun uzun kolu

SCE: Sister Chromatid Exchange

İÇİNDEKİLER

Beyan

Teşekkür

Kısaltmalar

Tablolar Listesi

Şekiller Listesi

Özet

Abstract

I. Giriş ve Amaç

II. Genel Bilgiler

II.1 Kanser

II.2 Lenfoma

II.2,1 Hodgkin Dışı Lenfoma

II.2.1.1 Hodgkin Dışı Lenfoma Hastalarında Sınıflama

II.2.1.2 Hodgkin Dışı Lenfoma Hastalarında Tedavi Seçenekleri

II.3 Sitogenetik Analiz yöntemleri

II.4 Sitogenetik Biyomarkerler

III. Gereç ve Yöntem

III.1 Gereç

III.2. Kardeş Kromatid Değişimi Yöntemi

III.3. Mikronükleus Değişimi Yöntemi

IV. Bulgular

V. Tartışma ve Sonuç

VI. Kaynaklar

VII. Etik Kurul Onayı

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2–1: Lenfoid Malignitelerin WHO sınıflaması

Tablo 2–2: Lenfoid malignitelerin sınıflandırılması

Tablo 2–3: Translokasyonların yol açtığı bazı hastalıklar

Tablo 2-4: Hematolojik malignitelerde tespit edilen translokasyonlar ile prognoz ilişkisi

Tablo 4–1: Tedavi Öncesi Grup, Kemoterapi Sonrası Grup, Kemoterapi + Radyoterapi Sonrası Grup ve Kontrol Grubunun Metafaz Başına Kardeş Kromatid Değişimi Sıklıkları

Tablo 4–2: Tedavi Öncesi Grup, Kemoterapi Sonrası Grup, Kemoterapi + Radyoterapi Sonrası Grup ve Kontrol Grubunun Mikronükleus Sıklıkları

Tablo 4–3: Hodgkin Dışı Lenfoma Olgularında Tedavi Öncesi Grubun demografik özellikleri, KKD ve MN Sıklığı

Tablo 4–4: Hodgkin Dışı Lenfoma Olgularında Kemoterapi Sonrası Grubun demografik özellikleri, KKD ve MN Sıklığı

Tablo 4–5: Hodgkin Dışı Lenfoma Olgularında, KT + RT Sonrası Grubun Demografik Özellikleri, KKD ve MN Sıklığı

Tablo 4–6: Sağlıklı Kontrol Grubunun Demografik Özellikleri, KKD ve MN Sıklığı

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 2.1:** B lenfosit gelişimi ve Lenfomaların gelişim evrelerine göre orijinleri
- Şekil 2.2:** G bantlı insan İdiogramı
- Şekil 2.3:** 5., 6., 7. ve 8. kromozomların bant özelliklerini gösteren idiogramları
ISCN, 1995
- Şekil 2.4:** Metafaz başına 50–100 adet değişim gözlenen Bloom sendomlu bir
olguya ait Kardeş kromatid Değişimi örneği
- Şekil 2.5:** Binükleuslu hücrelerde mikronukleusların görünümü
- Şekil 3.1:** 2 çekirdekli bir hücrede mikronukleus görünümü
- Şekil 4.1:** Kromatidler arasında koyu ve açık renk parça değişimi şeklinde Kardeş
Kromatid Değişimi görülmektedir.
- Şekil 4.2:** 2 Nukleuslu hücrede bir adet mikronukleus görünümü
- Şekil 4.3:** Mikronukleus içermeyen 2 çekirdekli hücre

ÖZET

Giriş. Hodgkin-dışı Lenfomalar (HDL) hematolojik tümörler arasında klinik davranış, morfoloji, hücre kökeni, etioloji ve patogeneze yönünden çok heterojen bir hastalık grubunu oluştururlar. Tüm Hodgkin-dışı lenfomaların %90'ında sitogenetik anomali saptanmaktadır. Kromozom anomalilerinin hastalığın oluşumundaki rolleri çok kesin bilinmemekle birlikte onkogen ve anti onkogenlerin bu kromozom anomalileri ile tümör oluşumunda rolü olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada sitogenetik biyomarkerler kullanılarak hastalığın tedavi öncesi ve sitotoksik tedavi sonrası döneminde genomik instabilite araştırılmıştır.

Materyal-Metod. Hodgkin Dışı Lenfoma Hastalarında yeni tanı konulmuş tedavi öncesi grup, kemoterapisi tamamlanmış grup ve KT + RT tamamlanmış grupta genomik instabilite, sitogenetik biyomarkerlerle (Kardeş Kromatid Değişimi ve Mikronukleus Analizi) araştırıldı. Araştırmaya yeni tanı konmuş tedavi başlanmamış 29 hasta, kemoterapisi tamamlanmış 29 hasta, kemoterapi ve radyoterapi yapılmış 16 hasta dahil edildi. Kontrol grubu 25 sağlıklı bireyden oluşturuldu.

Sonuçlar. KKD sıklığı açısından yapılan analizde tedavi öncesi HDL olgularında istatistiksel olarak anlamlı yükseklik tespit edildi.($p=0.038$) Ancak tedavi sonrası gruplarda anlamlı farklılık tespit edilemedi. MN sıklığı açısından yapılan analizde HDL olgularının tedavi öncesi ve sonrası gruplarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında belirgin olarak anlamlı yükseklik tespit edildi ($p=0,000$).

Sonuç: HDL hastalarında tedavi öncesi grupta KKD sıklığının artmış olarak saptanması ile hastalarda DNA hasarında artışın ortaya çıkarılabileceği ve bu artışın etyopatogenezinde önemli bir rol oynayabileceği öne sürülebilir. Aynı zamanda tedavi öncesi grupta kardeş kromatid değişimi yüksek bulunan hastalara ikincil kanser gelişimi açısından daha sıkı takip edilmesi gerektiği önerilebilir. KT ve KT + RT almış gruplarda KKD sıklığının normal olarak saptanması, KT ve RT' nin uzun dönemde tedavi edici etkisine bağlı olabilir. MN sıklığının HDL hastalarının tedavi öncesi ve sonrası gruplarında kontrol grubuna göre yüksek olarak saptanması hastalığın doğal bir süreci olabileceği gibi DNA onarım sistemindeki bozukluklarla da ilişkili olabilir. Kemoterapi ve Radyoterapi görmüş olan hastalarda, MN sıklığının kontrol grubuna göre yüksek olarak saptanması aksine KKD sıklığının yüksek olarak saptanmaması, aynı zamanda MN ölçüm yönteminin uygulamasının daha kolay ve güvenilir olması nedeniyle genotoksisitenin araştırılmasında daha informatif bir yöntem olduğunu düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Hodgkin Dışı Lenfoma, Kardeş kromatid değişimi (KKD), Mikronukleus Analizi (MN), Kromozomal aberasyon

ABSTRACT

Background : Non-Hodgkin Lymphoma (NHL) is a heterogeneous group of a disease due to their clinical behavior, morphology, cellular origin, etiology and pathogenesis. Cytogenetic anomaly is present in 90% of all Non-Hodgkin lymphoma. Although the role of chromosomal anomaly is not known exactly in the pathogenesis of the disease, oncogenes and anti-oncogenes are suspected to cause chromosomal anomalies and emergence of the tumor. In this study genomic instability before and after cytotoxic therapy evaluated using cytogenetic biomarkers.

Methods : Cytogenetic biomarkers; Sister Chromatid. Chromatid Exchange (SCE), and Micronucleus Analysis (MN) used to evaluate cytogenetic instability in three groups of NHL patients. 29 newly diagnosed patient with no previous therapy, 29 patient who completed chemotherapy and 16 patient who received both chemotherapy and radiotherapy. 25 healthy individual included as the control group.

Results : Frequency of SCE was determined to be significantly high in the pre-treatment group (P: 0.038) and no statistically difference was found in post-treatment groups. Micronucleus analysis revealed statistically significant difference in pretreatment and post-treatment groups of HDL patients comparing to the control group (P: 0.000).

Conclusion : Determination of increased frequency of SCE in NHL patients with no previous treatment may increase DNA damage which might be an important point in the etiopathogenesis of the disease. Meanwhile, patients with high SCE before treatment should be recommended to be carefully followed for the risk of development of a secondary malignancy. Determination of a normal SCE frequency in treated patients may be the long term result of therapeutic effects of chemotherapy and radiotherapy. High MN frequency in all HDL patients comparing to the control group might be due to a defeat in DNA repair mechanism or because of the nature of the disease. Determination of high MN frequency in post-treatment group comparing to the control group and normal SCE frequency in the treated group, meanwhile the measurement of MN frequency being more easy and reliable makes this method more informative in evaluating genotoxicity.

Keywords : Non-Hodgkin Lymphoma, Sister Chromatid. Chromatid Exchange (SCE), Micronucleus analysis (MN), chromosomal abrasion

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Lenfoma lenfoid sistemi oluşturan hücrelerden kaynaklanan malign bir hastalıktır. Hodgkin-dışı Lenfomalar (HDL) hematolojik tümörler arasında klinik davranış, morfoloji, hücre kökeni, etioloji ve patogeneze yönünden çok heterojen bir hastalık grubunu oluştururlar. Son yıllarda immünohistokimya ve moleküler genetiğin katkılarıyla hastalığın biyolojisi daha iyi anlaşılmış ve bununla ilişkili olarak pek çok yeni lenfoma tipleri tanımlanmıştır (3, 24).

Son yıllarda HDL insidansı artmaktadır. Bu artışta kazanılmış immün yetmezlik sendromunun rolü vardır ama tek etken değildir. Değişik lenfoma tiplerinin ülkelere göre dağılımında farklılıklar vardır. Foliküler Lenfomalar Avrupa ve Kuzey Amerika'da çok sık iken Japonya ve Orta Doğu Ülkelerinde seyrek. Burkitt Lenfoması Afrika'da, Erişkin T Hücre Lösemi lenfoması Japonya ve Afrika'da, alfa ağır zincir yapımıyla giden İnce Barsak Lenfomaları Akdeniz Bölgesi'nde siktir. HDL erkeklerde biraz daha siktir ve tüm yaşlarda görülebilir (3,24).

Hodgkin-dışı lenfomaların etiolojisi bazı tipler dışında kesin bilinmemektedir. Afrika tipi Burkitt lenfoması olgularının %90'ında Epstein-Barr virüs enfeksiyonuna ait kanıtlar vardır. Non-endemik olgularda bu oran ancak %15- 20' dir. ATLL'de insan T-hücre lösemi virüsünün rolü gösterilmiştir(3,24).

Günümüz teknolojisi ile tüm Hodgkin-dışı lenfomaların %90'ında sitogenetik bozukluk saptanmaktadır. Kromozom anomalilerinin hastalığın oluşumundaki rolleri çok kesin bilinmemekle birlikte onkogen ve anti onkogenlerin bu kromozom anomalileri ile tümör oluşumunda rolü olduğu düşünülmektedir (24).

İmmün sistemi baskılanmış hastalarda HDL gelişimi siktir. Bunun en iyi örneği immünoşüpresif tedavi uygulanan kalp ve böbrek transplant hastalarında HDL sıklığının artmasıdır. Bu durum lenfoma gelişiminde immün regülasyon bozukluğunun önemli rolü olduğunu düşündürmektedir. Konjenital veya kazanılmış immün yetmezliklerde, insan immün yetmezlik virusu enfeksiyonunda HDL siktir. Bazı otoimmün hastalıklarda Hodgkin-dışı lenfomaya daha sık rastlanır. Romatoid

artrit, Hashimoto tiroiditi ve Sjögren hastalığında lenfoma riski artmıştır. Sistemik lupusta da HDL eğilimi yüksektir. Doğumsal veya kazanılmış immun yetmezliği olanlar ve otoimmun hastalık zemininde gelişen Hodgkin-dışı lenfomada tümör hücre DNA'sında EBV sık olarak saptanır. Bu olgulardaki lenfoma patogenezinde EBV'nın rolü olabilir. Epilepsi tedavisi için diphenylhydantoin kullanan hastalarda lenf bezi büyümeleri olabilir. Ya da gerçek malign lenfoma gelişebilir. Epidemiyolojik araştırmalar lenfomada rolü olabilecek pek çok çevresel faktörü incelemiş, en belirgin ilişki saç boyaları ile görülmüştür (3,24).

Hodgkin-dışı lenfomalarda en çok incelenen kromozom anomalisi Burkitt lenfomasındaki 8. ve 14. kromozomlar arasındaki translokasyondur. t(8;14)(q24;q32). Bu değişim sırasında 8. kromozomdaki c-myc onkogeni 14. kromozomun q32 bandına taşınır. 14. kromozomdaki bu bölgede immünglobulin ağır zincir geni bulunur. Translokasyon, c-myc proto-onkogen aktivasyonuna yol açar. t(8;14), Burkitt tipi akut lenfositik lösemi (ALL-L3) olgularında da saptanabilir. 8. kromozomdaki c-myc onkogeni daha seyrek olarak kapa hafif zincir geninin bulunduğu 2 numaralı kromozom ile t(2;8)(q24;q11) veya lambda hafif zincir geninin bulunduğu 22 numaralı kromozom ile translokasyon yapabilir (3,7,12, 26).

Kromozomal anomalilerin meydana gelmesinde genomik instabilite sorumludur. Genomik instabilite sitogenetik ve moleküler genetik değişik yöntemlerle araştırılabilir. Çalışmalarda sitogenetik biyomarkerler olarak kromozomal anomali, Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) sıklığı ve mikronukleus analizi kullanılmaktadır (1, 5, 6, 11, 26, 30, 31).

Bu tez çalışmasında tedavi görmemiş Hodgkin Dışı Lenfoma olgularında periferik kan lenfositlerinde genomik instabilite, kemoterapi ve radyoterapinin genotoksik etkileri araştırılacak ve ayrıca iki sitogenetik biyomarker (KKD ve mikronukleus sıklığı) birbirleriyle karşılaştırılacaktır. Değişik evrelerdeki lenfoma olgularında bu iki sitogenetik biyomarkerle genomik instabilite araştırılacaktır.

II. GENEL BİLGİLER

II.1 KANSER

Kanser karmaşık ve kalıtsal bir hastalık ailesidir. Hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalması ve büyümesi sonucu ortaya çıkar. Normal hücrelerin kanser hücresine dönüşümü karmaşık ve çok aşamalı bir olaydır ve karsinogenezis olarak isimlendirilir. Kanserleşen hücre kalıtsal olarak bir sonraki jenerasyona aktaracağı bir takım yeni özellikler kazanmıştır. Bu özellikler aşağıda sıralanmıştır (27).

1-Kanserleşen hücre, normal hücrelerdeki inhibisyon mekanizmasını kaybetmesi ile çoğalma kontrolünü yitirmiştir.

2-Kanserleşen hücre, dokuya özgüllüğünü kaybetmiştir. Kökeni ne olursa olsun artık tamamen farklı özelliklere sahiptir. Kan ve lenf yolu ile her hangi bir dokuya yerleşebilir.

3-Kanserleşen hücrede, farklılaşma gerilemiştir.

4-Kanserleşen hücrenin, metabolizması değişmiştir.

5-Kanserleşen hücrenin, antijenik özellikleri değişmiştir.

6-Kanserleşen hücrenin, morfolojisi değişmiştir.

