

TC  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. Mahmut ÇARİN

132334

**KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİLİ HASTALARDA  
11Q 22-23 VE 13Q 14 DELESYONLARININ  
FLORESAN IN SITU HİBRİDİZASYON YÖNTEMİ  
İLE TESBİTİ**

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

132334

Tıbbi Biyolog Gonca Emel KARAHAN  
Yüksek Lisans Tezi

2003- İstanbul

**132334**

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği tarafından desteklenmiştir. Proje no: T-152/06032003

132334

Tezimi yapmam için bana tüm olanakları sağlayan tez danışmanım  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr.Mahmut Çarın'e,

Çalışmamın her aşamasındaki sıkıntı ve zorlukları maalesef benimle  
beraber yaşayan, sabır ve özveri ile değerli yardımlarını ve ilgisini  
hiçbir zaman esirgemeyen çok kıymetli hocam Prof Dr.Filiz Aydın'a,

Yoğun temposuna rağmen ne zaman olursa olsun bilgiyi  
paylaşmaktan ve öğretmekten çekinmeyen Doç. Dr. Melih Aktan'a,

Değerli katkılarından dolayı çok kıymetli hocam Prof. Dr.Mehmet  
Gürtekin'e,

Laboratuarda bana sonsuz destek olan çok sevgili arkadaşlarım  
Lab.Esma Köse'ye ve Lab. Emel Gündoğan' a,

İstatistik ve yol yardımlarından dolayı Dr.Çiğdem Kekik'e,

Her zaman yanımda olduklarına inandığım Melisa ve Neslihan'a,

Yaşantım boyunca bana destek olan canım aileme

Sevgi ve Teşekkürler  
Gonca Emel KARAHAN

# İÇİNDEKİLER

1.	GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.	GENEL BİLGİLER	3
2.1	Kanser	3
2.1.1	Hematolojik maligniteler	4
2.1.2	İnsan kromozom yapısı ve anomalileri	5
2.2	Kronik Lenfositik Lösemi	8
2.2.1	Epidemiyoloji	8
2.2.2	Etyoloji ve Patogenez	8
2.2.3	Büyüme ve Farklılaşma	9
2.2.4	Lenfositlerin İmmunofenotipik Profilleri	10
2.2.5	Klinik Özellikler	11
2.2.6	Klinik Evrelendirme	12
2.2.7	Prognostik Faktörler	13
2.2.8	Tedavi	15
2.3	Kronik Lenfositik Lösemide Genomik Aberasyonlar	16
2.3.1	KLL'nin Genetik Analizi İçin Yaklaşımlar	16
2.3.1.1	Konvensiyonel Kromozom Bantlama Analizi	16
2.3.2.1	Floresan in situ Hibridizasyon (FISH)	17
2.3.1.3	Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon	20
2.3.1.4	Moleküler Genetik Teknikler	21

2.3.2	KLL'deki Genomik Aberasyonların Karakterizasyonu	21
2.3.2.1	13q14 Delesyonları ve Aday Genler	21
2.3.2.2	11q22-23 Delesyonları ve Aday Genler	25
2.3.2.3	Trizomi 12	27
2.3.2.4	17p13 delesyonu ve p53 mutasyonu	27
2.3.2.5	14q32'de IgH mutasyonları	27
2.3.2.6	Diğer Kromozomal Anomaliler	28
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1	Gereçler	29
3.1.1	Hasta Grubu	29
3.2.1	Problar	29
3.1.3	Mikroskop	31
3.1.4	Filtreler	31
3.1.5	Kimyasal Malzemer	31
3.1.6	Cihaz ve Gereçler	32
3.1.7	Solüsyonlar	33
3.2	Yöntem	35
3.2.1	Lenfosit İzolasyonu	35
3.2.2	Sitogenetik Protokol	36
3.2.3	Preparat hazırlığı	36
3.2.3.1	Yaşlandırma	36
3.2.3.2	Denatürasyon ve hibridizasyon	37
3.2.3.3	Hibridizasyon sonrası yıkamalar	37
3.2.4	Değerlendirme	37
3.3	İstatiksel Analiz	38
4.	BULGULAR	39

5.	TARTIŞMA	.....	49
6.	ÖZET	.....	52
7.	SUMMARY	.....	54
8.	KAYNAKLAR	.....	56
9.	ÖZGEÇMİŞ	.....	66



# 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser, normal hücre çoğalmasını kontrol eden mekanizmalardaki bozukluklardan kaynaklanan genetik bir hastalıktır (21). Tüm kanserlerin %3'ünü oluşturan lösemiler, kemik iliğindeki hematopoetik hücrelerin malign tümörleridir. Lösemilerin periferik doku ya da kemik iliğindeki tek bir hücre içindeki genetik değişiklik sonucu ortaya çıktığı sanılmaktadır. Sayısal ve yapısal kromozom anomalilerin pek çok lösemi tipinde yaygın olduğu görülür. Lösemi tipinin belirlenmesi ve hastalığın prognozunun anlaşılmasında da kromozom anomalilerinin belirlenmesi önemlidir (51,63).

İlk kez 1903'te W.Turk tarafından tanımlanmış olan kronik lenfositik lösemi (KLL), olgun görünümlü B lenfositlerin klonal gelişimleri sonucu periferik kan, kemik iliği ve lenfoid dokularda ortaya çıkan neoplastik çoğalmasıdır (67, 89). KLL, programlı hücre ölümündeki (apoptoz) bozukluklardan kaynaklanır. Lösemik hücreler ivmesi artmış bir hızda bölündüklerinden dolayı değil de normalden çok daha uzun bir süre yaşadıklarından dolayı akümüle olurlar (12,72).

KLL, yetişkinlerde en sık görülen lösemidir . Heterojen seyirli bir hastalıktır. Prognozun belirlenmesinde Rai ve Binet klinik evreleme sistemleri kullanılmaktadır. Ancak bu sistemler prognozu belirlemede yetersiz kaldığından prognoz göstergesi olabilecek başka kriterlere ihtiyaç duyulmaktadır (68).

KLL'nin patogenezi altında yatan genomik aberasyonlarla ilgili bilgi halen kısıtlıdır. Bunun sebebi düşük mitotik aktiviteli tümör hücreleri ile kromozom bantlama ve konvansiyonel sitogenetik çalışmaların zorlaşmasıdır. Floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi ile genomik anomaliler, KLL hücrelerinden metafaz kromozomu eldesine gerek kalmadan ve bölünmeyen hücrelerde, tek hücre seviyesinde saptanabilir. FISH ile KLL vakalarının %80'inden fazlasında aberasyon tespit edilmiştir (49, 71, 83). KLL 'de en yaygın genomik aberasyon tipi delesyonlardır. 13q14 ve 11q22-23 bantları KLL'de en sık rastlanan delesyon bölgeleridir. 13q14 delesyonunun varlığı iyi prognozun göstergesi iken , 11q23 delesyonunun varlığı kötü bir prognostik değer olarak kabul edilmektedir.

Biz de çalışmamızda Türkiye'de ilk defa KLL hasta grubunda 13q14 ve 11q23 bantlarını lokus spesifik problar kullanarak FISH yöntemi ile delesyon açısından araştırmayı hedefledik. İnterfaz FISH tekniğini kullanara, 13q14 ve 11q23 delesyonlarının

anamlılığını değerlendirmeyi ve laboratuar bulgularımızı klinik-biyolojik 6zelliklerle ilişkilendirmeyi amaçladık.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. KANSER

Kanser, normal hücre çoğalmasını kontrol eden mekanizmalardaki bozukluklardan kaynaklanır. Çok hücreli canlılarda proliferasyon, farklılaşma ve tek bir hücrenin canlılığını sürdürmesi, organizmanın tüm ihtiyaçlarını bir bütün olarak karşılamak üzere özenle düzenlenmektedir. Bu düzenleme kanser hücrelerinde kaybolmuştur. Kontrolsüz bir şekilde büyürler, bölünürler ve tüm vücut içerisine yayılarak normal doku ve organların fonksiyonlarına müdahale ederler (21). Kanser, kontrolsüz hücre proliferasyonu ve klonal tümör gelişimi ile karakterize bir hastalık sürecidir. Kanserde programlı hücre ölümü (apoptoz) ve hücre proliferasyonu arasındaki denge bozulmuştur. Kanser; hücre çoğalmasının aşırı artışı, apoptozun baskılanması ya da bu ikisinin birlikte görülmesi ile atipik hücrelerin anormal artışı ve birikimi sonucu ortaya çıkmaktadır. Gerek tek bir bireyde sporadik olarak ortaya çıksın, gerekse bir ailenin bireylerinde kalıtsal bir özellik olarak görülsün, **kanser genetik bir hastalıktır** (62).

Kanserleşme sürecinin başlamasına pek çok farklı gendeki bozukluk dahil olmaktadır. Bu genler, hücre proliferasyonu sinyal yollarındaki proteinleri, kontakt inhibisyonun devamlılığına katılan hücre iskeleti bileşenlerini, mitotik döngünün düzenleyicilerini, programlı hücre ölümü mekaniğinin bileşenlerini ve mutasyonların saptanması ve tamirinden sorumlu proteinleri kodlamaktadırlar (62).

Kansere sebep olan farklı mutasyon tipleri vardır. Bu mutasyonlar, bir proto-onkogenin bir alleline fonksiyon kazandıran mutasyonlar, bir tümör supresör genin tek bir allelinin dominant negatif mutasyonu veya her iki allelinin fonksiyon kaybı mutasyonları ve kromozomal anomalilerdir. Tümörlerin çoğu translokasyonlar, delesyonlar ve inversiyonlar gibi kromozomal yeniden düzenlemelere sahiptirler (60, 62).

Malign tümörler, tümörün köken aldığı dokunun embriyonik orjinine göre sınıflandırılırlar. **Karsinomlar**, deri veya iç organların veya glandların epitelyal sınırları gibi endodermal ya da ektodermal dokulardan kaynaklanırlar ve kanserlerin %85'ini oluştururlar. %2'lik bir sıklıkla görülen **sarkomlar** ise kemik, yağ ve kıkırdak gibi mezodermal dokulardan köken alırlar. **Lösemiler** (%3) ve **lenfomalar** (%5) ise kemik

iliğindeki hematopoetik hücrelerin malign tümörleridir. Lösemiler tek hücre halinde çoğalırken, lenfomalar tümör kitleleri şeklinde büyüme eğilimindedirler (51).

### 2.1.1. HEMATOLOJİK MALİGNİTELER: LENFOMALAR VE LÖSEMİLER

İmmun sistemin tümörleri lenfomalar veya lösemiler olarak sınıflandırılırlar. Lenfomalar kemik iliği, lenf düğümleri veya timus gibi bir lenfoid dokunun içerisinde solid tümörler olarak çoğalırlar ve Hodgkin hastalığı ve non-Hodgkin lenfomaları içerirler. Lösemiler ise tek hücre halinde çoğalma eğiliminde olup, kanda lökosit sayısının artışıyla belirlenirler. Lösemi lenfoid veya myeloid soylarda gelişebilir (51).

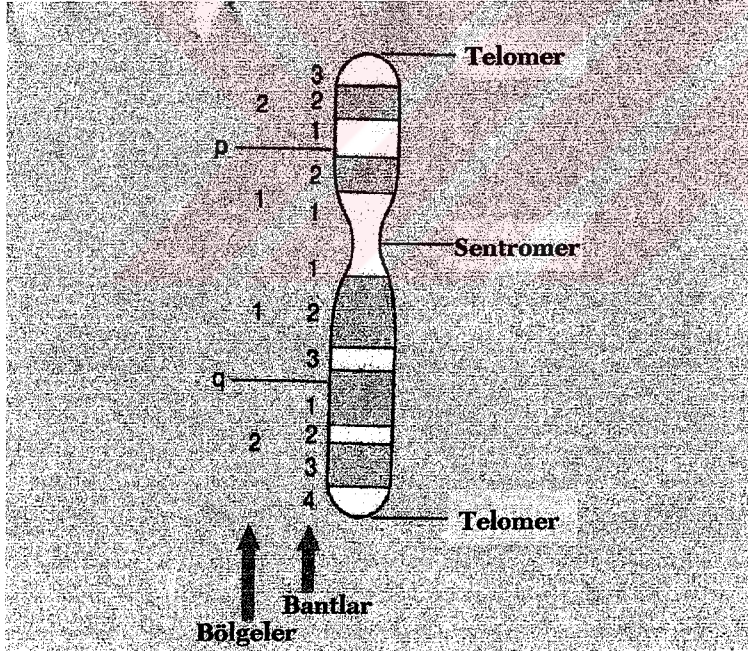
Lösemiler geçmişte, hastalığın klinik progresyonuna göre akut ya da kronik olarak sınıflandırılmışlardır. Akut lösemiler aniden ortaya çıkar ve hızla ilerlerken, kronik lösemiler daha az agresif olup hafif semptomatik bir hastalık olarak yavaş gelişim gösterir. Bu klinik farklılık tedavi edilmemiş hastalara özgüdür. Bugünkü tedavilerle akut lösemiler çoğunlukla iyi bir prognoza sahip olmakta ve tam remisyon sıklıkla başarılabilmektedir. Akut ve kronik lösemiler arasında bugün artık en temel fark olaya dahil olan hücrenin olgunluğudur. Kronik lösemiler olgun hücrelerde ortaya çıkarken, akut lösemiler daha az olgun hücrelerde ortaya çıkarlar. Akut lösemiler **akut lenfositik lösemi (ALL)** ve **akut myeloid lösemi (AML)**'yi içerir; bu hastalıklar her yaşta gelişebilir ve hızlı şekilde ortaya çıkarlar. Kronik lösemiler ise **kronik lenfositik lösemi (KLL)** ve **kronik myeloid lösemi (KML)** ve bu hastalıklar yavaş gelişim gösterip yetişkinlerde görülür (51).

Lösemik hücreler, normal hematopoetik progenitör hücrelerden ayırt edilebilir. Bu ayırım hücrelerin morfolojik ve sitokimyasal özelliklerine karyotipik veya genetik anomalilerine, antijen - reseptör genlerinin yeniden düzenlenmelerine göre ve immuno-fenotiplemeyle yapılabilir. Lösemi ve lenfomanın periferik lenfoid doku ya da kemik iliğindeki tek bir hücre içindeki genetik değişiklik sonucu ortaya çıktığı sanılmaktadır (63).

Sayısal ve yapısal kromozomal anomaliler pek çok B ve T hücreli lösemi ve lenfomada yaygındır. Lösemi tipinin doğru olarak belirlenmesi ve hastalığın prognozunun anlaşılmasında kromozomlardaki bu düzensizliklerin belirlenmesi önem taşımaktadır.

## 2.1.2. İNSAN KROMOZOM YAPISI VE ANOMALİLERİ

Somatik hücreler nükleuslarında 46 kromozom taşımaktadır ve bunlara 'diploid' denilmektedir. Yumurta ve sperm 23 kromozomlu olup 'haploid'dir. Kromozomlar, karyotipte birer çift oluşturarak ve 1'den 22'ye kadar boyları giderek kısalan bir şekilde sıralanmışlardır. Dişide 'XX' ve erkekte 'XY' şeklinde iki adet cinsiyet kromozomu mevcuttur. Her bir kromozomun bir kısa kolu 'p' (petit = kısa) bir de uzun kolu 'q' (que = kuyruk) vardır. Kromozomların boyanması sonucu her bir kolda sentromerden dışa doğru bazı bölgeler gözlenir ki bu bölgelere 'bant' adı verilir (Şekil 1).



Şekil 1: Kromozom yapısı

İnsanda kromozomal anomaliler iki ana gruba ayrılır:

### 1. Sayısal kromozom anomalileri

Normal insan kromozom sayısı olan 46 herhangi bir şekilde değişirse sayısal kromozom anomalileri ortaya çıkar. Hücrelerdeki kromozom sayısı o organizma için normal olan haploid ( $n$ ) sayının tam katları halinde artmışsa buna **öploidi** denir. Normal somatik hücrelerin diploid ( $2n$ ) özelliğine ek olarak triploidi ( $3n$ ) ve tetraploidi de ( $4n$ ) bildirilmiştir. Hem triploidi hem de tetraploidi ölümcüldür (62).

Haploid sayının katları halinde olmayan artma ve eksilmeler ise **anöploidi** olarak adlandırılır. Anöploid hastalarda ya trizomi ya da daha az sıklıkla monozomi görülür. Hem trizominin hem de monozominin ciddi fenotipik sonuçları olabilir (62).

### 2. Yapısal kromozom anomalileri

- Translokasyon (Yer değiştirme)
- Delesyon (Eksilme)
- Duplikasyon (Artma)
- İnversiyon (Ters dönme)
- İnsersiyon (Katılma)
- Halka kromozom
- İzokromozom

Yapısal değişiklikler, hücre döngüsünün S fazı esnasında gerçekleşir ve DNA replikasyonu süresince DNA moleküllerinin yanlış tamirini ve hataların yanlış düzeltimini içerir. X ışınları veya kimyasallar gibi çevresel ajanlar da kromozom kırıklarını uyandır.

**Translokasyon** , kromozomların bir tanesinden kopan bir parçanın diğer kromozomda kırılan yere giderek yapışması olayıdır. Homolog olan ya da olmayan kromozomlarda kopan parçaların karşılıklı olarak yer değiştirmesine **karşılıklı (resiprokal) translokasyon** denir. Bu tip translokasyonda iki kromozom arasında dengeli değiş tokuş (**dengeli translokasyon**) söz konusu olup, hiçbir genetik materyal kaybolmamaktadır. **Robertsonian tipi translokasyon** ise iki akrosentrik kromozomun

sentromerinde ya da yakınında füzüyon (kaynaşma) olması ile gerçekleşir. İnsan Sitogenetik Nomenklaturü Uluslararası Sistemi'ne (International System for Human Cytogenetics Nomenclature- ISCN) göre **translokasyon** 't' harfi ile ifade edilir: Örn; **t (9;22)** gibi.

**Delesyon**, kromozomların parça kaybetmesi olayıdır. Kromozomun bir kolunun ucundan kromozomal materyal kaybına sebep olan delesyonlara **terminal delesyon** denir. Buna en iyi örnek 'kedi miyavlaması' hastalığında 5. kromozomun kısa kolunun silinmesidir. Kromozomal materyal kaybı bir kromozom kolunun içinde gerçekleşiyorsa buna **intertisyel delesyon** adı verilir. İki homolog kromozomdan sadece birinin delesyonlu olmasına **heterozigot (veya hemizigot) delesyon** denir. Homolog kromozomların her ikisinin de aynı bölge için delesyonlu olmasına ise **homozigot delesyon** denir. ISCN'ye göre delesyon 'del' kısaltması veya '-' işareti ile ifade edilir. Örn., **del (13) (q14)** veya **(5p-)** gibi.

Homolog veya homolog olmayan kromozomlardan bir tanesinde iki yerde, diğerinde bir yerde kırılma ve kopma oluştuktan sonra, iki yerde kopma ile aradan çıkan parça tek yerden kopanın yerine giderek kaynaşırsa **duplikasyon** denilen olay meydana gelir. Duplikasyon 'dup' kısaltması ile ifade edilir.

Bir kromozomun iki yerinde kopma oluşur ve kopan parça aynı yere kendi ekseni etrafında 180° dönerek tekrar yapışırsa buna **inversiyon** denir ve 'inv' kısaltması ile gösterilir. Örn., **inv (9) (p13q22.3)** gibi.

Kromozom materyali bir kromozom koluna ekleniyorsa buna **insersiyon** denir. ISCN'ye göre insersiyon 'ins' kısaltması ile gösterilir.

Bir kromozomda kırılma ve kopma olduktan sonra, kopmanın gerçekleştiği uçlar birbirleri ile birleşirse **halka (ring)** biçiminde bir kromozom yapısı oluşur ve 'r' ile gösterilir. Örn., **46,X,r (X)** gibi

Bir kromozomda bölünme yanlış eksen boyunca olursa ortaya çıkan kromozom bir koldan iki kopya içerir ve diğer kol kayıptır. Böyle kromozomlara **izokromozomlar** denir ve 'i' ile gösterilir. Örn., **46,X,i (Xq)** gibi (3, 62, 69, 87).

## 2.2 KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMI

Kronik lenfositik lösemi (KLL) olgun görünümlü B lenfositlerin klonal gelişimleri sonucu periferik kan, kemik iliği ve lenfoid dokularda birikmesidir (67). Bu birikim proliferasyonun artmasının değil de lenfositlerin uzamış yaşam sürelerinin bir sonucudur (4, 12). Hastalık ilk defa 1903'de W. Turk tarafından tanımlanmıştır (89).

### 2.2.1. EPİDEMİYOLOJİ

KLL, tüm lösemiler arasında yaklaşık %25-30'luk bir oranla batı yarım kürede görülen en yaygın lösemi tipidir (80, 38). KLL, 70 yaştan büyük kişilerde 100.000'de 20'den büyük insidans ile ileri yaşın bir hastalığıdır. Tanıda ortalama yaş 55'tir. KLL'nin insidansı, erkek/kadın oranı yaklaşık 1.7/1 olarak, erkekler arasında daha yüksektir. KLL, Japonya, Çin ve diğer Asya ülkelerinde nadirdir (30, 73).

### 2.2.2. ETYOLOJİ VE PATOGENEZ

KLL'nin etyolojisi halen bilinmemektedir. Sonradan kazanılan bir hastalıktır. Radyasyona, kimyasallara veya alkilleyici ajanlara maruz kalmanın hastalığa neden olan bir etkisi bulunmamıştır. DNA ve retrovirüslere bağlı infeksiyonlar ile birlikte olan vakalar bildirilmiş fakat sonraki çalışmalarda bir neden sonuç ilişkisi bulunamamıştır (41).

KLL'de lösemik hücrelerin proliferasyon hızlarında herhangi bir artış olmaksızın progresif birikimleri söz konusudur. KLL'deki lenfositler uzamış yaşam sürelerine sahiptirler (12, 29). Son çalışmalar KLL'nin programlanmış hücre ölümü veya apoptoz yolaklarındaki hatalardan kaynaklanan insan kanserlerinin klasik bir örneği olduğu yönündedir (12,72).

Bcl-2 (B cell leukemia/lymphoma-2 protein) ailesinden proteinlerin apoptozda anahtar düzenleyici olarak işlev gördüğü bilinmektedir. Bcl-2 apoptozu bloke eder. KLL'li hastaların lösemi hücrelerinin % 90'ından fazlasında Bcl-2 ailesi proteinlerinin aşırı ekspresyonu söz konusudur. Ayrıca BAX (Bcl-2 associated X protein) ve BAK(Bcl-2 antagonist/killer protein 1 (apoptozu indüklerler), BCL-2 (anti -apoptotik), BAD (Bcl-2

associated death protein), BIK (Bcl-2 interacting killer protein) ve HRK (harakiri) (anti-apoptotik inhibitörler) gibi temel pro- ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerinin oranındaki dengesizlik de KLL'nin davranışı ve tedaviye cevabında önemli rol oynamaktadır (12,16).

p53 tümör baskılayıcı gendeki mutasyonların ve sikline bağlı kinaz inhibitörü p27'nin ekspresyon seviyelerindeki artışın da hastalığın ilerleyişi ve kötü prognoz ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Tedaviye kötü cevabın p53 mutasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (22, 90).

KLL hastalarının birinci derece akrabalarında; KLL, diğer B-hücreli neoplaziler ve otoimmün hastalıkların insidansı, toplumdaki diğer bireylere göre yüksek bulunmuştur. Bu hastalar ile otoimmün hastalığı varolan akrabalarının HLA ("human leucocyte antigen"-insan lökosit antijeni) haplotip incelemesi benzerlik göstermektedir. KLL'de lenfositlerin çoğunluğu CD5(+) B lenfositleri olduğundan bu hücrelerin otoimmüniteden sorumlu olabileceği düşünülmektedir (15). Bu nedenle MHC ("major histokompatibility complex" - büyük doku uygunluk kompleksi) incelemeleri yapılmıştır, fakat normal popülasyondan farklı bir HLA haplotipi saptanmamıştır (61).

### 2.2.3. BÜYÜME VE FARKLILAŞMA

KLL'deki lösemik hücreler  $G_0$  evresinde duraklamıştır (30). B-hücre farklılaşmasının geç evrelerinde duran KLL hücreleri in vitro ortamda hastalığın fizyopatolojisinin en azından bazı yönlerini açıklayan belirgin özellikler gösterirler.

Kültüre edilen KLL hücreleri ortamda sitokinler ve mitojenler olmadığı takdirde apoptoz ile hızla ölürlür. KLL hücrelerinin kültür esnasında bcl-2 proteinini kaybettikleri gösterilmiştir. Kültüre IL-4 veya IFN-  $\gamma$  eklenmesi apoptozla hücre ölümünü inhibe eder. IL-4 ile muamele edilen KLL hücrelerinde bcl-2 protein ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir (47, 52). KLL hücreleri, B-hücre mitojenleri veya forbol esteri TPA (tetradecanoylphorbol acetate) varlığında kültüre edildiğinde, plazmasitoid farklılaşma kapasitesindedir. Bu da bu hücrelerin B-hücre farklılaşması yolağında ara bir evrede

'donup' kalmadığı fikrini önermektedir. KLL hücrelerinin farklılaşmalarının uyarımı süreci karmaşıktır. Bu süreç sitokin üreten, non-neoplastik T hücreler de dahil olmak üzere in vitro şartlarda farklılaşmaya giren normal B hücreleri için gerekli olan tüm ko-situmulator etmenlere gereksinim duyar (73).

## 2.2.4. LENFOSİTLERİN İMMUNOFENOTİPİK PROFİLLERİ

### B Hücreleri

Normal T hücre / B hücre oranı KLL'de tersine dönmüştür. KLL'de tüm lenfositlerin yaklaşık %90'ını B hücreleri oluşturur. KLL B hücrelerinde yüzey Ig sentezi azalmıştır. IgM en sık rastlanılan immunoglobulindir. Tek başına veya IgD ile birlikte olabilir.  $\kappa$  veya  $\lambda$  hafif zincirlerinden yalnızca birini taşırlar. Bu hücreler fare eritrositleri ile rozet oluştururlar. Birkaç vakada intrasitoplazmik immunoglobulinler de saptanmıştır. Bazı B hücrelerinin Fc fragmanları, IgG ve kompleman (C3d) için reseptörleri vardır. Monoklonal antikolar kullanılarak KLL'deki B hücrelerinin bir pan-T hücre antikoru olan Leu (CD5) ile pozitif boyanırken aynı zamanda B1 (CD20), B4 (CD19), CD23 (aktivasyon markeri, düşük afiniteli Fc reseptörü) ve BA1 (CD24) B-hücre monoklonal antikolarının en azından biri ile de pozitif boyandıkları gösterilmiştir. Bu hücreler büyük doku uygunluk kompleksi sınıf II antijenlerinden HLA-DR'yi eksprese ederler. CD25 (IL-2 reseptörü) ve CD 11c ( $\beta_2$  integrin) ve yüzey adezyon molekülleri CD54, CD58 ve L-elektin ekspresyonunda kayda değer bir heterojenite vardır. Bu fenotipik ifadenin genel değerlendirmesi, KLL hücrelerinin B- hücre farklılaşması yolağının ara bir evresinde durmuş olan nispeten olgun hücreler olduğu yönündedir (73).

Normal B lenfositlerin küçük bir alt kümesinin CD5+ oldukları bilinmektedir. Bu normal CD5+ B-hücre alt topluluğunun KLL'de proliferen olan ve biriken grup olup olmadığı bilinmemektedir. Ancak bilinmektedir ki CD5 KLL vakalarının % 95'inde mevcuttur (15).

Lösemik B hücreleri antijenik uyarıya cevap veremediğinden hastalarda hipogamaglobulinemi vardır. Ancak bu hastaların yaklaşık %15'inde eritrositlere karşı

antikorlar mevcuttur ve bu nedenle de hemolitik anemi görülür. İlginç olarak B hücrelerinin CD5+ bu alt grubu, lupus eritromatozus gibi bazı hastalıklarda ortaya çıkan oto-antikorların kaynağı olarak gösterilmektedir (15).

Antijene immun cevapta kritik bir adım da aktive T hücreleri tarafından üretilen CD40 ligandın (CD40L veya CD154) ekspresyonudur. Lösemik KLL lenfositlerin etkisiyle T lenfositlerinde bu ligandın miktarındaki düşüklük ciddi immun yetmezlik durumlarına yol açar. Fonksiyonel bir CD40 ligandı KLL hücrelerine transfer ederek otolog lösemik hücrelere karşı sitotoksik T lenfosit oluşturmayı kapsayan gen terapisi çalışmaları devam etmektedir (48).

### **T hücreleri ve Doğal Öldürücü Hücreler**

KLL'de kemik iliği ve lenf nodlarındaki yardımcı T hücre sayısı artmıştır. KLL'de CD4 / CD8 T hücre oranı azalmıştır. Doğal öldürücü (natural killer-NK) hücreler genelde azalmıştır (73)

## **2.2.5. KLİNİK ÖZELLİKLER**

Hastalığın başlangıcı genellikle sinsidir ve başlangıç bulguları asemptomatik lenfadenopati olabilir. Semptomatik hastanın genellikle özgül olmayan yakınmaları vardır; halsizlik, kilo kaybı, egzersizde dispne ve büyüyen dalaktan dolayı karında dolgunluk hissi. Tanıda yaygın lenfadenopati, orta derecede büyümüş karaciğer ve dalak olağan bulgular arasında yer alır. Hastalık ilerledikçe solukluk ve peteşi görülebilir. Hipogamaglobulinemi nedeniyle bakteriyel enfeksiyona yatkınlık sözkonusu olabilir. Bakteriyel, viral ve fungal enfeksiyonlar ilerleyen KLL'nin belirtilerindendir (3).

Tanı için birçok kriter geliştirilmiştir. 1988'de "Ulusal Kanser Enstitüsü sponsorluğundaki Çalışma Grubu ("National Cancer Institute-sponsored Working Group" - NCI-WG) ve "Uluslararası Kronik Lenfositik Lösemi Semineri ("International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia" - IWCLL) tarafından tanı kriterleri, evreleme ve tedavi yöntemleri ortaya konmuştur (19).

IWCLL tanı kriterleri; lenfosit sayısının  $> 10 \times 10^3 / \text{mm}^3$  olması, kemik iliği biyopsi incelemesinde hücrelerin % 30'undan fazlasını lenfositlerin oluşturması ve CD5 pozitif B-lenfositlerin tipik fenotipik özelliklerinin saptanmasıdır. Kandaki lenfosit sayısı  $10 \times 10^3 / \text{mm}^3$  'den fazla ise diğer iki kriterden birinin varlığı veya lenfosit sayısı  $10 \times 10^3 / \text{mm}^3$  'den az ise diğer iki kriterin de pozitif olması tanı için gerekli görülmüştür (19)

NCI-WG tanı kriterleri; lenfosit sayısının  $> 5 \times 10^3 / \text{mm}^3$  olması ve CD5 pozitifliği ile birlikte en az bir B lenfosit yüzey antijeninin pozitif bulunması (CD19, CD20, CD23), prolenfosit sayısının %55'den az olması ve kemik iliği infiltrasyonunun %30'dan fazla bulunmasıdır (19).

KLL, prolenfositik lösemiye ya da Richter sendromuna, nadiren de akut lenfositik lösemiye transforme olabilir (8).

## 2.2.6. KLİNİK EVRELENDİRME

KLL heterojen seyirli bir hastalıktır. Çoğunda yavaş seyir gözlenir. Fakat hastaların bir kısmında hızlı seyir ve buna bağlı kötü prognoz gözlenirken bazı hastalarda da transformasyon görülür. Bu nedenle bu hastalığın seyrinin erken evrelerde tahmin edilebilmesi tedavinin belirlenmesi açısından çok önemlidir. Bu amaçla klinik evrelendirme sistemleri geliştirilmiş ve uzun süreden beri yapılan çalışmalar sonucu prognostik değeri olan biyolojik parametreler bulunmuştur (30).

Rai ve Binet sistemleri KLL'de en yaygın kullanılan evrelendirme sistemleridir. Ancak her iki sistem de erken evrelerdeki hastalığın ilerleyip ilerlemeyeceğini yeterince tanımlayamamaktadır. Bu sebeplerden dolayı klinisyenler genelde her iki evreyi beraber kullanmaktadırlar (9, 74). Bunların haricinde alternatif evrelendirmeler de geliştirilmiştir. Rai ve Binet evrelendirme kriterleri Tablo 1'de gösterilmektedir.

Tablo 1: Rai ve Binet Evrelendirme sistemleri

Evreleme sistemi	Evre	Klinik-hematolojik özellikler	Ortalama sağkalım (yıl)
<b>Rai</b>	0	Lenfositoz	> 10
	I	Lenfositoz + lenfadenomegali	7
	II	Lenfositoz + splenomegali	7
	III	Lenfositoz + anemi (Hb < 11g/dl)	1.5
	IV	Lenfositoz + trombositopeni (trombosit < 100.000/mm <sup>3</sup> )	
<b>Binet</b>	A	Lenfoid alan* < 3	> 10
	B	Lenfoid alan ≥ 3	5
	C	Anemi (Hb < 11g/dl) ve/veya Trombositopeni (trombosit < 100.000/mm <sup>3</sup> )	2

\* Tek veya iki taraflı servikal ,aksiller ve inguinal bölgeler, dalak ve karaciğer lenfoid alanlardır.

## 2.2.7. PROGNOSTİK FAKTÖRLER

Tedavi stratejisinin belirlenmesinde Rai ve Binet klinik evrelendirme sistemlerinin yanısıra birtakım laboratuvar parametrelerinin de prognoz göstergesi olabileceği öne sürülmüştür. Lenfosit katlanma zamanı (LKZ),  $\beta_2$  – mikroglobulin, solubl CD23 ve laktat dehidrogenaz enzim (LDH) miktarı, kemik iliği infiltrasyon şekli ve kromozomal anomaliler yardımcı prognostik faktörler arasında sayılabilir (18, 29, 30, 75).

**Lenfosit katlanma zamanı (LKZ):** Tedavi almayan hastalarda kandaki lenfosit sayısının iki katına çıktığı süre lenfosit katlanma zamanı olarak adlandırılır. KLL hastalarında

lenfosit katlanma zamanının <12 ay olması durumunda kötü prognozdan ,  $\geq 12$  ay olması durumunda ise iyi prognozdan söz edilir (30, 58).

**Kemik iliği histopatolojisi:** Kemik iliğinin KLL hücrelerince infiltrasyonu diffüz veya non-diffüz olmak üzere ikiye ayrılır. Non-diffüz infiltrasyon nodüler, intertisyel veya mikst tiplerde olabilir (71). Diffüz tutulum paterni kötü prognoz göstergesidir (30, 75).

**Lösemik hücre fenotipi :** Atipik morfoloji kötü klinik gidişat ile ilişkilidir. Eğer lösemik hücrelerin %55'sinden fazlası prolenfositik morfolojiye sahipse hastalık prolenfositik lösemiye ilerlemiştir. İleri evre ile ilişkili bir diğer durum da düşük veya eser miktarda CD11a ve Cd18 ekspresyonudur (8).

**CD38 ekspresyonu:** Son dönemlerde yapılan çalışmalarda CD38 aktivasyon belirtecinin prognostik önemi üzerinde durulmaktadır. Bu çalışmalar KLL'yi CD38 ekspresyonu  $< \%30$  (CD38<sup>-</sup>) ve  $\geq \%30$  (CD38<sup>+</sup>) olarak iki gruba ayırmaktadır. CD38 pozitifliği kötü prognoz ile ilişkili bulunurken, CD38 negatifliğinin iyi prognoz ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (20, 40, 65).

**Sitogenetik:** Anormal karyotipe sahip hastalarda sağkalım normal karyotiplilere göre daha kısadır (29, 44, 46). Trizomi 12'li hastalarda prolenfosit sayısında artış vardır ve hastalık progresyonu hızlı seyrederek (59, 66). 11q22-23 delesyonlu (özellikle genç) hastalarda, hastalığın progresif olduğu ve sağkalım süresinin kısaldığı gösterilmiştir (33). 17p delesyonu ve p53 geni mutasyonu veya delesyonu olduğunda hastalık tedaviye dirençlidir (11, 31, 78). Tüm bunlar kötü prognoz nedenleridir. 13. kromozomun uzun kolundaki delesyonlar KLL'li hastalarda iyi prognozun belirtisidir (42).

**Beta-2-mikroglobulin:** Birçok lenfoproliferatif hastalıkta olduğu gibi KLL'de de  $\beta$ -2-mikroglobulin düzeyleri yüksektir (  $>2300$  ng/ml ). Hastalık aktivitesi ve tümör yükü ile doğru orantılı artış gösterir (28).

**Telomeraz aktivitesi:** Ortalama telomer boyları ve telomeraz aktiviteleri KLL'de sağkalım ile ilişkili bulunmuştur. Ortalama telomer boyu telomeraz aktivitesi ile ters orantılıdır. 6 kb'den daha kısa telomer uzunluğuna sahip lösemik hücrelerde telomeraz aktivitesi yüksek iken, 6 kb'den daha büyük telomer uzunluğuna sahip olan bireylerde

telomeraz aktivitesi düşük bulunmuştur. Yüksek telomeraz aktivitesine sahip lösemik hücreleri olan hastalarda ortalama sağkalım lösemi hücrelerinin telomeraz aktivitesi düşük olanlara göre belirgin olarak daha kısadır (8).

**IgV gen mutasyon durumu:** KLL hücreleri mutasyon oranı  $< \%2$  (mutasyonsuz) veya  $\geq \%2$  (mutasyonlu) olan V genleri eksprese ederler. Mutasyonsuz grupta mutasyonlu gruba göre hastalık daha agresif olup sağkalım da daha kısadır (40, 65, 20).

## 2.2.8. TEDAVİ

KLL tanısı konulduktan sonra , hastalığın nasıl takip edileceği, hangi durumlarda ne tür tedavi uygulanması gerektiği çok önemlidir. Bu amaçla klinik ve biyolojik parametreler kullanılabilir. Hastalık aktivitesi düşük olgularda (Rai evre ve/veya Binet A , kemik iliği tutulumu diffüz olmayan , anemi veya trombositopeni olmayan, lenfosit sayısı  $< 30 \times 10^9 / L$  olan ve LKZ  $\geq 12$  ay olan hastalar) hastalık progresyonu gözlenene kadar tedavisiz takip edilir. Erken evre hastalarda yapılan çalışmalarda, tedavi verilmesinin böyle hastalarda sağkalım süresini uzatmadığı gösterilmiştir (77).

Tedavide; alkilleyici ajanlar, kortikosteroidler, fludarabine, 2 klorodeoksiadenozin, pentostatin (2-deoksikoformisin), interferon-alfa, yüksek doz immunoglobulin, kombinasyon tedavileri ve radyoterapi kullanılmaktadır. Otoimmün hemolitik anemi ve/veya trombositopeni geliştiğinde splenektomi uygulanabilir. Kemik iliği transplantasyonu genç olgularda uygulanabilir (8, 30).

**Gen Tedavisi:** KLL'de gen tedavisinin amacı KLL fenotipini değiştirmek olacaktır. Böylece KLL hücreleri sunulan antijenlere cevap verecek olan T hücrelerini uyarabilecek kapasitede olacaktır. CD40 ve ligandının (CD40L veya CD154) aktive T hücreleri üzerindeki ekspresyonu B-hücre aktivasyonu, sağkalımı ve farklılaşmasında anahtar rol oynar (48).

## **2.3. KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİDE GENOMİK ABERASYONLAR**

KLL, yetişkinlerde en sık görülen lösemidir. Yüksek insidansına karşılık, KLL'nin patogenezi altında yatan genomik aberasyonlarla ilgili bilgi halen kısıtlıdır. Bunun sebebi esasen tümör hücrelerinin düşük mitotik aktivitesi nedeniyle kromozom bantlama ile konvansiyonel sitogenetik çalışmaların güçleşmesidir. Öte yandan Southern blot analizi veya polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) gibi moleküler genetik teknikler de KLL'de etkilenen yalnızca birkaç bölge için aday genlerin biliniyor olması gerçeğinden dolayı sınırlıdır. Floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi ile genomik anomaliler KLL hücrelerinden metafaz kromozomu eldesine gerek kalmadan, bölünmeyen hücrelerde, tek hücre seviyesinde saptanabilir. Genom çapındaki kütüphanelerden elde edilen DNA problemleri ile genomik bölgeler önceki aday genin tanımlanmasına gerek kalmadan belirlenebilir. Bugün artık hastalığa özgü prob seti kullanılarak FISH ile KLL vakalarının %80'inden fazlasında aberasyonlar tespit edilebilmektedir (49, 71, 83).

### **2.3.1. KLL'NİN GENETİK ANALİZİ İÇİN TEKNİK YAKLAŞIMLAR**

#### **2.3.1.1. Konvansiyonel Kromozom Bantlama Analizi**

KLL'deki anomaliler ilk olarak kısa dönem in vitro kültürlerin konvansiyonel metafaz kromozom analizi ile çalışılmıştır. Bu ilk çalışmalarda önemli bir problem metafaz eldesinin azlığıdır ve 1970'lerin sonuna kadar KLL için karakteristik bir kromozom anomalisi gösterilmemiştir (57). 1980'lerde kullanılmaya başlanan TPA, lipopolisakkarid, pokeweed mitojen, anti-insan IgM, B-hücre büyüme faktörü ve anti-CD40 antikoru gibi B-hücre mitojenlerinin kullanılması B-hücrelerinin in vitro ortamda bölünmelerine olanak vermiş ve kromozom aberasyonlarının tanımlanmasını sağlamıştır. Ancak bundan sonra da sıklıkla sadece klonal anomalileri olmayan metafaz yaymaları elde edilmiştir (36). İmmunofenotipleme ve karyotiplemeyi birleştiren bir çalışmada B-hücre mitojenleri kullanılmasına rağmen KLL örneklerinden elde edilen normal metafaz yaymaların çoğunlukla lösemik olmayan T hücrelerinden köken aldığı görülmüştür (1). Gelişmiş hücre kültür tekniklerine rağmen, 1990'ların başında kromozomal anomaliler

KLL vakalarının yalnızca %40-50'sinde saptanabilmekteydi. Ayrıca aberasyonların gösterilmesi ve özelliklerinin belirlenmesi kötü kromozom kalitesi nedeniyle çoğu zaman engellenmiştir (45).

Kromozom bantlama teknikleri ile KLL'de ilk gösterilen anomali trizomi 12 olmuştur. Daha sonra 1980'lerde 13.kromozomun uzun kolu kapsamında, çoğunlukla delesyonlar, nadiren translokasyonlar şeklinde q14 bandı ile ilgili yapısal anomaliler saptanmıştır. Farklı sıklıklarda tanımlanan diğer kromozom anomalileri 6q, 11q ve 17p'nin delesyonları, kısmi veya total trizomi 3 ve 14q32 bandını içeren translokasyonlardır. Günümüzde artık 14q32 anomalisinin t(11;14)(q13;q32)'nin bir sonucu olduğu bilinmektedir (45).

### **2.3.1.2. Floresan In situ Hibridizasyon Yöntemi (FISH)**

FISH, nükleik asit problemlerinin sitolojik hücresel veya kromozom preparatları üzerinde denatüre edilmiş olan DNA veya RNA ile hibridizasyonuna dayalı bir tekniktir. Hücresel ya da kromozomal bölgenin görünür hale gelmesi ancak spesifik olan problemlerin kullanımı ile mümkün olabilir. Bu nedenle hibridizasyonun güvenilir ve duyarlı olabilmesi için in situ hibridizasyon yönteminde prob seçimi önemli bir aşamadır (43).

Sitogenetik alanda kullanılacak 4 farklı prob çeşidi bulunmaktadır.

#### **1- Satelit problemleri**

Primat kromozomların sentromerik bölgesi olarak tekrarlayan uzun DNA sekanslarından oluşur.  $\alpha$  - satelit problemler anöploid tanısında, tüm kol ve Robertsonian tipi translokasyonlarında sentromer değerlendirilmelerinde ve "marker" ve "halka" kromozom orijinlerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır

#### **2- Lokusa özgü problemler**

15-500 kbp (kilo base-pair- kilo baz çifti) arasında değişirler. Klonlanmış genlere özgü dizileri içeren bu problemler ile genellikle ilgili kromozomların sayısal düzensizliklerinin belirlenmesi mümkün olup, yapısal düzensizlikler ve mikrodelsyonların da tanısı

yapılabilmektedir. Plazmid, faj, YAC ("yeast artificial chromosome"- maya yapay kromozomu), kosmid klonları ile oligonükleotidler lokusa özgü problemlerdir.

### **3- Tüm kromozom boyama problemleri:**

Kromozom boyunca değişik bölgelere özgü DNA dizisi içeren prob karışımlarının kullanılması halinde, o dizilere özgü olan kromozomlar da tümü ile boyanırlar. Translokasyonların belirlenmesinde kullanılan bu tip problemler aynı zamanda marker ve halka kromozom incelemelerinde de kullanılmaktadırlar.

### **4- Banda özgü problemler:**

Özellikle dengesiz translokasyonlarda ve terminal delesyonların saptanmasında kullanılırlar.

FISH yönteminin sitogenetik alanda yaygın olarak kullanılmasının sebebi;

- Belirli bir DNA dizisinin her hücrede kaç kopya halinde bulunduğunu belirlemesi,
- Farklı fluorokromların birlikte ve değişik oranlarda kullanılması ile aynı anda bir hücrede kompleks translokasyon anomalilerini saptayabilmesi,
- Lokusa özgü prob kullanımı ile, lokusları içeren delesyon, insersiyon, duplikasyon ve inversiyon gibi diğer yapısal anomalileri saptayabilmesi,
- İnterfaz nükleuslarda da kromozom analizi yapma olanaklarını sunmasıdır.

### **Kanser Genetiği ve FISH**

Malin ya da pre-malin lezyonlardaki hücrelerin genomlarında meydana gelen sayısal ve yapısal aberasyonlar bazı olgularda hastalık prognozu ile yakından ilişkilidir. Neoplazmların başlaması ve gelişmesinde bu tür genetik değişikliklerin etkili olması kanser genetiğinin gelişmesini hızlandırmıştır.

Solid tümörlerde metafaz kromozomu elde edilmesi zor, hatta imkansızdır. Buna karşın FISH yönteminde nükleusların incelenebilir olması büyük bir avantajdır. Bu nedenle, FISH yöntemi kanser sitogenetiğinde uygulanan çok önemli bir teknik olarak görülür.

Mitotik indeksin düşük olması ve kromozom morfolojisinin güvenilir bir analiz için yeterli olmaması nedeni ile, FISH tümör hücrelerinde belirli bir kromozom için anöploidi tayininde sitogenetik yöntemlere göre daha hızlı, hassas ve güvenilirdir. Lösemilerde sayısal anomalilerin analizinde en yaygın olarak kromozoma spesifik tekrarlayan nükleotid

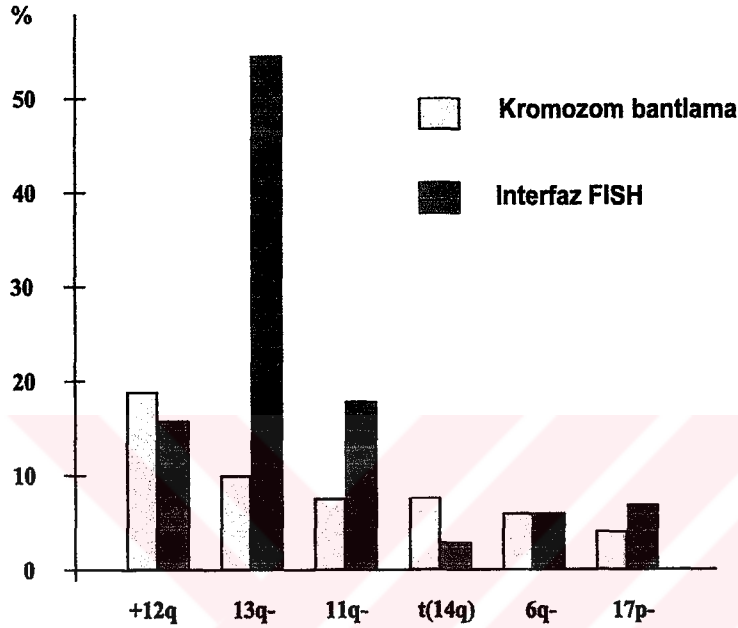
dizisi problemleri ( $\alpha$  ve  $\beta$  satelit DNA problemleri) kullanılmaktadır. Bu problemler hem metafaz hem de interfaz hücrelerde oldukça parlak sinyaller vermesi nedeni ile kolayca saptanabilmektedir. Sayısal anomaliler için ayrıca lokus spesifik problemlerden de yararlanılır (69).

Geçtiğimiz yıllarda FISH gibi sitogenetik teknikler, tümör hücrelerinde genomik aberasyonların gösterilmesindeki doğruluğu arttırmıştır (53). İnterfaz veya metafaz hücrelerindeki spesifik DNA dizileri floresan mikroskopu ile görüntülenen klonlanmış DNA fragmanları ile tanımlanır. Bu da sayısal ve yapısal aberasyonların gösterilmesine izin verir. Çünkü tümör hücre genomundaki kopya sayısı değişiklikleri bir hücredeki anormal sinyal sayısı ile belirlenirken translokasyon kırılma noktaları floresan sinyallerin anormal uzaysal dağılım şekliyle belirlenmektedir. FISH'in aberasyonları saptamadaki uzaysal çözünürlüğü konvensiyonel kromozom bantlamadan daha yüksektir. Kromozom bantlama analizleri ile yalnızca büyük anomaliler gösterilirken (örn., DNA'nın birkaç megabaz çiftine karşılık gelen yeniden düzenlenmiş veya kayıp kromozom bantları) FISH birkaç kilobaz çiftlik bir aralıktaki genomik aberasyonları saptayabilmektedir. Ayrıca genomik aberasyonların saptanması için bu olaya dahil olan bölgenin moleküler seviyede iyice karakterize edilmiş olması da gerekmez. PZR'ye dayalı yaklaşımlarla analizin aksine, araştırılan bölgenin dizi bilgisine ihtiyaç yoktur. Problemler, genom çapında kütüphanelerde mevcut bulunan YAC ("yeast artificial chromosome"- maya yapay kromozomu), PAC ("P1 derived artificial chromosome"- P1 kökenli yapay kromozom), BAC ("bacterial artificial chromosome"- bakteriyel yapay kromozom) veya kosmidlerde klonlanmış, fiziksel olarak haritalandırılmış çok sayıda fragmandan elde edilebilir (23).

İnterfaz sitogenetik yöntem ile uygun prob setleri kullanılarak yapılan çalışmalar, spesifik genomik aberasyonların prevalansının kromozom bantlama verilerinde ifade edilenden daha yüksek olduğunu göstermiştir. %50'lik bir oranla KLL vakalarında en sık görülen anomali 13q14 delesyonudur. Bundan sonraki en yaygın aberasyonlar 11q22-23 delesyonu (yaklaşık %20), trizomi 12 (%15-20), 6q21 delesyonu (%5-10) ve 17p13 (%5-10) delesyonudur (32).

İnterfaz FISH'in KLL'deki genomik aberasyonları saptamadaki hassaslığı bu anomalilerin hastalık progresyonu, tedaviye cevap ve sağkalım gibi klinik parametrelerle

korelasyonunun daha doğru yapılması için bir temel sağlamıştır. Yapılan çalışmalar KLL'de genomik aberasyonların en önemli bağımsız risk faktörleri arasında olduğunu göstermiştir (32). İnterfaz FISH ve kromozom bantlama tekniklerinin aberasyonları saptamadaki farkları Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2: KLL'de kromozom aberasyonları açısından metafaz ve interfaz sitogenetiğin karşılaştırılması

### 2.3.1.3. Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (KGH)

Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon ile (KGH) bir tümör genomundaki kromozom dengesizliklerinin genom çapında taranması, farklı tümör tipine dahil olan aday bölgelerin bilgisi olmaksızın yapılabilir. Biri tümör hücresinden köken almış diğeri normal dokudan köken almış ve farklı işaretlenmiş total genomik DNA örnekleri normal metafaz hücrelerine probmuşlar gibi eş zamanlı hibridize edilirler. Tümörde trizomiler, polizomiler ve DNA amplifikasyonları gibi aşırı ifade edilen kromozom bölgeleri metafaz kromozomlarının farklı bölgelerinde, farklı işaretlenmiş bir kontrol DNA'sının homojen

olarak boyanmasıyla karşılaştırıldığında, daha kuvvetli bir hibridizasyon sinyali ile saptanabilirler. Buna karşılık tümör genomunda monozomiler veya delesyonlar gibi az ifade edilen bölgeler metafaz kromozomlarında kontrol DNA'sıyla karşılaştırıldığında zayıf sinyalleri ile tespit edilebilirler. KGH, KLL'de kromozom dengesizliklerinin genom çapında taranmasında değerli bir ek teknolojidir (6, 74).

