

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ (ALL) OLGULARINDA
MYC GEN BÖLGESİNDEKİ YENİDEN
DÜZENLEMELERİN FLUORESAN İN SİTU
HİBRİDİZASYON (FISH) YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

SEDA EREN

**DANIŞMAN
PROF. DR. SENİHA HACİHANEFİOĞLU**

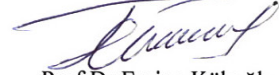
**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİMDALI/ TIBBİ BİYOLOJİ
PROGRAMI**

İSTANBUL-2009

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

31 / 07 / 2009



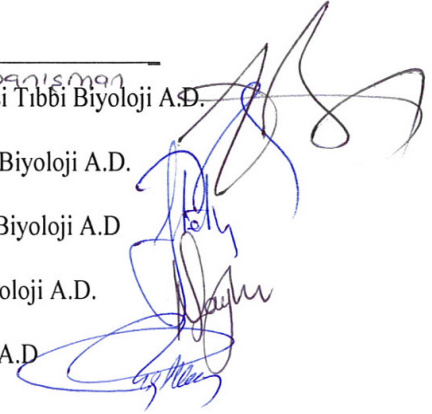
Prof. Dr. Emine Kökoğlu y.
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
 Program Adı : Tıbbi Biyoloji
 Programın seviyesi : Yüksek Lisans ☒ Doktora ☐
 Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji
 Tez Sahibi : Seda Eren
 Tez Başlığı : Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) Olgularında MYC Gen Bölgesindeki Yeniden Düzenlemelerin Fluoresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemi ile Araştırılması
 Sınav Yeri : Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD
 Sınav Tarihi : 21 / 07 / 2009

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

1. Prof. Dr. Seniha Hacıhanefioğlu İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D. Danışman
2. Doç. Dr. Ayhan Deviren İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D.
3. Prof. Dr. Mehmet Gürtekin İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D.
4. Prof. Dr. Nur Buyru- İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D.
5. Prof. Dr. Nejat Dalay- İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji A.D.



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

SEDA EREN



İTHAF

ÇOK KIYMETLİ AİLEME.....

TEŞEKKÜR

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Turgut Ulutin'e,

Bu çalışmanın her aşamasına bilgi ve tecrübesiyle katkıda bulunan, yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmaları boyunca bana yol gösteren değerli danışman hocam Prof Dr. Seniha Hacıhanefioğlu'na,

Yüksek lisans eğitimime önemli katkıları olan ve benden hiçbir konuda bilgisini, tecrübesini ve yardımını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Ayhan Deviren'e

Veri toplanmasındaki katkılarından dolayı Dr. Cem Ar'a, Doç. Dr. Tiraje Celkan'a, Prof. Dr Ömer Devecioğlu'na ve Prof. Dr. Meliha Nalçacı'ya

Bilgi ve tecrübeleriyle destek olan, teorik ve pratik bilgileriyle birçok problemi çözmede yardımcı olan Dr. Ayşe Çırakoğlu'na, Dr. Dilhan Kuru'ya, Dr. Şükriye Yılmaz'a ve Dr. Yelda Tarkan Argüden'e

Bu çalışmanın her aşamasında her türlü sıkıntıyı benimle birlikte çeken ve daima yanımda olan canım arkadaşım Figen Aydoğdu'ya

Varlıklarıyla yüksek lisans yaşamımda ve dostluklarıyla hayatımda büyük öneme sahip dostlarım İpek Mine Gürsel ve Sezgi Arpağ'a

Lisans ve yüksek lisans hayatım boyunca hep yanımda olan ve benden yardımlarını esirgemeyen dostum Mehtap Vafai Mastanabad'a

Ve bugüne kadar benim için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, her zaman her koşulda bana destek olan çok kıymetli annem Neslihan Eren'e, çok kıymetli babam Sadullah Cihan Eren'e ve biricik kardeşim Mert Caner Eren'e

Teşekkür ederim.....

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:T-1506

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	Xİ
ÖZET	XV
ABSTRACT.....	XVI
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ.....	4
2.1.1. TANIM.....	4
2.1.2. SINIFLANDIRMA.....	5
2.1.3. GÖRÜLME SIKLIĞI.....	6
2.1.4. OLUŞUM MEKANİZMASI	7
2.1.5. TANI	8
2.1.5.1. Klinik Bulgular	8
2.1.5.2. Laboratuvar Değerlendirmeleri	9
2.1.5.3. İmmünofenotipleme.....	9
2.1.5.4. Morfolojik Değerlendirme	10
2.1.5.5. Genetik İnceleme	12
2.1.6. PROGNOTİK FAKTÖRLER.....	12
2.1.6.1. Cinsiyet.....	12
2.1.6.2. Yaş.....	13
2.1.6.3. Lökosit sayısı.....	13
2.1.6.4. Malnutrisyon.....	13
2.1.6.5. İmmünofenotip	13
2.1.6.6. Genetik özellikler.....	14

2.1.7. TEDAVİ.....	15
2.1.7.1. Destek Tedavisi	16
2.1.7.2. Kemoterapi	17
2.1.7.3. Hematopoetik kök hücre nakli	17
2.1.7.4. Radyoterapi.....	18
2.2. ALL’de GÖRÜLEN SİTOGENETİK DEĞİŞİKLİKLER.....	19
2.2.1. Sayı anomalileri.....	19
2.2.2. Yapı anomalileri	21
2.2.2.1. T-ALL’de gözlenen kromozom yapı anomalileri	22
2.2.2.2. B-ALL’de gözlenen kromozom yapı anomaliler.....	23
2.2.2.3. Hem T-ALL hem de B-ALL görülen kromozom yapı anomalileri	24
2.3. MYC GENİ(Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog)	25
2.3.1. Fonksiyonları.....	27
2.3.1.1. Normal hücre gelişimi ve proliferasyonunda myc’in rolü	28
2.3.1.2. Myc ilişkili hücre döngüsü ve genomik instabilite	29
2.3.1.3. Myc aracılı apoptoz	29
2.3.1.4. Myc’in uyardığı ölümsüzlük	30
2.3.1.5. Myc’im metabolik fonksiyonları.....	30
2.3.1.6. Hücrel adezyon ve farklılaşma.....	31
2.3.2. Myc’in onkogenik aktivasyon mekanizmaları	31
2.4. ALL’de KROMOZOM İNCELEME YÖNTEMLERİ	34
2.4.1. Sitogenetik yöntemler	35
2.4.2. Moleküler sitogenetik yöntemler	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM	39
3.1. Gereç	39
3.2. Yöntem.....	39
3.2.1. Kullanılan solüsyonlar ve malzemeler	40
3.2.1.1. Kemik iliği kültüründe kullanılan solüsyonlar	40
3.2.1.2. Perifer kanı kültüründe kullanılan solüsyonlar	40
3.2.1.3. FISH yönteminde kullanılan solüsyonlar	41
3.2.1.4. Kullanılan Laboratuar Malzemeleri	42
3.2.2. Yöntemler.....	43
3.2.2.1. Kemik İliği Kültürü	43

3.2.2.2. Perifer Kanı Kültürü	44
3.2.2.3. Preparatların hazırlanması.....	44
3.2.2.4. GTL bantlama.....	44
3.2.3. Mikroskop incelemesi.....	44
3.2.4. FISH Yöntemi	45
4. BULGULAR.....	47
4.1. Olguların G bantlama ve FISH değerlendirmeleri	58
5. TARTIŞMA	67
KAYNAKLAR	75
ETİK KURUL KARARI.....	83
ÖZGEÇMİŞ	84

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: T-ALL’de görülen kromozom yapı anomalileri.....	23
Tablo 2-2: B-ALL’de görülen kromozom yapı anomalileri.....	24
Tablo 2-3: Hem T-ALL hem de B- ALL’de görülen kromozom yapı anomaliler	25
Tablo 2-4: C-myc’in katıldığı translokasyonlar ve ilişkili hastalıklar.....	33
Tablo 4-1: Olguların G bantlama ve FISH sonuçları	50
Tablo 4-2: Olguların G bantlama sonuçları ve FISH sonuçlarına göre myc geninin yorumlanması.....	53
Tablo 4-3: MYC breakapart probu ile yapılan FISH analizi sonucunda elde edilen veriler.....	57

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Kromozom 8'in idiyogramı ve myc geninin yerleşimi.....	25
Şekil 2-2: C-myc'in yapısal sahaları:.....	26
Şekil 2-3: Myc-Max kompleksinin yer aldığı hücresel olaylar	28
Şekil 2-4: Kromozom 8'in katıldığı translokasyonların karyogramı:.....	33
Şekil 2-5: FISH yönteminde kullanılan prob çeşitleri.....	38
Şekil 3-1: Myc Breakapart probunun şematik resmi.....	42
Şekil 4-1: FISH analizinde metafaz kromozomlarında ve interfaz nukleusunda sinyal görünümleri ve değerlendirmeleri	49
Şekil 4-2: Olgulara ait FISH görüntüleri	64
Şekil 4-3: Olgu 2'ye ait G bantlı karyogram	65
Şekil 4-4: Olgu 5'e ait tetraploid metafazın karyogramı.....	65
Şekil 4-5: Olgu 8'e ait karyogram	66
Şekil 4-6: Olgu 12'ye ait karyogram	66

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ABL	v-abl abelson murine leukemia viral oncogene homolog
Add	addition
AF4	ALL fused gene 1 from chromosome 4
ALL	Akut lenfoblastik lösemi
AML	Akut myeloid lösemi
APC	Adenomatous polyposis coli
BAD	Bcl-2 antagonist of cell death
BAX	Bcl-2 associated X-protein
BCL11B	B-cell lymphoma 11B
BCL2	B-cell lymphoma 2
BCR	break point cluster region
BFM	Berlin-Franfurt-Münih protokolü
BHLH	basic helix loop helix
BHLHLZ	basic helix loop helix leucin zipper
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
CALLA	common acute lymphocytic leukemia antigen
CBFA2	core binding factor 2
CD	cluster of differentiation
CDK	cyclin dependent kinase
CGH	comperative genomic hybridizatiom
c-MYB	myeloblastosis viral oncogene homolog
C-myc	cytoplasmic myc
CUL1	CuLlin
DAPI	4-6 diamidino-fenilindol (4-6 diamidino- phenylindole)
del	delesyon
der	derivatif
dH₂O	distile su
dic	disentrik
DNA	Deoksiribonükleik asit
dup	duplikasyon
E2A	immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47

EBV	Ebstein Barr virüs
EGIL	European Group for the Immunological Classification of Leukemias
eIF	eukaryotic elongation factor
FAB	French-American-British
Fas	TNF reseptör süper ailesi 6 üyesi
FasL	Fas-ligand
FISH	fluoresan in situ hibridizasyon
G1	Gap 1 evre
G2	Gap 2 evre
GLUT1	glukoz transport proteini 1(glucose transporter 1)
GTL	Giemsa-Tripsin-Leishman boyama
HIF	hypoxia inducible factor
HLA	human leukocyte antigen
HLF	hepatic leukemia factor
HLHLZ	helix-loop-helix lösün zipper
HOX11	T cell leukemia homeobox 1
HRB	high resolution banding
HTERT	human telomerase reverse transcriptase
Ig	immünglobin
IL	interlökin
ITF1	immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47
i	izokromozom
KCl	potasyum klorür
kDa	kilodalton
KLL	kronik lenfositik lösemi
KML	kronik myeloid lösemi
LAP	lenfadenopati
LDH	laktat dehidrojenaz
LDHA	laktat dehidrojenaz A
LFA1	leukocyte function associated antigen
LMO1	LIM only 1 gene
LMO2	LIM only 2 gene
Mad	max dimerization protein 1

Max	myc associated factor X
Mb	megabaz
MDS	myelodisplastik sendrom
MHC	majör histokompatilite antijenleri
MIC	morphology immunology cytogenetic
MLL	Myeloid/ Lymphoid or Mixed Lineage Leukemia
MPO	myeloperoksidaz
MRH	minimal rezidüel hastalık
mRNA	mesajcı RNA
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
mSV	miliSievert
MTHFR	5,10-metilentetrahidrofolat redüktaz
MYB	v-myb myeloblastozis viral onkogen homolog (v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog)
Myc	avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
n-myc	nuklear myc
NRE	negatif regülasyondan sorumlu elementler
ODC	ornithine decarboxylase
PAS	Periodic acid shiff
PBX	pre-B-cell leukemia homeobox
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction)
Ph	Philadelphia
PHA	phytohemaglutinin
Pre	öncül (prekürsör)
Rb	retinablastoma
RFC	reduced folat carier
RNA	ribonükleik asit
RT	radoterapi
RT-PCT	reverse transcriptase PCR
SID	Sin3 interacting domain
SIL	SCL interrupting locus
TAD	transkripsiyon aktive edici bölge (transcription activation domain)
TAL1	T hücre akut lenfositik lösemi 1 (T-cell acute lymphocytic leukemia 1)

T-ALL	T hücreli ALL
THR	T hücre reseptörü
TdT	terminal deoksinükleotidiltransferaz
TEL	translocation ets leukemia
TLX	T hücre lösemi homeobox
THRA	T hücre reseptör alfa
THRB	T hücre reseptör beta
THRD	T hücre reseptör delta
THRG	T hücre reseptör gama
TRRAP	(TRansactivation/tRansformation-domain Associated Protein)
UTR	untranslated region
VDAC	Voltage-dependent anion channels
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organization

ÖZET

EREN S. Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) Olgularında Myc Gen Bölgesindeki Yeniden Düzenlemelerin Fluoresan In Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemi İle Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2009

ALL’de kromozom anomalilerinin tespiti tanıda, prognozda ve tedavide önemli rol oynamaktadır.

Çalışmada 25 ALL hastasından alınan kemik iliği aspirasyon materyaline G-bantlama ve myc genindeki yeniden düzenlemelerin tespiti için FISH uygulandı.

Olgularımız 14(%56) çocuk, 11(%44) erişkinden oluşmaktadır. Olgularımızın %58’inde sayısal ve/veya yapısal kromozom anomalisi tespit edildi.

ALL’de prognostik değere sahip olduğu bilinen yapısal kromozom anomalileri; t(9;22)(%9), add(11)(q23)(%8), t(8;14)(%4), del(6q)(%8) olarak tespit edildi.

Lösemi olgularında G bantlama için yeterli sayıda ve kalitede metafaz elde etmenin zorluğu bilinmektedir. Olgularımızın %92’sinde kromozom analizi gerçekleştirildi. Yeterli sayıda metafaz elde edilemediği durumlarda sayısal ya da yapısal kromozom anomalileri tespit edilememekte bu nedenle konvansiyonel sitogenetik yöntemlerin yanında FISH gibi moleküler sitogenetik yöntemler kullanılmaktadır.

FISH uygulamaları hastalığın tanı ve takibinde ayrıca genetik değişimlerin bire bir her hücrede değerlendirilmesine olanak sağladığından minimal rezidüel hastalığın takibinde önemlidir. Kolay uygulanabilir, hızlı, duyarlı ve güvenilirliği yüksek bir yöntemdir.

8q24’te bulunan myc geni, hücre döngüsünün ilerlemesi, farklılaşma, metabolizma, apoptozis, ölümsüzlük ve adezyon gibi hücreyel olayları etkiler. Bir protoonkogen olan myc; translokasyon, amplifikasyon ve mutasyon gibi çeşitli aktivasyon mekanizmalarıyla onkogenik özellik kazanır. ALL’de myc geninin karıştığı translokasyonların yaklaşık %85’ini t(8;14)(q24;q32), %10’unu t(2;8)(p11;q24) ve %5’ini t(8;22)(q24;q11) oluşturur.

25 hastaya uygulanan 33 FISH analizinin hepsinde myc geninin değişime uğradığı gözlemlendi.

Elde ettiğimiz sonuçlar; hem interfaz hem de metafaz da inceleme olanağı sunan ve konvansiyonel sitogenetik yöntemlere göre daha hızlı ve hassas sonuçlara ulaşmamızı sağlayan FISH yönteminin bulgularının tanıda, prognozda ve tedavi protokolünün belirlenmesinde yol gösterici olduğunu kanıtlamaktadır.

Anahtar Kelimeler : Akut lenfoblastik lösemi, myc geni, sitogenetik, FISH, G bantlama

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-1506

ABSTRACT

Eren S. Detection of Myc Gene Rearrangements by Fluorescence In Situ Hybridization in Acute Lymphoblastic Leukemia Cases. İstanbul University, Institute of Health Science, Medical Biology. Master Thesis. İstanbul.

Detection of chromosomal anomalies associated with acute lymphoblastic leukemia (ALL) plays an essential role for diagnosis, prognosis and treatment.

We investigate bone marrow aspiration material from 25 ALL patient. G banding and FISH were performed to detect myc gene rearrangements.

Our case group includes 14(%56) children and 11(%44) adults. Numerical and/or structural chromosomal anomalies were detected in %58 of cases.

Structural anomalies which provide prognostic information about ALL are t(9;22)(%9), add(11)(q23)(%8), t(8;14)(%4), del(6q)(%8)

Difficulties in obtaining sufficient and qualified metaphases for G banding in leukemia cases have been known. G banding in study were successful %92 of cases. Conventional cytogenetic methods should be accompanied by more sensitive and specific molecular cytogenetic techniques, such as FISH when sufficient and qualified metaphases couldn't be obtained.

FISH technique is important for diagnosis and prognosis to provide detection of genetic changes for each cell. Additionally this technique is more sensitive and rapid technique.

MYC (avian myelocytomatosis viral oncogene homolog) gene is located on 8q24. The gene plays a role in cellular processes such as cell cycle progression, apoptosis, metabolism, immortality and adhesion. Myc is a protooncogene and becomes an oncogene when translocation, amplification and mutations occur. Translocations involving MYC gene are t(8;14)(q24;q32) (%85), t(2;8)(p12;q24) (10%) and t(8;22)(q24;q11)(%5).

Myc gene rearrangements were detected all 33 FISH analyses for 25 patients in our study.

Our results showed that FISH technique is quicker and more sensitive than conventional cytogenetic methods additionally FISH provides detection of genetic changes in both interphases and metaphases.

Key Word: Acute lymphoblastic Leukemia, Myc gene, Cytogenetic, FISH, G banding

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University.

Project No. T-1506

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akut lenfoblastik lösemi (ALL), kemik iliğinden köken alan progenitör lenfoid hücrelerin artmasıyla seyreden malign bir hastalıktır (6, 17, 40). Kontrolsüz çoğalan olgunlaşmamış hücreler kemik iliğini işgal ederek normal hematopoezi baskırlar (7). ALL, çocukluk çağında en sık gözlenen kanser türü olup gözlenen tüm kanserlerin %30'unu, tüm lösemilerin ise %75-80'ini oluşturmaktadır. Yetişkinlerde ise görülen lösemilerin % 5'ini oluşturmaktadır (8, 36). Hastalığın görülme sıklığı cinsiyete göre değişmektedir. Erkeklerde daha yaygın görülen bir hastalık olup kadınlara oranla 1,4 kat daha sık gözlenmektedir. Anemi, halsizlik, kilo kaybı, ateş, lenfadenopati, hepatosplenomegali gibi belirtilerle kendini göstermektedir. Tanı koymak amacıyla kemik iliği ya da perifer kan lenfositlerinin morfolojik, immünolojik ve sitogenetik incelemesi yapılmalıdır. ALL'de etkili prognostik faktörler; yaş, lökosit sayısı, cinsiyet, genetik özellikler olarak sıralanabilir (7, 8, 76).

Yapılan araştırmalar genetik yatkınlık, radyasyon, benzen ve türevleri, böcek ilaçları gibi kimyasal maddeler, bazı kalıtsal hastalıklar ve bir takım virüs hastalıklarının lösemiye yol açabildiğini göstermiştir (12, 22, 99).

ALL gelişimi, diğer birçok kanserde olduğu gibi çok basamaklı ve çok etkenle ortaya çıkan bir süreçtir. Bu süreçteki ana etken ise sonradan kazanılan somatik mutasyonlarla hücrenin genetik yapısındaki değişimlerdir. Bu değişimler ya kromozom düzeyinde ya da deoksiribonükleik asit (DNA) düzeyinde ortaya çıkmaktadır. Meydana gelen kromozom değişimlerinin belirlenmesi; tanıda, hastalığın prognozunun tahmininde ve risk sınıflamasında önemli rol oynamaktadır (6, 7, 81).

Kromozom anomalileri sayısal ve yapısal anomaliler olarak sınıflandırılmıştır. ALL'de gözlenen sayısal anomaliler öploidi ve anöplöidilerdir. Yapısal kromozom anomalileri ise dengeli (resiprokal translokasyon, insersiyon, inversiyon gibi) ve dengesiz anomaliler (delesyon, duplikasyon, izokromozom, ring gibi) olmak üzere iki alt grupta toplanmakta, lösemilerde en yaygın olarak translokasyonlar, delesyonlar ve inversiyon görülmektedir (59).

ALL' de en sık görülen sitogenetik anomaliler; t(1;19)(q23;p13), t(2; 8)(p12;q24), t(4;11)(q21;q23), del(6q), i(6p), i(7q), t(7;9)(q34;q32), trizomi 8, t(8; 14)(q24;q11), t(8;22)(q24;q11), del(9q), t(9;22)(q34;q11), t(11;19)(q23;p13), t(12;21)(p13;q22),

i(17q), t(17;19)(q22; p13), monozomi 20, trizomi 21 dir. T hücrelerinden köken alan ALL' ler için 9. kromozomun kısa kolunun karıştığı yapısal değişimler, T hücre reseptör alfa, beta, ve gama zincirlerini etkileyen kromozom anomalileri t(1;14)(p32-34;q11), t(7;9)(q34-36; q34), t(7;19)(p34; p13) sık gözlenmektedir. t (1; 19)(q23; p13) pre B ALL' de, t(4; 11) (q21; q23) erken dönem B hücrelerinin gözlendiği ALL' de , del 6q ve del 12 p tüm ALL tiplerinde, t(9;22)(q34; q11) olgunlaşmamış B hücrelerinden köken alan ALL'de ve t(8;14)(q24;q11) ise olgun B hücreli ALL olgularında sık gözlenmektedir (39, 49, 53).

MYC(avian myelocytomatosis viral oncogene homolog) geni, 8q24.2'de yerleşmiştir. Bu genin kodladığı protein, çok işlevli bir çekirdek fosfoproteinidir. Hücre döngüsünün ilerleyişinde ve apoptozda rol oynamaktadır. Etkisini transkripsiyon faktörü olarak, hedef genlerin transkripsiyonunu düzenleyerek göstermektedir (14, 43).

Birçok lösemi ve lenfomada myc geninin mutasyonu, yeniden düzenlemeleri ve gen ürününün artışı görülmektedir (15). Myc genini içeren, sıklıkla görülen 3 tane translokasyon vardır. Bu translokasyonlardan en sık (yaklaşık %85) görüleni t(8;14)(q24;q32)'dur. t(2;8)(p12;q24) ise yaklaşık % 10 oranında gözlenirken, t(8;22)(q24;q11) %5 oranında gözlenmektedir (24, 43).

Tümör hücrelerinde metafaz kromozomu eldesinin zorluğu bilinen bir gerçektir. Elde edilen metafaz kromozomlarının morfolojileri çoğunlukla konvansiyonel sitogenetik yöntemlerle, özellikle kromozom yapı anomalilerin belirlenmesinde yetersiz kalabilmektedir. Konvansiyonel sitogenetikle 4Mb'dan büyük, yüksek çözünürlüklü bantlama (High resolution banding-HRB) tekniğinde de >2 Mb ye kadar olan düzensizlikler saptanabilmektedir. Dolayısıyla yeterli sayıda ve kalitede metafaz elde edilemediğinde de ne yapısal ne de sayısal değerlendirme yapılamamaktadır. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) analizi hem interfaz nükleusunda analizi olanaklı kılması hem de 4Mb'dan 1Mb'a kadar olan yapısal düzensizlikleri saptayabilmesi nedeniyle kanser genetiğinde kullanılan en önemli tekniklerden biri haline gelmiştir (59, 70).

Myc yeniden düzenlenmeleri FISH ile metafaz ve interfaz hücrelerinde analiz etmek amacıyla Myc çift renkli, kırık noktası yeniden düzenlenme probu kullanılmaktadır. Prob MYC geninin sayısal anomalilerini (amplifikasyon ve delesyon) belirlediği gibi translokasyona girip girmediği konusunda da bilgi vermektedir (35, 42).

Lösemilerde FISH uygulamaları, hastalığın tanısı ve takibinde ciddi bir öneme sahiptir. Özellikle de lösemi tiplerine özgü translokasyonların kantitatif takibi açısından sitogenetik ve ters transkriptaz zincir reaksiyonu, tekniklerine bir alternatif oluşturmaktadır. Ayrıca genetik değişikliklerin bire bir her hücrede değerlendirilebilmesine olanak sağladığından minimal rezidüel hastalığın takibinde etkin rol oynamaktadır (35, 39, 99).

Klonal özellik taşıyan kromozom yeniden düzenlemelerin tespiti, hastalığın biyolojisinin anlaşılması ve bu düzensizliklerin lösemi gelişimindeki rollerinin aydınlatılması açısından oldukça önemlidir. Bu hastalığa özgü kromozom yeniden düzenlenmelere katılan genlerden biri olan myc geninin, hastalığın tanısında ve tedavisi sonrasında hastanın takibi ve minimal rezidüel hastalık tespiti açısından önem taşımaktadır (99).

Bu çalışmada amaç; akut lenfoblastik lösemili hastalarda konvansiyonel sitogenetik inceleme ile kromozom anomalilerini tespit ederken yeterli sayıda ve kalitede metafaz elde etmekteki zorluğu, interfaz nukleusunda da analiz olanağı sağlayan FISH yöntemi ile aşmaya çalışmaktır. Ayrıca G bantlamada gözden kaçabilecek myc geni yeniden düzenlenmeleri gibi sitogenetik bulguların FISH yöntemi ile incelenerek hastalara daha sağlıklı sonuçlar verilmesi amaçlanmıştır. ALL gelişiminde önemli rol alan myc gen bölgesindeki yeniden düzenlenmelerin daha fazla hücrede incelenerek, G bantlamaya göre daha hızlı ve daha hassas bir şekilde tespitiyle elde edilecek sonuçlar prognozda, tedavi protokolünün belirlenmesi ve minimal rezidüel hastalığın takibinde önemli bilgiler sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ

2.1.1. TANIM

Hematopoetik kök hücreler, geri dönüşümsüz şekilde farklılaşabilme yeteneğine sahip olan hücrelerdir. Kan hücrelerinin tümü pluripotent kök hücreden köken almaktadır. Pluripotent kök hücreden myeloid ve lenfoid öncül hücreler oluşup, bu öncül hücrelerden lenfoid ve myeloid hücre serileri gelişmektedir (56). Hematopoez adı verilen bu olay kemik iliğinde gerçekleşmektedir. Myeloid hücreler kemik iliğinde gelişerek eritrosit, granülosit, monosit ve megakaryosit oluştururken; lenfoid hücreler dalak ve timusa göç ederek T ve B lenfositleri oluşturmaktadır. T hücreleri timus bezinde, B hücreleri ise kemik iliğinde olgunlaşmaktadır. Hümorale immüniteyi oluşturan B lenfositler, uyarı durumunda plazma hücresine dönüşerek immünoglobulin salgırlar. T lenfositler ise antijene ve mikroorganizmalara karşı hücre düzeyinde savunmaya katılırlar (7).

Hematopoetik kök hücre ve progenitör hücrelerden köken alan hücrelerin monoklonal hastalığına lösemi adı verilmektedir. Diğer kanserlerde olduğu gibi lösemilerde de hücrelerin olgunlaşma yeteneğinde azalma, farklılaşmamış agresif habis bir fenotip gözlenmektedir. Habis tümörlerde görülen en belirgin özellik, hücre büyümesinin düzenlenmesinde görülen anormalliktir (46).

Tümör gelişimi, hücrede tek bir değişimle başlayan klonal bir süreçtir. Bu süreçte belirli sitogenetik değişimlerin gerçekleşmektedir. Oluşan bu sitogenetik değişimler sonucunda tümör gelişiminde etkili genlerden olan protoonkogenler aktifleşerek onkogene dönüşebilmektedir. Bu moleküler değişimin normal hücrenin büyüme, çoğalma ve farklılaşmasında meydana getirdiği farklılıklar sonucunda hücre tümör hücresinde dönüşmektedir (34, 46).

Akut lenfoblastik lösemi, kemik iliğindeki normal farklılaşma yeteneğini kaybetmiş lenfoid öncül hücrelerin klonal proliferasyonu sonucu gelişen bir kanser türüdür (36).

2.1.2. SINIFLANDIRMA

Lösemiler köken aldıkları hücelere göre adlandırılırlar. Tümör, olgunlaşmamış öncül hücreden oluşmuşsa akut lösemi, olgunlaşmış hücre serisinden meydana gelmişse kronik lösemi adını almaktadır (91).

Lösemi sınıflamasında tümörün hangi hücre serisinden geliştiği de önemlidir. Lenfoid hücre serisinden köken almışsa lenfoid lösemi, myeloid hücre serisinden köken almışsa myeloid lösemi olarak adlandırılmaktadır. Olgunlaşmamış lenfoid seriden gelişen lösemiler T ve B hücre kaynaklı olmasına göre T hücreli ALL (T-ALL) ve B hücreli ALL (B- ALL) olarak alt sınıflara ayrılmaktadır (8, 47, 91).

1976 yılında Fransız, Amerikan ve İngiliz bir grup hematolog tarafından orijinal akut lösemi French-Amerikan-British (FAB) sınıflaması oluşturulmuştur. Bu sınıflamada akut lösemiler morfolojik ve sitokimyasal boyanma özelliklerine göre gruplanmıştır. Ancak bu sınıflama; immüfenotipleme, elektron mikroskobu, sitogenetik, moleküler biyolojik tetkik yöntemlerini ve nadir lösemi tiplerini içermeyen bir sınıflamadır (37).

Akut lösemide; hücre yüzey antijenlerinin, sitogenetiğin öneminin fark edilmesi ve FAB sınıflamasının yeterli olmadığının anlaşılması, akut lösemide Morfolology-immunology-cytogenetic (MIC) ve European Group for the Immunological Classification of Leukemias (EGIL) sınıflamalarını gündeme getirmiştir (60). “EGIL Sınıflaması’nda, akut myeloid lösemi (AML)’ler iki veya daha fazla myeloid marker myeloperoksidaz (MPO), CD13(Cluster of differentiation 13), CD33, CDw65, CD117) üretimi ile tanımlanmış ve akut lenfoblastik lösemiler de B-I pro-B hücreli, B-II common-B hücreli ve B-III prekürsor (pre)-B hücreli olarak 3 alt gruba ayrılmıştır. Akut lösemide sitogenetik ve moleküler genetik anomalilerin rolünün anlaşılması ve bunların prognostik önem arz etmesi nedeni ile yeni bir sınıflandırma ihtiyacı olduğu gözlenmiştir. 2001 yılında Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) tarafından akut lösemiler de dahil olmak üzere hemopoetik ve lenfoid neoplazmaları içeren yeni bir sınıflama yapılmıştır. WHO sınıflamasında; morfoloji, immüfenotipleme, sitogenetik ve moleküler biyolojik özellikler göz önüne alınmış, akut lösemi tanısı için blastik hücre sayısı %30’dan %20’ye indirilmiş ve nadir lösemi tipleri de dahil edilmiştir (11).

WHO sınıflamasında akut lösemiler; myeloid, lenfoid ve serisi belirlenemeyen olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Akut myeloid lösemiler:

- a. Tekrarlayan sitogenetik anomalilerle seyreden akut myeloid lösemi
- b. Çoğul seri displazisi ile seyreden akut myeloid lösemi
- c. Tedaviye ikincil akut myeloid lösemi ve myelodisplastik sendrom (MDS)
- d. Tanımlanan gruplara girmeyen akut myeloid lösemi olmak üzere dört gruba ayrılarak değerlendirilmiştir.

Lenfoid lösemiler ise:

- a. Pre B-lenfoblastik lösemi/lenfoma
 - b. Pre T lösemi/lenfoma
 - c. Burkitt lenfoma/lösemi şeklinde 3 gruba ayrılmıştır.
- Üçüncü grup olarak belirsiz serili akut lösemiler göz önüne alınmış ve bu grupta
- a. Bifenotipik akut lösemi
 - b. Farklılaşmamış akut lösemiler olmak üzere 2 gruba ayrılmıştır (13).

2.1.3. GÖRÜLME SIKLIĞI

ALL, yetişkinlerde gözlenen bir lösemi türü olmakla birlikte daha sıklıkla çocuklarda gözlenmektedir. Yetişkinlerde görülen lösemilerin % 15'ini, çocuklarda gözlenen tüm lösemilerin ise % 80'i gibi ciddi bir kısmını oluşturmaktadır (36).

Hastalığın görülme sıklığı cinsiyete göre değişmektedir. Erkeklerde daha yaygın görülen bir hastalık olup, kadınlara oranla 1,4 kat daha sık gözlenmektedir. Avrupa'da, erkeklerde görülme sıklığı 1,3/ 100000, kadınlarda ise 0,9/100000 olarak bildirilmiştir. Amerika'da ise her yıl yaklaşık 4000 kişiye ALL tanısı konmaktadır (8).

Yetişkin ALL vakalarının %50'si 50 yaşın altında olup, 70 yaş üzerindeki bireylerde pek gözlenmemektedir (7, 8).

Akut lenfoblastik lösemi çocuklarda en sık gözlenen kanser türüdür. Çocukluk çağında gözlenen tüm kanserlerin %30'unu, tüm lösemilerin ise %80'ini oluşturmaktadır (8). Çocukluk çağı ALL'si Amerika Birleşik Devleti'nde 4/100000, Türkiye'de Sağlık Bakanlığı'nın verilerine göre Türkiye'de 1,5/100000 oranında bildirilmiştir. En sık 1-4 yaş arası çocuklarda gözlenmektedir. Kızlardaki görülme sıklığının erkeklerdeki görülme sıklığına oranı 1/1,3 olarak bildirilmiştir. ALL'nin beyaz ırkta görülme sıklığı sarı ve siyah ırka göre daha fazladır (22).

2.1.4. OLUŞUM MEKANİZMASI

Akut lösemilerin neden oluştuğu tam olarak açıklanamasa da, lösemi gelişiminin tek bir olay sonucunda oluşmadığı ve kromozom hasarı, fiziksel ya da kimyasal ajana maruz kalma, virüs enfeksiyonu gibi etkenlerin rol aldığı çok basamaklı bir süreç olduğu bilinmektedir (22).

Lösemi gelişimindeki genetik mekanizmayı açıklamak için ortaya koyulan ve en fazla destek gören teori Knudson'un "çift vuruş teorisi"(Two Hit Teori)'sidir. Bu teoriye göre lösemi gelişimi için iki mutasyon gerçekleşmesi gerekmektedir. İlk mutasyon anne karnında iken, ikinci mutasyon ise postnatal dönemde çevresel faktörlerin (enfeksiyon, radyasyon, toksin, diyet, immün sistemin baskılanması vb.) etkisiyle gerçekleşmektedir. Bu mutasyonların etkisiyle; tümör baskılayıcı genlerde delesyon, hipometilasyon veya mutasyon yoluyla fonksiyon kaybı, protoonkogenlerde ise mutasyon, translokasyon ve amplifikasyon yoluyla fonksiyon kazanımı söz konusudur (22).

Kalıtsal bazı hastalıkların akut lenfoblastik lösemiye yatkınlığı arttırdığı bilinmektedir. Örneğin Down sendromlu bireylerde ALL gelişme riski 20 kat daha fazladır. Yatkınlığı arttıran diğer kalıtsal hastalıklar; bloom sendromu, fanconi anemisi, ataxia telenjektazi, nörofibromatozis, klinefelter sendromu, langerhans hücreli histiositozis olarak sıralanabilir. Ayrıca folat metabolizmasında görev alan 5,10-metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) genindeki belli polimorfizmlerin ALL gelişme riskini arttırdığı bilinmektedir (8, 12, 51).

Lösemi gelişmiş tek yumurta ikizlerinde yapılan çalışmalarda konkordansın %5 olması postnatal çevresel hasarın lösemi gelişiminde ne kadar etkili olduğunu göstermektedir. Çevresel etkenlerin başında kimyasal ajanlar, sigara dumanı, elektromagnetik alan, radyasyon ve enfeksiyöz ajanlar gelmektedir (8, 12, 22, 51, 74).

Sigara dumanı ve lösemi arasındaki ilişki, Cancer and Leukemia Group B protokülüne göre tedavi edilen 18-79 yaş arasındaki hastalarda araştırılmış ve sonuçlar 60 yaş üstünde sigara kullanan hastalarda riskin arttığı yönünde bulunmuştur (8, 12, 22, 51, 73).

ALL gelişimin de etkili diğer bir çevresel etken ise radyasyondur. Çernobil kazasından sonra 10mSV üstünde radyasyona maruz kalanlarda hastalığın gelişme riskinin belirgin bir şekilde arttığı saptanmıştır. Ayrıca prenatal X ışınına maruz kalma

ve tinea capitis tedavi amacıyla uygulanan X ışını da bir risk faktörüdür. Düşük frekanslı elektromagnetik alan da ALL için risk faktörleri arasındadır (8, 12, 22, 51).

Yapılan hayvan deneyleri, retrovirüslerin lökomogenezde etkili olduğunu göstermiş ancak insanla ilişkisi tam gösterilememiştir. Ancak Ebstein-Barr virusünün olgun B hücreli veya burkit ALL ile ilişkisi bulunmuştur (8, 22, 51, 73).

Lösemi gelişiminde etkili kimyasal ajanlar; benzen ve metabolitleri, fenol, hidrokinon, katekol, benzetriol olarak sıralanabilir. Ayrıca alkilleyici ajanlar ve topoizomeraaz enzim inhibitörleri bu gruba dahil olabilir. Fakat alkilleyici ajanlar ve topoizomeraaz enzim inhibitörleri genellikle kemoterapiyi izleyen ikincil lösemilerde etkilidir. Terapi sonrası gelişen lösemilerin %90'ı myeloid kökenli olsa da, topoizomeraaz II inhibitörü kullanımından sonra ALL gelişime riski arttığı bildirilmektedir (8, 12, 22, 51, 73).

2.1.5. TANI

2.1.5.1. Klinik Bulgular

Lösemi, kan hücrelerinin sayılarında azalma veya fonksiyonlarında bozulma, diğer organların tutulumu, kilo kaybı, ateş gibi sistemik tablolar veya tümör lizisi gibi metabolik bozuklukların etkisiyle kendini göstermektedir. Tanıda fizik muayene ve laboratuvar bulguları çok önemli yer tutmaktadır (8).

ALL'nin klinik belirtilerle kendini göstermesi genellikle aniden olmaktadır. Yorgunluk, spontan kanama, halsizlik, uyku hali, kilo kaybı, ateş ve gece terlemesi gibi belirtiler gözlenmektedir. Nadiren asimetrik artrit, bel ağrısı, diffüz osteopeni veya litik kemik lezyonları görülmektedir. Çocuklarda bu belirtiler erişkinlere oranla daha sık gözlenmektedir. Küçük çocuklarda kemik ağrısına bağlı yürüme zorluğu gelişebilmektedir (7, 8, 22).

Fizik muayenede solgunluk, lenfadenopati, hepatosplenomegali, trombositopeninin neden olduğu diş eti ve burun kanaması, peteşi, ekimoz görülebilmektedir (51).

Ekstramedüller tutulumlar da sıkça görülmektedir. Başta merkezi sinir sistemi (MSS) olmak üzere, genitoüriner sistem, gastrointestinal sistem, deri, kalp, akciğer tutulumları gözlenmektedir (22).

MSS tutulumu tanı sırasında %5'den daha az oranda gözlenmektedir. MSS tutulumuna bağlı olarak gelişen baş ağrısı, kusma, kranial sinirlerin felçleri, polifaji ve

diabet insipitus başlıca semptomlardır. Özellikle 6. ve 7. kranial sinirleri tutan nöropatiler gözlenmektedir (22, 51).

Testis tutulumu ağrısız şişlik olarak kendini göstermektedir. Tanıdan itibaren ilk 1 yılda %10-23 erkek çocukta bulunur. Testis biyopsisi yapılan ALL'li olguların %10-33'ünde testis tutulumu varlığı bildirilmiştir (22, 51).

2.1.5.2. Laboratuvar Değerlendirmeleri

Hematolojik problemi olan hastaya lösemi tanısı koymak için kemik iliği aspirasyon materyali, kemik iliği biyopsi materyali ve blast hücrelerinin dolaşıma geçtiği durumda ise perifer kanı gerekmektedir (51).

ALL'de kemik iliği infiltrasyonuna bağlı olarak kandaki ve kemik iliğindeki hücrelerin üretiminde bozukluk olduğundan kan sayımı, yapılan ilk tetkikler arasındadır. Ayrıca periferik kan yayması ve kemik iliği aspirasyon materyalinden yapılan yayma ile hücrelerin morfolojik değerlendirmesi yapılmaktadır. Genellikle perifer kanında ve kemik iliğinde hücre sayısı artsa da, bazen pansitopeni oluşabilmektedir (51).

MSS tutulumunu tespit etmek için lomber ponksiyon ile alınan beyin omurilik sıvısında (BOS) blast varlığına bakılmaktadır. Children Cancer Group tarafından yapılan değerlendirmeye göre BOS'ta lökosit sayısı 5'ten fazla ise MSS tutulumunun var olduğu kabul edilmektedir (8).

ALL'de hipokalsemi, hiperkalemi, hipofosfatemi, artmış laktat dehidrojenaz (LDH), hiperüresemi ve artmış kreatinin gibi kan tablosunda değişiklikler görülebildiğinden biyokimyasal tetkikler yapılmalıdır. Bunların dışında koagülasyon parametreleri, kardiyak fonksiyonlar, infeksiyon profili yapılması gereken diğer incelemelerdir (7, 22, 51).

2.1.5.3. İmmüfenotipleme

İmmüfenotipleme, hematolojik kanserlerin tanınmasına ve morfolojiye ek bilgiler kazandırarak tiplendirilmesine yardımcı olmaktadır. Lenfositlerin hücre yüzeyinde CD adı verilen antijenler bulunmaktadır ve immünolojik değerlendirmede CD terminolojisi kullanılmaktadır (71).

Antijenlerin çoğu bir hücre serisine eşlik etseler de o seriye özgün değildirler. Farklılaşmanın değişik evrelerinde sergilenen antijenler, hücrenin olgunlaşmasının takibinde kullanılabilir. Fenotipik değerlendirme, myeloperoksidaz ya da Sudan Black

reaksiyonu gibi sitokimyasal çalışmalarla başlamaktadır. Bu aşama AML'yi dışlamak için kullanılmaktadır (71).

Genellikle immünofenotipleme çalışmaları kandan ya da kemik iliği aspiratından yapılmaktadır. Blastlarda incelenen hücre yüzey ve sitoplazmik markerların sayısı zamanla ve immünofenotipleme teknikleri ilerledikçe artmaktadır (51).

ALL'de immünofenotipleme B ve T lenfositlerin olgunlaşma sürecinde taşıdıkları yüzey antijenleri ve bazı sitoplazmik moleküllerin varlığı dikkate alınarak yapılmaktadır (7, 8, 51).

B hücre olgunlaşmasının farklı aşamalarında taşıdığı yüzey ya da sitoplazmik moleküllere göre B hücreli ALL; pro B, common pre B, pre B ve olgun B ALL olarak gruplandırılmıştır (7, 8).

Pro B-ALL: Hücre yüzeyinde CD19, CD22, CD79a ve terminal deoksिनükleotidiltransferaz (TdT) gözlenmektedir.

Common pre B-ALL: Erken pre B-ALL olarak isimlendirilir. TdT, CD19, CD22, CD79a ve CD10 bulunmaktadır.

Pre B-ALL: TdT, CD19, CD22, CD79a, CD10 ve sitoplazmik μ bulunmaktadır.

Olgun B-ALL: CD19, CD22, CD79a, CD10 ve yüzey Ig gözlenirken TdT bulunmaz.

T-ALL de timik hücre farklılaşma aşamalarına göre fenotipik gruplara ayrılır. Bu gruplar; protimosit, common timosit, olgun timosit olarak adlandırılmaktadır.

Protimosit timosit: Sitoplazmik CD3, TdT ile CD2 ve/veya CD5 ve/veya CD7 görülmektedir.

Common timosit: TdT, CD1a, CD2, CD5, CD7, CD1a, CD4, CD8 ve sitoplazmik CD3 gözlenmektedir.

Olgun timosit: Common timositte daha ileri olgunlaşma aşamasındadır. CD3, CD2, CD5, CD7, CD4 veya CD8 gözlenmektedir.

Ayrıca bu antijenlerin dışında B ve T hücreli ALL'de myeloid ve kök hücre antijenleri de üretilebilir (7, 22, 71).

2.1.5.4. Morfolojik Değerlendirme

Morfolojik değerlendirme, ALL'yi teşhis etmekte ve AML'den ayırmakta kullanılan ana kriterdir. ALL tanısı koyabilmek için kemik iliği aspirasyon materyalinden inceleme yapılmalıdır.

Morfolojik incelemede dikkate alınması gereken özellikler; hücre büyüklüğü, çekirdek/ sitoplazma oranı, sitoplazma, vakuol, granüllerin yapısı ve miktarı, çekirdeğin şekli ve sayısı, kromatin ve çekirdekçiğin yapısıdır.

Lenfoblastlar yayma preparatta küçük, dar sitoplazmalı, kaba kromatinli, belirsiz çekirdekçik bulunan hücrelerden, orta-büyük boyutta, izlenebilen mavi sitoplazmaya sahip, ince kromatinli, belli belirsiz ya da belirgin çekirdekçiye hücrelere kadar değişen hücrelerden oluşmaktadır (8, 51).

Bu özellikler göz önünde tutularak FAB komitesi L1, L2 ve L3 olarak 3 ana morfolojik alt grup belirlemiştir (51).

L1: Hücreler küçük, kromatin daha homojen ve daha az yoğunlaşmıştır. Sınırlı sitoplazma pek çok hücrede dikkat çekicidir, öyle ki nukleus hücre sitoplazmasından çıkıntı yapıyormuş gibi görünmektedir. Sitoplazma yoğun boyanmamıştır ve açık mavi renktedir. En sık çocuk vakalarda gözlenmektedir.

L2: Bazı vakalarda, lenfoblastlar önemli morfolojik çeşitlilikler gösterirler. Bazı lenfoblastlar tipik L1 lenfoblastlardan daha büyüktürler, oval veya düzensiz nuklear yapı gösterirler ve kromatinleri daha az homojendir. Nukleolusları genellikle belirgindir ve bazen birden çokta olabilmektedir. Sitoplazma daha fazladır ancak yine soluk mavidir.

L3: Burkitt lösemi olarak da adlandırılır. Blastlar daha büyüktür, homojendir ve koyu mavi sitoplazmaya sahiptirler. Ayrıca sitoplazmada keskin, tanımlanabilen vakuoller bulunmaktadır. Burkitt hücrelerinin nukleusları büyüktür ve yuvarlak veya ovaldir. Bazen çok belirgin olan nukleoluslara sahiptirler (51).

Küçük lenfoblastlar ALL vakalarında nadir gözlenirler. Bu blastların boyutları küçük olgun lenfositlerin boyutlarına yakındır ki bu özellikleriyle KLL'deki küçük lenfoid hücrelerden ayırmakta zorluk çıkarmaktadır. Küçük lenfoblastların yoğun kromatine sahip olması tanınmalarını zorlaştırmaktadır. Sitoplazmik granülasyonu bulunan lenfoblastlar ALL vakalarının az bir kısmında gözlenmektedir (7, 8, 51).

2.1.5.5. Genetik İnceleme

ALL’de gözlenen genetik değişimlerin saptanmasında sitogenetik ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır (7).

Sitogenetik incelemede amaç; lösemik blastlardaki sayısal ve yapısal kromozom anomalilerini tespit ederek tanıya ve tedaviye katkıda bulunmaktır. İnceleme heparinize kemik iliği aspirasyon materyali ve perifer kanından yapılmaktadır (7).

Eğer incelenecek materyal kemik iliği aspirasyon materyali ise direk ya da 24-48 saatlik kültür, perifer kanı ise 72 saatlik kültür uygulanmaktadır. Hücre kültürünün ardından elde edilen metafaz kromozomlarında sitogenetik inceleme için en sık kullanılan yöntem G bantlama- Tripsin- Leishman (GTL) bantlama tekniğidir (20, 65).

GTL bantlama tekniğinin kısıtlayıcı ve yetersiz kaldığı durumlarda kromozom sayı artış ve kayıplarını, delesyon translokasyon gibi yapısal değişimleri tespit edebilmek için FISH ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) gibi moleküler yöntemlere de başvurulmaktadır. Özellikle FISH yöntemi interfaz nükleusuna uygulanabilmesi ve hızlı bir teknik olması sebebiyle sitogenetik inceleme için yaygın olarak kullanılmaktadır (7, 35).

Fakat bu moleküler yöntemler sadece aranan anomali hakkında bilgi verip varolabilecek diğer sitogenetik değişimleri göstermemektedir. Bu sebeple gerektiğinde tüm bu yöntemlerden elde edilen bilgiler bir arada kullanılıp kesin tanı konulmaktadır (7).

2.1.6. PROGNOSTİK FAKTÖRLER

Akut lenfoblastik lösemide, tanı koymada da kullanılan birçok klinik ve laboratuvar özellik; hastalığın prognozunda değer taşımakta ve nüks olasılığına, dolayısıyla remisyon sürelerine yansımaktadır. Prognostik kriterlerin incelenmesi hastalığın biyolojisinin tanınmasının yanı sıra, risk gruplarının belirlenerek bunlara uygun yoğunlukta ve nitelikte tedavi yaklaşımlarının seçilmesi açısından önem taşımaktadır (67, 79).

2.1.6.1. Cinsiyet

Prognozun genel olarak kızlarda erkeklere göre daha iyi olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bazı protokollerde erkeklere daha yoğun veya daha uzun tedavi verilebilmektedir. Erkeklerdeki olumsuz prognozun nedeni tam olarak açıklanamasa da

testis nüksleri, ileri yaş ve lökosit sayısı gibi yüksek risk faktörlerinin daha sık görülmesi gösterilmektedir (67, 73)

2.1.6.2. Yaş

Önemli bir prognostik faktör olan yaş, özellikle hayatta kalım süresi üzerinde etkilidir. Erişkinler genelde yaş ilerledikçe prognoz da kötüleşmektedir. 50 yaş üzerinde prognoz kötüleştiğinden sağ kalım % 20 civarındadır. İleri yaştaki bu kötü prognozun sebebi; vakaların yoğun tedavilere toleransının azalması, yaşa bağımlı olarak gelişen yüksek risk faktörleri olarak bilinmektedir (8).

Çocuklarda yaşın prognoza etkisi daha farklıdır. En kötü prognoz 1 yaşının altındaki çocuklarda gözlenmektedir (8). En olumlu prognoz ise 2-6 yaş arasındaki çocuklarda görülmektedir. 1-10 yaş arasındaki çocuklarda, 1 yaşın altındaki ve 10 yaşın üstündeki çocuklara göre hastalığın seyri daha iyidir (8, 22). On yaş üzeri grupta da prognoz kötü olup, BCR/ABL füzyonu ve tanıda lökositöz gibi bazı olumsuz faktörler sık gözlenmektedir (8, 29).

2.1.6.3. Lökosit sayısı

Tanıdaki lökosit sayısı prognostik önemini korumaktadır (8).Avrupada ve dünyada yaygın olarak kullanılan Berlin-Frankfurt-Münih (BFM) protokülüne göre $20.000/\text{mm}^3$ lökosit sayısı kötü prognoz işaretidir. Lökosit sayısının prognostik etkisine göre risk grubu sınıflaması oluşturulmuştur. Amerikan protokollerine göre ise üst sınır $50.000/\text{mm}^3$ kabul edilmiştir (67).

2.1.6.4. Malnutrisyon

Bazı çalışmalarda nütrisyonel durumun önemli bir prognostik faktör olduğu bildirilmiştir. Malnütrisyonlu çocukların kemoterapiyi daha zor tolere ettiği ve daha az dozda alabildiği bu sebeple prognoz daha kötü olduğu belirtilmektedir (67).

2.1.6.5. İmmüfenotip

ALL, lenfositlerin yüzey ve sitoplazmik antijenik özelliklerine göre sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırma sonucunda immüfenotipik olarak çocuklarda başlıca olgun B, B-öncül ve T-hücreli olmak üzere üç ana gruba ayrılmaktadır. Olgun-B hücreli ALL, tüm olguların ancak %2-3'ünü oluşturmakta kendisine özgü tedavi ile artık çok iyi prognoz göstermektedir. T-hücreli ALL tüm ALL vakalarının %15-20'sini oluşturmaktadır ve pre B ALL'ye göre erkeklerde daha sık görülür. T-hücreli ALL'nin

birçok çalışmada kötü prognoz gösterdiği belirtilmişse de, bu özelliği daha çok yüksek lökosit sayısı ile ilişkili bulunmuştur. Pre B ALL olguları genelde en iyi prognozu göstermekle birlikte, olgunlaşma seviyelerine göre pro-B, common-ALL (CD10 +) ve pre-B alt gruplarına ayrılmakta ve buna göre farklı prognoz göstermektedir. ALL hücrelerinde CD13 ve CD33 gibi myeloid antijenler ve CD34 gibi kök hücre antijeni üretilmektedir. Bu bulgunun genel olarak prognozu kötüleştirdiği düşünülse de hala tartışılmaktadır (8).

2.1.6.6. Genetik özellikler

Kromozom bantlama ve kültür yöntemlerindeki gelişmeler sayesinde ALL olgularının %90'dan fazlasında sayısal veya yapısal kromozomal anomalilerin varlığı saptanmıştır. Lösemik hücrelerin genetik özellikleri T- ALL'den çok, B-öncül hücreli ALL'de prognostik değer taşımaktadır. Sitogenetik değişiklikler tanıda anormal hücrelerde bulunur, remisyonda kaybolur ve nükslerde bazen ek değişikliklerle beraber ortaya çıkar. Sitogenetik incelemeler ile birçok yapısal ve sayısal anomal tespit edilse de sitogenetik analizin yetersiz kaldığı durumlar olmaktadır. Örneğin genetik yeniden düzenlemelerin birçoğu karyotipleme ile gösterilememektedir. Bu yüzden moleküler tekniklerden de yararlanmak gerekmektedir (22, 67, 73, 90).

Yapısal genetik özellikler

Yapısal kromozomal değişiklikler sitogenetik ve moleküler biyolojik yöntemlerle saptanmaktadır. Özellikle revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu teknikleri ile hassas, doğru ve hızlı olarak kimerik füzyon genlerinin oluşumuna neden olan genetik değişiklikler saptanabilmiştir. Belli genetik değişimlere göre, tedaviye farklı yanıt ve klinik seyir açısından farklı prognoz gösteren alt gruplar ayırd edilebilmekte ve tedavinin önemini vurgulamaktadır. Genelde, t(9;22) yani Philadelphia kromozomu (+) ALL, güncel ve yoğun kemoterapiye rağmen, kötü prognoz göstermektedir (23, 29). MLL-AF4 füzyonu yani t(4;11)(q21;q23) ve diğer 11q23 translokasyonları da kötü prognoz göstermektedir. Hatta MLL-ENL füzyonu T-ALL'de çok iyi seyretmektedir. TEL-AML1 olarak da adlandırılan ETV6-CBFA2 füzyonu geni t(12;21)(p12;q22) translokasyonu ile B-öncül ALL'de oluşmaktadır. Olumlu prognoz gösterir ve olguların yaklaşık dörtte birinde saptanır. Ayrıca BCL-2 ailesine ait proteinlerin arasında BCL-2, BCL-XL anti-apoptotik ve BAD, BAX gibi pro-apoptotik olanlar vardır. Başka proteinlerle etkileşimleri nedeni ile prognostik değerleri kesinlik

kazanmamıştır. Benzer şekilde, p16 vep15 tümör baskılayıcı genlerin kaybı önceleri olumsuz hastalık seyri ile ilişkilendirilmiştir (22, 67, 90).

Sayısal Genetik Özellikler

Ploidi seviyesi, GTL bantlama uygulanmış preparatlarda doğrudan kromozom sayısının belirlenerek veya akım sitometrisi ile deoksiribonükleik asit (DNA) içeriği ölçülerek dolaylı saptanmaktadır. Çocuklarda 51-65 kromozom içeren hiperdiploid ALL en iyi prognoz gösteren grubu oluşturmaktadır. Kromozom sayısı 47-50 olan hiperdiploid ALL orta, psödodiploidi ve hipodiploidi ise kötü prognozludur. Psödodiploidi normal kromozom sayısı gösteren, ancak yapısal değişiklikler içeren olguları kapsar ve olguların % 40'ından fazlasını, yani en büyük grubunu oluşturur. Kromozom sayısı sitogenetik yöntemler dışında akım sitometrisi ile DNA indeksi hesaplanarak da saptanmaktadır. Lösemik hücrelerin DNA içeriğinin, normal G0/G1 hücrelerin DNA içeriğine oranlanması ile hesaplanan DNA indeksi >1.16 ise prognoz iyi, <1.16 ise kötüdür. Bu yöntem hızlı ve doğru da olsa, yapısal kromozom özelliklerini göstermemesi nedeni ile tek başına yeterli olmamaktadır. Ayrıca lösemik hücrelerde 4. ve 10. kromozomların trizomisi de B hücreli ALL'de çok iyi prognozlu grubu tanımlamaktadır.

Bütün sayılan klinik ve laboratuvar bulguları hastalık ve tedavi seyrinde etkilidir fakat tedaviye yanıt, günümüzde en önemli prognostik faktör olarak kabul edilmektedir (22, 67).

2.1.7. TEDAVİ

Hematolojik kanserler arasında yer alan akut lenfoblastik lösemisinin tedavisinde son yıllarda oldukça başarılı sonuçlar alınmaya başlanmıştır. Öyle ki; 40-50 yıl önce tüm ALL olguları kaybedilirken bugün 5 yıllık sağ kalım % 80'lere ulaşmıştır. Bu başarının altında yatan en büyük etken modern tedavi protokollerinin hastaları taşıdıkları risklere göre düşük, standart ve yüksek riskli olarak sınıflandırılmasıdır. Bu sınıflamada amaç; nüks beklenen hastaları daha yoğun tedavi etmek, düşük risk grubundaki hastaları ise tedavinin geç yan etkilerinden korumaktır. Son zamanlarda hastanın lösemisinin özellikleri, risk faktörleri yanında ilaç metabolizmasına etki eden enzimleri kodlayan genlerdeki polimorfizminde (tiopürin metil transferaz, metilen tetra hidro folat redüktaz, timidilat sentetaz, glutatyon transferaz, multidrug resistans, RFC = reduced folat carier, sitokrom p-450, nikotinamidadenin dinüklotid, sistationin beta

sentetaz) prognozu etkilediği gösterilmiştir. Giderek ALL tedavisi genelinde belli kalıplar içinde geliştirilse de, kişiye özel biçime sokulmaya çalışılmaktadır (22) .

ALL'nin tedavisindeki ilk hedef kandaki ve kemik iliğindeki lösemik hücrelerin elimine ederek remisyonu sağlamaktır. Remisyon; ateş, kemik ağrısı gibi hiçbir klinik ve hematolojik bulgunun kalmaması durumudur. Fizik bulgulardan karaciğer dalak büyüklüğü, lenfadenopati (LAP) düzelmeli ve BOS'ta lenfoblast olmamalıdır. Normal bir kan tablosuna sahip olunmalı ve periferik kan yaymasında blast bulunmamalıdır. Eğer remisyon sağlanmazsa hastalar kısa süre içinde kaybedilebilirler. Bu yüzden sistemik kemoterapi ve MSS profilaksisi ile remisyonun devamı sağlanmalıdır (22, 67).

Nüks; hastalığın iyileşme döneminden sonra tekrarlamasıdır. Hastaların %20-30'unda izlenir. En sık kemik iliğinden daha nadir olarak MSS, testis ve diğer organlardan kaynaklanabilir. Bazen kemik iliği ve ekstremiteler tutulum beraber gözlemlenebilir. Nükslere en sık yoğun tedavi bitiminden sonraki ilk 6 ay ve tüm tedavi sonrasındaki ilk yılda rastlanılır (7, 8, 22).

Akut lenfoblastik lösemide tedavi; destekleyici tedavi, kemoterapi, kemik iliği transplantasyonu ve immünoterapi, biyoterapi gibi alternatif tedavi yaklaşımlarını içermektedir (67).

2.1.7.1. Destek Tedavisi

Diğer kanserlerde olduğu gibi akut lenfoblastik lösemi tedavisinde de kemoterapik ilaçlar kullanılmaktadır. Kemoterapide amaç; hastalığı ortadan kaldırmak olsa da kemoterapik ilaçların yan etkilerinin hastanın yaşama kalitesini olumsuz yönde etkilediği bilinen bir gerçektir. Bu amaçla gerek hastalığın sebep olduğu ateş, ağrı, iştahsızlık gibi semptomların gerekse kemoterapinin yol açtığı bulantı, kusma, enfeksiyona eğilim gibi komplikasyonların iyileştirilmesi için hastaya destekleyici tedavi uygulanır (7).

Genel destek tedavisi; tanı sırasında hastalarda genellikle ağrı, enfeksiyon, kanama, anemi, bozuk böbrek ve karaciğer fonksiyonları ve bunlara bağlı olarak gelişen metabolik komplikasyonlar vardır. Bu amaçla hastalara ağrı, kanama ve enfeksiyon tedavileri uygulanmaktadır (22).

2.1.7.2. Kemoterapi

Kanser tedavisindeki en etkin ve yaygın tedavi yöntemi kemoterapidir. Kemoterapi ilaçla tedavi anlamına gelmektedir. Kemoterapik ilaçların genel etki mekanizması hücre döngüsüne etki ederek bölünmeyi durdurma yönündedir. Kemoterapi ilaçlarının hemen hepsi kan yoluyla vücuda dağılır ve tümörlü hücrelerin bölünüp çoğalmalarını engeller. Kemoterapi ilaçları tümörlü hücreleri öldürürken vücudun normal hücrelerini de etkileyebilir. Bu durum çoğunlukla geçici olan yan etkilere neden olmaktadır. Kemoterapi;

1. İndüksiyon(başlangıç) tedavisi
2. Merkezi sinir sistemi tedavisi
3. Konsolidasyon (güçlendirme) tedavisi
4. İdame tedavisi

tedavilerinden oluşmaktadır (90).

2.1.7.3. Hematopoetik kök hücre nakli

Yüksek doz kemoterapi ya da radyoterapi lösemik klonun ortadan kalkmasını sağlasa da aynı zamanda geri dönüşümsüz kök hücre hasarına yol açmaktadır. Bunun sonucunda hastada hematopoez durmakta, pansitopeni ve buna bağlı komplikasyonlar oluşmaktadır. Tümörü ortadan kaldıracak dozda kemoterapi/radyasyon uygulandıktan sonra hematopoezin başlaması için hastaya hematopoez yapma yeteneği olan kök hücreler verilmelidir. Eğer kök hücreler bir donörden elde edilirse allojenik hematopoetik kök hücre nakli, yoğun tedaviden önce hastanın kendisinden alınmış sağlam hücrelerden elde edilirse otolog hematopoetik kök hücre nakli adı verilir. Ayrıca kök hücreler kemik iliği dışında periferik kandan ve göbek kordonundan da elde edilebilmektedir. Kök hücre naklinden sonra alıcıdaki tüm kan ve immün sistem hücreleri donör kaynaklı hücreler olacaktır ve bu durum hastanın yaşamı boyunca devam edecektir (90).

Allojenik kök hücre nakli, aralarında dokumu uyumu olan hasta ve donör arasında gerçekleştirilir. Doku uyumu insan lökosit antijeni (human leukocyte antigen HLA-) uyumu olarak tanımlanır. Kök hücre naklinde en önemli HLA lokusları HLA-A, HLA-B, HLA-C ve HLA-DR antijen lokuslarıdır. Bu lokusların uyumlu olsa bile bazı hastalarda alınan hücreler immün sistem tarafından yabancı antijen olarak algılanır ve immün cevaba sebep olarak doku hasarına yol açar. Buna graft versus host hastalığı adı

verilir. Bu durumu engellemenin yolu-varsa- hastanın tek yumurta ikizinden kök hücre nakledilmesidir (7).

Allojenik kök hücre nakli yapılan akut lenfoblastik lösemili hastalarda 5 yıllık sağ kalım yaklaşık %50 olarak bildirilmektedir (7).

Otolog hematopoetik kök hücre naklinde ise yüksek doz kemoterapi ve radyasyondan (hazırlık rejimi) önce hastanın kendisinden alınan kök hücreler ile yapılır. Bu yöntemde graft versus host hastalığı riski yoktur fakat bu yöntemdeki en ciddi risk hastaya lösemik hücrelerin verilmesidir. Ayrıca diğer bir problem ise hastaya uygulanan tedavilerin etkisiyle hastada hematopoetik hücrelerin azalması sonucu hastaya yeteri kadar kök hücre verilememesidir (90).

Otolog nakilde ölüm riski allojenik nakile göre daha azdır fakat hastalığın nüks etme riski fazladır. Otolog hematopoetik kök hücre nakli akut lenfoblastik lösemi olgularında 5 yıllık sağ kalım oranı yaklaşık %40'tır (7).

2.1.7.4. Radyoterapi

Radyoterapi tek başına ya da kemoterapi ile birlikte uygulanmaktadır. İleri evrelerde palyatif amaçlı, MSS profilaksisinde uygulanmaktadır. Ayrıca kemik iliği transplantasyon öncesi hazırlık rejiminin parçası olarak tüm vücut ışınlaması yapılmaktadır (1, 2, 7).

Lösemide uygulanan bahsedilen tedavi yaklaşımlarındaki gelişmelere karşın, nüksün varlığı hala ciddi bir sorun olarak sürmektedir. Hastaya uygulanan tedaviden (radyoterapi, kemoterapi, kemik iliği nakli) kaçan ve nükse neden olan hücrelerin varlığı "minimal rezidüel hastalık (MRH) tanımlamasını gündeme getirmektedir (21, 74). Morfolojik olarak saptanamayacak kadar düşük sayıda lösemik blastın varlığına minimal rezidüel hastalık denir. Tedaviden kaçan bu rezidüel hücrelerin varlığı, diğer risk faktörlerinden bağımsız olarak hastalığın seyri için belirleyici bir faktör olmuştur. MRH 'i tespit etmek için kullanılan başlıca metodlar;

İmmünofenotipleme: Akım sitometri ile lösemik hücre yüzeyindeki aberant protein üretiminin gösterilmesi

Karyotip analizi: Sitogenetik analiz, FISH

PCR yöntemi: Kromozomal anomalilerin gösterilmesi ve klona özgü Ig ve T hücre reseptör (THR) gen yeniden düzenlenmelerin gösterilmesidir (33, 74).

2.2. ALL’de GÖRÜLEN SİTOGENETİK DEĞİŞİKLİKLER

Kanser, hücre çoğalmasının düzenlenmesini kontrol eden genetik mekanizmaların bozulması sonucu ortaya çıkan genetik bir hastalıktır. Yapılan araştırmalar da kansere neden olan genetik değişimin, özellikle kromozom anomalileri sonucunda oluştuğunu göstermektedir (75).

Sitogenetik çalışmalar, malign hematolojik hastalıkların klinik olarak yönlendirilmesinin ve lösemi araştırmalarının önemli bir kısmını oluşturmaktadır (50, 84). Kromozom analizleri lösemi tipinin belirlenmesi ve hastalığın prognozunu tahmininde önemli bir rol oynamaktadır. Lösemilerde genellikle tek bir anormal karyotipik yapı bulunur ve bu yapı birincil kromozom değişikliği olarak tanımlanmaktadır. Bu birincil karyotipik değişikliklerin akut lösemilerde anahtar rol oynadığı kabul edilmektedir. Bazen buna ilaveten ikincil anomalilerde ortaya çıkabilir ve bu ikincil yapılar hastalığın seyrini etkilemektedir (99).

Esas olarak kromozom anomalileri sayısal ve yapısal olarak iki şekilde gözlenmektedir.

2.2.1. Sayı anomalileri

Öploidi: Bir hücredeki kromozomların, organizma için normal olan haploid sayının tam katları şeklinde artması veya tek takım olarak bulunması durumudur. Örneğin, insan somatik hücrelerinde normal diploid ($2n=46$) sayının dışında, haploid sayı olan 23’ün katları şeklinde artışı triploid ($3n=69$) ve tetraploid ($4n=92$) olarak isimlendirilir (28).

Anöploid: Temel kromozom sayısının katları kadar olmayan artma ya da eksilmelere anöploid adı verilir. Diploid bireyde tek bir kromozomun eksik olması monozomi olarak adlandırılır. Kromozom çiftinin iki yerine üç adet bulunması durumuna trizomi, dört adet bulunması tetrazomi olarak ifade edilir. Bunların dışında kromozom sayısında artma yönündeki değişiklikler hiperploid, azalma yönündeki değişiklikler hipoplodi olarak tanımlanır (28).

Konvensiyonel sitogenetik başlarda birincil olarak sayı anomalilerinin belirlenmesi için kullanılırdı. Sayısal değişimlerin kromozom analizi ile tespiti ile kanserdeki prognostik önemini ortaya çıkarmıştır (86). Örneğin; yüksek hiperdiploidi ve near haploidinin çocukluk çağı ALL’inde prognostik belirleyiciler olduğu, düşük risk ve yüksek risk sınıflandırmasını oluşturduğu bilinmektedir (41, 88).

ALL’de prognostik ve terapötik anlamı olan pek çok kromozom anomalisi bildirilmiştir. Görülen sayısal anomaliler ploidi derecesine sınıflandırılmaktadır (41, 69).

Hiperdiploidi; 46’dan fazla kromozoma sahip hücrelerdir. Hiperdiploidi, bulunan kromozom sayısına göre yüksek hiperdiploidi ve düşük hiperdiploidi olarak gruplandırılmıştır.

Yüksek hiperdiploid, 51-65 kromozoma sahip hücelere denir. Çocukluk çağı ALL sinde yüksek hiperdiploidi vakaların %30 unda görülmektedir. Yetişkinlerde bu oran %10 civarındadır. 1978 de tanımlanan yüksek hiperdiploidi iyi prognoza ilişkilendirilmiş ve 5 yıllık sağ kalım %80 civarındadır. Bu karyotip, 1-9 yaş, düşük lökosit sayısı ve pre B immüfenotipine sahip olanlar için iyi prognoz göstergesidir. Yetişkin ALL’inde de en iyi prognoza sahip olan grup bu gruptur. 3 yıllık hastaliksız sağ kalım %59’dur. Çocuklarda ise 51-55 kromozom 5 yıllık sağ kalım %72, 56-67 kromozom 5 yıllık sağ kalım %86’dır (40, 51).

Düşük hiperdiploid, 47-50 kromozoma sahip hücrelerdir. Prognoz yüksek hiperdiploidiye göre kötüdür. Bu sayı anomalilerinin prognoza etkisi; kromozom sayısına ve hangi kromozomların arttığına göre çeşitlilik göstermektedir. Artışı gözlenen kromozomlar genellikle kromozom X, 21, 4, 6, 14, 8, 10 ve 17 dir. 4, 10, 6, 17 kromozomların artışı iyi prognozla ilişkilendirilmiştir. Hiperdiploid karyotipte 5. kromozomun artışı bu gruptaki hastalara göre prognoza kötü etkileri bulunmaktadır. Trizomi 5 nadiren de olsa tek başına bulunduğu çocukluk çağı ALL’inde kötü prognoza işaret etmektedir. Benzer olarak trizomi 8’de aynı etkiye sahiptir. Hiperdiploid hücrelerde ek olarak yapı anomalilerinin olması prognozu olumsuz yönde etkiler. Örneğin izokromozom 17 çok nadir görülse de hiperdiploidide kötü prognozla ilişkilidir. Hiperdiploid yetişkin ALL vakalarının yaklaşık %50’si yapı anomalisi de taşımaktadır. En sık gözlenen yapısal anomali Ph kromozomudur (40, 95).

Psödodiploidi; bir ya da daha fazla kromozomun monozomi veya trizomisi gibi sayısal anomalisi olan fakat 46 kromozoma sahip ya da 46 kromozoma sahip fakat yapısal anomalisi olan hücrelerdir. Olguların %40’ bu gruptadır. Lökosit sayısı ve LDH yüksektir. Yoğun tedavi ile başarı sağlanabilmektedir (40).

Hipodiploidi; 46’dan az kromozoma sahip hücrelerdir. Erişkin ALL olgularının %4-9’unda görülür. Bu olgularda tanı genellikle prekürsör-B-ALL dir. Genetik materyal kaybı ve bu nedenle potansiyel tümör baskılayıcı genlerin kaybı, hipodiploid-ALL de lösemi oluşumunda hastalık modelini açıklayabilmektedir (69)

23-29 kromozoma sahip (near haploid) olan karyotip, yaklaşık % 0.7- 2.4 oranında nadir görülmektedir. Kötü prognoz gözlenir ve ortalama sağ kalım 11 aydır. Near haploid metafazlarda genellikle cinsiyet kromozomları bulunur ve 10, 14, 18 ve 21. kromozomların artışı gözlenmektedir. Ayrıca near haploid serisinin kopyalanması sonucu hiperdiploid hücreler oluşabilir. Bu hastalarda prognoz daha iyidir (40, 69, 95)

45 kromozomlu vakalar hipodiploid grubunun büyük bir kısmını kapsarlar. Bu gruptaki hastalar orta derecede prognoza sahiptir. Fakat kromozomal anomaliye de bağlı olarak hastalığın seyri değişebilmektedir. Örneğin monozomi 7 özellikle yetişkinlerde kötü sonuçlara neden olabilmektedir. 33-34 kromozomlu klonlar ALL'de % 0.8 oranında gözlenmektedir. Bu karyotip, hem çocuklarda hem de yetişkinlerde kötü prognoz göstergesidir. Azalan kromozom sayısının olumsuz etkisi olduğu Children's Cancer Group tarafından belirtilmiştir. Moleküler metodlar sayısal anomalilerin tespitinde kullanılmadığından, tedavi protokolünde belirleyici olan karyotip analizidir. Metafaz olmadığı durumlarda FISH için tasarlanmış sentromer problemleri ile interfazda kromozomların eksikliği fazlalığı tespit edilebilmektedir (40).

2.2.2. Yapı anomalileri

Kromozomlarda meydana gelen yapı anomalileri ise; translokasyon, delesyon, insersiyon, duplikasyon, izokromozom, marker kromozom, halka kromozom, inversiyon ve onkogenik potansiyele sahip genlerdeki yeniden düzenlenmeler gibi yapı anomalilerini kapsamaktadır. Bu onkogenler, hücre farklılaşması ve proliferasyon yollarını etkileyerek lösemi gelişiminde rol almaktadır (40, 51, 75).

Lösemiyle ilişkilendirilmiş translokasyonların, inversiyonların kırılma noktalarının belirlenmesiyle, kanserleşme sürecinde rol oynayan genler daha iyi anlaşılmıştır. Bu genler direkt ya da indirekt yolla kan hücrelerinin hemostazında ve gelişiminde rol oynamaktadır. Translokasyonlar sonucu oluşan füzyon genlerin ürünleri hücrelerin proliferasyonunu, farklılaşmasını ve apoptozunu etkilemektedir (66).

Sonuç olarak sitogenetik analiz, ALL'nin klinik tanısında rutin olarak kullanılan ve hastalığın prognozunda belirleyici bir değerlendirmedir. Ayrıca hastalığa özgü kromozom anomalileri ve tamamlayıcı moleküler değerlendirmelerden elde edilen bulgular, WHO'nun hematolojik malignite sınıflandırmasında morfoloji, immünofenotip ve klinik özelliklerle beraber kullanılmaktadır (39, 66, 86).

2.2.2.1. T-ALL’de gözlenen kromozom yapı anomalileri

Tüm çocukluk çağı ALL vakalarının %15’i ve yetişkin vakaların ise %25’i T-hücreli kaynaklı akut lösemidir (40, 96).

T-ALL görülen olguların %70’inde kromozom anomalisi gözlenirken geri kalanı normal karyotipe sahiptir. T-ALL’de görülen kromozom anomalileri Tablo 2.1’de belirtilmiştir. Görülen translokasyonlar çoğunlukla T hücre reseptör lokusunu içermektedir. THR lokusunu içeren yeniden düzenlenmeler T-ALL vakaların %30’unda gözlenmektedir. T hücre reseptör genleri; THRA (alfa) ve THRD (delta) 14q11’de, THRB (beta) THRG(gama)ise 7q34 ve 7p14’te bulunmaktadır. TCRAD ve TCRB lokuslarını içeren yeniden düzenlenmeler, hem çocukluk çağı hem yetişkin ALL’inde en sık görülen değişimlerdir (41, 96).

Bu kromozom yeniden düzenlemelerinde onkogenler, T hücre reseptör geninin promotör ya da enhancer elementlerinin yakınına yerleşirler ve üretim seviyeleri değişir. Bu değişim genellikle üretiminin artması yönündedir (40).

T-ALL’deki mutasyonlar etki mekanizmalarına göre 4 gruba ayrılmıştır.

1. Proliferatif avantaj sağlayanlar
2. Farklılaşmayı ya da sağ kalımı bozanlar
3. Hücre döngüsünü etkileyenler
4. Kendini yenileme kapasitesini sağlayanlar

Bu farklı yolların anomalilerle ilişkisi ve gen ekspresyon çalışmaları, T-ALL’nin patogenezinin çok basamaklı bir süreç olduğunu göstermiştir. Bu moleküler ve genetik çalışmalar gelecek T-ALL tedavi protokollerini yönlendirebilecek bilgiler sağlamaktadır (40, 41).

Tablo 2-1: T-ALL’de görülen kromozom yapı anomalileri (40,41)

Karyotip	Katılan Genler	Yeniden düzenlenmenin sonucu	Görülme sıklığı
t(10;14)(q24;q11)	HOX11/THRA-THRD	HOX11’in üretiminde artış	%10
t(11;14)(p13;q11)	LMO1/THR	LMO1’in üretiminde artış	%5-10(çocuklarda)
t(11;14)(p15;q11)	LMO2/THR	LMO2’nin üretiminde artış	%1’den az
t(6;7)(q23; q34)	c-MYB/THRB	MYB’nin regülasyonunda bozulma	%5’ten az
t(1;14)(p33;q11)	TAL1/THRA	TAL1’in üretiminde artış	%3
t(5;14)(q35;q32)	BCL11B/TLX3	TLX3’ün ektopik üretimi	%20(çocuklarda)
del(11)(p12p13)	LMO2	Negatif regülasyonundan sorumlu elementlerinin kaybına bağlı LMO2’nin ektopik üretimi	%5
NUP/ABL-1 amplifikasyonu	NUP/ABL-1	NUP ve ABL1 genlerinin miktarında artış	%6

2.2.2.2. B-ALL’de gözlenen kromozom yapı anomaliler

B hücreli ALL, tüm ALL vakalarının yaklaşık %80’nini oluşturmaktadır. Özellikle birçok yapısal anomalinin görüldüğü B-ALL için sitogenetik bulgular prognostik değer taşımaktadır. En sık görülen yapısal anomali translokasyonlar ve delesyonlardır. Hematopoezde yer alan transkripsiyon faktörleri, immünoglobulin genleri, B-ALL gelişiminden sorumlu olan ve yapısal değişimlere katılan genlerdir. Translokasyonlar sonucunda füzyon proteinleri ya da bazı transkripsiyon faktörlerinin

üretiminde artış gözlenir. Ayrıca tümör baskılayıcı genlerin yerleştiği lokusları kapsayan delesyonlarda B-ALL gelişimi için önemli faktörlerdendir. B-ALL’de gözlenen kromozom yapı anomalileri Tablo 2.2’de yer verilmiştir (40, 41, 51).

Tablo 2-2: B-ALL’de görülen kromozom yapı anomalileri (41, 51)

Karyotip	Katılan genler	Yeniden düzenlenmenin sonucu	Görülme Sıklığı Çocuk Yetişkin
t(1;19)(q23;p13)	PBX1/E2A	Transkripsiyon faktörü aktivasyonu	%5 %2
t(17;19)(q21;p13)	E2A/HLF	Apoptozun baskılanması	<%1 <%1
t(12;21)(p13;q22)	TEL/AML1	TEL geninde fonksiyon kaybı	%25 %2
t(9;22)(q34;q11)	BCR/ABL	Tirozin kinaz aktivitesi	%4 %25
MLL yeniden düzenlenmeleri			
t(4;11)(q21;q23)	MLL/AF4	Transkripsiyon faktörünün regülasyonunun bozulması	%60(infant) %5
t(11;19)(q23;p13.3)	MLL/ENL	Transkripsiyon faktörünün regülasyonunun bozulması	%5 nadir
MYC yeniden düzenlenmeleri			
t(8;14)(q24;q32)	MYC/IGH	Myc’in üretiminde artış	%2 %8
t(2;8)(p12;q24)	IGK/MYC	Myc’in üretiminde artış	<%1 %2
t(8;22)(q24;q11)	MYC/Igλ	Myc’in üretiminde artış	<%1 <%1

2.2.2.3. Hem T-ALL hem de B-ALL görülen kromozom yapı anomalileri

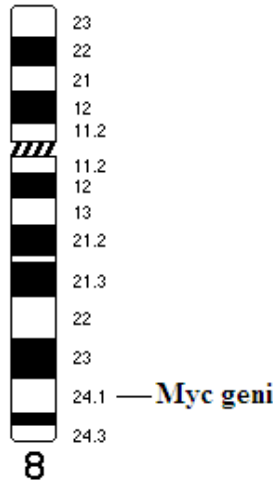
ALL’de gözlenen bazı yapısal anomaliler ise hem T-ALL’de hem de B-ALL’de görülebilmektedir. Bu anomalilere Tablo 2.3’te yer verilmiştir (41, 51).

Tablo 2-3: Hem T-ALL hem de B- ALL’de görülen kromozom yapı anomaliler (41, 51)

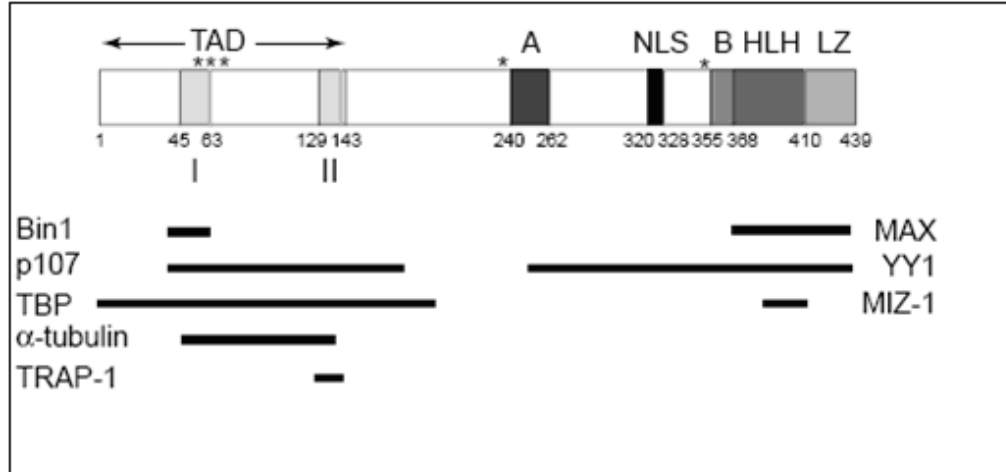
Karyotip	Katılan Genler	Yeniden düzenlenmenin sonucu	Görülme sıklığı Çocuk Yetişkin
del(9p)	p16 ^{INK4A} p15 ^{INK4B} p14 ^{ARF}	Tümör baskılayıcı genlerin kaybı	%10 %10
del(12p)	p27 ^{KIP1}	Tümör baskılayıcı genlerin kaybı	%10-15 %5
del(6q)	?	Tümör baskılayıcı genlerin kaybı	%30 %5

2.3. MYC GENİ(Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog)

C-myc geni, avian myelositik lösemi virüsünün insandaki hücresel homologudur. N-myc ve B-myc’in de yer aldığı myc protein ailesinin bir üyesidir. 8q24’te yerleşmiştir. Myc geninin kromozom 8’in üzerindeki yerleşimi Şekil 2.1de gösterilmektedir (26, 44).

**Şekil 2-1: Kromozom 8’in idiyogramı ve myc geninin yerleşimi (44).**

Genin yapısında üç adet ekzon ve üç farklı transkripsiyon başlatan promotör bölge bulunmaktadır. 2. ekzondan başlayıp devam eden translasyon sonucu 439 aminoasitlik, 64 kDa ağırlığında c-myc proteini üretilir. Diğer alternatif başlama bölgelerinden başlayan translasyonlar sonucu p67 Myc ve MycS gibi daha uzun ya da daha kısa proteinler elde edilebilir (14).



Şekil 2-2: C-myc'in yapısal sahaları: Myc-box I (I) ve myc-box II(II) içeren transkripsiyonel aktivasyon sahası(TAD), asidik bölge(A), nükleer lokalizasyon sinyali(NLS), bazik bölge(B), helix-loop-helix motifi(HLH), lösin zipper(LZ). Majör in vivo fosforilasyon sahaları * ile, myc proteini ile etkileşen proteinlerin myc proteini üzerindeki etkileşme sahaları siyah çizgiler ile gösterilmiştir (18).

C-myc proteininin C-terminali dimerizasyon motifi içerir. Bu motif, DNA'ya bağlanan proteinlerde bulunan helix-loop-helix lösin zipper (HLHLZ) sahasına sahiptir. HLHLZ sahası diğer HLHLZ proteinleri ile homotipik ve heterotipik dimerizasyonu sağlamaktadır. Nükleer hedeflenme dizisi içeren dimerizasyon sahası, hücre sel transformasyonda gereklidir. 1991 yılında tespit edilen Max, myc bağımlı partner protein olarak tanımlanmıştır. Myc'in DNA'ya bağlanması için max ile heterodimer oluşturması gerekmektedir. Böylece myc inaktif formdan, E-Box'lara bağlanabildiği aktif duruma gelmektedir. DNA bağlı myc-max heterodimeri, myc'in N-terminal bölgesi aracılığı ile TRRAP, histon asetilaz GCN5 gibi transkripsiyonda yer alan çeşitli proteinlerle etkileşmektedir. Histon asetilasyonu ile kromatin yapısını değiştirerek transkripsiyonda rol alan proteinlerin, faktörlerin DNA ya yaklaşıp bağlanmasını sağlamaktadır. C-myc proteinin yapısı Şekil 2.2'de gösterilmiştir (14, 24, 26, 32).

Max proteini ayrıca Mad protein ailesi üyeleri (Mga ve Mnt) ile de etkileşebilmektedir. Mad proteinleri transrepressyon kompleksini ve histon deasetilaz aktivitesini güçlendiren SID yapısı (Sin3-interacting domain) içermektedir. E-Box'a bağlanan mad/max kompleksi, myc'in hedef sahalarıyla yarışıp histon deasetilasyonuna yol açar. Böylece transkripsiyon faktörlerinin DNA'dan uzaklaşmasına sebep olarak transkripsiyonu kısıtlar. Böylece mad, myc aracılı neoplastik transformasyonu inhibe

edebilmektedir. Mad genleri delesyona uğradığında tümör baskılayıcı gen gibi davranarak myc'in fonksiyonunu destekleyici özellik gösterir. Mad ailesinden Mxi-1'in homozigot delesyonu sağlanan knock out farelerde deri tümörlerine ve lenfomaya yatkınlık gözlemlendiği bildirilmiştir (14).

C-myc proteinin N terminal sahasında transkripsiyonel aktivasyon sahası (TAD-transcription activation domain) adı verilen 143 aminoasitlik fonksiyonel transkripsiyon sahası bulunmaktadır (26). Myc, gen aktivasyonunda için gerekli olan E-box (myc box1, myc box2) yapısı içermektedir. Box2 transkripsiyonel baskılamaya katılmaktadır. N-terminal sahada meydana gelecek hasar myc'in biyolojik fonksiyonunu etkilemektedir (3, 24, 43).

DNA bağlı Myc-Max kompleksi, TAD ile transkripsiyonu aktive eder. Bu sahanın ufak bir kısmı transkripsiyonun baskılanması içinde gerekmektedir. Fakat mekanizması tam olarak çözülememiştir. N terminaldeki bu transregülatör saha, transformasyon ve transkripsiyon baskılanması için gerekli sahadır. Bu iki olayda kanserleşme sürecindeki etkili olaylardır (3, 14, 43).

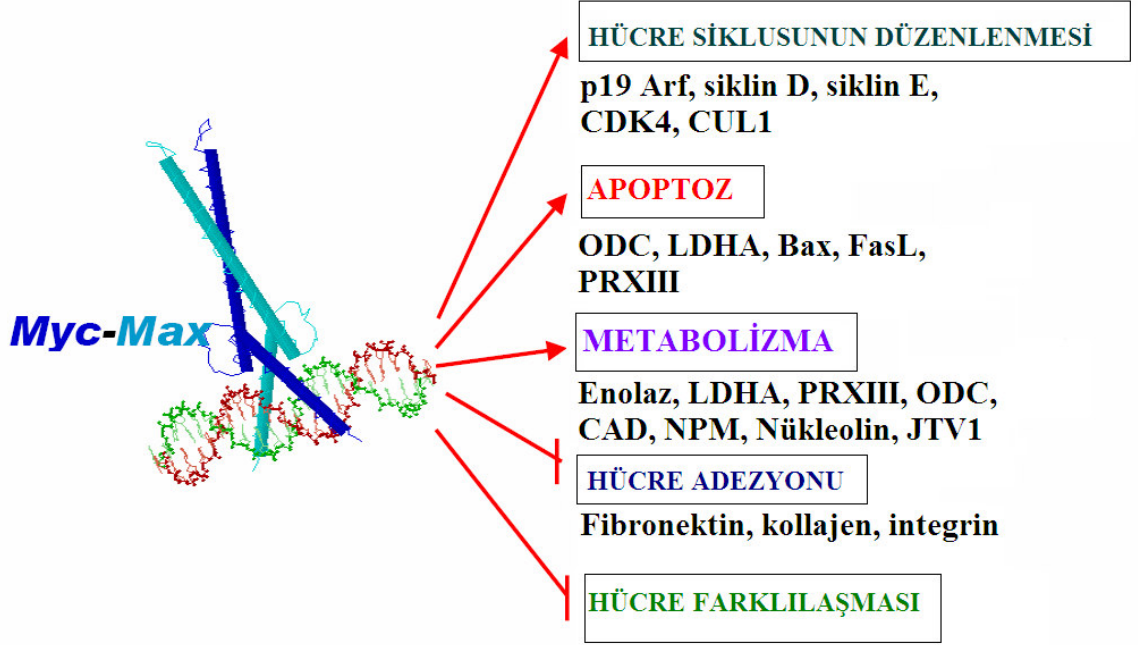
2.3.1. Fonksiyonları

Myc protoonkogeni, transkripsiyonu hem aktive hem de baskılama özelliği olan, DNA bağlayan bir transkripsiyon faktörü kodlamaktadır. Myc proteini hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptoz gibi farklı birçok olayda yer almaktadır. Myc proteinin üretimi; transkripsiyonel, post transkripsiyonel, translasyonel aşamalarda kontrol altındadır. Çünkü myc üretiminin normalden saptması patolojiyi beraberinde getirmektedir (3, 14, 18, 19, 24, 78).

C-myc'in aşırı üretimi birçok kanser tipinde gözlenmektedir. Bu durum, genin amplifikasyonu ya da transkripsiyonel aktivitesinin artmasına neden olacak bir translokasyon gibi genetik değişimin sonucunda gerçekleşmektedir. Myc'in çok üretildiği dokularda yüksek proliferasyon hızı görülmekte, ayrıca ektopik myc üretimi sessiz hücreleri bölünmeye sevk etmektedir (3, 14, 18, 19, 24, 34, 78).

C-myc ile kanser arasındaki ilişki in vivo ve in vitro çalışmalarla açıklanmaya çalışılmaktadır. Fakat c-myc bağımlı transformasyonun moleküler hücresel mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Bugünkü araştırmalar ile c-myc'in hücre döngüsü, metabolik olaylar, apoptoz ve genomik instabilitedeki rolleri tespit edilmiştir.

Myc'in yer aldığı hücresel olaylar ve etkileştiği moleküller şekil 2.3'te verilmiştir (3, 16, 18, 19, 24).



Şekil 2-3: Myc-Max kompleksinin yer aldığı hücresel olaylar ve etkileştiği moleküller (14).

2.3.1.1. Normal hücre gelişimi ve proliferasyonunda myc'in rolü

Normal hücrelerde c-myc geninin ifadesi; büyüme faktörleri, ekstrasellüler matriks etkileşimleri gibi dış kaynaklı sinyallerin yanında ayrıca hücre döngüsü ile de kontrol altındadır. Dinlenme halinde olan hücre, çok az miktarda c-myc proteinini üretir. Oysa büyüme faktörü ile uyarılmış hücrede ani bir c-myc proteinin üretiminde artışı olur. Sonra üretim bazal seviyesine iner. Öte yandan normal hücrede gerçekleşen anormal ya da ektopik myc proteinin üretimi, p19/p14ARF ve p53 bağımlı hücre ölümü yolunu aktive ederek bu hücreyi organizmadan uzaklaştırılıp meydana gelebilecek ölümcül kanserleşme önlenmiş olur (3, 14).

Düzenli c-myc proteinin üretimi, normal embriyogenez ve hücresel proliferasyonu için gereklidir. Fare embriyolarında yapılan çalışmalarda, homolog rekombinasyonla myc allelleri alınan farelerin gelişimin erken evresinde hematopoez yokluğundan öldükleri gözlenmiştir.

Myc ailesinden olan n-myc, normal hücre gelişimi için yetersiz olmakla beraber homozigot delesyonu ise embriyo için öldürücüdür. L- myc'in homozigot delesyonu ise gelişimi etkilememektedir.

C-myc'nin pleiotropik transkripsiyonel etkisiyle, fizyolojik hücre büyümesini, proliferasyonunu ve hücre metabolizmayı düzenlemektedir (3, 18, 19, 24).

2.3.1.2. Myc ilişkili hücre döngüsü ve genomik instabilite

Hücre döngüsünün düzenlenmesi ve kontrolü, normal hücrelerin büyüme ve differansiasyonun yanında tümör gelişiminde de önemli roller oynamaktadır. Hücre döngüsünü düzenleyen ve kontrol eden proteinler, döngünün belli aşamalarında işlev gören ve birbirleri ile olan etkileşimleri yoluyla, pozitif ve/veya negatif düzenleyici etki göstererek, döngünün ilerlemesini ya da kısıtlanmasını sağlayan proteinlerdir. Siklin bağımlı kinazla inhibitörleri hücre döngüsünün negatif kontrolünden sorumludurlar. Hücre döngüsü ilerlemesini ve devamını sağlayan siklinlerin, katalitik partneri olan siklin bağımlı kinazlar (Cdk) tarafından kontrol edilmektedir. Düzenli olarak kontrol edilmeyen Cdk aktivitesi, artmış hücre çoğalmasına ve genomik instabiliteye neden olmaktadır. Bu durum; hücrenin ölümsüzlük kazanması veya kanserleşmesi ile sonuçlanır (23, 77).

C-myc hücre döngüsünde rol alan bahsedilen moleküller ile etkileşerek döngünün düzenlenmesine katılmaktadır. Siklin bağımlı kinaz inhibitörü p27, c-myc'in hedef moleküllerinden biridir. Myc, p27'nin seviyesini ya da aktivesini azaltmaktadır. Myc, siklinD2 ve CDK4'ü indükler ve p27'yi siklinE/CDK2'den ayırmaktadır (14, 24, 77).

İyi bir şekilde düzenlenen hücre döngüsü, DNA replike olmadan önce oluşan bir hasar varsa tamir eder. Hasarlı olan hücrenin proliferasyonu; yeni mutasyonlar, kromozom sayı ve yapı anomalileri gibi genomik instabiliteye yol açmaktadır. Myc aktivasyonu, DNA hasarı olan hücreyi sentez fazına sokabilir. Reaktif oksijen hasarı olan hücrede eğer myc regülasyonu bozulmuşsa p53 aracılı DNA hasar cevabı gerçekleştirilemez ve hasarlı genoma sahip hücre döngüsüne devam etmiş olur. Yani myc'in onkogenik aktivasyonu, hasar kontrol noktalarını atlanarak döngüsün ilerlemesine ve DNA hasarının devam etmesine neden olmaktadır (14, 77).

2.3.1.3. Myc aracılı apoptoz

Burkitt lenfomada yapılan morfolojik incelemelerde, ortamda fazla piknotik çekirdeğin görülmesi patologların dikkatini çekmiştir. Bu durum hücrelerin hem mitotik indeksinin hem de apoptoz hızının yüksek olduğunu göstermektedir (14).

C-myc'in apoptozu indüklediği, ilk önce IL-3 bağımlı 32d.3 miyeloid progenitör hücre serilerinde fark edilmiştir. IL-3 yokluğunda c-myc üretimi, hücrenin siklusa girmesine engel olarak ölüm hızını arttırmaktadır. Aşırı c-myc proteini üretimi yapan fibroblastlar düşük serum, hipoksi ve hipoglisemi gibi çevresel stres etkenlerine cevap olarak apoptoza giderler (14).

C-myc'in ektopik üretimi p53 ve p19/ARF aktivasyonuna ve indirek olarak da ARF'yi etkilemektedir. ARF'nin artması p53'ün büyümeyi engelleyici ve apoptoz başlatıcı aktivitesini ortaya çıkarmaktadır (14).

C-myc'in hedef genleri arasında olan ODC, LDH-A, p53 ve cdc25 myc ilişkili apoptoza katılmaktadır. ODC, LDHA enzimleri, büyüme faktörlerinin ve glukozun azalmasına karşı hücreleri hassas hale getirerek apoptozu uyarmaktadır. Ayrıca apoptoz kaskadındaki FasL, Fas gibi moleküllerini de etkilemektedir. Myc geni knock out edilmiş fare lenfositlerinde, Fas ve FasL'nin üretilmediği gözlenmiştir. Bu moleküllerin üretilmemesi lenfositlerde apoptozu engelleyerek hücrenin ömrünü uzatmaktadır (14, 24).

2.3.1.4. Myc'in uyardığı ölümsüzlük

Telomerez, proliferen olan hücrelerde üretilen ribonükleik bir proteindir. Bu enzim telomer uzunluğunun sabit kalmasını sağlayan enzimdir. Myc, telomerazın katalitik alt ünitesi olan insan telomerez ters transkriptazı (HTERT-human telomerase reverse transcriptase) aktive ederek normal ve kanser hücresinde kromozom bütünlüğünü koruyarak hücrelerin ömrünü uzatmakta rol almaktadır (14, 24, 32).

2.3.1.5. Myc'im metabolik fonksiyonları

Hücrenin proliferen olabilmesi için enerjiye ve biyosentetik substratlara ihtiyacı vardır. Eğer proliferasyon hızlanacaksa metabolik hız da artmalıdır (14).

Ribozomal biyogeneizde görev alan nükleolin ve nükleofosmin BN51 gibi proteinler myc'e cevap olarak üretilen proteinlerdir. Translasyonda yer alan bazı genlerde myc'in hedef genleri arasındadır. Bunlar eIF2a, eIF3b, eIF4E, eIF4G, eIF5A translasyonel elongasyon faktör EF- 2, amino asit taşıyıcısı ECA39'dir (14, 24).

Hücre sentez fazına girmeden önce glikolitik metabolizmada belirgin bir artış gözlenir. Birçok kanser tipinde glikozun hücre içine alınımında artış ve laktat üretimi gözlenir. Buna warburg etkisi denir. Ayrıca LDH artışı da gözlenmektedir ve bu durum birçok kanserde kötü prognoz göstergesidir. C-myc LDH-A'yı direk regüle etmesinin

yanında ayrıca GLUT1, fosfofruktokinaz ve enolazA'nın üretimini de başlatmaktadır (19, 24).

Bazı tümörler, damarlanma olmadığında hipoksi ile karşı karşıya kalır. Fakat hücrenin çoğalabilmesi ve yaşamına devam edebilmek için oksijene ve enerjiye ihtiyacı vardır. Hipoksinin indüklediği transkripsiyon faktörü HIF1, c-myc'in LDHA promotörü tarafından tanınır. HIF1, bütün glikolitik enzimleri kodlayan genlerin aktivasyonundan sorumludur. HIF1 aktivitesindeki artış, hücrelerin hipoksiye karşı fizyolojik cevabıdır. HIF1 aracılı metabolik cevap ile c-myc, tümör hücrelerinin glikoliz aktivasyonu ile hipoksiye adapte olmalarını sağlar. C-myc'in glikolizi indüklemesinin yanında siklofilin, VDAC, sitokromC ve hem oksijenaz1 gibi mitokondriyal fonksiyonu olan genleri de etkilemektedir. Dolayısıyla c-myc oksijen bağımlı ve oksijen bağımsız metabolizmalar arasındaki dengede rol almış olur (19, 23, 24, 27).

2.3.1.6. Hücresel adezyon ve farklılaşma

Hücresel farklılaşmanın temel taşı; hücre-hücre ve hücre-ekstrasellüler matriks etkileşimine aracılık eden özel hücre yüzey moleküllerinin üretimidir. Normal hücrelerde dış etkenler tanınır ve kontak inhibisyon gerçekleşirken, transforme hücreler dış etkenlerden bağımsız proliferasyon olabilirler (14, 19).

Lenfositlerdeki azalmış LFA1 üretimi c-myc üretimi ile ilişkilendirilmiştir. Adezyondan sorumlu olan LFA1(leukocyte function associated antigen1), lenfositler arasındaki homotipik etkileşimden sorumludur. Azalmış LFA1 üretimi, c-myc yeniden düzenlenmelerinin sıkça görüldüğü Burkitt lenfomada gözlenmektedir (14, 19, 24).

Anjiyogeneze negatif düzenleme etkisi olan matrix ilişkili bir protein olan Trombospondin c-myc'in hedef moleküllerden biridir. In vivo çalışmalarda c-myc'in damar endotelial büyüme faktörünü (VEGF-vascular endothelial growth factor) uyardığı bildirilmiştir. Embriyonal süreçte ve yara tamirinde myc fizyolojik olarak üretilerek anjiyogeneze katılmaktadır. Ayrıca c-myc'nin tümör dokusunda da anjiyogeneze yardımcı olduğu bilinmektedir (14, 19, 24).

2.3.2. Myc'in onkogenik aktivasyon mekanizmaları

İnsanda kanser gelişimine sebep olabilecek c-myc gen aktivasyonu çeşitli yollarla gerçekleşmektedir (78).

Kromozomal translokasyonlar: Burkitt lenfomada; c-myc geni translokasyon sonucunda immunoglobulin genlerini yakına yerleşir ve B lenfositler transkripsiyonel

olarak aktif hale gelir. Böylece B hücrelerde aktif olan regülatör elementler sayesinde, c-myc'in üretim seviyesinde artış gözlenir ve bu durum B hücreli kanser gelişimine neden olmaktadır (15, 25, 30, 53, 56, 57, 72, 79, 87)

İmmünoglobulin ağır zinciri intron enhancerı ile bağlı olan c-myc'i taşıyan farelerde klonal B hücreli kanserler gözlenmiştir. Ayrıca lenfoblastik hücreler EBV ile ölümsüzleştirip, konstitütif c-myc geni transfekte edildiğin de tümörojenik hale geldiği bildirilmiştir (14, 24).

Transloke olmuş c-myc allellerinde bazen nokta mutasyonları ve delesyon şeklinde dizi değişimleri de görülmektedir. Transloke olan allel immünoglobulin lokusunda bulunmaktadır. Çoğu mutasyon regülasyonda önemli bölgeler olan ekzon1'deki 2. promotörün yakınında ya da ekzon1-intron1 sınırında meydana gelmektedir (19, 25, 49, 53, 57, 72).

C-myc'nin immünoglobulin ya da T hücre reseptörleriyle yaptıkları translokasyonların Burkitt lenfomada, B hücreli ve T hücreli ALL'de tümör gelişimide birincil olay olduğuna inanılmaktadır (49, 53, 57, 72, 94).

Bu anomaliler kompleks translokasyonları ve insersiyonları içerir ve muhtemelen immünoglobulin lokusunun VDJ(variable diversity joining) segmentinde ya da sınıf switch rekombinasyonda ya da somatik hipermutasyonda hataya yol açmaktadır (19, 25, 53, 54, 72).

Myc geninin katıldığı başlıca translokasyonlar; t(8;14)(q24;q32), t(2;8)(p12;q24), t(8;22)(q24;q11) olarak sıralanabilir (30). Myc geninin katıldığı translokasyonların %75'i t(8;14), %10'u t(8;22), %5'i ise t(2;8)'dir. Bu translokasyonların görüldüğü hastalıklar Tablo 2.4'te verilmektedir. Şekil 2.4'te kromozom 8'in karıştığı translokasyonların çeşitli bant teknikleri kullanılarak yapılan karyogram görüntüleri gösterilmektedir (38, 49, 53, 57, 72).

Tablo 2-4: C-myc'in katıldığı translokasyonlar ve ilişkili hastalıklar (14).

Translokasyonlar	Katılan genler	Görülen Hastalık
t(8;14)(q24;q32)	c-myc/IgH	Akut lenfoblastik lösemi, Burkitt lenfoma, Diffüz büyük hücreli lenfomalar, Multipl Myelom
t(2;8)(p12;q24)	Igκ/c-myc	Akut lenfoblastik lösemi, Burkitt lenfoma, Multipl Myelom
t(8;22)(q24;q11)	c-myc/Igλ	Akut lenfoblastik lösemi, Burkitt lenfoma, Multipl Myelom
t(8;14)(q24;q11)	c-myc/TCRαβ	T hücreli akut lenfoblastik lösemi

Şekil 2-4: Kromozom 8'in katıldığı translokasyonların karyogramı: Üst sırada; solda ve ortada t(2;8)(p12;q24)'ün G-bantlı ve sağda R-bantlı karyogramı. Orta sırada; solda t(8;14)(q24;q32)'ün G-bantlı, ortada ve sağda R-bantlı karyogramı. Alt sırada; solda ve ortada t(8;22)(q24;q11)'ün G-bantlı, sağda R-bantlı karyogramı (43).

Bazı T-ALL vakalarında myc geni, T hücre reseptör lokusuna transloke olabilir

Translokasyon, c-myc'de meydana geldiği kırık noktalarına göre sınıflandırılmıştır.

Sınıf 1'de kırılma noktası myc'in ekzon 1 ve intron 1 arasında yer alır. Genin bütünlüğü bozulmuştur. Kodlayan 2. ve 3. ekzon bozulmamıştır.

Sınıf 2'de, kırık genin 5' ucuyla ekzon1 arasında olur.

Sınıf 3'de, kırık noktası genin 5' ucundan biraz uzaktadır. Genin bütünlüğü bozulmamıştır.

Sınıf1 ve sınıf2 kırık noktaları sonucunda c-myc'in regülatör bölgesinin bütünlüğü bozulmaktadır. Fakat bu durum malign transformasyon oluşması için tek başına yeterli değildir (19, 24, 36).

Gen amplifikasyonları: Myc geninin kopya sayısının artması transkripsiyonun artmasına sebep olur. Örneğin nöroblastomada hücre başına 200 kadar N-myc kopyası bulunmaktadır. Ayrıca akciğer kanserinde 50 den fazla Cmyc, N-myc, L-myc gen kopyası bulunabilmektedir. Artmış myc transkripsiyonu insan kolon ve meme kanserinde de gözlenmektedir.

APC genini inaktive eden mutasyonlar: Myc onkogeni APC/β-katenin/TCFyolağının önemli bir hedef genidir(15). APC, B-katenine bağlanarak inaktivasyonuna neden olur. APC genini inaktive eden mutasyonlar β -kateninin

anormal birikimine neden olmaktadır. Biriken β - katenin TCF4'e bağlanır ve böylece myc gibi bazı genlerin transkripsiyonel aktivasyonuna neden olmaktadır.

3' UTR dizisinin kaybolması: Bu durum myc'in aşırı üretimine yol açmaktadır.

Bir retrovirüsün myc genine ya da yakınına yerleşmesi; üretim seviyesinde değişikliğe neden olur (16, 19, 78).

2.4. ALL'de KROMOZOM İNCELEME YÖNTEMLERİ

Kalıtsal bilgiyi taşıyan DNA molekülü ökaryotlar da nukleusta bulunmaktadır. Hücre interfaz aşamasında iken bu materyal, histon ve histon olmayan proteinlerle kromatin yapıyı oluşturur. Hücre bölünürken kromatin yapı kısalıp kalınlaşarak kromozomları meydana getirir. Kromozomlar metafaz safhasında incelemeye uygun hale gelirler (28, 59).

Karyotipleme; kromozomların yapısal olarak incelenmesi, anomalilerinin belirlenebilmesi için yapılan işleme karyotipleme denir. Kromozomların yapısını fonksiyonlarını, davranışlarını ve patolojilerini inceleyen bilim dalı sitogenetiktir. Geniş bir uygulama alanı bulunsa da sitogenetik analizinin gerektiren koşullar olmalıdır. Karyotipleme, tanı ve takibinde belirleyici kromozom anomalilerinin görüldüğü kanserler, özellikle hematolojik kanserlerin belirlenmesi için uygulanmaktadır (20, 50, 59).

Nukleusu olan ve bölünebilme yeteneğini kaybetmemiş tüm dokulardan kromozom elde edilebilir. Kromozom analizi için en çok kullanılan dokular; perifer kanı, deri, kemik iliği, amniyositler ve koryon villus dokusudur. Metafaz kromozomlarının eldesi için temel olarak iki yöntem kullanılır;

1- Direkt yöntem: Kemik iliği, lenf nodülü, testis, koryon villus gibi kendiliğinden bölünen hücreye sahip olan dokulara uygulanır.

2- Kültür yöntemi: Çalışılacak materyaldeki hücreler spontan olarak bölünmüyorsa, kültür yapılması gerekmektedir. Perifer kan lenfositleri, amniyositler, deri fibroblastları, gonad dokularına uygulanmaktadır. Bu amaçla protein, vitamin, hormon ve minerallerle zenginleştirilmiş besi ortamları (medyum) kullanılır. Kullanılacak materyal besi ortamı seçiminde ve kültür süresinde etkilidir. Kısa süreli (örneğin perifer kan lenfosit kültürü için 72 saatlik) veya uzun süreli(örneğin; amniyosit kültürleri birkaç hafta veya solid tümör örnekleri birkaç ay) olmak üzere sınıflandırılmıştır (65).

Postnatal kromozom anomalilerini tespit etmek için kullanılan perifer kan çalışmalarında, öncelikle heparinli steril enjektör veya vakumlu tüpler içine örnek alınır. Örnekler taşıma ve bekleme süresinde kesinlikle dondurulmamalı, oda ısısında veya +4°C’de tutulmalıdır. Kültür ortamında, mikroorganizmaların çoğalmasını önlemek için Penisilin/Streptomisin gibi antibiyotikler ve nistatin vb fungusitler bulunmalıdır (20).

Spontan olarak bölünmeyen bazı hücreleri (örneğin olgun lenfositleri) bölünmeye teşvik etmek için ortama mitojen ajan koymak gerekir. Bu amaçla PHA (phytohemaglutinin) ilave edilir. Perifer kanı lenfositleri için kültür süresi 72 saat, kemik iliğinden elde edilen lenfositler için 24 saattir. Kültürler 37°C’de inkübe edilir ve kültür süresi örnek çeşidine göre değişir. Direk yöntem ve kültür yöntemiyle çalışılan örneklerden, metafazları saptamak için çıkış işlemlerinin yapılması gerekir. Burada ilk adım hücre bölünmesinin metafaz aşamasında hücrelerin durdurulmasıdır. En sık kullanılan mitoz durdurucusu kolşisindir ve etkisini iki yavru hücreye ayrılan kardeş kromatidlerin zıt kutuplara çekilmesini sağlayan iğ iplikçiklerinin oluşumunu engelleyerek gösterir. Sonuç olarak kromozomların kutuplara çekilmesi önlenerek metafaz plağında birikmeleri sağlanır. Çıkış işlemlerinde ikinci temel basamak hücre hacmini arttırmak için hipotonik solüsyon uygulanmasıdır. Hipotonik solüsyonlar sitoplazmik membrana karşı bir konsantrasyon gradienti oluşturur ve aktif transportla su hücre içine girer, hücreler şişer ve kromozomlar yayılacak alan bulurlar. Bu amaçla hipotonik 0,075M KCl solüsyonu kullanılır. Kromozom elde etme yönteminde üçüncü temel basamak hücrelerin fiksasyonudur. Fiksatif olarak 3:1 oranında metanol:asetik asit solüsyonu kullanılır. Fiksasyon uygulanması hipotonik solüsyonun etkisini durdurur, şişen hücreler sabitlenir ve ayrıca eritrositleri parçalar. Çıkış işlemlerinin son basamağı lam üzerine damlatılarak yayma yapılmasıdır. Daha sonra boyama ve bantlama işlemleri gerçekleştirilerek mikroskopta incelenir (65).

Kromozom inceleme yöntemleri; sitogenetik ve moleküler sitogenetik yöntemleri içermektedir.

2.4.1. Sitogenetik yöntemler

Kromozomlarda meydana gelen yapısal ve sayısal anomalileri tespit etmek için her kromozomu tanımlamak amacıyla çok sayıda kromozom bantlama yöntemi geliştirilmiştir. Rutin incelemelerde genelde 450-550 band düzeyindeki metafazlar kullanılmaktadır. Band rezolüsyonu, X kromozomunu içeren bir haploid sette görülen

açık ve koyu renk bölgelerin toplam sayısını ifade etmektedir. Band düzeyleri, küçük kromozom parçalarının kayıp ve artışlarının saptanmasında yeterli olmayabilir. Bu durumda daha yüksek band seviyelerinde(550-850) inceleme yapılması gerekmektedir.

Genel olarak G bantlama yöntemiyle inceleme yapılır, amaca yönelik olarak Q, R, C, HRB gibi yöntemler de kullanılmaktadır (9, 59, 65).

2.4.2. Moleküler sitogenetik yöntemler

Kanserli olgularda sitogenetik inceleme yapmak için tümör dokusuna ihtiyaç vardır. Örneğin lösemili olgularda kromozom analizi, kemik iliği aspirasyon materyalindeki lenfositlerden ya da perifer kanı lenfositlerinden yapılmaktadır. Klasik bantlama yöntemlerinde analizin metafaz kromozomlarından yapılması ve bu olgularda yeterli ve kaliteli metafaz elde edilememesi moleküler sitogenetik tekniklerin gelişmesine sebep olmuştur (63, 89, 93).

Moleküler sitogenetik teknikler, konvansiyonel sitogenetik analizler ile belirlenemeyen ya da çözümlenemeyen kompleks, kriptik ve submikroskobik yeniden düzenlenmelerin saptanmasını sağlar (9, 63).

- 1- Fluoresan In Situ Hibridizasyon(FISH)
Metafaz FISH, Interfaz FISH, Reverse FISH, Multi Color FISH, PRINS, Fiber FISH
- 2- Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon(CGH)
- 3- DNA Array

Lösemi genetiğinde en sık kullanılan moleküler sitogenetik teknik floresan in situ hibridizasyon tekniğidir (48).

FISH

Kromozomal anomalilerin araştırılması için genel olarak yapılan 400-550 bant seviyesinde sitogenetik inceleme ile 5 Mb'dan küçük anomalileri tespit etmek mümkün değildir. FISH yöntemiyle, DNA problemleri kullanarak küçük kromozom anomalileri tespit edilebilir. 3 Mb üzerinde olan anomalilerde ise bantlamanın yeterince belirgin olmadığı bir bölge söz konusuysa araştırılan kromozomal değişiklik yine gözden kaçabilmektedir (9, 10, 70, 86, 96).

In situ hibridizasyon (melezleme), nükleik asit dizilerinin (DNA ve RNA) morfolojik olarak korunmuş kromozomlar, hücreler veya doku kesitlerinde saptanarak gösterilmesini sağlayan ve temel olarak çift iplikli nükleik asit oluşumu

kinetiğini kullanan güçlü bir tekniktir. Bu yöntemin diğer melezleme yöntemlerinden (Southern ve Northern Blot) farkı nükleik asitlerin kendi hücresel ortamlarında tanınarak gösterilmesidir. Böylece hedef nükleik asit dizisinin hücredeki yeri belirlenmiş olur (9, 10, 70).

FISH yöntemi tanı ve araştırma amaçla kullanılabilir (48).

Belirli bir kromozomal bölgenin veya DNA kesiminin FISH yöntemi ile görünür hale gelebilmesi için o bölgeye spesifik bir probun kullanılması gerekir. FISH yönteminde hedef DNA/RNA molekülüne komplementer işaretli nükleik asit dizisine “prob” denir. Problar haptenler, florokromlar, enzimler veya kolloidal altın ile işaretli olabilirler. Ancak bugün pratik olmaları ve ticari olarak bulunabilmeleri nedeniyle direkt ve florokromlarla işaretli problemler kullanılmaktadır (10).

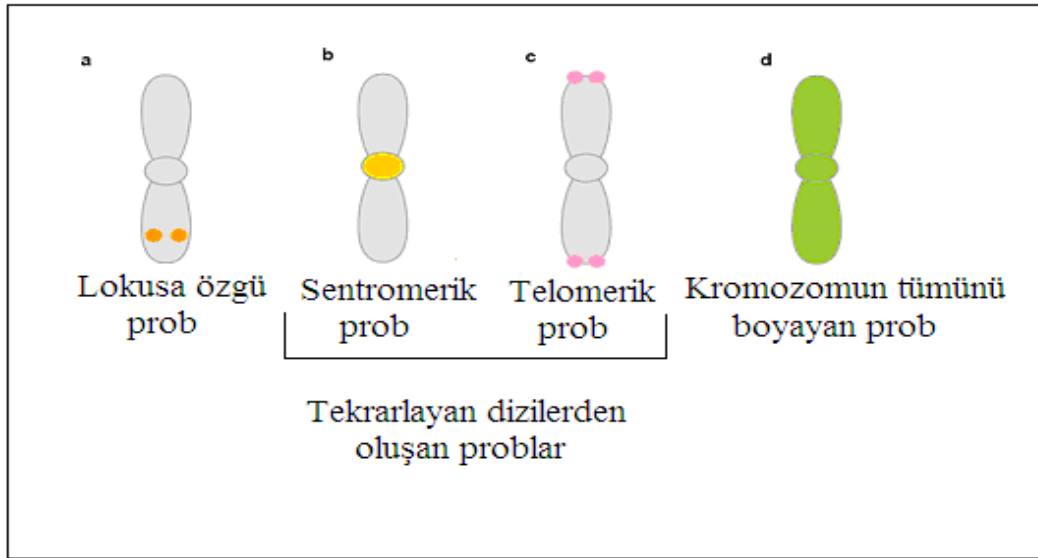
Aranan anomalinin doğru bir şekilde tespit edilebilmesi için amaca uygun prob seçimi çok önemlidir. Problemler; hedef bölgelerine ve sinyal paternlerine göre gruplara ayrılmıştır. Hedef bölgelerine göre 4 sınıfta toplanır (10, 61).

1- **Lokusa özgü problemler:** Yaklaşık 15-500kb uzunluğundaki problemlerdir. Araştırılan genin bulunduğu lokusa ait DNA dizisini içerir. İnterfaz nuklesuna ve metafaz kromozomlarına uygulanabilir. Bilinen mikrodelsiyon ve duplikasyon sendromlarının tanısında ayrıca translokasyon ve inversiyon gibi kromozom anomilerindeki kırık noktalarının tespitinde kullanılır.

2- **Tekrarlayan dizilerden oluşan problemler (sentromerik veya telomerik problemler):** Alfa satellitler; kromozomların sentromerlerine özgün tekrarlayan dizilerdir. Bu dizileri taşıyan problemler sentromerlerin tespitinde kullanılır. Beta satellit problemler; perisentrik heterokromatin bölgelere, akrosentrik kromozomlara ve 9. kromozoma özgüdür. Klasik satellit problemler ise AATGG tekrar dizileri ile bağlantılı olarak 1, 9, 15 ve 16. kromozomların perisentrik heterokromatin bölgelerine ve Y kromozomunun uzun koluna özgün dizilerdir.

3- **Telomerik problemler:** Toplam 2-15 kb uzunluğunda 5'-TTAGGG-3' tekrarlarından oluşan telomer dizilerine özgü problemlerdir.

4- **Kromozomun tümünü veya belirli bir bölgesini boyayan problemler (painting veya whole chromosome painting):** Belirli bir kromozomda bulunan çeşitli DNA dizilerine homolog olan prob karışımından oluşmuş problemlerdir. Ayrıca kromozomun p ve q kolunu ayrı renklerde görünmesini sağlayan problemlerde bu gruba dahildir (9, 10, 61).



Şekil 2-5: FISH yönteminde kullanılan prob çeşitleri: a) Özel nükleotid dizilerine bağlanan lokusa özgü prob, b) Sentromerlerdeki tekrarlayan dizilere bağlanan sentromerik prob, c) Telomerdeki TTAGG tekrar dizilerine bağlanan telomerik prob, d) Kromozomun tümüne komplementer olan kromozomun tümünü boyayan prob (61).

Sinyal paternine göre tasarlanmış problemler ise lokusa özgü (tek spot), translokasyon ve kırık noktası yeniden düzenlenme (break apart rearrangement) problemleri olarak sıralabilir.

Bu problemler kullanım şekilleri ve özelliklerine göre tek ve/veya çift renkli, prob setlerinde ise üç ve/veya beş farklı renkle işaretli olabilirler (61).

FISH yönteminin rezolusyonu konvansiyonel sitogenetiğe göre daha yüksektir. Bölünen ve bölünemeyen hücrelere uygulanabilir ve kültür her zaman gerekli değildir. Bu yönleriyle FISH, lösemi sitogenetiğinde sıkça kullanılan bir yöntem haline gelmiştir (63, 86, 98).

ALL olgularında gözlenen Myc geni yeniden düzenlemeleri iki renkli Myc Breakapart DNA probunun kullanıldığı FISH yöntemi uygulanarak tanımlanmaktadır. Yeşil ve kırmızı işaretli 2 probun karışımıyla hazırlanan Myc probu uygulanan, normal kromozom 8'de kırmızı- yeşil sinyal bir arada görülürken, Myc bölgesinde oluşan yeniden düzenlemelerde sinyaller birbirinden ayrılmaktadır. Bu DNA probu hem interfaz hem de metafaz hücrelerine uygulanabilmektedir (42, 45, 92)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Örnek

Çalışma, 2007-2009 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Çalışma grubu, İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi İç Hastalıklar Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı, İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Pediatrik Hematoloji-Onkoloji Bilim Dalı, İ.Ü Tıp Fakültesi İç Hastalıklar Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı ve İ.Ü Tıp Fakültesi Pediatrik Hematoloji-Onkoloji Bilim Dalı'nda akut lenfoblastik lösemi (ALL) tanısı konulmuş hastalardan oluşturuldu.

Olgular 14'ü(%56) çocuk, 11'i(%44) yetişkin olmak üzere toplam 25 hastadan oluşmaktadır. 6 hastadan birden fazla kez materyal alınmak üzere toplam 33 kemik iliği ve/veya perifer kan örneği çalışıldı.

Çalışmayı oluşturan olgu grubunda fenotipini bilinmeyen ALL tanılı 9 (%36), B- ALL tanılı 12 (%48) , T-ALL tanılı 4 hasta(%16) bulunmaktadır.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 26.09.2007 tarihli 26183 sayılı kararı ile onaylandı.

3.2. Yöntem

Bu yüksek lisans tezi İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilimdalı Sitogenetik Laboratuarında yürütülmüştür.

Olguların metafaz kromozomlarını incelemek için G-bantlama, myc gen bölgesindeki yeniden düzenlenmeleri araştırmak amacıyla FISH yöntemi uygulandı.

Çalışmada kemik iliği aspirasyon materyaline 24 saatlik kemik iliği kültürü, perifer kan örneklerine ise Moorhead ve arkadaşları tarafından geliştirilen 72 saatlik kültür yöntemi modifiye edilerek uygulanmıştır. Karyotipleme için G bantlama ve myc geni yeniden düzenlenmeleri tespit etmek amacıyla myc breakapart(kırık noktası yeniden düzenlenme) prob kullanılarak floresan in situ hibridizasyon tekniği uygulanmıştır.

3.2.1. Kullanılan solüsyonlar ve malzemeler

3.2.1.1. Kemik iliği kültüründe kullanılan solüsyonlar

Kültür medyum

RPMI 1640 w/o PHT hazır medyum 5'er ml'lik vidalı kapaklı tüplere bölünerek kullanıma hazır hale getirildi.

Kolsemid

10µg/ml'lik çözelti

ONC(over night colcemid)

0,5ml kolsemid+ 5ml RPMI 1640 w/o PHT medyum

Hipotonik solüsyon

0,75M KCl çözeltisi

Carnoy Fiksatif

3:1 Metanol: Asetik Asit

3.2.1.2. Perifer kanı kültüründe kullanılan solüsyonlar

Kültür medyum

RPMI 1640 w/w PHT hazır medyum 5'er ml'lik vidalı kapaklı tüplere bölünerek kullanıma hazır hale getirildi.

Kolsemid

10µg/ml'lik çözelti

Hipotonik solüsyon

0,75M KCl çözeltisi

Carnoy Fiksatif

3:1 Metanol: Asetik Asit

3.2.1.3 GTL bant yönteminde kullanılan solüsyonlar

Tripsin

0,001g toz tripsin 50ml salin içinde çözüldü.

Salin

4,5gr NaCl 500ml distile su içinde çözüldü.

Buffer

0,025M KH_2PO_4 çözeltisi. pH 6.8'e ayarlandı.

Leishman Boyası

Stok solüsyon: 0.3g Leishman boyası 200ml metanol içinde 70 °C'de bir gece karıştırılarak çözüldü.

Kullanım solüsyonu: 1:5 stok solüsyon: buffer

3.2.1.3. FISH yönteminde kullanılan solüsyonlar

20xSSC

43,8gr NaCl

22,05gr $\text{triNaCitrat.2H}_2\text{O}$

Distile suyla 250ml'ye tamamlandı.

pH 7'ye ayarlandı.

2xSSC

50ml 20xSSC

450ml distile su eklendi.

pH 7'ye ayarlandı.

0,4xSSC

10ml 20xSSC

490ml distile su eklendi.

pH 7'ye ayarlandı.

Etanol Serileri

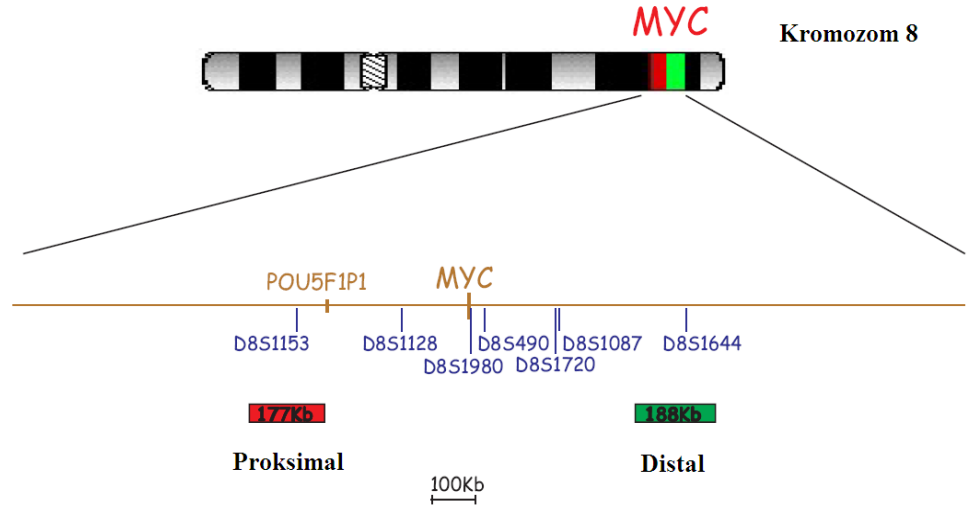
%70'lik : 70ml etanol, 30ml dH₂O

%85'lik : 85ml etanol, 15ml dH₂O

%100'lük: 100ml etanol

FISH Probu

FITC ve Texas Red ile işaretlenmiş 8q24'te bulunan myc genine özgü kırık noktası yeniden düzenlenme FISH probu kullanıldı (Cytocell myc breakapart prob). Probun şematik resmi Şekil 3.1'de gösterilmiştir



Şekil 3-1: Myc Breakapart probunun şematik resmi. Breakapart probu, kırmızı ve yeşil renkli iki farklı probdan oluşmaktadır. Problar birbirinden 717Kb uzaklıkta olup myc'in katıldığı 3 translokasyonun kırık bölgelerini de içermektedir. Kırmızı işaretli proksimal prob 177Kb uzunluğunda ve myc geninin 3' ucundan 332Kb uzakta, yeşil işaretli distal prob ise 188Kb uzunluğunda ve myc geninin 5' ucundan 380kb uzaktadır (45).

3.2.1.4. Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri

- Termometre
- Hotplate (Selecta)
- Nem Cihazı(Sinbo)
- Santrifüj(Omnispin)

- Vorteks (Velp)
- Digital saat (Marienfeld)
- Derin dondurucu (Arçelik)
- Buzdolabı (Bosch)
- Ayarlanabilir mikropipet (Eppendorf)
- Pastör pipeti (LP Italiana SPA)
- Ben Mari (Kotterman)
- Kültür tüpü (Greiner)
- PCR tüpü (Eppendorf)
- pH Sticks (ISO LAB)
- Etüv (Mettler)
- Hassas terazi (Shimadzu)
- Buffer solüsyonu (Merck)
- Enjektör (Injekt)
- Watman40 kurutma kağıdı
- ThermoBrite (StatSpin)
- Kettle (King)
- Işık mikroskobu (Nikon)
- Floresan mikroskobu

3.2.2. Yöntemler

3.2.2.1. Kemik İliği Kültürü

Kültürde vasat ortamı olarak, mitotik ajan içermeyen hazır medyum RPMI 1640 kullanıldı. Medyum 5'er ml'lik vidalı tüplere bölünerek her bir hasta için 2 tüpe 0.3ml heparinize kemik iliği materyali ilave edilerek ekim yapıldı. Tüpler 37°C'lik etüvlere koyuldu. Kemik iliği ekimi yapılan 1. tüpe ekimden hemen sonra 100µl ONC(over night colcemid= tüm gece kolsemid) ilave edildi. 2. tüpe ise ekimi takip eden 22. saatte

hücreleri metafazda durdurmak amacıyla, iğ ipliklerini bloke eden 100µl Colcemid (Colchicin) eklendi ve 2 saat etüvde bekletildi. 24. saatte hücreler santrifüj edildi ve hipotonik şok için 0.75M KCL ile muamele edildi ve 20dk etüvde bekletildi. Daha sonra yine santrifüj edilen hücreler 3:1 oranında Carnoy fiksatif ile fikse edildi. Fiksatifle yıkama işlemi sitoplazma artıklarını ve parçalanmış hücreleri temizlemek amacıyla 3 kez tekrarlandı.

3.2.2.2. Perifer Kanı Kültürü

Kültürde vasat ortamı olarak, mitotik ajan içeren hazır medyum RPMI 1640 kullanıldı. Medyum 5'er ml'lik vidalı tüplere bölünerek her bir hasta için 2 tüpe 0.3ml heparinize perifer kanı ilave edilerek ekim yapıldı. Tüpler 37°C'lik etüvlere koyuldu. Ekimi takip eden 70. saatte hücreleri metafazda durdurmak amacıyla, iğ ipliklerini bloke eden 100µl Colcemid (Colchicin) ilave edildi ve 2 saat etüvde bekletildi. 72. saatte hücreler santrifüj edildi ve hipotonik şok için 0.75M KCL ile muamele edildi ve 10dk etüvde bekletildi. Daha sonra yine santrifüj edilen hücreler 3:1 oranında Carnoy fiksatif ile fikse edildi. Fiksatifle yıkama işlemi sitoplazma artıklarını ve parçalanmış hücreleri temizlemek amacıyla 3 kez tekrarlandı (65).

3.2.2.3. Preparatların hazırlanması

Son yıkamayı takiben santrifüj edilen tüplerdeki süpernatant atılıp, dipte kalan pelletten birkaç damla temiz lama damlatıldı. Sonra üstüne 1-2 damla fiksatif damlatılıp havada kurumaya bırakıldı. Preparatlar kuruduktan sonra 90°C'lik ısıtıcı üstünde 2 saat yaşlandırıldı

3.2.2.4. GTL bantlama

Yaşlandırılan preparat sırayla tripsin, salin ve tampon çözeltilerinden geçirildi. her bantlama işleminde tripsin süresi yeniden düzenlendi. En son tampondan çıkarılan preparat yaklaşık 90 sn leishman boyası kullanım solüsyonu ile boyandı.

3.2.3. Mikroskop incelemesi

Hazırlanan preparatlar, Nikon Eclipse E600 W ışık mikroskopunda incelendi. Analiz edilen metafazlar ISCN 1995 ve 2005'e göre değerlendirildi (64, 80). Metafazlar otomatik görüntüleme (Applied Imaging-Powergene) sisteminde fotoğraflandı. Bu çalışmada her hastadan metafaz miktarına ve kalitesine bağlı olarak 3- 35 metafaz plağı analiz edildi.

3.2.4. FISH Yöntemi

Preparat hazırlığı

Preparatlar, denatürasyonun yapılacağı gün GTL bantlama yöntemindeki gibi yayılıp hazırlandı. Kuruyan preparat oda sıcaklığında 2dk 2xSSC ile muamele edildi. Ardından sırayla %70, 85, 100'lük etanol serilerinden geçirildi. Oda sıcaklığında preparatlar kurutuldu.

Prob Hazırlığı

Oda sıcaklığındaki 10µl prob ependorfa alınıp 37°C'de 30 dk su banyosunda bekletildi.

Preperat ve lamel 37°C'de 30dk ısıtıcı üzerinde bekletildi.

Denatürasyon

Karanlık ortamda prob, preparatın belli bir kısmına koyuldu ve lamelle kapatılıp etrafına hava almayacak şekilde yapıştırıcı uygulandı. Ardından 74°C'de 5 dk ısıtıcı üstünde denature edildi.

Hibridizasyon

37°C'deki hibridizasyon fırınında 16-17 saat inkübe edilerek hibridizasyon gerçekleştirildi.

Hibridizasyon Sonrası İşlemler

Preparat 72°C 0,4xSSC'de 1 dk, ardından oda sıcaklığındaki 2xSSC'de 30 sn yıkandı. Preparatın üstüne 10 µl DAPI antifade eklenerek lamelle kapatıldı.

3.2.6 Görüntüleme

Preparatlar floresan mikroskopunda inceleninceye kadar +4°C'de ışık almayan kutu içinde saklandı. İnterfazların taranması, Nikon Eclipse E600 W floresan mikroskopunda 100X objektif'te DAPI/FITC/Rodamin üçlü filtre kullanılarak gerçekleştirildi ve Applied Imaging Powergene otomatik görüntüleme sistemi ile fotoğraflandı

Sinyallerin değerlendirmesi

Her hasta için 200 interfaz nukleusu ve bazı hastalarda gözlenebilen metafazlar değerlendirmeye alındı. Nukleus sınırları belirgin olan, sinyalin gl olduğu ve net görülebildiği hücreler değerlendirildi. Mikroskobun ince ayarı kullanılarak farklı derinliklerde bulunan sinyallerin görünmesi sağlandı. İki sinyal arasındaki mesafe bir füzyon sinyali kadar ya da daha az ise füzyon sinyali, eğer mesafe bir füzyon sinyalinden fazla ise ayrılmış olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesinde yürütülen bu yüksek lisans tezinde akut lenfoblastik lösemi tanısı konmuş yetişkin ve çocuktan oluşan 25 hastadan alınan kemik iliği aspirasyon materyaline kemik iliği kültürü, G- bantlama ve myc geni yeniden düzenlenmeleri tespit etmek amacıyla Fluoresan In Situ Hibridizasyon tekniği uygulanmıştır.

Olgular 14'ü(%56) çocuk, 11'i(%44) yetişkin olmak üzere toplam 25 farklı hastadan oluşmaktadır. 6 hastadan birden fazla kez materyal alınmak üzere toplam 33 G bantlı ve FISH analizi yapıldı. 33 analizin 31'i kemik iliği aspirasyon materyalinden, 2'si perifer kanından yapıldı.

Fenotipini bilmediğimiz ALL tanısı ile gelen 9 (%36), B- ALL tanısıyla gelen 12 (%48) , T-ALL tanısı ile gelen 4 hasta(%16) bulunmaktadır. B-ALL tanısı ile gelen hastaların 2'si pre B-ALL, 2'si common B-ALL tanısı ile gelmiştir.

FAB sınıflaması bilinen 7 hastanın 3'ü L1, 3'ü L2 ve 1'i de L3 tanılıdır. 18 hastanın morfolojik sınıflandırma bilgisi bilinmemektedir.

Olgu grubumuzu oluşturan 25 hastanın 33 materyalinde yapılan G bantlama sonucunda 29 materyalde metafaz elde edilip analiz edilirken 4'ünde yeterli sayıda ve kalitede metafaz elde edilemedi. Kültürü yapılan 33 materyale ait bilgiler Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

G bantlama yapılan 29 materyalin 13'ünde sayısal ve/veya yapısal anomaliye rastlanmazken 12'sinde hipodiplodi, 3'ünde hiperdiploidi ve 1'inde psödodiploidi görüldü.

Sayısal ve/veya yapısal anomaliye rastlanan 16 olgu materyalinin 8'inde sadece sayısal, 4'ünde sadece yapısal ve 4'ünde ise hem sayısal hem de yapısal anomaliye rastlandı.

Gözlenen klonal sayı anomalileri; 3, 5, 11, 14, 17, 18, 21 ve 22. kromozomların trizomisi ve 1, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 16, 17, 19, 20, 21, 22 ve Y kromozomların monozomisidir.

Tüm olgulardan FISH analizi sonucu elde edildi. 33 materyale yapılan FISH analizinde ise 8 nolu kromozomu tutan sayısal ve/veya yapısal anomalinin görülmediği

olguya rastlanmamıştır. Sadece sayısal anomalinin görüldüğü 2, hem sayısal hem de yapısal anomalinin görüldüğü 31 olgu materyali bulunmaktadır. Olguların FISH sonuçlarının yorumları Tablo 4.2’de verilmiştir.

Sayısal anomali olarak değerlendirdiğimiz myc kaybı 31 olgu materyalinde, myc artışı 21 olgu materyalinde görüldü. Yapısal anomaliler olarak yeniden düzenlenme sonucunda oluşan der(8) bulgusu olgu materyallerinin 25’inde, del(dis) 11’inde, del(pro) ise 18’inde gözlenmiştir. Aynı hastada bu anomalilerin biri/ bir kaçı ya da hepsi gözlenmiştir. Olgularda FISH analizi ile saptanan sayısal ve yapısal anomaliler ile gözlendiği hücre sayıları Tablo 4.3’te verilmiştir.

	Metafaz kromozomları	İnterfaz nukleusu	Sinyal paterni
2 adet normal (myc geninde yeniden düzenlenme meydana gelmemiş) kromozom 8'i temsil eden 2 füzyon sinyali			2F
1 adet normal kromozom 8'i temsil eden füzyon sinyali ile bir yeniden düzenlenme sonucunda diğer füzyon sinyalinin ayrılmasıyla oluşan 1 kırmızı ve 1 yeşil sinyal			1F1K1Y
1 adet normal kromozom 8'i temsil eden füzyon sinyali ile myc geninin distalinde delesyonu sonucu kalan 1 kırmızı sinyal			1F1K
1 adet normal kromozom 8'i temsil eden füzyon sinyali, yeniden düzenlenme meydana gelen 2. kromozom 8'i temsil eden 1 yeşil ile 1 kırmızı sinyal ve myc geninin distalinde delesyonu meydana gelen 3. kromozom 8'i temsil eden 1 kırmızı sinyal			1F2K1Y
1 adet normal kromozom 8'i temsil eden füzyon sinyali ve myc genini içeren amplifikasyonun meydana geldiği 2. kromozom 8'de bulunan ekstra füzyon sinyalleri			1F ve amplifikasyon
1 adet normal kromozom 8'i temsil eden füzyon sinyali ve myc geninin proksimalini içeren amplifikasyonun meydana geldiği 2. kromozom 8'de bulunan ekstra kırmızı sinyaller			1F ve kırmızı sinyalin amplifikasyonu
2 adet normal kromozom 8'i temsil eden füzyon sinyalleri ve myc genini içeren amplifikasyonu gösteren ekstra füzyon sinyalleri			2F ve ekstrakromozomal amplifikasyon
2 adet normal kromozom 8'i temsil eden füzyon sinyalleri ve myc geninin proksimalini içeren amplifikasyonu gösteren ekstra kırmızı sinyaller			2F ve kırmızı sinyalin ekstrakromozomal amplifikasyonu

Şekil 4-1: FISH analizinde metafaz kromozomlarında ve interfaz nukleusunda sinyal görünümleri ve değerlendirmeleri (94).

Tablo 4.1'deki ve Tablo 4.2'deki sinyal şekilleri ve yorumları Şekil 4.1'de gösterildiği şekilde yorumlanmıştır.

Tablo 4-1: G bantlama ve FISH sonuçları

Hasta No	Ad Soyad	Yaş Cinsiyet	Tanı	G Bantlama	FISH Sonuçları (MYC)
1	F.A	44y/E	ALL	46,XY[16]	2F(184), 2F(3met), 1F(9), 3F(3), 4F(2), 2F1Y1K(1), 2Y2K(1)
1°	F.A	45y/E	ALL	46,XY[22]	2F(190), 1F(6), 3F(1), 5F(1), 1F1K1Y(2)
2	A.A	11y/K	ALL	47~53,XX,add(1)(q42)[20],+11[15], add(11)(q23)[18], -13[3],+14[8], +17[6], +21[10], +21[5], +22[2], +mar1[3], +mar2[2], +mar3[2][cp20]	2F(194), 2F(1met), 1F(2), 4F(2), 3F1K(1)
3	M.M.G	7y/E	ALL	DMB	2F(180), 1F1K1Y(8), 1F(10), 1F1Y(1),1K1Y(1), 3F(2)
4	H.Ü	1ay/K	Common B-ALL	38~42,XX,-15[cp3]/46,XX[16]	2F(167), 2F(1 met), 1F(23), 1F1K(2), 1K(1), 1Y1K(1), 2F1Y(1),4F(1), 3F(2), 2K(1)
5	S.Ç	28y/E	B-ALL	38~45,XY,-4[4],-6[4],-7[3],-8[3],-13[3], -16[3],-19[4],-20[3][cp11]/46,XY[10]	2F(188), 1K1Y(1), 2F1K(1), 1F(9), 3F(1)
5°	S.Ç	28y/E	B-ALL	36~45,XY,-Y[5],-1[5],-4[3],-9[3],-10[5], -13[4],-19[5][cp13]/92,XXYY[2]/ 46,XY[13]	2F(185), 1F1Y1K(7), 4F(2), 3F(1), 1Y2K(1), 2F1K(3), 2F1Y(1)
5°°	S.Ç	28y/E	B-ALL	46,XY[16]	2F(193), 1F1K1Y(5), 2Y2K(2), 1F(1)
6	A.Ö	32y/K	B-ALL	41~46,XX,add(11)(q25)[3],-17[4], -21[9],+mar1[9],+mar2[8][cp9] /46,XX[3]	2F(188), 1F(3), 1F1Y(5), 1F1K1Y(3), 1K1Y(1)

6°	A.Ö	32y/K	B-ALL	42~45,XX,-12[cp4]/92,XXXX[2]/ 46,XX[18]	2F(133), 1F(5), 1F1K1Y(14), 4F(1), 1F1Y(1), 2F1Y(1), 2Y1K(3), 3F1K1Y(1), 1F1K(1), 3F1Y(1)
6°°	A.Ö	32y/K	B-ALL	46,XX[22]	2F(169), 1F1K1Y(15), 1F(6), 2F1K1Y(1), 4F(2), 2F2Y1K(1), 2F1Y(1)
7	D.M	31y/E	T-ALL	DMB	2F(174), 1F(20), 1F1Y(2), 2Y(1), 1Y1K(1), 1Y(1), 2Y1K(1)
7°	D.M	31y/E	T-ALL	42~46,XY,-21[cp3]/46,XY[29]	2F(187), 2F(11met), 1F(1), 2F1K(1)
8	S.G	54y/ K	B-ALL	DMB	2F(197), 1F(3)
8°	S.G	54y/ K	Common B-ALL- L2	45,XX,t(9;22)(q34;q11)[cp2]/46,XX[16]	2F(192), 1F(6), 4F(1), 2F1K(1)
9	S.G	24y/K	ALL-L2	92,XXXX[2]/46,XX[17]	2F(194), 2F(2met), 1F(2), 1F1K(1), 2Y(1)
10	C.E.A	6y/E	ALL- L1	46,XY[27]	2F(191), 1F(4), 1F1Y(2), 1F1K(2), 3F(1)
11	A.M.Y	16y/E	B-ALL	46,XY[29]	2F(183), 2F(2met), 1F1K1Y(3), 1F1Y(4), 1F(6), 2F2Y(1), 1F1K(1)
12	S.S	27y/E	B-ALL L3	40~46,XY,dup(1)(q23q32)[25], del(6)(q23)[3],t(8;14)(q24;q32)[21] [cp25]	2F(141), 1F1K1Y(42), 1F(9),1F1Y(3), 1Y2K(1),1F2Y1K(2), 1Y1K(2)
13	E.A	18y/E	ALL-L1	46,XY[20]	2F(189), 1F1K(2), 2F(1met), 1F1Y1K(2), 1F(6)
14	A.B.H	7y/E	ALL-L1	46~60,<2n>,XY,+5[2],+11[2],+17[2], +18[2],+21[2],+22[2],+mar[2][cp3]/ 46,XY[20]	2F(191), 1F(9)
15	C.T.Ç	22y/E	T-ALL	46,XY[3]	2F(190), 1F(5), 1F1K1Y(4), 2F1K(2), 2Y2K(1), 3F(1)

16	Ş.S	10y/K	T-ALL	46,XX[19]	2F(146), 1F1K1Y(6), 2F1K(6+1met), 2F2K(7), 2F1Y2K(3), 2F2Y(1), 3F1K1Y(1), 4F(2), 2F1Y(7), 3F1Y(1), 1F1Y2K(2), 2F1Y1K(1met), 1F(6), 1F1K(1), 1F1K(1met), 2F2Y3K(1),1F2Y(1), 2Fçok sayıda yeşil
17	E.S	22y/E	B-ALL	46,XY,t(4;6)(q35;q24)[4]/46,XY[12]	2F(181),2F(1met), 3F1K(1), 1F(1), 1F1K1Y(3), 1F1K2Y(1), 2Y2K(1), 2F2K(4), 2F1Y1K(1met), 2F1Y1K(1), 2F3Y(1), 1F1Y(1), 2F2Y(1), 3F1Y(1), 3F(1)
18	F.B	13y/E	T-ALL	46,XY[18]	2F(185), 1F1Y1K(6), 3F1Y1K(1), 2F1Y(2), 1F(5), 3F(1met)
19	B.K	11y/E	Pre-B ALL L2	44~46,XY,-21 [cp3]/46,XY[19]	2F(183), 2F(4met), 1F1K1Y(5), 2F1K(2), 4F(2), 1F(4)
20	Y.E.S	23ay/E	ALL	46,XY[15]	2F(190), 1F(7), 1F1Y(3)
21	E.L	26y/E	B-ALL	DMB	2F(177), 1F(9), 1F1K(1), 1F1Y(7), 2F1Y(1), 1F1K1Y(3), 2Y(2)
21°	E.L	28y/E	B-ALL	46,XY[17]	2F(190), 1F(6), 2K2Y(1), 2F1K(1), 1F1K1Y(2)
22	Y.B	15y/E	ALL	38~45,XY,-22[cp3]/46,XY[18]	2F(173), 3F(3), 1F(14), 2F1Y(2), 1F1K1Y(2), 1F1K(1), 1F1Y(1), 12F(1), 1Y1K(1), 2F2K(1), 1F2Y1K(1)
23	E.A	20y/K	B-ALL	46,XX[17]	2F(178), 2F(2met), 1F(4), 3F(3), 4F(4), 1F1K1Y(6), 2F1K(1), 2K2Y(1), 5F1K1Y(1)
24	H.K	4y/E	B-ALL	45~46,XY,+3[2],del(3)(q13q23)[2], del(9)(q11q21)[4],+mar[2][cp5]/ 46,XY[16]	2F(191), 3F(4), 4F(3), 1F1Y1K(1), 2Y2K(1)
25	B.K	17y/K	Pre B-ALL	39~45,XX,add(6)(q12)[cp2]/46,XX[1]	2F(195), 1F(1), 1F1Y1K(2), 4F1Y(1), 2F1Y(1)

FISH yorumlarında; F(Füzyon), K(Kırmızı sinyal), Y(Yeşil Sinyal), met(Metafaz), gözlenen hücre sayısı (), DMB (Değerlendirilecek metafaz bulunamadı) , E(erkek), K(kız), y(yaş) kısaltmaları ile ifade edildi.

Tablo 4-2: Olguların G bantlama sonuçları ve FISH sonuçlarına göre myc geninin yorumlanması

Hasta No	Ad Soyad	G-bantlama (karyotip)	FISH sonuçlarının göre myc geninin yorumlanması
1	F.A	46,XY[16]	187N;-myc[9];+myc[3];+mycx2[2];+der(8)x1[1];der(8)x2[1]
1°	F.A	46,XY[22]	190N;-myc[6];+myc[1];+mycx3[1];der(8)[2]
2	A.A	47~53,XX,add(1)(q42)[20],+11[15], add(11)(q23)[18],-13[3],+14[8], +17[6],+21[10],+21[5],+22[2], +mar1[3], +mar2[2], mar3[2][cp20]	195N; -myc[2]; +mycx2[2]; +myc,+del(dist)[1]
3	M.M.G	DMB	180N; der(8)x1[8]; -myc[10];del(pro)[1]; der(8)[1],+myc[2]
4	H.Ü	38~42,XX,-15[cp3]/46,XX[16]	168N;-myc[23];del(dis)[2];-myc,del(dis)[1];-myc,der(8)[1];+del(pro)[1];+mycx2[1]; +myc[2];del(dis)x2[1]
5	S.Ç	38~45,XY,-4[4],-6[4],-7[3],-8[3],- 13[3],-16[3],-19[4],-20[3][cp11]/ 46,XY[10]	188N;-myc,der(8)[1];+del(dis)[1];-myc[9];+myc[1]
5°	S.Ç	36~45,XY,-Y[5],-1[5],-4[3],-9[3],- 10[5],-13[4],-19[5][cp13]/ 92,XXYY[2]/46,XY[13]	185N;der(8)[7];+mycx2[2];+myc[1];der(8), del(dis)[1] ;+del(dis)[3];+del(pro)[1]
5°°	S.Ç	46,XY[16]	193N;der(8)[5];der(8)x2[2];-myc[1]

6	A.Ö	41~46,XX,add(11)(q25)[3],-17[4], -21[9],+mar1[9],+mar2[8][cp9]/ 46,XX[3]	188N;-myc[3];del(pro)[5];der(8)[3];-myc,der(8)[1]
6°	A.Ö	42~45,XX,-12[cp4]/92,XXXX[2]/ 46,XX[18]	133N;-myc[5];der(8)[14];+mycx2[1]; del(pro)[1]; +del(dis)[1]; der(8),del(pro)[3]; +myc,+der(8)[1];del(dis)[1]; +myc,+del(pro)
6°°	A.Ö	46,XX[22]	169N;der(8)[15];-myc[6];+der(8)[1];+mycx2[2]; +der(8),+del(pro)[1];+del(pro)[1]
7	D.M	DMB	174N;-myc[20];del(pro)[2];del(pro)x2[1];-myc,der(8)[1];-myc,del(pro)[1];der(8),del(pro)[1]
7°	D.M	42~46,XY,-21[cp3]/46,XY[29]	198N;-myc[1];+del(pro)[1]
8	S.G	DMB	197N,-myc[3]
8°	S.G	45,XX,t(9;22)(q34;q11)[cp2]/46,XX [16]	192N;-myc[6];+mycx2[1];+del(dis)[1]
9	S.G	92,XXXX[2]/46,XX[17]	196N; -myc[2];del(dis)[1];del(pro)x2[1]
10	C.E.A	46,XY[27]	191N;-myc[4];del(pro)[2];del(dis)[2];+myc[1]
11	A.M.Y	46,XY[29]	185N;der(8)[3];del(pro)[4];-myc[6];+del(pro)x2[1];del(dis)[1]
12	S.S	40~46,XY,dup(1)(q23q32)[25], del(6)(q23)[3],t(8;14)(q24;q32)[21][cp25]	141N;der(8)[42];-myc[9];del(pro)[3];der(8),del(dis)[1];der(8),+del(pro)[2];-myc,der(8)[2]
13	E.A	46,XY[20]	190N;del(dis)[2];der(8)[2];-myc[6]

14	A.B.H	46~60,<2n>,XY,+5[2],+11[2], +17[2],+18[2],+21[2],+22[2], +mar[2][cp3]/	191N;-myc[9]
15	C.T.Ç	46,XY[3]	190N;-myc[5];der(8)[4];+del(dis)[2];der(8)x2[1];+myc[1]
16	Ş.S	46,XX[19]	146N;der(8)[6];+del(dis)[7];+del(dis)x2[10]; +der(8),+del(dis)[3]; +del(pro)x2[1]; +myc,+der(8)[1]; +myc,+myc[2];+del(pro)[7];+myc,+del(pro)[1];der(8),+del(dis)[2];+der(8)[1];-myc[6]; del(pro)[1]; del(dis)[2]; +der(8)x2,+del(dis)[1]; del(pro),+del(pro)[1];+del(dis)[3];çok sayıda del(pro)[1]
17	E.S	46,XY,t(4;6)(q35;q24)[4]/ 46,XY[12]	182N;+myc,+del(dis)[1];-myc[1];der(8)[3];der(8),+del(pro)[1];der(8)x2[1]; +del(dis)x2[4];+der(8)[2];+del(pro)x3[1];del(pro)[1]; +del(pro)x2[1];+8,+del(pro)[1]; +myc[1]
18	F.B	46,XY[18]	185N;der(8)[6];+myc,+der(8)[1];+del(pro)[2],-myc[5];+myc[1 met]
19	B.K	44~46,XY,-21 [cp3]/46,XY[19]	187N;der(8)[5];+del(dis)[2];+mycx2[2];-myc[4]
20	Y.E.S	46,XY[15]	190N;-myc[7];del(pro)[3]
21	E.L	DMB	177N;-myc[9];del(dis)[1];del(pro)[7];+del(pro)[1];der(8)[3];del(pro)x2[2]
21°	E.L	46,XY[17]	190N;-myc[6];der(8)x2[1];+del(dis)[1];der(8)[2]
22	Y.B	38~45,XY,-22[cp3]/46,XY[18]	173N;+myc[3];-myc[14]; +del(pro)[2]; der(8)[2]; del(dis)[1]; del(pro)[1]; +mycx10[1];-8,der(8)[1]; +del(dis)x2[1];der(8),+del(pro)[1]

23	E.A	46,XX[17]	180N;-myc[4];+myc[3];+mycx2[4];der(8)[6];+del(dis)[1];der(8)x2[1];+mycx3,+der(8)[1]
24	H.K	45~46,XY,+3[2],del(3)(q13q23)[2], del(9)(q11q21)[4],+mar[2][cp5]/46, XY[16]	191N;+myc[4];+mycx2[3];der(8)[1];der(8)x2[1]
25	B.K	39~45,XX,add(6)(q12)[cp2]/46,XX[1]	195N;-myc[1];der(8)[2]; +mycx2+del(pro)[1]; +del(pro)[1]

FISH yorumlarında; N: normal 2 tane myc geni, der(8): derivatif kromozom 8, del(dis): distaldeki delesyon, del(pro): proksimaldeki delesyon , []: gözlenen hücre sayısı kısaltmalarıyla ifade edildi

Tablo 4-3: Myc breakpart probu ile yapılan FISH analizi sonucunda elde edilen veriler

Olgu No	Myc açısından normal	Myc kaybı	Myc artışı	der(8) Yeniden düzenlenme	del(dis)	del(pro)
1	187	9	6	3	-	-
1°	190	6	2	2	-	-
2	195	2	3	-	1	-
3	180	11	2	9	-	1
4	168	25	4	1	4	1
5	188	10	2	1	1	-
5°	185	-	6	8	4	1
5°°	193	1	-	7	-	-
6	188	4	-	4	-	5
6°	133	5	4	18	1	6
6°°	169	6	5	17	-	2
7	174	22	-	2	-	5
7°	198	1	1	-	1	-
8	197	3	-	-	-	-
8°	192	6	2	-	1	-
9	196	2	-	-	1	1
10	191	4	1	-	2	2
11	185	6	1	3	1	5
12	141	11	2	47	1	5
13	190	6	-	2	2	-
14	191	9	-	-	-	-
15	190	5	3	5	2	-
16	146	6	34	14	22	11
17	182	1	9	7	5	5
18	186	5	3	7	-	2
19	187	4	2	5	2	-
20	190	7	-	-	-	3
21	177	9	1	3	1	10
21°	190	6	1	3	1	-
22	173	15	8	4	2	4
23	180	4	9	8	1	-
24	191	-	7	2	-	-
25	195	1	2	2	-	2

4.1. Olguların G bantlama ve FISH değerlendirmeleri

Olgu 1: ALL tanısı konmuş 44 yaşında erkek hastadan farklı zamanlarda 2 kemik iliği aspirasyon materyali alındığından Olgu 1 ve 1° olarak adlandırıldı. İlk alınan materyalden(olgu 1) elde edilen G bantlama sonucunda 16 metafazda 46,XY karyotipi gözlemlendi. FISH analizinde 187 hücre 8q24'te bulunan myc geni açısından normal, 9 hücrede myc kaybı, 6 hücrede myc artışı, 3 hücrede myc gen bölgesinde meydana gelen yeniden düzenlenme sonucu oluşan der(8) gözlemlendi. Olgu 1°de yapılan G bantlı incelemede 22 metafazda 46, XY karyotipi tespit edildi. FISH sonucunda; 190 hücrede myc geni açısından normal 6 hücrede myc kaybı, 2 hücrede myc artışı ve 2 hücrede der(8) gözlemlendi.

Olgu 2: ALL tanısı almış 11 yaşında bir kız çocukta yapılan G bantlama sonucunda kompleks bir karyotip gözlemlenmiştir. 20 metafazda yapılan incelemede 47-53 arasında değişen kromozom sayısı ile 13. kromozomun monozomisi ve 11,14, 17, 21, 22 kromozomların trizomisi görüldü. Ayrıca marker kromozomlar da gözlemlendi. Gözlenen yapısal anomaliler ise add(1)(q42) ve add(11)(q23)'tür. FISH sonuçları; 195 hücre myc geni açısından normal, 2 hücrede myc kaybı, 3 hücrede myc artışı ve 1 hücrede distali delesyona uğramış myc geni taşıyan 8 nolu kromozom bulunmaktadır.

Olgu 3: ALL tanılı 7 yaşında bir erkek çocukta yapılan G bantlı analiz için yeterli sayıda metafaz elde edilememiştir. Yapılan FISH sonucunda, 180 hücre myc geni açısından normal, 11 hücrede myc kaybı, 2 hücrede myc artışı, 9 hücrede der(8) ve 1 hücrede proksimali delesyona uğramış myc geni taşıyan 8 nolu kromozom bulunmaktadır.

Olgu 4: 1 aylık, common B-ALL tanısı alan kız çocukta yapılan G bantlı analiz sonucunda değerlendirilen toplam 19 metafazın 3'ünde 38-42 arasında değişen hipodiploid karyotip gözlemlendi. Klonal sayı anomalisi olarak monozomi 15 tespit edildi. 16 metafazda ise 46, XX karyotipi gözlemlendi. FISH sonuçlarında ise 168 hücre myc geni açısından normal, 25 hücrede myc kaybı, 4 hücrede myc artışı, 1 hücrede der(8), 1 hücrede proksimali delesyona uğramış myc geni taşıyan 8 nolu kromozom ve 4 hücrede distali delesyona uğramış myc geni taşıyan 8 nolu kromozom bulunmaktadır.

Olgu 5: 28 yaşında B-ALL tanılı erkek hastadan 3 kez kemik iliği aspirasyon materyali alındı ve olgu 5, olgu 5° ve olgu 5° ° olarak adlandırıldı. İlk alınan materyalden(olgu 5) elde edilen G bantlı analiz sonucunda değerlendirilen 21 metafazın 11'inde 38-45 arasında değişen hipodiploid metafazda 4, 6, 7, 8, 13, 16, 19 ve 20 nolu

kromozomların monozomisi gözlendi. 10 metafazda ise 46,XY karyotipi gözlendi. FISH sonuçlarında ise; 188 hücrede myc geni açısından normal, 10 hücrede myc kaybı, 2 hücrede myc artışı, 1 hücrede der(8) ve 1 hücrede distali delesyona uğrayan myc genini taşıyan 8 nolu kromozom tespit edilmiştir. Olgu 5° elde edilen G bantlı analizinde değerlendirilen 28 metafazın 13'ünde 36-45 arasında değişen hipodiploid metafazda 1, 4, 9, 10, 13, 19 ve Y kromozomunun monozomisi gözlendi. Ayrıca 2 metafazda 92,XXYY karyotipi görüldü. 13 metafazda ise 46, XY yapısı tespit edildi. FISH analizinde; 185 hücre myc geni açısından normal, 6 hücrede myc artışı, 8 hücrede der(8), 4 hücrede distali delesyona uğramış myc geni taşıyan 8 nolu kromozom ve 1 hücrede proksimali delesyona uğramış myc geni taşıyan 8 nolu kromozom tespit edildi. Olgu 5°°de yapılan G bantlı analizde incelenen 16 metafazda sayısal ya da yapısal hiçbir anomaliye rastlanmazken FISH analizinde 193 hücre myc geni açısından normal, 1 hücrede myc kaybı ve 7 hücrede der(8), görüldü.

Olgu 6: B-ALL tanılı 32 yaşında kadın hastadan 3 kez kemik iliği materyali alındı (olgu 6, 6° ve 6°°). İlk alınan materyalden(olgu 6) elde edilen G bantlı analizde değerlendirilen 12 metafazın 9'unda sayısı 41-46 arasında değişen hipodiploid ve psödodiploid metafazlar görüldü. Bu metafazlarda 17 ve 21. kromozomların monozomisi, marker kromozomlar gözlendi. Ayrıca add(11)(q25) yapısal anomalişi tespit edildi. 3 metafazda ise 46, XX yapısı saptandı. FISH analizinde 188 hücre myc geni açısından normal, 4 hücrede myc kaybı, 4 hücrede der(8) ve 5 hücrede proksimali delesyona uğramış myc geni taşıyan 8 nolu kromozom görüldü. Olgu 6°da yapılan G bantlı analizde değerlendirilen 24 metafazın 4'ünde 42- 45 arasında değişen hipodiploid metafazda monozomi 12 klonal sayı anomalişi görüldü. 2 metafazda 92,XXXX şeklinde poliploidi ve 18 metafazda 46, XX karyotipi saptandı. FISH sonuçlarında; 133 hücre myc geni açısından normal, 5 hücrede myc kaybı, 4 hücrede myc artışı, 18 hücrede der(8), 6 hücrede proksimali delesyona uğramış myc geni taşıyan 8 nolu kromozom ve 1 hücrede distali delesyona uğramış myc geni taşıyan 8 nolu kromozom gözlendi. Olgu 6°°da yapılan G bantlı analizde incelenen 22 metafazda da sayısal veya yapısal anomaliye rastlanmadı. FISH analizinde ise 169 hücre myc geni açısından normal, 6 hücrede myc kaybı, 5 hücrede myc artışı, 17 hücrede der(8) ve 2 hücrede proksimali delesyona uğramış myc geni taşıyan 8 nolu kromozom gözlendi.

Olgu 7: T-ALL tanısı almış 31 yaşında erkek olan hastadan ilki perifer kanı ikincisi kemik iliği aspirasyon materyali olmak üzere 2 kez materyal alındı (olgu 7 ve

7°). İlk materyalde(olgu 7) G bantlı analiz için yeterli sayıda metafaz elde edilemedi. FISH sonuçlarında; 174 hücre myc geni açısından normal, 22 hücrede myc kaybı, 2 hücrede der(8) ve 5 hücrede proksimali delesyona uğramış myc geni taşıyan 8 nolu kromozom gözlendi. 2. materyalinden yapılan G bantlı analizde değerlendirilen 32 metafazın 3'ünde 42-46 arasında gözlenen hipodiploid ve psödodiploid metafazlar da monozomi 21 görüldü. 29 metafazda ise sayısal ve yapısal anomali gözlenmedi. FISH analizinde; 198 hücre myc açısından normal, 1 hücrede myc kaybı, 1 hücrede myc artışı ve 1 hücrede distali delesyona uğramış myc geni taşıyan 8 nolu kromozom gözlendi.

Olgu 8: 54 yaşında common B-ALL tanılı kadın hastadan iki kez kemik iliği aspirasyon materyali alındı (olgu 8 ve 8°). İlk alınan materyalde G bantlama için yeterli sayıda metafaz elde edilemedi. FISH analizinde ise 197 hücre myc açısından normal, 3 hücrede myc kaybı gözlendi. Olgu 8°de yapılan G bantlamada değerlendirilen 18 metafazın 2'sinde t(9;22)(q34;q11) anomalisi ve 16'sında 46,XX karyotipi gözlendi. FISH analizinde; 192 hücre myc geni açısından normal, 6 hücrede myc kaybı, 2 hücrede myc artışı ve 1 hücrede distali delesyona uğramış myc geni taşıyan 8 nolu kromozom gözlendi.

Olgu 9: 24 yaşında ALL-L2 tanılı kadında yapılan G bantlı analizde incelenen 19 metafazın 2'sinde 92,XXXX, 17'sinde yapısal ve sayısal anomali gözlenmedi. FISH sonucunda; 196 hücre myc geni açısından normal, 2 hücrede myc kaybı, 1 hücrede 1 distali delesyona uğramış myc geni taşıyan 8 nolu kromozom ve 1 hücrede proksimali delesyona uğramış myc geni taşıyan 8 nolu kromozom gözlendi.

Olgu 10: 6 yaşında ALL-L1 tanılı erkekte yapılan G bantlı analizde 27 metafazda 46,XY karyotipi gözlendi. FISH analizinde; 191 hücre myc geni açısından normal, 4 hücrede myc kaybı, 1 hücrede myc artışı, 2 hücrede proksimali delesyona uğramış myc geni taşıyan 8 nolu kromozom ve 2 hücrede distali delesyona uğramış myc geni taşıyan 8 nolu kromozom, gözlendi.

Olgu 11: 16 yaşında B-ALL tanılı erkekte yapılan G bantlı analizde incelenen 29 metafazda yapısal ve sayısal anomali saptanmadı. FISH analizinde; 185 hücre myc geni açısından normal, 6 hücrede myc kaybı, 1 hücrede myc artışı, 3 hücrede der(8), 5 hücrede proksimali delesyona uğramış myc geni taşıyan 8 nolu kromozom ve 1 hücrede distali delesyona uğramış myc geni taşıyan 8 nolu kromozom gözlendi.

Olgu 12: 27 yaşında B-ALL L3 tanılı erkekte yapılan G bantlı analizde değerlendirilen 25 metafazda dup(1)(q23q32) ,del(6)(q23) ve t(8;14)(q24;q32) yapısal

anomalileri saptandı. Ayrıca klonal olmayan sayı anomalileri de görüldü. FISH analizinde 141 hücrede myc geni açısından normal, 11 hücrede myc kaybı, 2 hücrede myc artışı, 47 hücrede der(8), 5 hücrede proksimali delesyona uğramış myc geni taşıyan 8 nolu kromozom ve 1 hücrede distali delesyona uğramış myc geni taşıyan 8 nolu kromozom gözlendi.

Olgu 13: 18 yaşında ALL-L1 tanısı alan erkekte yapılan G bantlı analizde değerlendirilen 20 metafazda sayısal veya yapısal anomali saptanmadı. FISH analizinde; 190 hücre myc geni açısından normal, 6 hücrede myc kaybı, 2 hücrede der(8) ve 2 hücrede distali delesyona uğramış myc geni taşıyan 8 nolu kromozom saptandı.

Olgu 14: 7 yaşında ALL-L1 tanılı erkekte yapılan G bantlamada değerlendirilen 23 metafazın 3'ünde 46-60 arasında değişen hiperdiploid metafazlarda 5, 11, 17, 18, 21 ve 22. kromozomun trizomileri ve marker kromozomlar gözlendi. 20 metafazda ise 46, XY yapısı saptandı. FISH analizinde ise 191 hücrede myc geni açısından normal, 9 hücrede myc kaybı gözlendi.

Olgu 15: 22 yaşında T-ALL tanılı erkekte yapılan G bantlı analizde değerlendirilen 3 metafazda 46,XY karyotipi saptandı. FISH analizinde 190 hücre myc geni açısından normal, 5 hücrede myc kaybı, 3 hücrede myc artışı, 5 hücrede der(8) ve 2 hücrede distali delesyona uğramış myc geni taşıyan 8 nolu kromozom gözlendi.

Olgu 16: 10 yaşında T-ALL tanılı kızda yapılan G bantlı analiz sonucunda değerlendirilen 19 metafazda 46,XX karyotipi gözlendi. FISH analizinde; 146 hücre myc geni açısından normal, 6 hücrede myc kaybı, 34 hücrede myc artışı, 1, 14 hücrede der(8), 22 hücrede distali delesyona uğramış myc geni taşıyan 8 nolu kromozom ve 11 hücrede proksimali delesyona uğramış myc geni taşıyan 8 nolu kromozom gözlendi. Ayrıca bu olguda normal sinyalden daha küçük kırmızı ve yeşil sinyaller gözlendi. Bu sinyallerin nedeni, probun ilgili bölgesinin amplifikasyonu sebebiyle ya da FISH işleminin herhangi bir aşamasında meydana gelebilecek teknik bir problemten kaynaklanabileceği düşünüldü.

Olgu 17: 2 yaşında B-ALL tanılı erkekte yapılan G bantlı analizde değerlendirilen 16 metafazın 4'ünde t(4;6)(q35;q24) yapısal anomalisi ve 12 metafazda 46,XY karyotipi gözlendi. FISH analizinde 182 hücre myc geni açısından normal, 1 hücrede myc kaybı, 9 hücrede myc artışı, 7 hücrede der(8), 5 hücrede distali delesyona

uğramış myc geni taşıyan 8 nolu kromozom ve 5 hücrede proksimali delesyona uğramış myc geni taşıyan 8 nolu kromozom gözlendi.

Olgu 18: 13 yaşında T-ALL tanılı erkekte yapılan G bantlama sonucunda değerlendirilen 18 metafazda 46, XY karyotipi gözlendi. FISH sonucunda 185 hücrede myc geni açısından normal, 5 hücrede myc kaybı, 3 hücrede myc artışı, 7 hücrede der(8) ve 2 hücrede proksimali delesyona uğramış myc geni taşıyan 8 nolu kromozom, gözlendi.

Olgu 19: 11 yaşında pre B-ALL tanılı erkekte yapılan G bantlamada değerlendirilen 22 metafazın 3'ünde monozomi 21, 19 metafazda 46,XY karyotipi gözlendi. FISH analizinde; 187 hücrede myc geni açısından normal, 4 hücrede myc kaybı, 2 hücrede myc artışı, 5 hücrede der(8) ve 2 hücrede distali delesyona uğramış myc geni taşıyan 8 nolu kromozom gözlendi.

Olgu 20: 23 aylık ALL tanılı erkekte yapılan G bantlı analizde incelenen 15 metafazda 46, XY karyotipi gözlendi. FISH analizinde; 190 hücre myc geni açısından normal, 7 hücrede myc kaybı ve 3 hücrede proksimali delesyona uğramış myc geni taşıyan 8 nolu kromozom gözlendi.

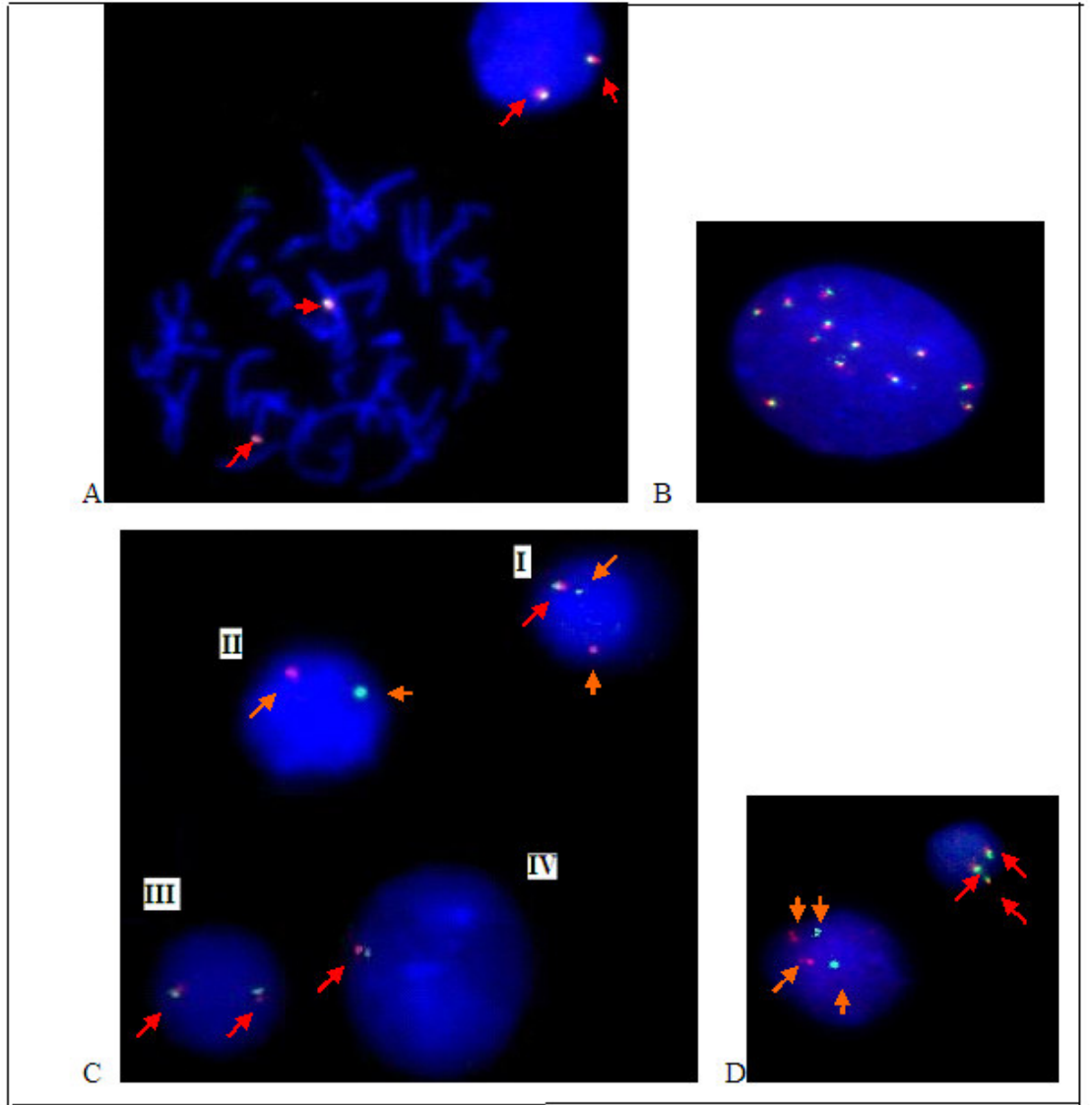
Olgu 21: 26 yaşında B-ALL tanılı erkek. Biri perifer kan biri kemik iliği aspirasyon materyali olmak üzere 2 kez materyal alındı. İlk materyal olan perifer kanından G bantlama için yeterli metafaz elde edilemedi. FISH analizinde; 177 hücre myc geni açısından normal, 9 hücrede myc kaybı, 11 hücrede myc artışı, 1 hücrede distali delesyona uğramış myc geni taşıyan 8 nolu kromozom, 10 hücrede proksimali delesyona uğramış myc geni taşıyan 8 nolu kromozom, 3 hücrede der(8) gözlendi. Olgu 21'de yapılan G bantlamada 17 metafazda 46, XY karyotipi görüldü. FISH sonuçlarında; 190 hücrede myc geni açısından normal, 6 hücrede myc kaybı, 1 hücrede myc artışı, 3 hücrede der(8) ve 1 hücrede distali delesyona uğramış myc geni taşıyan 8 nolu kromozom gözlendi.

Olgu 22: 15 yaşında ALL tanılı erkekte yapılan G bantlamada değerlendirilen 21 metafazın 3'ünd monozomi 22, 18'inde 46, XY karyotipi görüldü. FISH analizinde; 173 hücre myc geni açısından normal, 15 hücrede myc kaybı, 7 hücrede myc geni açısından normal, 4 hücrede der(8), 4 hücrede proksimali delesyona uğramış myc geni taşıyan 8 nolu kromozom ve 2 hücrede distali delesyona uğramış myc geni taşıyan 8 nolu kromozom gözlendi.

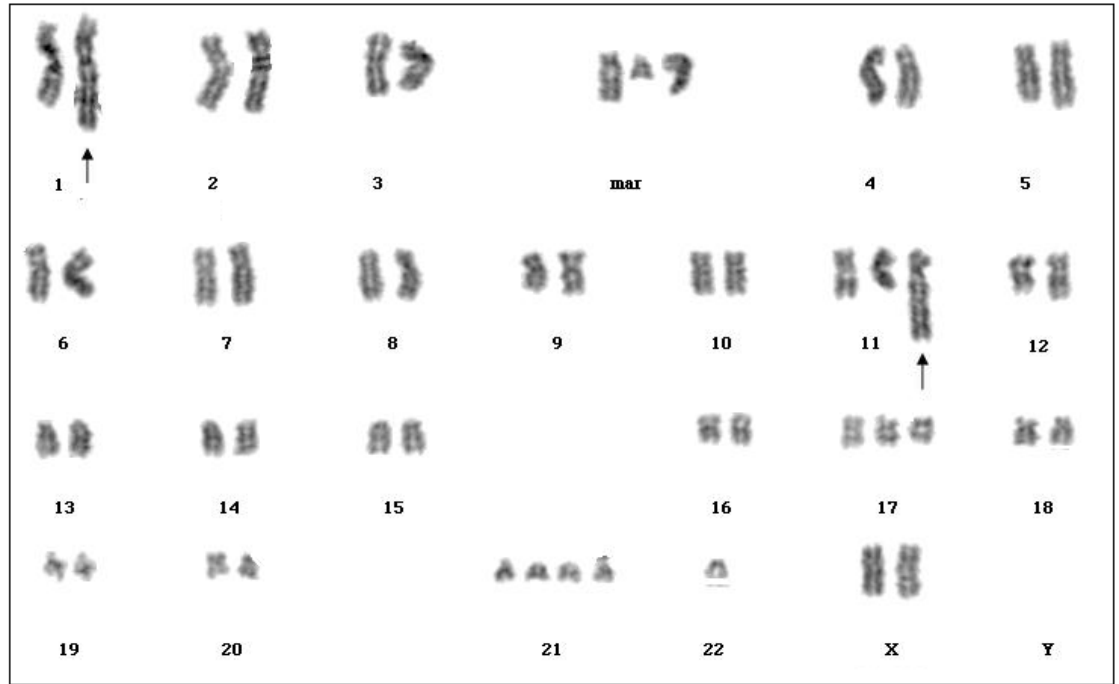
Olgu 23: 20 yaşında B-ALL tanılı kadında yapılan G bantlamada incelenen 17 metafazda sayısal ve yapısal bir anomali gözlenmedi. FISH sonucunda; 180 hücre myc geni açısından normal, 4 hücrede myc kaybı, 9 hücrede myc artışı, 8 hücrede der(8) ve 1 hücrede distali delesyona uğramış myc geni taşıyan 8 nolu kromozom gözlendi.

Olgu 24: 4 yaşında B-ALL tanılı kızda yapılan G bantlamada değerlendirilen 21 metafazın 3'ünde myc artışı, marker kromozom, del(3)(q13q23) ve del(9)(q11q21) görüldü. 16 metafazda 46,XY karyotipi gözlendi. FISH sonucunda; 191 hücre myc geni açısından normal, 7 hücrede myc artışı, 2 hücrede der(8) gözlendi.

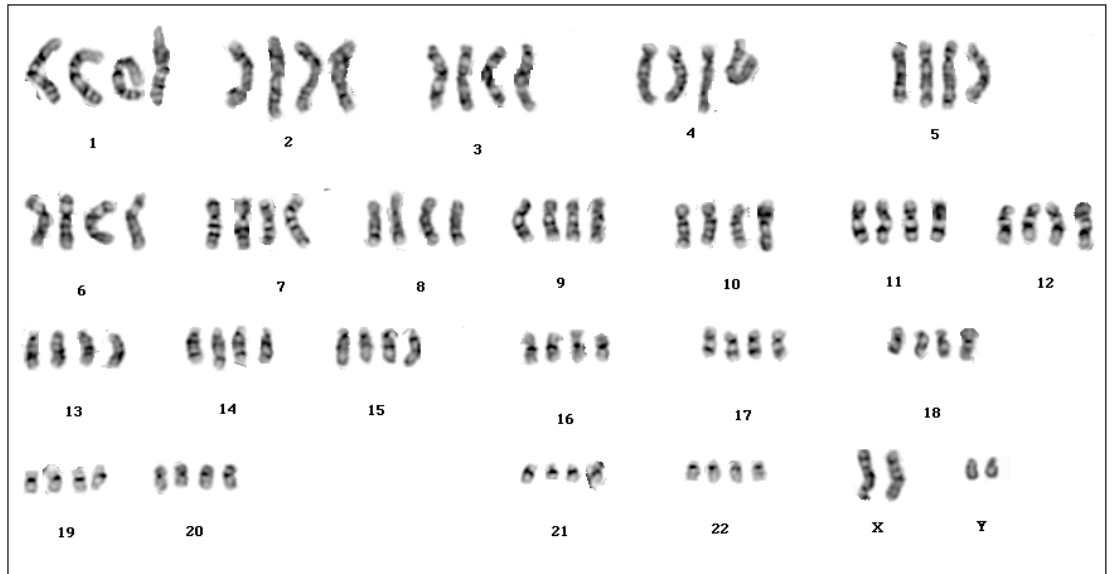
Olgu 25: 17 yaşında pre B-ALL tanılı kızda yapılan G bantlamada incelenen 3 metafazın 2'sinde klonal olmayan sayı anomalileri, del(3)(q13q23) ve add(6)(q12) klonal yapısal anomalisi gözlendi. 1 metafazda 46,XX karyotipi saptandı. FISH analizinde; 195 hücre myc açısından normal, 1 hücrede myc kaybı, 2 hücrede myc artışı ve 2 hücrede der(8) gözlendi.



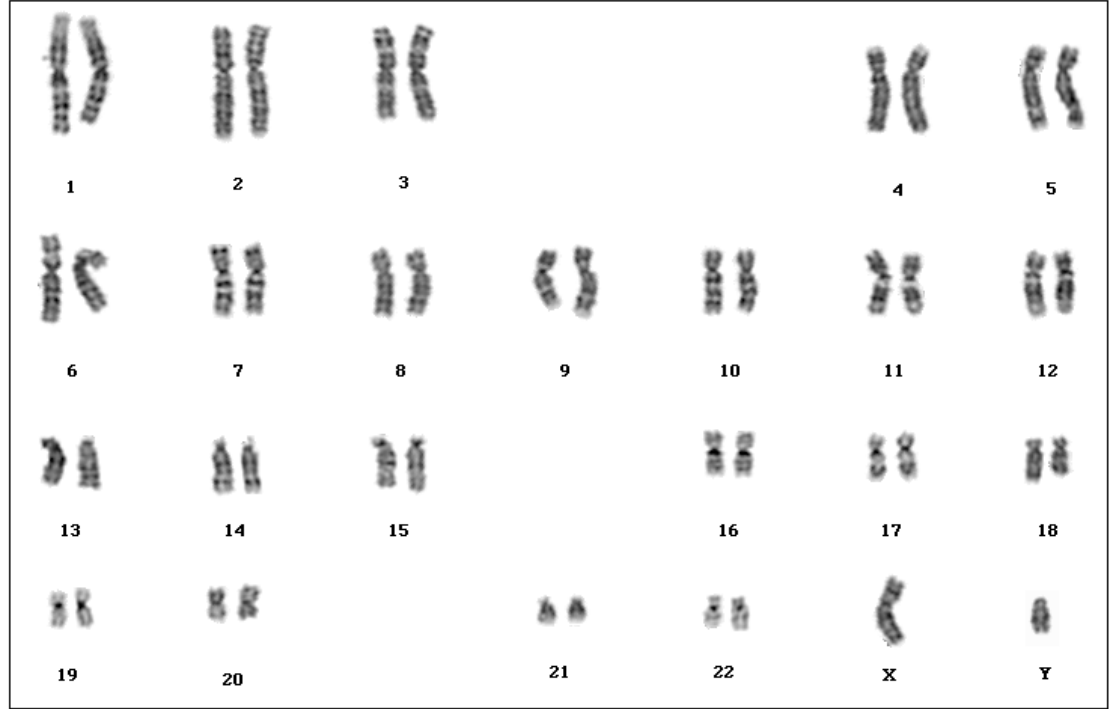
Şekil 4-2: Olgulara ait FISH görüntüleri. A-Olgu 9'a ait FISH görüntüsünde interfaz nukleusunda ve metafaz plağında 2 adet füzyon sinyali; B-Olgu 22'ye ait FISH görüntüsünde interfaz nukleusunda 12 adet füzyon sinyali; C-Olgu 12'ye ait interfaz nukleuslarının FISH görüntülerinde; I- 1 adet füzyon sinyali ve 1 adet der(8), II- 1 adet der(8), III- 1 adet füzyon sinyali ve 8 nolu kromozomların birinde proksimal delesyon, IV- 1 adet füzyon sinyali; D-Olgu 15' e ait FISH görüntüsünde üstteki interfaz nukleusunda 3 füzyon sinyali, alttaki interfaz nukleusunda 2 adet der(8) gözlenmektedir.



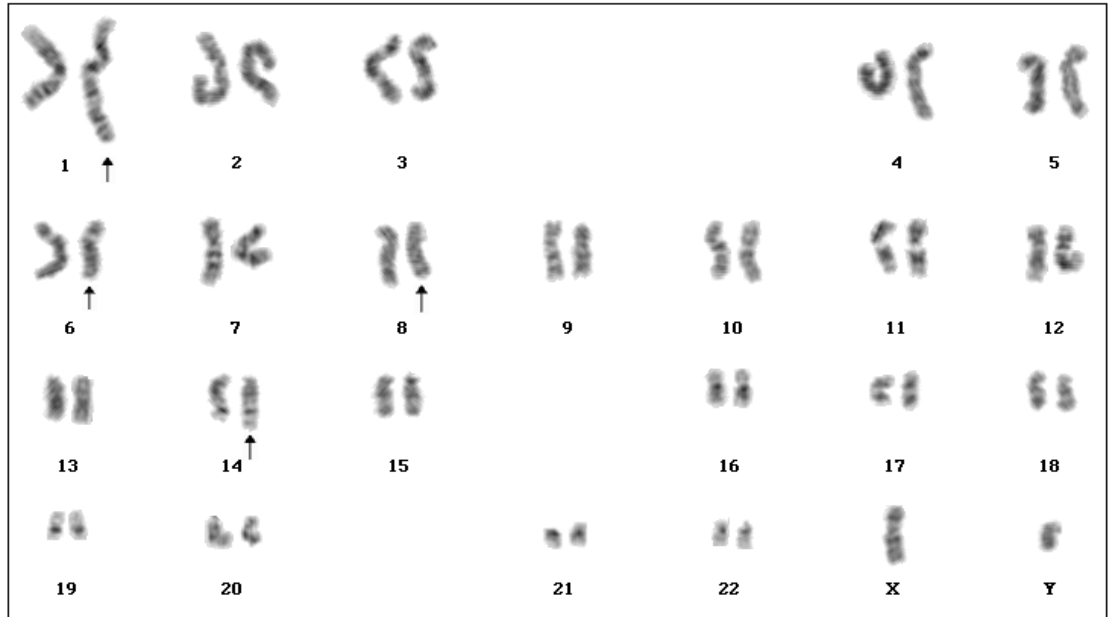
Şekil 4-3: Olgu 2'ye ait G bantlı karyogramda add(1)(q42) , add(11)(q23) ve marker kromozom yapısal anomalileri gözlenmektedir



Şekil 4-4: Olgu 5'e ait tetraploid metafazın karyogramı



Şekil 4-5: Olgu 8'e ait karyogramda t(9;22) bulgusu gözlenmektedir



Şekil 4-6: Olgu 12'ye ait karyogramda dup(1)(q23q32), del(6)(q23) ve t(8;14)(q24;q32) yapısal anomalileri gözlenmektedir

5. TARTIŞMA

Hasta grubumuz toplam 25 ALL tanılı çocuk ve erişkinden oluşmaktadır. 25 olgunun 6'sından birden fazla kez materyal alındı. Bazı olgularımızda ise hem kemik iliği aspirasyon materyali hem de perifer kan örneğinden inceleme yapıldı. Alınan kemik iliği aspirasyon materyaline kemik iliği kültürü ve perifer kan örneklerine periferik lenfosit kültürü uygulandıktan sonra G bantlama ve FISH yöntemi ile myc gen bölgesindeki yeniden düzenlenmeler araştırıldı.

Yapılan çalışmalarda ALL'nin hem çocuklarda hem de yetişkinlerde gözlendiği bildirilmektedir. Bizim olgularımızın 14'ü(%56) çocuk, 11'i (%44) erişkin hastadan oluşmaktadır.

ALL'nin erkeklerde daha sık gözlendiği bildirilmektedir. Bizim de buna uygun olarak hasta grubumuz %65 erkek, %35 kız hastadan oluşmaktadır.

Çalışma grubumuzda immünofenotiplemesini bildiğimiz 16(%64) olgu bulunmaktadır. Bunların 12(%75'i)'si B-ALL, 4 tanesi T-ALL(%25) tanısını almıştır. B-ALL tanılı bildiğimiz 12 hastadan 2'si prekursor, 2'si ise common B-ALL'dir.

Morfolojik sınıflandırma ALL'de tanı koymada önemli bir yöntemdir. 25 olgumuzun 7'sinin(%28) morfolojik tipi bilinmektedir. Morfolojik tipini bildiğimiz 4 çocuk hastanın 3'ü L1, 1 tanesi ise L2 tipinde, 3 erişkin hastanın ise 2'si L2, 1 tanesi ise L3 tipindedir.

Lösemi olgularında G-bantlama için yeterli sayıda ve kalitede metafaz bulmanın zorluğu bilinen bir gerçektir. Bu yüzden birçok çalışmada değerlendirilecek metafaz bulunamadığından bazı olguların G bantlama sonucu elde edilememektedir. ALL' li olgularda çalışılan literatürlerde bildirilmiş olan G bantlama için metafaz elde edebilme oranı %80 ile %91 arasında değişmektedir. Bizim çalışmamızda ise bu oran %92'dir.

ALL'de gözlenen sayısal kromozom anomalileri kromozomların artış ve azalışlarıyla oluşan hiperdiplodi, psödodiploid, hipodiploidi ve poliploidiler olarak sıralanabilir. Gmidene ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada hiperdiploidinin çocuklarda görülme oranı %24, yetişkinlerde %16 olarak bildirilmektedir. Bizim çalışmamızda yetişkinlerde hiperdiplodi görülmezken çocuklarda % 14 oranında gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda (36, 55, 82) hipodiploidi görülme oranı %10'u geçmemektedir. Bizim çalışmamızda hipodiploidi görülme oranı çocuklarda %21, erişkinler için ise %27 olup literatürde bildirilen oranlardan daha yüksek olarak bulunmuştur.

Yapılan çalışmalarda sıklıkları değişkenlik gösterse de en sık trizomisi gözlenen kromozomlar 4, 6, 8, 10, 14, 17, 18,19, 20, 21 (36, 82) numaralı kromozomlardır. Çalışmamızda ise 3, 5, 11, 14, 17, 18, 21, 22 numaralı kromozomların trizomisi gözlenmiştir.

En sık monozomisi gözlenen kromozomlar 1,7, 8, 9, 10, 12 ve 14 numaralı kromozomlardır. Hasta grubumuzda ise 1, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 16, 17, 19, 20, 21, 22 ve Y kromozomlarının monozomisi gözlenmiştir. Yapılan çalışmaların (4, 82) aksine, bizim grubumuzda kromozom kayıplarının, artışlardan daha sıklıkla görüldüğü gözlenmiştir.

11 yetişkin hastamızın 4(%36'sı)'ü normal, 7(%64)'si ise sayısal ve/veya yapısal kromozom anomalisine sahiptir. Gmidene ve arkadaşlarının yetişkin ALL hastalarında yaptıkları G-bantlama sonucunda bizim bulgularımıza oranla daha yüksek (%76) oranda sayısal ve/veya yapısal kromozom anomalisi gözlenmiştir.

14 çocuk hastamızda G bantlamada 6(%46) olguda klonal sayısal ve yapısal anomali tespit edilmezken, 7(%54) olguda sayısal ve/veya yapısal anomali gözlemlendi. Bir olgumuzda ise G-bantlama yapılacak yeterli sayıda ve kalitede metafaz bulunamadığından değerlendirmeye dahil edilmedi. Sayısal ve/veya yapısal anomalinin görülme oranı Soszynska ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada %59, Gmidene ve ark. yaptığı çalışmada ise %62.5 olarak bildirilmiş olup bizim sonuçlarımıza benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Sayısal ve/veya yapısal anomalisi görülme sıklığını tüm hasta grubumuza uyarladığımızda oran %58 bulunmaktadır. Sonuç olarak çalışmamızda kromozom anomalisi bulduğumuz hasta oranımız, görülme oranı %68 olarak bildirilen Gmidene ve arkadaşlarının çalışmasına göre daha düşük bulunmuştur. 1, 1°, 5°, 8, 10, 11, 13, 15, 16, 18, 20, 21 ve 23 numaralı olgularımızın G-bantlama ile yapılan analizinde sayısal ve/veya yapısal anomaliye rastlanmamıştır.

t(9;22) bulgusu(Philadelphia kromozomu-Ph) KML için tanı koydurucu bir bulgu olmakla birlikte ALL' de de görülen bir yapısal anomalidir (5, 29). KML kadar sık gözlenmese de Ph kromozomunun varlığı ALL' de tedavi protokolünün ve prognoz belirlenmesinde önemli bir yer tutar. Çünkü Ph kromozomu bulunan ALL hastalarında genellikle prognoz kötüdür ve kemik iliği transplantasyonu önerilmektedir. Çalışma grubumuzda sadece bir erişkin bireyde(olgu 8°) t(9;22) bulgusuna rastlanmıştır. Çocuk hastalarımızda ise bu bulguya hiç rastlanmamıştır. Yapılan benzer

çalışmalarda çocuklarda görülme oranı erişkinlere göre daha azdır. Gmidene ve arkadaşlarının 298 ALL hastasında yaptıkları çalışmada çocuklarda %2, yetişkinlerde %4 oranında t(9;22) gözlenmiştir. Sadece çocuk hastalardan oluşan Soszynska ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise t(9;22) %1.5 oranında bildirilmiştir. Yetişkinler için bu oranın %20'lere kadar çıktığının bildirildiği literatürler de bulunmaktadır (55). Erişkin hasta grubumuzdaki bu oran (%9) yapılan çalışmaların sınırları arasında bulunmuştur.

ALL'de yapılan çalışmalarda 11 numaralı kromozomun katıldığı birçok yapısal ve sayısal anomali bildirilmiştir. Özellikle 11q23'te yer alan MLL geninin katıldığı yeniden düzenlenmeler çocuklarda(%8) ve yetişkinlerde(%4) görülme oranı farklılık göstermektedir. Özellikle 1 yaşından küçük çocuklarda daha sık gözlenmektedir. MLL yeniden düzenlenme varlığı kötü prognoza işaret etmektedir. Çalışma grubumuzdaki 1'i(%7) çocuk (olgu 2), 1'i(%9) erişkin(olgu 6) olmak üzere 2 olguda 11 numaralı kromozomun karıştığı yeniden düzenlenmeler tespit edilmiştir. Olgu 2'de add(11)(q23), trizomi 11 ve olgu 6'da add(11)(q25) gözlenmiştir. add(11)(q23) ve add(11)(q25) bölgelerine farklı kromozomlara ait parçalar eklendiği düşünülmüş ancak ilave olan kromozom parçalarının kökeni G bantlama ile saptanamamıştır. Silva ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada %1 oranında add(11)(q23), %1 oranında del(11)(q23) ve %4 oranında 11q23'ün katıldığı translokasyonlar bulunmuştur.

del(6q) bulgusu ALL'de tekrarlayan yapısal anomaliler arasındadır. 12. olgumuzda başka yapısal anomalilerin yanında del(6)(q23) bulgusuna da rastlanmıştır. Mancini ve arkadaşlarının (58) 285 yetişkin ALL hastasında yaptıkları çalışmada 18 hastada(%6) del(6)(q23) bulgusuna rastlanmıştır. Bizim çalışmamızda 24 hastadan 1'inde(%4) görülüp benzer çalışmalara yakın bir oran gözlenmiştir. 6q21-23 ve 6q25-27 bölgesinde tümör baskılayıcı genlerin varlığı sebebiyle bu bölgede meydana gelen delesyonlar lösemi gelişimi için anlam ifade edebilmektedir (62). 6q'nun katıldığı başka yapısal anomaliler de gözlenmiştir. Olgu 17'de t(4;6)(q35;q24) ve olgu 25'te add(6)(q12) yapısal anomalileri de tespit edilmiştir. add(6)(q12) anomalisi literatürlerde (52) APL(akut promyelositik lösemi)'de görülen bir bulgu olarak bildirilmiştir.

8q24'te yerleşmiş olan myc geni, çoğalan hücrelerde üretimi artan, hücre döngüsünün ilerlemesini ve hücre dönüşümünü uyaran, farklılaşmayı engelleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Myc üretimiyle; hücre döngüsünün ilerlemesi, farklılaşma, metabolizma, apoptozis, ölümsüzlük ve adezyon gibi çeşitli hücresel olaylar etkilenir.

Bir protoonkogen olan myc, translokasyon, amplifikasyon ve mutasyon gibi çeşitli aktivasyon mekanizmalarıyla onkogenik özellik kazanır. Bunlar arasında en sık gözlenen mekanizma translokasyondur (34). Translokasyonlar sonucunda myc geni yapısal olarak değişebilir veya üretimi artabilir. Lenfosit proliferasyonunda görevli birçok protein myc'in hedef moleküllerindendir. Myc'in üretimi arttıkça lenfositler daha çok prolifer olacaktır (68). Bu durum lenfositlerde malign değişime neden olmaktadır. Burkitt lenfoma ve lösemide myc geninin karıştığı translokasyonların yaklaşık %85'ini t(8;14)(q24;q32), %10'unu t(2;8)(p11;q24) ve %5'ini t(8;22)(q24;q11) oluşturur. Her üç translokasyonun ortak noktası, 8. kromozomdaki myc protoonkogeninin, ağır veya hafif zincir genlerinden birinin regülatör bölgesi ile komşuluklu hale gelerek, işlevsel değişikliğe uğramasıdır (14, 18, 19, 34).

25 hastaya uygulanan 33 FISH analizinde tüm olgularda myc gen bölgesinin kayıpları, artışları ve/veya yeniden düzenlenmeler gözlenmiştir. G-bantlama sonuçları ile karşılaştırıldığında anomali oranının bu kadar yüksek olmasının sebebi FISH yöntemi ile daha fazla sayıda hücrede analiz imkanının bulunmasıdır. 33 FISH analizinde 2 materyalde sadece myc gen bölgesi kayıp veya artışı, kalan 31 materyalde ise myc gen bölgesinin kaybı, artışı ve yeniden düzenlenmeleri bulunmaktadır.

Olgu 12'de yapılan G-bantlamada t(8;14)(q24;q32)(%4) bulgusuna rastlandı. t(8;14)(q24;q32), B hücreli akut lenfoblastik lösemide ve Burkitt lenfomada görülen sitogenetik bir bulgudur. Gmidene ve ark, Andreasson ve ark. yaptıkları benzer çalışmalarda çocuk ve yetişkinlerde bu anomalinin görülme oranı birbirine yakın olup yaklaşık %1 oranındadır. Çocukluk çağı ALL hastalarında yapılan (Silva ark.) çalışmada ise bu oran B-ALL'li hastalar için %6 olarak bildirilmiştir. Bizim hasta grubumuzdaki %4 oranı benzer çalışmalarda bildirilmiş olan sınırlar içindedir. Yapılan FISH sonucunda ise sayılan 200 interfaz nükleusunda 47'sinde der(8), ayrıca 6 hücrede genin proksimalinin ve 1 hücrede distalinin delesyona uğradığı tespit edilmiştir. En yüksek oranda der(8) bulgusuna rastladığımız bu olguda bu translokasyonun dışında dup(1)(q23q32) ve del(6)(q23) anomaliside gözlemlendi. dup(1)(q23q32) bulgusuna benzer olarak 1q'nun parsiyel duplikasyonunun bildirildiği çalışmalar bulunmaktadır (82).

Olgu 1'den iki kez kemik iliği aspirasyon materyali alındı. İlk geliş olgu 1, ikinci geliş olgu 1° olarak isimlendirildi. Olgu 1 ve 1°'in ikisinde de G bantlamada sayısal ve yapısal anomaliye rastlanmadı. Olgu 1'de yapılan FISH analizinde myc

geninde kayıp ve artışları ve der(8) bulgusuna rastlandı. Olgu 1°'de de gözlenen myc geni kayıp ile artışların ve der(8) bulgusunun devam ettiği gözlenmiştir.

Olgu 5'in G-bantlamasında birçok klonal sayı anomalisine rastlandı. Bu anomalilerden monozomi 8 incelenen 21 metafazın 3'ünde gözlemlendi. FISH analizine baktığımızda 200 hücreden 9'unda myc geninin kaybına rastlanmıştır. Ayrıca der(8) ve genin distalinin delesyona uğradığı hücreler de gözlemlendi. Bu hastanın 2. (olgu 5°) ve 3. (olgu 5°°) kez alınan materyallerinden yapılan G bantlamada 8 nolu kromozomu tutan sayısal ve yapısal bir anomaliye rastlanmadı. 5°'in FISH sonucunda myc genindeki kayıpların devam etmediği aksine artışların görüldüğü, der(8)'in yanı sıra, genin proksimal ve distalinde delesyonların varlığı tespit edildi. 5°°'nın FISH analizinde myc geninin kayıp ve artışlarında azalma olduğu daha çok der(8) görülen hücrelerin devam ettiği tespit edildi.

Olgu 6'da add(11)(q25) yapısal anomalisinin yanı sıra sayısal anomaliler ve marker kromozomlar gözlemlendi. FISH analizinde ise myc geni kaybı, der(8) ve genin proksimal delesyonunun gözlemlendiği hücreler tespit edilmiştir. Hastadan alınan ikinci materyalin (olgu 6°) G bantlamasında marker kromozomlar ve yapısal anomaliler devam etmemiş fakat poliploid metafazlara rastlanmıştır. FISH analizinde ise myc geni kayıp ve artışların, yapısal anomalilerden der(8) bulgusunun arttığı tespit edildi. Hastanın 3. materyalinde(olgu 6°°) ise karyotip normal fakat FISH sonucunda der(8), myc geninde proksimal ve distal delesyonlar ile myc geninin kayıp ve artışlarının devam ettiği gözlemlendi.

Olgu 7'den alınan kemik iliği aspirasyon materyalinden G-bantlama için yeterli sayıda ve kalitede metafaz elde edilmedi. FISH analizinde ise 22/200 gibi ciddi oranda myc geninin kaybı ve der(8) yanısıra proksimal ve distal bölgelerin delesyonu gözlemlendi. Hastadan alınan 2. materyalde(olgu 7°) perifer kanıydı. G-bantlamada monozomi 21 gözlemlendi. FISH sonuçlarında ise az oranda myc geninin kaybı ile distali delesyona uğrayan hücreler gözlemlendi.

Olgu 8'den alınan kemik iliği aspirasyon materyalinden yeterli sayıda ve kalitede metafaz bulunmadığından G bantlama sonucu elde edemedik. FISH sonuçlarında da myc geni kayıpları gözlemlendi. Hastanın ikinci materyalinde(olgu 8°) ise t(9;22) tespit ettik fakat 8 numaralı kromozomu tutan herhangi yapısal ve sayısal anomaliye rastlamadık. FISH sonuçlarında ise myc geninin kaybının görüldüğü hücre sayısının arttığı gözlemlendi.

Olgu 21’de alınan perifer kanından G-bantlama için yeterli sayıda ve kalitede metafaz bulunamadı. Perifer kanından yapılan FISH analizinde myc geninde kayıp, der(8), genin proksimal delesyonu ve distal bölgesinin delesyonu gözlemlendi. Hastanın 2. gelişinde(olgu 21°) alınan kemik iliği aspirasyon materyalinden yapılan G bantlamada sayısal ve yapısal anomali tespit edilmezken FISH analizinde önceki gelişindeki FISH’te tespit edilen myc geni kayıplarının ve der(8)’in azalarak devam ettiği tespit edildi.

Olgu 3’te G-bantlama için yeterli sayıda ve kalitede metafaz elde edemedik. Uygulanan FISH yönteminin sonucunda hem myc geninde kayıp ve artış ayrıca 9 hücrede yeniden düzenlenmelerin meydana geldiğini tespit ettik.

Olgu 16’da yapılan G bantlama sonucunda yapısal ve/veya sayısal anomaliye rastlanmadı. FISH analizinde, genin distal ve proksimal delesyonu, myc geni artışları gibi anomaliler tespit edildi. Ayrıca bazı hücrelerde çok sayıda ya da normal sinyallerden daha küçük boyutta sinyaller gözlemlendi. Bu sinyaller probun bağlanarak yalancı sinyal vermesine neden olabilecek artefaktların varlığı ya da sıcaklık vb. dış faktörlerle probun parçalanmasından doğan teknik bir problemten kaynaklanabileceği düşünüldü. Teknik problemlerin olma olasılığı dışlandığında bu sinyal paternleri bize myc genini içeren amplifikasyonların varlığını düşündürür. Fakat G-bantlamada böyle ektrakromozomal ya da intrakromozomal bir amplifikasyonu düşündürecek herhangi bir sitogenetik bulguya rastlanmadı.

Olgu 22’de yapılan G bantlama sonucunda sadece monozomi 22 bulgusuna rastlandı. FISH analizinde ise myc geninde kayıp ve artışlar, der(8), distal ve proksimal delesyonlar gözlemlendi. 1 interfaz nuklesunda ise 12 adet füzyon sinyaline rastlandı. Myc amplifikasyonunu destekleyecek double minute gibi sitogenetik bulguya rastlanmaması ve ayrıca gözlenen hücrenin diğer hücrelerine göre oldukça büyük olması sebebiyle bu bulgu bize 8 nolu kromozomun polizomisinin varlığını düşündürdü.

Yaptığımız G bantlı analizde bir olguda 8q24’teki myc geninin karıştığı sitogenetik bulguya rastlanırken FISH analizi yapılan 33 materyalde myc geninde kayıp ve artış 31’nde ise myc geninde kayıp, artışla birlikte myc gen bölgesinin karıştığı yeniden düzenlenmeler gözlenmektedir. G bantlama ise sadece 1 olguda bu anomaliye rastlanmıştır.

Kanser sitogenetiğinin iki ana hedefi vardır. Bunlardan birincisi temel kanser araştırmalarına yönelik olup, spesifik kromozom anomalilerinin tanımlanması, primer

ve sekonder değişikliklerin ve özellikle kırık noktalarının belirlenmesi, bu noktada üretimi değişen yada üretimi kaybedilen genlerin tanımlanarak, tümör gelişimindeki biyolojik mekanizmaların aydınlatılmasına olanak sağlamaktır. İkincisi ise klinik uygulamalardır. Belirli kanserlerde primer ve sekonder kromozom değişikliklerinin bilinmesi, tanının kesinleşmesinde, prognozda, tedavi protokolünün düzenlenmesinde, minimal rezidüel hastalığın takibinde büyük önem kazanmaktadır. Akut lenfoblastik lösemide karyotip bulguları, anlamlı prognostik bilgi sağlamakta ve sitogenetik bulguların değişkenliği bağımsız olarak prognostik önem taşımaktadır (31, 70, 86, 99).

İnceleme yapılacak olan kemik iliği aspirasyon materyalinden yeterli sayıda metafaz elde etmek her zaman mümkün olamamaktadır. Yeterli sayıda metafaz elde edilse bile klonal sayı ve yapı anomalilerini ayırabilecek kalitede metafaz bulmakta sıkıntı yaşanmaktadır. Bu durumda kromozomlarda meydana gelen sayısal ya da yapısal anomaliler tespit edilememektedir. Bu problemleri aşmak ve karmaşık yapıdaki kromozomal anomalilerin belirlenmesi amacıyla konvansiyonel sitogenetik yöntemlerin yanında moleküler yöntemler de uygulanmalıdır. Bu moleküler yöntemlerin başında sitogenetik ve moleküler yöntemleri birleştiren FISH yöntemi gelmektedir (35, 70, 97).

Lösemilerde FISH uygulamaları hastalığın tanısı ve takibinde ciddi bir öneme sahiptir. Özellikle de lösemi tiplerine özgü kromozomal translokasyonların kantitatif takibi açısından sitogenetik ve RT-PCR tekniklerine bir alternatif oluşturmaktadır. Ayrıca genetik değişikliklerin bire bir her hücrede değerlendirilebilmesine olanak sağladığından minimal rezidüel hastalığın takibinde de etkin rol oynamaktadır. FISH tekniğinin moleküler tekniklerdeki ilerlemelere paralel olarak gelişmesi ve geniş bir uygulama alanı bulmasının altında yatan gerçek, bu tekniğin kolay uygulanabilir olması, hızlı sonuç alınması, duyarlılığı ve güvenilirliğinin yüksek olmasıdır (9, 20, 97).

Fakat FISH tekniğinin yetersiz kaldığı bazı durumlar vardır. Bu teknikle sadece aranan anomaliyle ilgili bilgi sahibi olunabilir. Konvansiyonel sitogenetikle ise tüm sayısal ve yapısal kromozomal anomaliler tespit edilmektedir.

Bu çalışmada yeterli sayıda ve kaliteli metafaz bulmanın zorluğu bilinen ALL olgularında, konvansiyonel sitogenetik ve FISH yöntemi ile ALL' nin prognozunda önemli rol oynayan myc geninin yeniden düzenlenmeleri incelendi. G bantlamada bir materyalde myc genini içeren bulgu saptanmasına rağmen FISH ile 31 materyalde yeniden düzenlenme meydana geldiği gözlemlendi. İnterfaz FISH tekniği ile hızlı ve daha çok sayıda hücrede bu yeniden düzenlenmelerin incelenmesi tanı, tedavinin planlanması

ve minimal rezidüel hastalığın takip edilmesinde etkili olacaktır. Elde ettiğimiz sonuçlar; hem interfaz hem de metafazda inceleme olanağı sunan ve konvansiyonel sitogenetik yöntemlere göre daha hızlı ve hassas sonuçlara ulaşmamızı sağlayan FISH yönteminin bulgularının tanıda, prognozda ve tedavi protokolünün belirlenmesinde yol gösterici olduğunu kanıtlamaktadır.

KAYNAKLAR

1. Akarsu S, Yılmaz E, Denizmen AA, Gözdaşoğlu S. Akut lenfoblastik lösemili çocuklarda L-asparajinaz tedavisi ve komplikasyonları. *T Ped Arş* 2004; **39**: 162-170.
2. Aksu MG, Korcum AF, Tunçel N, Şen CA, Dünder E. Akut lenfoblastik lösemide kranial profilaktik radyoterapi: İki farklı tedavi alanı ve enerjinin karşılaştırılması. *UHOD* 2007; **2(17)**: 79-86.
3. Amati B. Function of the c-Myc oncoprotein in chromatin remodeling and transcription. *Biochim Biophys Acta* 2001; **1471**: 135-145.
4. Andreasson P, Hoglund M, Bekassy AN, Garwicz S, Heldrup J, Mitelman F, et al. Cytogenetic and FISH studies of a single center consecutive series of 152 childhood acute lymphoblastic leukemias. *Eur J Haematol* 2000; **65**: 40-51.
5. Aplan PD. Causes of oncogenic chromosomal translocation. *Trends Genet* 2006; **22**: 46-55.
6. Appelbaum FR. Progress in adult lymphoblastic leukemia. *West J Med* 1996; **164**: 180-181.
7. Aydın Y, Başlar Z, Apak H, editörler. Erişkinlerde akut lösemiler. Hematolog olmayanlar için hematolojik maligniteler. İstanbul; *İstanbul üniversitesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi*; 2005.
8. Bassan R, Gatta G, Tondini C, Willemze R. Adult acute lymphoblastic leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004; **50**: 223-261.
9. Başaran N. Tıbbi Genetik Ders Kitabı. Ankara: Güneş ve Nobel Tıp Kitabevi; 1999.
10. Bayani J and Squire JA. Fluorescence in situ hybridization (FISH). *Curr Protoc Cell Biol* 2004; **23**: 22.4.1-22.4.51.
11. Beksac M. Akut miyeloid lösemi. *T Klin Hematol* 2004; **2**: 1-9.
12. Belson M, Kingsley B, Holmes A. Risk Factors for acute leukemia in children: A Review. *Environ Health Perspect* 2007; **115**: 138-145.
13. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995; **9**: 1783-1786.

14. Bertino JR, editor. *The Encyclopedia of Cancer*, 2nd ed. USA: Academic Press; 2002
15. Bertrand P, Bastard C, Maingonnat C, Jardin F, Maisonneuve C, Courel MN, Ruminy P, Picquenot JM, Tilly H. Mapping of MYC breakpoints in 8q24 rearrangements involving non immunoglobulin partners in B-cell lymphomas. *Leukemia* 2007; **21**: 515–523.
16. Blancato J, Singh B, Liu A, Liao DJ, Dickson RB. Correlation of amplification and overexpression of the c-myc oncogene in high-grade breast cancer: FISH, in situ hybridization and immunohistochemical analyses. *Br J Cancer* 2004; **90**: 1612-1619
17. Blum AK, Lozanski G, Byrd JC. Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood*. 2004; **104**(10): 3009-3020.
18. Bouchard C, Staller P, Eilers M. Control of cell proliferation by Myc. *Trends Cell Bio* 1998; **8**: 202-206
19. Boxer LM and Dang CV. Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene* 2001; **20**: 5595 -5610.
20. Branch MJ, Knutsen T, Spurbeck JL, editors. *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. 3rd ed. USA, Lippincott-Raven; 1997.
21. Campana D. Molecular Determinants of Treatment Response in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008; **2008**: 366-373.
22. Celkan T. Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemisi. *Klin Gelişim* 2007; **20**: 14-25
23. Choi JR, Kim J, Park TS, Lyu CJ, Song J, Lee KA et al. BCR/ABL rearrangement with b3a3 fusion transcript in a case of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2009; **189**: 132-137
24. Cole MD and McMahon SB. The myc oncoprotein: a critical evaluation of transactivation and target gene regulation. *Oncogene* 1999; **18**: 2916-2924.
25. Cowling VH and Cole MD. Mechanism of transcriptional activation by the Myc oncoproteins. *Semin Cancer Biol* 2006; **16**: 242–252.
26. Cowling VH, Chandriani S, Whitfield ML, Cole MD. A conserved myc protein domain, MBIV, regulates DNA binding, apoptosis, transformation, and G2 arrest. *Mol Cell Biol* 2006; **26**: 4226–4239.
27. Dang CV, Li F, Lee LA. Could myc induction of mitochondrial biogenesis be linked to ROS production and genomic instability? *Cell Cycle* 2005; **4**: 1465-1466 .

28. Deviren A. Genel Genetik. İstanbul: *İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları*; 2002.
29. Durak B, Akay OM, Yaşar NŞ, Özdemir M, Gülbaş Z, Artan S. BCR-ABL Pozitif Lösemilerde Klasik Sitogenetik, FISH ve RT-PCR Analizlerinin karşılaştırılması. *Osmangazi Tıp Derg* 2008; **30**: 1-9.
30. Einerson RR, Law ME, Blair HE, Kurtin PJ, McClure RF, Ketterling RP, Flynn HC, Dogan A, Remstein ED. Novel FISH probes designed to detect IGH-MYC and IGH-MYC rearrangements in B-cell lineage malignancy identify a new breakpoint cluster region designated BVR2. *Leukemia* 2006; **20**: 1790-1799.
31. Felix CA and Lange BJ. Leukemia in infants. *The Oncologist* 1999; **4**: 225-240
32. Frank SR, Schroeder M, Fernandez P, Taubert S, Amati B. Binding of c-Myc to chromatin mediates mitogen-induced acetylation of histone H4 and gene activation. *Genes Dev.* 2001; **15**: 2069-2082.
33. García-Castillo H, Barros-Núñez P. Detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombination in hematological malignancies: monitoring minimal residual disease. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2009; **9**: 124-35
34. Gauwerky E, Huebner K, Isobe M, Nowell PC, Croce CM. Activation of MYC in a masked t(8;17) translocation results in an aggressive B-cell leukemia. *C Proc Natl Acad Sci* 1989; **86**: 8867-8871.
35. Gerr H, Gadzicki D, Kreipe H, Schlegelberger B, Wilkens L. Fluorescence in situ Hybridization reveals closely correlated results in cytological and histological specimens of hematological neoplasias compared to conventional cytogenetics. *Pathobiol* 2006; **73**: 271-279.
36. Gmidene A, Sennana H, Elghezal H, Ziraoui S, Youssef YB, Elloumi M et al. Cytogenetic analysis of 298 newly diagnosed cases of acute lymphoblastic leukaemia in Tunisia. *Hematol Oncol* 2008; **26**: 91-97
37. Greer B, JP, Foerster J, Lukenks JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader, editors. *Classification and differentiation of the acute leukemias. In: Wintrobe's Clinical Hematology*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2004.
38. Gupta AA, Grant R, Shago M, Abdelhaleem M. Occurrence of t(8;22)(q24.1;q11.2) Involving the MYC Locus in a Case of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia with a Precursor B Cell Immunophenotype. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004; **26**: 532-534.

39. Gündüz C, Coğulu O, Cetingül N, Kantar M, Cankaya T, Ozkinay C et al. New chromosome rearrangement in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; **137**: 150–152.
40. Harrison CJ. Acute lymphoblastic leukaemia. *Best Practice Res Clin Haematol* 2001; **14**: 593-607.
41. Harrison CJ. Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2009; **144**: 147-156.
42. Heim S, Mitelman F. *Cancer Cytogenetics*. 2nd ed. New York: Wiley-Liss Inc; 1995
43. <http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/t0814ID1050.html>
44. http://atlasgeneticsoncology.org/Indexbychrom/idxa_8.html
45. <http://www.cytocell.com/products/aquarius/haematology/lph010.asp>
46. Irons RD and Stillman WS. The Process of Leukemogenesis. *Environ Health Perspect* 1996; **104**: 1239-1246.
47. İlhan O. Akut Lösemilerin Sınıflandırılması. *T Klin Tıp Bilimleri* 1992; **12**: 468-471.
48. Jain KK. Current status of fluorescence in-situ hybridization. *Med Device Technol* 2004; **15**: 14-17.
49. Kanungo A, Medeiros LJ, Abruzzo LV, Lin P. Lymphoid neoplasms associated with concurrent t(14;18) and 8q24/c-MYC translocation generally have a poor prognosis. *Mod Pathol* 2006; **19**: 25–33.
50. Kearney L and Horsley SW. Molecular cytogenetics in haematological malignancy: current technology and future prospects. *Chromosoma* 2005; **114**: 286-294.
51. Kebriaei P, Anastasi J, Larson RA. Acute lymphoblastic leukaemia: diagnosis and classification. *Best Pract Res Clin Haematol* 2003; **15**: 597-621.
52. Kizaki M, Matsushita H, Takayama N, Muto A, Ueno H, Awaya N, Kawai Y et al. Establishment and characterization of a novel acute promyelocytic leukemia cell line (UF-1) with retinoic acid-resistant features. *Blood* 1996; **88**: 1824-1833.
53. Ladanyi M, Offit K, Jhanwar SC, Filippa DA, Chaganti RS. MYC rearrangement and translocations involving band 8q24 in diffuse large cell lymphomas. *Blood* 1991; **77**: 1057-1063.

54. Lenz G, Nagel I, Siebert R, Roschke AV, Sanger W, Wright GW et al. Aberrant immunoglobulin class switch recombination and switch translocations in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Med* 2007; **204**: 633–643.
55. Levitt L and Lin R. Biology and treatment of adult acute lymphoblastic leukemia. *West J Med* 1996; **164**: 143-155.
56. Look AT. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 1997; **278**: 1059-1064.
57. Louis SF, Vermolen BJ, Garini Y, Young IT, Guffei A, Lichtensztein Z et al. c-Myc induces chromosomal rearrangements through telomere and chromosome remodeling in the interphase nucleus. *PNAS* 2005; **102**: 9613-9618.
58. Mancini M, Vegna ML, Castoldi GL, Mecucci C, Spirito F, Elia L et al. Partial deletions of long arm of chromosome 6: biologic and clinical implications in adult lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2002; **16**: 2055-2061.
59. Marilyn L and Daniel P. Clinical cytogenetics and molecular cytogenetics. *J Zhejiang Univ SCIENCE B* 2006; **7**:162-163.
60. Matsuo Y, Drexler HG. Establishment and characterization of human B cell precursor-leukemia cell lines. *Leuk Res* 1998; **22**: 567-579.
61. McNeil N and Ried T. Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: technology and applications in molecular medicine. *Expert Rev Mol Med* 2000; 1-14.
62. Merup M, Moreno TC, Heyman M, Rönnerberg K, Grandér D, Detlofsson R et al. 6q deletions in Acute Lymphoblastic Leukemia and Non-Hodgkin's Lymphomas. *Blood* 1998; **91**: 3397-3400.
63. Miranda RN, Mark HF, Medeiros LJ. Fluorescent in situ hybridization in routinely processed bone marrow aspirate clot and core biopsy sections. *Am J Pathol* 1994; **154**: 1309-1314.
64. Mitelman F, editor. ISCN (1995): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel: S. Karger; 1995.
65. Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparations of leukocytes cultured from peripheral blood. *Exp Cell Res* 1960; **20**: 613-616.
66. Mrozek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev* 2004; **18**: 115–136.

67. Mutlu N. BFM-2000 Protokolü almış akut lenfoblastik lösemili çocuklarda miyeloid işaretliyi pozitifliğinin prognostik değeri ve diğer prognostik faktörler ile ilişkisi, Bakırköy Doğumevi Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi. İstanbul; 2005
68. Osborne CS, Chakalova L, Mitchell JA, Horton A, Wood AL, Bolland DJ et al. Myc Dynamically and Preferentially Relocates to a Transcription Factory Occupied by Igh. *Plos Biology* 2007; **5**: 1764-1772.
69. Özkalemkaş F. Akut Lenfoblastik Lösemi. *T Klin J Hematol* 2004; **2**: 10-23.
70. Pala FS. Hematolojik kanserlerde FISH uygulamaları. *Trakya Üniv Tıp Fak Derg* 2005; **22**: 132-136.
71. Paredes-Aguilera R, Romero-Guzman L, Lopez-Santiago N, Burbano-Ceron L, Camacho-Del Monte O, Nieto-Martinez S. Flow cytometric analysis of cell-surface and intracellular antigens in the diagnosis of acute leukemia . *Am J Hematol* 2001; **68**: 69-74
72. Popescu NC and Zimonjic DB. Chromosome-mediated alterations of the MYC gene in human cancer. *J Cell Mol Med* 2002; **6**: 151-159.
73. Pui CH, Schrappe M, Ribeiro RC, Niemeyer CM. Childhood and Adolescent Lymphoid and Myeloid Leukemia. *Haematol* 2004; **1**: 118-145.
74. Ryan J, Quinn F, Meunier A, Boublikova L, Crampe M, Tewari P et al. Minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukaemia patients at multiple time-points reveals high levels of concordance between molecular and immunophenotypic approaches. *Br J Haematol* 2008; **144**: 107–115.
75. Sandberg AA. Cancer cytogenetics for clinicians. *CA Cancer J Clin* 1994; **44**: 136-159.
76. Scelo G, Metayer C, Zhang L, Wiemels JL, Aldrich MC, Selvin S et al. Household Exposure to Paint and Petroleum Solvents, Chromosomal Translocations, and the Risk of Childhood Leukemia. *Environ Health Perspect* 2009; **117**: 133–139.
77. Schmidt EV. The role of c-myc in cellular growth control. *Oncogene* 1999; **18**: 2988-2996.
78. Sears RC. The life cycle of c-myc. *Cell Cycle* 2004; **3**: 1133-1137.
79. Settin A, Al Hagggar M, Al Dosoky T, Al Baz R, Abdelrazik N, Fouda M et al. Prognostic cytogenetic markers in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Indian J Pediatr* 2007; **74**: 255-263.

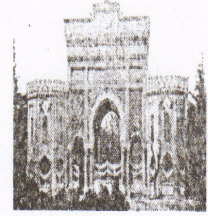
80. Shaffer LG and Tommerup N, editors. ISCN(2005): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel: *S. Karger*; 2005.
81. Siebert R, Matthiesen P, Harder S, Zhang Y, Borowski A, Zühlke-Jenisch R et al. Application of interphase fluorescence in situ hybridization for the detection of the Burkitt translocation t(8;14)(q24;q32) in B-cell lymphomas. *Blood* 1998; **91**: 984-990.
82. Silva MLM, Ornellas de Souza MH, Ribeiro RC, Land MG, Boulhosa de Azevedo AM et al. Cytogenetic analysis of 100 consecutive newly diagnosed cases of acute lymphoblastic leukemia in Rio de Janeiro. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; **137**: 85-90.
83. Smock KJ, Nelson M, Tripp SR, Sanger WG, Abromowitch M, Cairo MS et al. Characterization of childhood precursor T-lymphoblastic lymphoma by immunophenotyping and fluorescent in situ hybridization: a report from the children's oncology group. *Pediatr Blood Cancer* 2008; **51**: 489-494.
84. Sonbahar M, Topçugil F, Demir İ, Bal F, Bakan M Akut lösemilerde kromozom anomalileri ve prognoza etkisi. *İzmir Atatürk Eğitim Hastanesi Tıp dergisi* 2005; **43**: 79-85.
85. Soszynska K, Mucha B, Debski R, Skonieczka K, Duszenko E, Koltan A. The application of conventional cytogenetics, FISH, and RT-PCR to detect genetic changes in 70 children with ALL. *Ann Hematol* 2008; **87**: 991-1002.
86. Sreekantaiah C. FISH panels for hematologic malignancies. *Cytogenet Genome Res* 2007; **118**: 284-296.
87. Subero JIM, Harder L, Gesk S, Schlegelberger B, Grote W, Martinez-Climent JA et al. Interphase FISH assays for the detection of translocations with breakpoints in immunoglobulin light chain loci. *Int J Cancer* 2002; **98**: 470-474.
88. Tanaka K, Arif M, Eguchi M, Shintani T, Kumaravel TS et al. Interphase fluorescence in situ hybridization overcomes pitfalls of G-banding analysis with special reference to underestimation of chromosomal aberration rates. *Cancer Genet Cytogenet* 1999; **115**: 32-38.
89. Teixeira MR. Combined classical and molecular cytogenetic analysis of cancer. *Eur J Cancer* 2002; **38**: 1580-1584.
90. Tiftik EN, Ayyıldız MO, Işıkkakdoğan A, Müftüoğlu E. Erişkin Akut Lenfoblastik Lösemide Tedavi. *T Klin Tıp Bilimleri* 2000; **20**: 245-254.

91. Turgeon ML. *Clinical Hematology Theory and Procedure*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott William&Wilkins; 1999.
92. Ventura RA , Martin-Subero JI, Jones M, McParland J, Gesk S, Mason DY et al. FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn* 2006; **8**: 141-151.
93. Veronese ML, Ohta M, Finan J, Nowell PC, Croce CM. Detection of myc Translocations in Lymphoma Cells by Fluorescence In Situ Hybridization with Yeast Artificial Chromosomes. *Blood*, 1995; **85**: 2132-2138.
94. Wang J and Linda M. Boxer. Regulatory Elements in the Immunoglobulin Heavy Chain Gene 3 Enhancers Induce c-myc Dereglulation and Lymphomagenesis in Murine B Cells. *J Biol Chem* 2005; **280**: 12766–12773.
95. Wehrli LA, Braun J, Buetti LN, Hagleitner N, Hengartner H, Kühne T et al. Non-classical karyotypic features in relapsed childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2009; **189**: 29-36
96. Weng AP, Millholland JM, Yashiro-Ohtani Y, Arcangeli ML, Lau A, Wai C et al. c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev* 2006; **20**: 2096-2109.
97. Woo HY, Kim DW, Park H, Seong KW, Koo HH et al. Molecular cytogenetic analysis of gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Korean Med Sci* 2005; **20**: 36-41.
98. Xiao S, Renshaw A, Cibas ES, Hudson TJ, Fletcher JA. Novel fluorescence in situ hybridization approaches in solid tumors. *Am J Pathol* 1995; **147**: 896-904.
99. Yakut T ve Gülten T. Çocuklukçağı Lösemilerindeki Genetik Değişiklikler ve Klinik Önemi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2005; **31**: 57-62.

ETİK KURUL KARARI



T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI



Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Başkanlığına

26 Eylül 2007

Sayı: 26183

İstanbul :/...../.....

Konu:

İLGİ: 24.07.2007 tarihli, 597 sayılı yazınıza:

Bölümünüze bağlı Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans ögr. SEDA EREN** 'nin yürüteceği " Akut Lenfo Blastik Lösemi(ALL) Olgularında MYC Gen Bölgesindeki Yeniden Düzenlemelerin FISH Yöntemiyle Araştırılması" başlıklı çalışma hakkında ilgi yazınız ve ekleri **18 Eylül 2007** tarihinde toplanan Fakültemiz Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Desteği alınması koşuluyla etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi durumun adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini saygılarımla rica ederim.

EKİ:

1 dosya

Prof.Dr. Mehmet YILDIRIM
Dekan Yardımcısı ve Etik
Kurul Başkanı

Not: Yanıtlarda yazımınızın gün sayısının belirtilmesi rica olunur. Tel:(0212)4143000

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	SEDA	Soyadı	EREN
Doğ.Yeri	KADIKÖY/ İSTANBUL	Doğ.Tar.	04.02.1984
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	29410893972
Email	sssedaeren@yahoo.com	Tel	05327048084

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İ.Ü Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Programı	2009
Lisans	İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü	2006
Lise	Haydarpaşa Anadolu Lisesi	2002

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi	73.750	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	60.842	56.390	51.937
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

1-A. Çırakoğlu, Y.T. Argüden, S. Yılmaz, D. Kuru, A. Deviren, G.S. Güven, E. Paşalıoğlu, İ.M. Gürsel, S. Eren, S. Arpağ, F. Aydoğdu, N. Birinci, H. Kurt and S. Hacıhanefioğlu. Structural Chromosome Abnormalities in couples with recurrent fetal losses. Chromosome Research, 15 (1) Suppl 1,1.182-P,p:103,2007.

2-S. Yılmaz, Y.T. Argüden, D. Kuru, A. Çırakoğlu, G.S. Güven, H. Kurt, N. Birinci, İ. Bayazıt, İ.M. Gürsel, S. Eren, S. Arpağ, F. Aydoğdu, E. Paşalıoğlu, M. Seven, A. Deviren ve S. Hacıhanefioğlu. Turner Sendromu Tanısıyla Başvuran Hastalarda Gözlenen Sitogenetik Bulgular. X. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi Bildiri Kitabı, 106-P,p:226,2007.

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Müzik