Kanserdeki temel sorun hücre çoğalmasındaki kontrolün kaybıdır. Çoğalma ve büyüme gen kontrolü altında olduğundan gen ekspresyonunun değişimi ile kontrol dışına çıkmaktadır. Gen ekspresyonunun değişimi DNA'nın direk etkilenmesi (gen mutasyonları, translokasyonlar ya da amplifikasyonlar) ve gen transkripsiyonu ya da translasyonu gibi mekanizmalardan biri ile oluşur (27)

Kanser oluşumunun sebebi tam olarak bilinmemekle beraber hem dış (Çevresel kimyasallar, radyasyon) hem de iç nedenler (immün sistem defektleri, genetik yatkınlık) rol oynamaktadır. İlk olarak 1914 te Boveri tarafından, kanserin kaynağında somatik mutasyonun olduğu hipotezi ortaya atıldı. Bu hipoteze göre kanser hücrelerinin kaynağı, somatik hücrelerde oluşan kromozom düzensizliklerinin

sonucudur. Bu düzensizlikler ise aşağıda sıralanan hücresel kontrol mekanizmasının bozulması ile anormal hücre proliferasyonuna yol açar (27).

Kromozom bant tekniklerinin gelişmesi ile kanser hücrelerinde bulunan kromozomlarının yeniden yapılandırılmalarının belirlenmesinde ilerleme kaydedilmiştir. Kanser oluşumunda etkili olan 3 tip gen bulunmaktadır:

1-Tümör Baskılayıcı Genler: Tümör baskılayıcı gen ürünleri normalde anormal büyüme ve malign malformasyonları bloke eder. Bu genler ekspresse olmadıklarında hücrenin büyüme ve bölünmesini baskılayıcı etkileri ortadan kalkar. Kanser oluşabilmesi için her iki allelin kaybedilmesi gerekmektedir.

2- Onkogenler: Normal hücre büyümesini ve gelişmesini etkileyen genlerdir. Onkogenlerin büyük bir bölümü hücre çoğalması ve farklılaşmasının kontrolü ile ilişkili protoonkogen adı verilen normal genlerin mutasyona uğramış formlarıdır. İnsanda normal genomda bulunan onkogenler (c-onc) RNA tümör virüslerinde bulunan genlere homologdur. Bugün için 100 ün üzerinde c-onc izole edilmiş olup, insan kromozomlarında haritalanmıştır. Protoonkogenleri aktive eden 3 mekanizmadan söz edilmektedir (27).

A. Amplifikasyon: Yapısal olarak normal onkogenlerin artan kopyaları sitogenetik olarak küçük kromozom parçaları şeklinde ya da normal kromozomlar içinde duplikasyon yapmış olarak görülür. Böylece protoonkogenlerin aşırı ekspresyonu ortaya çıkar. Normal hücrelerde hemen hemen hiç görülmeyen bu olay kanser hücrelerinde çoğu kez görülür. Nöroblastomalarda N- myc protoonkogeninin 200 kez artması bu mekanizmaya örnek olarak verilebilir (27).

B. Nokta mutasyonları: Tümör dokusundaki c-onkogenlerinin DNA dizilerinin diğer somatik dokularla karşılaştırılması sonucunda, spesifik nokta mutasyonlarının farklı tümör tiplerinde neden olabileceği kabul edilmiştir (26,27).

C. Kromozomal yeniden düzenlemeler(rearrangement'ler): Burada iki ayrı mekanizma söz konusudur.

a. C-onkogenlerinin immunoglobulin yada T-cell reseptör lokusuna translokasyonudur. Antijen reseptörleri adı verilen bu reseptörlerin normal süresi esnasında onkogenler aktive edilir. Bu durum Burkitt lenfomada gözlenir. 8 numaralı

kromozomda (8q24) bulunan myc onkogeni; immunoglobulin 2p11 de bulunan hafif zincirin K parçası t(8;2) 14q32 de bulunan ağır zincirinin enhanceri t(8;14) ve 22q11 de bulunan hafif zincirinin parçaları t(8;22) ile oluşturduğu translokasyonlar sonucu aktive olmaktadır (27).

b. Kromozomal translokasyon sonucu 2 geni kodlayan bölgelerin füzyonu ile füzyon proteinin üretilmesidir. Buna en iyi örnek KML olgularında görülen 9q34 deki c- abl onkogeninin 22q11 de bulunan bcr ile füzyonu, t(9;22) sonucu ortaya çıkan bcr- abl füzyon proteinidir (27).

3-Diğer Genler: Onkogen ve tümör baskılayıcı genlerin dışındaki diğer genler de kanser oluşumundaki rollerinden dolayı sorumlu tutulmaktadırlar. Bu genlere ilişkin en iyi örnek sitokrom P450 ve DNA tamiri enzim genleridir (27)

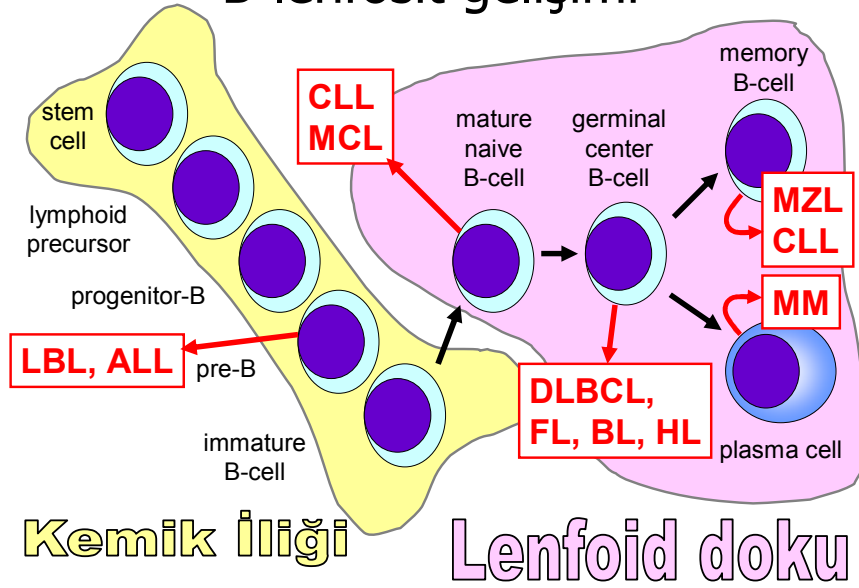
II.2.LENFOMA

Lenfomalar, immun sistemi oluşturan hücrelerin çeşitli diferansiyasyon aşamalarından kökenini alan maligniteleridir. Geliştikleri diferansiyasyon aşamasına göre farklı morfolojik, immünolojik ve klinik tablo oluştururlar.

Tüm lenfoid hücreler hematopoetik progenitör hücrelerden menşeyini alırlar. Hematopoetik progenitör hücreler lenfoid ve myeloid öncü hücreleri oluşturmak üzere iki ana gruba ayrılır. Lenfoid kök hücre son ürünü olan B ve T lenfositleri oluşturmak üzere farklılaşır. Lenfoid lösemilerin % 75 i ve tüm lenfomaların %90 ı B hücre orijinlidir. B hücrelerinin gelişmesinde antijene bağımlı olmayan ve antijene bağımlı olan üzere iki faz dikkati çeker. Antijene bağımlı olmayan B hücre gelişimi kemik iliğinde gerçekleşir ve neticede slg + matür B hücre oluşumuna kadar olan tüm aşamaları kapsar. Antijene bağımlı evre ise matür B hücresinin antijenle karşılaşması, hafıza B hücrelerinin oluşumu ve Ig class (sınıf) değişimi ve plazma hücre oluşumu ile sonlanır ve lenf bezleri, dalak, basaklar Peyer plakları gibi lenfoid organda gerçekleşir (Şekil 2,1).

İmmunglobulin ağır zincir ve hafif zincir rearanjmanı ve delesyonu B hücrelerinin erken evresinde oluşur. Ağır zincir için önce D segmenti J segmenti ile rearanje olurken daha sonra VDJ rearanjmanı gerçekleşir. Daha geç evrede de VJ segment rearanjmanı sonucu hafif zincir rearanje olarak nihayet ağır ve hafif zinciri olan intakt Ig molekülü oluşur. B hücreleri antijenle uyarı sonucu daha çok lenf-nodu germinal merkezlerde yer alan somatik mutasyon adı verilen işlevle modifikasyona uğrar. T hücreleri ise timusa göç eder ve burada T hücre reseptör genlerinin rearanjmanı sonucu T hücre diferansiyasyonu tamamlanır (26).

B-lenfosit gelişimi



Şekil 2-1: B lenfosit gelişimi ve Lenfomaların gelişim evrelerine göre orijinleri: LBL: Lenfoblastik Lenfoma, ALL: Akut Lenfoblastik Lösemi, CLL: Kronik Lenfositik Lösemi, MCL: Mantle Zon Lenfoma, DLBCL: Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma, FL: Foliküler Lenfoma, BL: Burkitt Lenfoma, HL: Hairy Cell (tüylü hücreli) lösemi, MZL: Marjinal Zon Lenfoma, MM: Multipl Myelom (26)

Her ne kadar lenfoid maligniteler lenfoid hücrelerin diferansiyasyonunun farklı evrelerinden orijinini alırlarsa da, lenfomanın diferansiyasyon aşaması onun doğal seyrini tahmin etmede yararlı olmamaktadır. Örneğin Burkitt lenfoma ontogenik olarak matür folikül merkez IgM taşıyan hücrelerden orijinini almasına rağmen daha primitif evreden orijinini alan pre-B ALL (CD10+) den daha agresif ve tedavi yanıtı daha kötü kabul edilmektedir. Ancak bu yapının bilinmesi lenfoid tümörlerin immunofenotipleme ile ayrılmasında önemli rol oynamaktadır (26).

Lenfoma, bugüne kadar sınıflaması en sık değişen neoplazmdır. 1966 yılında Rapaport, 1974 Lukes/Collins, 1982 Working Formulation, 1994 R.E.A.L ve 2001 WHO sınıflaması en çok adından söz edilen sınıflamalardır. WHO sınıflaması, dünyada hematopatoloji ve klinik onkoloji konusunda deneyimli otörlerin morfolojik, klinik, immünolojik ve genetik verileri dikkate alarak oluşturdukları konsensüs sonucu ortaya konmuş ve halen geçerliliğini sürdüren son sınıflamadır. Bu sınıflamanın özelliği lenfoid maligniteleri prekürsör B (ontogenik olarak B hücrelerinin diferansiyasyonunun erken evresinden) ve matür B, keza T hücrelerini

de prekürsör T ve matür T olarak ikiye ayırmakta prekürsör B ve T grubuna akut lenfoblastik lösemi (B ve T) dahil etmektedir (26).

II.2.1 HODGKIN DIŞI LENFOMA

Hodgkin Dışı Lenfomalar (HDL) farklı davranış paterni ve tedaviye cevabı ile lenfoproliferatif hastalıkların heterojen bir grubudur. Hodgkin hastalığı gibi HDL lenfoid dokulardan çıkar ve diğer organlara yayılabilir. Bununla birlikte HDL, Hodgkin hastalığına göre daha çok ektranodal yayılım eğilimi gösterir. Prognoz histolojik tipe, evreye ve tedaviye bağlıdır (26)

HDL iki prognostik gruba ayrılabilir. Indolent (yavaş seyirli) lenfoma ve agresif lenfoma. Indolent lenfoma, median sağ kalımı 10 yıla kadar uzayan, rölatif olarak iyi prognoza sahiptir, ancak ileri klinik evrelerde genelde kürabl olamamaktadır. Erken evre (I-II) Indolent HDL' lar tek başına radyoterapi ile efektif olarak tedavi edilebilirler. Indolent tiplerin çoğu morfolojik olarak nodülerdir. HDL' nin agresif tiplerinde semptomlar kısa sürelidir fakat bu hastaların önemli bir kısmı intensif kombinasyon kemoterapi ile tedavi edilebilirler. Genelde modern tedavi ile HDL' larda 5 yıllık genel sağ kalım yaklaşık olarak %50-60'dır. Agresif HDL nin %30-60'ında kür sağlanabilir. Relapsların çoğu tedaviden sonraki ilk 2 yılda olmaktadır. Indolent HDL radyoterapi ve kemoterapiye cevap vermekle birlikte ileri evrelerde relaps görülmektedir. Bununla birlikte histoloji low grade kaldığı müddetçe ikinci seri tedaviye iyi cevap verebilir (20,26).

Radyoterapi tekniği Hodgkin hastalığındakinden biraz farklıdır. Radyoterapi dozu, histolojik tip, evre, performans, tedavinin küratif veya palyatif olusuna, komşu organların sensitivitesine ve tedavinin tek başına radyoterapi veya kemoterapi ile kombine edilerek mi yapıldığına bağlı olarak , 2500-5000 cGy arasında değişir. Tedavi 4-15 MV yüksek enerjili LINAC ve simülatör gerektirir. Radyoterapi alanları hastadan hastaya değişmekle birlikte genellikle tutulmuş alan veya komşu bölgeleri içine alacak şekilde planlanır (20,26).

II.1.1.1 Sellüler Klasifikasyon

HDL nin üniform tedavisi, üniform bir klasifikasyon sisteminin olmaması nedeni ile mümkün olmamaktadır. 1982’de uzlaşma çalışmasının sonuçları Working Formulation (WF) olarak yayınlanmıştır. WF 6 majör klasifikasyon sistemini bir sistem halinde kombine etmişlerdir. Bu farklı ülkeler ve enstitülerdeki çalışmaları karşılaştırma imkânı vermiştir. Rapaport sınıflandırması artık kullanılmamaktadır (Tablo 2.1, 2.2)

B HÜCRELİ	T HÜCRELİ
Prekürsör B neoplasmları	Prekürsör T neoplasmları
Prekürsör B lenfoblastik lösemi/lenfoma	Prekürsör T- lenfoblastik lösemi/lenfoma
Mature B hücre neoplasmları	Matüre T hücre neoplazmları
B-KLL/küçük lenfositik lenfoma	T prolenfositik lösemi
B prolenfositik lösemi	T hücreli granüler lenfositik lösemi
Lenfoplasmositik lenfoma	Agresif NK hücreli lösemi
Splenik marjinal zon B hücreli lenfoma	Erişkin T hücreli lösemi/lenfoma
Nodal marjinal zon lenfomaları	Ekstranodal NK/T hücreli lenfoma,nazal tip
MALT tipi ektranodal marjinal zon lenfoma	Enteropati tipi T hücreli lenfoma
Mantle hücreli lenfoma	Hepatosplenik gamma-delta lenfoma
Foliküler lenfoma	Subkutan pannikulit benzeri lenfoma
Tüylü hücreli lösemi	Mycosis Fungoides /Sezary sendromu
Plazma hücreli myelom	Anaplastik büyük hücreli, primer kutaneoz tip
Diffuz büyük B hücreli lenfoma	Periferik T hücreli lenfoma
Burkit lenfoma/lösemi	Anjioimmunoblastik T hücreli lenfoma
	Anaplastik büyük hücreli, sistemik tip

Tablo 2-1: Lenfoid Malignitelerin WHO sınıflandırması (16, 26).

B HÜCRELİ	T HÜCRELİ
İNDOLEN B-KLL/küçük lenfositik lenfoma, Lenfoplasmasitik,,lenfoma, immunositoma,Waldenström makroglobulinemisi, Tüylü hücreli lösemi, Splenik marjinal zon B hücreli lenfoma, MALT tipi ektranodal marjinal zon lenfoma, Foliküler lenfoma (grade I,II) AGRESİV Plazma hücreli myelom Mantle hücreli lenfoma Foliküler lenfoma (grade III) Diffuz büyük hücreli lenfoma Primer Mediastinal büyük B hücreli ÇOK AGRESİV Prekürsör B lenfoblastik lösemi/lenfoma, Burkitt lenfoma, Plazma hücreli lösemi	İNDOLEN Large granüler lenfositik lösemi, Mycosis fungoides, Sezary sendromu, Primer kutaneoz anaplastik büyük hücreli AGRESİV T prolenfositik lösemi, Periferik T hücreli lenfoma, Angioimmunoblastik lenfoma, angiosentrik lenfoma (nazal tip NK hücreli veya T hücreli lenfoma), İntestinal T cell lenfoma, Anaplastik büyük hücreli lenfoma, Hepatosplenik gamma/delta lenfoma, subkutan pannikulit benzeri T hücreli lenfoma ÇOK AGRESİV Prekürsör T lenfoblastik lösemi/lenfoma, Erişkin T hücreli lösemi/lenfoma

Tablo 2-2: Lenfoid malignitelerin sınıflandırılması (16, 26)

Yavaş Seyirli (Indolent) Lenfoma

Foliküler lenfoma tüm HDL'ların %20 sini, Indolent lenfomaların %70 ini oluşturur. Foliküler lenfomalar genelde 50 yaşın üstünde ve tanı konulduğunda yaygın durumdadır. En sık splenik ve kemik iliği tutulumu ile birlikte nodal tutulum görülür. İleri evreye rağmen yavaş seyirli olmaları nedeniyle medyan sağkalım 8–12

yıl arasındadır. Bununla birlikte ileri evre foliküler lenfomaların çoğunun güncel tedavi seçenekleriyle küratif tedavisi mümkün olmamaktadır. Tedavi seçenekleri dikkatli izlem, purin nükleosid analogları, oral alkilleyici ajanlar, kombinasyon kemoterapisi, interferon ve monoklonal antikorlardır. bcl-2 geninin rearanjmanı foliküler lenfomalıların % 90' dan fazlasında mevcuttur. Bcl-2 proteininin over-ekspresyonu apoptoz inhibisyonu nedeniyle lenfomanın eradike edilememesine yol açmaktadır (20,26).

Lenfoplasmositik lenfoma genelde Ig-M tipi monoklonal serum paraproteinemi ile birlikte dir. Çoğunda kemik iliği, lenf nodu ve splenik tutulum ve bazı hastalarda hiperviskozite sendromu mevcuttur. Lenfoplasmositik lenfoma tedavisi diffüz küçük lenfositik lenfoma ve kronik lenfositik lenfoma gibi low-grade lenfomalara benzemektedir (26).

Marjinal zon lenfomaları nodları tuttuğunda monositoid B-cell lenfoma olarak ve ektranodal bölgeleri (GIS, troid, akciğer, meme, cilt) tuttuğunda mucosa-associated lymphatic tissue (MALT) lenfoması olarak adlandırılır. Hastaların çoğunda ektranodal tutulum (genelde mide) mevcuttur. Lokalize gastrik tutulumlu hastaların % 50' sinde Helikobakter pilori enfeksiyon tedavisi ile birlikte 3 ay sonraki endoskopik muayene ile birlikte gerileme görülmektedir. Progrese olan hastalar radyoterapi, cerrahi (total veya parsiyel gastrektomi + radyoterapi), kemoterapi veya kombine modalite ile tedavi edilirler. Lenf nodu, kemik iliği ve kana disemine olduklarında diğer low-grade lenfomalar gibi davranırlar. MALT bölgelerinin large B-cell lenfoması diffüz large cell lenfomalar içinde sınıflandırılır. Abdominal Akdeniz lenfoması, ağır zincir hastalığı ve immunoproliferatif ince barsak hastalığı (IPSID) muhtemelen MALT lenfomasının diğer versiyonlarıdır ve erken evrede antibiyotiklere cevap verirler (20,26).

Splenik marjinal zon lenfoması masif splenomegali, kemik ilgi ve periferik kan tutulumu ile birlikte olan Indolent lenfomalardandır. Splenektomi uzun remisyonla sonuçlanabilir. Tedavi diğer low-grade lenfomalar gibidir. Fakat bu tip lenfomalar kemoterapiye daha az cevap vermektedirler (26)

Primer kutanöz anaplastik large cell lenfoma ekstra kutanöz yayılımı olmayan ve önceden lenfoproliferatif hastalığın bulunmadığı olgulardır. Spontan regrese olabilen, Progrese olduğunda agresif doksorubisin temelli tedavi gerektiren bir hastalıktır. Lokalize hastalıkta genelde radyoterapi uygulanır. (26)

Agresif HDL

Diffüz large B-cell lenfoma yeni tanı konan HDL'ların % 30' unu oluşturmaktadır. Hastaların çoğu hızlı büyüyen kitle ve B semptomları ile başvurur. Lokalize olguların çoğu kombine modalite tedavi ile kürablardır. İleri evre hastalığı olanların % 40 kadarı doksorubisin temelli kombinasyon kemoterapisi ile kürabl olabilmektedir. Agresif HDL da genel sağkalımı etkileyen 5 önemli prognostik faktör tanımlanmıştır(26).

1. Yaş (60 yaşın altı ve üstü)
2. Serum LDH seviyesi
3. Performans statüsü (0-1 e karşı 2-4)
4. Evresi (1-2 ye karşı 3-4)
5. Ekstranodal tutulan bölge sayısı (0-1 e karşı 2-4)

İki veya daha fazla risk faktörü olanlar % 50'den daha az 5 yıllık hastalıksız ve genel sağ kalıma sahiptir. Relaps kemik iliği, santral sinir sistemi (CNS), karaciğer ve dalakta olabilmektedir. Paranasal sinüs ve testiküler tutulumu olanlarda intratekal metotreksatla Santral sinir sistemi (SSS) proflaksisi tavsiye edilmektedir. Kemik iliği tutulumunda SSS proflaksisi tartışmalıdır (20,26).

Anaplastik large cell lenfomalar (ALCL) karsinomlarla karıştırılabilirler. Bu lenfomalar genelde T-hücre orijinlidirler ve özellikle deri olmak üzere ektranodal tutulumla birliktedir. Bu grup lenfomalar da diffüz large cell lenfomalar gibi tedavi edilirler (26)

Ekstranodal NK/T-cell lenfoma (nasal tip) , özellikle nasal ve paranasal sinüs bölgesinde olmak üzere ektranodal yayımlı ekstensif nekroz ve anjioinvazyon ile karakterli agresif lenfomalardandır. Tedavisinde doksorubisin temelli kombinasyon tedavisine ilaveten yüksek SSS tutulumu ve lokal nüks riski nedeniyle genelde kemoterapiden önce lokal radyoterapi ve intratekal proflaksi ve/ veya proflaktik kranial radyoterapi uygulanmaktadır. Agresif küre rağmen standart tedavi ile kötü cevap ve kısa sağ kalım nedeniyle bazı araştırmacılar kemik iliği ve periferel kök hücre transplantasyonu önermektedirler. Yalnızca cildi tutan NK/T-cell lenfomalar daha iyi prognoza sahiptir. Enteropati tipi intestinal T-cell lenfoma glüten sensitif enteropati ile birlikte olup ince barsakları tutar (20,26)

Mantle cell lenfoma lenf nodlarında, dalakta, kemik iliğinde kanda ve bazen de gastrointestinal sistemde bulunur (lenfomatöz polipozis). Low-grade lenfomalar gibi Mantle cell lenfomalar antrasiklin temelli kemoterapi ile inküabl görünmektedir ve genelde yaşlılarda ileri evrelerde asemptomatik olarak bulunur. Genel sağ kalım diğer lenfomalara göre daha kısadır. Lenfoblastik lenfoma (Precursor T-cell) HDL ların çok agresif bir tipidir. Genelde gençlerde görülür, geniş mediastinal kitle ile birlikte olup kemik iliği ve CNS a disseminasyon eğilimlidir. İntensif kombinasyon kemoterapisi +/-kemik iliği transplantasyonu bu tipin standart tedavisidir. Bulky tümör kitlesine bazen radyoterapi yapılabilir (20,26).

Burkitt's Lenfoma/diffüz small noncleaved cell lenfoma genelde gençlerde görülür, pediatrik HDL' ların çoğunu oluşturur. Tedavisi ileri evre agresif lenfomalarda kullanılan multidrug rejimlerdir. Bulky abdominal hastalık ve yüksek serum laktat dehidrogenaz kötü prognostik faktörler olarak değerlendirilir. Burkitt's lenfomalarda yaşam boyu % 20–30 SSS tutulumu riski vardır (26).

Primer effüzyon lenfoması plevral, perikardial ve abdominal kaviterlerde tanımlanabilen tümör kitlesi olmadan bulunmaktadır. Hastalar genelde HIV (+) tir, prognozu kötüdür (26).

Evreleme

Evreleme sistemi Hodgkin lenfomadakine (HL) benzemektedir. Nonkontigüöz lenf nodu tutulumu HL' da sık olmamakla birlikte HDL da sık görülmektedir. HDL da aynı zamanda Waldeyer's halkası, epitrohear nodlar ve Gastrointestinal sistem (GIS) tutulumu sık görülmektedir. Ekstranodal prezantasyon HDL' da daha sıktır. Tek bölge halinde ekstranodal tutulum diffüz lenfomalarda enderdir. Karaciğer ve kemik iliği tutulumu özellikle low-grade lenfomalarda sıktır. Agresif HDL' larda BOS un sitolojik incelenmesi (+) olabilir. Hiler ve mediastinal tutulum HL' ya göre daha enderdir. HDL da Ann Arbor evreleme sistemi kullanılmaktadır. Bu sistemde evre I,II, III, IV HDL

A ve B kategorilerine subklasifiye edilebilir.

B semptomları;

- 6 ayda % 10'luk açıklanamayan kilo kaybı
- 38 derecenin üzerinde açıklanamayan ateş
- Gece terlemesi

Evre I: Tek lenf nodu bölgesi (I), veya tek ekstra lenfatik organ veya bölgenin lokalize tutulumu (IE)

Evre II: Diyaframın aynı tarafında iki veya daha fazla lenf nodu bölgesi (II), veya tek komşu ekstra lenfatik organ veya bölgenin regional lenf nodları ile birlikte (ve/veya diyaframın aynı tarafında başka lenf nodu bölgelerinin lokalize tutulumu (IIE)).

Evre III: Diyaframın her iki tarafında lenf nodu tutulumu (III), ekstra lenfatik organ veya bölgenin lokalize tutulumu (IIIE) birlikte olabilir. Splenik tutulum varsa (III S) ekstra lenfatik organ veya bölgenin lokalize tutulumu ile birlikte ise (III S+E)

Evre IV: Bir veya daha fazla ekstra lenfatik bölgenin dissemine (multifokal) tutulumu +/- komşu lenf nodu tutulumu veya nonregional uzak lenf nodu tutulumu ile birlikte izole ekstralenfatik organ tutulumu (20,26)

TEDAVİ

Indolent evre I ve kontigioz evre II HDL:

HDL da lokalize prezantasyon ender olmakla birlikte uygun evreleme yapılmışsa, gerçek lokalize hastalıkta tedavi ile kür mümkündür. Indolent evre I ve II HDL’ da tutulmuş alan veya komsu nodal bölgelerin dahil edildiği geniş alan 2500–4000 cGy radyoterapi ile önemli sayıda hastada radyoterapi alanlarında uzun dönem hastalık kontrolü sağlanabilmektedir. Radyoterapiye adjuvant kemoterapi ilavesinin relapsı azalttığı gösterilememiştir. Radyoterapinin kontrendike olduğu ender durumlarda semptomatik olgularda kemoterapi kullanılabilir, veya asemptomatik olgular dikkatli gözlemlenmelidir. Tutulan alanları radyoterapi porteline dahil edilemeyen olgular evre III-IV low grade lenfomalar gibi tedavi edilir. Foliküler large cell ve Mantle cell HDL larda genelde agresif lenfomalar gibi tedavi edilir (26).

Standart tedavi seçenekleri:

- 1.Tutulmuş alan radyoterapisi
- 2.Komşu profilaktik nodları içine alan geniş (regional) radyoterapi
- 3.Subtotal veya total lenfoid radyoterapi

4.Radyoterapi ile birlikte kemoterapi

5.Radyoterapi uygulanamıyorsa yalnız kemoterapi veya dikkatli izlem

Agresif, evre I ve kontigioz evre II HDL:

Geleneksel olarak radyoterapi bu grup lenfomalarda primer tedavidir. Tedavi edilen hastaların yaklaşık % 90'ında radyasyon alanı içinde uzun dönem hastalık kontrolü tek başına radyoterapi ile sağlanabilmektedir. Mega voltaj cihazlarla 3500-5000 cGy radyoterapi uygulanmaktadır. Bununla birlikte tek başına radyoterapi ile hastalıksız 5 yıllık sağ kalım %60–70 kadardır. Bu grup hastalarda radyoterapi + kemoterapi veya tek başına kemoterapi de uygulanabilmektedir. İki büyük randomize prospektif çalışma CHOP + radyoterapinin tek başına CHOP'a üstünlüğünü göstermiştir (26).

Diffüz agresif lenfomalarda başka bölge tutulmaksızın ektranodal bölgeler tutulabilmektedir. Bu bölgeler gastrointestinal sistem, tiroid ve kemik olabilir. Adjuvan kemoterapi veya radyoterapi olsun/olmasın primer ektranodal lenfomalarda cerrahinin tanı ve tedavide önemi büyüktür. Ektranodal bölge prezantasyonunda relaps tahmin edilemediğinden kemoterapi primer tedavi modalitesi olarak kullanılmaktadır. Nodal diffüz agresif lenfomada bile tutulan bölgeye kemoterapiden sonra radyoterapi uygulaması hastalıksız ve genel sağ kalım yönünden yararlı görünmektedir (25,26,33).

Standart tedavi seçenekleri:

Kemoterapi+Radyoterapi

CHOP (siklofosfamid+doksorubisin+vinkristin+ prednison) tercih edilen kemoterapi kombinasyonudur.

Indolent, Non-kontigioz evre II-III-IV HDL

İleri evre low-grade lenfomaların optimal tedavisi tartışmalıdır. Bu konuda çok sayıda çalışma devam etmektedir. Tartışmanın sebebi bugünkü terapötik seçeneklerle ileri evre low grade lenfomaların çoğunluğunda kür sağlanamamış olmasıdır. Tedaviye komplet cevap alınsa bile relaps sık olmaktadır. Standart tedavi purin nükleosid analogları (fludarabin, 2- klorodeoksiadenozin), oral alkilleyici ajanlar

veya kombinasyon kemoterapisi olmaktadır. Bu tedavilerin hiçbirisi ileri evre hastalıkta küratif olmadığından yeni tedavi yaklaşımlarına dair çalışmalar devam etmektedir. Bu çalışmalar: Total vücut ışınlaması + kemoterapiyi takiben otolog veya allojenik kemik iliği veya periferik kök hücre transplantasyonu, rituximab(CD20 ye karşı monoklonal antikor) ve radiolabeled monoklonal antikorlar (26).

