

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇOCUKLUK ÇAĞI AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ
OLGULARININ TANISINDA YENİ BİR KOMBİNE YAKLAŞIM:
REAL TIME PCR VE YÜKSEK ÇIKTILI BAC TABANLI
MOLEKÜLER FISH ANALİZLERİ**

Zeynep İLKAY

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Genetik ve Molekuler Biyoloji Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ
2012

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇOCUKLUK ÇAĞI AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ
OLGULARININ TANISINDA YENİ BİR KOMBİNE YAKLAŞIM:
REAL TIME PCR VE YÜKSEK ÇIKTILI BAC TABANLI MOLEKÜLER
FISH ANALİZLERİ**

Zeynep İLKAY

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç.Dr.Hakan SAVLI

KOCAELİ
2012


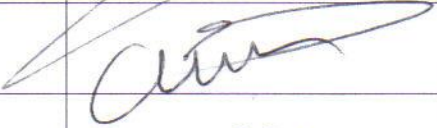
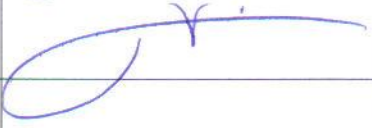
SAGLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: Gocukluk çağı ALL olgularının tanısında yeni bir kombine yaklaşımlı:
Real Time PCR ve Yüksek Güçlü BAC Tabanlı Moleküler FISH Analizleri
Tez yazarı: Zeynep İLKAY

Tez savunma tarihi: 01.02.2012

Tez Danışmanı: Doç.Dr.Hakan SAVLI

İşbu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) - ~~DOKTORA TEZİ~~ olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ		İMZA
ÜNVANI	ADI SOYADI	
BAŞKAN:	Dr. Bülent Kara	
ÜYE(DANIŞMAN):	Doç. Dr. Hakan SAVLI KOÜ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Dip. No. 8904 A-142	
ÜYE:	Naci LİWE	
ÜYE:		
ÜYE:		

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.../.../200..

Prof.Dr. Ümit BİÇER

Enstitü Müdürü

Özet

Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemi Olgularının Tanısında Yeni Bir Kombine Yaklaşım: Real Time PCR Ve Yüksek Çıktılı BAC Tabanlı Moleküler FISH Analizleri

Akut lenfoblastik lösemi (ALL), kanda ve kemik iliğinde olgunlaşmamış lenfoid seri hücrelerinin birikimi ve lösemik transformasyonu ile karakterize hastalık tablosudur. ALL'nin tanı ve tedavisinde kromozomal aberasyonların saptanması önem taşımaktadır.

Bu çalışmada, çocukluk çağı ALL olgularının tanısında, kantitatif real time PCR (Q-RT-PCR) ve yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri yöntemlerinin aynı zamanda kullanılıp, meydana gelen aberasyonların genom düzeyinde saptanması amaçlanmıştır.

Çalışmada, cinsiyet farkı gözetmeksizin, 0-18 yaş arası, ALL ön tanılı 29 hastadan alınan periferik kan veya kemik iliği örneklerinden RNA elde edilerek Q-RT-PCR, DNA elde edilerek, yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri yöntemi uygulanmıştır. Sonuç olarak 17 (%58,6) hastada, çeşitli boyutlarda aberasyonlar saptanmıştır. Bu 17 hastanın 1'inde (%3,4) bulunan aberasyonlara ek olarak Q-RT-PCR yöntemi ile, MLL-AF4 füzyon geni varlığı saptanmıştır. Hastaların 2'sinde (%6,9) ise yalnızca Q-RT-PCR yöntemi sonucu ile izlenen MLL-AF4 ve BCR-ABL füzyon geninin varlığına rastlanılmıştır. Çalışmada yer alan hastaların 10'unda (%34,5), her iki yöntemle de herhangi bir aberasyon saptanmamıştır. Çalışmamızda en sık görülen kromozomal anomaliler, %20,7 oranla X ve 21. kromozom artışı, %10,3 oranla 9p ve 6q kromozom kaybı olarak saptanmıştır.

Hematolojik malignitelere bu iki yöntemin birlikte kullanımının, hızlı tanı ve duyarlılık artışı açısından anlamlı olduğunu düşünüyoruz.

Anahtar Kelimeler: ALL, hematolojik malignite, aberasyon, Q-RT-PCR, yüksek çıktılı FISH analizleri

Abstract

A New Combined Approach At The Diagnosis Of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Patients: Real Time PCR And BAC Based High Throughput FISH Analysis

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a disease characterized by the accumulation and leukemic transformation of immature lymphoid cells in the blood and bone marrow. Determination of chromosomal aberrations is very important in the diagnosis and treatment of ALL.

Aim of this study was to determine genomic level aberrations for the diagnosis of childhood ALL patients using quantitative real time PCR (Q-RT-PCR) and high throughput BAC based molecular FISH analysis simultaneously.

In this study, Q-RT-PCR was performed on RNA samples and high throughput BAC based molecular FISH analysis was performed on DNA samples obtained from peripheral blood and bone marrow of 29 pre-diagnosed ALL patients between the ages of 0-18 regardless of gender. As a result of high throughput BAC based molecular FISH analysis, aberrations with various sizes were detected in various regions of the genome in 17 (58,6%) patients. The presence of MLL-AF4 fusion gene was identified in a patient (3,4%) among 17 patients using Q-RT-PCR method in addition to the found aberrations. The presence of MLL-AF4 and BCR-ABL fusion genes were found using Q-RT-PCR as an only result in 2 (6,9%) patients. Using both methods no aberrations were found in 10 (34,5%) patients. Gain of chromosomes X and 21 in a frequency of 20,7%, loss of chromosomes 9p and 6q in a frequency of 10,3% were the most common chromosomal aberrations detected in our study.

We think rapid diagnosis and increased sensitivity is the significance of the simultaneous use of these two methods in hematological malignancies.

Key words: ALL, hematological malignancy, aberration, Q-RT-PCR, high throughput FISH analysis

TEŞEKKÜR

Genetik alanında çalışabilme şansını bana tanımış olan ve bilimsel konulardaki engin bilgisiyle bu zorlu yolda ilerlememe yardımcı olan değerli tez hocam Doç. Dr. Hakan SAVLI'ya; çalışmamın her aşamasına bilgi ve tecrübesiyle katkıda bulunan, yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarını boyunca bana yol gösteren değerli hocam Yard. Doç. Dr. Naci ÇİNE'ye; yüksek lisans eğitimim süresince büyük bilgi birikimlerini içtenlikleriyle paylaşan hocalarıma tümüne;

Çalışmamıza değerli katkılarından dolayı Çocuk Hematoloji/Onkoloji Polikliniği ve Servisine;

Birlikte çalıştığım, iyi ve kötü günlerimde hoşgörü ve destekleriyle yanımda olan, eşsiz sabırlarıyla en zor anlarımda yardımcı olup, beni motive eden çok değerli arkadaşlarım Uzm. Tıbbi Biyolog Seda EREN, Biyolog Buket DOĞRUOĞLU, Uzm. Biyolog Deniz SÜNNETÇİ ve başta Lab. Tek. Tuba ÜNAL olmak üzere tüm sitogenetik ekibine;

Tezimin deney kısmında yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Uzm. Biyolog Nilüfer ÜZÜLMEZ ve Uzm. Biyolog Duygu YAVUZ'a ve başta Biyolog Nevin ÇALIK olmak üzere tüm moleküler ekibine;

Hayatımın her aşamasında bana yürekten desteğinden ve sabrından dolayı eşime ve aileme sonsuz teşekkürler...

Saygılarımla....

Zeynep İLKAY

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1-GİRİŞ.....	1
2-GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Lösemi.....	3
2.1.1 Tanım.....	3
2.1.2 Tarihçe.....	3
2.1.3 Patogenez.....	4
2.1.4 Sınıflandırma.....	5
2.2 Akut lenfoblastik Lösemi.....	6
2.2.1 Tanım.....	6
2.2.2 Epidemiyoloji.....	6
2.2.3 Sınıflandırma.....	7
2.2.3.1 Morfolojik sınıflandırma.....	7
2.2.3.2 Histokimyasal sınıflandırma.....	7
2.2.3.3 İmmünofenotipleme.....	8
2.2.3.4 Sitogenetik sınıflandırma.....	10
2.2.3.4.1 Kromozom sayısal bozuklukları.....	10
2.2.3.4.2 Kromozom yapısal anomalileri.....	11
2.2.4 Etiyoloji.....	15
2.2.5 Tanı.....	16
2.2.5.1 Klinik Tanı.....	16
2.2.5.2 Laboratuvar Bulguları.....	17
2.2.6 Prognostik Faktörler.....	18
2.2.6.1 Yaş.....	18
2.2.6.2 Lökosit Sayısı.....	19
2.2.6.3 Malnutrisyon.....	19
2.2.6.4 İmmünofenotip.....	19
2.2.6.5 Genetik Özellikler.....	19
2.2.6.6 Cinsiyet.....	20
2.2.6.7 Tedaviye Erken Yanıt.....	20
2.2.6.8 Merkezi Sinir Sistemi Tutulumu.....	20
2.2.7 Tedavi.....	20
2.2.7.1 Supportif Bakım.....	21
2.2.7.2 Kemoterapi.....	21
2.2.7.2.1 İndüksiyon Tedavisi.....	21
2.2.7.2.2 Santral Sinir Sistemi Profilaksisi.....	21
2.2.7.2.3 Güçlendirme Tedavisi.....	22
2.2.7.2.4 İdame Tedavisi.....	22

2.2.7.2.5 Kemik İliği Transplantasyonu.....	22
2.3 Hematolojik Malignitelerde Genetik Tanı Yöntemleri.....	23
2.3.1 Sitogenetik Yöntemler.....	23
2.3.2 Real Time PCR	28
2.3.2.1 Özgül Olmayan Belirleme Sistemi.....	29
2.3.2.2 Özgül Belirleme Sistemi.....	29
2.3.2.3 Real Time PCR Yönteminin Avantajı.....	32
2.3.2.4 Real Time PCR Yönteminin Dezavantajı.....	32
2.3.3 Yüksek Çıktılı BAC Tabanlı Moleküler FISH Analizleri	32
2.3.3.1 Yüksek Çıktılı BAC Tabanlı Moleküler FISH Analizleri Yönteminin Avantajı...	35
2.3.3.2 Yüksek Çıktılı BAC Tabanlı Moleküler FISH Analizleri Yönteminin Dezavantajı.....	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	37
3.1. Yöntem.....	37
3.1.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu.....	38
3.1.2. Periferik Kandan RNA İzolasyonu.....	38
3.1.3. DNA ve RNA'ların Kantite ve Kalite Tayini.....	39
3.1.4. Yüksek Çıktılı BAC Tabanlı Moleküler FISH Analizi Metodu.....	40
3.1.4.1. DNA Lekeleme.....	40
3.1.4.2. DNA' nin Purifikasyonu.....	40
3.1.4.3. Örneklerin Kurutulması.....	41
3.1.4.4. Hibridizasyon.....	41
3.1.4.5. Yıkama.....	42
3.1.4.6. Tarama.....	43
3.1.4.7. Veri Analizi.....	44
3.1.5. Kantitatif Real-Time PCR Metodu.....	45
3.1.5.1. cDNA sentez aşaması.....	45
3.1.5.2. t(9;22) LightCycler (LC) aşaması.....	45
3.1.5.3. t(4;11) LightCycler (LC) aşaması.....	47
4. BULGULAR.....	50
5. TARTIŞMA.....	65
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	70
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	71
ÖZGEÇMİŞ.....	77

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

aCGH: Dizi karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (Array Comparative Genomic Hybridization)

ALL : Akut Lenfoblastik Lösemi

ANLL: Akut Lenfositik Olmayan Lösemi

AML : Akut Myeloid Lösemi

AP: Asit Fosfataz (Asid Phosphatase)

BAC: Bakteri yapay kromozomu (Bacterial Artificial Chromosome)

B-ALL: B hücreli ALL

BCL-2: B hücreli lenfoma-2(B-cell lymphoma 2)

BCR: Breakpoint Cluster Region

BFM: Berlin-Frankfurt-Münih

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

CD: Antijen sınıflarının farklılaşması (Cluster of Differentiation)

CMV: Sitomegalovirus (Cytomegalovirus)

CNV: Kopya sayısı değişimi (Copy Number Variation)

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

EBV: Epstein-Barr virus

ETS: E-26 Transforme Spesifik

FAB: Fransız-Amerikan-İngiliz (French-American-British)

KLL: Kronik Lenfositik Lösemi

FISH: Floresan In Situ Hibridizasyon

FRET: Floresan Rezonans Enerji Transferi (Fluorescence Resonance Energy Transfer)

HHV6 : İnsan Herpes Virusü-6 (Human Herpes Virus 6)

HKH: Hematopoietik Kök Hücre

HKHT: Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyonu

HRB: Yüksek çözünürlüklü bantlama (High Resolutioion Banding)

HOX: Homeobox

KML: Kronik Myeloid Lösemi
MLL: Mixed lineage leukemia
MMUD: Tam uyumlu olmayan akraba dışı donör (Mismatched Unrelated Donor)
MPE: Miyeloperoksidaz
MSD: Tam uyumlu kardeş donör (Matched Sibling Donor)
MSS: Merkezi Sinir Sistemi
MTX: Methotrexate
MTHFR: Metilen Tetra Hidro Folat Redüktaz
MUD: İyi uyumlu akraba dışı donör (Matched Unrelated Donor)
MYC: Myelocytomatosis Onkogen Homoloğu
NHL: Non-Hodgkin Lenfoma
NSE: Nonspesifik Esteraz
PAS: Periodic-Aside-Schiff
PBX1: Pre-B-cell Leukemia Homeobox 1
Ph: Philadelphia kromozomu
RNA: Ribo Nükleik Asit
QRT-PCR: Kantitatif Real-time PCR
SEER: Surveillance Epidemiology and End Results
SBB: Sudan siyahı
SNP: Tek nükleotid polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism)
SSC: Sodyum Salin Sitrat (Sodium Saline Citrate)
T-ALL: T hücreli ALL
TdT: Terminal Deoksinükleotil Transferaz
TEL: Translocation ETS Leukemia
WBC: Beyaz kan hücresi (White Blood Cell)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 TEL ve AML1 bölgelerinin kırılma noktaları.....	11
Şekil 2.2. TEL-AML1 füzyon proteininin oluşumu.....	12
Şekil 2.3. BCR ve ABL nin kırılma noktaları ve oluşan BCR-ABL füzyon proteini.....	12
Şekil 2.4. BCR-ABL'nin 3 farklı kırılma noktası.....	13
Şekil 2.5. MLL ve AF4 genlerinin kırılma noktaları ve translokasyon sonrası.....	14
Şekil 2.6. MLL ve ENL genlerinin kırılma noktaları.....	15
Şekil 2.7: t(1;19) kromozom üzerinde gösterimi.....	15
Şekil 2.8. Q bantlama.....	25
Şekil 2.9. G Bantlama.....	25
Şekil 2.10. C bantlama.....	26
Şekil 2.11. G ve R bantlama.....	26
Şekil 2.12. NOR bantlama.....	27
Şekil 2.13. Floresan in situ hibridizasyon (FISH) tekniği.....	27
Şekil 2.14. Syber Green 1 yöntemi.....	29
Şekil 2.15. "TaqMan® Probe" Yöntemi.....	30
Şekil 2.16. Moleküler boncuk yöntemi.....	31
Şekil 2.17. Hibridizasyon Problemleri.....	32
Şekil 2.18. aCGH tekniğinin basamakları.....	35
Şekil 3.1. NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE).....	39
Şekil 3.2. Yükleme yapılan slaytlar.....	41
Şekil 3.3. HyBex İnkubatorde yıkanan slaytlar.....	43
Şekil 3.4. Tarayıcı kasete yerleştirilen slayt.....	43
Şekil 3.5. Tarayıcı karuseline yerleştirilen slaytlar.....	44
Şekil 4.1. ALL tanılı hasta : tri(6,8,10,14,18,21) , dup X.....	56
Şekil 4.2. ALL tanılı hasta : del(1)(q32.1q44), dup(11)(q13.4q25), tri 21.....	57
Şekil 4.3. ALL tanılı hasta : del(7p).....	57
Şekil 4.4. ALL tanılı hasta : tri 2, tri 16, del(3)(p21.31p21.2), del(14)(q24.3), dup(17)(q21.31q25.3).....	58
Şekil 4.5. ALL tanılı hasta : dup (4)(q34.3q35.2), del(6) (q14.3q27), del(9)(p24.3p22.2) ,dup(9)(q34.11q34.3).....	58
Şekil 4.6. ALL tanılı hasta : tri (4,6,8,14,17,21) ,dup (X).....	59
Şekil 4.7. ALL tanılı hasta : tri 4,dup (X).....	59
Şekil 4.8. ALL tanılı hasta : tri (4,6,8,10,14,17,18,21), dup(X), dup (Y).....	60
Şekil 4.9. ALL tanılı hasta: dup (X).....	60
Şekil 4.10. ALL tanılı hasta : del(11)(q23.1q25), dup(X)(q21.31q28).....	61
Şekil 4.11. ALL tanılı hasta : del (9)(p24.3p12), del (11)(q14.1q23.2), del (Y)(p11.31q11.23).....	61
Şekil 4.12. ALL tanılı hasta : del(6)(q14.2q16.3),del(12)(p13.31p12.3), del(14)(q32.33) ,dup(22)(q12.1q13.3),tri 10.....	62
Şekil 4.13. ALL tanılı hasta : tri 21, dup (X)(q28).....	62
Şekil 4.14. ALL tanılı hasta : tri (4,6,10,14,17,18,21), dup (X).....	63
Şekil 4.15. ALL tanılı hasta : dup(1)(p12q44).....	63
Şekil 4.16. ALL tanılı hasta: del(6)(q14.2q27),dup(8)(q23.3q24.3), dup(21)(q11.2q22.12).....	64
Şekil 4.17. ALL tanılı hasta : del(5)(q35.2q35.3),del(9)(p24.3p12),dup(9)(q21.11q34.3)...	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1: Akut lenfoblastik lösemide FAB sınıflandırması(Apak, 2006).....	7
Çizelge 2.2. Akut lenfoblastik lösemilerde sitokimya.....	8
Çizelge 2.3. ALL’de kullanılan immünofenotipleme (Celkan, 2007).....	9
Çizelge 2.4. ALL’de immunolojik sınıflandırılmaya göre görülen başlıca kromozom anomalileri.....	10
Çizelge 2.5 . Kromozomal bozuklukların prognozla ilişkisi (Celkan, 2007).....	20
Çizelge 4.1. Cinsiyetin hastalar üzerindeki dağılımı.....	50
Çizelge 4.2. ALL ön tanılı hastaların yaş ortalaması dağılımı.....	50
Çizelge 4.3. ALL olgularının immünofenotipik olarak sınıflandırması.....	51
Çizelge 4.4. Olgularda saptanan aberasyonların yöntemlere göre dağılımı.....	52
Çizelge 4.5. Aberasyon saptanan olguların dağılımı.....	52
Çizelge 4.6. QRT-PCR sonucu aberasyon saptanan olgular.....	54
Çizelge 4.7. Aberasyon saptanan olgular.....	54
Çizelge 4.8. Her iki yöntemle de aberasyon saptanmayan olgular.....	55

1.GİRİŞ

Akut lösemiler, lenfohematopoetik hücrelerin olgunlaşmaları aşamasındaki duraklama sonucu malign özellikteki klonların çoğalması ile karakterize olan heterojen bir hastalıktır (Lanskowsky, 2000). Farklılaşmadaki duraklama sonucu sıklıkla normal fonksiyonunu yapamayan immatüre görünümlü lösemik hücreler, başta kemik iliği ve periferik dolaşım olmak üzere retiküloendotelyal sistem, merkezi sinir sistemi ve diğer vücut bölgelerinde birikirler. Kemik iliğinin, kontrolsüz olarak çoğalan lösemik hücrelerle infiltre olması sonucu anemi, trombositopeni ve nötropeni gelişir. Sonuçta solukluk, halsizlik, kanamalar, kemik ağrıları ve hayatı tehdit eden enfeksiyonlar ortaya çıkar.

Akut lenfoblastik lösemi (ALL), lenfositlerin öncülleri olan lenfoblastların hızlı gelişmesi ve anormal çoğalması sonucu oluşur. Tüm çocukluk çağı kanserlerinin %25-30'unu, yeni tanı almış lösemilerin %75'ini, akut lösemilerin ise %80'ini oluşturmaktadır (Lanskowsky, 2000; Bennett et al., 1981). Gelişmiş ülkelerde ALL, en sık bir ila dört yaş arasında görülmektedir. Amerika Birleşik Devletlerinde bulunan SEER (Surveillance Epidemiology and End Results) araştırma programı, erkeklerde lösemi sıklığının, kızlara göre yaklaşık 1,1-1,4 kat fazla olduğunu belirtmektedir (<http://seer.cancer.gov/>; Apak, 2006)

ALL'nin nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte multifaktöriyel olduğu düşünülmektedir. Prenatal faktörlere ek olarak, çevresel ve immünolojik faktörler, genetik özellikler, geçirilmiş enfeksiyonlar, ALL'nin etiolojisinde rol oynamaktadır. Fakat bu faktörlerin etkisinin %1'den daha az bir oranda etkili olduğu düşünülmektedir.

Tanı ve tedavideki ilerlemelerle, bazı klinik ve laboratuvar bulgularının prognoza etkili olduğu görülmüştür ve birçok prognostik faktör belirlenmiştir. Yaş, lökosit sayısı, immünolojik alt tipler ve bazı sitogenetik bozukluklar, ALL'de sıklıkla kullanılan prognostik faktörlerdir. ALL, çocukluk yaş grubunda kemoterapiye iyi yanıt veren bir lösemi türüdür. Son yıllarda mevcut tedavi yaklaşımları ile ALL'li çocukların büyük bir bölümü ve erişkin hastaların bir kısmı başarılı bir şekilde tedavi edilebilmektedir. ALL'nin sınıflandırılmasında önemli olan kromozomal aberasyonlar, prognoza da yön vermektedir. Hastalığın erken tanı ve teşhisine olanak veren bu durum birçok yöntemle belirlenebilmektedir. Bu yöntemler içinde, konvansiyonel sitogenetik, Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) ve kantitatif real time PCR (Q-RT-PCR) en bilinen tanı yöntemleridir. Son yıllarda, BAC tabanlı dizi karşılaştırmalı

genomik hibridizasyon (BAC aCGH) ve FISH tekniklerini temel alan “yüksek ıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri” yöntemi, genomda birçok bölgedeki aberasyonu aynı anda tarama ve sonuç verme kapasitesiyle, hematolojide yeni bir tanı olanağı sağlamaktadır.

Çalışmamız, çocukluk çağı ALL hastalarına yoğunlaşan ve bu yeni teknolojinin tanısal imkanlarını sorgulayan, alanında ilk çalışmalardan biridir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Lösemi

2.1.1 Löseminin Tanımı

Löseminin kemik iliğinden köken alan lenfopoetik, hemapoetik kök hücrelerinin veya öncü hücrelerinin malign bir hastalığıdır. Normal myeloid ya da lenfoid hematopoezin spesifik bir kademesindeki duraklama ve klonal çoğalma sonucu neoplastik hücrelerin kemik iliği ve diğer dokularda toplanması ve periferik kanda birikmesi ile karakterize bir kan hastalığı olan löseminin etiyojisi tam olarak bilinmemekle beraber, tedavi edilmediğinde ölümlerle sonuçlanabilmektedir.

Löseminin kelime anlamı “kanda beyazlaşma”dır. Lösemik hücrelerin kemik iliği dışındaki dokularda birikmesiyle oluşan kitleler myeloblastom veya lenfoblastom olarak adlandırılmış olup bu tarz tutulumların en sık görüldüğü yerler, merkezi sinir sistemi, cilt, paranazal sinüsler, kemik, meme dokusu, gonadlar ve lenf dokusudur. Sonuçta eritrosit, granülosit ve trombosit yapımı azalır ve halsizlik, çabuk yorulma, solukluk gibi anemiye bağlı belirtiler, nötropeniye bağlı enfeksiyonlar ve trombositopeniye bağlı kanamalar meydana gelir (Biondi and Masera, 1998; McKenna, 2000).

2.1.2 Löseminin Tarihçesi

Literatürde ilk kez 1827’de lösemili bir olgu bildirilmiştir . 1827’de Velpeau tarafından lösemi ile ilgili ilk vaka bildiriminden bu yana, lösemi, gerek klinik gerekse genetik incelemelerde ilgi duyulan bir neoplazm olmuştur. Velpeau tarafından tespit edilen hastada; ateş, güçsüzlük, karın şişliği ve idrar yolları taşlarından kaynaklanan ağrılar şikayet edilmiş ve hastaneye başvurusundan kısa bir süre sonra hasta kaybedilmiştir. Hastanın otopsisinde, büyük dalak ve karaciğerin yanı sıra, kanın kırmızı şarap renginde ve kıvamının artmış olduğu adeta lapa kıvamında olduğu bildirilmiştir (Albayrak, 1983). Bu tarihten 1845 yılına kadar, lösemi ile ilgili çalışmalar yeterli olmamıştır. Bu tarihlerde Virchow ve Bennett ayrı ayrı olgularının otopsisinde, kanın beyaz rengine dikkat çekmiş ve hastalığı tanımlamışlardır (Williams et al., 1991).

İlk tanımlanan olguda, dalak oldukça büyük ve lökositoz, damarların içindeki sarı beyaz ve yeşilimtrak kitle olarak tarif edilmiştir. O dönemde lökositlerdeki yapısal özelliklerden henüz bahsedilmemektedir. Yüksek lökosit sayısına atfen, beyaz kan terimi (weisses blut) kullanılmış, daha sonra ise Yunanca kökenli olarak beyaz anlamına gelen “leukos” ve kan

anlamına gelen “haima” sözcüklerinden “leukemia” terimi türetilerek kullanılmaya başlanmıştır (Williams et al., 1991).

İlk defa 1870 yılında lösemiye, myelojen, dalak ve lenfatik lösemi olarak Neumann sınıflandırmıştır ve kemik iliğinden kaynaklandığını göstermiştir. Erlich 1891 yılında yeni boya yöntemleri ile lösemi histolojisinde yeni bir sayfa açmıştır. Turk’un 1903 yılında lenfatik lösemileri akut ve kronik olarak ayırmasının ardından Naegeli 1905 yılında myeloblastı tariflemiş, 1914 yılında lösemnin başka alt tipleri tarif edilmeye başlanmıştır (Apak, 2006).

Lösemnin ilk tanımlandığı dönemde sadece semptomatik tedavi yöntemi uygulanmaktayken, 1873 yılında ilk kan transfüzyonu uygulanmaya başlanmış, 1942’de ise nitrojen mustard devirilerini gözlemleyen Gilman ve ekibi tarafından lösemi tedavisine kemoterapik ajanlar eklenmeye başlanmıştır (Ar ve ark., 2008; Ünal ve Tuncer, 2004). Folik asit antagonisti olan aminopterinin Farber, Diamond ve ekibi tarafından ilk kez 1948 yılında tedavide kullanılmasıyla, lösemilerde ölüm geciktirilebilmiştir (Miller, 2005). Bu tarihten sonra çok ilaçlı kemoterapi yöntemleri geliştikçe hastalarda sağ kalım oranları da yıllar içinde artmıştır (Apak, 2006).

2.1.3 Lösemnin Patogenezi

Kan hücreleri, hematopoetik organlardaki kök hücrelerden gelişirler. Fetal dönemde, karaciğer ve dalak gibi geçici hematopoetik organlarda oluşturulan kan hücreleri fetal dönemin sonuna doğru esas hematopoetik doku haline gelen kemik iliğinden üretilir. Bütün hematopoetik hücreler ortak bir multipotent ana hücrelerden kaynaklanır. Eritrositler, polimorfonükleer granüositler, monositler ve trombositler gibi periferik kandaki olgun hücreler, kemik iliğindeki progenitor hücrelerden, tek bir hat üzerinde olgunlaşarak oluşur (Neimenger and Sallan, 1993; Margolin and Poplack, 1997). Bu hücrelerden bir kısmı “lenfoid” diğer bir kısmı ise “myeloid” hücre serisine farklılaşır. Myeloid hücreler kemik iliğinde gelişerek eritrositler, granüositler, monositler ve megakaryositlere dönüşürler. Gelişimin erken döneminde lenfoid hücreler kemik iliğinden lenf düğümleri, dalak ve timusa göç ederek lenfositlere farklılaşırlar.

Lösemi, kök hücreden spesifik kan hücrelerinin oluşumuna kadar herhangi bir farklılaşma aşamasında gözlenebilir. Lösemiye yol açan malign transformasyonun mekanizması net olarak bilinmemekle birlikte, temelde genlerdeki mutasyonlar sonucu geliştiği düşünülmektedir. Mutasyona uğrayan hücrelerin çoğu, organizma tarafından çeşitli mekanizmalarla ortadan

kaldırılmasına rağmen az sayıda hücre aşırı çoğalma özelliği kazanabilmektedir. Bu hücreler “klonojenik lösemik hücreler” olarak adlandırılmaktadır (Willams et al., 1991).

2.1.4 Löseminin sınıflandırılması

Lösemi ortaya çıkış ve ilerleme hızına bağlı olarak “akut lösemi” ve “kronik lösemi” olarak tanımlanır. Akut lösemiler “blast” adı verilen olgunlaşmamış ilkel hücrelerden kaynaklanır ve hastalık hızlı ilerleme gösterir. Kronik lösemide de olgunlaşmamış hücreler bulunmaktadır ama lösemili hücrelerin çoğu olgunlaşmıştır ve normal işlevlerinin bir bölümünü yerine getirirler. Hücre sayısındaki artış ve hastalığın ilerleme hızı akut lösemiye göre daha yavaştır.

Lösemi, genellikle iki farklı hücreden ortaya çıkar: Bunlar “lenfoid” ve “myeloid” hücrelerdir. Lösemi, bunlardan hangisine bağlı olarak ortaya çıktığına göre “lenfositik lösemi” ya da “myeloid lösemi” olarak adlandırılır (Ar ve ark., 2008; Ünal ve Tuncer, 2004). Sonuç olarak lösemilerin büyük bir bölümünü 4 tip altında toplayabiliriz:

- **Akut lenfositik lösemi (ALL):** ALL, ilikteki tek bir hücrenin DNA'sına aldığı genetik hasarın sonucudur. Hastalık sıkça “akut lenfoblastik lösemi” olarak da adlandırılır. Çünkü normal ilik hücreleriyle yer değiştiren lösemik hücreler, lenfoblastdır (<http://www.hematology.org>). Erken çocukluk döneminde en çok görülen lösemi tipidir. Ayrıca 65 yaş üstü ileri dönemde ortaya çıkabilir.
- **Akut myeloid lösemi (AML):** AML, myeloid progenitör hücrelerde oluşan akkiz somatik mutasyonlar sonucu gelişen klonal bir hastalıktır (Oyan ve Koç, 2003). Hem çocuklarda, hem erişkinlerde görülür.
- **Kronik lenfositik lösemi (KLL):** KLL, B veya T lenfositlerinin nispeten olgun hücre döneminden köken alan, olgun görünümlü küçük lenfositlerin kan, kemik iliği, lenf bezi ve dalağı infiltre etmesi ve lenfositlerin fonksiyon bozukluğu göstermesi ile karakterize, kemik iliğinin malign bir hastalığıdır (Ali, 2006). Genellikle 55 yaş üstü erişkinlerde ortaya çıkar. Daha gençlerde de görülebilir. Ancak çocukluk döneminde nadir olarak görülmektedir.
- **Kronik myeloid lösemi (KML):** Primitif pluripotent kök hücrenin, klonal bir hastalığıdır. Kemik iliğinde aşırı myeloid hiperplazisi, çevre kanında olgun myeloid hücrelerden oluşan yüksek lökosit sayısı (bazofili ile birlikte) ve splenomegali ile

karakterizedir (Haznedaroğlu, 2006). Genellikle erişkin yaşlarda görülür. Çocukluk çağında görülen lösemilerin çok küçük bir bölümünü oluşturur.

2.2 Akut lenfoblastik lösemi

2.2.1 Tanım

ALL, kemik iliğinde olgunlaşmamış kan hücrelerinin klonal birikimi ile karakterize olan, lenfositlerin kötü huylu tümörleridir. Bu anormal hücreler, normal olgunlaşma yolunun lenfoblast evresinde durdurulurlar. Bu hücrelerin çoğalmasında ve farklılaşmasında aberasyonlar yaygındır ve normal hematopoez baskılanır (Harrison, 2001).

Çocukluk çağı lösemilerinin en sık görülen tipi olan ALL'nin, görülme sıklığı çeşitli ülkeler arasında her 100.000 vakada 0,9 ile 4,7 arasında değişmektedir ve onbeş yaş altındaki çocuklarda gözlenen lösemilerin %80'i oluşturmaktadır. Bazen yetişkinlerde de görülebilmekle birlikte, 50 yaşın üzerinde ALL son derece nadirdir (Krajinovic et al., 2001).

2.2.2 Epidemiyolojisi

Çocukluk lösemisi, 15 yaşın altındaki çocuklarda, tüm malignansilerin %35'ini (Ely et al., 1998; Zorlu ve ark, 2002), çocukluk çağı kanserlerinin %30'unu oluşturur (Işıkdoğan ve ark, 2003).

ALL, çocukluk çağının en sık görülen malign hastalığıdır (Loonen et al.,2002; Işıkdoğan ve ark., 2003). Gelişmiş ülkelerde akut lösemilerin %83'ünü ALL, %17'sini AML oluşturmakta olup, insidansta bölgesel farklılıklar görülebilir. İnsidans, başta genetik ve çevresel faktörler olmak üzere birçok nedene bağlı olarak değişebilmektedir (Greaves et al., 1993; Parkin et al., 1988). ABD'de onbeş yaşından küçüklerde, ALL görülme sıklığı 3.4/100.000'dir. Ülkemizde, Tübitak'ın dahil olduğu beş büyük pediatri merkezinde incelenen toplam 10548 pediatrik malignite arasında, lösemiler ilk sırada yer almaktadırlar (Çevik, 1992). Gelişmiş ülkelerde, ALL en sık bir ila dört yaş arasında görülmektedir. ABD'de bulunan ulusal kanser enstitü programı olan SEER (Surveillance Epidemiology and End Results), erkeklerde lösemi sıklığının, kızlara göre yaklaşık 1,1-1,4 kat fazla olduğunu belirtmektedir (Apak, 2006; <http://seer.cancer.gov/>)

2.2.3 Sınıflandırma

2.2.3.1 Morfolojik sınıflandırma

1976 yılında Fransız, Amerikan ve İngiliz bir grup hematolog tarafından orjinal akut lösemi French-American-British (FAB) sınıflaması oluşturulmuştur. FAB sınıflamasında, akut lösemilerin morfolojik ve sitokimyasal boyanma özelliklerine göre gruplanmıştır. Ancak immünofenotipleme, elektron mikroskobu, sitogenetik, moleküler biyolojik tetkik yöntemlerini ve nadir lösemi tiplerini içermeyen bir sınıflamadır (Ali, 2006). FAB sınıflamasında, blastlar morfolojik olarak L1, L2 ve L3 olmak üzere üç alt gruba ayrılır.

Çizelge 2.1: Akut Lenfoblastik Lösemide FAB sınıflandırması (Apak, 2006)

Akut Lenfoblastik Lösemi
L1 Çocukluk tipi ALL
L2 Erişkin tipi ALL
L3 Burkitt tipi ALL

FAB L1: Çocukluk çağı ALL'lerin %85'ini oluşturur. Hücreler homojen ve küçük olup, sitoplazmaları hafif bazofilik ve dardır. Çekirdek sınırları düzenlidir ve çekirdekçik yoktur ya da çok küçük ve belirsizdir (Celkan, 2007).

FAB L2: Çocukluk çağı ALL'lerin %14'ünü oluşturur. Hücreler heterojen ve daha büyük olup, sitoplazmaları daha geniştir. Değişken derecelerde bazofilik boyanır. Çekirdek sınırları düzensizdir ve çekirdekçik belirgin olup, bir veya daha fazla sayıdadır (Celkan, 2007).

FAB L3: Hücreler homojen ve büyük olup, sitoplazmaları koyu bazofilik ve geniştir. Sitoplazmada belirgin vaküolizasyon vardır. Çekirdek yuvarlak, sınırları düzenlidir. Çekirdekçik büyük ve belirgin olup, veziküller içerir. Bu hücrelerde mitoz siktir. Çocukluk çağı ALL'lerin %1'ini oluşturur. L3, Burkitt lenfomasının lösemik şekli olarak kabul edilmektedir (Celkan, 2007).

2.2.3.2 Histokimyasal sınıflandırma

Blastların bazı boyaları alıp almama veya az ya da çok almaları da lösemi tipini belirlemek için kullanılmaktadır. Miyeloperoksidaz (MPE), Sudan siyahı (SBB), Periyodik-Aside-Schiff (PAS), Asid Fosfataz (AP), Nonspesifik Esteraz (NSE), Terminal Deoksinükleotil Transferaz (TdT), Demir (Fe) boyaları kullanılmaktadır. Bunların farklı

kombinasyonlarda pozitif olması FAB sınıflamasını desteklemektedir (Lanskowsky, 2000; Margolin and Poplack, 1997).

Çizelge 2.2.Akut lenfoblastik lösemilerde sitokimya

FAB	MPE	SBB	AP	CAE	A-EST	B-EST	PAS	MGP	Fe	TdT
L ₁	-	-/np	+*	-	+/z	-/z	+/-	+	-	+
L ₂	-	-/np	+*	-	-/z	-/z	+/-	+	-	+
L ₃	-	-	+*	-	-	-	+/-	+	-	-

np:nadir pozitif, *: T-ALL'de unipolar pozitif, z: zayıf,

MPE: Miyeloperoksidaz, **SBB:** Sudan Black Boyası, **AP:** Acide Phosphatase, **CAE:** CholoroacetateEsterase, **A-EST:** Alpha Naphthyl Acetate Esterase, **B-EST:** Alpha Naphthyl Butyrate Esterase, **PAS:** Periodic Acide Schiff, **MGP:** Methyl Green Pyronine, **TdT:** Terminal Deoxynucleotidyl Transferase

2.2.3.3 İmmünofenotipleme

ALL'nin biyolojik alt tiplerini saptamada en güvenilir yöntem, akım sitometresi ile immünofenotiplemedir. Lenfoid hücrelerin olgunlaşması sırasında sitoplazma içinde ve hücre yüzeyinde ortaya çıkan bazı belirleyici moleküller, hücrenin olgunlaşma aşaması ve malign hücrenin kökeni hakkında bilgi vermektedir. Malign klonun öncelikle alt tipi (B veya T lenfosit) saptanmakta ve öncü hücrelerden, olgun hücrelere kadar olan aşamaların hangisinde duraklama olduğu saptanmaktadır. ALL'nin immunolojik olarak sınıflandırılması konusunda da, belirgin bir fikir birliği olmadığından her grup (CALGB, GMALL, EGIL) ayrı bir sınıflama yapmıştır (Tekgündüz ve ark., 2010). Lenfositlerin yüzeylelerinde gelişim aşamasında farklı antijenler belirir ve kaybolur. Bu yüzey işaretleyicilerine “antijen sınıflarının farklılaşması” (Cluster of Differentiation (CD)) denilir. Bu işaretleyiciler tıpkı bir etiket gibi o hücrenin hangi gelişim aşamasında olduğu hakkında bilgi verir. Bu hastalığın seyri için önemlidir. Örneğin; çocukluk çağının en iyi prognoz gösteren lösemisi, CALLA (CD 10) antijen taşıyan blastlarla oluşmuş lösemidir (Celkan, 2007).

Çizelge 2.3. ALL’de kullanılan immünofenotipleme (Celkan, 2007)

B-hücreli ALL	Saptanan CD
Pro-B ALL	CD 19 + ve/veya CD79a+ve/veya sit CD22
Common ALL	CD10+,sit Ig-
Pre-B ALL	Sit Ig+, yüzeyel Ig-
Olgun B ALL	Yüzeyel Ig+
T hücreli ALL	
Pro-T ALL	Sit CD3+, CD7+
Pre-T ALL	CD2+ ve/veya CD5+ ve/veya CD8+
Kortikal T-ALL	CD1a +
Olgun T-ALL	CD1a-, membran CD3(+)

T hücreli ALL: Erken T-ALL, timik (kortikal)-ALL ve olgun T-ALL, T lenfosit kökenli ALL’nin immunolojik alt tipleridir. ALL’lerin %15-20’si T hücrelidir. T-ALL, erkeklerde ve gençlerde artmış sıklık, tanı anında yüksek lökosit sayısı, mediastinal kitle, MSS tutulumu ve MSS’de sık nüks gibi klinik özellikler gösterir. Yüksek lökosit sayısı ($100.000/mm^3$ ’den fazla), tam yanıtın geç ortaya çıkması ve immunolojik alt tip, T-ALL için en önemli risk faktörleridir. Eskiden T-ALL’de remisyon süresi ortalama on ay, lösemisiz yaşam oranı %10’dan azdı. Günümüzde ise, yeni tedavi rejimleri ile tam yanıt oranı %80’lerden fazla ve lösemisiz yaşam oranı %46’dan daha fazladır. Hatta CALBG çalışmalarında, T-ALL’nin prognozunun, B-ALL’dan daha iyi olduğu bulunmuştur (Tekgündüz ve ark., 2010).

B hücreli ALL: Pro B-ALL, common ALL, pre B-ALL ve olgun B-ALL, B lenfosit kökenli ALL’nin immünojenik alt tipleridir. Çocukluk çağı ALL’lerin %80’i B hücrelidir. Lökosit sayısının yüksekliği ($30.000/mm^3$ ’den yüksek), yaş, tam yanıtı ulaşma süresi (dört hafta üzeri) ve t(9;22) varlığı gibi faktörlerin kullanımı ile B-ALL, risk sınıflamasına tabi tutulmuştur (Düşük ve yüksek-çok yüksek risk grubu). Common ve pre B-ALL’yi birbirinden ayıran belirgin bir klinik ve biyolojik farklılık yoktur. Ph kromozomunun sık olarak görülmesi ve risk faktörü olmayan olgularda bile, beş ila yedi yıl veya daha sonra nüksler görülmesi bu alt tiplerin en önemli özellikleridir. Pro B-ALL, bebeklerde ve erişkinlerde kötü yanıtlar oluşturan bir alt tiptir. t(4;11) pozitifliği ve myeloid belirleyicilerin varlığı en dikkat çeken özelliğidir. Ancak söz konusu translokasyonun ve myeloid belirleyicilerin varlığı pro B-ALL’de bir prognostik değer olarak kabul edilmemiştir. Burkitt lenfomasının lösemik varyantı olan olgun B-ALL ise MSS tutulumu ve yüksek LDH düzeyleri ile seyretmektedir (Tekgündüz ve ark., 2010).

Çizelge 2.4. ALL’de immünojenik sınıflandırılmaya göre görülen başlıca kromozom anomalileri

Fenotipi	Genetik Anomaliler	Sıklığı	Risk Yüzdesi
Pre-B-ALL	Hiperdiploidi ile 4, 10 ve 17 no.lu kromozomların trizomisi	Pre-B-ALL vakalarının % 25’i	Düşük
	t(12;21)(p13;q22)	Pre-B-ALL vakalarının % 28’i	Düşük
	TEL/AML1,11q23 yeniden düzenlemeleri	B-ALL vakalarının % 4’ü	Yüksek
	t(4;11)(q21;q23)	Yenidoğan ALL’lerde %40-50’sinde	
	t(1;19)(q23;p13)E2A/PBX1	B-ALL vakalarının % 6’sı	Yüksek
	t(9;22)(q34;q11)BCR/ABL	B-ALL vakalarının % 2’si	Çok Yüksek
	Hipodiploidi	Çok nadir	Çok Yüksek
B-ALL	t(8;14)(q24;q32) IgH/MYC	B-ALL vakalarının % 5’i	Yüksek
T-ALL	TCR αβ (7q35) ya da TCR γδ (14q11) lokusunu içeren birçok translokasyon	ALL vakalarının % 7’si	Bilinmiyor

2.2.3.4 Sitogenetik Sınıflama

Lösemik hücrelerin biyolojik davranışlarını ve tedaviye duyarlılıklarını belirleyen en önemli faktör, hücrelerin genetik özellikleridir (Tekgündüz ve ark., 2010). ALL’de prognostik ve terapötik anlamı olan pek çok kromozom aberasyonu bildirilmiştir. ALL, ploidi (sayısal bozukluklar) derecesine veya yapısal aberasyonlara göre sınıflandırılmaktadır (Durak, 2006).

2.2.3.4.1 Kromozom sayısal bozuklukları

Sitogenetik veya akım sitometrik olarak ölçülür. Akım sitometresi ile normal ve blast içindeki DNA miktarı ölçülerek birbirine oranlanır. Bu oran 1,16’dan büyük ise hiperdiploidi, 1’den küçük ise hipodiploidi denilir.

Sayısına göre;

Kromozom sayısı 50'den büyük olan ALL: Olguların %25-30'unu oluşturur. En sık 21. kromozomun artışı gözlenir. Trizomi 4, 10 ve 17 olanların, prognozu iyidir.

Kromozom sayısı 47-50 olan ALL: Olguların %10-15'ini oluşturur. Prognoz, hiperdiploide sahip olgulardan daha kötüdür.

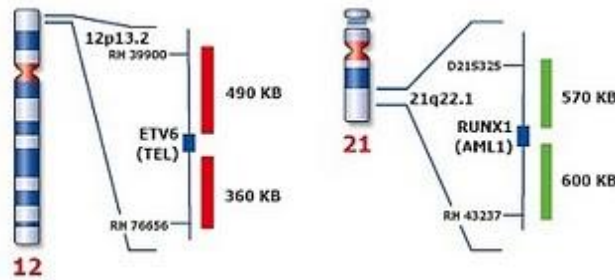
Psödodiploid ALL: Olguların %40'ı bu grupta yer alır (Harrison, 2001). Kromozom sayısı 46'dır ancak yapısal değişiklik saptanabilir. Çoğunda lökosit ve LDH yüksektir. Ancak prognoz, yoğun kemoterapi ile daha iyi olabilir.

Hipodiploid ALL: Erişkin ALL olgularının %4-9'unda görülür. Bu olgularda tanı prekürsör B-ALL'dir. Genetik materyal kaybı ve bu nedenle potansiyel tümör baskılayıcı genlerin olmaması, hipodiploid ALL'de lösemi oluşumunda hastalık modelini açıklayabilmektedir (Durak, 2006). Prognoz kötüdür (Celkan, 2007).

Diploid ALL: %10 sıklıkta saptanır. Prognoz tam olarak belli değildir (Celkan, 2007).

2.2.3.4.2 Kromozom yapısal anomalileri

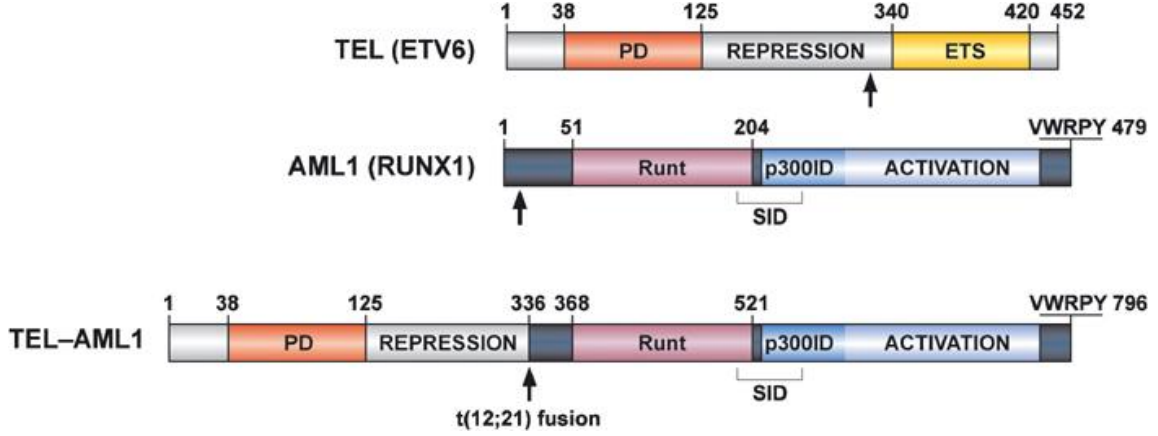
t(12;21)(p12-13;q22): "Translocation ETS Leukemia" olarak tanımlanan TEL geni 12p13'te lokalizedir. E-26 transforme spesifik (ETS) transkripsiyon faktörü ailesinden bir gen olduğu için, ETV6 (ETS varyantı gen 6) olarak da tanımlanmaktadır (<http://www.atlasgeneticsoncology.org>). AML1 geni, 21q22.3'te lokalizedir (Miyoshi et al., 1991). Bu gen RUNX1 olarak da tanımlanmaktadır (Levanon et al., 2001).



Şekil 2.1 TEL ve AML1 bölgelerinin kırılma noktaları (<http://www.funakoshi.co.jp>)

t(12;21)(p13;q22) sonucunda TEL/AML1 (ETV6/RUNX1) füzyon geni oluşmaktadır (Miyoshi et al., 1991). TEL-AML1 füzyon geni, TEL proteinin fonksiyon kaybı veya AML1'in hedef genlerinin kontrolünün bozulmasıyla, ALL oluşumuna yol açmaktadır (Zuna et al., 2004). Çocukluk dönemi ALL'sinde en sık ortaya çıkan, yapısal kromozom anomalisi olduğu görülmüştür. Genellikle bir ila on yaş arasında olan, düşük beyaz kan hücresi sayısına sahip, pre-B ALL fenotipli ve nonhiperdiploidi sayısal kromozom anomalisi görülen

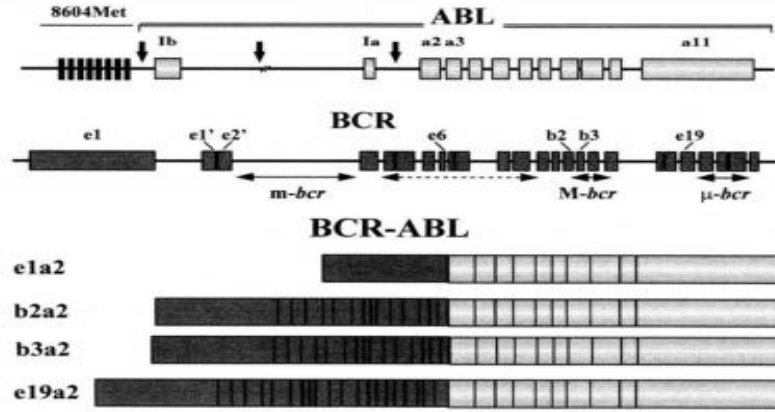
hastalarda ortaya çıkmaktadır (Spathas et al.,1999; Harbott et al.,1997; Woerden et al., 2007). t(12;21), pre B hücreli ALL'lerin %25'inde saptanır.



Şekil 2.2. TEL-AML1 füzyon proteinin oluşumu

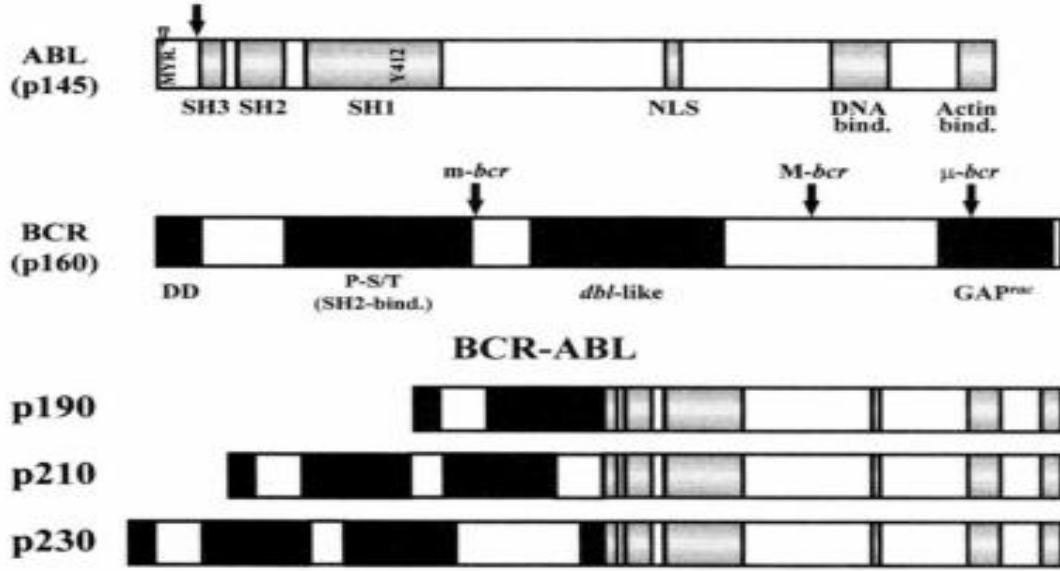
t(9;22)(q34;q11): “Breakpoint Cluster Region” olarak tanımlanan BCR geni, 22q11.2’de lokalizedir (Laurent et al., 2001). Bu protein serin- treoninkinaz aktivitesine sahiptir.

ABL1 geni 9q34.1’de lokalize olmaktadır. Abelson murine lösemi virüsünün transformasyon geni olan v- abl geninin insandaki homologudur (Koleske et al., 2006).



Şekil 2.3. BCR ve ABL nin kırılma noktaları ve oluşan BCR-ABL füzyon proteinini

Üç adet farklı kırık noktası vardır. Ph kromozomu (+) (bcr/abl füzyonu) saptanan ALL olgularının büyük kısmında, kırık noktası exon e1 ile e2 arasında, intron bölgesinde m-bcr (minor breakpoint cluster region) olarak adlandırılan bölgede oluşur. Bu füzyon sonucunda 190 kd ağırlığında protein oluşmaktadır ve “p190 BCR-ABL” olarak tanımlanır. KML’de saptanan füzyon benzer olsada, oluşan ürün farklıdır. ALL’de oluşan 190 kb, KML’deki ise 210 kb’dir (Celkan, 2007).



Şekil 2.4. BCR-ABL'nin 3 farklı kırılma noktası

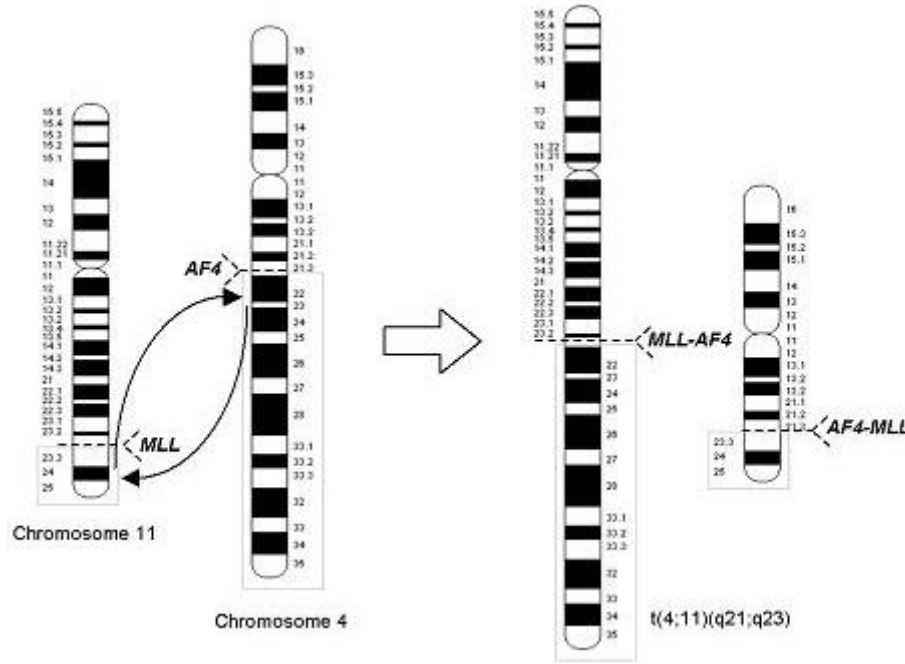
Bu translokasyon 9.kromozomun q34.1 bant bölgesi ile 22. kromozomun q11.2 bant bölgelerinin translokasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır. Oluşan füzyon gene 1973 yılında Rowley tarafından Philadelphia (Ph) kromozomu adı verilmiştir (<http://www.atlasgeneticsoncology.org>; Hotfilder et al., 2005). KML olgularında %90, yetişkin ALL olgularında %20, çocukluk dönemi ALL olgularında ise yaklaşık olarak %5 oranında görülmektedir (Rooney et al., 2001). Çocukluk dönemi ALL'sinde, Ph (+) saptanan olgular da klinik tablo: L1 ya da L2 FAB sınıflandırması, B hücre fenotipi daha çok olmakla beraber T hücre fenotipi, yüksek beyaz kan hücre sayısı, genellikle CD10+, daha az CD19+,CD10- olarak tanımlanmaktadır. Ph kromozomu ile beraber, hastanın diğer özelliklerine (lökosit sayısı, yaşı) bağlı olarakta tedaviye verilen cevapta değişiklik görülse de, çocukluk dönemi ALL olgularında bu kromozom, kötü prognoz göstermektedir (Hotfilder et al., 2005; Arico et al., 2000; Heerema et al., 2004; Dave et al., 2005). Bu yüzden Ph kromozomunun varlığının saptanması çok önemlidir.

11q23 (MLL geni) Anomalileri: "Mixed lineage leukemia" olarak tanımlanan MLL geni 11q23'te lokalizedir (<http://www.atlasgeneticsoncology.org>). Tanı yöntemlerine bağlı olarak, bir yaş altı ALL vakalarında görülme sıklığı %60-80 arasında değişmektedir. Bir yaş üzerinde olan ALL'li olgularda ise, MLL gen yeniden düzenlenmelerinin görülme sıklığı %4,5 ile %7,5 arasında değişme göstermektedir (Cimino et al., 2000; Kowarz et al., 2007).

Akut lösemili diğer olgularla karşılaştırıldığında, özellikle yenidoğanlarda görülen 11q23 anomalileri, kötü prognoz göstermektedir (Felix and Lange, 1999). MLL geninin dahil olduğu

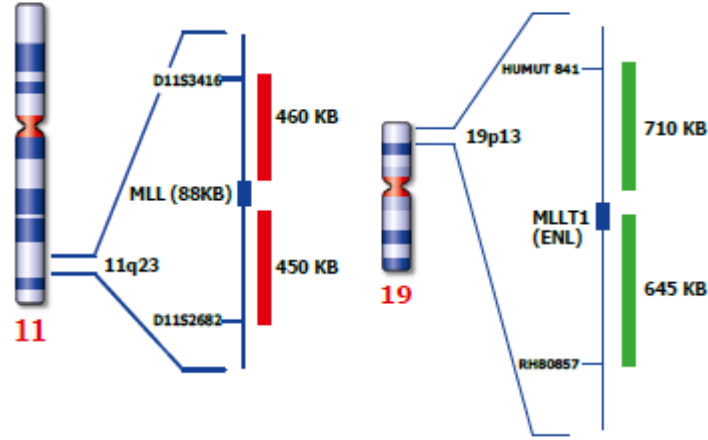
çok sayıda translokasyon bulunmaktadır. Bunların arasında ALL'li olgular arasında en sık saptanan; t(4;11)(q21;q23) ve t(11;19)(q23;p13.3)'dur (Behm et al., 1999).

t(4;11)(q21;q23): AF4 geni 4q21'de lokalizedir. 11. kromozomun q23'te lokalize MLL geni ile translokasyonu sonucu ortaya çıkan hibrid gen, 5' MLL- 3' AF4 yönünde oluşmakta, oniki kd'lik mRNA transkribe olmaktadır (<http://atlasgeneticsoncology.org/>; Kowarz et al., 2007). Bu translokasyon sonucunda, MLL-AF4 füzyon geni oluşur. MLL-AF4 füzyon genini oluşturan t(4;11), süt çocuğu ALL olgularında %50, erişkinlerde ise %5 sıklıkta rastlanır ve kötü prognoz ile ilişkilidir. MLL-AF4 anomalisi CD10 negatif, pro-B ALL ile ilişkilidir ve bu alt grupta %50 sıklıkta t(4;11) izlenir (Tekgündüz ve ark., 2010).



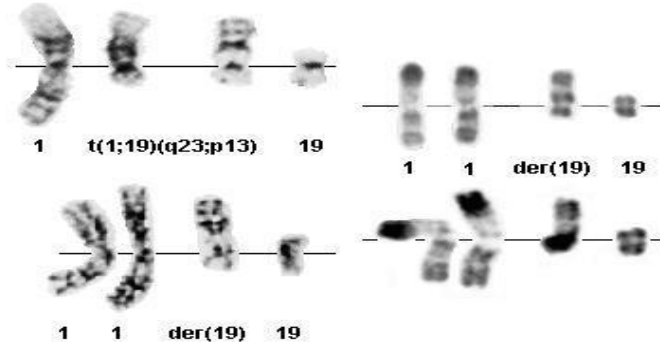
Şekil 2.5. MLL ve AF4 genlerinin kırılma noktaları ve translokasyon sonrası

t(11;19)(q23;p13.3): t(11;19)(q23;p13) translokasyonu sonucu oluşan füzyon geni, MLL-ENL'dir (Yakut ve Gülten, 2005). ENL geni, 19p13.3'de lokalizedir. Lösemik hücreler, B kökenlidir. Genel olarak CD19 pozitifliği ve CD10 negatifliği vardır. Olgularda organomegali, yüksek oranda beyaz kan hücre sayısı, MSS tutulumu görülmektedir (Pekçelen, 2003; <http://atlasgeneticsoncology.org/>). Yenidoğan ALL olgularında, %10 oranında görülen bu translokasyon, klinik ve immünofenotipik özellikleri bakımından t(4;11) ile çok benzerlik göstermektedir (Pekçelen, 2003; Behm et al., 1999).



Şekil 2.6. MLL ve ENL genlerinin kırılma noktaları (<http://www.kreatech.com/>)

t(1;19)(q23;p13): t(1;19), pre B hücreli olguların %25'inde saptanır. Genellikle, tanıda lökosit yüksektir ve yüksek doz MTX verilmediğinde prognoz kötüdür. Bir transkripsiyon faktörü olan 19. kromozomdaki E2A, 1. kromozomdaki bir HOX geni olan PBX1 ile birleşir. HOX genlerinin düzenlediği, gen ekspresyonu bozulur, lösemi oluşur (Celkan, 2007).



Şekil 2.7: t(1;19) kromozom üzerinde gösterimi

MYC gen bozuklukları: t(8;14)(q24;q32), t(2;8)(p12;q24), t(8;22)(q24;q11) saptanır (Celkan, 2007). B hücre kaynaklı ALL'lerde ve Burkitt lenfomada daha sık olmak üzere, olguların yaklaşık olarak %2'sinde görülmektedir. Bu translokasyon, B hücre kaynaklı ALL'lerde, ortalama yaş oranı onbir olan erkek çocuklarında ve ALL L3 morfolojisine sahip hastalarda daha sık ortaya çıkmaktadır (Pekçelen, 2003; Rooney et al., 2001).

2.2.4 Etiyoloji

ALL'nin etiyojisi tam olarak açıklanamasa da, lösemik dönüşümün tek bir olay sonucunda oluşmadığı ve kromozom hasarı, fiziksel ya da kimyasal ajana maruz kalma, virüs

enfeksiyonu gibi etkenlerin rol aldığı, çok basamaklı bir süreç olduğu bilinmektedir (Celkan, 2007).

Patogenez de tek bir mutasyondan daha çok ardışık birkaç mutasyon sonrası oluşan mutant hücrenin çoğalması sorumlu tutulmaktadır. Bu teoriler arasında en fazla destek gören teori, Knudson'un "çift vuruş teorisi"dir. Bu teoriye göre, lösemi gelişimi için iki mutasyon gerçekleşmesi gerekmektedir. İlk mutasyon anne karnında iken, ikinci mutasyon ise postnatal dönemde çevresel faktörlerin (enfeksiyon, radyasyon, toksin, diyet, immün sistemin baskılanması vb.) etkisiyle gerçekleşmektedir. Bu mutasyonların etkisiyle; tümör baskılayıcı genlerde delesyon, hipometilasyon veya mutasyon yoluyla fonksiyon kaybı, protoonkogenlerde ise mutasyon, translokasyon ve amplifikasyon yoluyla fonksiyon kazanımı söz konusudur (Celkan, 2007).

Ataxia telenjiektazi ve Down sendromu gibi kalıtsal hastalıkların lösemiye yatkınlığı arttırdığı bilinmektedir (Kebriaei et al., 2003). Ayrıca folik asit metabolizmasında önemi olan metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) geninde bozukluk sonucunda, kromozom kırıklarının tamir mekanizması bozulmaktadır ve ALL gelişme riskini artmaktadır (Apak, 2006).

Lösemili tek yumurta ikizlerinde yapılan çalışmalar da konkordansın %5 olması, postnatal çevresel hasarın lösemi gelişiminde ne kadar etkili olduğunu göstermektedir. Çevresel etkenlerin başında kimyasal ajanlar, sigara dumanı, elektromagnetik alan, radyasyon ve enfeksiyöz ajanlar gelmektedir (Bassan et al., 2004; Belson et al., 2007; Ryan et al., 2008).

2.2.5 Tanı

2.2.5.1 Klinik Tanı

Akut lösemnin en önemli klinik belirti ve bulguları, kemik iliğinin ya da diğer organların lösemik hücrelerce infiltrasyonu, normal hematopoezin ve etkilenen organ fonksiyonlarının bozulmasıyla ortaya çıkar. Hastalık ALL'li çocuklarda, genellikle herhangi bir belirti olmadan, birdenbire ağır bir klinik tablo şeklinde başlayabilir.

Yorgunluk, spontan kanama, halsizlik, uyku hali, kilo kaybı, ateş ve gece terlemesi gibi belirtiler gözlenmektedir. Nadiren asimetrik artrit, bel ağrısı, diffüz osteopeni veya litik kemik lezyonları görülmektedir. Çocuklarda bu belirtiler, erişkinlere oranla daha sık gözlenmektedir. Küçük çocuklarda kemik ağrısına bağlı yürüme zorluğu gelişebilmektedir (Aydın ve ark., 2005; Bassan et al., 2004; Celkan, 2007).

Fizik muayenede solgunluk, lenfadenopati, hepatosplenomegali, trombositopeninin neden olduğu diş eti ve burun kanaması, peteşi, ekimoz görülebilmektedir (Kebriaei et al., 2003). Karaciğer ve dalak büyüklüğü, lenfadenomegali her zaman olmayabilir. Sistemik bir hastalık olduğu için, her sistemle ilgili yakınma ve bulgu olabilir.

Çocuklarda merkezi sinir sistemi (MSS) tutulumu %4 oranında tespit edilmektedir.

Testislerin ağrısız büyümesi ile karakterize testis tutulumu, erkek lösemi hastalarının %10'undan azında görülmektedir (Apak, 2006).

2.2.5.2 Laboratuvar Bulguları

Tıbbi hikâye ve fizik muayene tamamlandıktan sonra tanının doğrulanması, prognostik sınıflamanın yapılabilmesi ve uygun tedavi planının belirlenmesi amacı ile diagnostik laboratuvar testleri yapılmalıdır.

Başlangıç olarak, tam kan sayımı ve periferik yayma yapılmalıdır. Hemoglobün değeri sıklıkla, hafif ya da orta derecede düşüktür. Lökosit sayısı artmış, azalmış ya da normal olabilir. Hastaların %92'sinde trombosit sayısı azalmıştır. Periferik kan yaymasında blastlar görülebilir.

Her lösemi düşünülen olguda, kemik iliği aspirasyonu (KİA) yapılması gerekir. Periferik kan yaymasındaki blastlar, bazen kemik iliğinde saptananlardan farklı olabilir. Hücre tipini, kemik iliğinden belirlemek uygundur. Kemik iliğinde beşten fazla blast saptanması patolojiktir. Ancak non-Hodgkin lenfoma (NHL) ve lösemi, kemik iliğindeki blast sayısına göre belirlenir. Kemik iliğinde blast sayısı yirmibeşten fazla ise lösemi, daha az ise NHL, kemik iliği tutulumu veya miyelodisplaziden bahsedilir. ALL'de kemik iliğindeki blast sayısı, genellikle altmıştan fazla olarak saptanır. Kemik iliğinden ayrıca histokimyasal boyalar, hücre tipini belirlemek için immünofenotipleme ve genetik inceleme yapılmalıdır (Celkan, 2007).

Göğüs radyogramlarında, mediastinal kitle veya plevral mayi saptanabilir. Mediasten kitesinin varlığını araştırmak için her olguda göğüs grafisi çekilir. Kitle varlığı, T hücre tipini destekler (Kutaniş, 2005; Celkan, 2007).

MSS tutulumunu tespit etmek için lomber ponksiyon ile alınan beyin omurilik sıvısında (BOS), blast varlığına bakılmaktadır. Çocuk Kanser Grubu tarafından yapılan değerlendirmeye göre BOS'ta lökosit sayısı beşten fazla ise MSS tutulumunun var olduğu kabul edilmektedir (Bassan et al., 2004).

Ayrıca kemik grafileri, koagülasyon profili, kardiyak fonksiyonların belirlenmesi, kan biyokimyası (elektrolitler, üre, kreatinin, ürik asit, fosfor, karaciğer enzimleri vs.), enfeksiyon profili (hepatit işaretleyicileri gibi) ve immünolojik tarama (immünglobulinler gibi) tanı anında yapılması gereken diğer incelemelerdir (Celkan, 2007).

2.2.6 Prognostik Faktörler

Lenfoblastların klonal çoğalması sonucu gelişen ALL, çok sayıda biyolojik alt tipi içeren oldukça heterojen bir hastalıktır. Benzer tedaviler ile bütün ALL hastalarında aynı sonuçlar alınmamaktadır, bu nedenle tedavi öncesi prognostik faktörler kullanılarak risk gruplarının belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Yaş, lökosit sayısı, immünolojik alt tipler ve bazı sitogenetik bozukluklar ALL'de sıklıkla kullanılan prognostik faktörlerdir. Minimal rezidüel hastalık değerlendirmesi ve yeni gen lezyonların tespitini sağlayan daha güvenilir immünolojik ve moleküler tekniklerin geliştirilmesi ile ALL hastalarının prognostik değerlendirmesi ve risk gruplaması daha iyi yapılabilmektedir (Tekgündüz ve ark., 2010).

2.2.6.1 Yaş

ALL'deki prognostik faktörlerin belki de en önemlisi, yaştır (Rowe, 2010). ALL hastalarının yaşı, klinik sonuçlarıyla ilişkisi bakımından oldukça önemlidir. Çocukluk çağı ALL'sinde, bebekler ve ergenler, 1-10 yaş hastalarına göre daha kötü prognoza sahiptir. 1-10 yaş arasındaki ALL hastalarında, TEL/AML1 ve yüksek hiperdiploidi daha çok gözlemlendiğinden bu hastaların, bebek ve ergenlere göre prognozu daha iyidir (Silverman, 2010).

ALL'nin prognozu ve tedavi yaklaşımı açısından, çocuk-erişkin ile genç-erişkin grubu ayıracak sınırlar belirsizdir. Pediatrik ALL protokollerinde, 0-15, 0-18 ve 0-21 yaş aralığı, çocuk grubu içinde ele alınmakta iken, erişkin tedavi protokolleri ise 12-60, 15-65, 16-59 yaş aralığında hastaları içermektedir (Tekgündüz ve ark., 2010). Günümüzde en kötü prognoz, bir yaş altında olduğu, hastalığın bu yaş grubunda yüksek blast yükü, t(4;11) pozitifliği ve CD10 negatifliği gibi belli biyolojik özellikler taşıdığı görülmektedir (Chen et al.,1993; Crist et al., 1988; Chessells et al., 2002).

On yaş üzeri grupta da prognoz kötü olup, BCR/ABL füzyonu ve tanıda lökositöz gibi bazı olumsuz faktörler sıktır (Crist et al.,1988).

2.2.6.2 Lökosit Sayısı

Yaş ile birlikte, ilk periferik kandaki lökosit sayısı, çocukluk çağı ALL'lerinde ilk tanımlanan prognostik faktörlerdendir (Silverman, 2010). Yüksek olan olgularda prognoz kötüdür. Üst sınır Berlin-Frankfurt-Münih (BFM) protokollerinde $20000/\text{mm}^3$, Amerikan protokollerinde ise $50000/\text{mm}^3$ alınır (Celkan, 2007).

2.2.6.3 Malnutrisyon

Bazı çalışmalarda nutrisyonel durumun önemli bir prognostik faktör olduğu bildirilmiştir. Malnutrisyonlu çocukların, kemoterapiyi daha zor tolere ettiği ve daha az dozda alabildiği bu sebeple, prognozun daha kötü olduğu belirtilmektedir (Mutlu, 2005).

2.2.6.4 İmmünofenotip

Çocukluk çağı ALL hastalarının %80-85'i B hücreli lenfoblastik fenotip, %10-15'i T hücreli fenotiptir (Silverman, 2010). Pre B hücreli lösemilerde, prognoz daha iyidir. T hücrelilerde kötüdür. Olgun B hücreli lösemilerde, NHL tipi tedavi ile prognoz daha iyi düzeye ulaşmıştır (Celkan, 2007).

2.2.6.5 Genetik Özellikler

Kromozomal sayısal düzensizlikler ve translokasyonlar genelde çocukluk çağı lösemilerinin başlangıcındaki olaylardır ya da hastalığın oluşmasını sağlayan ilk olaylardır. Çocukluk çağı lösemilerine özgü spesifik genetik değişiklikler, hastalığın tanısı ve tedaviye yanıtın izlenmesi açısından oldukça önemlidir. Bu genetik değişiklikler, aynı zamanda hastalığın prognozu açısından da önemli bir gösterge oluşturmaktadır (Yakut ve Gülten, 2005).

Hipodiploidi, MLL, t(9;22), (1;19) kötü prognozu belirler. Hiperdiploidi, trizomi 4, 10, 17 ve t(12;21) de ise, prognoz iyidir (Celkan, 2007; Silverman, 2010).

Çizelge 2.5 . Kromozomal bozuklukların prognozla ilişkisi (Celkan,2007)

Kromozon anomalisi	5 yıllık yaşam şansı
>50	%80
47-50	%90
66-73	? iyi
82-94	? <%60
Normal diploid 46 kromozom	%80
<46	%71
Psödodiploid	%73
t(1,19) Yoğun ted (-)	%53
t(4,11)	%45
t(9,22)	%14

2.2.6.6 Cinsiyet

Prognozun genel olarak kızlar da, erkeklere göre daha iyi olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bazı protokollerde erkeklere daha yoğun veya daha uzun tedavi verilebilmektedir. Bu durum testiküler nüksün ve T lenfosit kökenli hastalık oranının, erkeklerde sık görülmesinden kaynaklanmaktadır (Hammond et al., 1986; Tekgündüz ve ark., 2010).

2.2.6.7 Tedaviye Erken Yanıt

En önemli prognostik göstergedir. Steroid yanıtı, sekizinci gün periferik kan yaymasında blast sayısı, yedinci, onbeşinci ve otuzüçüncü gün kemik iliği blast oranları tedavi yanıtı açısından önemli ipuçlarıdır. Kemik iliği, blast sayısına göre M1: % 5'den az blast sayısı, M2: %5'den fazla, %25 veya %25'den az, M3: %25'den fazla olarak tanımlanır. M3'ün prognozu M2'den, M2'nin prognozu da M1'den daha kötüdür (Celkan, 2007).

2.2.6.8 Merkezi Sinir Sistemi Tutulumu

Tanı sırasında MSS tutulumu varsa prognoz, radyoterapi ve daha yoğun intratekal tedavilere rağmen kötüdür (Celkan, 2007).

2.2.7 Tedavi

ALL, her yaşta görülebilen, çocukluk yaş grubunda kemoterapiye iyi yanıt veren bir lösemi türüdür. Son iki ila üç dekatta, mevcut tedavi yaklaşımları ile ALL'li çocukların büyük bir bölümü ve erişkin hastaların bir kısmı başarılı bir şekilde tedavi edilebilmektedir (Tiftik ve ark., 2000). Akut lenfoblastik lösemilerde tedavi esas olarak supportif bakım, kemoterapi, kemik iliği nakli ve diğer (immünoterapi, biyoterapi) tedavi yaklaşımlarından oluşmaktadır (Mutlu, 2005).

2.2.7.1 Supportif Bakım (Destekleyici Tedavi):

Tanı sırasında hastaların genellikle enfeksiyonu, kanaması, anemisi, bozuk böbrek ve karaciğer fonksiyonları vardır. Hastalardan tanı konulunca hemen elektrolitler, üre, ürik asit, kreatinin, kalsiyum, fosfor ve olası enfeksiyonları saptamak amacı ile kan, idrar kültürleri alınmalıdır. Bu amaçla hastalara ağrı, kanama ve enfeksiyon tedavileri uygulanmaktadır.

2.2.7.2 Kemoterapi

ALL, her yaşta görülebilen, çocukluk yaş grubunda kemoterapiye iyi yanıt veren bir lösemi türüdür. ALL hastaları, teşhisten hemen sonra kemoterapiye başlamalıdır. Temel amaç kanda veya ilikte hiç lösemik blast hücreleri kanıtı olmayan remisyona ulaştırmak, normal kan hücreleri oluşumunu geri getirmek ve kan hücreleri sayısını normal düzeyine döndürmektir (<http://www.hematology.org/>). Tedavi de hangi ilaçların kullanılacağı hastanın yaşına, kanda bulunan lösemi hücrelerinin sayısına ve tipine bağlı olarak belirlenir. Kemoterapötik ilaçlar, lösemik hücrelerin çoğalmasını engelleyerek, öldürür. Fakat kemoterapi sağlıklı hücrelerin ölümüne de yol açabilir. Bu nedenle, ALL hastalarında yan etki olarak bulantı, halsizlik, yüksek enfeksiyon riski görülebilir (Tiftik ve ark., 2000).

2.2.7.2.1 İndüksiyon Tedavisi

İndüksiyon tedavisi terimi, tedavinin başlangıç evresi için kullanılır. Kullanılan özellikli ilaçlar, kullanım ve veriliş zamanları hastanın yaşı, lösemnin belirli özellikleri ve hastanın genel sağlık durumu gibi bazı faktörlere bağlıdır. Bazı ilaçlar karıştırılabilir (<http://www.hematology.org/>). Tedavi ortalama dört ila altı hafta sürer. Arkasından remisyon değerlendirmesi için kemik iliği alınır. Kemik iliğinde, blast sayısı %5'den az olması amaçlanır. Tam remisyon için ayrıca kan tablosu normal sınırlara ulaşmalıdır. