

**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ**  
**İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ**  
**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**Hematolojik Hastalıkların Tanı ve Takibinde Konvansiyonel  
Sitogenetik Değerlendirmenin Önemi**



**Uzmanlık Tezi**  
**Dr.Nevzat KOCA**

**Tez Danışmanı**  
**Prof. Dr. Meliha NALÇACI**

**İSTANBUL 2017**

**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ**  
**İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ**  
**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**Hematolojik Hastalıkların Tanı ve Takibinde Konvansiyonel  
Sitogenetik Değerlendirmenin Önemi**

**Uzmanlık Tezi**  
**Dr.Nevzat KOCA**

**Tez Danışmanı**  
**Prof. Dr. Meliha NALÇACI**

**Bu tez İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu tarafından  
(Dosya No:2016/1123) onaylanmıştır.**

**İSTANBUL 2017**

## TEŞEKKÜR

İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda tıpta uzmanlık eğitimimi en iyi şekilde tamamlamamda katkılardan dolayı, değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım tüm kıymetli hocalarıma,

Asistanlık sürem boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, yoğun çalışmalarına rağmen beni kırmayıp tez danışmanım olmayı kabul eden ve her türlü desteğini esirgemeyen çok değerli hocam Prof.Dr. Meliha Nalçacı'ya

Eğitim sürem boyunca her türlü idari ve bilimsel desteği veren, kendini tanımaktan büyük mutluluk duyduğum İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Şükrü Palandüz'e ve

Kendilerinden bir şeyler öğrenme fırsatı bulduğum iç hastalıkları uzmanlarına, tıbbi ve hayat tecrübelerini bizden esirgemeyen Halil Abi'ye(Doç. Dr. Halil Yazıcı) ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma,

Bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan sevgili annemebabama, Behçet abime, Sevgi ablama, kardeşlerime ve sevgili yeğenlerime,

Her konuda yanımda olan ve destek veren eşim Sevda'ya

Sonsuz şükranlarımı ve teşekkürlerimi sunarım...

**Dr. Nevzat KOCA**

**İÇİNDEKİLER**

<b>TEŞEKKÜR</b> .....	i
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	ii
<b>TABLolar</b> .....	iv
<b>ŞEKİLLER VE RESİMLER</b> .....	v
<b>KISALTMALAR VE SİMGELER</b> .....	v
<b>ÖZET</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>1. GİRİŞ</b> .....	3
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	5
2.1. Hematolojik Hastalıklar ve Genetik Çalışmalar.....	5
2.2. Hematolojik Hastalıklar ve Eşlik Eden Genetik Bozukluklar.....	5
2.2.1. Akut Lenfoid Lösemiler (ALL) .....	9
2.2.2. Akut Miyeloid Lösemi (AML) .....	11
2.2.3. Kronik Lenfositler Lösemi (KLL).....	13
2.2.4. Kronik Myeloid Lösemi (KML) .....	14
2.2.5. Lenfoma.....	15
2.2.6. Multipl Myelom.....	18
2.2.7. Miyelodisplastik Sendrom (MDS) .....	18
2.2.8. Diğer Kronik Miyeloproliferatif Bozukluklar: (KMPH) (Polisitemia Vera, Esansiyel Trombositopeni, İdiyopatik Miyelofibrozis) .....	18
2.3. Hematolojik Maligniteler ve Genetik Değişiklikler.....	19
2.3.1. Kromozomal Değişim Terminolojisi.....	19
2.3.2. Kanserlerde Gözlenen Diğer Yapısal Bozukluklar.....	20
2.3.2.1. Hücre Yüzey Reseptörleri.....	20
2.3.2.2. Uyarı İletim Sistemi.....	21
2.3.2.3. Transkripsiyon Faktörleri.....	22
2.3.3. Kanserde Etki Gösteren Tümör Süpressör Genler.....	22
2.3.3.1. Hücre Yüzeyinde Etkili Tümör Süpresör Genler.....	22

2.3.3.2. Uyarı İletim Sistemini Regüle Eden Sitoplazmik Tümör Supresör Genleri.....	23
2.4. Hematolojik Malignansilerde Kullanılan Metodlar ve Mutasyon.....	24
2.4.1. Klasik Sitogenetik Analiz Yöntem.....	24
2.4.1.1. GTG Bantlama Tekniği.....	24
2.4.1.2. Mikronükleus Tekniği.....	25
2.4.1.3. Kardeş Kromatid Değişimi Tekniği.....	25
2.4.2. Moleküler Sitogenetik Yöntemler (Fluoresan in situ hybridization) .....	25
2.4.3. Moleküler Genetik Teknikler.....	27
2.4.3.1. Jak-2 Tip-1 PCR Sistemi.....	27
2.4.4. Hematolojik Malignansilerde Sık Gözlenen Genetik Değişiklikler.....	28
2.4.4.1. Sitogenetik ve/veya Moleküler Sitogenetik (FISH) ile Tespit Edilen Değişiklikler...28	
2.4.4.1.1. BCR/ABL - t(9;22) FISH Analizi.....	28
2.4.4.2. Moleküler Olarak Tespit Edilen Değişiklikler.....	28
2.4.4.2.1. BCR/ABL - t(9;22) DNA Testi (Real-Time PCR) .....	28
2.4.4.2.2. JAK2 Mutasyon Testi - V617F.....	28
<b>3.MATERYAL VE METOD.....</b>	<b>30</b>
3.1.Konvansiyonel Sitogenetik Çalışma Protokolü.....	30
3.1.1.Çalışma Materyali.....	30
3.1.2 Yöntemler.....	30
3.1.3.Metod.....	31
3.1.4.Mikroskobik Analiz.....	32
3.2.Olgu Toplama ve Çalışma Dizaynı.....	33
3.3.İstatiksel Analiz.....	33
<b>4.BULGULAR.....</b>	<b>34</b>
<b>5.TARTIşMA.....</b>	<b>46</b>
<b>KAYNAKÇA.....</b>	<b>50</b>

## TABLolar LİSTESİ

<b>Tablo 1:</b> Hematolojik malignitelerin sınıflandırması. ....	7
<b>Tablo 2:</b> ALL ve AML'nin immünofenotipik olarak değerlendirilmesi (CD: Cluster of Differentiation) .....	9
<b>Tablo 3:</b> ALL'de sayısal ve yapısal kromozom anomalileri ve prognostik önemleri.....	10
<b>Tablo 4:</b> FAB Grubunun AML Sınıflaması. ....	12
<b>Tablo 5:</b> AML'de sayısal ve yapısal kromozom anomaliler ve prognostik önemi.....	13
<b>Tablo 6:</b> Lenfoid Malignitelerin WHO (2008) Klasifikasyonu.....	16
<b>Tablo 7:</b> Türkiye'de Lenfoma Altgrupları Dağılımı. ....	17
<b>Tablo 8:</b> WHO sınıflandırmasında, sık görülen B hücreli lenfomaların genetik özellikleri...17	
<b>Tablo-9:</b> JAK-2 Mutasyonunun Myeloproliferatif hastalıklarda görülme sıklıkları.....	29
<b>Tablo 10:</b> Tüm hastaların yaş ve hemogram bulguları. ....	34
<b>Tablo 11:</b> Hematolojik hastalıklara göre tüm hastaların genel özellikleri ve dağılımı.....	35
<b>Tablo 12:</b> Tüm hastaların sitogenetik nedeni, Flow Sitometri, FISH ve moleküler sonucu...36	
<b>Tablo 13:</b> Çalışma gruplarının sayısı, cinsiyet ve sitogenetik sonuç dağılımı.....	38
<b>Tablo 14:</b> Sitogenetik sonuçların hastalık tanılarına göre dağılımı.....	39
<b>Tablo 15:</b> Myeloproliferatif-Lenfoproliferatif genele özelliklerin karşılaştırmasının istatistik değerlendirmesi. ....	40
<b>Tablo 16:</b> Myeloproliferatif Hasta grubu ve Lenfoproliferatif Hasta grubunun sitogenetik sonucukarşılaştırılması.....	41
<b>Tablo 17:</b> Myeloproliferatif Hasta grubu ve Lenfoproliferatif Hasta grubunun sitogenetiğinin tanıya, prognoza, tedaviye katkısı karşılaştırılması. ....	41
<b>Tablo 18:</b> Lenfoproliferatif Hastalar ve Diğer Hastalar gruplarının yaş ve hemogram özelliklerinin karşılaştırması.....	42
<b>Tablo 19:</b> Lenfoproliferatif Hastalar ile Diğer Hastaların sitogenetik sonucu.....	43
<b>Tablo 20:</b> Çalışmadaki hastalarda saptanan anormal sitogenetik sonuçları.....	45

## ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

<b>Şekil 1:</b> FISH yönteminde kullanılan prob çeşitleri. ....	26
<b>Şekil 2:</b> Tüm hastalardan alınan sitogenetiklerin sonuç dağılım grafiği.....	37
<b>Resim 1:</b> SG isimli erkek hastanın normal konvansiyonel sitogenetik sonucu.....	32
<b>Resim 2:</b> MDS tanılı HŞ isimli hastanın sitogenetik sonucu.....	39
<b>Resim 3:</b> MDS tanılı DY isimli hastanın sitogenetik sonucu.....	43
<b>Resim 4:</b> MDS tanılı DY isimli hastanın başka bir metafaz sitogenetik sonucu.....	44
<b>Resim 5:</b> KML tanılı EP isimli hastanın sitogenetik sonucu.....	44

## KISALTMALAR VE SİMGELER

AA: Aplastik Anemi
Abl: Abelson proto-onkogeni
AD: Anabilim Dalı
ALL: Akut Lenfoblastik Lösemi
AML: Akut Myeloid Lösemi
APL: Akut Promiyelositik Lösemi
BCR: Breakpoint Cluster Region
BL: Burkitt Lenfoma
CD: Cluster of Differentiation
CGH: Comperative Genomics Hybridization
DNA: Deoksiribonukleik asit
DBBHL: Diffuz büyük B Hücreli lenfoma
ET: Esansiyel Trombositoz
FAB: Fransız-Amerikan-İngiliz
FISH: Fluorescence In Sıtu Hybridization
GTG: Giemsa-Tripsin-Giemsa
Hct: Hemotokrit
Hgb: Hemoglobin
HL: Hodgkin lenfoma
HDL: Hodgkin Dışı Lenfoma
HRB: High resolution bantlama
Inv: İnversiyon(Ters Dönme)
ITP: Immün Trombositopenik Purpura
ISCN: System for Human Cytogenetic Nomenclature

JAK2: Janus kinaz 2  
KCl: Potasyum Klorür  
KKD: Kardeş Kromatid Değişimi  
KGL: Kronik Granülositik Lösemi  
Kİ: Kemik İliği  
KLL: Kronik Lenfositik Lösemi  
KMPH: Kronik Miyeloproliferatif Hastalık  
KML: Kronik Myeloid Lösemi  
KMML: Kronik miyelomonositik lösemi  
LGL: Large Granüler Lösemi  
MCL: Mantle Cell Lenfoma  
MCV: Mean Corpuscular Volume  
MDS: Myelodisplastik Sendrom  
MF: Myelofibrozis  
MGUS: Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance  
MLL: Myeloid/Lymphoid, Mixed Lineage Leukemia  
MM: Multipl Myeloma  
MN: Mikronükleus  
mg: miligram  
p: Kromozomun kısa kolu  
q: Kromozomun uzun kolu  
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu  
Ph: Philadelphia kromozomu  
PHA: Phytohaemaglutinin  
PNH: Paroksizmal Noktürnal Hemoglobinüri  
Plt : Trombosit  
PV: Polisitemia Vera  
Rb: Retinoblastom  
STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription  
TK 2: Tirozin kinaz 2  
RAR: Retinoik Asit Reseptör  
RNA: Ribonukleik asit  
RT-PCR: Real Time Polymerase Chain Reaction  
SCE: Sister chromatid Exchange  
WBC: White Blood Cell (Lökosit)  
WHO: World Health Organization (Dünya sağlık Örgütü, DSÖ)  
µl: Mikrolitre

## Hematolojik Hastalıkların Tanı ve Takibinde Konvansiyonel Sitogenetik Değerlendirmenin Önemi

### ÖZET

**Giriş:** Akut lösemiler, lenfomalar, kronik myeloproliferatif hastalıklar, myelodisplastik sendrom ve paraproteinemiler önemli hematolojik hastalıklardır. Hastalıkların tanısında, tedavisinin seçiminde ve prognoz belirlenmesinde laboratuvar tetkikleri ve çeşitli görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır. Konvansiyonel sitogenetik analiz ile hematolojik hastalıkların tanısı, tedavi cevabının takibi ve prognoz belirlenmesinde değerli bilgiler elde edilmektedir.

**Amaç:** Bu çalışma ile Hematoloji Bilim Dalı polikliniğine başvuran hastalarda yapılan konvansiyonel sitogenetik incelemenin tanı, prognoz ve tedaviye olan katkısını incelemeyi amaçladık.

**Materyal ve Metod:** Hematoloji polikliniğimizde tanısı konulmuş 199 hastanın Ocak 2014 ile Mart 2015 tarihleri arasında yapılan sitogenetik sonuçları geriye dönük olarak incelendi. Laboratuvarın sitogenetik sonuç elde etme oranı, anormal sitogenetik oranı ve sitogenetik sonucun katkısı değerlendirildi.

**Bulgular:** Hastaların yaş ortalaması  $56,1 \pm 15,3$  dı. Sitogenetik sonuçların 150 sinde (%75,6) normal , 32 sinde (%16,1) anormal karyotip saptandı. 17 (%8,5) hastanın, 7'sinde(%3,5) yetersiz materyal nedeniyle ve 10'unda(%5,1) yeterli metafaz üretilemediği için sonuç elde edilemedi. Kontrol grubu olarak seçilen Lenfoproliferatif hastalık (ALL, KLL, HL, HDL, MM, MGUS, HCL, Waldenström Makroglobulinemisi, LGL) grubu, hem Myeloproliferatif hastalık (AML, KML, ET, MF, PV, KMPH, MDS) grubu hem de Diğer hematolojik hastalıklar (İTP, Anemi, HS, Aplastik Anemi, PNH) grubuyla karşılaştırıldı. Myeloproliferatif grubunda sitogenetik tetkiklerin katkısı, lenfoproliferatif hastalık grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır. Lenfoproliferatif hastalık grubu ile Diğer hastalıklar grubu arasında sitogenetik inceleme katkısı ile ilgili istatistiksel bir anlamlılık saptanmadı.

**Sonuç:** Sitogenetik analiz yöntemi, KML ve AML de kesinlikle yapılmalıdır. Sitogenetik analizin MDS, KMPH gibi myeloproliferatif hastalıklarda da rutin olarak yapılması önerilir. Hodgkin Dışı Lenfomalarda, HL, LGL, KLL, MM gibi alt tiplerde rutin konvansiyonel sitogenetik önerilmez.

**Anahtar kelimeler:** Hematolojik hastalıklar, konvansiyonel sitogenetik inceleme.

## **The Importance of Conventional Cytogenetic Assessment in the Diagnosis and Follow-up of Hematologic Diseases**

### **ABSTRACT**

**Introduction:** Acute leukemia, lymphomas, chronic myeloproliferative diseases, myelodysplastic syndrome and paraproteinemia are important hematological diseases. Laboratory tests and various imaging modalities are used in the diagnosis of the diseases, in the selection of the treatment and in determining the prognosis. Conventional cytogenetic analysis provides valuable information on the diagnosis of hematologic diseases, the follow-up of treatment response and the prognosis.

**Objective:** In this study, we aimed to investigate the contribution of conventional cytogenetic examination to the diagnosis, prognosis and treatment of patients admitted to the Department of Hematology Science Polyclinic.

**Material and Method:** The cytogenetic results of 199 patients diagnosed in our hematology polyclinic between January 2014 and March 2015 were retrospectively reviewed. The rate of cytogenetic result, abnormal cytogenetic ratio and cytogenetic outcome of the laboratory were evaluated.

**Findings:** The mean age of the patients was  $56,1 \pm 15,3$ . Cytogenetic results were normal in 150 cases (75,6%) and abnormal karyotype in 32 cases (16,1%). 17 (8,5%) patients could not be obtained because 7 of the patients had insufficient material and 10 of the patients could not produce sufficient metaphase. Lymphoproliferative disease (ALL, CLL, HL, HDL, MM, MGUS, HCL, Waldenström Macroglobulinemia, LGL) as the control group was compared with the group of Myeloproliferative disease (AML, CML, ET, MF, PV, KMPH, MDS) group and Other Hematological diseases (ITP, Anemia, HS, Aplastic Anemia, PNH) group. The contribution of cytogenetic tests in the myeloproliferative group was statistically significant compared to the lymphoproliferative disease group. There was no statistically significant difference between the Lymphoproliferative Disease group and the Other Diseases group regarding the contribution of cytogenetic examination.

**Conclusion:** Cytogenetic analysis method should be done absolutely in CML and AML. Cytogenetic analysis is also suggested to be routinely performed in myeloproliferative diseases such as MDS and KMPH. Routine conventional cytogenetics are not recommended for lymphoproliferative diseases such as NHL, HL, LGL, KLL and MM.

**Keywords:** Hematologic diseases, Conventional Cytogenetic analysis.

## 1. GİRİŞ

Kanın şekilli elemanlarının üretim süreci olarak adlandırılan hematopoez pluripotent hematopoetik kök hücrelerden başlayarak bir basamaklar dizisinden oluşmaktadır. Üretim süreci ve farklılaşma basamaklarının bir kısmı eritroid ve myeloid seride olduğu gibi kemik iliğinde, lenfoid serinin bir kısmı kemik iliğinde bir diğer kısmı ise periferde devam etmektedir. Bu basamaklarda herhangi bir sorun oluşunca temel kan ürünlerinin oluşumu tamamlanmadığı gibi klonal serilerin malignleşmesi ya da fonksiyon kaybı çeşitli hematolojik hastalıklara yol açılmaktadır.

Akut lösemiler, lenfomalar, kronik myeloproliferatif hastalıklar, myelodisplastik sendrom ve paraproteinemiler önemli hematolojik malignitelerdir. Hastalıkların tanısında, tedavisinin seçiminde ve prognozun belirlenmesinde anamnez, fizik muayene, kan sayımı, rutin biyokimyasal testler, periferik yayma, kemik iliğinin değerlendirilmesi, sitogenetik incelemeler ve çeşitli görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır.

Bu tetkiklerin biri olan konvansiyonel sitogenetik inceleme ile hematolojik hastalıkların tanısı, tedavi cevabının takibi ve prognozun belirlenmesi için çok değerli bilgiler elde edilmektedir.

Sitogenetik analiz, kromozomların sayısal ya da yapısal bozuklukların gösterilebilmesi için uygulanır. Periferik kan, amniyotik sıvı, kemik iliği, düşük materyeli vb. örneklerde yapılan sitogenetik analizlerle otozomal ve seks kromozomlarının yapıları ve sayıları incelenerek, yüksek rezolüsyonlu kromozom analizleri yapılmaktadır. Geliştirilen yeni sitogenetik analiz yöntemleri hematolojik hastalıklarda bu hastalıkların etyopatolojisinin anlaşılmasında çok önemli bulgular vermiştir. Bu teknik ile; kromozomal polimorfizm (özellikle kromozom 1, 9, 16 ve Y de), fragil bölgeler, kromozomal kayıplar-“loss” (delesyonlar ve monozomiler), kromozomal kazançlar-“gain” (duplikasyon ve trizomiler), kromozomal “rearrangement”- yeniden yapılanma (inversiyon, insersiyon ve translokasyonlar-yer değiştirme) bulunur(1). Sitogenetik analizler olgularda kromozom yapılanmasını gösterir. Etkilenen kromozomal yapılar ortaya konur, olguların tanı, tedavi cevabının belirlenmesi, prognoz takipleri ile ilgili önemli bulgulara ulaşılır(2). Genetik bilim

dalındaki gelişmeler sonucunda birçok genetik bozukluk yeni tetkiklerle ortaya konabilmektedir.