#### **2.3.1.4.Moleküler Genetik Teknikler**

KLL'de genomik aberasyonların moleküler seviyede tespiti, olaya dahil olan hemen hemen tüm genomik segmentlerdeki aday genlerin yokluğu ile sınırlıdır. Ek olarak, KLL örneklerinin klonal olmayan hücrelerle kontaminasyonu kantitatif Southern blot ya da mikrosatellit analizi gibi moleküler yaklaşımların hassasiyetini etkileyebilir. Kantitatif Southern blot veya mikrosatellit analizi ile delesyon taramaları, SSCP ("single strand conformation polymorphism"- tek iplik konformasyon polimorfizmi) veya DNA dizileme analizleri ile belli mutasyonların analizi yalnızca birkaç bölge ile sınırlıdır. KLL alt gruplarında sadece p53 ve *ATM* ("ataxia telangiectasia mutated") gibi bazı özel genler için patojenik bir rol tanımlanmıştır.

### **2.3.2. KLL'DEKİ GENOMİK ABERASYONLARIN KARAKTERİZASYONU**

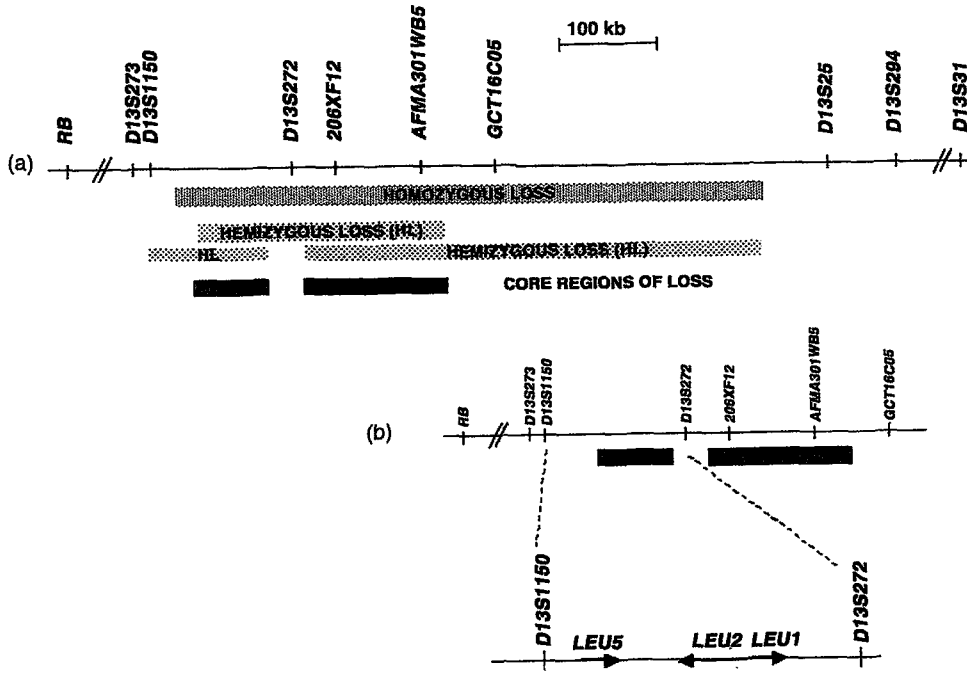
#### **2.3.2.1. 13q14 BANDINDAKİ DELESYONLAR VE ADAY GENLERİN GÖSTERİLMESİ**

İlk olarak 1980'lerin sonunda kromozom bantlama çalışmalarında, 13. kromozomun uzun kolunun KLL'de etkilendiğine dikkat çekilmiştir. Metafaz kromozom incelemelerinin çözünürlük düzeyinde 13q14 aberasyonlarının çoğu delesyonlar ve bazıları da dengeli translokasyonlar olarak bildirilmiştir. Ancak daha sonradan gelişen moleküler genetik tekniklerle translokasyon kırılma noktalarında submikroskopik delesyonların da bulunduğu gösterilmiştir (76). FISH yöntemiyle yapılan çalışmalarda 13q14 bölgesindeki

delesyonların yaklaşık %50'lik bir oran ile (%11-48) KLL'de en yaygın anomali olduğu saptanmıştır (32, 68, 39).

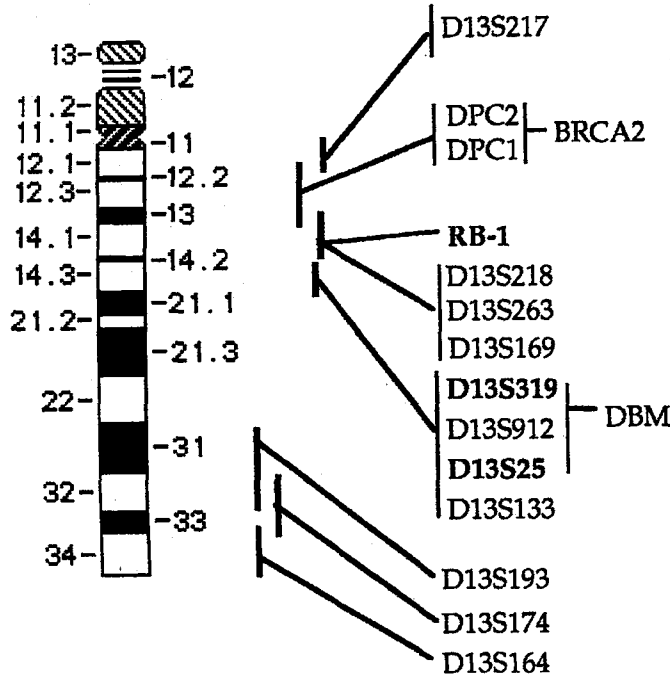
Delesyonların sık olduğu genomik bölgelerin, Knudson hipotezine (tümör supresör geni taşıyan iki allelden birinde delesyon olduğunda diğer gen bunu kompanse edebilir. Bu hipoteze göre ancak diğer allelde de mutasyon olduğu takdirde tümör supresör gen inaktive olabilir) uygun olarak bir allelin delesyona uğradığı kalan kopyanın da inaktive olduğu tümör supresör genler barındırdığı düşünülmektedir. 13q14 bandında dikkati çeken tümör supresör gen retinoblastoma genidir (RB1) (7, 91). Kalıtsal ve sporadik retinoblastoma dışında çeşitli tümörlerde de mutasyon ve/veya delesyonla her iki allelin inaktive olduğu düşünülmektedir. RB1 hücre siklusunun kontrolüne ve transkripsiyonun regülasyonuna katılan nükleer bir fosfoproteini kodlar. RB1'in bir allelinin delesyonu KLL'de sıklıkla görülür. Ancak tümör supresör genin inaktivasyonuna yol açan, iki-vuruş hipotezine uygun olarak her iki RB1 allelini de haraplayan anomalilerin nadir olduğu bildirilmiştir (55). Bu yüzden söz konusu bölgedeki diğer tümör supresör genler halen araştırılmaktadır. Bu bölgedeki aday genler Şekil-3'te gösterilmektedir.

13q14'ü içeren translokasyon kırılma bölgeleri RB1'i sağlam bırakırken, D13S25 markerı etrafına daha telomerik bir bölgenin kaybı ile RB1'e yaklaşık 1.6 cM telomerik yerleşmiş yeni bir tümör supresör gene dikkat çekmektedir (84). Bu bölge DBM ("deleted in B malignancies") olarak adlandırılır (42). Daha sonraki moleküler genetik çalışmalar kritik genin yerleşimini netleştirmiştir. Devilder ve ark., (27) söz konusu genin D13S25 ve D13S294 "marker"ının arasında olduğunu tesbit etmişlerdir. Ancak, 85 KLL'li hastada RB1 ve D13S25 delesyonlarının karşılaştırılması, kritik bölgenin D13S25'e daha sentromerik yerleştiğini göstermiştir. Liu ve ark (56), RB1 ve D13S25 arasına yerleşmiş olan D13S319 'marker'ının da içinde olduğu kritik bir bölge bularak, bu bulguyu desteklemiştir. Bullrich ve arkadaşları (14) ise D13S25 ve 206XF12 arasına yerleşmiş bir minimal delesyon bölgesi göstermişlerdir.



Şekil 3: 13q14'deki tümör supresör lokus. a) KLL'deki kayıp bölgesinin haritası  
b) LEU1, LEU2 ve LEU3 genlerini içeren bölgenin detayı

Kritik genomik bölgenin bulunduğu yeri belirlemek ve bu segmentteki aday genleri tanımlamak amacıyla , birçok araştırmacı RB1ve D13S25 aralığında yüzlerce kilobazı tarayan yüksek çözünürlüklü fiziksel haritalar yapmışlardır. Liu ve ark. (54), D13S272'ye sentromerik olan bölgede yerleşmiş bir minimal delesyon aralığı bulmuşlar ve bu bölgede yerleşen üç aday geni, LEU1 ve LEU2 ve LEU 5, ("leukemia associated gene" - lösemi ile ilişkili gen) olarak isimlendirmişlerdir. Ancak bu genlerin mutasyonel inaktivasyonu bulunmamıştır. Bouyge-Moreu ve ark. da (10) , 550 kb'lik kritik bir bölge tanımlamış ancak LEU1 ve LEU2'de mutasyonel bir inaktivasyon bulamamıştır. 13q14 bandında KLL'de etkili olduğu düşünülen tümör supresör gen ile ilgili araştırmalar devam etmektedir (Şekil 4) .



Şekil 4: 13q kromozom haritası

Yapılan bazı çalışmalarda 13q14 anomalilerinin KLL'de tipik lenfosit morfolojisiyle ilişkili olduğu bulunurken (50), diğer çalışmalarda bu korelasyon gösterilememiştir (2). Starostik ve ark. (82) 13q14 bandında delesyonu olan ve olmayan hastalarda sağkalım açısından bir fark bulmamışlardır. Hogan (42), 13q14 bölgesinde delesyonu olan KLL'lilerin (RB1, D13S19 veya D13S25 lokusları) delesyonlu olmayanlardan daha uzun bir süre tedavi gerektirmediğini göstermiştir. 13q14 delesyonlu vakalarda Ig genlerinde çok sayıda somatik mutasyon vardır. Üstelik, 13q14 delesyonlu hastalar karakteristik olarak genelde, sabit veya yavaş ilerleyen selim bir hastalık tablosu sergilerler. Bu delesyonun olduğu KLL hastaları sağlıklı kontrolleri kadar yaşarlar (42). Bu olumlu bulgulara karşın, 13q delesyonlarının prognostik anlamı üzerine yapılan yeni bir çalışmada da böyle bir sitogenetik anomalinin erken evre hastalarda (düşük  $\beta_2$ -mikroglobulin veya Rai evre 0-II) daha agresif bir davranış ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ancak bu sonuçlar küçük sayılarla sınırlıdır (82).

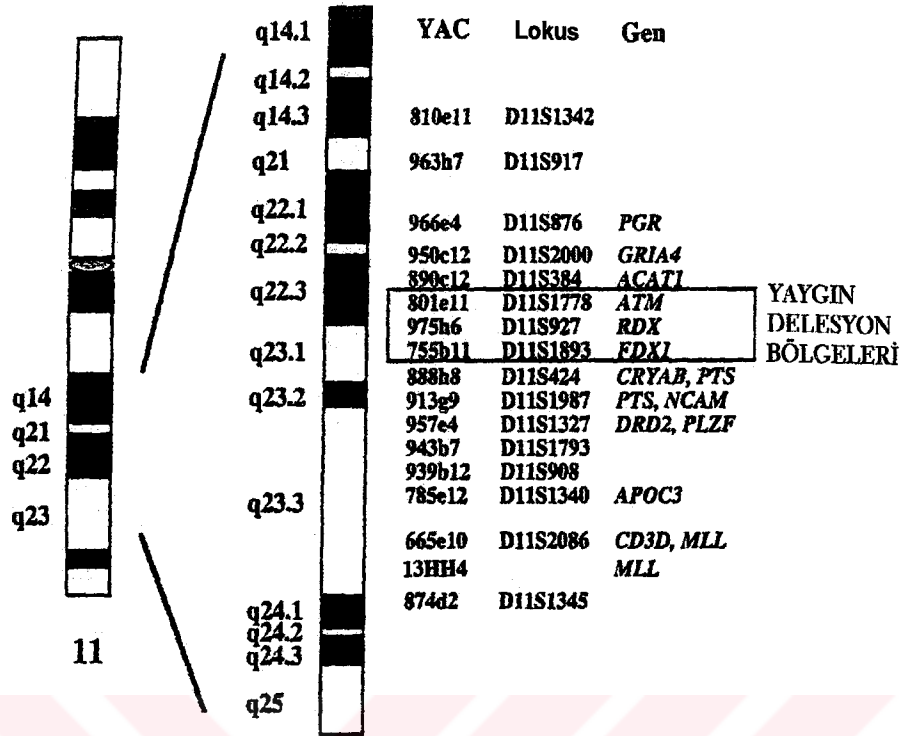
13q14 delesyonu dışında, bir çalışmada 13q12 bandındaki BRCA2 ("breast cancer 2") geninde bağımsız bir delesyon tanımlanmıştır (37). Ancak sonraki pek çok çalışmada BRCA2 delesyonu gözlemlenmemiştir Panoyotidis ve ark (68) 24 KLL hastası arasında hiçbir BRCA2 kaybı bulmamışlardır.

### 2.3.2.2 11q22-23 KROMOZOM BANTLARININ DELESYONLARI VE ADAY GENLERİN GÖSTERİLMESİ

11q22-23 'teki delesyonlar KLL vakalarındaki %20'lik oran ile en sık görülen ikinci genetik anomali olup ilerlemiş klinik evre (yaygın lenfadenopati), genç yaş ve hızlı hastalık progresyonu ile ilişkilidir (24, 64). Elli beş yaşından küçük bireylerde 11q kaybının sağkalımda azalma ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. 13q14 allelik kaybında olduğu gibi 11q kaybının da bir tümör supresör genin inaktivasyonu ile sonuçlandığı düşünülmektedir. Lenfoproliferatif hastalıklarda kromozom materyalindeki kayıpla sonuçlanan en yaygın yapısal aberasyonlardan bir tanesinin de 11q21-q25 bölgesini etkileyenler oldukları bilinmektedir. 11q bölgesindeki kromozomal kaybın 13q bölgesindeki delesyondan sonra ikinci en yaygın anomali olduğu ve prognostik önemi son çalışmalarla ortaya konmuştur (76, 92, 93).

11q delesyonu görülen 15 hematolojik neoplazmlı hastanın FISH çalışmasında nöral hücre adezyon molekülü ("neural cell adhesion molecule"- NCAM) genini içeren 11q23.1 bandında yaygın olarak delesyona uğrayan bir bölge bulunurken, 11q13'teki BCL1 lokusu ve 11q23.3'teki MLL ise kritik bölgenin dışına yerleştirilmiştir (29, 85).

KLL'de 11q delesyonlarından etkilenen kritik bölgeyi tanımlamak amacıyla 11q14.3 - 11q23.3 bantlarını kapsayan YAC contig probolar kullanılarak yapılan interfaz FISH çalışmalarının sonucunda 11q delesyonlarının 11q22.3-q23.1 bantlarında 2-3 Mb'lik tek bir minimal delesyon bölgesini etkilediği ve bu bölgede iki translokasyon kırık noktasının yerleştiği gösterilmiştir (86) (Şekil 5).



Şekil 5: 11q kromozom haritası

Bu bölgede yerleşen genler arasında RDX (radixin) ve ATM (ataxia-telangiectasia mutated) işlevlerinden dolayı aday tümör supresör genler olarak düşünülmektedir (87). RDX'in (radixin) NF-2 (nörofibromatozis-tip 2) genine homolojisi vardır. ATM'nin ise büyüme baskılayıcı işlevi hücre döngüsü kontrol noktalarına ve DNA'nın devamlılığına katılmasından ileri gelmektedir (5). KLL'de ATM'nin etkilenmiş olabileceği fikri KLL alt kümelerindeki eksik ATM protein ekspresyonu ile desteklenmektedir (81). Bullrich ve arkadaşlarının (13) yaptıkları çalışmada KLL hücrelerinde bulunan ATM mutasyonlarının germ-line'da da görüldüğü bunun da heterozigot ATM mutasyonu taşıyıcılarının KLL geliştirmeye meyilli oldukları fikrini desteklediği bulunmuştur Schaffner ve arkadaşları (79) ise böyle bir gözlemlerde bulunmamakla beraber çalışmalarında 11q22-23 delesyonu olan KLL hastalarının yalnızca %5'inde ATM mutasyonları gözlemlemişlerdir. KLL'de 11 kaybı ve ATM inaktivasyonunun biyolojik ve klinik anlamını netleştirmek için daha ileri

çalışmalara gerek vardır. Doneda ve arkadaşlarının yaptıkları 11q21-23 bölgesindeki FDX1 (ferrodoxin), NCAM ve APOC3 (apolipoprotein C3) aday genlerine yönelik yeni bir çalışmada da her üç bölgede delesyonlar tespit edilmiş ancak minimal delesyon bölgesi 11q22.3-q23.1 ile sınırlandırılmıştır (34). Bu sebepten dolayı KLL'de 11q22-23 bölgesinde bulunan başka genlerin de değişime uğrayabileceği olasılığı da göz önünde bulundurulmalıdır.

### 2.3.2.3. TRİZOMİ 12

1980'lerin başında konvansiyonel sitogenetik çalışmalarla KLL'deki en yaygın anomali olarak bildirilen 12. kromozomun trizomisi, moleküler genetik tekniklerin ilerlemesi ve DNA problemleri kullanılarak uygulanan interfaz FISH yöntemi ile KLL'de %15-20'lik bir oranla en sık rastlanılan üçüncü anomali olmuştur. İnterfaz sitogenetik çalışmalar sonucunda trizomi 12'nin lösemik hücrelerde atipik lenfosit veya prolenfosit sayısında artış ve atipik immunofenotip ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Trizomi 12'si olan KLL hasta grubunda diploid karyotiplere sahip olanlara nazaran daha kötü bir sonlanım bildirilmiştir. Ayrıca bu anomaliye sahip hastalar ileri hastalık evresinde olup, hastalıkları agresif bir davranış sergiler (59, 66).