Standart tedavi seçenekleri:

- 1-Aseptomatik hastalarda dikkatli gözlemlerle tedavi ertelenebilir.
- 2- Purin nükleosid analogları (fludarabin, 2- klorodeoksiadenozin)
- 3-Oral alkilleyici ajanlar (siklofosfamid, klorambusil)
- 4-Yalnız kombinasyon kemoterapisi: Siklofosfamid+ vinkristin+ prednison (CVP), Siklofosfamid+ Oncovin+ Prednison+ Prokarbazin (C(M)OPP), Siklofosfamid+ doksorubisin+Oncovin+Prednison(CHOP),fludarabin+Mitoksantron+Deksametazon(FND)
- 5-Anti-CD20 monoklonal antikor (rituximab) ilk basamak tedavi olarak +/- kombinasyon tedavisi ile birlikte kullanılabilir.
- 6-Kemoterapi + total vücut ışınlamasını takiben otolog veya allojenik kemik iliği veya periferik kök hücre transplantasyonu

Agresif , Non-kontigüöz evre II/III/IV HDL

İleri evre agresif HDL li hastalarda tedavi seçeneği kombinasyon kemoterapisi +/- lokal alan radyoterapisidir. Doxorubicin temelli kombinasyon tedavisi ile % 35–45 uzun dönem hastalıksız sağ kalım elde edilmiştir. Paranasal sinüs ve testiküler tutulumu olan hastalarda 4–6 metotreksat intratekal enjeksiyonu ile SSS profilaksisi önerilmektedir. Kemik iliği tutulumunda SSS profilaksisi tartışmalıdır (26)

Standart tedavi seçenekleri:

- 1-CHOP+rituximab
- 2-Yalnız kombinasyon tedavisi (CHOP)
- 3- Otolog kemik iliği veya periferik kök hücre transplantasyonu veya yüksek relaps riski olanlarda allojenik kemik iliği veya transplantasyonu

Lenfoblastik Lenfoma

HDL nin çok agresif bir formudur. Genelde gençlerde görülmekle birlikte sık değildir. Genelde Büyük mediastinal kitle ile birlikte olup, kemik iliği ve SSS disseminasyonuna eğilimlidir. SSS profilaksisi ile yoğun kombinasyon kemoterapisi standarttır. Bulky tümör kitlesine radyoterapi bazen uygulanır. Çok hızlı progrese olduğundan tanı kesinleştikten hemen sonra kombinasyon kemoterapisine başlanmalıdır (26).

Diffüz Küçük Non-Cleaved Cell /Burkitt's Lenfoma

Bu lenfomaların tedavisi ileri evre agresif lenfomalar gibi agresif multidrog rejimlerle yapılmalıdır. Bu hastalarda kötü prognostik faktörler bulky abdominal hastalık ve yüksek serum LDH olarak tanımlanmıştır. Bazı merkezlerde tedaviye konsolidasyon amacıyla kemik iliği transplantasyonu ilave edilmektedir. Bu grup lenfomalarda %20–30 SSS tutulum riski vardır. Tüm hastalarda intratekal metotreksatla SSS profilaksisi önerilmektedir (26).

II.3 SİTOGENETİK ANALİZ YÖNTEMLERİ

Yaşayan ve çekirdeği olan, bölünebilme yeteneğini kaybetmemiş tüm dokular kromozom çalışmalarında kullanılabilir. Perifer kanı lenfositleri, deri, kemik iliği, amniyositler ve koryon villi hücreleri invitro olarak laboratuvar koşullarında en çok kullanılan dokulardır. Sitogenetik çalışmalar için gerekli olan metafaz kromozomlarının eldesinde temel olarak iki farklı yöntem kullanılmaktadır;

1- Direkt Yöntem: Kemik iliği hücreleri ile sitotrofoblastlar gibi spontan mitotik aktivitesi olan dokularda uygulanabilmektedir.

2- Kültür Yöntemi: Perifer kanı, amniyositler, gonad dokusu ve deri fibroblastlarından ancak kültür edilerek kromozom elde edilebilmektedir. Bu amaçla medyum adı verilen protein, vitamin, hormon ve minerallerle zenginleştirilmiş ortamlar kullanılmaktadır.

Postnatal kromozom anomalilerinin saptanmasında kullanılan Perifer kanı lenfosit çalışmalarında, kullanılacak besi yerine normal şartlarda bölünmeyen lenfositleri uyarak, mitoz sokmak için Phytohaemaglutinin (PHA) eklenmektedir. Perifer kanı lenfositleri için ideal kültür süresi 72 saattir. Uzun süreli kültürlerde ise bu süre daha uzun ve dokuya özeldir. Hücre kültürlerinde kolşisin (colsemid) ilave edilerek iğ iplikçiklerinin protein yapısı bozulmakta ve mitoz metafaz evresinde durdurulmaktadır. Böylece daha fazla sayıda metafaz elde edilmektedir. Hücre zarının yarı geçirgen özelliklerinden faydalanılarak hacmi genişletmek için hipotonik solüsyon uygulanması ve hücrelerin fiksasyonu ile daha kaliteli metafazlar elde edilmektedir. Bundan sonraki adım kromozomların bantlama teknikleri ile tek tek tanınıp sayısal ve/veya yapısal bir anomalinin olup olmadığının araştırılmasıdır. Metafaz kromozomları konvansiyonel yöntemle düz olarak boyanarak ancak sayısal anomaliler ile özgün olmayan büyük yapısal anomaliler görülebilmektedir (27).

Kromozomlarda daha ayrıntılı tanıya gidebilmek için bantlama yöntemlerinin uygulanması gerekmektedir. Uygulanan bantlama yöntemleri GTG/GTL (Giemsa-Tripsin – Giemsa) / (Giemsa-Tripsin – Leishman); QFA (Quinakrin- Fluoresan – atebrin); CBG (Centromer – Barium- Giemsa); RBG (Reverse – Brdu); NOR (

Nukleolar Organiser Region); HRB: (High Resolution Bantlama) ve SCE Yöntemi (Sister Chromatid Exchange: Kardeş Kromatid Değişimi) dur (27).

GTL (Giemsa – Tripsin – Leishman) Bantlama yöntemi

Sitogenetik laboratuvarlarında en yaygın kullanılan bantlama tekniğidir. Yöntemde, kromozomal proteinler olan histonlar ve nonhistonlar Tripsin ile denatüre edilerek açıkta kalan DNA'nın Adenin ve Timin bazlarınca zengin tekrarlarından oluşan bölgelerine Leishman'ın girmesi sonucu bu bölgelerde koyu boyanmakta ve heterokromatin bölgeler olarak adlandırılmaktadır. Boyanmayan bölgeler ise ökromatin bölgelerdir ve yapısal genleri içermektedir. Yapısal kromozom anomalisi görülen olgularda anomali, ökromatin bölgelerde oluşursa fenotipin daha fazla etkilendiği bilinmektedir. Bu işlemten sonra her kromozom çiftine özgü açık ve koyu bantlar görünür hale gelmektedir. İlk kez 1971 yılında, Pariste yapılan ISCN (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature) konferanslarının 1995 yılındaki toplantısında kabul elden sınıflandırmaya göre bantlı analizleri yapılmakta ve karyotip yazımında da aynı toplantıda standardize edilen yazım kuralları kullanılmaktadır (27)

Bu sitogenetik analiz yöntemi ile genomun genel görünümü belirlenmektedir. Kullanım alanlarından birisi olan kanser genetiğinde de, hastalıkların tanısının konması ve takibinin yapılmasında önemli bir yer tutmaktadır. Tedavinin yanı sıra hastalığın ilerlemesi ile ortaya çıkan ikincil kromozomal düzensizliklerin tespitine imkân sağlamaktadır (27)

II.4 SİTOGENETİK BİYOMARKERLER

II.4.1 Kromozomal anomaliler:

Bir kromozomda meydana gelen yapısal ya da sayısal değişiklikleri gösterir. Genellikle mayoz ve mitozu izleyen hücre bölünmesi sırasında meydana gelen hatalardan kaynaklanırlar. Birkaç farklı türü bulunmakla beraber, genel olarak sayısal ve yapısal anomaliler olarak iki ana gruba ayrılırlar.

II.4.1.1 Yapısal anomaliler

a. Delesyon, bir kromozomun bir parçasının kopup, kaybolmasıyla meydana gelen kromozom anomalileridir. Kopan parçadaki genler kaybolur ve ciddi genetik bozukluklara sebep olur. Sentromer içermediklerinden hücre bölünmesine katılamazlar ve kopan parça başka bir kromozoma bağlanmaz, yok olur. Sitoplazma içersinde kalan kromozom parçası enzimlerin etkisiyle kendini oluşturan ana birimlere kadar parçalanıp, kaybolur. Hücre diploid ise, kaybolan genlerin allelleri kardeş kromozom üzerinde bulunacağından öldürücü olmaz fakat gen dengesinin ve fenotipin değişmesine sebep olur. Eğer gen parçaları büyükse gen dengesi bozulur ve ölüm meydana gelir. Delesyonlar, kromozomların uç kısmından (terminal delesyon=defisiyens) ya da iç kısmından olabilir. Kopan parça eğer sentromer taşımıyorsa yani asentrik ise, mayoz ve mitoz bölünmelerdeki kromozomların kutuplara gitmesini sağlayan sentromer olmadığı için kromozomlar, kutuplara ulaşmazlar ve canlılık devam etmez yani böyle bir gebelik düşükle sonuçlanır. İçten eksiklik durumunda (**interstisyel delesyon**) kromozom iki noktasından kırılır ve kırılan parça ayrılıp, serbest uçlar birbirine bağlanır. Kromozomun sarmal yapısından dolayı oluşan halka kopmaları da bu gruba girer. Uçtan kopmalarda ise, tek noktadan kırılma olur (19).

Delesyonların en klasik örneği, 5. kromozomun kısa kolunda meydana gelen bir delesyon sonucu 50,000 canlı doğumda bir görülen "kedi çılgılığı sendromu" olarak da bilinen Cri du Chat sendromudur. Kedi çılgılığına benzer ağlama, bazı mental gerilikler ve kısa hayat olarak etkileri görülür. **Duplikasyon**, bir kromozomun bir parçasının o kromozom üzerinde iki veya daha fazla sayıda tekrarla görülmesi

şeklindeki kromozom anomalisidir. Yani kromozomun bir kısmının kendi kendini eşlemesi olarak da tanımlanabilir. Duplikasyonlu bir parça sentromerli serbest bir parça veya tamamlayıcı bir kromozom parçası olabilir. Eğer sentromere sahip, yani sentrik bir kromozom parçası ise, bu parça küçük, ekstra bir kromozom olarak kabul edilir. Bir kromozom parça değişimi sırasında karşısındakine belirli genleri vermez, sadece alırsa o gen bakımından diploid olur. Bu, çoğunlukla düzenli işlemeyen bir krossingoverde meydana gelir. Normal olarak mayozun ilk evrelerinde eş genler sinapsis yapar. Ayrılırken normal bir bölünme olmazsa, kromatidlerden biri, o gen bakımından diploid olur, diğeri ise o genlerden yoksun kalır (19).

b. Duplikasyon yani iki tane normal homologue ile karşılıklı geldiğinde bu fazla parça kısmı dışarıya doğru bir halka yapısı gösterir. Dolayısıyla Profaz I sırasında gözlenen ilmek veya halka yapıları delesyon veya duplikasyon olaylarına işaret eder. Genellikle ikilenmeler şeklindeki gen sayısı atışları, parça delesyonlarına nazaran daha az zararlıdır. Çünkü hücrede orijinal gen kombinasyonunu bozmadan DNA ilavesi mutasyonun oluşmasını sağlar. Bloom ve Rett Sendromu kromozomal duplikasyon sonucu meydana gelen genetik hastalıklardandır (19).

c. Translokasyon, bir kromozomun kaybolan parçasının ya da kopan bir parçasının başka bir kromozoma yapışması şeklinde görülen kromozom anomalilerindendir. Translokasyonlar, her zaman homolog olmayan parça değişimleridir. Gen sayısının ve niteliğinin aynı kaldığı translokasyonlara "**Dengeli Translokasyon**"lar denir. Gen sayısının ve niteliğin değiştiği, çoğunlukla anomalilere neden olan translokasyonlara "**Dengesiz translokasyon**"lar denir (19).

Resiprokal translokasyon

Eğer homolog olmayan kromozomlar arasında karşılıklı parça değişimleri oluyorsa buna **Resiprokal Translokasyon** denir. Resiprokal translokasyonlar genellikle dengeli translokasyonlardır. Translokasyonlar homolog çiftin iki kromozomunun parçaları arasında oluyorsa **homozigot translokasyon**lar meydana gelir. Eğer homolog çiftten sadece bir kromozom üzerinde translokasyon oluyorsa buna **heterozigot translokasyon** denir. Genellikle homolog olmayan kromozomlarda ve 600 canlı doğumda bir oranında görülen translokasyonlardır. Bu tip

translokasyonlar genellikle gebeliklerde yapılan amiyosentezlerde karşılaşılabilen, *zararsız* translokasyonlardır. Fakat dengeli translokasyon taşıyan gametler de düşük sebebi ya da anomalili çocuk doğum riskini kapsar. Böyle translokasyon tespit edilen ailelere genetik danışma verilir ve ebeveynlere kromozom analizi yapılır (19).

Robertsonian translokasyonlar

Eğer her iki kromozom sentromere yakın olarak kopmuşlarsa **Robertsonian translokasyon** denir. Sentrik birleşme ile yeni bir kromozom meydana gelir. Bu birleşmede V şeklinde iki kolu olan metasentrik bir kromozom ile küçük bir parça meydana gelir. Bu küçük parça kaybolacaktır. Gen sayısında meydana gelen azalmadan dolayı genellikle düşükle ya da konjenital anomalili doğumla sonuçlanırlar. Homolog olmayan kromozomların belirli noktalarından rastgele çaprazlanmaları, bu noktalardan kopma ve yeniden farklı şekillerde birleşmeleri ile görülür. Bu tür translokasyon sonucu kolları farklı uzunluklarda olan iki yeni kromozom oluşur (19).

Translokasyonlar ile oluşan bazı hastalıklar:

- Kanser: Bazı lösemi, akut miyolek lösemi, kronik miyolek lösemi gibi bazı kanser türlerine translokasyonlar neden olmaktadır.
- Kısırlık: Dengeli translokasyon taşıyan ebeveynlerden bazıları fetüsün tutunmaması nedeniyle bebek sahibi olamazlar.
- Down sendromu (%5 ya da daha az oranla) 21. ve 14. kromozomların Robertsonian translokasyonu ile Down sendromu görülebilmektedir.

Örneğin insanlarda en çok görülen translokasyonlardan olan 21. kromozomdan kopan bir parçanın 14. kromozoma yapışmasıyla Down sendromu görülür. Mayoz bölünmede oluşan bazı gametlerde normal bir 21. kromozomun yanında normal boyutundan daha büyük bir 14. kromozom geçirilmiş ise, böyle bir gametin normal bir gametle döllenmesi ile oluşan zigotta 21. kromozomun o parçası diploid kromozom seti içinde üç kat fazla bulunmaktadır (19).

t(2;5)(p23;q35)	Anaplastik büyük hücre lenfoması
t(8;14)	Burkitt's lenfoma (c-myc)
t(9;22)(q34;q11)	Philadelphia kromozom, Kronik miyelojenik lösemi (KML), Akut lenfoblastik lösemi (ALL)
t(11;14)	Kabuklu hücre lenfoması (Bcl-1)
t(11;22)(q24;q11.2-12)	Ewing's sarkoma
t(14;18)(q32;q21)	Foliküler lenfoma (Bcl-2)
t(17;22)	Dermatofibrosarkomik protuberans
t(15;17)	Akut promyelötik lösemi
t(1;12)(q21;p13)	Akut miyelötik lösemi
t(9;12)(p24;p13)	Kronik miyelötik lösemi (KML), Akut lenfoblastik lösemi (ALL) (TEL-JAK2)
t(X;18)(p11.2;q11.2)	Eklem sarkoması
t(1;11)(q42.1;q14.3)-	Şizofreni

Tablo 2-3: Bazı hastalıklarda saptanan spesifik ve/veya sık translokasyon örnekleri

d. İnversiyon, kromozomda bir parçanın 180^0 ters dönerek tekrar aynı kromozoma bağlanması şeklinde görülen kromozom anomalileridir. Kromozomun birinde kendiliğinden meydana gelen bir katlanma sonucu bir ilmek oluşur ve bu noktalardan kopmayı takiben tekrar ters yönde aynı kromozoma bağlanır. Kromozomun gen sayısı ve özelliği aynı olmasına rağmen diziliş sırası değişmiştir. Bu tür bir inversiyonda kromozomun sentromeri ters dönen parçaya ait ise, buna "**perisentrik inversiyon**" denir. Fakat sentromer ters dönen parça içinde değilse bu da "**parasentrik inversiyon**" olayıdır. İnversiyonlu kromozomlar gametlere dağılılabirler. Fakat fertil gametlerin oluşması ancak mayoz bölünmede homolog kromozomların çiftler oluşturması ile mümkündür (19).

II.4.1.2 Sayısal anomaliler:

a. Öploid: Bu durumda kromozom sayısı o organizma türü için normal olan haploid sayısının tam katları biçiminde artmaktadır. Örneğin insanda haploid sayı 23'tür, diploid sayı ise 46'dır. Haploid sayının 3 kat artması ile triploidi oluşmaktadır (bu durumda total kromozom sayısı 69 dur). 4 katı artması halinde tetraploidi oluşurken kromozom sayısı 92 olmaktadır. Genelde bu katlar şeklindeki artışa poliploidi denmektedir. Poliploidinin nedeni hücre çekirdeği bölündüğü halde sitoplazma bölünmemesinin meydana gelmemesidir. Yani sitokinez olamamaktadır. Poliploidiye insan kötü huylu tümör dokusunda ve spontan düşük materyalinde rastlanabilir. Haploid sayısını "n" olarak gösterirsek, triploidi 3n, tetraploidi 4 n'dir (19).

b. Anöploidi: Bu tip anomalide kromozom sayısı normal diploid sayıdan (46), bir yada birkaç adet daha fazladır veya eksiktir. Euploididen farkı, buradaki değişimin kromozomun haploid katları şeklinde olmayışıdır. Bir ya da birkaç kromozom azlığına hipoploidi denir. Hipoploidiye en iyi örnek monozomidir. Örneğin; 45,X0 Turner Sendromu. Bir ya da birkaç kromozom fazlalığına ise hiperploidi denmektedir. Hiperploidiye en iyi örnek trizomidir (19).

Örneğin;

- 47,XXY Klinefelter Sendromu
- 47,XX,+ 21 Down Sendromu
- 47,XX,+ 13 Patau Sendromu
- 47,XX,+ 18 Edward Sendromudur.

Anomali	FAB tipi	Önemi
t(12;21)	ALL	İyi prognoz
t(1;19)	ALL	İyi prognoz
t(9;22)	ALL	Kötü prognoz
t(v;11q23)	ALL	Kötü prognoz
t(8;14); t(2;8);	ALL	Kötü prognoz
t(8;21)	AML	iyi prognoz
t(15;17)	AML-M3	İyi prognoz
Inv(16)	AML-M4Eo	İyi prognoz
-7	AML	Kötü prognoz
-5 veya del(5q)	AML	Kötü prognoz
Sayısal anomaliler	AML	Kötü prognoz
Krom. 8 anomalileri	AML	Kötü prognoz
Trizomi 12	KLL	Kötü prognoz
t(9;22)	KML	İyi prognoz

Tablo 2.4. Hematolojik malignitelerde tespit edilen translokasyonlar ile prognoz ilişkisi (21).

Periferik kan lenfositlerindeki kromozomal aberasyonlar, çeşitli ajanlarla uyarılan DNA hasarının duyarlı sitogenetik indikatörleri olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle kromozomal anomali araştırması bu hastalarda genotoksisiteye maruziyeti göstermesi açısından katkılar sağlayacaktır (19).

II.4.2 Kardeş Kromatid Değişimi (KKD):

Kardeş kromatid değişimi, J.H Taylor tarafından (1957) geliştirilmiştir. Taylor bir siklus H3 Timidin birleşmesine uğrayıp nonradyoaktif ortamda kromozomların kardeş kromatidlerini incelemiştir fakat bu yöntem zaman kaybına neden olduğu için KKD analizinde 5-Bromodeoksiuridin (BrdU) boyama tekniği kullanılmaktadır (51).

BrdU Timidin analogudur ve BrdU'lu kültürde çoğalan hücrelerdeki DNA'daki timidin yerine geçecektir. Hücreler in vivo bir replikasyon siklusu, in vitro bir veya iki replikasyon siklusu BrdU'ya maruz bırakılır (51).

Bisbenzimid (33258 Hoechst) floresan boyanın poly (dA-dBrdU)'ya bağlanması, poly (dA-dT) bağlanmasından daha az etkilidir. Bu yüzden iki DNA zincirinde BrdU bulunan kromatid Bisbenzimid ile soluk boyanacaktır Bu durum BrdU metodunun avatajıdır çünkü floresan sindirimi BrdU sayısına ve yerine geçtiği zincire bağlı olarak çok veya daha az parlayacaktır. Boyamada Floresan + Giemsa (FPG) tekniği kullanılır. Hoechst aydınlık bölgesi koyu, Hoechst soluk boynan bölgesi Giemsada açık boyanır (51).

Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) sıklığı analizi, potansiyel mutajen ve/veya karsinojen ajanların etkilerini belirlemede biomonitorizasyon olarak kullanılmaktadır. KKD, replikasyon prosesinde kardeş kromatidler arasında karşılıklı DNA değişimi sonucu meydana gelmektedir. Oluşum mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen, DNA hasarı ve tamir defektleri KKD oluşumunda önemli role sahiptir. KKD oluşumu için DNA'da kırık ve yeniden birleşme gerektiğinden DNA'da kırığa yol açan fiziksel ve kimyasal ajanlar KKD sıklığını artırabilir (30,38).

Bazı araştırmacılar tarafından genotoksisiteyi değerlendirmede KKD oranının kromozomal aberasyondan daha duyarlı bir belirteç olduğu ileri sürülmüştür. Viral enfeksiyonlar, malign hastalıklar, kimyasal maddeler ve ultraviyole ışığına maruz kalmanın KKD sıklığını artırdığı gösterilmiştir (30).

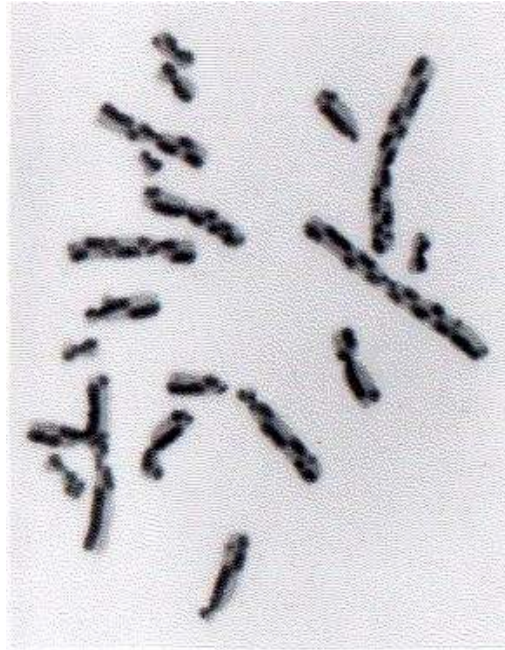
Kardeş Kromatid değişim testi genellikle insan periferel lenfositlerine uygulanır. G0 fazındaki hücreler, fitohemaglutinin ile bölünmeye teşvik edilir. İkinci mitozun metafazında hücre bölünmesini durdurmak ve mitozda kromozom elde etmek için kolşemid ilave edilir (70. saatte).

İki hücre döngüsü boyunca araştırmacıya kromatidleri ayırma fırsatı veren BrdU (bromo-deoxy-uridine) kültür ortamına eklenir. Sadece bir zincirde DNA BrdU almışsa normal karanlık Giemsa boyaması olur, diğer zincir daha açık renkle boyanır. Eğer değişim gerçekleştiyse, kromatid parça parça açık ve koyu renklere görülür: "harlequin kromozomları" (Şekil2.4).

KKD sıklığı, birkaç faktörden etkilenebilir: 1-BrdU konsantrasyonu 2-Harvest zamanı 3- Kültür medyumunu, serum ve ısı derecesi 4- Işık

KKD analizi, kromozom kırık sendromları (Bloom sendromu, Fanconi anemisi, Ataxia telangiectasia ve Xeroderma pigmentosum) ve neoplazinin gelişimine yatkınlık gösteren çeşitli kalıtsal hastalıkların klinik tanısının konmasında yardımcıdır (51).

Bloom sendromu ; gelişme geriliği, immun yetmezlik, kansere yatkınlık ile karakterize ,nadir görülen otozomal resesif bir hastalıktır. Bloom sendromlu hastaların ~%25'inde 30 lu yaşlarda hem karsinoma hem de lösemi gelişebilmektedir. Hastaların hücrelerinde DNA metabolizma defekti olarak kromozom kırıkları ve yeniden düzenlenmeler görülmektedir.1974 yılında bu hastalarda Chaganti ve arkadaşları tarafından artmış yüksek KKD tanımlanmıştır ve artmış KKD sıklığı tanı koydurucu bir laboratuvar bulgusudur (54).



Şekil 2.4: Metafaz başına 50-100 adet değişim gözlenen Bloom sendromlu bir olguya ait Kardeş kromatid Değişimi örneği

II.4,3 Mikronukleus (MN):

Mikronukleus yöntemi ilk kez X ışınlarının neden olduğu genotoksisteyi araştırmak için Countryman ve Heddle tarafından 1976 yılında geliştirilmiş bir metoddur. Mikronukleuslar, hücre çekirdeğinden kaynaklanan ancak çekirdekten bağımsız, zarla çevrili, kromatin içeren yuvarlak sitoplazmik yapılardır. MN analizi, toplumda genotoksik riski araştırmada kullanılan hızlı ve duyarlı bir tarama sistemidir. (46,55)

Mikronukleusların şekil, yapı ve boyanma özellikleri nukleusa benzer ancak büyüklükleri değişkenlik gösterir (Şekil 3.1). Hücre bölünmesi sırasında yeni oluşan çekirdeklerden dışarı atılan asentrik fragmentlerden meydana gelir. MN ayrıca mitotik iğcikte yetmezlik veya anafazda probleme yol açan karmaşık konfigürasyonlar nedeniyle tüm kromozomdan da oluşabilir. Bu yüzden MN oluşumu hem klastojenik ajanlar hem de mitotik inhibitörler tarafından uyarılabilir (45,46).

Mikronukleuslar uzun süredir hematologlar tarafından polikromatik eritrositlerde görülen sferik granüller, Howell-Jolly cisimleri olarak bilinmektedir. Mikronukleus analizi, toplumda genotoksik riski araştırmada kullanılan hızlı ve duyarlı bir tarama sistemidir. Mikronukleuslar mitoz sırasında çeşitli mekanizmalarla (asentrik fragment, multisentrik kromozom, hasarlı kinetokor, iğ iplikçikler) meydana gelebilir. MN testi kromozom kırıklarını, kromozom kaybını, nekrozu, apoptozu ve sitositazı (lökosit birikimi sonucu kılcal damar lümeninin tıkanmasını) ölçmek için geliştirilen kapsamlı bir metod olmuştur. Ayrıca bu teknik sayesinde ağız, burun, bronş, üretelyal eksfoliyatif hücrelerde çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanların sitogenetik etkilerini değerlendirmektedir (46,47).

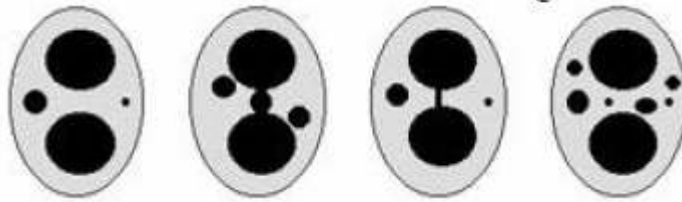
Günümüzde, hızlı endüstrileşmeye bağlı olarak çevresel kirliliğin giderek artmasıyla, canlılar daha fazla fiziksel ve kimyasal ajana maruz kalmakta dolayısıyla güçlü toksik, mutajenik, karsinojenik ve teratojenik faktörlerin olumsuz etkilerini tespit etme ve önlemler alma ihtiyacı kaçınılmaz olmaktadır. Bu nedenle, MN sıklığının araştırılması sitogenetik harabiyetin tespitinde, kromozom analizi ve KKD sıklığı yöntemine göre kolay uygulanabilmesi, daha fazla sayıda hücre

sayılması ve istatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi nedeniyle yaygın kullanım alanı bulunmaktadır (46).

Mikronukleus (MN) sıklığı kanser hastalarının radyoterapi ve kemoterapiye duyarlılıklarının araştırılmasında ve bir çok maddenin kromozomlar üzerindeki etkilerini araştırmakta kullanılan, güvenilir biyolojik sonuçlar gösteren , çok geniş kullanım alanına sahip bir yöntemdir. Büyük radyasyon kazaları gibi çok sayıda kişide ciddi sağlık problemlerinin beklendiği olaylarda radyasyon doz düzeylerinin hızlı bir şekilde belirlenip sınıflandırılmasına olanak sağlar (46,47).

MN sıklığının değerlendirilmesinde dikkate alınması gereken durumlar şu şekilde sıranabilir;

- hücrenin hasar görmemiş olması, diğer hücrelerle füzyon oluşturmaması gerekir
- mikronukleusun etrafı düzgün ve büyüklüğü ana nukleusun 1/3 ü kadar büyüklükte olmalı ve aynı boyanma özelliklerini göstermelidir (56)



Şekil 2.5: Binükleuslu hücrelerde mikronukleusların görünümü

III. GEREÇ VE YÖNTEM

III.1 GEREÇ:

Çalışma grubu İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı, Onkoloji Enstitüsü ve Genel Dahiliye Servis ve Polikliniklerine başvuran Hodgkin Dışı Lenfoma hastalarından oluşturuldu.

Çalışmaya HDL tanısı yeni konulan, tedavi almamış 29 olgu, kemoterapisi tamamlanmış 29 olgu, kemoterapi ve radyoterapisi tamamlanmış 16 olgu, kontrol grubu olarak sağlıklı 25 olgudan periferik venöz kan örneği alınarak; birincisi KKD analizinde ve ikincisi de mikronukleus analizinde kullanılmak üzere iki adet periferik kan lenfosit kültürü yapıldı.

III.2 Kardeş Kromatid Değişimi Yöntemi

III.2.1 Solüsyonlar :

Kültür Medyumu:

100 ml RPMI 1640 Medyum

20 ml Fetal Kalf Serum (FCS)

2 ml (200 mM) L- Glutamin

1.5 ml Phytohaemagglutinin (PHA)

0.2 ml (5000 IU) Penicilin

0.2 ml (0.01 gr) Streptomisin

Stok BromodeoksUridin (BrdU) Solüsyonu

50 ml distile suda 0.025 gr. BrdU eritilir. Mikropor filtreden geçirilerek derin dondurucuda saklandı

Harvest Solüsyonları

Kolsemid: 10 µg/ml lik çözelti

Hipotonik çözelti: 0.075 M KCl çözeltisi

Carnoy fiksatif: 3:1 Metanol / Asetik asit .

III.2.2 Kültür :

Kromozom analizi yöntemi: Moorhead P ve ark 'nın yöntemi ile lenfosit kültürü yapıldı. Steril şartlarda; 100 ml Ham's RPMI 1640 (Seromed), 10 ml Fetal Calf Serum (Seromed), 1 ml Penisilin –Streptomisin (Biological industries), 1.5 ml Fitohemaglutinin M (Seromed) ilave edilerek stok besi yeri hazırlandı. Her olgu için stok besiyerinden 15 ml'lik iki tüp'e 10'ar ml alınarak 37 derecede etüve kondu. Kültür ısıdıktan sonra hastanın periferik veninden 1 ml'lik steril enjektörle alınan kandan her besiyerine 6 damla (0.2 ml) steril ortamda ekildi. Kültür başlatılan birinci tübe 24. saatte stok BrdU'dan 50 µl ilave edilerek (son konsantrasyon 0.5 mikrogram/ml olacak şekilde) hafifçe karıştırıldı ve ışık geçirmeyen folyo kağıdı ile sarılıp etüve kondu. Standart Harvest metotları ile elde edilen metafazlar Fluoresan plus Giemsa (FPG) tekniği ile boyandı. İnterstisyel değişimler iki, terminal değişimler bir değişim olarak sayıldı ve metafaz başına KKD sıklığı hesaplandı.

III.2,3 KKD incelenmesi için Fluoresan + Giemsa Tekniği (FPG)

Solüsyonlar:

<u>PBS</u>	NaCl	8 gr
	KCL	0.2 gr
	NA ₂ HPO ₄	0.92 gr
	KH ₂ PO ₄	0.2 gr / 1 lt distile suda

Stok Hoechst 33258 solüsyonu: 10 ml. PBS’de 0.05 gr. Hoechst 33258 eritilerek stok solüsyon hazırlandı

Hoechst 33258 çalışma solüsyonu: 99.9 ml PBS’ de 0.1 ml stok Bisbenzimid solüsyonu dilüe edildi.

2xSSC solüsyonu:

NaCl	17.5 gr.
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	8.82 gr. / 1 lt distile suda

Buffer: 1 tb. Buffer / 1 lt distile suda eritildi.

Giemsa boya: 1:4 Leishman: Buffer

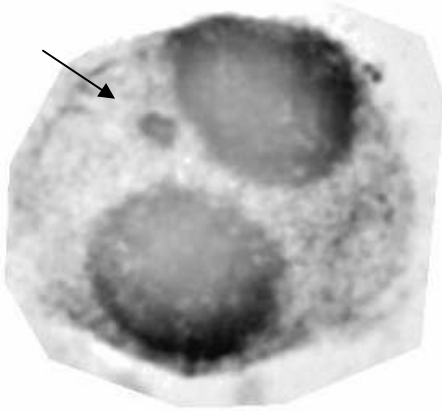
III.2.3.1 Metod:

- Yaşlanmış olan preparatlar 5 dk. PBS’de tutuldu.
- 10 dk. Hoechst 33258 çalışma solüsyonunda bekletildi
- Çıkarılan preparatlar 3–4 damla Hoechst 33258-PBS konup üzeri 25x50 mm lamelle kapatıldı.
- 1 saat siyah ışığa maruz bırakıldı.
- Preparatlar distile su ile yıkandı
- 60-65 C° deki 2xSSC’de 1 saat bekletildi.
- Leishman çalışma solüsyonunda 3 dk. Boyandı.
- Distile su ile yıkanan preparatlar mikroskopta incelendi.

III.3 Mikronukleus Analizi Yöntemi

Cytochalasin B (CAS no: 14930–96–2), DMSO içerisinde ml’de 1 mg olacak şekilde stok solüsyonu hazırlandı ve -20’de saklandı. Yukarıda tanımlandığı şekilde periferik kan lenfosit kültür medyumunu hazırlandı. 37 derecede 44. saatte, Stok Cyt B solusyonu PBS ile 1/10 oranında dilüe edildi ve kültür ortamına 0,3 ml ilave edildi. (son konsantrasyon 3 mikrogram/ml olacak şekilde). Enkübasyon 72 saate tamamlandı ve lam üzerine yayma yapıldı.

Mikronukleusların skorlanması: Sadece sitoplâzması iyi korunmuş, hücre sınırları belirgin ve iki nukleuslu hücreler değerlendirmeye alındı. Ana nukleusun çapının yarısından daha küçük olan ve ana nukleusla aynı yapı ve boyanma özelliğine sahip olan mikronukleuslar çalışmaya alındı. Her olgu için 1000 adet, iki nukleuslu hücrede mikronukleus sayılması ve her olgu için mikronukleus sıklığı belirlenmesi amaçlandı. Ancak 100 hücreye ulaşamayan olgularda MN sayısı incelenen hücre oranı ile MN sıklığı hesaplandı.



Şekil 3.1: 2 çekirdekli bir hücrede mikronukleus görünümü

IV. BULGULAR

Çalışmamızda, İ.Ü İstanbul Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı, Onkoloji Enstitüsü ve Genel Dahiliye Servis ve Polikliniklerine başvuran 29'u yeni tanı konulmuş (Kemoterapi ve Radyoterapi görmemiş), 29'u sadece kemoterapi görmüş, 16'si hem kemoterapi hem de radyoterapi sonrası olan olgu değerlendirildi. 74 Hodgkin Dışı Lenfoma'lı olgunun periferik kan örnekleri alındı. Periferik kan lenfosit kültürleri yapılarak KKD ve MN sıklığı açısından inceleme yapıldı. Kontrol grubu 25 sağlıklı bireyden oluşturuldu.

Çalışma grubunu yaş ortalaması Tedavi Öncesi: 51,66 +/- 17,26 (22–79), KT almış olan: 42,86 +/- 14,64 (22–76), KT + RT alan: 47,5 +/- 14,37 (29–73) olan, 42 si bayan olmak üzere toplam 74 hasta oluşturmuştur. Kontrol grubunu ise yaş ortalaması 30,04 +/- 5,26 (25–45) olan 25 sağlıklı birey oluşturmuştur.

Tedavi öncesi grupta metafaz başına KKD sıklığı 5,7 +/- 1,6 (2,9–8,2) iken kontrol grubunda 6,8 +/- 1,5 (4,5–10,1) olarak saptanmıştır. İki grup arasında KKD sıklığı açısından anlamlı farklılık bulunmuştur (p=0,038).

Kemoterapisi tamamlanmış grupta metafaz başına KKD sıklığı 7,6 +/- 1,9 (4,2–12,6) iken kontrol grubunda 6,8 +/- 1,5 (4,5–10,1) olarak saptanmıştır. İki grup arasında KKD sıklığı açısından anlamlı değişiklik saptanmamıştır (p=0,071).

KT + RT tedavisini almış grupta metafaz başına KKD sıklığı 6,9 +/-1,3 (4,2–9,2) iken kontrol grubunda 6,8 +/- 1,5 (4,5–10,1) olarak saptanmıştır. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı değişiklik saptanmamıştır (p=0,552).

Tablo 4–1: Tedavi Öncesi grup, Kemoterapi Sonrası grup, Kemoterapi + Radyoterapi Sonrası Grup ve Kontrol Gurubunun Metafaz Başına KKD sıklıkları

KKD	Aritmetik ortalama	Standart Sapma	Min.	Max	Toplam	P Değeri
Tedavi Öncesi	5,7	1,6	2,9	8,2	29	0,038
KT Sonrası	7,6	1,9	4,2	12,6	29	0,071
KT + RT Sonrası	6,9	1,3	4,2	9,2	16	0,552
Kontrol gurubu	6,8	1,5	4,5	10,1	24	

Çalışmada Hasta gruplarının KKD sıklıkları, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında sadece tedavi öncesi grupta anlamlı farklılık gözlenmiştir. KT almış ve KT + RT' yi birlikte almış hasta grupları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında KKD sıklıkları açısından anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Tedavi öncesi grupta metafaz başına MN sıklığı 12 ± 2.74 (8–18) iken kontrol grubunda $8,92 \pm 2,23$ (5–15) olarak saptanmıştır. İki grup arasında MN sıklığı açısından belirgin olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p=0,000$).

Kemoterapisi tamamlanmış grupta metafaz başına MN sıklığı $12,1 \pm 2,89$ (418–29) iken kontrol grubunda $8,92 \pm 2,23$ (5–15) olarak saptanmıştır. İki grup arasında MN sıklığı açısından anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0,000$).

KT + RT tedavisini almış grupta metafaz başına MN sıklığı $106 \pm 33,24$ (70–170) iken kontrol grubunda $8,92 \pm 2,23$ (5–15) olarak saptanmıştır. İki grup arasında istatistiksel olarak belirgin anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0,000$).

Tablo 4–2: Tedavi Öncesi grup, Kemoterapi Sonrası Grup, Kemoterapi + Radyoterapi Sonrası Grup ve Kontrol Gurubunun Mikronükleus Sıklıkları

MN	Aritmetik ortalama	Standart Sapma	Min.	Max	Toplam	P Değeri
Tedavi Öncesi	12	2,74	8	18	29	0,000
KT Sonrası	12,1	2,98	8	18	29	0,000
KT + RT Sonrası	106,25	33,24	70	170	16	0,000
Kontrol gurubu	8,92	2,23	5	15	25	

Çalışmada HDL' lı hastaların tedavi öncesi, KT sonrası ve KT + RT sonrası gruplarıyla, kontrol grubu karşılaştırıldığında MN sıklığı açısından belirgin anlamlı istatistiksel farklılık saptanmıştır.

Tablo 4-3: Hodgkin Dışı Lenfoma Olgularında Tedavi Öncesi Grubun demografik özellikleri, KKD ve MN Sıklığı

Olgu	Yaş	Cinsiyet	Tanı	KKD	MN
1	45	K	DBBHL	8,2	12
2	60	E	BBHL	7,6	10
3	59	K	BBHL	8,2	12
4	77	K	Malt lenfoma	5,9	10
5	32	K	BBHL	6,7	10
6	23	E	Börkit Lenfoma	4,8	8
7	72	E	BBHL	5,4	10
8	60	E	BBHL	7,2	12
9	50	E	Mantle Cell Lenfoma	5,2	10
10	72	K	BBHL	4,2	18
11	67	E	Malt lenfoma	3,9	10
12	50	E	Yüksek Gradli Lenfoma	4,2	12
13	79	E	Mantle Cell Lenfoma	7,6	12
14	32	K	DBBHL	8,2	10
15	40	K	Foliküler Lenfoma	6,1	16
16	46	E	BBHL	2,9	10
17	22	K	BBHL	4,2	18
18	65	E	Foliküler Lenfoma	7,6	12
19	28	K	BBHL	6,2	10
20	31	K	Börkit Lenfoma	4,2	12
21	63	K	Primer Beyin HDL	6,2	12
22	23	E	Börkit Lenfoma	4,9	16
23	45	K	DBBHL	4,1	10
24	50	K	BBHL	4,2	11
25	55	E	Küçük Lenfositik Lenfoma	7,2	10
26	75	K	BBHL	6,1	12
27	68	K	BBHL	3,2	17
28	55	K	DBBHL	7,2	16
29	54	K	DBBHL	4,9	10

Tablo 4-4: Hodgkin Dışı Lenfoma Olgularında Kemoterapi Sonrası Grubun demografik özellikleri, KKD ve MN Sıklığı

Olgu	Yaş	Cinsiyet	Tanı	KKD	MN
1	39	K	DBBHL	6,7	12
2	36	E	BBHL	7,6	15
3	45	K	Börkit Lenfoma	4,2	10
4	29	K	BBHL	4,3	12
5	37	E	DBBHL	7,9	10
6	53	K	DBBHL	8,2	8
7	56	E	DBBHL	6,8	16
8	36	E	BBHL	6,9	12
9	22	K	DBBHL	7,2	10
10	61	E	BBHL	7,6	18
11	28	K	Foliküler Lenfoma	9,2	12
12	40	E	Mantle Cell Lenfoma	9,4	10
13	76	K	T Hücreli lenfoma	9,8	8
14	39	K	BBHL	6,2	12
15	23	E	T Hücreli lenfoma	4,2	16
16	47	E	BBHL	4,9	10
17	26	E	Börkit Lenfoma	6,2	12
18	36	K	BBHL	6,8	16
19	25	K	DBBHL	7,2	10
20	40	E	DBBHL	7,6	12
21	40	K	Foliküler Lenfoma	9,8	10
22	46	E	BBHL	8,2	8
23	45	K	DBBHL	12,6	10
24	63	K	Primer Beyin HDL	8,9	16
25	23	E	Börkit Lenfoma	8,7	18
26	45	K	DBBHL	9,6	16
27	55	E	BBHL	9,2	12
28	75	K	BBHL	7,2	10
29	57	K	DBBHL	9,4	10

Tablo 4-5: Hodgkin Dışı Lenfoma Olgularında, KT + RT Sonrası Grubun Demografik Özellikleri, KKD ve MN Sıklığı

Olgu	Yaş	Cinsiyet	Tanı	KKD	MN
1	29	K	DBBHL	6,8	100
2	29	E	DBBHL	8,7	70
3	49	E	Foliküler Lenfoma	7,2	110
4	56	K	BBHL	7,6	100
5	42	E	DBBHL	9,2	70
6	65	E	BBHL	6,2	100
7	73	K	DBBHL	7,6	90
8	67	K	Yüksek Gradli Lenfoma	7,8	100
9	34	E	Yüksek Gradli Lenfoma	8,2	80
10	49	E	DBBHL	5,9	170
11	45	K	DBBHL	6,8	90
12	29	K	BBHL	6,9	80
13	37	E	DBBHL	6,2	150
14	53	K	DBBHL	4,2	140
16	63	K	Primer Beyin HDL	4,9	170
17	40	K	Foliküler Lenfoma	7,2	80

Tablo 4–6: Sağlıklı Kontrol Grubunun Demografik Özellikleri, KKD ve MN Sıklığı

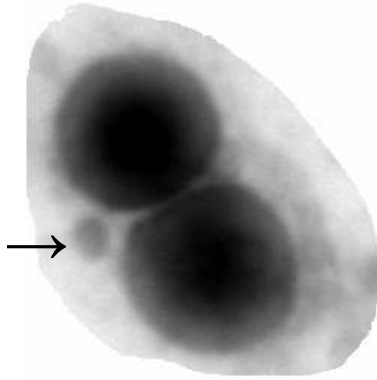
Olgu	Yaş	Cinsiyet	KKD	MN
1	27	E	7,1	10
2	28	E	4,5	8
3	28	E		10
4	29	K	9,1	6
5	26	E	5,8	8
6	25	E	9,2	6
7	26	K	4,7	6
8	29	K	5,4	10
9	26	E	6,7	9
10	36	E	6,6	10
11	26	K	7,3	10
12	28	E	4,8	10
13	27	E	7,2	8
14	28	E	5,9	7
15	28	E	7,2	9
16	29	K	10,1	11
17	26	E	5,9	8
18	25	E	4,8	8
19	26	K	5,6	5
20	29	K	6,7	7
21	26	E	6,8	11
22	36	E	7,2	8
23	26	K	7,8	11
24	28	E	8,7	12
25	27	E	9,4	15

Çalışmamızdaki istatistik analizler nonparametrik testlerden Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı.

Kardeş Kromatid Değişimi ve Mikronukleus örnekleri Şekil 4.1,2,3 'de verilmiştir.

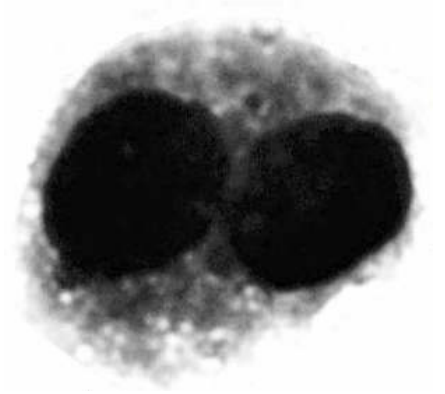


Şekil 4.1: Kromatidler arasında koyu ve açık renk parça değişimi şeklinde Kardeş Kromatid Değişimi görülmektedir.



Şekil 4.2: 2 Nukleuslu hücrede

Bir adet mikronukleus görünümü



Şekil 4.3: Mikronukleus içermeyen

2 çekirdekli hücre

V. TARTIŞMA VE SONUÇ

Lenfoma lenfoid sistemi oluşturan hücrelerden kaynaklanan malign bir hastalıktır. Hodgkin-dışı Lenfomalar (HDL) hematolojik tümörler arasında klinik davranış, morfoloji, hücre kökeni, etiyoloji ve patogeneze yönünden çok heterojen bir hastalık grubunu oluştururlar. Son yıllarda immünohistokimya ve moleküler genetiğin katkılarıyla hastalığın biyolojisi daha iyi anlaşılmış ve bununla ilişkili olarak pek çok yeni lenfoma tanımlanmıştır (3, 24).

Bu çalışmada yeni tanı konulmuş, henüz tedavi görmemiş ve sitotoksik tedavi görmüş HDL olgularında, periferik kan lenfosit kültürlerinde genomik instabilite, kemoterapi ve radyoterapinin genotoksik etkileri araştırıldı ve ayrıca iki sitogenetik biyomarker (KKD ve Mikronukleus sıklığı) birbirleriyle karşılaştırıldı.

KKD yöntemi, eş kromozom lokuslarında iki kromatid arasında meydana gelen ve kromozom morfolojisinde değişikliğe neden olmayan karşılıklı segment değişimidir. Mikronukleuslar, hücre bölünmesi sırasında geri kalmadan dolayı asentrik fragmentler veya kromozomun tamamından oluşan küçük ekstrasnükleer yapılarıdır (37,38). Değişik evrelerdeki lenfoma olgularında üç sitogenetik biyomarkerle genomik instabilite araştırıldı.

Kardeş Kromatid Değişimi sıklığı açısından yapılan incelemede:

Çalışmamızda; Tedavi görmemiş yeni tanı konulmuş HDL'lı hastalar grubunda metafaz başına KKD sıklığı $5,7 \pm 1,6$ (2,9–8,2) iken kontrol grubunda $6,8 \pm 1,5$ (4,5–10,1) olarak saptandı. İki grup arasında KKD sıklığı açısından farklılık istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,038$) olarak bulundu. Kemoterapisi tamamlanmış grupta metafaz başına KKD sıklığı $7,6 \pm 1,9$ (4,2–12,6) iken kontrol grubunda $6,8 \pm 1,5$ (4,5–10,1) olarak saptanmıştır. İki grup arasında KKD sıklığı açısından anlamlı değişiklik saptanmamıştır ($p=0,071$). KT + RT tedavisini almış grupta metafaz başına KKD sıklığı $6,9 \pm 1,3$ (4,2–9,2) iken kontrol grubunda $6,8 \pm 1,5$ (4,5–10,1) olarak saptanmıştır. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı değişiklik saptanmamıştır ($p=0,552$).

Çalışmamızda tedavi öncesi HDL grubunda KKD sıklığının yüksek bulunması ve tedavi sonrası gruplarda KKD sıklığında farklılık saptanmaması ile ilgili olarak, literatürde farklı lenfoma ve hematolojik malignite türlerinde benzer sonuçlar elde edilmiş çalışmalar bulunmaktadır:

Cevetka Bilban ve arkadaşları (11), sadece kemoterapi almış (Grup I), hem kemoterapi, hem radyoterapi almış (Grup II) olmak üzere toplam 30 Hodgkin Lenfomalı hastada tedaviden hemen sonra ve tedaviden altı ay sonra her iki grupta da kromozomal aberasyon, KKD ve mikronukleus sıklığını araştırmışlardır. Anti-kanser tedavisinden hemen sonra I. ve II. grup hastada incelenen KKD sıklığı anlamlı olarak yüksek bulunmuş ($p=0.002$). Aynı gruplarda tedaviden 6 ay sonra bakılan KKD sıklığı $p=0.744$ olarak saptanmış. Bu durum kemoterapi ve radyoterapinin KKD sıklığının artışını önleyici etkisine bağlanmıştır.

Mertens R ve arkadaşlarının (39) yaptıkları çalışmada, çocuk yaş grubundaki akut lenfoblastik lösemi hastalarında, tanın ilk konduğu dönemde incelenen KKD sıklığı, sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olarak saptanmıştır ($p=0.002$). Kemoterapiden sonraki erken dönemde bakılan KKD sıklığı çok daha yüksek olarak saptanmış ancak aynı hasta grubunda 5 yıl sonra incelenen KKD sıklığında azalma gözlenmiştir. Bu durum, kemoterapinin erken dönemde kan hücrelerindeki DNA hasarını arttırarak, KKD sıklığını arttırdığı, geç dönemde T lenfositlerindeki azalma ve DNA tamiri ile KKD sıklığının azaldığı şeklinde açıklanmıştır.

Tuna M. ve arkadaşları (40) hematolojik maligniteli hastalarda (13 ANLL, 1 ALL, 1 Hodgkin Lenfoma) sitotoksik ilaç tedavisinin kromozomlar üzerine etkisini göstermek amacıyla KKD sıklığını araştırmışlar. Tedavi öncesi ve tedavi sonrası periferik kan lenfositlerini incelenmiş. Tedavi öncesi hasta grubunda KKD sıklığını, kontrol grubuna göre yüksek olarak bulmuşlar. Tedavi sonrası grupta KKD sıklığını çok daha yüksek seviyede bulmuşlar. Muhtemelen tedavi sonrası erken dönemde incelendiği için KKD değeri çok daha yüksek olarak bulundu. Geç dönemde KKD sıklığı tekrar araştırılacak olursa, tedavinin düzeltici etkisine bağlı olarak, değerler bizim sonuçlarımız ve literatürdeki diğer sonuçlarla uyumlu olarak saptanabilir.

Öztürk Ş ve arkadaşları (41) Kronik Lenfositik Lösemili hastaların B hücre mitojeni (TPA) ile stimüle edilmiş periferik kan hücrelerinde KKD sıklığını araştırmışlardır. KLL-B hastalarındaki KKD sıklığı ($8,24 \pm 1,36$) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ($7,25 \pm 1,42$) çok daha yüksek olarak saptanmıştır. Bu yüksekliğin DNA instabilitesinden kaynaklanabileceği ve hastalardaki DNA tamir defektinin bir sonucu olabileceği öne sürülmüştür.

Literatürde yayınlanmış bazı çalışmalarda KLL hastaları ve akut lösemi hastalarında kültüre edilmiş kemik iliği hücrelerinde KKD sıklığı analiz edilerek normal kemik iliği hücreleriyle karşılaştırılmış ve KKD oranının düşük olduğu bulunmuştur. Bu durum lösemik hücrelerin tipik bir özelliği olarak kabul edilmiştir (39.42.43).

Çalışmamızda tespit ettiğimiz ve literatürle de desteklenen, tedavi öncesi grupta kardeş kromatid değişimindeki artış ile DNA hasarındaki artışın ortaya çıkarılabileceği ve bu artışın HDL etyopatogenezinde önemli bir rol oynayabileceği öne sürülebilir. Aynı zamanda tedavi öncesi grupta kardeş kromatid değişimi yüksek bulunan hastalara ikincil kanser gelişimi açısından daha sıkı takip edilmesi gerektiği önerilebilir.

Çalışmamızda Kemoterapi sonrası ve Kemo + Radyoteapi sonrası gruplarda, Kardeş Kromatid Değişimi sıklığının kontrol grubuna göre yüksek olarak saptanmaması, KKD sıklığının sitotoksik ilaç tedavisi ve ışın tedavisinin genotoksik etkilerini göstermede daha az informatif olacağını söyleyebiliriz.

Mikronükleus sıklığı açısından yapılan değerlendirilmede:

Çalışmamızda Tedavi öncesi grupta metafaz başına MN sıklığı $12 \pm 2,74$ (8–18) iken kontrol grubunda $8,92 \pm 2,23$ (5–15) olarak saptanmıştır. İki grup arasında MN sıklığı açısından belirgin olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. ($p=0,000$) Kemoterapisi tamamlanmış grupta metafaz başına MN sıklığı $12,1 \pm 2,89$ (18–29) iken kontrol grubunda $8,92 \pm 2,23$ (5–15) olarak saptanmıştır. İki grup arasında MN sıklığı açısından anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0,000$).

KT + RT tedavisini almış grupta metafaz başına MN sıklığı $106 \pm 33,24$ (70–170) iken kontrol grubunda $8,92 \pm 2,23$ (5–15) olarak saptanmıştır. İki grup arasında istatistiksel olarak belirgin anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0,000$).

Çalışmamızda HDL hastalarını üç grubunda da MN sıklığının kontrol grubuyla karşılaştırıldığında belirgin olarak yüksek saptanması literatürdeki Hematolojik maligniteler ile ilgili yapılmış birçok çalışma ile de desteklenmektedir.

Yukarıda da irdelediğimiz Cevetka Bilban ve Arkadaşlarının (11) yapmış oldukları çalışmada, sadece kemoterapi almış (Grup I), kemoterapi + radyoterapi almış (Grup II) olmak üzere toplam 30 Hodgkin Lenfomalı hastada tedaviden hemen sonra ve tedaviden altı ay sonra araştırılan MN değerlerinde, her iki grupta da anlamlı olarak yüksek saptanmış ($p=0,0001$). Bu durum özellikle radyoterapinin genotoksik etkisine bağlanmıştır. Tedaviden 6 ay sonra MN sıklığı, tedaviden hemen sonra çalışılan olgulara göre bir miktar azalsa da istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmemiştir ($p=0.902$).

Hamurcu Z. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada yeni tanı konulmuş ve henüz tedaviye başlanmamış 20 lösemi hastasında periferik kan lenfositlerinde MN sıklığı araştırılmış, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı yükseklik tespit edilmiştir. ($p=0,0001$). Bu MN sıklığı yüksekliğinin, genomik instabilite ile ilişkili olabileceği veya DNA onarım sistemindeki bozukluğun bir yansıması olabileceği ve hastalığın oluşumunun bir sonucu olabileceği belirtilmiştir (50).

Lösemi hastalarında, anti lösemik tedavinin değişik aşamalarında yapılan birçok çalışmada MN sıklığı araştırılmıştır. Çoğunda MN sıklığı kontrol gurubuna göre oldukça yüksek olarak saptanmıştır (44,45).

Michael Fenech tarafından yapılan çalışmada (46); Sitokinez Blok--Mikronukleus (CB-MN) tekniğiyle incelenen; Bölgesel vücut radyoterapisi görmüş hastalarda ve laboratuvar şartlarında tüm vücut ışınlaması yapılmış farelerde yapılan analizlerde mikronukleus sıklığında anlamlı yükseklikler tespit edilmiştir($p=0,0001$). Çalışma sonunda CB-MN yönteminin biyolojik dozimetre olarak kullanılabileceği öngörülmüş ve bu bağlamda artan iklimatik değişiklere (atmosferik ozon, ultraviyole radyasyon) maruz kalan bireylerde genotoksisitenin takibinde, seçilmiş

genotoksiklere karşı bireylerin aşırı duyarlılığının tespitinde kullanılabileceği ön görülmüştür.

Demirel S ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada (47), yeni doğan sarılığında tedavi amacıyla kullanılan fototerapinin organizma üzerine etkilerini KKD sıklığı ve MN sıklığı ile araştırılmıştır. Floresan ışığın KKD sıklığını değiştirmediğini, MN sıklığını istatistiksel olarak arttırdığını saptamışlardır.

Çalışmamızdaki HDL hasta grupları ve hematolojik malignite türleri ile ilgili yapılan literatürdeki çalışmalarda periferik kan ve kemik iliği lenfosit kültürlerinde MN sıklığının, kontrol grubuna göre yüksek olarak saptanması hastalığın doğal sürecinin bir parçası olabileceği gibi DNA onarım sistemindeki bozukluklarla da ilişkili olabilir.

Kemoterapi ve radyoterapi görmüş olan hastalarda, MN sıklığının kontrol grubuna göre yüksek olarak saptanması ancak KKD sıklığının yüksek olarak saptanmaması, aynı zamanda MN ölçüm yönteminin uygulamasının daha kolay ve güvenilir olması nedeniyle genotoksisitenin araştırılmasında daha informatif bir yöntem olduğu düşünülebilir (46,48,49).

Günümüzde, hızlı endüstrileşmeye bağlı olarak çevresel kirliliğin giderek artmasıyla, canlılar daha fazla fiziksel ve kimyasal ajana maruz kalmakta dolayısıyla güçlü toksik, mutajenik, karsinojenik ve teratojenik faktörlerin olumsuz etkilerini tespit etme ve önlemler alma ihtiyacı kaçınılmaz olmaktadır. Bu nedenle, MN testi sitogenetik harabiyetin tespitinde, kromozom analizine göre kolay uygulanabilmesi, daha fazla sayıda hücre sayılması ve istatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi avantajı sağlamasıyla yaygın kullanım alanı bulan bir teknik olmuştur (46.52.53).

MN testi, sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin endirekt göstergesi olarak organizmayı etkileyen çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanların sitogenetik etkilerini belirlemek için yapılabilecek büyük çaplı tarama çalışmalarında güvenle kullanılabilir (46,48,49).

VI. KAYNAKLAR

1. Ankina MA, Zavitaeva TA, Panferova TA, Shakhtarina SV, Pavlov VV. Cytogenetic study of bone marrow and blood cells in patients with non-Hodgkin lymphoma before and after antitumor therapy. Bull Exp Biol Med. 2007 Feb;143(2):236–9.
2. A. Cuneo, R. Bigoni, G. M. Rigolin, M. G. Roberti, A. Bardi, N. Piva, R. Milani, F. Bullrich, M. L. Veronese, C. Croce, *et al.* Cytogenetic Profile of Lymphoma of Follicle Mantle Lineage: Correlation With Clinicobiologic Features Blood, February 15, 1999; 93(4): 1372 – 1380.
3. Baillier's Clinical heamatology, Epidemiology of Haematological Disease: Part I .5, 1992
4. Bea S, Colomo L, Lopez-Guillermo A, Salaverria I, Puig X, Pinyol M, Rives S, Montserrat E, Campo E. Clinicopathologic significance and prognostic value of chromosomal imbalances in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. J Clin Oncol. 2004 Sep 1;22(17):3498–506.
5. Bernicot I, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Herry A, Morel F, De Braekeleer M. Molecular cytogenetics of IGH rearrangements in non-Hodgkin B-cell lymphoma. Cytogenet Genome Res. 2007;118(2–4):345–352.
6. Bilban-Jakopin C, Bilban M. Genotoxic effects of radiotherapy and chemotherapy on circulating lymphocytes in patients with Hodgkin's disease. Mutat Res. 2001 Oct 18;497(1–2):81–8.
7. By Outi M, Heikki J, Kaarle F, Juha K, Kari A and Sakari K, BCL2 Overexpression Associated With Chromosomal Amplification in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Blood, vol.90 N0.3 (August 1) 1997: pp. 1168–1174

8. C.-Y. Chen, M. Yao, J.-L. Tang, W. Tsay, C. -C. Wang, W.-C. Chou, I.-J. Su, F.-Y. Lee, M.-C. Liu, and H.-F. Tien Chromosomal abnormalities of 200 Chinese patients with non-Hodgkin's lymphoma in Taiwan: with special reference to T-cell lymphoma *Ann. Onc.*, July 1, 2004; 15(7): 1091 - 1096.

9. Chen CY, Yao M, Tang JL, Tsay W, Wang CC, Chou WC, Su IJ, Lee FY, Liu MC, Tien HF. Chromosomal abnormalities of 200 Chinese patients with non-Hodgkin's lymphoma in Taiwan: with special reference to T-cell lymphoma. *Ann Oncol.* 2004 Jul;15(7):1091–6.

10. Crossen PE, Fitzgerald PH, Colls BM. Normal sister chromatid exchange and cell cycle progression in cultured lymphocytes from patients with malignant lymphoma. *J Natl Cancer Inst.* 1981 Oct;67(4):821–4.

11. Cvetka Bilban-Jakopin, Dr. Sc., MD, SI-1000 Ljubljana, Zaloska 2, Slovenia Institute of Occupational Safety, Bohoriceva 22a, Genotoxic effects of radiotherapy and chemotherapy on circulating lymphocytes in patients with Hodgkin's disease Received 4 April 2001; revised 29 May 2001; accepted 30 May 2001 Available online 26 November 2001.

12. J. Inwards, Thomas M. Habermann, Peter M. Banks, Joseph P. Colgan, and Gordon W. Dewald Cytogenetic findings in cases of peripheral T-Cell Lymphoma *American journal of hematology* 35:88–95 (1990)

13. Espinet B, Salido M, Pujol RM, Florensa L, Gallardo F, Domingo A, Servitje O, Estrach T, Garcia-Muret P, Woessner S, Serrano S, Sole F. Genetic characterization of Sezary's syndrome by conventional cytogenetics and cross-species color banding fluorescent in situ hybridization. *Haematologica.* 2004 Feb;89(2):165–73.

14. Fonatsch C, Schaadt M, Diehl V. Sister chromatid exchange in cell lines from malignant lymphomas (lymphoma lines). *Hum Genet.* 1979 Nov 1;52(1):107–18.

15. G. Ott, T. Katzenberger, A. Lohr, S. Kindelberger, T. Rudiger, M. Wilhelm, J. Kalla, A. Rosenwald, J. G. Muller. Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3 *Blood*, May 15, 2002; 99(10): 3806 – 3812.

16. Hiddemann W, Longo DL, Coiffier B, et al. Lymphoma Classification-The gap between biology and clinical management is closing. *Blood* 1996; 88,4085–4089.
17. Inwards DJ, Habermann TM, Banks PM, Colgan JP, Dewald GW. Cytogenetic findings in 21 cases of peripheral T-cell lymphoma. *Am J Hematol.* 1990 Oct;35(2):88–95.
18. Johansson B, Mertens F, Mitelman F. Cytogenetic evolution patterns in Non-Hodgkin's lymphoma. *Blood.* 1995 Nov 15;86(10):3905–14.
19. Kurzrock R, Talpaz M. *Molecular Biology in Cancer Medicine* (Second Edition)
20. Gürel N, Doğusoy G, Ferhanoğlu B, Ülkü B, Molinas N, Tüzüner N. Immunophenotyping and DNA Flow cytometric analysis of Non_Hodgkin's Lymphoma. XIII th meeting of The International Society of Hematology, 3-8 September 1995, İstanbul Turkey, Abs.No 905
21. Yenerel N.M, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları ABD, Hematoloji Bilim Dalı, İstanbul Tanısal Hematoloji:
22. Nicot C. Current views in HTLV-1-associated adult T-cell leukemia/lymphoma. *Am J Hematol* 2005;78.232–9.
23. Ohtsuru M, Ishii Y, Takai S, Kosaki G. Sister chromatid exchanges in lymphocytes of a patient treated with cyclophosphamide and vincristine for non-Hodgkin's lymphoma. *Gann.* 1982 Jun;73(3):433–8.
24. Özdemirli M, Department of Pathology, Georgetown University Hospital, Washington DC, USA B hücreli lenfomalarda morfolojik, immünolojik ve sitogenetik özellikler
25. Pienkowska-Grela B, Witkowska A, Grygalewicz B, Rymkiewicz G, Rygier J, Woroniecka R, Walewski J. Frequent aberrations of chromosome 8 in aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005 Jan 15;156(2):114–21.

- 26.** Burhan Ferhanoğlu Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı öğretim üyesi Yüksek dereceli hodgkin dışı lenfomalarda güncel tedavi yaklaşımı
- 27.** R. Dilhan Kuru. KML Vakalarının Sitogenetik, moleküler sitogenetik ve moleküler genetik yöntemleri ile incelenmesi. İstanbul 2002, Doktora tezi
- 28.** R. Siebert, P. Matthiesen, S. Harder, Y. Zhang, A. Borowski, R. Zuhlke-Jenisch, S. Metzke, S. Joos, K. Weber-Matthiesen, W. Grote. Application of Interphase Fluorescence In Situ Hybridization for the Detection of the Burkitt Translocation t(8;14)(q24;q32) in B-Cell Lymphomas Blood, February 1, 1998; 91(3): 984 – 990.
- 29.** Ruddon RW. Cancer Biology Third Edition OXFORD–1995
- 30.** Sardas S, Erdoğan F, Sardas OS, Cengel M, Karakaya AE. Sister Chromatid Exchange studies for monitoring DNA damage in lymphocytes of malignant lymphoma patients under cytostatic therapy. Anticancer Drugs. 1994 Aug;5:487–9.
- 31.** Seto M. Genetic and epigenetic factors involved in B-cell lymphomagenesis. Cancer Sci. 2004 Sep;95(9):704–10.
- 32.** Staratschek-Jox A, Shugart YY, Strom SS, Nagler A, Taylor GM. Genetic susceptibility to Hodgkin's Lymphoma and to secondary cancer: workshop report. Ann Oncol. 2002;13 Suppl 1:30–3.
- 33.** Thierens H, Vral A, Van Eijkeren M, Speleman F, De Ridder L. Micronucleus induction in peripheral blood lymphocytes of patients under radiotherapy treatment for cervical cancer or Hodgkin's disease. Int J Radiat Biol. 1995 May;67(5):529–39.
- 34.** Başlar Z, Oşar Z, Soysal T, Ferhanoğlu B, Aydın Y, Ülkü B, Aydın Y, Aytuğlu G, Akman N. Hodgkin - Dışı Lenfomada Klinik Özellikler Ve Prognozu Etkileyen Faktörler- Bir Merkezin Sonuçları. XXIV. Ulusal Hematoloji Kongresi. İstanbul, 11-14 Nisan, 1996
- 35.** Little J.B. Genomik instability and radiation. 2003 Radiol. Prot.23 173-181

36. Öztürk Ş, Palanduz Ş, Çefle K, Tutkan G, Uçur A, Dinçol G, Nalçacı M, Aktan M, Yavuz S, Küçükkaya R. Genotoxicity and sister chromatid exchange in patients with myelodysplastic disorders. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, Volume 159, Issue 2, Pages 148 – 150
37. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res.* 1985 Feb-Apr;147(1–2):29–36
38. Larripa I, Labal ede Vinuesa M, Slavutsky I, Salum S. Sister Chromatid Exchange in leucemic patients. *Cancer Genet Cytogenet.* 1985 Feb 1,15(1–2):169–75
39. Mertens R, Bussing A, Rubbert F, Lassay L, Heiman G. SCE rate and lymphocyte differentiation in children with acute lymphoblastic leukemia and SCE rates of leukemia patients in long-term remission. *Klin Pediatr.* 1996 Mar-Apr; 208 (2): 73–6
40. Tuna M., Artan S., Gezer S., Sayılı BS., Basaran N. Sister Chromatid Exchange analysis in acute leukemia patients. *Cancer Genet Cytogenet.* 1995 Jan; 79(1): 86–8
41. Öztürk Ş., Palanduz Ş., aktan M., Çefle K., Serakinci N., Pekçelen Y. Sister Chromatid Exchange in B Cell stimulated by TPA in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2000 Nov; 123(1): 49–51
42. Becher R, Gabriele Z, Gabriele P, Schmidt G. Spontaneous Chromatid Exchange in normal bone marrow and Ph-positive Chronic Myelocytic Leukemia. 1988. *Cancer Research* 48, 745–750
43. Becher R, Schmidt CG, Theis G, Hossfeld DK. Sister chromatid Exchange in Ph-positive Chronic Myelocytic Leukemia. *Int. J. Cancer.* 1979 Dec 15;24 (6): 713–6
44. Mihalache D, Stefanescu DT, Motoiu I, Constantiniu L, Costache A, Dumitrescu A. Micronucleus test applied in patients with acute leukemia, before and at different intervals during the cytostatic treatment. *Morphol Embryol* 1998 Jul-Sep; 35.209–15
45. Abe T, Isemura T, Kikuchi Y. Micronuclei in human bone marrow cells: evaluation of the micronucleus test using Human leukemia patients treated with antileukemic agents. *Mutat res.* 1984 Apr; 130(2):113–20

46. Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations CSIRO Division of Human Nutrition, P.O. Box 100141, Gouger Street, Adelaide SA 5000, Australia Received 19 June 1992; revised 15 July 1992; accepted 17 July 1992. ; Available online 15 January 2003.
47. Demirel S, Çora T, Acar A, Acar H, Çalışkan Ü, Öner AF. Evaluation of the effects of photo therapy on chromosomes with sister chromatid exchange and micronucleus method. *Tr J Medical Sci* 1993;17:109–16.
48. Jagetia GC, Jayakrishnan A, Fernandes D, Vidyasagar MS. Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after radiation treatment. *Mutat Res* 2001;491:9–16.
49. Cruz AD, McArthur AG, Silva CC, Curado MP, Glickman BW. Human micronucleus counts are correlated with age, smoking, and cesium-137 dose in the Goiania (Brazil) radiological accident. *Mutat Res* 1994;313:57–68.
50. Hamurcu Z. Dönmez-Altuntas H, Patirolu T. Basal level micronucleus frequency in stimulated lymphocytes of untreated patients with leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, Volume 180, Issue 2, Pages 140 – 144
51. Barch JM. The act cytogenetic laboratory manual. Gustashow KM. Chromosome stains.1991. Second Edition.Ravenpres, Ltd. 1185 avenue of the America, New York
52. Labay K, Ould-Elhkim M, Kles V, Guffroy M, Poul JM, Sanders P. Effects of griseofulvin in medium-term liver carcinogenesis assay and peripheral blood micronucleus test in rat. *Teratog Carcinog Mutagen* 2001;21:441–51.
53. Naccarati A, Molinu S, Mancuso M, Siciliano G, Migliore L. Cytogenetic damage in peripheral lymphocytes of mitochondrial disease patients. *Neurol Sci* 2000;21:963-5.

- 54.** Weksberg R. Low Sister Chromatid Exchange Bloom syndrome cell lines: An important new tool for mapping the basic genetic defect in Bloom Syndrome and for unreveling the biology of Human tumor development. *Am J Hum Genet.* 1995 November, 57(5). 994–997
- 55.** Countryman PI, Heddle JA. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes *Mutat. Res.* 41: 321–322.1976
- 56.** Başer D, Sunguroglu A, Bökesoy I, Uysal A: Spontaneous micronuclei in cytokinesis-blocked bone marrow and peripheral blood lymphocytes of CML patients.Tr. *J Med Sciences.* 28.1–4,1999.



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI
Yerel Etik Kurulu



Sayı : 1405

Tarih : 21/09/2005

Konu : Doç.Dr.Şukru ÖZTÜRK hk,

Sayın. Doç.Dr.Şukru ÖZTÜRK
İç Hastalıkları Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

İlgil : 14.07.2005 tarih, 2405 sayılı yazınız,

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Tıpta Uzmanlık Öğrencisi Dr.Oktay PERDECİ'nin yürüteceği 2005/1028 dosya no'lu "Nonhodgkin lenfomalı olgularda genomik insitasilitenin setogenetik biyomarkerlerle araştırılması" başlıklı uzmanlık tezi kurulumuzun 03.08.2005 tarih, 08 sayılı toplantısında incelenmiş olup, onaylandığına ilişkin tutanaklar ekte sunulmuştur.
Bilgilerinize saygılarımla rica ederim.

Prof.Dr. Zafar ARI
İstanbul Tıp Fakültesi
Etik Kurul Başkanı

Eki: Tutanak



**İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
YEREL ETİK KURUL TUTANAĞI**

Toplantı Tarihi : 03/08/2005

Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi Pembe Salon

Toplantı Sayısı : 8

Sorumlu araştırmacılığını Fakültemiz İç Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr.Şükrü ÖZTÜRK'ün üstlendiği ve Tıpta Uzmanlık Öğrencisi Dr.Oktay PERDECİ'nin yürüteceği 2005/1028 protokol numaralı "Nonhodgkin lenfomalı olgularda genomik insitasilitenin setogenetik biyomarkerlerle araştırılması" başlıklı uzmanlık tez çalışması kurumumuzda incelendi etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü, uygulamaya konulabileceğine karar verildi.

Prof.Dr. Züfer ARI

Etik Kurul Başkanı (Dekan Yardımcısı)

Prof.Dr. Aykan CANBERK

Farmakoloji ve Kll.F. A.D

Prof.Dr. Berrin UMMAN

Kardiyoloji Anabilim Dalı

Prof.Dr. Beyhan ÖMER

Biyokimya A.D

Prof.Dr. Cahide GÖKKUŞU

Biokimya A.D

Prof.Dr. Kamil PEMBEÇİ

Anesteziyoloji A.D.

Prof.Dr. Mübeccel DEMİRKOL

Çocuk Sağ. Ve Hast. A.D

Prof.Dr. Nuran YILDIRIM

Deontoloji ve Tıp Tarihi A.D

Prof.Dr. Oğuzhan ÇOBAN

Nöroloji A.D

Prof.Dr. Pınar SAİP

İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü

Prof.Dr. Selim BADUR

Mikrobiyoloji ve Kll.Mik. A.D

Prof.Dr. Veli UYSAL

Patoloji A.D