Tedavi süresinde yapılacak testlerin sonucunda ilaca verilen cevabın pozitiflik-negatiflik durumlarına göre tedavi protokolleri de şekillenmektedir. Aynı zamanda yeni mutasyonların varlığının bilinmesi ve buna göre kullanılan ilaçların miktarları azaltılıp arttırılabilmektedir. Ya da hastalığın başka tür malignensiye transforme (dönüşüm) olma kapasitesini de belirleyebilmektedir. Ayrıca bu çalışmaların ışığında en etkili tedavi protokollerine ulaşılabilmektedir.

Hematolojik hastalıklarda konvansiyonel sitogenetik incelemeyle bir çok kromozomal anomali saptanmaktadır. Çalışmamızda, Hematoloji Bilim Dalımıza tanı için başvuran ya da takibi süren hastaların kemik iliği aspirasyonundan elde edilen konvansiyonel sitogenetik inceleme sonuçları değerlendirilecek, saptanan kromozomal anomalilerin tanıyı ve prognozu belirlemedeki önemi tartışılacaktır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Hematolojik Hastalıklar ve Genetik Çalışmalar**

İlk kez 1890 yılında Alman patolog David von Hansmann kanser biyopsi materyallerinde nükleer ve mitotik yapı düzensizlikleri tanımlamış ve bu bulgunun kanser gelişiminde önemli olduğunu belirtmiştir. Yaklaşık 25 yıl sonra Theodor Boveri genetik değişikliklerin kanserle ilişkili olabileceğini, kansere kromozomal anomalilerin yol açabileceğini ileri sürmüştür. Boveri, ‘‘hücre ve organizmadaki normal fonksiyonların meydana gelmesini sağlayan, kromozomlar üzerinde yer alan kalıtım birimlerinin dengesidir’’ düşüncesini ‘‘Malign tümörler nasıl oluşur?’’ isimli makalesinde 1914 yılında yayınlamıştır.

Kanserde ilk kromozomal anomali 1960’ lı yıllarda Nowell ve Hungerford tarafından kronik myeloid lösemi (KML) olgularında tanımlanmış ve tanımlanan kromozoma Philadelphia kromozomu (Ph) adı verilmiştir (1). İlerleyen yıllarda gelişen bantlama ve diğer farklı sitogenetik analiz yöntemleri ile kanser genetiğine ait bilgilerimiz artmış, birçok türe özgün sitogenetik anomaliler tanımlanmış ve altta yatan moleküler mekanizmalar ortaya konmuştur (2). Philadelphia kromozomunun keşfi ile genom, kromozomlar ve kanser arasındaki ilişki her geçen gün ivme kazanarak araştırılmaktadır. Bu sayede oluşan ve oluşmakta olan verilerin sonuçları tanı koyma, prognoz ve tedavi planlamada özellikle lösemi ve lenfomada, sitogenetik tanının önemini ortaya koymuştur.

Hematolojik malignitelerin oluşumunda kromozomal değişikliklerin oluşması önemli etkenlerden biridir. Hematopoetik neoplazmaların yaklaşık %50’sinin oluşmasında, bu kromozomal değişiklikler sonucu protoonkogenlerin aktifleşmesi sorumludur. Hematolojik malignitelerde hücre proliferasyonunu veya ölümünü onkogenler ve tümör süpressör genler birarada sağlar. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar kanserin seyrini belirler.

### **2.2. Hematolojik Hastalıklar ve Eşlik Eden Genetik Bozukluklar**

Hematolojik hastalıkların etiolojisinde, genetik materyalin önemli rol oynadığı moleküler ve sitogenetik gelişmelerle net bir şekilde ortaya çıkmıştır. Özellikle familial lösemi olgularının tahmin edilenden fazla olması, belli kromozomal anomalileri olan myelodisplastik sendromların (MDS) yüksek oranda akut myeloblastik lösemiye (AML)

transformasyonu, belli sitogenetik anomalilerin saptandığı lenfomaların olması genetik faktörün lösemi etiolojisinde önemli rol oynadığının bir kanıtıdır.

Lösemiler, kemik iliği hematopoetik hücrelerinin klonal malign hastalıklarıdır. Bu tam olarak farklılaşmamış hücreler ‘blast’ olarak adlandırılmaktadır. Bu hücreler normal fonksiyonlarını yerine getirme yeteneğinden yoksundur. Çok fazla çoğalan fakat farklılaşmayan lökositler, başta kemik iliği olmak üzere karaciğer, lenf bezleri, dalak, deri, testis ve merkezi sinir sistemi gibi organ ve sistemleri infiltre edebilir. Yeterinden fazla hücre üretilmesine karşın, bu hücreler tam olarak olgunlaşıp farklılaşmadığından yetersiz işlev gören sorumlu hücre sayısı azalarak anemi, trombositopeni ve nötropeni oluşmaktadır.

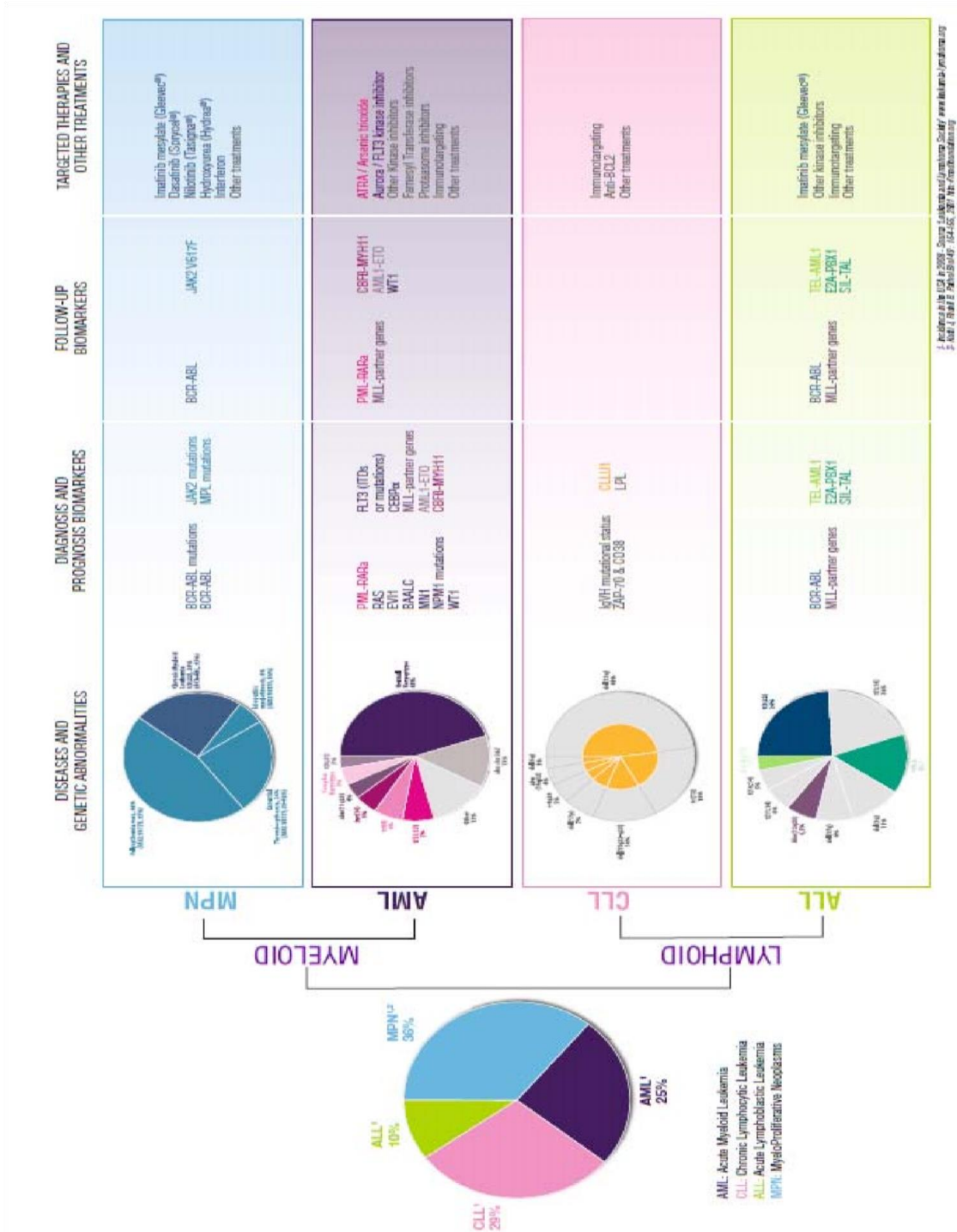
Lösemi ile ilgili ilk vaka 1827’de Velpeau tarafından bildirildikten sonra, gerek klinik gerekse genetik incelemelerde ilgi duyulan bir neoplazm olmuştur. Fakat 1845 yılına kadar lösemi çok iyi tanımlanamamıştır. Bu tarihlerde Virchow ve Bennett ayrı ayrı olguların otopsisinde, kanın beyaz rengine dikkat çekmiş ve hastalığı tanımlamışlardır. Bu yüksek lökosit sayısına atfen beyaz kan terimi (weisses blut) kullanılmış, daha sonralarda ise Yunanca kökenli olarak beyaz anlamına gelen “leukos” ve kan anlamına gelen “haima” sözcüklerinden leukemia terimi türetilerek kullanılmaya başlanmıştır (3).

Lösemilerde meydana gelen kromozomal değişikliklerin tespiti, değişik lösemi alt gruplarının ve buna bağlı olarak tedavi yöntemlerinin belirlenmesine katkıda bulunmuştur. Ayrıca tedavi sürecinde hastanın tedaviye verdiği yanıtın değerlendirilmesinde ve hastanın takiplerinde yine sitogenetik yöntemlere başvurulmaktadır. Mevcut çalışmalar kromozomlardaki olası sayısal ve yapısal mutasyonları aramaya yöneliktir. Yapısal veya sayısal olarak değişmiş bölgelerdeki ilgili genleri tespit edip bu genlerin lösemi ile bağlantısını çözmeyi amaçlamakta en yeni ve detaylı çalışmaları oluşturmaktadır. Lösemi genetiğindeki son değişimler, lösemi tanısında kullanılmakta olan, hücre morfolojisine dayanan French American British (FAB) sınıflaması, sitokimyasal boyalar, lökosit yüzey antijenlerine dayalı immün fenotiplendirme metodlarına, sitogenetik ve moleküler genetik yöntemlerin de eklenmesini sağlamıştır(4).

Hematolojik malignitelerin sınıflandırılması Tablo 1’de özetlenmiştir (5).

**Tablo 1:**Hematolojik malignitelerin sınıflandırılması(5).

Incidence in the USA in 2008 - Source ‘Leukemia and Lymphoma Society’ [www.leukemia-lymphoma.org](http://www.leukemia-lymphoma.org), Kutti J, Ridell B. Pathol. Biol 49: 164–166, 2001 <http://mpdfoundation.org> (4).



Bu sınıflandırmaya göre lösemiler 2 ana başlıkta 4 grupta incelenir.

1. Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)
2. Akut Myeloblastik Lösemi(AML)
3. Kronik Myelositer Lösemi (KML)
4. Kronik Lenfositer Lösemi (KLL)

Lenfomalar, immun sistemi oluşturan hücrelerin çeşitli diferansiyasyon aşamalarından orijinlenen malignitelere aittir. Orijinlerini aldıkları diferansiyasyon aşamasına göre farklı morfolojik, immunolojik ve klinik tablo oluştururlar.

Tüm lenfoid hücreler hematopoetik progenitor hücrelerden köken alır. Hematopoetik progenitor hücreler lenfoid ve myeloid öncü hücreleri oluşturmak üzere iki ana gruba ayrılır. Lenfoid kök hücre son ürünü olan B ve T lenfositleri oluşturmak üzere farklılaşır. Lenfoid lösemilerin % 75'i ve tüm lenfomaların da % 90'ı B hücre orijinlidir. Hodgkin lenfoma ile Non-Hodgkin lenfoma tanıları farkı 20. yüzyılın başlarında Reed-Sternberg hücrelerinin tanınması ile ayırt edilmiştir.

Lenfoid hücre kökenli kronik lenfoproliferatif hastalıklar grubunda B hücresinden köken alan kronik lenfositik lösemi (KLL), promiyelositik lösemi(PML), "Hairy cell leukemia", Waldenström's makroglobülinemisi, multipl myeloma (MM), plazma hücreli lösemi yer alır. T hücresinden köken alan olguların içinde KLL, promiyelositik lösemi, erişkin T hücre lösemi/lenfoması, "Cutaneous" T hücre lenfoması, "mucozis fungoides" ve Sezary sendrom yer alır. Olgular nispeten olgun hücrelerin lösemik formasyonu ile karakterizedir. Bu olgularda diğer lenfoid malignitelere göre daha az kromozomal anomali tanımlanmaktadır. T hücresinden köken alan kanserler T hücre reseptörlerini özellikle 14q11 de yer alan alfa bölgelerini etkilemektedir. Trizomi 12 ve del(13q) B hücresinden köken alan KLL' de, del(6q)tüylü hücreli lösemide ve erişkin T hücre lösemi/lenfomasında, 2. kromozomun kısa koluna ait yeniden yapılanmalar Sezary sendromunda sık gözlenir. t(1; 20) MM' da sık gözlenen bir sitogenetik anomalidir. Bu bulguların klinik önemleri ile ilgili yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Genellikle MM ve B-KLL' de gözlenen kromozomal anomaliler kötü prognoz kriteri olarak yorumlanmaktadır (1, 6).

### 2.2.1. Akut Lenfoid Lösemiler (ALL)

ALL, lenfoid ana hücrelerin klonal ekspresyonu sonucu gelişir. Malign transformasyon, farklılaşmasının değişik safhalarında gelişebilir. ALL FAB sınıflamasına göre lösemik hücrelerin L1, L2 ve L3 olmak üzere 3 subtipi vardır. Bu sınıflamada daha çok sitolojik özellikler temel alınmıştır. Bu morfolojik sınıflama giderek önemini kaybetmektedir. Bunlar yerine, monoklonal antikörlerin kullanıldığı yüzey belirleyici moleküllerin analizine, sitoplazmik belirleyiciler, kromozom yapısı ve yeniden gen düzenlenmelerinin analizine başvurulmaktadır(7,8).

Özellikle ALL'nin AML'den ayırımında ve kendi içinde alt tiplere ayırımında monoklonal antikörlardan yararlanır (Tablo 2)(7).

**Tablo 2:** ALL ve AML'nin immünofenotipik olarak değerlendirilmesi (CD: Cluster of Differentiation)

AML	ALL
CD 11b (M0,1,2,4,5)	CD 10 (Common ALL antigen=CALLA)
CD 13 (M0-5)	CD 2, CD 5, CD 7 (T-hücreli ALL)
CD 14 (M1,2,4,5)	CD 3 (T )
CD 15 (M2-5)	CD 4, CD 8 (T helper )
CD 33 (M0-7)	CD 5 (B, T)
CD 41 (M7)	CD 19 (B)
CD 61 (M7)	CD 20 (B)

Kromozomal çalışmalarda da prognostik önemi olan yapısal ve sayısal değişiklikler tanımlanabilmektedir. Ayrıca özgül yapısal sitogenetik çalışmalar normal hücresel fonksiyonlar ve onkogeneizde rol oynayan genlerin belirlenmesini sağlamıştır(9). Yeni WHO sınıflaması ALL subtiplerini fenotipik ve sitogenetik özelliklerine göre sınıflamaktadır. Yani FAB sınıflaması bu sınıflamada kullanılmaktadır.

L1 tip ALL: Küçük ve homojen hücrelerden oluşur. Hücrelerin %25'i T lenfosittir. Nükleus membranı düzenlidir. En sık görülen kromozom anomalileri t(9;22), t(1;19), t(4;11), t(8;14), 6q ve 9p anormallikleridir(10).

L2 tip ALL: Hücre sitoplazması daha geniş olup, bir veya daha fazla belirgin nükleolus vardır. Hücrelerin %25'i T lenfositlerdir. Karşılaşılan kromozom anomalileri t(9;22), t(4;11), 6q, +21, +8, i(17q), 7p-,11q- şeklindedir(8,10,11,12).

L3 tip ALL: Hücreler büyük ve homojendir. ALL'nin %5'inden fazlası bu tiptir. Pek çok hücre olgun B lenfositlerden köken alır. Kromozom anomalileri t(8;14), t(8;22), t(2;8), 1q-, +6, 6q-, 8q+'dir(11).

ALL, 5 yaşın altındaki çocuklarda daha sık görülür. Erişkinlerde görülen ALL'nin remisyona oranı ve hayat süresi çocuklara göre daha azdır. ALL'de sayısal ve yapısal kromozom anomalileri ve prognostik değeri Tablo 3 te özetlenmiştir(7).

**Tablo 3:** ALL'de sayısal ve yapısal kromozom anomalileri ve prognostik önemleri (Kern 2005)(7).

<b>Hiperdiploidi</b>	<b>(51-65 kromozom); en sık rastlanılan sayısal kromozomal anomalidir ve iyi prognoz göstergesidir.</b>
<b>Tetraploidi</b>	(82-94 kromozom); kötü prognoza işaret eder.
<b>Hipodiploidi</b>	(<46 kromozom); kötü prognoza işaret eder.
<b>Psödodiploidi</b>	(yapısal anomali gösteren 46 kromozom); kötü prognoza işaret eder.
<b>T(12;21)</b>	Periatrik öncül B-ALL'lerin %25'i, TEL/AML1 gen değişimi, iyi prognoz, genellikle standart sitogenetik analiz ile yakalanmaz, moleküler yöntemlerle bakılmalıdır.
<b>T(9;22) Ph Kromozomu</b>	Pediyatrik ALL'lerin %5'i, erişkin ALL'lerin %30'u, BCR/ABL gen değişimini taşır. Kötü prognoz; sıklıkla miyeloid antijen ekspresyonu ile birlikte.
<b>T(1;19)</b>	Pediyatrik ALL'lerin %5'i; B-öncül hücre fenotipi, E2A/PBX1, daha önce kötü prognoza işaret ederken agresif tedavi sonrası prognoza katkısı anlamlılığını yitirmektedir.
<b>T(v;11q23)</b>	Pediyatrik ALL'lerin %4-8'i, MLL gen değişimi; birçok eşdeğeri, infantil ALL'de siktir (1 yaş); kötü prognoz; sıklıkla CD10, CD15 <sup>+</sup> fenotip
<b>T(8;14), t(2;8), t(8;22)</b>	Pediyatrik ALL'lerin <% 5'i, c-MYC onkogeni; immünooglobulin, Burkitt hücreli lösemi ile ilişkilidir; agresif genleri kemoterapi öncesi dönemde kötü prognoz göstergesiydi; agresif tedavi ile daha az önemli, daha iyi sonuçlar alınır.

Ph kromozomu t(9;22)(q34;q11) ALL'de sık gözlenen bir düzenlemedir. Yaklaşık yetişkin ALL'lerin %30'unda, çocuk ALL'lerin %5'inde saptanır. Sitogenetik düzeyde kopma noktaları KML'ye benzemektedir(13). ALL vakalarında BCR (Breakpoint Cluster Region)'nin kırılma noktası major BCR olarak adlandırılan bölgeye yerleşmektedir. Buna uyan protein p210 proteindir veya minör BCR olarak adlandırılan bölgeye yerleşmektedir ki

buna uyan protein de p190 proteinidir. Oysa KML vakalarının büyük çoğunluğunda major BCR bölgesinde kırılma olmakta ve ilgili protein p210 olmaktadır (14,15).

### 2.2.2. Akut Miyeloid Lösemi (AML)

Akut myeloid lösemi (AML) hematopoeitik kök hücrelerinin klonal çoğalması ile oluşur. Çoğunlukla tek yönlü farklılaşabilen (unipotent) ve az oranda da çok yönlü farklılaşabilen (pluripotent) kök hücrelerinden gelişir. Klonalite ve stem hücrelerinin bozuklukları değişik kromozom teknikleri ile gösterilebilir. Bu tekniklerle çok sayıda AML vakasında kromozom anomalilerine rağmen lösemik hücrelerin granülosit, eritrosit, monosit ve megakaryositlere farklılaşmasının devam ettiği görülmektedir. Böylece AML, farklılaşma hiyerarşisinin devam ettiği bir malignite olarak tanımlanır(8,11).