### 2.3.2.4. 17p13 DELESYONU ve p53 MUTASYONU

İnterfaz FISH ile KLL'de %9-17 oranında 17. kromozomun kısa kolunda delesyon bildirilmiştir ve 17p13'te yerleşmiş olan p53 tümör baskılayıcı genin mutasyonu buna eşlik ettiği düşünölmektedir. p53 değişimlerinin KLL'nin klinik davranışı üzerine etkileri vardır ve kötü sağkalım ve ilaç direnci ile ilişkilidir (11, 31, 78).

### 2.3.2.5. 14q32'DEKİ *IgH* LOKUSU MUTASYONLARI VE YENİDEN DÜZENLEMELERİ

14q32'deki *IgH* lokusunda BCL-tipi protoonkogenlerle birlikte olan yeniden düzenlemeler KLL'de nadir görölen olaylardandır. İmmunoglobulin genlerindeki diğer bir önemli değişiklik değişken bölgelerdeki (*IgV*) mutasyonlardır. Bu konu KLL 'de son yıllarda oldukça önem kazanmıştır. Çalışmalarda, KLL vakalarının yaklaşık yarısında

post-germinal merkez B hücrelerinde gözlenen fizyolojik bir özellik olarak mutasyonlu *IgV* bulunmuştur. Bu yüzden iki tip KLL önerilmektedir; biri pregerminal merkez hücrelerinden köken alan , diğeri ise postgerminal merkez B hücrelerinden köken alan gruptur. Yapılan son dönem çalışmalarda *IgV* mutasyon durumunun CD38 ekspresyon seviyesi ile ters ilişkili olduğu bulunmuştur (26).

#### **2.3.2.6. DİĞER KROMOZOMAL ANOMALİLER**

KLL vakalarında meydana gelen diğerkromozom anomalileri %10'dan düşük bir oranda görülürler ve 6q delesyonu, 7q delesyonu, monozomi 21 ve 4q'dan ibarettirler. Bu anomilerde etkilenen genler tanımlanmamıştır ve KLL'de oynadıkları rol de bilinmemektedir (64, 85).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1 GEREÇLER**

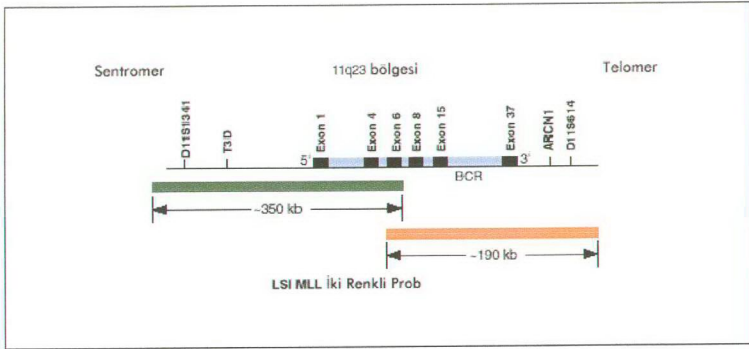
##### **3.1.1. Hasta Grubu**

Çalışmamızda, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Dahiliye Anabilim Dalı Hematoloji polikliniğinde 1992 ile 2002 tarihleri arasında takip edilen 40 KLL hastası değerlendirilmiştir. Yanlış pozitiflik oranının belirlenmesinde ise 3 sağlıklı erişkinden örnek alınmıştır.

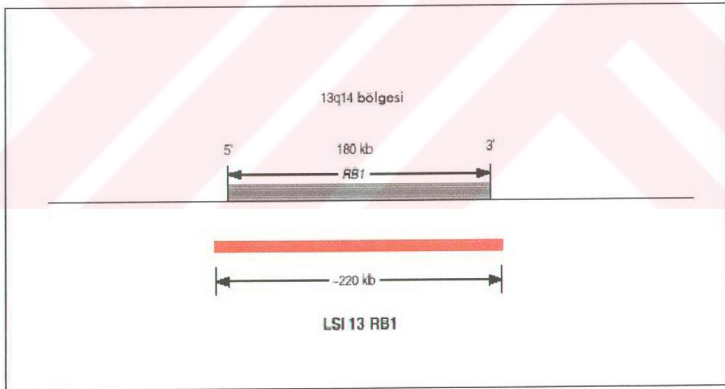
##### **3.1.2. Problar**

**LSI (Locus specific identifier) MLL (Myeloid/Lymphoid or mixed-lineage leukemia) iki renkli DNA probu (Vysis):** 11q 23 bandındaki delesyonları göstermek amacıyla kullanılan lokusa özgü tanımlayıcı probtur. LSI MLL iki renkli DNA probu MLL geni kırılma bölgesine (break point cluster region-bcr) sentromerik 350 kb'lik yeşil (Spectrum green) renk ile işaretli bir bölgeden ve bu kırılma bölgesine telomerik 190 kb'lik turuncu ile (Spectrum orange) işaretli bir bölgeden oluşur (Şekil 6). Prob MLL genini içeren çeşitli translokasyonlarla ilişkili 11q23 genindeki yeniden düzenlemeleri saptamak amacıyla tasarlanmıştır. Çalışmamızda bu prob 11q23 bandındaki delesyonları saptamak için kullanılmıştır. Bu bölgede meydana gelen heterozigot bir delesyonun varlığı; iki kırmızı sinyalin veya iki yeşil sinyalin ya da iki kırmızı yeşil kırmızı-yeşil füzyonun (sarı) yalnızca bir tanesinin görülmesiyle saptanır.

**LSI (Locus specific identifier) 13/ RB1 tek renkli DNA probu (Vysis):** 13. kromozomdaki 13q14 bandına hibridize olan prob KLL hastalarında bu bölgeye özgü delesyonları saptamak amacıyla tasarlanmıştır. LSI 13 (RB1) 13q14 tek renkli prob 13. kromozomun q14 bölgesindeki RB-1 genine özgü bir gen dizisi içerir (Şekil-7). Kırmızı ile işaretli (Spectrum orange) yaklaşık 220 kb'lik bir prob olup tüm RB-1 genini hedefleyen diziler içerir. Bu lokusa özgü heterozigot delesyonu olan hücrelerde yalnızca tek bir kırmızı sinyal gözlenir.



Şekil 6: LSI MLL prob haritası (Vysis)



Şekil 7: LSI 13/ RB1 Prob haritası (Vysis)

### 3.1.3. Mikroskop

Çalışmamızda preparatların değerlendirilmesi için Olympus BX 50, Olympus BX 51, Nikon Eclipse E800 ve Leica DM LS marka floresan mikroskopları kullanılmıştır.

### 3.1.4. Filtreler

**Texas red (TR):** Kırmızı sinyali gösterir.

**Dual filtre ( FITC+TR):** Kırmızı, yeşil ve füzyon rengi sarı sinyalleri gösterir.

**Triple filtre (DAPI+FITC+TR):** Kırmızı, yeşil ve füzyon rengi sarıyı gösterir.

LSI MLL iki renkli DNA probu ile 11q23 bandındaki delesyonların tesbitinde Texas red, Dual Color ve Triple filtreler, LSI 13/ RB1 tek renkli DNA probu ile 13q14 bandındaki delesyonların tesbitinde ise Texas red filtre kullanılmıştır.

### 3.1.5. Kimyasal Malzemeler

Ficoll (Lymphoprep-Hypaque)

RPMI-1640 (Biological Industries)

Fetal calf serum (FCS)

Fetal bovine serum (FBS)

Fithemaglutinin (PHA)

Kolşisin (Biological Industries )

Formamid (Merc)

RNAz (Boehringer Mannheim)

Formalin (Sigma)

Sodyum hidroksit (Merc)

Hidroklorik asit (Merc)

Sodyum klorür (Merc)

Potasyum klorür (Merc)

Tri-sodyum sitrat (Merc)

Metanol (Merc)

Asetik asit (Merc)

Etanol (Kimetsan)

Lastik yapıştırıcı (Bison)  
Tween 20 (Sigma)  
DAPI II (Vysis)  
Hibridizasyon solüsyonu (Vysis)  
İmmersiyon yağı

### **3.1.6. Cihaz ve gereçler**

Santrifüj (Heraus)  
Mini santrifüj (Heraus)  
Etüv (Heraus)  
Su banyosu (Memmert)  
Işık mikroskobu (Olympus CH 30)  
Floresan mikroskobu (Leica DM LS, Olympus BX50, Olympus BX51, Nikon Eclipse E800)  
Laminar akım kabini (Forma Scientific)  
Derin dondurucu (-20°C) (Arçelik)  
Buzdolabı (+4°C) (Arçelik)  
Hot plate (Cytocell)  
Vorteks (Heidolp)  
Manyetik karıştırıcı (Kermanlar)  
Hassas tartı (Sartorius-BL 210S)  
İspirto ocağı  
Otomatik pipet (10, 100 ve 1000 µl'lik) (Eppendorf)  
Otomatik pipet ucu (10, 100 ve 1000 µl'lik)  
Pipetör veya lastik par  
50 ml'lik polipropilen santrifüj tüpü  
15 ml'lik polipropilen santrifüj tüpü  
5 ve 10 ml'lik cam pipet  
0.2 µm steril mini filtre (Schleicher & Schuell FP 030/3)  
Pastör pipeti

Şale

Lam

Lamel

### **3.1.7. Solüsyonlar**

#### **10 PBS (pH:7)**

8 gr NaCl

2.01 gr KCl

11.36 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

2.04 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tartılır . 1 L distile suda (dH<sub>2</sub>O) çözülür.

#### **1 PBS**

100 ml 10 PBS dH<sub>2</sub>O ile 1 L'ye tamamlanır.

#### **Hücre kültür medyumı**

100 ml %10 FCS + FBS (1:1) içeren RPMI-1640 medyuma 10 µg/ml'lik PHA solüsyonundan 300-400 µl eklenir. Her hasta için 5 ml'lik hacimlere bölünür, -20°C'de dondurulur.

#### **0.075 M KCl çözeltisi**

560 mg KCl çözeltisi 100 ml dH<sub>2</sub>O içinde çözülür ve 0.2 µm'lik mini filtreden süzülür. Oda sıcaklığında saklanarak üç hafta kullanılabilir.

#### **Sitogenetik protokol için fiksatif**

Metanol / asetik asit (3 / 1). Günlük, taze hazırlanır. -20°C'de saklanır.

#### **1N NaOH**

4 gr NaOH 100 ml dH<sub>2</sub>O içinde çözülür.

### **0.01 N HCl**

83 µl %37'lik (12N) HCl 100 ml dH<sub>2</sub>O ile karıştırılır.

### **RNAz solüsyonu**

10 µg/ml olacak şekilde hazırlanır. Küçük hacimlere bölünerek -20°C'de saklanır.

### **Pepsin stok solüsyonu**

100 mg pepsin 1 ml dH<sub>2</sub>O içinde çözülür. 40 µl'lik hacimlere bölünerek -20°C'de saklanır.

Kullanılacağı zaman 40 µl'lik hacimler 80 ml 0.01 N HCl ile karıştırılır ve 37 °C'de 5 dakika bekletilir.

### **Alkol serileri**

% 70, 85, 90, 96 ve 100'lük etanol solüsyonları hazırlanır. Her hafta değiştirilir.

### **20 X SSC (pH:5.3)**

175.3 gr NaCl ve 88.23 gr Na sitrat (tri) tartılır. dH<sub>2</sub>O ile 1 L'ye tamamlanır. pH ölçülür. 0.45 µm'lik filtreden süzülür. +4°C'de 6 ay saklanabilir.

### **2 X SSC**

100 ml 20 X SSC

900 ml dH<sub>2</sub>O

### **Denatürasyon solüsyonu (% 70 formamid / 2 X SSC) (pH: 7.0)**

7 ml 20 X SSC

49 ml formamid

14 ml dH<sub>2</sub>O

### **Formamid yıkama solüsyonu (% 50 formamid / 2 X SSC) (pH:7.0)**

21 ml 20 X SSC

105 ml formamid

84 ml dH<sub>2</sub>O

### **2 X SSC / % 0.1 Tween 20 yıkama solüsyonu (pH:7.0)**

100 ml 20 X SSC

900 ml dH<sub>2</sub>O

1 ml Tween 20

## **3.2 YÖNTEM**

Hastalardan Li Heparinli tüpe 10 ml venöz kan veya 5 ml kemik iliği aspirasyon örneği alındı. Örnek periferik kan ise ilk önce lenfositler izole edildi.

### **3.2.1. Lenfosit izolasyonu**

İzotonik solusyon ve Ficoll buzdolobından çıkarılarak oda ısısına getirildi.

- Heparinli kan 50'lik tüp içine boşaltıldı. İzotonik solusyon ile 20 ml'ye tamamlandı.
- 15 ml'lik iki tüpe 5'er ml ficoll kondu. İzotonik solusyon ile sulandırılmış kan 5 ml'lik cam pipet ile ficoll üzerine yavaşça yüklendi.
- 2600 devir/ dak.da 20 dak. santrifüj edildi.
- Oluşan lenfosit tabakası pastör pipeti ile dikkatlice toplanarak temiz 15 ml'lik tüpe aktarıldı.
- İzotonik ile 10 ml'ye tamamlandı.
- 1700 devir/dak.da 5 dak. santrifüj edildi.
- Üst sıvı atıldı. Pellet üzerine 5 ml'ye kadar izotonik eklenerek karıştırıldı.
- 1500 devir/dak. santrifüj edildi.
- Üst sıvı atıldı. Pellet karıştırılarak daha önceden eritilmiş ve 37<sup>0</sup>C'ye getirilmiş medyuma konarak CO<sub>2</sub>'li etüve kaldırıldı.

Örnek kemik iliği ise 0.5 ml kemik iliği aspirasyon örneği erimiş medyum içine kondu ve karıştırıldı. CO<sub>2</sub>'li etüve kaldırıldı.

Kemik iliği aspirasyon örnekleri etüvde 2 saat inkübe edildi ve 1.saatte 100 µl kolşisin eklendi ve karıştırıldı. Periferal kan örnekleri ise 48 saat inkübe edildi ve 100 µl kolşisin 48 saat dolmadan 1 saat önce eklendi ve karıştırıldı.

### 3.2.2. Sitogenetik protokol

- Kolşisin eklenen örnekler 1 saat sonra 1200 devir/dak.da 10 dak. santrifüj edildi.
- 5 ml hipotonik KCl çözeltisi damla damla eklendi.
- Etüvde 20 dakika bekletildi.
- İnkübasyon süresi sonunda - 20<sup>0</sup> C'ye soğutulmuş 2 ml metanol / asetik asit (3/1) karışımı damla damla eklendi.
- 30 dak. +4<sup>0</sup>C'de inkübe edildi. Süre sonunda 1200 devir/dak.da 10 dak. santrifüj edildi.
- Pellet hala kirli görünüyorsa yıkama tekrarlandı.
- Hücre yoğunluğuna göre metanol / asetik asit ile sulandırıldı. - 20<sup>0</sup>C'de bekletildi.

### 3.2.3 Preparat hazırlığı:

- Alkol ve distile su ile temizlenmiş lam üzerine 50 µl hücre süspansiyonu olabildiğince yukarıdan damlatıldı, kurutuldu ve mikroskop ile hücre yoğunluğu kontrol edildi.
- Oda sıcaklığında şalede test süresine kadar bekletildi.

#### 3.2.3.1.Yaşlandırma

- Preparatlar 1 X PBS ile şalede 30 dak. yıkandı.
- Her preparat için 1 µl RNAz + 99 µl 2 x SSC karışımı lam üzerine konarak parafilm ile kapatıldı. Nemlendirme kutusunda 1 saat etüvde inkübe edildi.
- İçinde 2 x SSC solüsyonu bulunan şalede 3 x 2 dak. yıkandı.
- 10 dak. 37<sup>0</sup> C'ye ısıtılmış pepsinde bekletildi.
- 10 dak. oda ısısında formalinde bekletildi.

- 5 dak. oda ısısında PBS'te yıkandı.
- 2'şer dak. % 70, 90 ve 96'lik alkol serisinden geçirildi.
- Havada sallanarak kurutuldu.

### 3.2.3.2 Denatürasyon ve Hibridizasyon

- Preparat daha önceden 73<sup>0</sup> C'ye ısıtılmış su banyosunda , içinde % 70 formamid bulunan şale içine konarak 5 dak. denatüre edildi.
- Bu arada bir preparat için 7 µl hibridizasyon solüsyonu + 2 µl dH<sub>2</sub>O + 1 µl prob küçük bir santrifüj tüpünde karıştırılıp 73<sup>0</sup> C'ye ısıtılmış su banyosunda 5 dak denatüre edildi.
- Denatüre edilen preparat hemen oda ısısında bulunan %70, 85 ve 100'lük alkol serisinden geçirildi.
- Önceden 46<sup>0</sup> C'ye getirilmiş sıcak yüzey (hotplate) üzerine kondu.
- 10 µl prob karışımı lama uygulanır, üzerine cam lamel konur ve lamelin kenarları lastik yapıştırıcısı ile kapatıldı.
- Nemlendirme kutusu ile etüvde gece boyu hibridize edildi.

### 3.2.3.3 Hibridizasyon sonrası yıkamalar

- Sabah 3 ayrı %50 formamid, bir 2 x SSC ve bir NP-40 solüsyonu şalesi 46<sup>0</sup> C su banyosunda 30 dak. ısıtıldı.
- Preparat etüvden çıkartıldı. Üzerinde lastik yapıştırıcısı dikkatlice temizlendi. İlk 4 şalede 10 dak., NP-40 solüsyonu olan şalede 5 dakika yıkandı.
- Preparat kurutuldu ve üzerine 10 µl DAPI II uygulandı.
- Karanlık ortamda saklandı.

### 3.2.4. Değerlendirme

Değerlendirme floresan mikroskobu kullanılarak yapıldı. Her bir preparat için sınırları belirgin ve sinyalleri güçlü 250 nükleus değerlendirildi. Laboratuvarımızın, çalışmamızda kullanılan del (11) (q23)'e ve del (13)(q14)'e özgü proplar için yanlış

pozitiflik oranının kesim (cut-off) değerleri 3 sağlıklı bireyde  $MV + 3 SD$  (ortalama değer artı standart sapmanın 3 katı) formülüne göre  $\%2.8 + 3 \times 0.7$  olarak bulundu. Yanlış pozitif sonuçlardan kaçınmak amacıyla bu değer laboratuvarımız için  $> \%5$  olarak belirlendi.

### 3.3. İstatiksel analiz

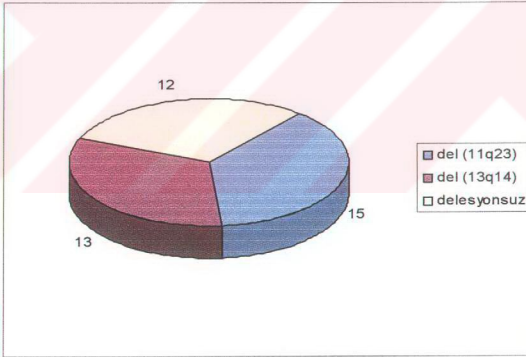
İstatiksel analiz Fisher's exact test ve Pearson ki-kare testi kullanılarak yapıldı. Prognostik faktörler arasında istatiksel olarak anlamlı bir ilişki olup olmadığı araştırıldı..



#### 4. BULGULAR

Çalışmaya KLL tanısı konmuş 40 hasta dahil edilmiştir. Hastaların klinik özellikleri ve test sonuçları Tablo 2’de belirtilmiştir.

Yaşları 40 ile 80 arasında değişen 26 erkek ve 14 kadından oluşan çalışma grubunda yaş ortalaması  $58 \pm 10$  bulunmuştur. Kırk hastadan alınan kan / kemik iliği örneklerinde 11q23 ve 13q14 bölgelerine özgü delesyonları saptamak amacıyla FISH tekniği kullanılmıştır. Bu testin sonucunda 40 hastanın 15’inde (%37.5) del (11q)(23) ve 13’ünde (%32.5) del (13)(q14) saptanmıştır. 12 hastada (%30) ise iki bölgenin de delesyonu saptanmamıştır. Her iki delesyonu birden gösteren hasta yoktur (Şekil 8, Tablo 3). Çalışmaya alınan 40 hastanın 25 tanesinin Kİ infiltrasyon şekli, 21 tanesinin CD38 pozitifliği ve 20 tanesinin  $\beta_2$  – mikroglobulin ( $\beta_2$  m) düzeyleri bilinmektedir. Üç hastada, tanıdan hemen sonra ilaç tedavisine başlandığından dolayı LKZ hesaplanamamıştır.



Şekil 8: Hastalarda delesyonların dağılımı

Tablo 2: Hastaların klinik özellikleri ve test sonuçları

No	Tarih*	Yaş	Cins	Rai	Binet	Hm	Sm	Lap	Lökosit* (/mm3)	lenfosit* (/mm3)	LKZ (ay)	CD38 (%)	b2m (ng/ml)	Kİ histo.	Örnek*	del 11q	del 13q
1	31.01.02	70	E	III	C	-	+	+	63000	54000	>12	82.00	6847	**	KAN	----	% 74 +
2	19.02.02	76	E	0	A	-	-	-	17000	8600	>12	**	2107	ND	KAN	----	%35 +
3	26.02.02	50	K	III	A	+	+	+	88700	70900	>12	**	**	**	KAN	----	% 20+
4	26.02.02	45	K	IV	C	+	+	+	160000	143000	<12	**	**	D	KAN	----	% 40+
5	26.02.02	78	K	I	A	-	-	-	145000	80600	<12	**	**	ND	KAN	----	----
6	27.02.02	40	K	I	A	-	-	+	41800	34400	>12	6.80	2230	ND	KAN	----	----
7	27.02.02	53	E	IV	C	+	+	+	6000	2600	<12	7.57	2259	ND	KAN	----	----
8	27.02.02	56	K	IV	C	-	-	+	11000	9100	<12	**	**	D	KAN	% 15 +	----
9	28.02.02	63	E	0	A	-	-	-	39000	31000	>12	3.00	2800	ND	KAN	----	% 50 +
10	28.02.02	59	E	0	A	-	-	-	63600	53000	>12	**	**	**	KAN	----	----
11	28.02.02	61	E	III	A	+	+	+	82700	62300	<12	89.00	5371	D	KAN	----	% 40 +
12	28.02.02	55	K	0	A	-	-	-	36400	29300	>12	**	**	**	KAN	----	% 70 +
13	01.03.02	57	E	I	B	-	-	+	12900	7400	>12	8.39	**	D	KAN	% 9 +	----
14	01.03.02	69	E	III	A	-	+	+	165000	68600	<12	4.90	6191	ND	KAN	% 10 +	----
15	04.03.02	45	E	I	B	-	-	+	15900	12100	<12	49.20	**	D	KAN	% 11 +	----
16	05.03.02	75	E	III	B	+	+	+	30000	23900	>12	14.00	**	D	Kİ	----	----
17	07.03.02	54	E	IV	C	-	+	-	11500	8500	>12	44.0	**	**	KAN	----	----
18	08.03.02	65	E	0	A	-	-	-	49000	36000	>12	74.00	**	**	KAN	% 10 +	----
19	21.03.02	48	K	III	A	-	+	-	4600	2900	<12	**	**	D	KAN	----	----
20	28.03.02	63	K	III	B	+	-	+	44800	38200	<12	17.10	3275	**	KAN	% 93 +	----
21	11.04.02	68	E	0	A	-	-	-	24600	20900	>12	**	**	ND	KAN	% 9 +	----
22	18.04.02	56	E	0	A	-	-	-	17000	13000	>12	**	2100	ND	KAN	----	% 21 +
23	29.04.02	52	E	III	B	-	-	+	74000	53000	<12	27.00	**	D	KAN	% 10 +	----
24	02.05.02	76	E	III	A	-	-	-	295000	155000	**	**	**	**	KAN	----	% 19 +
25	02.05.02	75	K	III	C	+	+	+	14000	11000	<12	**	**	D	KAN	% 60 +	----
26	03.05.02	43	E	III	B	+	+	+	68000	51000	>12	5.00	2501	ND	KAN	----	----
27	09.05.02	69	K	0	C	-	-	-	14700	11000	>12	31.2	**	**	KAN	----	----
28	10.05.02	56	K	III	A	-	+	+	28200	19000	**	15.00	2173	**	KAN	% 7 +	----
29	22.05.02	62	E	0	A	-	-	-	39000	23000	<12	**	2000	D	KAN	----	----
30	04.06.02	49	E	0	A	-	-	-	17000	9000	>12	**	1316	**	KAN	----	%42 +
31	06.06.02	61	E	0	A	-	-	-	30100	23200	>12	5.70	**	ND	KAN	----	----
32	04.09.02	40	E	0	A	-	-	-	33200	24000	>12	**	1350	ND	KAN	% 8 +	----
33	04.09.02	53	K	III	C	-	-	-	335000	300000	**	25.20	2720	**	KAN	% 17 +	----
34	06.09.02	69	K	0	A	-	+	+	20600	15900	>12	8.91	4700	D	KAN	% 8 +	----
35	22.09.02	49	E	0	A	-	-	-	20000	14000	>12	28.60	1714	ND	KAN	% 93 +	----
36	03.10.02	80	E	0	A	-	-	-	15100	10000	>12	**	**	**	KAN	----	----
37	30.10.02	58	E	0	A	-	-	+	18000	13700	>12	**	1650	**	KAN	----	% 15 +
38	07.11.02	69	E	IV	C	-	+	+	20000	8000	<12	47.00	3840	D	Kİ	% 9 +	----
39	07.11.02	70	K	III	C	-	+	-	10700	8200	>12	**	**	**	KAN	----	% 14 +
40	07.11.02	57	E	IV	C	+	+	+	30000	27000	<12	**	6800	ND	KAN	----	% 23 +

\* FISH uygulanan tarih  
 \*\* elde edilemeyen bilgiler  
 Cins:cinsiyet  
 Hm hepatomegali  
 Sm: splenomegali  
 Lam: lenfadenopati  
 Kİ histo: kemik iliği histolojisi

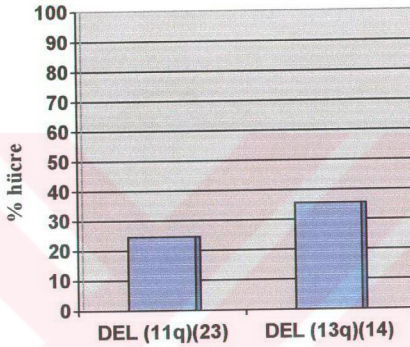
LKZ: lenfosit katlanma zamanı  
 WBC: lökosit  
 b2m: beta-2 mikroglobulin  
 ND: non-diffüz  
 D: Diffüz  
 E: erkek  
 K: kadın

Tablo 3: Çalışma grubunun FISH sonuçları

Hasta no	Örnek	Del (11)(q23)	Del (13)(q14)
1	KAN	NEGATİF	% 74 POZİTİF
2	KAN	NEGATİF	%35 POZİTİF
3	KAN	NEGATİF	% 20POZİTİF
4	KAN	NEGATİF	% 40POZİTİF
5	KAN	NEGATİF	NEGATİF
6	KAN	NEGATİF	NEGATİF
7	KAN	NEGATİF	NEGATİF
8	KAN	% 15 POZİTİF	NEGATİF
9	KAN	NEGATİF	% 50 POZİTİF
10	KAN	NEGATİF	NEGATİF
11	KAN	NEGATİF	% 40 POZİTİF
12	KAN	NEGATİF	% 70 POZİTİF
13	KAN	% 9 POZİTİF	NEGATİF
14	KAN	% 10 POZİTİF	NEGATİF
15	KAN	% 11 POZİTİF	NEGATİF
16	Kİ	NEGATİF	NEGATİF
17	KAN	NEGATİF	NEGATİF
18	KAN	% 10 POZİTİF	NEGATİF
19	KAN	NEGATİF	NEGATİF
20	KAN	% 93 POZİTİF	NEGATİF
21	KAN	% 9 POZİTİF	NEGATİF
22	KAN	NEGATİF	% 21 POZİTİF
23	KAN	% 10 POZİTİF	NEGATİF
24	KAN	NEGATİF	% 19 POZİTİF
25	KAN	% 60 POZİTİF	NEGATİF
26	KAN	NEGATİF	NEGATİF
27	KAN	NEGATİF	NEGATİF
28	KAN	% 7 POZİTİF	NEGATİF
29	KAN	NEGATİF	NEGATİF
30	KAN	NEGATİF	%42 POZİTİF
31	KAN	NEGATİF	NEGATİF
32	KAN	% 8 POZİTİF	NEGATİF
33	KAN	% 17 POZİTİF	NEGATİF
34	KAN	% 8 POZİTİF	NEGATİF
35	KAN	% 93 POZİTİF	NEGATİF
36	KAN	NEGATİF	NEGATİF
37	KAN	NEGATİF	% 15 POZİTİF
38	Kİ	% 9 POZİTİF	NEGATİF
39	KAN	NEGATİF	% 14 POZİTİF
40	KAN	NEGATİF	% 23 POZİTİF

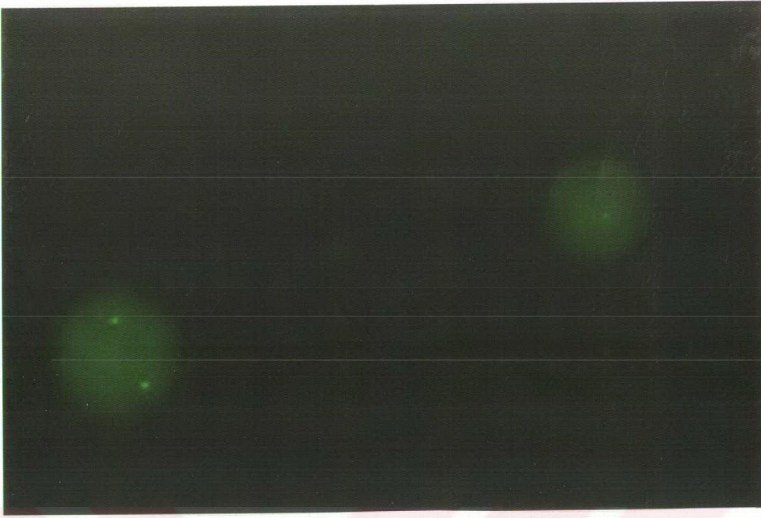
Delesyonsuz bir hücrede iki sinyal görülürken, heterozigot delesyonu olan bir hücrede tek sinyal görülmektedir. 11q23 ve 13q14 bölgelerinin delesyonlu ve delesyonsuz örneklerdeki FISH görüntüleri Resim-1-4'te görülmektedir.

Del (11)(q23) , %7 ile %93 arasında değişen oranlarla lösemik hücrelerin (ortalama) %24.6'sında pozitif bulunurken del (13)(q14), %14 ile %74 arasında değişen oranlarla lösemik hücrelerin (ortalama) % 35.6'sında pozitif bulunmuştur (Şekil 9) .

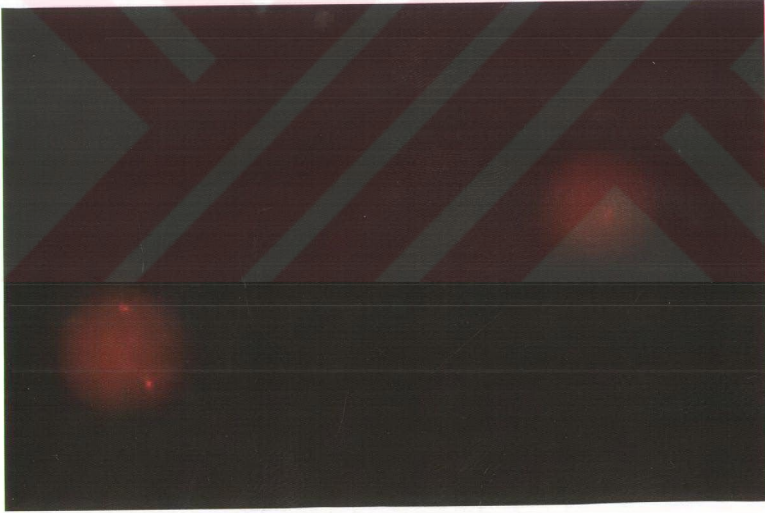


Şekil 9: Lösemik hücrelerde delesyon yüzdesi

Çalışmada 40 hastanın 23'ü (% 57.5) Binet evre A'da, 6'sı (%15) Binet evre B'de ve 11'i (%27.5) ise Binet evre C'dedir. Binet evre A'daki 23 hastanın 7'sinde (%30.4) del (11)(q23) , 9'unda (%39.1) ise del (13)(q14) pozitif bulunmuştur. Bu evredeki hastaların 7'sinde ise bu delesyonların ikisi de negatif bulunmuştur. Binet evre B'deki 6 hastanın 4'ünde (% 66.6) del (11)(q23) pozitif bulunurken , del (13)(q14) hiçbir hastada pozitif bulunmamıştır. Bu evredeki hastaların 2'sinde (%33.4) ise bu iki delesyonun her ikisi de negatif bulunmuştur. Binet evre C'deki 11 hastanın 4'ünde (% 36.3) del (11q 23), 4'ünde (%36.3) del (13)(q14) pozitif bulunurken 3 (%27.2) tanesinde hiç delesyon saptanmamıştır (Tablo 4).



Resim 1: 11q23 delesyonu olan (sağ) ve olmayan (sol) örnekler (yeşil filtre)



Resim 2: 11q23 delesyonu olan (sağ) ve olmayan (sol) örnekler (Texas red)



Resim 3: 11q23 delesyonu olan (sağ) ve olmayan (sol) örnekler (Triple filtre)



Resim 4: 13q14 delesyonu olan (sağ) ve olmayan (sol) örnekler (DAPI filtre)

Tablo 4: Hastalık evre dağılımı

	Binet evre			Toplam
	A	B	C	
del (11)(q23)	7 (%30.4)	4 (%66.6)	4 (%36.3)	15 (%100)
del (13)(q14)	9 (%39.1)	0 (%0)	4 (%36.3)	13 (%100)
delesyonsuz	7 (%30.4)	2 (%33.4)	3 (%27.2)	12 (%100)
<b>Toplam</b>	23 (%100)	6 (%100)	11 (%100)	40

11q 23 delesyonu pozitif olan 15 hastanın 7'si (%46.7) Binet evre A'da iken, 8'i (%53.3) Binet evre B-C'dedir ( $\chi^2 = 1.153$ ,  $p > 0.05$ ). 13q14 delesyonu pozitif olan 13 hastanın 9'u (% 69.2) Binet Evre A'da olup, 4'ü (%30.8) ise Binet evre B-C'dedir ( $\chi^2 = 1.085$ ,  $p > 0.05$ ). Evreler ve delesyonların varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki kurulamamıştır (Tablo 5).

Tablo 5: Delesyon ve klinik evre ilişkisi

	Binet evre		Toplam
	A	B-C	
del (13)(q14)	9 (%69.2)	4 (%30.8)	13 (%100)
del (11)(q23)	7 (%46.7)	8 (%53.3)	15 (%100)

11q23 delesyonu ve lenfosit katlanma zamanı karşılaştırıldığında 11q delesyonu pozitif olan ve LKZ'si bilinen 13 hastanın 7'sinde (% 53.8) LKZ < 12 ay bulunurken 6'sında (%46.2) LKZ  $\geq$  12 'dır. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki kurulamamıştır (Fisher's exact test,  $p > 0.05$ ) (Tablo 6) .

Tablo 6: del (11)(q23) \* LKZ ilişkisi

del (11)(q23)	LKZ		Toplam
	< 12 ay	≥ 12 ay	
Yok	7 (%29.2)	17 (%70.86)	24 (%100)
Var	7 (%53.8)	6 (%46.2)	13 (%100)

13q14delesyonu ve lenfosit katlanma zamanı karşılaştırıldığında 13q delesyonu pozitif olan ve LKZ'si bilinen 12 hastanın 3'ünde (%25) LKZ < 12 ay bulunurken 9'unda (%46.2) LKZ ≥ 12 'dir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki kurulamamıştır (Fisher's exact test,  $p > 0.05$ ) (Tablo 7) .

Tablo 7: del (13q)(14) \* LKZ ilişkisi

del (13)(q14)	LKZ		Toplam
	<12 ay	≥12 ay	
Yok	11 (%44)	14 (%56)	25 (% 100)
Var	3 (%25)	9 (%75)	12 (%100)

11q23 delesyonu ve CD38 pozitifliği karşılaştırıldığında 11q delesyonu pozitif olan ve CD38 pozitifliği bilinen 11 hastanın 8'inde (%72.7) CD38 < %30 bulunurken, 3'ünde (%27.3) CD38 ≥ %30 bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki kurulamamıştır (Fisher's exact test,  $p > 0.05$ ) (Tablo 8).

Tablo 8: del (11)(q23) \* CD38 ekspresyonu ilişkisi

del (11)(q23)	CD38 ekspresyonu		Toplam
	< %30	≥ %30	
Yok	6 (%60.0)	4 (%40.0)	10 (%100)
Var	8 (%72.7)	3 (%27.3)	11 (%100)

11q23 delesyonu ve Kİ infiltrasyon şekilleri karşılaştırıldığında 11q delesyonu pozitif olan ve Kİ infiltrasyon şekli bilinen 11 hastanın 7'sinde (%63.6) diffüz, 4'ünde (%36.4) ise non-diffüz Kİ infiltrasyon şekli olduğu saptanmıştır. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki kurulamamıştır ( $\chi^2 = 1.924$ ,  $p > 0.05$ ) (Tablo 9).

Tablo 9: del (11)(q23) \* Kİ infiltrasyon şekli ilişkisi

del (11)(q23)	Kİ infiltrasyon şekli		Toplam
	Diffüz	Non-diffüz	
Yok	5 (%35.7)	9 (%64.3)	14 (%100)
Var	7 (%63.6)	4 (%36.4)	11 (%100)

11q23 delesyonu ve  $\beta_2$ -mikroglobulin düzeyleri karşılaştırıldığında 11q delesyonu pozitif olan ve  $\beta_2$ -mikroglobulin düzeyleri bilinen 8 kişinin 5'inde (%62.5)  $\beta_2 m \geq 2300$  ng/ml bulunurken , 3 (%37.5) hastada  $< 2300$  ng/ml bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki kurulamamıştır (Fisher's exact test,  $p > 0.05$ ) (Tablo 10).

Tablo 10: del (11)(q23) \*  $\beta_2m$  ilişkisi

del (11)(q23)	beta-2 mikroglobulin (ng/ml)		Toplam
	$< 2300$	$\geq 2300$	
Yok	7 (%58.3)	5 (%41.7)	12 (%100)
Var	3 (%37.5)	5 (%62.5)	8 (%100)

11q23 delesyonu ve lenfadenopati varlığı karşılaştırıldığında, 11q23 delesyonu pozitif olan 15 hastanın 10'unda (%67) lenfadenopati olduğu , 5 kişide ise (%33) lenfadenopatinin görülmediği belirlenmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki kurulamamıştır ( $\chi^2 = 1.126$ ,  $p > 0.05$ ) (Tablo 11).

Tablo 11: del (11)(q23) \* Lenfadenopati ilişkisi

<b>del (11)(q23)</b>	<b>Lenfadenopati</b>		<b>Toplam</b>
	Var	Yok	
Yok	11 (% 44)	14 (%56)	25 (%100)
Var	10 (%67)	5 (%33)	15 (%100)

## 5. TARTIŞMA

KLL olgun görünümlü B lenfositlerin klonal gelişimleri sonucu periferik kan, kemik iliği ve lenfoid dokularda birikmeleridir (67). Klonal anomalilerin bulunması, teşhis ve tedavinin belirlenmesine yardımcı olur (70). KLL' nin konvansiyonel sitogenetik analizi in vitro ortamda lösemik hücrelerin düşük mitotik aktivitesi nedeni ile engellenir ve klonal kromozomal anomaliler vakaların yalnızca %40- 50' sinde saptanabilir (34).

Pek çok çalışma KLL'de FISH yönteminin genomik aberasyonları tespit etmedeki gücünü ortaya koymuştur. FISH yöntemi ile genomik anomaliler düşük mitotik aktiviteli KLL hücrelerinden metafaz kromozomu eldesine gerek kalmadan ve bölünmeyen hücrelerde tek hücre seviyesinde saptanabilmektedir (71) . FISH yöntemi ile KLL hastalarının yaklaşık % 80'inde klonal kromozom aberasyonları saptanabilmektedir (49, 81).

Çalışmamıza dahil edilen 40 hastanın 15'inde 11q delesyonu, 13'ünde ise 13q delesyonu tespit edilmiştir. 11q delesyonu lösemik hücrelerin %7'si ile %93'ü arasında (ortalama %24 .6) pozitif bulunurken, 13q delesyonu %14'ü ile %74'ü (ortalama 35.6) arasında pozitif bulunmuştur. KLL klonal bir hastalık olmasına rağmen delesyonların tüm hücrelerin %100'ünden çok daha az bir kısmında tespit edilmesinin iki nedeni vardır: birincisi, örnek çok yüksek lökosit sayılı periferik kan bile olsa, delesyon her zaman birincil defekt olmayabilir yani KLL klonunda bir alt popülasyon içerisinde var olabilir , ikincisi ise hücrelerin kültüre edilmesi ile normal lenfositlerin de çoğalması gerçekleşebilir (35, 25, 93).

FISH yöntemi ile yapılan çalışmalar 13q14 bölgesindeki delesyonların yaklaşık %50'lik bir oranla (%11-48) KLL'de en yaygın anomali olduğunu saptamıştır (32, 68). Starostik ve ark. (82) 13q14 bandında delesyonu olan ve olmayan hastalarda sağkalım açısından bir fark bulamamışlardır. Hogan (42) da 13q14 bölgesinde delesyonu olan KLL'lilerin (RB1, D13S19 veya D13S25 lokusları) olmayanlardan daha uzun bir süre tedavi gerektirmediğini göstermiştir. 13q14 delesyonlu vakalarda karakteristik olarak genelde sabit veya yavaş ilerleyen selim bir hastalık görülür. Bu delesyonun olduğu KLL hastaları sağlıklı kontroller kadar yaşarlar. Bu olumlu bulgulara karşın yeni bir çalışma 13q delesyonlarının erken evre hastalarda (düşük  $\beta_2$  - mikroglobulin veya Rai evre 0-II ) daha

agresif bir klinik davranış ile ilişkili olduğu bulunmuştur ancak bu sonuçlar küçük sayılarla sınırlıdır (82).

Çalışmamızda toplam 40 kişilik hasta grubunun 13'ünde (%32.5 ) 13q14 delesyonu (RB1 lokusu) saptanmıştır. İyi bir prognostik anlama sahip olduğu düşünülen 13q delesyonu ve hastalık evreleri (Binet A-B-C) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki kurulamamıştır ancak 13q delesyonuna sahip 13 hastanın 9'unun (%69.2) Binet evre A'da olduğu tesbit edilmiştir.

13q delesyonunun tedavisiz sağkalım ve toplam sağkalım ile ilgili prognostik etkisinin incelenmesi için farklı zamanlarda delesyon tesbitine ihtiyaç vardır. Çalışmamızda hastalara yalnızca tek bir tarihte delesyon tesbiti yapılmıştır.

KLL'de lenfosit katlanma zamanının (LKZ) 12 aydan kısa olmasının kötü prognostik anlamı vardır (58). Çalışmamızda 13 delesyonunun pozitifliği ve LKZ arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki kurulamasa da, 13q delesyonu pozitif olan bu hastaların %75'inin LKZ'si 12 ay ve üstüdür.

11q delesyonları vakaların %20'sindeki oranı ile KLL'de en sık görülen ikinci genetik anomalidir. 11q kaybı olan KLL vakalarında hastalığın ilerleme hızı daha fazla olup, sağkalım zamanları da kısalmıştır. 11q delesyonuna sahip KLL hastaları daha ileri bir hastalık evresine sahiptir ve yaygın lenfadenopati gösterirler. Dahası bu hastalarda tedavisiz süreç de daha kısadır (9 ay X 43 ay). Yapılan sağkalım analizlerinde 11q delesyonunun prognostik etkisinin yaşa bağlı olduğu gösterilmiştir. 55 yaşından küçük bireylerde ortalama sağkalım zamanı 11q delesyonlu grupta anlamlı olarak kısarken (64 ay X 209 ay), 55 yaş ve üzeri hastalarda anlamlı bir fark yoktur (94 ay X 11 ay). Sağkalım çalışmaları 11q delesyonunu bağımsız bir risk faktörü olarak göstermiştir. Bu yüzden 11 delesyonları yaygın lenf nodu katılımı, hastalığın hızlı ilerleyişi ve kötü sağkalım ile karakterize yeni bir klinik KLL alt kümesini tanımlamaktadır. 11q delesyonunun prognostik etkisi genç hastalarda ( $\leq 55$  yaş) daha fazla göze çarpmaktadır. Bu yüzden bu aberasyon otolog veya allojeneik kök hücre nakli ile birlikte yüksek doz tedavi gibi hassaslaştırılmış tedavi protokollerinden faydalanabilecek KLL hastalarını belirlemede bir parametre olarak kullanılabilir (68, 17).

Çalışmamıza dahil olan 40 hastanın 15'inde (%37.5) FISH yöntemi ile 11q23 delesyonu tespit edilmiştir. Kötü prognostik anlamı olduğu düşünülen 11q delesyonu ve hastalık evreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki kurulamamasına rağmen 11q delesyonlu 15 hastanın 8'inin (% 53.3) Binet evre B-C'de olduğu bulunmuştur.

Lenfosit katlanma zamanının 12 aydan kısa olması KLL'li hastalarda hastalığın hızlı ilerlediğinin bir göstergesidir (58). Çalışmamızda 11q delesyonu ve LKZ arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki kurulamasa da 11q delesyonlu 13 hastanın 7'sinin (%53.8) 12 aydan kısa bir LKZ'ye sahip oldukları saptanmıştır.

Kİ infiltrasyon şekli de diffüz ve non-diffüz olmasına göre değerlendirilir. Yaygın tip infiltrasyon kötü bir prognostik anlam taşır (30, 75). Çalışmamızda 11q delesyonu ve Kİ infiltrasyon şekli arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki kurulamamıştır ancak 11q delesyonlu ve Kİ infiltrasyon şekli bilgisini elde edebildiğimiz 11 hastanın 7'sinin (%63.6) diffüz tipte Kİ infiltrasyonu olduğu bulunmuştur.

Çalışmamıza dahil olan ve 11q delesyonu pozitif çıkan hastaların % 67'sinde lenfadenopati mevcuttur ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki kurulamamıştır.

Bu çalışmanın daha büyük sayıda bir örnek grubu ile çalışıldığı ve değerlendirilebilir hasta bilgisi artırıldığı takdirde istatistiksel bir anlam kazanabileceği kanısındayız. Delesyonların sağkalıma etkilerinin incelenmesi için farklı zamanlarda delesyon tesbiti yapılması ve bunun uzun bir döneme yayılması gerektiği düşüncesindeyiz.

## 6. ÖZET

Kronik lenfositik lösemi (KLL) en sık görülen lösemidir. Hastalık yaygın olarak CD5+ fenotipe sahip olgun görünümlü B lenfositlerinin akümülyasyonu ile karakterizedir. Akümülyasyonun sebebi proliferasyondaki artış değil apoptoz mekanizmasındaki bozukluk sonucu hücrelerin normalden daha uzun süre yaşamalarıdır. Hastalığın heterojen bir klinik seyri vardır.

Sayısal ve yapısal anomalilerin tesbiti hastalığın teşhis ve tedavisinde alınan kararları etkileme gücüne sahiptir. Lösemik hücrelerin düşük mitotik hızı KLL'de kromozom analizlerini zorlaştırmıştır. Metafaz preparasyonuna gerek duymadan, bölünmeyen hücrelerde tek hücre seviyesinde anomali tesbiti yapabilen Floresan in situ hibridizasyon (FISH) yönteminin gelişmesiyle doğru aberasyon tesbiti daha mümkün hale gelmiştir. Sayısal ve yapısal anomalilerin tesbiti hastalığın teşhis ve tedavisinde alınan kararları etkileme gücüne sahiptir.

FISH yöntemi ile yapılan çalışmalar KLL'li hastalarda en sık rastalanan kromozomal anomalinin iyi bir prognostik gösterge olan 13q14 delesyonu olduğunu göstermiştir. 11q23 delesyonu ise kötü bir prognostik anlama sahiptir ve KLL'de en yaygın ikinci anomalidir.

Çalışmamızda 40 KLL hastasında 13q14 ve 11q23 bölgesine özgü problemler kullanarak FISH yöntemi ile delesyon tesbiti yapıldı. Elde edilen sonuçlar CD38 seviyesi, hastalık evresi, Ki iliği infiltrasyon şekli, beta 2 mikroglobulin seviyesi ve lenfosit katlanma zamanı gibi diğer prognostik faktörler ile karşılaştırıldı ancak istatistiksel bir ilişki kurulamadı.

Örnek grubuna dahil edilen hastaların değerlendirilebilir klinik bilgilerinin kısıtlılığı nedeniyle gruplar arasında anlamlı ilişkiler kurulamamıştır. Ancak iyi prognostik anlam taşıdığı düşünülen 13q delesyonuna sahip hastaların %69'u hastalığın erken evresinde (Binet Evre A), kötü prognostik anlamı olduğu düşünülen 11q delesyonuna sahip hastaların ise % 53'ü ileri evrelerdedir (Binet evre B-C). Lenfosit katlanma zamanının (LKZ) 12 aydan kısa olması da kötü bir prognostik faktördür ve 11q delesyonu pozitif hastaların % 53.8'inde LKZ 12 aydan küçük, 13q delesyonu pozitif olan hastaların ise %75'inde 12 aydan büyük bulunmuştur.

Çalışmaya daha fazla sayıda hasta dahil edilirse ve delesyon tesbiti birden fazla tarihte yapılırsa delesyonların hastalığın gidişatı üzerine etkileri izlenebilir ve daha anlamlı sonuçlar elde edilebilir düşüncesindeyiz.



## 7. SUMMARY

The detection of 11q 22-23 and 13q14 deletions in patients with chronic lymphocytic leukemia by fluorescence in situ hybridization method

Chronic lymphocytic leukemia (CLL), is the most common leukemia in humans. The disease is characterized by the accumulation of mostly CD5+ mature - appearing B lymphocytes. The reason of the accumulation is not the increase in the proliferation rate. The impairment in the apoptosis mechanism leads to the prolonged survival and so to the accumulation of the leukemic cells.

The accurate detection of chromosomal abnormalities is important for the prognosis of the disease. Leukemic B lymphocytes have low mitotic rates and this makes chromosomal analysis by conventional methods difficult. Fluorescence in situ hybridisation (FISH) method can detect chromosomal abnormalities without the need for metaphase spreads, in non-dividing cells, at one cell level.

Del (13)(q14) and del (11)(q23) are the most common chromosomal aberrations in CLL, respectively. Del (13)(q14) is considered to be the predictor of good prognosis whereas del (11)(q23) is the predictor of poor prognosis.

40 patients were involved in our study. We performed FISH assay by using locus specific probes to detect deletions in 13q14 and 11q23 regions. The results were compared with other prognostic factors such as CD38 level, the stage of the disease, the pattern of the bone marrow infiltration and lymphocyte doubling time but no statistically significant correlation was established.

The reason for the insignificant statistical results is the lack of of the patient's clinical data. Besides all these, in our study 69% of the patients with 13 q deletions were found to be in early stages of the disease (Binet stage 1) whereas 53% of the patients with 11q deletions were found to be in the late stages of the disease (Binet stage B-C) as del 11q is a poor prognostic factor. Similarly, when patients were compared according to the deletions and lymphocyte doubling time, 53.8% of the patients with 11q deletions were found have a lymphocyte doubling time less than 12 months as a poor prognostic factor

whereas 75% of the patients with 13 deletions were found to have a lymphocyte doubling time more than 12 months.

We think that more patients must be included into the study and the deletion analysis should be performed at different times during the progression of the disease to have an idea about the prognosis.



## 8. KAYNAKLAR

1. Autio K., Elonen E., Teerenhovi L., Knuutila S., Cytogenetic and immunologic characterization of mitotic cells in chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 1986; 39: 289-298.
2. Avet-Louiseau H., Devilder MC., Garand R. 13q14 deletions are not primary events in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a study of 100 patients using fluorescence situ hybridization. *Clin Cancer Res* 1996; 2:1673-1677.
3. Aydın F., Gürtekin M. Tıbbi Biyoloji Ders Notları, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, 2000-2001; 106-115.
4. Bannerji R., and Byrd JC. Update on the biology of chronic lymphocytic leukemia. *Curr Opin Oncol* 2000;12: 22-29.
5. Barlow C., Hirotsune S., Paylor R., Liyanage M., Eckhaus M. Atm deficient-mice: A paradigm of ataxia-telangiectasia. *Cell* 1996; 86: 159-171.
6. Bentz M., Huck K., Manoir S., Joos Stefan., Werner CA., Fischer K., Döhner H and Lichter P. Comparative genomic hybridization in chronic B-cell leukemias shows a high incidence of chromosomal gains and losses. *Blood* 1995; 85: 3610-3618.
7. Bentz M., Stilgenbauer S., Lichter P., Döhner H. Interphase FISH in chronic lymphoproliferative disorders and comparative geneomic hybridisation in the study of lymphomas. *Haematologica* 1999, 84: (EHA-4 educational book): 102-106.
8. Beutler E., Lichtman A., Coller SB., Thomas JK., Seligsohn S. Williams Hematology, sixth edition , Mc Graw Hill , 1997; 1163-1190.
9. Binet JL., Leparrier M., Dighiero G. A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia. Prognostic significance. *Cancer* 1977; 49: 855-864.
10. Bouyge –Moreau T., Rondeau G., Avet-Loiseau H., André MT., Bézieau S., Chérel M., Saleün S., Devilder MC. Construction of a 780 kb PAC, BAC, and cosmid contig encompassing the minimal critical deletion involved in B-cell chronic lymphocytic leukemia at 13q14.3. *Genomics* 1997; 46: 183-190.
11. Brito-Bapulle V., Haoudi R., Matutes E., Watson S., Kaczmarek P., Maljaie H. and Catovsky D. p53 allele deletion and protein accumulation occurs in the absence of

- p53 gene mutation in T-prolymphocytic leukemia and Sezary syndrome. *Br J Haematol* 2000; 110: 180-187.
12. Bullrich F., Negrini M. and Croce CM. Molecular genetics of chronic lymphocytic leukemia. ([www.hematology.org](http://www.hematology.org)) American Society of Hematology Educational Material, *Hematology* 1999; 255-258.
  13. Bullrich F., Rasio D., Kitada S., Starostik P., Kipps T., Keating M., Albitar M. ATM mutations in B-cell chronic lymphocytic leukemia *Cancer Res* 1999;59: 24-27.
  14. Bullrich F., Veronese ML., Kitada S., Jurlader J., Caligiuri MA., Reed JC., Croce CM. Minimal region of loss at 13q14 in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1996; 88: 3109-3115.
  15. Caligaris-Cappio F. B-chronic lymphocytic leukemia: a malignancy of anti – self B cells. *Blood* 1996; 87(7): 2615-20.
  16. Caligaris-Cappio F. New insights into the biology of B-chronic lymphocytic leukemia. ([www.hematology.org](http://www.hematology.org)) American Society of Hematology Educational Material, *Hematology* 1999; 249-254.
  17. Catovsky D. The search for genetic clues in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Cell Therapy* 1997; 39: 5-11.
  18. Catovsky JF and Richards S. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia: the importance of age, sex and response to treatment in survival. *Br J Haematol* 1989; 72: 141-149.
  19. Cheson BD., Bennett JM., Grever M., Kay N., eatin MJ., O'Brien S. and Rai KR. National Cancer Institute-sponsored Working Group Guidelines for Chronic Lymphocytic Leukemia: Revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 1996; 87: 49990-4997.
  20. Chevallier P., Penther D., Avet-Loiseu H., Robillard N., Ifrah N., Mahe B., Hamidou M., Maisonneuve H., Moreu P., Jardel H., Harousseau JL., Batatille R. and Garand R. CD38 expression and secondary 17p deletion are important prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Br j Haematol* 2002; 116: 142-150.

21. Cooper. *The Cell, a molecular approach*. Second edition. Asm Press, Sinaver, 2001; 612-613.
22. Cordone I., Masi S., Mauro FR. p53 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a marker of disease progression and poor prognosis. *Blood* 1998; 91: 4342-4349.
23. Cremer T., Landegent J., Brückner A., Scholl HP., Schardin M, Hager HD., Devilee P., Pearson PP. Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive in situ hybridization techniques: diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84. *Hum Genet* 1986; 74: 346-352.
24. Crossen PE. Genes and chromosomes in chronic B-cell leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 94: 44-51.
25. Cuneo A., Bigoni R., Rigolin GM., Roberti MG., Bardi A. Late appearance of the 11q22.3-23.1 deletion involving the ATM locus in B-cell chronic lymphocytic leukemia and related disorders. *Haematologica* 2002; 87: 44-51
26. Damle RN., Wasil T., Fais F., Ghiotto F., Valetto A., Allen S Buchbinder A., Budman d, Dittmar K, Kolitz J., Lichtman SM., Schulman P., Vinciguerra VP., Rai KR., Ferrarini KR., N.Chiorazzi. IgV gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1840-1847.
27. Devilder MC., François S., Bosic C., Moreau A., Mellerin MP., Paslier D., Bataille R., Moisan JP. Deletion cartography around the D13S25 locus in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 1995; 55: 1355-1357.
28. Di Giovanni S., Valentini G., Carducci P., Giallonardo P. Beta- 2- microglobulin is a reliable tumor marker in chronic lymphocytic leukemia. *Acta Haematol* 1989; 81(4): 181-5.
29. Dierlamm J., Michaux L., Criel A, Wlodarska I., Berghe H. and Hossfeld D. Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia and their clinical and prognostic importance. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 94: 27-35.

30. Dighiero G., Travade P., Chevret S., Fenaux P., Chastang C., Binet J., and The French Cooperative Group on CLL. B-cell chronic lymphocytic leukemia: present status and future directions. *Blood* 1991; No 8: pp1901-1914.
31. Döhner H., Fischer K., Bentz M., hansen K., Benner A., Cabot G., Diehl Daniela ., Schlenk R., Coy J., Stilgenbauer S., Volkmann M., Galle PR., Poustka A., Hunstein W. and Lichter P. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B cell leukemias. *Blood* 1995; 85: 1580-1589.
32. Döhner H., Stilgenbauer S., Benner A., Leupolt E., Kröber a., Bullinger L., Döhner K., Bentz M., and Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; 343: 1910-1916.
33. Döhner H., Stilgenbauer S., James NR., Benner A., Weilguni T., Bnetz M., Fischer K., Hunstein W., Lichter P. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood* 1997; 89: 2516-2522.
34. Doneda L., Montillo M., Intropido L., Tedeschi A., Morra E., Larizza L. Interphase fluorescence in situ hybridization analysis of del(11)(q23) and del (17)(p13) in chronic lymphocytic leukemia: a study of 40 early onset patients. *Cancer Genet and Cytogenet* 2003; 140:31-36.
35. Doneda L., Castorina P., Tedeschi a., Intropido L., Morra E., Montillo M., Larizza L. Multicolor FISH in chronic lymphocytic leukemia. An interphase study of patients with early-onset disease. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; 125: 63-69.
36. Gahrton G., Robert KH, Friberg K., Zech L., Bird AG. Nonrandom chromosomal aberrations in chronic lymphocytic leukemia revealed by polyclonal B-cell mitogen stimulation. *Blood.*, 1980; 56: 640-647.
37. Garcia- Marco JA., Caldas C., Price CM., Widedmann LM., Ashworth A., Catovsky D. Frequent somatic deletion of the 13q23.3 locus encompassing BRCA2 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*; 1996;88: 1568-1575
38. Garcia-Marco., JA., Price CM., and Catovsky D. Interphase cytogenetics in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1997, 94: 52-58.

39. Gardiner AC., Corcoran MM., and Oscier DG. Cytogenetic, fluorescence in situ hybridisation, and clinical evaluation of translocations with concomitant deletion at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Genes, Chromosomes & Cancer* 1997; 20: 73-81.
40. Hamblin TJ., Orchard JA., Ibbotson RE., Davis Z., Thomas PW., Stevenson FK., and Oscier DG. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood* 2002; 99: 1023-1030.
41. Hendriks J. A possible association between HTLV-1 and B cell chronic lymphocytic leukemia in Jamaica. *Acta Haematol* 1985; 74: 55-57.
42. Hogan WJ., Tefferi A., Borell TJ., Jenkins R., Li CY., Witzig TE. Prognostic relevance of monosomy at the 13q14 locus detected by fluorescence in situ hybridization in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1999; 110: 77-81.
43. Joseph AM., Gosden JR., Chandley AC. Estimation of aneuploidy levels in human spermatozoa using chromosome specific probes and in situ hybridization. *Hum Genet* 1984; 22: 234-238.
44. Juliusson G and Merup M. Cytogenetics in chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in Oncology* 1998; 25: 19-26.
45. Juliusson G., Gahrton G. Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Pathogenetic and clinical implications. *Cancer Genet Cytogenet* 1990; 45: 143-160.
46. Juliusson G., Robert HK., Öst A., Friberg K., Bierfeld P., Nilsson B., Zech L. and Gahrton G. Prognostic information from cytogenetic analysis in chronic B-lymphocytic leukemia and leukemic immunocytoma. *Blood* 1985; 65: 134-141.
47. Kay NE, Han L., Bone N., Williams G. Interleukin 4 content in chronic lymphocytic leukemia (CLL) B cells and blood CD8+ T cells from B-CLL patients: impact on clonal B -cell apoptosis. *Br J Haematol* 2001; 112: 760-767.

48. Kipps TJ. Immune gene therapy of chronic lymphocytic leukemia. ([www.hematology.org](http://www.hematology.org)) American Society of Hematology Educational Material, Hematology 1999; 259-261.
49. Kröber A., Seiler T., Benner A., Bullinger L., Brückle E., Lichter P., Döhner H., and Stilgenbauer S.  $V_H$  mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. Blood 2002; 100:1410-1416.
50. Kroft SH., Finn WG., Kay NE., Peterson LC. Isolated 13q14 abnormalities and normal karyotypes are associated with typical lymphocyte morphology in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Leuk Res 1999; 23: 795-801.
51. Kuby J. Immunology. Third edition, 2001. US Press. 2001; 574.
52. Lagneux L., Delforge A., Bron D., Bruyn C., Stryckmans P. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. Blood 1998; 91: 2387-2396.
53. Lichter P., Ward DC. Is non-isotopic in situ hybridization finally coming of age?. Nature 1990; 45: 143-160.
54. Liu Y., Corocoran M., Rasool O., Ivanova G., Ibbotson R., Grander D., Iyengar A., Baranova A. Cloning of two candidate tumor suppressor genes within a 10kb region on chromosome 13q14, frequently deleted in chronic lymphocytic leukemia. Oncogene 1997;15: 2463-2473.
55. Liu Y., Grander D., Söderhall S., Juliusson G., Gahrton G., Einhorn S. retinoblastoma gene deletions in B-cell chronic lymphocytic leukemia . Genes Chrom Cancer 1992;4:3250-256
56. Liu Y., Hermanson M., Grander D., Merup M., Wu X., Heyman M., Rasool O. 13q deletions in lymphoid malignancies. Blood 1995; 86: 1911-1915.
57. Mitelman F., Levan G. Clustering of aberrations to specific chromosomes in human neoplasms. Hereditas 1978; 89: 207-232 (kromozombantl)
58. Montserrat E., Snchez-Bisono J., Vinolas N and Rozman C. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia: analysis of its prognostic significance. Br J Haematol 1986; 62: 567-575.

59. Mould S., Gardiner A., Corcoran M., and Oscier DG. Trisomy 12 and structural abnormalities of 13q14 occurring in the same clone in chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol* 1996; 92: 389-392.
60. Musio A, Mariani T. Chromosomes, genes, and cancer break points. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; (139), 141-142.
61. Nouri AM., Smith s., Oliver TR., Newland AC., Macey MG. Comparative expression of major histocompatibility complex (MHC) antigens on CD5+ and CD5- B cells in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Eur J Cancer* 1998; 34: 1618-1622.
62. Nussbaum RL., McInnes RR., Huntington FW. Thompson & Thompson, *Genetics in Medicine*. Sixth edition, WB Saunders, Philadelphia, 2001.
63. Oğuz R. Fluoresan in situ hibridizasyon yöntemi ile kronik myeloid lösemi ve farklı cinsten kemik iliği nakli olan hastaların minimal residuel hastalık tanısı, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İstanbul, 2000.
64. Oscier DG. Cytogenetics and molecular genetics of chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 1999, 84: (EHA-4 educational book): 88-91.
65. Oscier DG., Gardiner AC., Mould SJ., Glide S., Davis ZA., Ibbotson RE., Corcoran MM., Chapman RM., Thomas PW., Copplestone JA., Orchard JA and Hamblin T. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood* 2002; 100: 1177-1185.
66. Oscier DG., Matutes E., Copplestone A., Pickering RM., Chapman R., Gillingham R., Catovsky D., Hamblin TJ. Atypical morphology: an adverse prognostic factor for disease progression in stage A CLL independent of trisomy 12. *Br J Haematol* 1997; 98: 934-939.
67. Palandüz Ş., Çefle K., Aktan M., Tutkan G., Öztürk Ş., and Pekçelen Y. A case of chronic lymphocytic leukemia with a constitutional pericentric inversion of chromosome 1. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 118: 62-64.

68. Panayitidis P. and Kotsi P. Genetics of small lymphocyte disorders. *Semin Hematol* 1999; 36: 171-177.
69. Pasternak P. An Introduction to Human Molecular Genetics, Mechanisms of Inherited Diseases. FSP, Fitzgerald, 1999; 31-37.
70. Pitmann S., Catovsky D. Prognostic significance of chromosome abnormalities in chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol* 1984; 310: 288-292.
71. Rai KR., Döhner H., Keating MJ. And Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia: Case based session. ([www.hematology.org](http://www.hematology.org)) American Society of Hematology Educational Material, *Hematology* 2001; 140-156.
72. Rai KR., Kipps TJ., Dalla-Favera R. and Monserrat E. Chronic Lymphocytic leukemia. ([www.hematology.org](http://www.hematology.org)) American Society of Hematology Educational Material, *Hematology* 1999; 313-319.
73. Rai KR., Patel DV. Chronic Lymphocytic Leukemia. In: R.Hoffmann, E. Benz., S.Shattil., B. Furie. *Hematology: basic principles and practice*. 3<sup>rd</sup> edition, New York, 1997; 1350-1363.
74. Rai KR., Sawitsky a., Cronkite EP. Clinical Staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975; 46: 219-234.
75. Rai KR. and Montserrat E. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol* 1987; 24: 252-256.
76. Ross FM., Stockdill G., Clonal chromosome abnormalities in chronic lymphocytic leukemia patients revealed by TPA stimulation of whole blood cultures. *Cancer Genet Cytogenet* 1987; 25: 109-121.
77. Saka B. B hücreli Kronik lenfositik lösemide solubl CD23'ün prognostik önemi. İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, uzmanlık tezi, İstanbul 2002.
78. Saw GR., and Kronberger DL. TP53 deletions but not trisomy 12 are adverse in B-cell lymphoproliferative disorders. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 119: 146-154.
79. Schaffner C., Stilgenbauer S., Rappold G., Döhner H., Lichter P. Somatic ATM mutations indicate a pathogenetic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 748-753

80. Shydiel L., Shtarlid M, Klepfish A, Sigler E., Berebi A. Epidemiology and ethnic aspects of B cell chronic lymphocytic leukemia in Israel. *Leukemia* 1998; 12: 1612-1617
81. Starostik P., Manshouri T., O'Brien S., Freireich E. Deficiency of the ATM protein defines an aggressive subgroup of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 1998; 58: 4552-4557
82. Starostik P., O'Brien S., Chung CY. Prognostic significance of 13q14 deletions in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk res* 1999; 23: 795-801. (S49-182)
83. Stilgenbauer S., Bullinger L., Lichter P., and the German CLL Study Group (GCLLSG). Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and  $V_H$  gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia* 2002; 16: 993-1007.
84. Stilgenbauer S., Döhner H., Bulgay-Mörschel M., Weitz S., Bentz M., Lichter P. High frequency of monoallelic retinoblastoma gene deletion in B-cell chronic lymphoid leukemia shown by interphase cytogenetics. *Blood* 1993; 81: 2118-2124.
85. Stilgenbauer S., Döhner K., Bentz M., Lichter P., Döhner H. Molecular cytogenetic analysis of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Ann Hematol* 1998; 76: 101-110.
86. Stilgenbauer S., Liebisch P., James MR., Schröder M., Schlegeberger B., Fischer K., Bentz M. Molecular cytogenetic delineation of a novel critical genomic region in chromosome bands 11q22.2-q23.1 in lymphoproliferative disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 11837-11841.
87. Stilgenbauer S., Schaffner C., Litterst A., Liebisch P., Gilad S., Bar-Shira A., James MR., Lichter P., Döhner H. Biallelic mutations in the ATM gene in T-prolymphocytic leukemia. *Nat Med* 1997;3:1155-1159.
88. Temizkan GO. Genetik, I. Temel Genetik. 2. baskı, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul, 1994; 209-213.
89. Türk W. Elin System der Lymphomatosen. *Wien Klin Wechnschr* 1893; 211: 234.
90. Virhovac R., Delmer A., Tang R. Prognostic significance of the cell cycle inhibitor p27 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1998; 91: 4694-4700.

91. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995; 81: 323-339.
92. Zhu Y., Monni O., El-Rifai., Siitonen SM., Vilpo L., and Knuutila S. Discontinious deletions at 11q23 in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1999; 13: 708-712.
93. Zhu Y., Monni O., Franssila K., Elonen E., Vilpo Juhani., Joensuu H., Knuutila S. Deletions at 11q23 in different lymphoma subtypes. *Haematologica* 2000;85: 908-912.



## 9. ÖZGEÇMİŞ

1978, İstanbul doğumluyum. 1996 yılında Beşiktaş Atatürk Anadolu Lisesi'ni bitirdim. 2000 yılında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü'nden mezun oldum. Aynı yıl güz döneminde İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji yüksek lisans programına kaydımı yaptırdım ve İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladım. Aralık 2000 tarihinden itibaren aynı Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.



T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
EĞİTİM ARAŞTIRMA MERKEZİ