AML de değişik hücre serilerinin blastik hücre birikimi vardır. Lösemik blastlar normal hematopoezi baskımlarken,  $10^{11}$  ile  $10^{12}$  hücre içeren lösemik kitle oluşana kadar hasta anemik, nütropenik veya trombositopenik olmaz. Solukluk, enfeksiyon, kanama en sık rastlanan belirtilerdir(8)

65 yaş altı AML hastalarında uzun süreli hastaliksız yaşam oranı % 40'lar civarındadır. Daha ileri yaştaki hastalarda ve özellikle sekonder AML olgularında prognoz daha kötüdür. Tedaviye yanıt vermesi bakımından de novo AML'ye göre de oldukça dirençlidir. Kromozom analizi, hücre kaynağı, morfolojisi ve muhtemel patogenezi ile ilişkili yapısal anormallikleri ortaya koyar. Bazı kromozomal değişiklikler prognozla ilişki gösterir. Sitogenetik özelliklerine göre AML tanılı hastalar 3 grupta incelenir (Tablo 4)(7,11).

**İyi prognozlu grup:** t(8;21), t(15;17), inv(16) veya t(16;16) sitogenetik bozuklukları gösteren ve daha önce hematolojik hastalığı bulunmayan ve AML'si tedaviye bağlı gelişmemiş 60 yaş altı hastalar bu gruptadır. Bu de novo AML olarak da sınıflandırılır. Tam remisyon oranları % 85'in üzerindedir(11).

**Kötü prognozlu grup:** İki'den fazla kromozomda sitogenetik anomali, kromozom 5 veya 7 monozomisi, 5. kromozom uzun kol delesyonu veya 3. kromozomun uzun kolunda anomali gösteren AML'li hastaları kapsar. Tanımlanan bu bozukluklar sıklıkla ileri yaştaki hastalar ve sekonder AML'de bulunur. Tam remisyon oranları düşüktür(8,11)

**Standart (orta riskli) prognozlu grup:** İyi ve kötü prognoz grubundaki sitogenetik değişikliklerin dışında karyotip gösterirler(8,11).

ALL ve AML'de sayısal ve yapısal anormalliklerin prognostik önemi Tablo 3, Tablo 4 ve Tablo 5'da gösterilmiştir(7).

**Tablo 4:** FAB Grubunun AML Sınıflaması(7).

Alt tip	Özellikler	Yorum
M0: Minimum farklılaşma gösteren grup	Blastların <%3'ünde MPO veya SB pozitifdir.	AML'nin % 5- 10'udur, ALL'ye Benzer
M1: Olgunlaşma göstermeyen grup	Miyeloid hücrelerin >%90'ı blastik hücrelerden oluşur;blastların>%3'ü MPO ve SB ile boyanır	AML'nin %10-20 si
M2: Olgunlaşma gösterenAML	Myeloblastların oranı %30'dur.	AML'nin % 30-45'i t(8;21) %25 olguda > pozitifdir.
M3: Akut promiyelositer lösemi • Hipergranüler varyant • Mikrogranüler varyant	Hipergranüler (%75):büyük sitoplazmik granüller promiyelositler baskındır. Mikrogranüller (%25): küçük granülleri olan promiyelositler	AML'nin % 5-10'u t(15;17) ile ilişkilidir.
M4: akut miyelomonositik Alt tip: İlikte anormal eozinofillerin bulunduğu AMML (M4Eo)	Çevresel kanda monositöz hakimdir. M4Eo: kemik iliğinde büyükbazofilik granüllü anormal eozinofiller bulunur.	AML'nin % 15-25'i M4Eo varyant inv(16) veya t(16;16) ile ilişkilendirilmiştir
M5: Akut monositik lösemi • M5A • M5B	M5A: Kİ hücrelerinin >%80'i monoblastlardan oluşmuştur. M5B: Promonositler ön plandadır	M5A, AML'nin % 5-8'i M5B, AML'nin % 3-6'i
M6: Akut eritrolösemi	Kİ hücrelerinin >%50'si eritroid öncüllerden >30'u miyeloblastlardan oluşur	AML'nin %5'i
M7: Akut megakaryositik lösemi	Miyeloblastların >%50'si megakaryositik antijenleri ekspres eder.	AML'nin % 8-10'u

(MPO: miyeloperoksidaz, SB: Sudan Black, Kİ: kemik iliği).

**Tablo 5:** AML’de sayısal ve yapısal kromozom anomalileri ve prognostik önemi (Kern 2005)(7).

Sayısal kromozomal anomaliler	İleri yaşta görülen AML’ler ve sekonder AML’de, kötü prognozlu
Kromozom 7 delesyonu	İleri yaşta görülen AML’ler ve sekonder AML’de, kötü prognozlu
Kromozom 5 veya uzun kolu delesyonu	İleri yaşta görülen AML’ler ve sekonder AML’de, kötü prognozlu
Kromozom 8 anomalisi ve diğerleri	İleri yaşta görülen AML’ler ve sekonder AML’de, kötü prognozlu
T(8;21)	AML1/ETO gen değişimi, AML-M2’de görülür, iyi prognozludur
inv(16), t(16;16)	MYH11 geni 16p üzerindedir. M4Eo’de görülür, iyi prognozludur.
T(15;17)	PML/RAR-alfa gen değişimi, AML-M3 subtipinde görülür, iyi prognozlu
T(11q23;var)	MLL geni 11q23 üzerindedir, AML-M5 subtipinde görülür. Kötü prognozludur.

### 2.2.3. Kronik Lenfositik Lösemi (KLL)

Genellikle orta yaşta ve sıklıkla 60 yaşın üstünde görülür. KLL, matür lenfositlerin klonal ekspresyonundan kaynaklanır. Hastaların % 95’inde hastalık B lenfosit kaynaklıdır. Uzun yaşam süresine sahip, küçük, olgun lenfositlerin kemik iliği, periferik kan ve lenfoid organlarda artmış üretimleri ile lenf bezleri, dalak ve karaciğer dokularında büyüme ve bu organlara lenfositlerin infiltrasyonu gerçekleşir.

KLL oluşumunda genetik faktörler, bağışıklık sistemi ve kromozomal değişiklikler rol oynar (16). İmmünofenotipik olarak değerlendirildiğinde KLL’de B hücre belirteçleri (CD19, CD20, CD23) ve T hücre belirteci olan CD5 ekspresyonu gösterilir. Sitogenetik olarak değerlendirildiğinde KLL’de standart sitogenetik analiz yapmak güçtür; çünkü hücrelerin mitoz hızı düşüktür. Standart kromozom analizinde olguların yaklaşık yarısında sitogenetik anomaliler görülür. En sık gözlenen bozukluk trizomi 12’dir. Ayrıca del(13q), p53 del(17p13.1) ve del(14q) bozuklukları da sıkça görülür(8).

#### 2.2.4. Kronik Myeloid Lösemi (KML)

KML, hematopoetik kök hücrelerinin klonal ekspansiyonu sonucu gelişen malign klonal bir hastalıktır.

KML, spesifik karyotipik anomalinin saptandığı ilk hastalıktır. KML tüm lösemilerin %20'sini oluşturur. Her yaşta görülmekle birlikte ileri yaş hastalığıdır. Erkeklerde kadınlara göre daha sık görülür (17,18,19).

Nowel ve Hungerford (1960), KML hastalarında G-grubu kromozom anomalilerini tanımlamıştır. Philadelphia=Ph kromozomu olarak adlandırılan bu yeni oluşum 9 ve 22 nolu kromozomlar arasındaki resiprokal translokasyon sonucu oluşur. Bu translokasyon kromozom 9q34' teki 3' ABL gen bölgesini, kromozom 22q11' deki 5' BCR gen segmentine ekler. Böylece hibrit BCR-ABL geni oluşur (17,20). Bu genetik değişiklik 210 kilodalton ağırlığında, tirozin kinaz aktivitesine sahip füzyon proteini kodlar. Genlerin füzyonları ile tirozin kinaz normalden daha uzun sentezlenir. Bu genin oluşturduğu protein ayrıca hemotopoetik hücrelerin değişiminde rol oynar (21,22).

Hastalığın klinik seyri stabil veya kronik faz, akselere faz ve blastik faz olarak 3 evreye ayrılabilir. Tanı konulduktan sonra tedavisiz yaklaşık 3-5 yıl sonra akselere veya blastik faza ilerler (23,24). Bu fazları kısaca açıklarsak;

#### **Kronik Faz**

Periferik kanda lökositöz,  $20 \times 10^3/\text{mm}^3$  ile  $500 \times 10^3/\text{mm}^3$  arasındadır. Myeloblast oranı % 3'ten azdır.

Sitogenetik inceleme sonucu Ph kromozomunun tüm hücrelerdeki varlığı tanımı doğrular. Standart sitogenetik yöntemler ile hastaların %85-95'inde Ph kromozomu tespit edilir ve çok nadir hastada Ph kromozomu bulunmaz.

Hastaların %5-10'unda BCR geninin yeniden düzenlenmesini sağlayan varyant translokasyonlar saptanmıştır (23,24).

### **Akselere Faz**

Blastik faza geçiş ani veya yavaş olabilir. Genellikle fazın blastik faza ilerlemesi ilk yıl % 5 ve sonraki yıllarda % 20-25 dir. Periferik kanda blast % 5–30, kemik iliğinde ise % 10–30 arasındadır (23,24,25).

### **Blastik Faz**

Beyaz küre sayısı tedavi ile zorlukla kontrol altına alınabilir. Anemi ve trombositopeni derinleşir. İlerleyen splenomegali gözlenir. Kemik iliği periferik kanda myeloblast oranı % 30'u geçer. Periferik kan veya kemik iliğinde bazofil+eoziyofil % 20'den fazladır. Devamlı trombositoz veya trombositopeni olabilir. Hastaların % 70-80'inde yeni mutasyonlar gelişir (2. Ph, trizomi 8, iso(17q), +19 ve Y kaybı) (11,23,24,25).

### **2.2.5. Lenfoma**

Lenfoma terimi lenfatik sistemden kaynaklanan kanserleri tanımlamak için kullanılır. Sıklıkla lenf nodlarından köken alır ve nedeni bilinmemektedir. Hodgkin ve Non-Hodgkin lenfoma olmak üzere iki ana grupta incelenir (6).

**Hodgkin lenfoma (HL):** Görüldüğü lenf düğümlerinden diğerlerine düzenli bir şekilde yayılır.

**Non-Hodgkin lenfoma (NHL):** Görüldüğü lenf düğümlerinden diğerlerine lenfatik sistem ve kan yoluyla düzensiz olarak yayılır.

Lenfoma, bugüne kadar sınıflaması en sık değişen neoplasm grubu oluşturur. 1966 yılında Rapaport, 1974 Lukes/Collins, 1982 Working Formulation, 1994 R.E.A.L ve 2001 Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, 2001) ve son olarak 2008 Dünya Sağlık Örgütü sınıflamalarıdır(WHO,2008) (Tablo 6). WHO sınıflaması, dünyada hematopatoloji ve klinik onkoloji konusunda deneyimli klinisyenlerin morfolojik, klinik, immunolojik ve genetik verileri dikkate alarak oluşturdukları konsensus sonucu ortaya konmuş ve halen geçerliliğini sürdüren son sınıflamadır(7,11,26).

**Tablo 6:** Lenfoid Malignitelerin WHO (2008) Klasifikasyonu (26)

<b>B hücreli</b>	<b>T hücreli</b>	<b>Hodgkin hastalığı</b>
<b>1- Prekürsör B neoplasmları</b>	<b>1-Prekürsör T neoplasmları</b>	<b>1-Nodüler lenfosit predominant Hodgkin hastalığı</b>
-B lenfoblastik lösemi/lenfoma -B lenfoblastik lösemi/lenfoma (muhtelif genetik anomalilerle birlikte olan form)	-T lenfoblastik lösemi/lenfoma	
<b>2-Mature B hücre neoplazmları</b>	<b>2-Matüre T hücre neoplazmları</b>	<b>2-Klasik Hodgkin Hastalığı</b>
-KLL/küçük lenfositik lenfoma -B prolenfositik lösemi -Tüylü hücreli lösemi -Splenik marjinal zon lenfoma -Splenik lenfoma (sınıflandırılmayan) -Lenfoplasmasitik lenfoma -Ağır zincir hastalıkları -Plasma hücre neoplasmları -Ekstranodal marjinal zon lenfoma (MALT tipi) -Nodal marjinal zon lenfoma -Foliküler lenfoma -Primer kutaneoz folikül merkez lenfoması -Mantle hücreli lenfoma -Diffuz büyük B hücreli lenfoma -T hücre/histositten zengin B hücreli lenfoma -Primer CNS Diffuz büyük B Hücreli lenfoma(DBBHL) -Bacak tipi primer DLBCL -İleri yaş EBV pozitif DLBCL -Kronik enflamasyona eşlik eden DLBCL <b>-Lenfomatoid granulomatosis</b> -Primer mediastinal büyük B hücreli lenfoma -İntravasküler büyük B hücreli lenfoma -ALK pozitif büyük B hücreli lenfoma -Plasmablastik lenfoma -HHV8 assosiyе multisentrik Castleman Hastalığından oluşan DBBHL -Burkitt lenfoma -DBBHL ile Burkitt arası ayırım yapılamayan B hücreli lenfoma -DBBHL ile klasik Hodgkin lenfoma ayırımı yapılamayan lenfoma	-T hücreli prolenfositik lösemi -T hücreli granüler lenfositik lösemi -Kronik NK hücreli lenfoproliferatif hastalık -Agresif NK hücreli lösemi -EBV pozitif çocukluk T hücreli lenfoproliferatif hastalıkları -Erişkin T hücreli lösemi/lenfoma -Ekstranodal NK/T hücreli lenfoma, nazal tip -Enteropati assosiyе T hücreli lenfoma -Hepatosplenik T hücreli lenfoma -Subkutan pannikulit benzeri T hücreli lenfoma -Mycosis Fungoides -Sezary sendromu -Primer kutaneos CD30+ T hücreli lenfoproliferatif hastalıklar -Primer kutaneos gama-delta T hücreli lenfoma -Periferik T hücreli lenfoma - Anjioimmunoblastik T hücreli lenfoma -Anaplastik büyük hücreli lenfoma (ALK pozitif) -Anaplastik büyük hücreli lenfoma (ALK negatif)	-Noduler Sklerozan HH -Lenfositten zengin HH -Mikst sellüler HH -Lenfositten Fakir HH

Bu sınıflamanın özelliği immunolojik olarak lenfoid maligniteleri prekürsör B ve T ile matür B ve T hücreleri şeklinde ikiye ayırmakta, akut lenfoblastik lösemiye ( B ve T ) prekürsör B ve T grubuna dahil etmektedir.

Ülkemizde gözlenen lenfomaların istatistiği Tablo 7’de verilmiştir(7).WHO sınıflandırmasında, sık görülen B hücreli lenfomaların genetik özellikleri Tablo 8 de verilmiştir (26,27,28)

**Tablo 7:** Türkiye’de Lenfoma Altgrupları Dağılımı (Kern 2005)(7).

Lenfoma Tipi	%
<b>Küçük Lenfositik Neoplazmlar</b>	10,4
<b>MALT</b>	2,9
<b>Foliküler Lenfoma</b>	5,6
<b>Mantle Hücreli Lenfoma</b>	3,2
<b>Diffüz Büyük Hücreli</b>	30,1
<b>Plazma Hücreli Neoplaziler</b>	3,0
<b>Burkitt Lenfoma</b>	3,1
<b>T Lenfoblastik Lenfoma</b>	2,3
<b>Mycosis Fungoides</b>	1,2
<b>Anaplastik Büyük Hücreli Lenfoma</b>	2,9
<b>Hodgkin Lenfoma</b>	20,9
<i>5 Merkez- 3704 Vaka</i>	

**Tablo8:**WHO sınıflandırmasında, sık görülen B hücreli lenfomaların genetik özellikleri(26,27,28).

Hastalık	Karyotip	İlgili Genler
<b>Lenfoplazmositoid varyant</b>	t(9;14)(%50)	Pax 5(9q13) B hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını kontrol eder
<b>Mantle Hücreli Lenfoma</b>	t(11;14) (%70)	BCL-1(11q13) Hücre döngüsünü kontrol eder
<b>Foliküler Lenfoma</b>	t(14;18) (%70-95)	BCL-2(18q21)apoptozisi engeller
<b>Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma</b>	t(14;18) ve (3q27)	BCL-6(3q27) Germinal merkez olgunlaşması
<b>Burkitt Lenfoma</b>	t(8;14),t(2;8) veya t(8;22)(%100)	c-myc(8q24) transkripsiyon faktörü, çoğalmayı, farklılaşmayı ve apoptozisi kontrol eder
<b>MALT Lenfoma</b>	Trizomi 3(%60), t(11,18) ektranodal olguların %25 i	API2, MLT Apoptozun engellenmesi

### 2.2.6. Multipl Myelom

Plazma hücre diskrazileri olan Multipl Myelom, MGUS, Amilodoz, ve Waldenström makroglobulinemisi arasında en sık görülen malignite multipl miyelomdur. Hastalık erkeklerde kadınlara göre daha sık gözlenmekte olup bazı etnik gruplarda daha sık saptanmaktadır. t(1; 20) MM' da sık gözlenen bir sitogenetik anomalidir. Bu bulguların klinik önemleri ile ilgili halen yoğun çalışmalar vardır. Genellikle MM ve B-CLL' de gözlenen kromozomal anomaliler kötü prognoz kriteri olarak yorumlanmaktadır(1,6)

### 2.2.7. Miyelodisplastik Sendrom (MDS)

Miyelodisplastik sendrom kemik iliğinin disfonksiyonuna bağlı yapılan hücre sayısının azlığı veya hatalı yapımı ile karakterize bir hastalıktır. Olguların yaklaşık üçte biri AML tablosuna döndüğü için bu olguların takibinde sitogenetik analiz en önemli prognostik parametrelerden biridir. MDS olgularında gözlenen sitogenetik anomalilerin hemen tümü AML'de tanımlanan anomalilerdir. Sadece AML veya MDS' ye özgün sitogenetik anomali yoktur. MDS olgularında sıklıkla del 5(q), monozomi 7, trizomi 8, del 8, 20q-, -Y ve del (7q) anomalileri gözlenir. Bu nedenle kromozom 5 ve 7'ye ait anomaliler AML olgularında MDS'den geçişli AML olarak yorumlanabilir. Olguların subtipine özgün sitogenetik anomali bulunmamaktadır. En sık t(1;3);(p36;q21), t(1;7)(q10;p10), inv(3)(q21;q26), monozomi 5, del (5q), trizomi 6, t(6;9)(p23;q24), monozomi 7, del (7q), trizomi 8, rizomi 9, t(9;22), trizomi 11, inv (16) (p13q22), i(17q), trizomi 19, del (20q) sitogenetik anomalileri tanımlanmaktadır (28,29).

### 2.2.8. Diğer Kronik Miyeloproliferatif Bozukluklar: (KMPH) (Polisitemia

#### Vera, Esansiyel Trombositopeni, İdiyopatik Miyelofibrozis)

Kronik myeloproliferatif neoplaziler (MPNs), klonal hemapoetik kök hücre maligniteleri olup bir veya birkaç myeloid serinin klonal proliferasyonu ve hemapoetik progenitörlerin sitokinlere aşırı duyarlılığı ile karakterizedir. Kronik myeloproliferatif neoplaziler; kronik myeloid lösemi (KML) ile BCR/ABL negatif MPNs olarak adlandırılan polisitemia vera (PV), esansiyel trombositemi (ET) ve idiopatik myelofibrozis (MF) olmak

ve monositer kökenli diğer klinik tabloları içine alır. Birçok olguda; JAK2 geninin 617. kodonunda nokta mutasyon (V617F) gözlenir. V617F mutasyonu hastalarda klinik tanı, tedavinin izlemi ve hastalık relapsının saptanmasında kullanılır (30).

Ph (Negatif) KMPH içinde polisitemia vera, idiyopatik myelofibrozis, esansiyel trombositemi olgularda az da olsa maligniteye geçiş söz konusu olduğu için prognoz takibinde rutin sitogenetik araştırma en önemli prognostik kriterlerden birisidir. Sadece bu olgulara özgün sitogenetik anomali yoktur. Kromozom 1, 5q-, -7, +8, +9, t(9;22) (q34;q11), 13q-, i(17q) ve 20q- sıklıdır. t(6;9), t(8;21), t(15;17) ve inv (16) sitogenetik anomalileri nadir olarak gözlenir. AML' de gözlenen bu anomaliler AML' ye geçişin belirteci olabilir. Kronik myeloproliferatif hastalıklarda kromozomal anomalilerin bulunması kötü prognoz belirteci olarak yorumlanmalıdır (1).

Myeloproliferatif Hastalıkların Sınıflandırması aşağıdaki gibi son şeklini almıştır(27).

1. Kronik miyeloid lösemi (BCR/ABL pozitif)
2. Kronik miyeloid lösemi (BCR/ABL negatif)
3. Kronik notrofilik lösemi
4. Primer miyelofibroz
5. Primer (esansiyel) trombositemi
6. Polisitemia vera
7. Kronik eozinofilik lösemi
8. Kronik miyelomonositik lösemi (KMML)
9. Juvenil kronik miyelomonositik lösemi

## **2.3. Hematolojik Maligniteler ve Genetik Değişiklikler**

### **2.3.1. Kromozomal Değişim Terminolojisi**

Ayrı ayrı lösemi gruplarını genetik olarak incelemeyden önce konuyu daha iyi anlayabilmemiz için gerekli terminolojiyi bilmek gereklidir. Kromozomlar sayısal ve yapısal olarak adlandırılan iki tip düzensizliğe sahip olabilmektedirler. Bunlar ayrı ayrı özel bir terminoloji ile şu şekilde açıklanır(11,31,32).

1. Yer Değiştirme (Translokasyon)
2. Eksilme (Delesyon)
3. Artma (Duplikasyon)
4. Ters Dönme (İnversiyon)
5. Halka (Ring) Kromozom
6. İzokromozom

### **2.3.2. Kanserlerde Gözlenen Diğer Yapısal Bozukluklar**

Normal bir hücre siklusunda presentetik faz G1, DNA sentez fazı S, premitotik faz G2, Mitotik faz M fazı olarak bilinir. Labil ve stabil hücrelerde rejenerasyon kapasitesi vardır ve bu düzenli olan siklusta her zaman mümkün olmaktadır. Parankim hücrelerinin bulunduğu stroma, özellikle bazal membran (BM), organize rejenerasyon için gerekir.

Hücre büyümesinde moleküler olaylar, büyüme faktörünün (growth faktör GF) normal büyüme kontrol yoluyla ilişkili genlerin salınımını etkileyerek hücre proliferasyonuna yol açtığından anlaşılmasından sonra aşama kaydetmiştir. Büyüme kontrol eden genler protoonkogen olarak tanımlanır. Protoonkogenlerin salınımı, normal büyüme ve rejenerasyon boyunca sıkı kontrol altındadır. Protoonkogenlerin yapısında meydana gelen değişiklikler onların kontrolsüz hücre büyümesine neden olan onkogenlere dönüşümünü sağlar(11).

Hem normal hücre siklusu ve kanser basamaklarında önemli olan 3 sistem vardır.

- 1) Hücre yüzey reseptörleri
- 2) Sinyal (uyarı) iletim sistemi
- 3) Transkripsiyon faktörleri

#### **2.3.2.1. Hücre Yüzey Reseptörleri**

Hücre büyümesi, ajanın (çoğunlukla bu büyüme faktörüdür) spesifik reseptörlere bağlanmasıyla başlar. Reseptör proteinleri hedef hücrenin sitoplazmasında, hücre yüzeyinde

veya nükleusunda olabilir. Üç tip hücre yüzey reseptörü hücre büyüme ve gelişmesinde önemlidir. Bu reseptörler ile alınan uyarı, uyarı iletim aracılığıyla nükleusa iletilir(11).

1. İntrinsik kinaz aktivasyonu ile ilişkili reseptörler bu yolla çalışan reseptörler Epidermal büyüme faktörü, Fibroblast büyüme faktörü, Platelet kökenli büyüme faktörü vb.dir.
2. İntrinsik katalitik etkisi olmayan reseptörler Sitokinler bu yolla etkilidir.
3. G proteinine bağlı reseptörler hücre büyümesinde pek katkısı yoktur.

### 2.3.2.2. Uyarı İletim Sistemi

Protein kinaz uyarı iletim sistemi ile ekstraselüler uyarılar alınıp intraselüler uyarıya dönüştürülerek hücre sel cevap oluşturulur (11). Hücre büyümesinde önemli olan

- 1) Protein kinaz sistemleri
- 2) Mitojen aktive eden protein kinaz (MAP kinaz)
- 3) PI-3 Kinaz (Fosfoinozid-3kinaz)
- 4) IP-3 (İnositol 3 fosfat)
- 5) cAMP yolu
- 6) JAK/STAT (Janus kinaz) sistemidir.

Bunlardan en önemlisi ve sık kullanılanı MAP kinaz sistemidir. GF uyarı sisteminde etkili olan yoldur ve ras bu yolda bilinen protoonkogendir. Inositol lipid yolu proteinkinaz C'yi aktive eder bu da çeşitli hücre sel komponentleri fosforile ederek siklusun S fazına girmesini sağlar. CAMP yolu ise adenilat siklaz aktivasyonu sağlanarak cAMP artar ve protein kinaz A aktive olur böylece hedef genlerin ekspresyonu stimule edilir. JAK/STAT yolunda, intrinsik kinaz aktivitesine sahip olmayan sitokinler sitoplazmadaki protein kinazları aktive ederler.

### **2.3.2.3. Transkripsiyon Faktörleri**

Nükleusta regülasyon transkripsiyon gen düzeyinde yapılır ve transkripsiyon faktörleri ile kontrol edilir. Hücre proliferasyonunu ayarlayan faktörler c-myc, p53 ve Rb (retinoblastom geni)'dir. Transkripsiyon faktörleri fosforile olduktan sonra subselüler lokalizasyonu veya DNA'ya afinitesi değişir, bu da gen ekspresyonunu değiştirir.

Büyüme faktörleri reseptörlerine bağlanır ve onları aktive eder, uyarı iletiminde görevli proteinler fosforile olur, kinazlar serisi aracılığıyla sinyal nükleusa iletilir, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu DNA sentezi başlar ve S fazına giriş sağlanır.

### **2.3.3. Kanserde Etki Gösteren Tümör Süpresör Genler**

Fizyolojik fonksiyonları, tümör oluşumunu engellemek olmayıp hücre büyümesini kontrol etmektedir. Knudson'un 2 mutasyon teorisine göre, herediter olan olgularda bir genetik değişiklik herhangi bir ebeveynden gelir ve tüm somatik hücrelerde vardır; İkinci mutasyon ise retinal hücrelerin herhangi birinde olur ki bu ilk mutasyonu da taşımaktadır. Sporadik vakalarda ise her iki mutasyon aynı tek hücrede somatik olarak mevcuttur. Buna en iyi örnek retinoblastoma geninde açıklanmıştır. Mutant kalıtsal Rb geni taşıyan çocuk, Rb lokusu için heterozigot olduğundan normaldir ama kanser gelişme riski yüksektir. Mutant allel homozigot olursa kanser gelişir.

Tümör süpresör genlerde protoonkogenler gibi hücrenin yüzeyinde, sitoplazmasında ya da nükleusta etkili olmalarına bağlı olarak gruplandırılırlar.

#### **2.3.3.1. Hücre Yüzeyinde Etkili Tümör Süpresör Genler**

Hücre büyüme ve davranışını regüle eden hücre yüzeyinden salınan Transforming Growth Faktör beta (TGF $\beta$ ) gibi çeşitli tipte moleküller bulunmaktadır. TGF $\beta$ , büyümeyi inhibe eder.

### 2.3.3.2. Uyarı İletim Sistemini Regüle Eden Sitoplazmik Tümör Supresör

#### Genler

Tümör süpresör genlerin etkili olduğu diğer bir alan büyüme sinyalini azaltmaktır. Nöröfibromin 1 (NF1) geni ile Adenomatöz Polipozis Geni(APC) bu kategoridedir. NF1'de ve APC'de germ çizgi mutasyonu benign tümörlerle ve karsinom prekürsörleriyle ilişkilidir(8).

#### 1)Nükleusta etkili tümör süpresör genler

Nükleusta lokalize olan tümör süpresör genler retinoblastom(Rb), p53 ve Wilms tümör (WT1) dür.

#### **Retinoblastom (Rb);**

İlk tanınan tümör süpresör genidir. Hücre siklusunda anahtar rolü vardır. Her hücre tipinde eksprese edilir. Aktif ve inaktif formu vardır. Aktif formunda hücre siklusunda G1'den S'e geçerken fren görevi yapar. Hücreler Growth Faktör(GF) ile fosforile olunca Rb inaktifleşir ve fren ortadan kalkar. S fazına giren hücreler bölünmeye başlar. Rb proteini olmazsa hücre siklusunun moleküler freni bozulur ve hücreler sürekli S fazına girer.

Sonuç olarak hücre siklusunun kontrolünün kaybı malign transformasyonun merkezidir ve siklusun 4 anahtarından en azından birinin mutasyonu gerekir. Bunlar Rb, siklinler, SBK'lar ve SBK inhibitörlerinden p16 dır.

#### **P53 Geni:**

İnsanda gözlenen tümörlerde en sık gözlenen genetik değişikliktir. %50'den fazla bu tümörlerde genetik mutasyon olur. P53'ün homozigot kaybı hemen her tip kanserde görülür. Daha nadir olarak bazıları p53'ü kalıtsal şekilde mutant allel olarak bulundurur. Rb geni gibi bir mutant allelin kalıtımı kişinin malign tümör geliştirmesi için predispozandır çünkü sadece ek bir tek arıza normal olan ikinci alleli bozar(11).

1) P53 kritik kapı bekçisi gibidir. Nükleusta lokalizedir. Diğer genlerin transkripsiyonunu kontrol etmek primer görevidir. DNA hasarı, radyasyon, mutajenik kimyasallar ile temas sonucu genetik materyalin zarar görmesi ile uyuyan p53 harekete geçer. 2 ana hedefi vardır.

- 2) Hücre siklusunu durdurmak
- 3) Apoptozisi indüklemek.

## **2.4. Hematolojik Malignansilerde Kullanılan Metodlar ve Mutasyon**

### **Tarama Testleri**

Lösemi olgularında kromozomal anomaliler klasik sitogenetik, Floresan İnsitu Hibridizasyon (FISH), polimeraz zincir reaksiyonu gibi yöntemler ile araştırılmaktadır (33).

#### **2.4.1. Klasik Sitogenetik Analiz Yöntem**

Hematolojik hastalıklarda genellikle kemik iliği olmak üzere periferik kandan da inceleme yapılabilir. Sitogenetik çalışmalar için gerekli olan metafaz kromozomlarının direkt yöntem ile elde edilmesinde spontan mitotik aktivitesi olan kemik iliği hücreleri tercih edilir ya da kültür yöntemi kullanılır. İncelenebilecek metafaz sayısını arttırmaya yönelik olarak periferik kandan da direkt yöntem ile metafazlar elde edilmektedir.

Kültür yönteminde, ortamdaki hücreleri (lenfosit) uyararak mitozaya sokmak için Phytohaemaglutinin (PHA) kültür ortamına eklenir. İdeal kültür süresi 37°C'de 72 saattir. Kültüre hücrelerin metafazda durdurulması ortama iş ipliklerin protein yapısını bozmak suretiyle görev yapan kolşisin ilavesiyle olmaktadır. Daha sonra hacimce çekirdek ve kromozomları genişletmek için hipotonik solüsyon ile muamele edilen hücreler en son olarak fiksatif ile fikse edilerek daha kaliteli metafazlar elde edilmektedir. Bundan sonraki aşama kromozomların çeşitli bantlama teknikleri kullanmak suretiyle farklı açılardan değerlendirilmesini içermektedir. Düz olarak boyanan kromozomlar sadece sayısal anomaliler için değerlendirilebilecek iken; GTG (Giemsa-Tripsin-Giemsa), NOR (Nükleer Organiser Region), HRB (High resolution bantlama), RBG (Reverse-banding giemsa), SCE (Sister chromatid Exchange) gibi farklı teknikler ile kromozomlar farklı açılardan değerlendirilmektedir.

##### **2.4.1.1. GTG Bantlama Tekniği**

Rutin sitogenetik laboratuvarların birçoğunda kullanılan teknik GTG bantlama tekniğidir. Yöntemde, kromozomal proteinler olan histonlar ve nonhistonlar tripsin ile denatüre edilerek açıkta kalan DNA'nın Adenin ve Timin bazlarınınca zengin tekrarlarından oluşan bölgelerine Giemsa'nın girmesi sonucu bu bölgeler koyu boyanmakta ve

heterokromatin bölgeler olarak adlandırılmaktadır. Boyanmayan bölgeler ise ökromatin bölgelerdir ve yapısal genleri içerir. Bu işlem sonunda her kromozom çiftine özgü açık ve koyu bantlar görünür hale gelmektedir. 1995'deki konferansta kabul edilen ISCN (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature) sınıflandırmasına göre kromozomlar değerlendirilmektedir ve karyotip yazımı da aynı toplantıda standardize edilen yazım kuralları ile yapılmaktadır (1,34).

Sitogenetik analiz yöntemi ile genomun genel görünümü belirlenmektedir. Kanser genetiğinde de tanının konulması, takibi, tedavi ve hastalığın ilerlemesi ile ortaya çıkabilecek ikincil kromozomal düzensizliklerin tespitine imkan vermektedir(35).

#### **2.4.1.2. Mikronükleus Tekniği**

Yine bir diğer mutasyon tarama testi olan mikronükleus tekniği de lösemili vakaların değerlendirilmesinde kullanılabilir. Mikronükleus tekniği kromozomları görüntülemeye yönelik bir çalışma olmayıp çeşitli mutajen ve karsinojenlerin hem in vivo, hem de in vitro koşullar altında neden olduğu DNA hasarını saptamayı sağlayan sitogenetik yöntemlerden birisidir(11).

#### **2.4.1.3. Kardeş Kromatid Değişimi Tekniği**

Çeşitli mutajen ve karsinojenlerin hem in vivo, hem de in vitro koşullar altında neden olduğu DNA hasarını saptamayı sağlayan sitogenetik yöntemlerden bir diğeri de Kardeş Kromatid Değişimi (KKD)=Sister Chromatid Exchange (SCE)'dir. KKD, DNA'daki çok küçük harabiyetlerin bile hassas göstergesi olarak kabul edilir. DNA hasarının ve indüklenmiş DNA tamirinin gösterilmesinde en basit, duyarlı ve kısa zamanda sonuç veren bir yöntem olarak kullanılmaktadır (36,37).

KKD yeni mutajenik ajanların duplike olmuş kromatid ve eski kendi kardeş kromatidi arasında kromozom morfolojisi değişmeksizin simetrik olarak özdeş segmentlerin değişimidir (38).

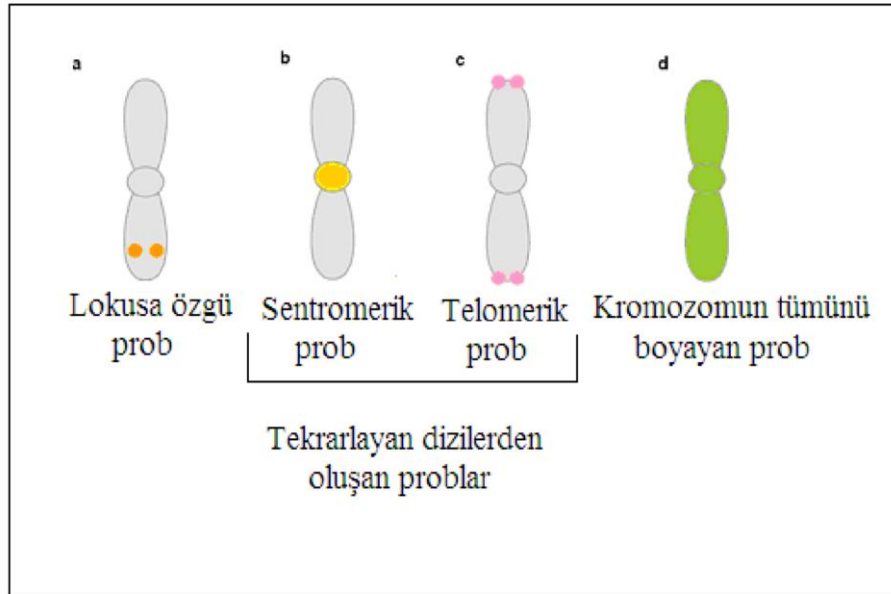
#### **2.4.2. Moleküler Sitogenetik Yöntemler (Fluoresan in situ hybridization (FISH))**

Klasik bantlama yöntemlerinde analizin metafaz kromozomlarından yapılması ve bu olgularda yeterli ve kaliteli metafaz elde edilememesi moleküler sitogenetik tekniklerin gelişmesine sebep olmuştur (39,40,41).

Moleküler sitogenetik teknikler, konvansiyonel sitogenetik analizler ile belirlenemeyen ya da çözümlenemeyen kompleks, kriptik ve submikroskobik yeniden düzenlenmelerin saptanmasını sağlamaktadır (39).

Kromozomal anomalilerin araştırılması için genel olarak yapılan 400-550 bant seviyesinde sitogenetik inceleme ile 5 Mb'dan küçük anomalileri tespit etmek mümkün değildir. FISH yöntemiyle, DNA probları kullanarak daha küçük kromozom değişiklikler tespit edilebilir (42,43,44).

FISH yöntemi tanı ve araştırma amaçlı kullanılabilir. Belirli bir kromozomal bölgenin veya DNA kesiminin FISH yöntemi ile görünür hale gelebilmesi için o bölgeye spesifik bir probun kullanılması gerekir. FISH yönteminde hedef DNA/RNA molekülüne komplementer işaretli nükleik asit dizisine "prob" denir. Aranılan anomalinin doğru bir şekilde tespit edilebilmesi için amaca uygun prob seçimi çok önemlidir(45). Problar; hedef bölgelerine ve sinyal paternlerine göre gruplara ayrılması Şekil 1'de gösterilmiştir (8).



**Şekil 1. FISH yönteminde kullanılan prob çeşitleri:**

- a) Özel nükleotid dizilerine bağlanan lokusa özgü prob, b) Sentromerlerdeki tekrarlayan dizilere bağlanan sentromerik prob, c) Telomerdeki TTAGG tekrar dizilerine bağlanan telomerik prob, d) Kromozomun tümüne komplementer olan kromozomun tümünü boyayan prob (46).

### 2.4.3. Moleküler Genetik Teknikler

Konvensiyonel sitogenetik ve moleküler sitogenetiğin yetersiz kaldığı durumlarda başvurulan tekniklerdir. Bu teknikler arasında Southern blotting, Northern Blothing, Westem Blotting, m-RNA'nın In-situ hibridasyonu ve PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu; (PZR)'dur. PZR tekniği çok küçük miktardaki DNA'nın kullanımına imkan veren ve oldukça hassas olan bir teknik olması açısından fazlaca tercih edilmektedir (11,47,48).

#### 2.4.3.1. Jak-2 Tip-1 PCR Sistemi

JAK2 proteini, hücre içinde hematopoetik büyüme faktörü olarak görev almaktadır. Bu nedenle kanser oluşumunda, özellikle kan kanserinde önemi olabileceği düşünülmektedir. JAK2 mutasyonu, proteinini kodlayan genin 1849 pozisyonunda yer alan tek nokta baz değişimi (G>T) ile gerçekleşmekte ve valin'in, fenilalanin'e dönüşümüne (V617F) neden olmaktadır (11,48)

Test prensibi, Taq DNA polimerazın 5'-3' exonuclease aktivitesine dayanmaktadır. Probun 5' ucunda bir reporter boya ve 3' ucunda da bir quencer boya bulunmaktadır. Quencer boya reporter boyanın ışınmasını baskılamakta aynı zamanda da probun primer gibi davranarak uzamasına engel olmaktadır. PCR esnasında enzim aktivitesi ile birlikte reporter ve quencer arasında bulunan prob parçalanarak ayrılır, baskılanmanın ortadan kalkmasıyla ısıma meydana gelir. Bu işlem sadece hedef bölgelerinde hibridize olmuş problarda gerçekleşir. Amplifikasyon miktarı arttıkça, reporter boyanın açığa çıkmasıyla birlikte ısıma doğrusal olarak artmakta ve bu artış cihaz tarafından es-zamanlı olarak tespit edilmektedir.

Her hasta için her mutasyon bölgesine uygun, patenti alınmış Normal ve Mutant olmak üzere iki mastermiks çalışılır. Sistem patenti alınmış SNP analizinde kullanılan 5' nükleaz PCR için özel olarak hazırlanmış kullanıma hazır kimyasalları sağlamaktadır. Sistem, ilgili mutasyonlara uygun sekans spesifik primerler ve prob için hazırlanmıştır. Sistem iki farklı primer-prob seti içermektedir. Mutasyon analizleri için FAM işaretli, sistemin doğru şekilde çalışıp çalışmadığını kontrol eden internal kontrol analizi için ise HEX/JOE boyası ile işaretli prob kullanılmaktadır. (<http://www.drzeydanli.com.tr/images/file/JAKYENIX>).

## **2.4.4. Hematolojik Malignansilerde Sık Gözlenen Genetik Değişiklikler**

### **2.4.4.1. Sitogenetik ve/veya Moleküler Sitogenetik (FISH) ile Tespit**

#### **Edilen Değişiklikler**

##### **2.4.4.1.1. BCR/ABL - t(9;22) FISH Analizi**

BCR/ABL translokasyonu; 22 numaralı kromozom üzerinde bulunan BCR bölgesi ile 9. kromozom üzerinde yer alan c-ABL proto-onkogeni arasındaki yeniden düzenlenmeye bağlı olarak bir füzyon geni oluşturur. Yeniden düzenlenmeye bağlı olarak artmış bir tirozin kinaz aktivitesi gözlenir. KML hastalarının neredeyse tamamında bulunan bu füzyon bazı ALL hastalarında da gözlenmekte olup kötü prognoz ile karakterizedir. BCR/ABL translokasyonu klinikte; KML tanısının konması, tedavinin ve minimal rezidüel hastalığın izlenmesi, hastalık nüksünün erken belirlenmesi ile bu füzyona sahip ALL'li olguların tanımlanması ve bunlarda prognoz tayini amacıyla kullanılmaktadır.

##### **2.4.4.2. Moleküler Olarak Tespit Edilen Değişiklikler**

###### **2.4.4.2.1. BCR/ABL - t(9;22) DNA Testi (Real-Time PCR)**

Yeniden düzenlenmeye bağlı olarak artmış bir tirozin kinaz aktivitesi gözlenir. KML hastalarının neredeyse tamamında bulunan bu füzyon bazı ALL hastalarında da gözlenmekte olup kötü prognoz ile karakterizedir. BCR/ABL translokasyonu klinikte; KML tanısının konması, tedavinin ve minimal rezidüel hastalığın izlenmesi, hastalık nüksünün erken belirlenmesi ile bu füzyona sahip ALL'li olguların tanımlanması ve bunlarda prognoz tayini amacıyla kullanılmaktadır. Real time PCR tekniği ile %99tanı değerliğine sahiptir.

###### **2.4.4.2.2. JAK2 Mutasyon Testi - V617F**

JAK2 DNA Testi, JAK2 Mutasyon Testi, JAK2 V617F Mutasyon Testi,

V617F Mutasyon Analizi şeklinde farklı adlarda bu test çalışılabilir.

Janus Kinaz 2 (JAK2), büyüme faktörü reseptör sinyaline aracılık eden sitoplazmik bir tirozin kinaz olup hematopoetik büyüme faktörlerinin kan hücreleri üzerindeki etkisini düzenler. JAK2 geni, 9. kromozomun kısa kolu (9p24.1) üzerinde yer alır ve 25 ekzondan oluşur. Kronik myeloproliferatif hastalıklarda gözlenen en önemli mutasyon ise V617F'dir. Hastalarda daha nadir olmakla birlikte 12. ekzonda da mutasyonlar saptanmıştır. JAK2 V617F mutasyonu, 2343. nükleotidde gözlenen G>T değişimi sonrasında meydana gelir.

Mutasyon sonrasında otoinhibitör kontrol kaybına bağlı JAK2 tirozin kinaz aktivasyonu gözlenir. Bu da eritropoetin tarafından indüklenen hücre sinyalinin hiperaktivasyonuna neden olur. JAK-2 Mutasyonunun Myeloproliferatif hastalıklarda görülme sıklıkları Tablo 9 da gösterilmiştir(28). Ayrıca; myelodisplastik sendrom, kronik myelomonositik lösemi ve diğer atipik kronik myeloid hastalarda %3-5 oranında saptanmaktadır. V617F mutasyonu; BCR/ABL negatif KMPH (PV, ET ve MF) hastalarını reaktif hematopoetik hastalıklardan ayırt etmede kullanılan eşsiz bir markerdir. Hastalarda tedavinin izlemi ve relapsın saptanması için de kullanılır JAK-2 Mutasyonunun Myeloproliferatif hastalıklarda görülme sıklıkları Tablo-9 da gösterilmiştir(3,28).

**Tablo-9:**JAK-2 Mutasyonunun Myeloproliferatif hastalıklarda görülme sıklıkları(28).

Somatik JAK2 mutasyonu frekansı		
Hastalık	JAK2 V617F (%)	JAK2 ekzon 12 (%)
Polisitemia vera (PV)	65-97	2-4
Esansiyel trombositemi (ET)	23-57	-
İdiopatik myelofibrozis (MF)	35-57	-
Diğer	3-5	-

### 3.MATERYAL VE METOD

Bu çalışma, hasta dosyalarının geriye dönük olarak incelenmesi şeklinde yapılmıştır.Çalışma grubunu, Ocak 2014 – Mart 2015 tarihleri arasında, İstanbul Tıp Fakültesi İçHastalıkları ABD Hematoloji Bilim Dalı 'na tanı için ilk kez başvuran ya da tanısı konmuş takip edilmekte olan199 olgu oluşturmuştur. Kemik iliğinden sitogenetik incelemeler yapılan hastalar tanı, kemik iliğinin değerlendirme nedeni, sitogenetik sonuçları açısından değerlendirilmiştir.

Hastaların sitogenetik analizleri “International System for Human Cytogenetic Nomenclature” (ISCN, 1995) protokollerine uygun olarak çalışılmıştır.

Çalışmamız, İstanbul Üniversitesi Etik Kurulu tarafından17/10/2016 tarih ve 17 sayılı kurul toplantısında onaylanmıştır.

#### 3.1.Konvansiyonel Sitogenetik Çalışma Protokolü

##### 3.1.1.Çalışma Materyali:

Bu çalışmada; İÜ. İTF. İç Hastalıkları AD. Hematoloji Bilim Dalı'ndan, İTF. İç Hastalıkları Tıbbi Genetik Bilim Dalı Laboratuvarına sitogenetik analiz yapılmak üzere kemik iliği materyeli gönderilen 199 hastaya ait klinik ve laboratuvar bulguları değerlendirilmiştir. Hematolojik malignite tanısı olan ya da ön tanısı bulunan hastalarınkemik iliği örnekleri, High Resolution Banding (HRB) tekniği kullanılarak incelenmiştir. Lösemili olgulardaki kemik iliği hücreleri flu bir görünüm gösteren, kısa kromozomlara sahiptirler(49). Bu kromozomlar direkt ve uzun süreli kemik iliği kültürleri ile metafaz yöntemlerinde 320-400 G bant düzeyinde, senkronizasyon tekniği (High Resolution Banding) nin kullanıldığı 24 saatlik kültürlerde ise 400-800 G bant düzeyinde incelenebilmektedir (50).Bu çalışmada 24 saatlik HRB ve 48 saatlik kültür yöntemleri kullanılmıştır.

##### 3.1.2 Yöntemler

###### Solüsyonlar:

###### a-Kültür Medyumu:

Bone Marrow Medium .....100 ml.

###### b-HRB Solüsyonları:

Synchroset solüsyonları(A ve B).....1,5 ml.

**c-Harvest Solüsyonları:**

Colcemid.....10µg/mL

Hipotonik Solüsyonu.....250 ml Distile su + 1,398 gr KCL (0.075 M. KCL)

Carnoy's fiksatif: 3:1 metanol : asetik asit glacial

**d-G bantlama Stok Solüsyonlar:**

PBS.....NaCl.....8 gr.

.....KCl.....0,2 gr.

.....Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....0,92 gr......KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....0,2 gr. / 1 litre distile suda.

Buffer.....1 tablet Guur's tablet / 1 litre distile suda

Leishman Boya.....0,2 gr. Leishman/50 °C de ısıtılmış 100 ml. Metanolde.

**G Bantlama Çalışma Solüsyonları:**

Tripsin.....30 mg./50 ml. PBS

Leishman.....1/4 Leisman / Buffer solüsyonu

**Kemik İliği Kültürü:**

100 ml. Bone Marrow Medium (Komplet kemik iliği medyumunu) a, 2 ml. L-Glutamin konularak hazırlanan kemik iliği kültüründen steril koşullarda 2 adet 5 ml steril santrifüj tüplerine kondu. Her bir tüpe 5-15 damla heparinize kemik iliği materyali ilave edildi. Her iki tüpte 37°C'lik etüvde kültüre edildi.

**3.1.3.Metod:**

1-24 saatlik kültüre ekimin yapıldığı gün saat 16.00 da 0,1 ml. A solüsyonu eklendi ve tekrar 37°C'lik etüvde bekletildi.

2-Aynı kültüre ertesi gün saat 09.00 da 0,1 ml. B solüsyonu eklendi ve 5 saat etüvde bekletildikten sonra iki damla (0,1 ml) colcemid eklendi ve tekrar etüve kondu.

3-25-30 dk. sonra etüvde inkübe edilen kültür 3000 rpm'de 6 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar atıldıktan sonra vorteksle karıştırılarak 10 ml hipotonik solüsyonu eklendi ve 10 dakika etüvde bekletildi.

4-Tüp 3000 rpm'de 6 dakika santrifüj edilip süpernatantlar atıldıktan sonra vorteks yardımıyla karıştırılarak pellet üzerine pastor pipetiyle damla damla 10 ml fiksatif eklendi ve çalkalandı.

5-Fiksatifte yıkama işlemi 2- 3 defa tekrarlandı.

6-Son santrifüj işleminden sonra tüplerde yaklaşık 0.5 cc süpernatant bırakıldı.

7-Dip materyal pipetle iyice karıştırılarak lamlar üzerine yayıldı.

8-Kurumaya bırakılan preparatlar 90°C etüvde 2,5 saat bekletilerek yaşlandırıldı.

9-GTL bantlama yöntemi ile bantlandı.

10-48 saatlik kültür için aynı işlemler tekrar edildi.

### **G-Bantlama Metod:**

1-Yaşlandırılan preparatlar Tripsin çalışma solüsyonunda 20-30 saniye arasında tutuldu. (En uygun süreyi ayarlayabilmek için her olguya ait bir preparat kullanıldı ve optimize edilerek diğerleri de bantlandı)

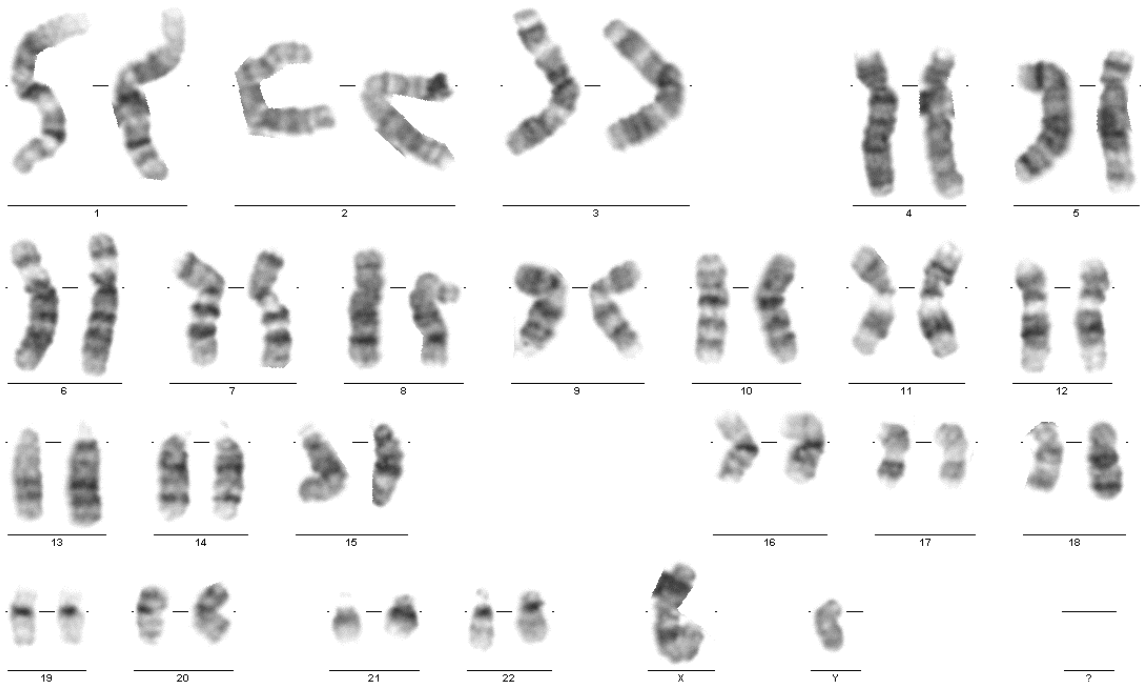
2-Preparat PBS'de yıkandı.

3-Leishman çalışma solüsyonunda 1 dk. boyandı.

4-Distile suda yıkandı ve havada kurutuldu.

### **3.1.4.Mikroskobik Analiz:**

Kuruyan preparatlar ışık mikroskobunda kontrol edilerek uygun özellikteki metafazların (en az 20 metafaz) analizi yapılarak en az 5 metafaz örneğinden otomatik görüntüleme sisteminde karyotip yapıldı ve arşivlendi. Resim 1 de SG isimli hastanın saptanan normal karyotip(46\_XY) gösterilmiştir.



**Resim 1:**SG isimli erkek hastanın normal konvansiyonel sitogenetik sonucu(46-XY)

### 3.2.Olgu Toplama ve Çalışma Dizaynı

Kayıt sisteminde kemik iliğinden konvansiyonel sitogenetik inceleme yapılan 590 hasta tespit edildi. Hematoloji poliklinik arşivinden 278 dosyaya ulaşıldı. Daha önce yapılan kemik iliği aspirasyonu sitogenetik incelemesi normal bulunmuş ama yinede sitogenetik inceleme tekrarlanmış 30 hasta ve 2 yıldan uzun süredir sitogenetik remisyonda olan takipli 49 KML hastası çalışmadan çıkarıldı. En az bir hematolojik hastalık tanısı almış toplam 199 hastanın bilgileri geriye dönük incelendi.

Olguların çalışmaya dahil edilme kriterleri;

1. Sitogenetik inceleme için kemik iliği aspirasyon materyali gönderilmiş olması,
2. Hematoloji polikliniğinde takipli dosyası olması,
3. Periferik yayma, flow sitometri, moleküler incelemeyle yadakemik iliği biyopsisi ile kesin bir hematolojik hastalık tanısı konulmuş olması,
4. İki yıldan daha kısa süreli takipli KML hastaları

Dosya incelemesinden olguların yaş, cinsiyet, hemogram bulguları(Hemoglobin (Hgb), Hematokrit (Hct), Mean Corpuscular Volume(MCV), trombosit sayısı(Plt), lökosit(WBC), nötrofil, lenfosit ve mutlak monosit sayısı) yapılmışsa flow sitometri, moleküler inceleme ve FISH sonucu, tanı ve takip süresince aldıkları tedaviler kaydedildi. Dosyadan ulaşılan sitogenetik tarihi, tanı tarihi, sitogenetik sonuçları,sitogenetik materyali yetersizse nedeni, aldığı tedaviler nedeniyle sitogenetik sonucu normale dönen hastalar not edildi.Her hasta için sitogenetik sonucunun tanıya, tedaviye ve prognoza katkısı olup olmadığı değerlendirildi. Sitogenetik sonuçları eksik kaydedilmiş hastaların sonuçlarına İç Hastalıkları AD Genetik Bilim Dalı arşivinden ulaşıldı.

### 3.3.İstatiksel Analiz

Çalışmamızda verilerin istatistiksel analizi için SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL, USA) programının 21.0 versiyonu kullanıldı. Tanımlayıcı istatistiklerinde sürekli değişkenler için ortalama değer, standart sapma, ortanca, minimum ve maksimum değerler; kesikli değişkenler için ise sayı ve yüzde değerleri hesaplandı.

Başlangıç analizleri olarak normal dağılımın değerlendirilmesinde Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri kullanıldı. Gruplar arası karşılaştırmalarda parametrik verilerde Bağımsız gruplarda t testi, nonparametrik verilerde Mann Whitney U ve ki kare testi kullanıldı. Sonuçlar %95 güven aralığında değerlendirilerek  $p<0,05$  istatistiksel anlamlılık,  $p<0,01$  ileri düzeyde istatistiksel anlamlılık,  $p<0,001$  çok ileri düzeyde istatistiksel anlamlılık olarak tanımlandı.’

#### 4.BULGULAR

Çalışma grubunu, Ocak 2014 – Mart 2015 tarihleri arasında, İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları ABD Hematoloji Bilim Dalı polikliniğine ilk kez başvuran ya da takipli hastalar içinde kemik iliğinden sitogenetik incelemeler yapılan 199 olgu oluşturdu. Tüm hastaların sitogenetik inceleme sırasındaki hemogram parametrelerinin ortalama dağılımı Tablo 10 de gösterilmiştir..

**Tablo 10:** Tüm hastaların yaş ve hemogram bulguları.

	<b>Ortalama</b>	<b>Medyan</b>	<b>Standart Sapma</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maksimum</b>
<b>YAŞ</b>	56,1	59	15,3	18	84
<b>WBC/mm<sup>3</sup></b>	9987	6400	13023,8	1100	105,000
<b>NOTROFIL/mm<sup>3</sup></b>	6267	3500	9807,7	0	87,600
<b>LENFOSIT /mm<sup>3</sup></b>	2062,7	1700	2062,2	300	21,000
<b>MONOSIT/mm<sup>3</sup></b>	793,3	500	1658,8	0	19,900
<b>HBG g/dl</b>	11,3	12	2,7	6	21
<b>HCT %</b>	34,5	35	8,4	16	69
<b>MCV fl</b>	91,1	91	13,2	56	190
<b>PLT/mm<sup>3</sup></b>	251,500	204,000	214,900	4,000	1,234,000

Tüm hastaların yaş ortalaması  $56,1\pm 15,3$  dır. Tüm hastaların genel özellikleri, cinsiyet dağılımı ve hematolojik hastalıklara göre dağılımı Tablo 11 de gösterilmiştir.

**Tablo 11:**Hematolojik hastalıklara göre tüm hastaların genel özellikleri ve dağılımı.

Tanı	Hasta sayısı(%)	Kadın	Erkek	Yaş dağılımı	Median Yaş	Başvuru Şekli	
						İlk Başvuru	Takipli
<b>ALL</b>	5 (%2,5)	1	4	18-58	28	1	4
<b>AML</b>	15 (%7,5)	9	6	26-71	61	7	8
<b>KML</b>	29 (%14,5)	13	16	29-78	57	13	16
<b>KMPH</b>	35 (%17,5)	19	16	34-84	65	15	20
<b>MDS</b>	24 (%12)	11	13	30-77	64,5	10	14
<b>MM, MGUS</b>	40 (%20)	16	24	33-84	61	22	18
<b>HDL-HL-HCL</b>	20 (%10)	9	11	26-82	56	15	5
<b>KLL, LGL</b>	9 (%4,5)	5	4	53-67	65,5	6	3
<b>Diğer</b>	22 (%11)	11	11	18-78	42	17	5
<b>Tüm Hastalar</b>	199 (%100)	94 (%47,2)	105 (%52,8)	18-84	59	106 (%53,3)	93 (%46,7)

Çalışmaya alınan 199 hastadan 105 hasta (%52,8) erkek, 94 hasta (%47,2) kadındı. Tüm hastaların yaş dağılımı 18-84 arasındaydı ve medyan yaş 59'du. Yaş ortalaması en yüksek olgular KMPH, MDS ve KLL gibi ileri yaş grubunda görülen hastalıklarla tanılıydı.

Hastaların % 20'si Multipl Myelom-MGUS, %17,5 u KMPH, %14,5 u KML, %12'si MDS ve % 10 u HL-HDL tanılı idi. KML gerek sitogenetik anormali oranı ve gerekse çalışmadaki hasta sayı oranı yüksekliği nedeniyle kendi alt başlığında incelendi. Hastalardan 4'ü KLL, 5'i Large Granüler Lösemi tanılıydı. 20 hastalı Lenfoma grubunda 1 olgu HL, 18 HDL, 1 olguHairy Cell Lösemi tanılıydı. 22 olgulu diğer hasta grubunda 11 Immün Trombositopenik Purpura(ITP), 4 Aplastik Anemi(AA), 1 Paroksizmal Noktürnal Hemoglobinüri (PNH) ve AA, 2 Herediter Sferositozis(HS), 1 Demir Eksikliği Anemisi, 1 Otoimmün Hemolitik Anemi(OIHA), 1 steroid indüklenmiş lökositoz, 1 B Hücre Hiperplazi tanılı hastadan oluşmaktaydı.

ITP hastaları genelde tedaviye cevap vermeyen hastalar olup bu hastalara MDS v.b. diğer hastalıkların ayırıcı tanısı için kemik iliği değerlendirmesi yapılmıştı.

Çalışma grubunda ilk başvurudaki hasta oranı %53,3 (106 hasta), takipli hasta oranı %46,7 (93 hasta) idi. İlk başvuru sırasında KMPH düşünülen hastalara Ph kromozomu t(9;22) pozitifliği bulunan KML ile ayırıcı tanı için özellikle sitogenetik çalışma yapılmıştı. KML hastalarının % 55 i takipli hastalardan oluşmaktaydı. Bu hastalarda imatinib tedavi cevabını değerlendirmek için kemik iliği sitogenetik açıdan tekrar değerlendirilmişti. Lenfoma grubunda ilk kez başvuran hastalarda(15 hasta) evreleme için yapılan kemik iliği

biyopsisi ve beraberinde konvansiyonel sitogenetik çalışması takipli lenfoma hastalarına(4 hasta) göre belirgin fazlaydı. MDS li hastalarda ilk tanı sırasında hem tanıyı koymak hem prognozu belirlemek için yapılması gerekli olan konvansiyonel sitogenetik tetkik takipliMDS hastalarında AML transformasyonu riski nedeniyle tekrarlanmıştı.

**Tablo 22:**Tüm hastaların sitogenetik nedeni, Flow Sitometri, FISH ve moleküler sonucu.

Tanı	Hasta sayısı	Sitogenetik Nedeni		Flow Sitometri		FISH		Moleküler Genetik	
		Tanı-Prognoz	Takip	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
<b>ALL</b>	5	5	0	3	0			0	1
<b>AML</b>	15	7	8	7	0	0	0	3	4
<b>KML</b>	29	13	16	1	0	2	0	15	12
<b>KMPH</b>	35	15	20	2	6	0	2	17	18
<b>MDS</b>	24	10	14	1	4	0	5	3	4
<b>MM, MGUS</b>	40	39	1	0	0	0	1	0	0
<b>HL,HDL,HCL</b>	20	15	5	0	1	0	0	0	0
<b>KLL, LGL</b>	9	9	0	6	0	0	0	0	2
<b>Diğer</b>	22	20	2	2	5	0	0	0	2
<b>Tüm Hastalar</b>	199	133 (%66,8)	66 (%32,2)	22	16	2	8	38	43

Hastaların 133'üne (%66,8) tanı ve prognoz,66'sına (%32,2) takip amaçlı sitogenetik inceleme yapılmıştı (Tablo 12). Tanı ve prognoz için sitogenetik tetkik yapılan 133 hastadan 106 sı yeni tanı hasta olup, diğer hastalarda sitogenetik tetkik yapılma nedeni özellikle ALL de nüksüsaaptama, sonradan gelişebilecek sitogenetik anomalileri değerlendirme ve tedaviye dirençli MM hastalarında sitogenetik anomaliyi ortaya koymaktı. Takipli hastalarda tekrarlanan sitogenetikincelemelerin KML de tedavi cevabını belirlemek için, MDS ve KMPH hastalarında ise özellikle AML transformasyonunu ortaya koymak için yapıldığı gözlemlendi.

Hastalarda tanı ve diğer hematolojik hastalıklara özellikle akut lösemilere transformasyonusaaptamak amaçlı yapılan flow sitometri, FISH ve moleküler inceleme sonuçları da değerlendirildi.

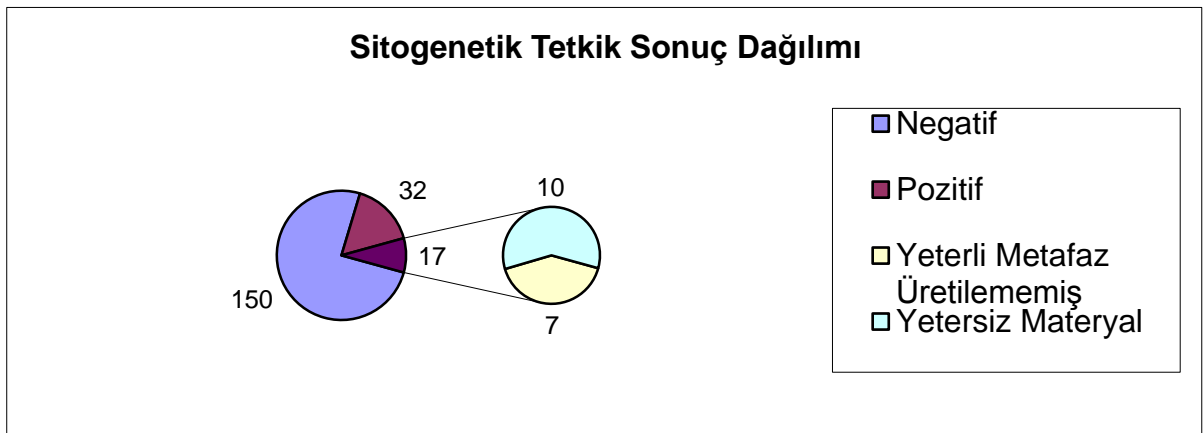
Flow sitometri özellikle akut lösemilerde ve akut lösemi transformasyonu yüksek MDS ve KMPH hastalarında bakılmıştı. KLL ve LGL hastalarında ise tanı amaçlı bakılmıştı. KMPH tanılı hastaların biri MF tanılı olup AML transformasyon değerlendirmek için yapılan flow sitometri tanı için şüpheli bulunmuştu, diğer KMPH tanılı hastaya ise

yapılan flow sitometri ile KMML tanısı konulmuştu. 4 KLL hastasına ve 2 LGL hastasına flow sitometri ile tanı konulmuştu.

FISH incelemesi KML nin diğer KMPH hastalıklardan ayırıcı tanısında değerlidir. Sitogenetik incelemede Ph kromozomu negatif ama klinik ön tanı KML ile uyumlu 8 hastada bcr-abl bakılmış, 2 sinde FISH pozitif saptanmıştı (Tablo 12). Ayrıca 5 MDS hastasında 5q delesyonu incelemesi için yapılan FISH 1 hastada pozitif saptanmıştı.

Moleküler inceleme bazı hastalarda ek olarak yapılmıştır. KML hastalarında tanı ve tedavinin 3, 6 ve 12 aylarda tedaviye yanıtı değerlendirme amaçlı BCR-ABL mutasyonu düzeyine bakılmıştı. KMPH tanılı (primer MF, PV, ET) hastalarda JAK-2 mutasyonu, akut lösemi hastalarında BCR-ABL, PML-RARA, NPM-1 ve FLT-3 mutasyonları için moleküler incelemeler yapılmıştı. 1 ALL hastasında BCR-ABL pozitif ve KML den transforme AML düşünülmüştü. 3 AML olgusunda bcr-abl pozitif saptanmıştı. NPM-1 mutasyonu, AML1/ETO-t(8;21) mutasyonu ve FLT-3 mutasyonu pozitif olan birer hasta mevcuttu. KML hastalarının 15 inde BCR-ABL pozitif 12 sinde negatif saptanmıştı ve bunların 12 sinde de Tirozin Kinaz inhibitörü İmatinib tedavisiyle bcr-abl negatifleşmişti. Bir hasta İmatinib altında nüks ettiği için Nilotinibe geçilmişti. Bir hasta ise İmatinib ve Nilotinib dirençli olduğu için yeni başlanan Dasatinib altında idi ve henüz BCR-ABL pozitifdi.

Tüm hastalardan kemik iliğinden sitogenetik tetkik için ilik örneği alınmıştı. Ama bazı hastalardan sitogenetik sonuç elde edilemedi. Alınan kemik iliği materyalinin çalşıma için yetersiz olması ya da ilik materyelinden değerlendirme için yeterli metafaz üretilememiş olması buna yol açmıştı. Yeterli sonuç alınamama oranı % 8,5 olarak bulundu. Tüm hastalardan alınan sitogenetik tetkiklerin sonuç dağılım grafiği Şekil 2 de gösterildi.



**Şekil 2:** Tüm hastalardan alınan sitogenetik tetkiklerin sonuç dağılım grafiği.

Sağlıklı kişilerden kemik iliği alınması uygun olmadığı için sağlıklı kontrol grubu oluşturulmadı. Çalışmada hastalar tanılarına göre gruplandırılarak karşılaştırıldı. Lenfoproliferatif hastalık(ALL, KLL, HL, HDL, MM, MGUS, HCL,Waldenström Makroglobulinemisi, LGL)tanılı olgular, Myeloproliferatif hastalık(AML, KML, ET, MF, PV, KMPH, MDS) tanılı olgular ve Diğer hematolojik hastalıklar (İTP, Anemi, HS, Aplastik Anemi, PNH) şeklinde 3 grupta toplandı. Grupların özellikleri ve sitogenetik tetkik sonuçları Tablo 13 de gösterilmiştir.

**Tablo 13:** Çalışma gruplarının sayısı, cinsiyet ve sitogenetik sonuç dağılımı.

Çalışma Grubu	Hasta Sayısı	Kadın	Erkek	Son Konvansiyonel Sitogenetik Sonucu			
				Normal	Anormal	Saptanamamış(n=17)	
						Yetersiz	Üremedi
<b>Lenfoproliferatif Hastalık Grubu</b>	74 (%37,2)	32	42	60	5	4	5
<b>Myeloproliferatif Hastalık Grubu</b>	103 (%51,8)	52	51	71	26	2	4
<b>Diğer Grup</b>	22 (%11,1)	11	11	19	1	1	1
<b>Toplam</b>	199	95	104	150 (%75,4)	32 (%16,1)	7	10

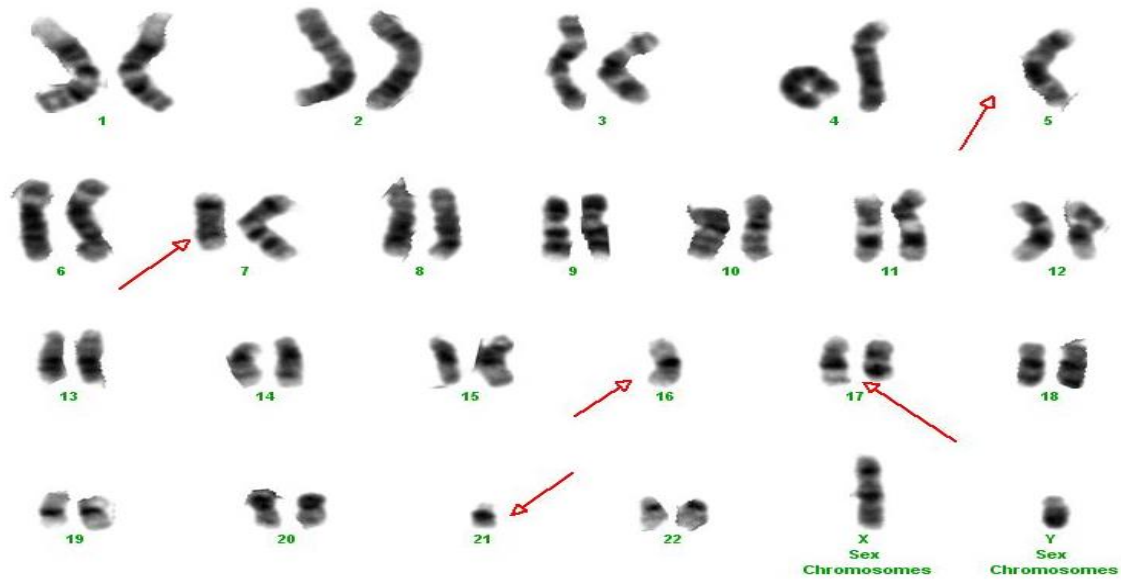
Lenfoproliferatif hastalık grubunda 74 hasta (%37,2), Myeloproliferatif hastalık grubunda 103 hasta (%51,8) ve diğer grupta 22 hasta(%11,1) yer almaktaydı. Hastaların 150 sinde (%75,4) normal sitogenetik bulunurken, 32(%16,1) hastada anormal sitogenetik sonuç elde edilmişti. Anormal sonuç elde edilen hastaların 26 (%81,25)'sı Myeloproliferatif grupta yer alıyordu. 17 (%8,5) hastada sitogenetik sonuç elde edilememişti, hastaların 7'si materyal yetersizliği, 10'u materyal çalışılmasına rağmen yeterli metafaz üretilemediği için değerlendirilemedi. Sitogenetik tetkik sonuçlarının hastalık tanılarına göre dağılımı Tablo 14 de gösterilmiştir.

**Tablo 14:** Sitogenetik tetkik sonuçlarının hastalık tanılarına göre dağılımı

Tanı	Sitogenetik		Yetersiz Materyal	Üremedi	Tekrar Sayısı	Tedavi ile Negatifleşme
	Normal	Anormal				
ALL	3	2	0	0	0	0
AML	10	3	1	1	2	1
KML	13	15	0	1	2	13
KMPH	30	3	1	1	2 ve 3	0
MDS	18	5	0	1	2	0
MM, MGUS	32	3	3	2	2 de 2.	0
HL-HDL-HCL	16	0	1	3	0	0
KLL, LGL	9	0	0	0	0	0
DİĞER	19	1	1	1	0	0
TOPLAM	150	32	7	10		14

Tüm hastalar değerlendirildiğinde 46 hastada sitogenetik sonucun tanıya, prognoza yada tedavi cevabının değerlendirilmesine katkısı olduğu saptandı. Bunların 32 sinde en son yapılan sitogenetik sonucu anormaldi, 1 AML ve 13 KML hastası toplam 14 hasta ise daha önce anormal sitogenetik sonucu olup tedavi sonrası negatifleşen hastalardı.

Myeloproliferatif hastalık grubu ile Diğer hastalık grubu sitogenetik sonuçların istatistiksel anlamlılığı açısından Lenfoproliferatif hastalık grubu ile ayrı ayrı karşılaştırıldı.



**Resim 2:** MDS tanılı HŞ isimli hastanın sitogenetik sonucu (43,XY,-5,del(7)(q),-16,der(17),-21).

**Tablo 15:** Myeloproliferatif-Lenfoproliferatif genele özelliklerin karşılaştırmasının istatistik değerlendirmesi.

		Ort	Standart Sapma	Min	Max	<i>p</i>
YAS	MyeloproliferatifHast (n=103)	57,5	14,7	26	84	0,747
	LenfoproliferatifHast. (n=74)	56,8	14,4	18	84	
WBC /mm <sup>3</sup>	MyeloproliferatifHast	11761	17268,8	1100	105000	0,511
	LenfoproliferatifHast.	7775,7	4616,4	1700	26600	
NOTROFIL/ mm <sup>3</sup>	MyeloproliferatifHast	7614,6	12890,1	0	87600	0,873
	LenfoproliferatifHast.	4474,0	3354,6	400	21100	
LENFOSIT /mm <sup>3</sup>	MyeloproliferatifHast.	2066,9	2356,6	300	21000	0,989
	LenfoproliferatifHast.	1973,6	1788,9	400	11200	
MONOSIT / mm <sup>3</sup>	MyeloproliferatifHast.	866,9	2039,4	0	19900	0,496
	LenfoproliferatifHast.	743,1	1235,9	0	8600	
Hgb g/dl	MyeloproliferatifHast.	10,9	3,0	6	21	0,028
	LenfoproliferatifHast.	11,8	2,1	7	16	
PLT /mm <sup>3</sup>	MyeloproliferatifHast.	297,1	266,2	10,000	1,234,000	0,732
	LenfoproliferatifHast.	223,6	101,4	7,000	660,000	

\* Mann Whitney U test sonucudur.

Myeloproliferatif hastalık grubu ve Lenfoproliferatif hastalık grubu yaşa göre değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=0,747$ ). Her iki grup WBC'ye göre değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=0,511$ ). (Tablo 15)

Myeloproliferatif hastalık grubu ve Lenfoproliferatif hastalık grubu Hgb'ne göre değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmış olup, Lenfoproliferatif hastalık grubunun Hgb ortalamasının myeloproliferatif hastalık grubundan daha yüksek olduğu görülmektedir. ( $p=0,028$ ). İki grubun hemogram değerlerinin karşılaştırılması Tablo 15 de gösterilmiştir.

Myeloproliferatif hastalık grubu ve Lenfoproliferatif hastalık grubu sitogenetik pozitifliğine göre değerlendirildiğinde arada istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ( $p=0,002$ ). Myeloproliferatif hastalık grubunda sitogenetik pozitifliği Lenfoproliferatif hastalık grubuna göre beklenenden yüksek oranda saptanmıştır (Tablo 16).

**Tablo 16:** Myeloproliferatif Hastalık grubu ve Lenfoproliferatif Hastalık grubunun sitogenetik sonucu karşılaştırılması

Sitogenetik Sonucu	Tanı				Toplam		p	ki kare
	Myeloproliferatif Hastalar		Lenfoproliferatif Hastalar		Sayı	Yüzde		
	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	,002	9.187
<b>Negatif</b>	71	54,2%	60	45,8%	131	100,0%		
<b>Pozitif</b>	26	83,9%	5	16,1%	31	100,0%		
<b>Total</b>	97	59,9%	65	40,1%	162	100,0%		

**Tablo 17:** Myeloproliferatif Hastalık grubu ve Lenfoproliferatif Hastalık grubunda sitogenetiğin tanıya, prognoza, tedaviye katkısının karşılaştırılması.

SİTOGENETİK	Tanı				Toplam		p	ki kare
SONUÇ	Myeloproliferatif Hastalar		Lenfoproliferatif Hastalar		Sayı	Yüzde		
	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	<,001	30.191
<b>Negatif</b>	54	46,6%	62	53,4%	116	100,0%		
<b>Pozitif</b>	43	93,5%	3	6,5%	46	100,0%		
<b>Toplam</b>	97	59,9%	65	40,1%	162	100,0%		
TANI	Myeloproliferatif Hastalar		Lenfoproliferatif Hastalar		Sayı	Yüzde	<,001	19.810
	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde		
<b>Negatif</b>	72	52,6%	65	47,4%	137	100,0%		
<b>Pozitif</b>	25	100,0%	0	0,0%	25	100,0%		
<b>Toplam</b>	97	59,9%	65	40,1%	162	100,0%		
PROGNOZ	Myeloproliferatif Hastalar		Lenfoproliferatif Hastalar		Sayı	Yüzde	<,001	26.771
	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde		
<b>Negatif</b>	57	47,9%	62	52,1%	119	100,0%		
<b>Pozitif</b>	40	93,0%	3	7,0%	43	100,0%		
<b>Toplam</b>	97	59,9%	65	40,1%	162	100,0%		
TEDAVİ	Myeloproliferatif Hastalar		Lenfoproliferatif Hastalar		Sayı	Yüzde	<,001	17.963
	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde		
<b>Negatif</b>	74	53,2%	65	46,8%	139	100,0%		
<b>Pozitif</b>	23	100,0%	0	0,0%	23	100,0%		
<b>Toplam</b>	97	59,9%	65	40,1%	162	100,0%		

Myeloproliferatif hastalık grubu ve Lenfoproliferatif hastalık grubu sitogenetik sonuç pozitifliği açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ( $p<0,001$ ). Myeloproliferatif hastalık grubunda sitogenetik sonuç pozitifliği lenfoproliferatif hastalık grubuna göre beklenenden yüksek oranda saptanmıştır.

Myeloproliferatif hastalık ve Lenfoproliferatif hastalık grubunda sitogenetik sonucun hem tanıya hem prognoza hem de tedaviye olan katkısı değerlendirildiğinde aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ( $p<0,001$ )(Tablo 17).

**Tablo 18:** Lenfoproliferatif Hastalık ve Diğer Hastalık gruplarının yaş ve hemogram özelliklerinin karşılaştırması

		Ort	Standart Sapma	Min	Max	<i>p</i>
<b>YAS</b>	Lenfoproliferatif Hast.	56,8	14,4	18	84	0,012
	Diğer Hast.	47,2	18,4	18	78	
<b>WBC/mm<sup>3</sup></b>	Lenfoproliferatif Hast.	7775,7	4616,4	1700	26600	0,340
	Diğer Hast.	9118,2	6577,1	2400	31700	
<b>NOTROFIL / mm<sup>3</sup></b>	Lenfoproliferatif Hast.	4474,0	3354,6	400	21100	0,242
	Diğer Hast.	5890,5	5791,6	600	27500	
<b>LENFOSIT / mm<sup>3</sup></b>	Lenfoproliferatif Hast.	1973,6	1788,9	400	11200	0,031
	Diğer Hast.	2347,6	1291,0	600	6200	
<b>MONOSIT / mm<sup>3</sup></b>	Lenfoproliferatif Hast.	743,1	1235,9	0	8600	0,690
	Diğer Hast.	604,8	348,5	100	1300	
<b>Hgb g/dl</b>	Lenfoproliferatif Hast.	11,8	2,1	7	16	0,164
	Diğer Hast.	11,0	2,5	7	16	
<b>PLT/mm<sup>3</sup></b>	Lenfoproliferatif Hast.	223,600	101,400	7,000	660,000	<0,001
	Diğer Hast.	132,400	166,500	4,000	730,000	

\*Mann Whitney U test sonucudur.

Lenfoproliferatif hastalık grubu ve Diğer hastalık grubu yaşa göre değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ( $p=0,012$ ). Lenfoproliferatif hastalık grubunda hastalar daha ileri yaşta bulunmuştur.

Her iki hasta grubu WBC'ye göre değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. ( $p=0,340$ )(Tablo 18).

Lenfoproliferatif hastalık ve diğer hastalık grubu hemoglobine göre değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır( $p=0,164$ )(Tablo 18).

Diğer hastalık grubu ve Lenfoproliferatif hastalık grubu PLT'ye göre değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır. ( $p<0,001$ ). Lenfoproliferatif hasta grubunda PLT ortalamasının diğer gruba göre daha yüksek olduğu saptanmıştır.

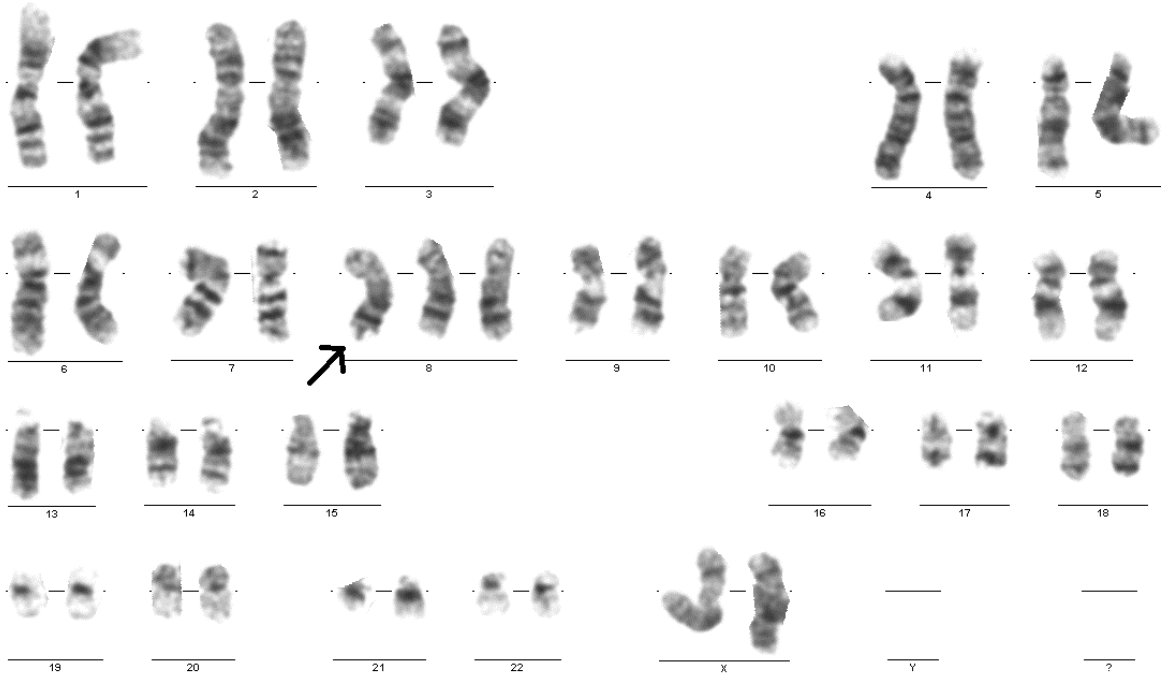
**Tablo 19:** Lenfoproliferatif Hastalık grubu ile Diğer Hastalık grubunun sitogenetik sonucu.

Sitogenetik	Lenfoproliferatif Hastalar		Diğer Hastalar		Toplam	<i>p</i>	<i>Ki-kare</i>
	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde			
<b>Negatif</b>	60	75,9%	19	24,1%	79	1.000	,169
<b>Pozitif</b>	5	83,3%	1	16,7%	6		
<b>Total</b>	65	76,5%	20	23,5%	85		

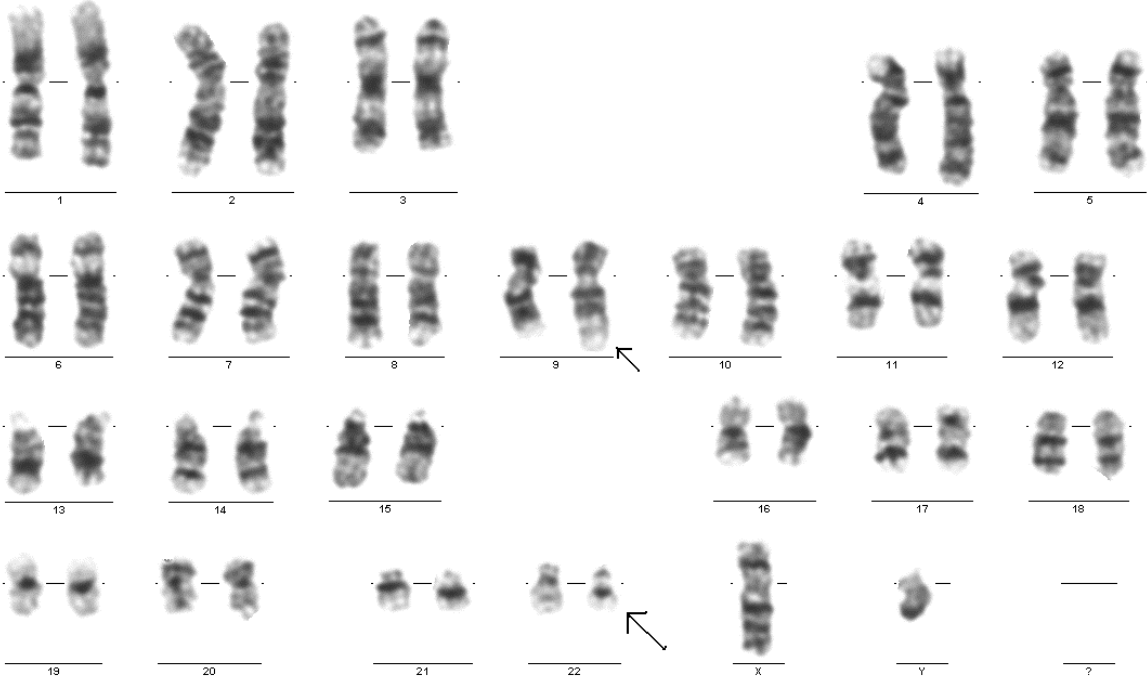
Diğer hasta grubu ve Lenfoproliferatif hasta grubu sitogenetik pozitifliğine göre değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=1,000$ ). Burada sitogenetik pozitif sayısı düşük olduğu için istatistiksel analiz pek anlamlı bulunmadı. Yine aynı nedenle sitogenetik sonucun tanı, tedavi, prognoza katkısı değerlendirilmedi.(Tablo 19)



**Resim 3:**MDS tanılı DY isimli hastanın sitogenetik sonucu (46-XX,del15q)



**Resim 4:** MDS tanılı DY isimli hastanın başka bir metafaz sitogenetik sonucu(46-XX,+8p).



**Resim 5:** KML tanılı EP isimli hastanın sitogenetik sonucu (46,XY,t(9;22)(q34;q11))

Sitogenetik anomali saptananların tümü tanıları ile birlikte Tablo 20 de gösterilmiştir.

**Tablo 20:** Çalışmadaki hastalardasaptanan anormal sitogenetik sonuçları.

<u>AD</u>	<u>SITOGENETİK</u>	<u>FISH</u>	<u>FLOW SİTOMETRİ</u>	<u>MOLEKULER</u>	<u>TANI</u>
<b>HŞ</b>	45-43-XY,-5,del(7q),-16der(17q),-21 +mar kompozit karyotip	YOK	YOK	YOK	MDS
<b>FT</b>	46-XX[11], 46-XX del(20)(q11.2) [9]	VAR	YOK	NEGATİF	MDS
<b>MFE</b>	45-X,-Y[9]/46-XY[11]	YOK	YOK	YOK	MDS
<b>RÇ</b>	45-XY,-7,der(12)(p)	YOK	YOK	POZİTİF	MDS
<b>DY</b>	46-XX[14]/ 46-XX,del(5)(q12q33)[4]/ 47-XX,+8[2]	VAR	YOK	POZİTİF	MDS
<b>EP</b>	46-XY, t(9,22);(q34,q11)(Ph+% 100)	YOK	YOK	POZİTİF	KML
<b>KB</b>	46_XY,inv(12),(p11,2q15)[2]/46-XY, t(9,22) (q34,q11),inv(12)(p11,2q15)[18]Ph+	YOK	YOK	POZİTİF	KML
<b>BS</b>	46-XX, t(9,22)(q34,q11),Ph+% 100	YOK	YOK	POZİTİF	KML
<b>SS</b>	46-XX, t(9,22)(q34,q11),Ph+% 100	YOK	YOK	POZİTİF	KML
<b>YA</b>	46-XX, t(9,22)(q34,q11),Ph+% 5	YOK	YOK	NEGATİF	KML
<b>TA</b>	46-XY, t(9,22)(q34;q11)(Ph+% 45)	YOK	YOK	POZİTİF	KML
<b>HA</b>	46-XY, t(9,22)(q34,q11),Ph+% 100	YOK	YOK	POZİTİF	KML
<b>FK</b>	46-XY, t(9,22)(q34,q11) Ph+% 15	YOK	YOK	POZİTİF	KML
<b>DYÖ</b>	46-XY, t(9,22)(q34,q11) Ph+% 5	YOK	YOK	POZİTİF	KML
<b>ÖK</b>	46-XY, t(9,21,22)(q34,q22,q11)Ph+% 100	YOK	YOK	POZİTİF	KML
<b>ŞS</b>	46-XX, t(9,22)(q34,q11),Ph+% 100	YOK	YOK	POZİTİF	KML
<b>ZÖ</b>	46-XX, t(9,22)(q34,q11),Ph+% 100	YOK	YOK	POZİTİF	KML
<b>MA</b>	46-XX, t(9,22)(q34,q11),Ph+% 100	YOK	POZİTİF	NEGATİF	KML
<b>NE</b>	46-XY, t(9,22)(q34,q11),Ph+% 15	YOK	YOK	POZİTİF	KML
<b>ŞA</b>	46-XY, t(9,22)(q34,q11),Ph+% 100	YOK	YOK	POZİTİF	KML
<b>MG</b>	46-XY[17]/46_Y-X,t(X,19)(q22,P13)[3]	YOK	YOK	POZİTİF	KMPH
<b>AA</b>	46-XY,del7[1]/46-XY,r(7)(p22,q22)[19]	YOK	YOK	POZİTİF	PV,2.MF
<b>FE</b>	46-XX,der(6)(pq),der(13)(p11.2), t(1.13) (q24,p11.2)[11]/46-XX, der(15)(p11.2), t(1.13)(q24,p11.2)[3]	YOK	NEGATİF	POZİTİF	MF
<b>CB</b>	46-XY[8]/46-XY, der(7p)[2]/46-XY,-5,-7, der(15) t(11,15),-17, +3mar[10]	YOK	POZİTİF	NEGATİF	AML
<b>MA</b>	45-XX,-3,der5(5)(q13.3), t(3;5)(q13;q13) ,-9, der(22)(p13),+mar	YOK	YOK	YOK	AML
<b>NS</b>	46-XX,del5,t(8,21)(q22,q22),del9 (q21q22)	YOK	POZİTİF	YOK	AML
<b>MA Ö</b>	45-X-Y[4],/46-XY[16]	YOK	YOK	YOK	MGUS
<b>VT</b>	46-XY, inv(16)(p15,q22)	YOK	YOK	YOK	MM
<b>BK</b>	46-XY[10], 45_X-Y[4]	YOK	YOK	YOK	MM
<b>BS</b>	46-XY[6]/92-XXYY[5],5 metafazda Tetraploid Karyotip	YOK	POZİTİF	YOK	ALL
<b>MA</b>	Hipotriploidi(Kromozom sayısı 58-68 arası)	YOK	POZİTİF	YOK	ALL
<b>HA</b>	46-XY, 1 Metafaz 46-X-Y+14	YOK	YOK	YOK	ITP

## 5.TARTIŞMA

Akut lösemiler başta olmak üzere malign hematolojik hastalıkların çoğu kötü seyirli olup enfeksiyon gibi diğer hastalıkların eşliğinde mortalite oranı yüksektir. Hastaların kliniği ve laboratuvar testleri prognozu hakkında bilgi verse de prognozun daha iyi belirlenmesi, remisyonun tespit edilmesi ve tedavi cevabının değerlendirilmesi açısından sitogenetik değişikliklerin tespiti önem taşımaktadır (51)

Hematolojik malignitelerde konvansiyonel sitogenetik tetkikle birlikte moleküler inceleme ve FISH yöntemi gibi gelişen diğer yöntemlerle kromozomal anomalileri saptama insidansı %75 kadar artmaktadır (52). FISH ve moleküler incelemelerle, konvansiyonel sitogenetik analizler ile saptanamayan kompleks, kriptik ve submikroskopik anomalilerin saptanması sağlanmaktadır (39). Konvansiyonel sitogenetik tetkik tüm kromozomal anomalilerin ve kompleks karyotiplerin tanımlanabilmesi nedeniyle, daha spesifik kromozomal anomali incelenen moleküler ve FISH yöntemlerinden üstün kabul edilmektedir.

Çalışmamızda konvansiyonel sitogenetik analizinin hematoloji polikliniğimizde takipli hastalarda tanı, prognoz ve tedavi şeklini belirlemede etkisi ve gerekliliği değerlendirildi.

Hastaların sitogenetik analizleri “International System for Human Cytogenetic Nomenclature” (ISCN, 1995) protokollerine uygun olarak çalışılmıştır. Çalışmamızda, yüksek sitogenetik anomali oranına sahip hematolojik hastalıklar ayırımı yapılmaksızın polikliniğimizde takipli hastalardan belirli bir süre içinde konvansiyonel sitogenetik tetkik istenen tüm hastalar değerlendirilmiştir. Hastalarımızdan alınan kemik iliği örneğinden yapılan konvansiyonel sitogenetik incelemesinde 150 sinde (%75,6) normal , 32 sinde (%16,1) anormal karyotip olmak üzere 182 (%91,5) hastada sitogenetik sonuç elde edildi. Sadece 7 sinde (%3,5) kemik iliği materyal eksikliği, 10 unda ise (%5,1) yeterli metafaz üretilmediği için toplam 17 (%8,5) hastada sonuç elde edilememiştir.

Yiğit B. tarafından yapılan uzmanlık tezinde konvansiyonel sitogenetik, FISH ve moleküler genetik tetkikler karşılaştırmıştır. Konvansiyonel sitogenetik tetkikle 110 hastanın 15 inde (%13,6) da anomali saptanmış, 59 hastada (%53,6) karyotip normal bulunmuştur. Metafaz üretilmeyen 5 hasta (%4,5) kaydedilmiştir. Hastaların 31 i ise

(%28,2) de materyal eksikliği yada takipli KML lerde direkt FISH çalışıldığı için sitogenetik incelemeye alınmamıştır(11).

Benzer amaçlı yapılan birçok çalışmada literatürde yer almaktadır. Ama çalışmaların çoğunda genelde bir hastalık grubunda konvansiyonel sitogenetik inceleme yapılmıştır. Genel hematolojik hastalıklarda yapılan sitogenetik analizler çoğu kez ya moleküler inceleme yada FISH ile yapılmış incelemelerdir. Genel olarak çalışmalara tez çalışması yada laboratuvarın başarı oranı saptama amacıyla yapılmıştır. Cox ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada 260 AML tanılı hastada yapılan FISH analizi ile konvansiyonel sitogenetik analiz sonuçları karşılaştırılmıştır. Konvansiyonel sitogenetik analizi sonucu 105 hastada (%41) anormal, 102 hastada (% 39) normal karyotip tespit etmişler, metafaz üretilmediği için 53 hastada (%20) sonuç verilememiştir(36). Benzer şekilde Byrd, J.C ve arkadaşları tarafından yapılan non-randomize tedavi öncesi çalışmalarda AML li hastalarda, sitogenetik anomali oranı %52'e yakın bulunmuştur (53,54).

Konvansiyonel sitogenetik tetkik kemik iliğinin alınması aşamasından itibaren titiz bir çalışma gerektirmektedir. Zaman ve emek gerektiren bu işlemler sırasında belli bir oranda sonuç elde edilememesi söz konusu olabilmektedir. Cox ve arkadaşlarının çalışmasında % 20, Yiğit B nin çalışmasında % 30 a ulaşan sonuç elde edememe oranı genetik laboratuvarımız için % 8.5 olacak şekilde anlamlı olarak düşük bulundu.Yiğit B tarafından yapılan çalışmada anomali saptanma oranı % 13.6 iken çalışmamızda bu oran % 16,1olarak daha yüksek bulundu(11,53).Bu sonuçlar konvansiyonel sitogenetik tetkiklerin yapıldığı genetik laboratuvarımızın titiz çalışmasının göstergesi olarak kabul edilebilir.

Çalışmamızda 15 aylık bir sürede genetik laboratuvarımızda kemik iliğinden sitogenetik tetkik yapılan 590 hasta olduğu belirlenmiş ve bunların içinde dosya bilgilerine ulaşılan 199 hasta değerlendirilmiştir. Tetkik yapılan hastaların % 53.3 ü ilk tanı hastası iken % 46.7 si takipli hasta idi. Bu sonuç hastaların sadece tanı aşamasında değil, takibinde de konvansiyonel sitogenetik tetkikin vazgeçilmez olduğunu göstermektedir.

Hastalarımız genel olarak değerlendirildiğinde median yaşın 59 olduğu, tanılara göre değerlendirdiğimizde ise ALL de 28 olan median yaşın MDS, KMPH, KLL,LGL de 65 e ulaştığı görülmektedir. Bu yaş dağılımı literatüre uygun bulunmaktadır. Erkek /kadın oranı 1.1 olarak bulundu.

Çalışmamızda anormal sitogenetik saptanan hastalar 5 MDS, 15 KML, 3 AML, 3 MGUS-MM, 3 KMPH, 2 ALL, 1 ITP tanılı toplam 32 hastadan (tüm hastaların %16,1 i) oluşmaktaydı (Tablo 20). Konvansiyonel sitogenetik tetkik yapılan toplam 29 KML tanılı hastamız mevcuttu. Bu hastaların 14'ünde tedavi ile Ph kromozomu negatifleşmişti. Diğer 15 hastada sitogenetik anomali mevcuttu. Bu 15 hastanın 13 ünde klasik t(9,22);(q34,q11) anomalisi varken, birinde 46,XY,inv(12),(p11,2q15)[2] /46\_XY,t(9,22)(q34,q11), inv(12)(p11,2q15) [18], diğerinde 46,XY,t(9,21,22);(q34,q22,q11) şeklinde anormal karyotip saptandı. Sonuç olarak tüm KML tanılı hastalarımızda tanı sırasında konvansiyonel sitogenetikle Ph kromozom anomalisi saptama oranı %100 olarak bulundu. KML hastalarının tanısında ve takibinde konvansiyonel sitogenetik analizleri altın standart kabul edilmesi çalışmamız tarafından doğrular nitelikte (55,56) bulundu. Çalışmamızda anomali saptanan 15 KML tanılı hastanın sadece 2 sinde (%15,2) de 2. anomali saptanmıştır. Bu hastaların prognozunun daha kötü olabileceği bilinmeli ve takiplerinde konvansiyonel sitogenetik yöntemle yapılması sağlanmalıdır.

Çalışmaya alınan 15 AML tanılı hasta olup 7 si ilk başvuran tedavi öncesi hasta, 8 i takipli hastaydı. Çalışmamızda yeni tanılı 7 hastadan 3 ünde (% 42.8) kompleks karyotip anomali saptandı. Cox ve arkadaşlarının çalışmasında AML de tedavi öncesi sitogenetik anomali %41 oranında saptanmıştı(53). Sonuçlar benzer olmakla birlikte bizim hastalarımız içinde AML tanılı hasta sayısının çok daha az olduğunu belirtmek gerekir.

ALL tanılı 5 hastamızdan 1 ilk başvuru, 4 takipli hasta idi. Bu hastaların 2 sinde (%40) anomali saptanmış olup, bunlar 1 hastada 46\_XY[6]/92\_XXYY[5], 5 metafazda tetraploid karyotip, diğer 1 hastada hipotriploidi (Kromozom sayı 58-68 arası) anomalisi şeklinde idi. Her iki hastadaki anomaliler de ALL de kötü prognoz kabul edilen anomalilerdi (Tablo 8)(7). Prognozun belirlenebilmesi bu hastalara daha yoğun kemoterapi protokolleri uygulanmasına imkan tanıyabilmektedir.

Çalışmaya alınan 24 MDS hastasının 5 inde (%20,8) anomali saptanmış olup bunların 3 ünde anomali kompleks karyotip şeklinde idi. Diğer 2 MDS hastasında ise del(5) ve -7 saptanmıştı. Bu anomaliler özellikle kompleks karyotip AML ile ilişkili kabul edilen anomalilerdir (Tablo 20). 15 AML hastamızın 3'ünde çok sayıda delesyon ve translokasyonlar içeren kompleks karyotip saptanmıştı. AML de kromozom 5, 7, kompleks karyotip ve 11q23'ün anomalileri tedaviye kötü yanıt ve genel sağkalımın daha kısa olması ile ilişkilidir. Zaten sadece AML yada MDS ilişkili anomali yoktur (57). Ayrıca 1 MDS, 1

MGUS ve 1 ITP hastasında bazı metafazlarda kliniği tam anlaşılamayan anomaliler saptandı. İTP tanılı hastalarda anomali saptanması beklenmemektedir, bu hastalara tanı amaçlı rutin olarak kemik iliği incelemesi de yapılmamaktadır. İleri yaştaki hastalarda bu işlem MDS ayırıcı tanısı için ya da splenektomi öncesi planlanan bir işlemdir.

Kemik iliğinden biyopsi yapılması ve iliğin aspire edilmesi invaziv bir işlem olması ve ciddi riskler barındırması nedeniyle kemik iliğinin değerlendirilme endikasyonu olan hastalıklarda yapılmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda sağlıklı popülasyondan oluşan bir kontrol grubu oluşturulamadı. Çalışmamız sadece hastalıklı popülasyondan oluştuğundan, konvansiyonel sitogenetik anomali saptanma oranı düşük HL, HDL ve MM-MGUS gibi lenfoproliferatif hastalık tanısı olan hastalar ile birçok çalışmada sitogenetik anomali oranının yüksek olduğu bulunan AML, MDS, KMPH, MDS gibi myeloproliferatif kökenli hastalık tanılı hastalar ile karşılaştırıldı (51,53,54). Burkitt lenfoma ve foliküler lenfoma gibi HDL alt grupları ile ALL ve KLL gibi çalışmalarda yüksek sitogenetik anomali oranına sahip olmalarına rağmen lenfoid kökenli olduğundan çalışmada lenfoproliferatif hastalar grubuna dahil edildi. Yine lenfoproliferatif hasta grubu, ITP gibi hastalıkları kapsayan diğer bir grup hasta ile karşılaştırıldı.

Hastalarımızın 74 ü ( % 37,2) lenfoproliferatif hastalık tanılı iken, 103 hasta (%51,8) myeloproliferatif hastalık tanılı, 22 hasta ( % 11,1) ise diğer tanıları olan hastalardı.

Çalışmamızda myeloproliferatif hastalık tanılı hasta grubunda sitogenetik tetkiklerin hem tanı, hem prognoz hem de tedaviye katkısı lenfoproliferatif hastalık tanılı hasta grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır (**p<0,001**). Myeloproliferatif hastalarda sitogenetik tetkiklerin pozitif sonuç vermesi lenfoproliferatif hasta grubuna göre beklenenden yüksek oranda saptanmıştır (Tablo 17). Diğer tanılı hasta grubu lenfoproliferatif hastalık tanılı hasta grubu ile sitogenetik pozitifliğine göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (**p=1,000**). Sitogenetik pozitiflik sayısının lenfoproliferatif hastalık grubunda 65 hastanın 5 inde (%7,7) ve diğer hastalık tanılı hasta grubunda 20 hastadan 1 inde (%5) saptandı ve hasta sayısının düşük olması sonucu istatistiksel analizin anlamlı bulunmaması gerektiği düşünüldü. Aynı nedenle sitogenetik sonucun tanı, tedavi, prognoza katkısı değerlendirilmedi (Tablo 19).

Literatür bilgisine dayanarak Burkitt Lenfoma (BL), Mantle Cell Lenfoma(MCL) ve Foliküler Lenfoma(FL) , DBBHL gibi sitogenetik anomali oranının yüksek olduğu bilinen ve bazen sitogenetiğin tanı konulmasında katkısı da olan HDL alt tipleri mevcuttur. Çin de An

G. ve arkadaşları tarafından yapılan konvansiyonel sitogenetik sonuçları ile ilgili bir retrospektif çalışmada 126 olgunun %38,9 i (49) DBBHL, %19 u (24) lenfoplazmasitik lenfoma (LPL), %16,7 si (21) MCL, %9,5 u (12) FL, % 8.7 i (11) Marjinal Zone lenfoma (MZL) ve % 7,1 u (9) Küçük Lenfositik lenfoma (SLL) tanılı olup bu.126 olgunun 52(% 41.3) 'sinde anomali tespit edildiği bildirilmiştir. Kromozomal anomali görülme sıklığı DBBHLda %73,4, MCL da %38,1, MZL da %36,4, LPLda %8,3, FLda %8,3 ve SLL da %11,1 oranında saptanmıştır(58).Bizim çalışmamızda lenfoma tanılı 20 hastada (hastaların %10 unda) bir sitogenetik anomali saptanmadı. Çalışmamızın büyük eksikliklerden biri çalışmadaki lenfoma hastalarının sayıca az olması olarak kabul edilebilir.

Sonuç olarak çalışmamızda elde edilen sonuçlar istatistiksel analiz ışığında değerlendirildiğinde konvansiyonel sitogenetik analiz yöntemi KML ve AML de kesinlikle yapılmalıdır. MDS, KMPH gibi myeloproliferatif hastalıklarda da rutin olarak yapılması önerilir. Hodgkin Dışı Lenfomalarda, HL, LGL, KLL, MM gibi alt tiplerde rutin konvansiyonel sitogenetik önerilmez. Yine literatür bilgisine dayanarak belli alt tip lenfoma tanısına katkı amaçlı sitogenetik çalışma önerilebilir(58). Konvansiyonel sitogenetik incelemeler için kemik iliği alınımından itibaren tetkik sonuçlanana dek kurallara uygun ve dikkat gerektiren bir çalışma sürdürülmesi sonuç elde edilme olasılığını artıracaktır.

#### KAYNAKÇA

1. Heim S, Mitelman F: Cancer cytogenetics. 2nd Ed. Willey Liss. Inc. New York 1995, pp:33-68.
2. Rowley DJ, Mitelman F: Principles of molecular cell biology of cancer: Chromosome abnormalities in human cancer and leukemia. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA (Eds) Cancer Principles and practice of oncology. 4th Ed. JB Lippincott Co. Philadelphia, 1993, pp67-91
3. Beutler E.,Jorde LB., Godley LA. Molecular and Cellular Hematology Willam's Hematology, Kaushansky K., Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Prchal JT.Ed 8. Edition, McGraw Hill Company, New York, 2010; 129–161.
4. Fırat D, Akdaş A, Atakan IA, Baltalı E, Berk Ö, Berkardo B, Bilge N, Büyükpamukcu M, Çevik N. (Çeviri):Klinik Onkoloji, Dördüncü baskı, Sağlık Bakanlığı Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Ortak Yayını, 1990.

5. Kutti J, Ridell B..Incidence in the USA in 2008 - Source 'Leukemia and Lymphoma Society' [www.leukemia-lymphoma.org](http://www.leukemia-lymphoma.org), Pathol Biol 49: 164–166, 2001 <http://mpdfoundation.org>.
6. Adeyinka A, Dewald GW.Cytogenetics of chronic myeloproliferative disorders and related myelodysplastic syndromes. Hematol Oncol Clin North Am. 2003 Oct;17(5):1129-49.
7. Kern WF. Çeviri:Ferhanoğlu B. PDQ Hematoloji 1.Baskı 2005.
8. Altunbaşak A.Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi bünyesinde kemoterapi tedavisi gören lösemi hastalarında G-Bantlama Metodu ile sitogenetik analizler. Yüksek Lisans Tezi.2006.
9. Travade P, Chastang C, Dighiero G, Binet JL, Cooperative Group on CLL of Societe Française d'hematologie. New trends in CLL treatment. Blood Cells, 1987; 12:485-496.
10. Johanson B, Mertens F, Heim S, Kristofferson V, Mandahl N, Nilsson PG, Mitelman F. Cytogenetic Findings in Acute Megakaryoblastik Leukemia (ANLL-M7), Cancer Genet. Cytogenet., 1990; 48: 119-123.
11. Yiğit B. Hematolojik Malignansilerde Konvansiyonel Sitogenetik, Moleküler ve Moleküler Sitogenetik Uygulamalar. Yüksek Lisans Tezi, 2013.
12. Kadam PR, Advani SH, Bhijey AN. Studies on sister chromatid exchanges in patients with Hodgkin's disease, Cancer Genet. Cytogenet., 1985; 22:265-274.67
13. Bacher U, Haferlach T, Hiddemann W, Schnittger S, Kern W, Schoch C. Additional clonal abnormalities in Ph(+) ALL and CML demonstrate a different cytogenetic pattern at diagnosis and follow different pathways at progression. Cancer Genetics and Cytogenetics. 2005; 157:53-61.
14. Tabertero MD, Bortoluci AM, Aaejos I, Lopez Berges MC, Rasillo A, Garcia Sanz R, Garcia M, Sayagues JM, Gonzalez M, Mateo G, San Miguel JF, Orfao A. Adult precursor B-ALL with BCR/ABL gene rearrangements displays a unique immunophenotyped on the pattern of CD10, CD34, CD13 and CD38 expression. Leukemia 2001; 15:406-14.
15. Rieder H, Ludwig WD, Gassmann W, Maurer J, Janssen J, Gökbaget N, Schwarz S, Thiel E, Löffler H, Bartram C, Hoelzer D, Fonatsch C. Prognostic significance of additional chromosome abnormalities in adult patients with Ph chromosome positive ALL. Br J Haematol 1996; 95: 678-91.

16. Gale RP, Kanti RR. New insight into a chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*.1987; 1: 667-679.
17. Spechia G, Minini D, Guerrasia A, Palumbo G, Pastore D, Liso V. Ph(+) ALL in Adults: Molecular and clinical studies. *Leuk. Lymphoma*. 1995;18 (1): 37-42).
18. Hooberman AL, Westbrook CA. Molecular methods to detect the Philadelphia chromosome. *Clinics and Laboratory Medicine* 1990; 10(4):839-850.
19. Glassman A, Talpaz M, Arlinghaus B. Comparison of bcr-abl protein expression and Philadelphia chromosome analysis in chronic myelogenous leukemia patients. *Hematopathology* 1996; 106:442-446.
20. Rowley JD . A new consistent chromosomal abnormality in CML identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973; 243:290-3.
21. Heim S, Mitelman F. *Chronic Myelogenous Leukemia*. Cancer Cytogenetics 2nd Edition. 1989; 4: 41-69.
22. Sanberg AA. Chromosome changes in lymphomas. *Human Pathology* 1981; 12:531-539.
23. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of the chronic leukemias. *N Eng J Med*. 1999; 341:164-172.
24. Kantarjian H, Dixon D, Keating MJ. Characteristics of accelerated disease in CML. *Cancer* 1988; 61: 14-41.
25. İlhan O. Kronik myelositer lösemi ([www.osmanilhan.com/kronik\\_miyelosit.pdf](http://www.osmanilhan.com/kronik_miyelosit.pdf)).
26. James W. Vardiman. The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: An overview with emphasis on the myeloid neoplasms. *Chemico-Biological Interactions* 2010; 184 :16–20.
27. Hilman Robert S. Çeviri: Sakacı S. *Klinik Uygulamada Hematoloji 5.Baskı* Güneş Tıp Kitap Evi, 2012. p:279-299.
28. Komrokji R, Bennett JM. The myelodysplastic syndromes: classification and prognosis. *Curr Hematol Rep*. 2003 May;2(3):179-85. 13.
29. Maciejewski JP, Selleri C. Evolution of clonal cytogenetic abnormalities in aplastic anemia. *Leuk Lymphoma*. 2004 Mar;45(3):433-40.

30. Kaushansky K. The chronic myeloproliferative disorders and mutation of JAK2: Dameshek's 54 year old speculation comes of age. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; 20: 5-12.
31. Klug WS, Cummings MR. *Genetik Kavramlar* (Çeviri:Öner C.) İstanbul, 2002.
32. Özçelik N. SDÜ Tıp Fakültesi T.Biyoloji ABD. *Tıbbi Biyoloji Klavuzu*, 2.Baskı Isparta, 2005.
33. Poirel H, Radford-Weiss I, Rack K, et al. Detection of chromosome 16 CBF beta- MYH11 Susian transcript in myelomonocytic leukemios. *Blood*,1995; 85: 1313-1322.
34. Gilliland DG, Blanchard KL. Clonality in myeloproliferative disorders: Analysis by means of the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991; 88: 6848-6852 57.
35. Kurzrock R, Talpaz M. *Molecular Biology in Cancer Medicine*. Martin Dunitz Ltd. 1999.
36. Acar A. *Ferrokrom fabrikasında çalışan işçilerde sitogenetik çalışmaları*, Doktora Tezi, 1985.
37. Öztürk A. *Meme kanserli hastaların lenfosit hücrelerinde KKD sıklığı*. Yüksek Lisans Tezi, 1995.
38. Özkınay C. *Kromozomlarda KKD*. Ege Üni. Tıp Fak. Dergisi,1982; Cilt 21 Sayı 1:1-4.
39. Miranda RN, Mark HF, Medeiros LJ. Fluorescent in situ hybridization in routinely processed bone marrow aspirate clot and core biopsy sections. *Am J Pathol* 1994; 154: 1309-1314.
40. Teixeira MR. Combined classical and molecular cytogenetic analysis of cancer. *Eur J Cancer* 2002; 38: 1580-1584.
41. Veronese ML, Ohta M, Finan J, Nowell PC, Croce CM. Detection of myc Translocations in Lymphoma Cells by Fluorescence In Situ Hybridization with Yeast Artificial Chromosomes. *Blood*, 1995; 85: 2132–2138.
42. Pala FS. *Hematolojik kanserlerde FISH uygulamaları*.Trakya Üniv Tıp Fak Derg 2005;22: 132-136.,
43. Sreekantaiah C. FISH panels for hematologic malignancies. *Cytogenet Genome Res* 2007; 118: 284-296.

44. Weng AP, Millholland JM, Yashiro-Ohtani Y, Arcangeli ML, Lau A, Wai C et al. c- Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev* 2006; 20: 2096–2109.
45. Jain KK. Current status of fluorescence in-situ hybridization. *Med Device Technol* 2004; 15: 14–17.
46. McNeil N, Ried T. Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: technology and applications in molecular medicine. *Expert Rev Mol Med* 2000; 1-14.
47. Roth MS, Antin Jh, Bingham EL, Ginsburg D. Detection of Philadelphia chromosome-positive cells by the polymerase chain reaction following bone marrow transplant for CML. *Blood*, 1989; 74(2): 882-885.
48. Strachan T and Read AP. *Human Molecular Genetics*. BIOS Scientific Publishers Limited, 1996.
49. Yunis JJ. New chromosome techniques in the study of human neoplasia. *Hum Pathol*. 1981, 12: 540-49.
50. Mohamed AN, Clarkson BD, Chaganist RSK. High resolution banding of Chronic Myeloid Leukemia chromosomes. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1986, 20: 209-222.
51. Hokland P. Pallisgaard N. Integration of Molecular Methods for Detection of Balanced Translocations in the Diagnosis and Follow-up of Patients With Leukemia. *Seminars in Hematology*. 2000;374(4): 358-367.
52. Kearney L: The impact of the new fish technologies on the cytogenetics of haematological malignancies. *Br J Haematol* 4: 648-658, 1999
53. Cox MC, Panetta P, Venditti A, Del Poeta G, Franchi A, Buccisano F, Tamburini A, Maurillo L, Amadori S. Comparison Between Conventional Banding Analysis and FISH Screening with an AML Specific Set of Probes in 260 Patients, *The Hematology Journal* 2003; 4: 263-270.
54. Byrd, J.C.; Mrózek, K.; Dodge, R.K.; Carroll, A.J.; Edwards, C.G.; Arthur, D.C.; Pettenati, M.J.; Patil, S.R.; Rao, K.W.; Watson, M.S.; et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: Results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* 2002, 100, 4325–4336.[CrossRef] [PubMed]

55. Ou J, Vergilio JA, Bagg A. Molecular diagnosis and monitoring in the clinical management of patients with chronic myelogenous leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors. *Am J Hematol* 2008;83:296-302.

56. Kantarjian H, Schiffer C, Jones D, Cortes J. Monitoring the response and course of chronic myeloid leukemia in the modern era of BCRABL tyrosine kinase inhibitors: practical advice on the use and interpretation of monitoring methods. *Blood* 2008;111:1774-80.

57. Döhner, H.; Weisdorf, D.J.; Bloomfield, C.D. Acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2015, 373, 1136–1152. [PubMed]

58. An G, Zhang JW, Shi LH, Yi SH, Zhao YZ, Qi JY, Zou DH, Qiu LG. Cytogenetic and clinical study on 126 cases of B cell non-Hodgkin's lymphoma with bone marrow involvement. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* 2011 Jan;32(1):34-7. [PubMed]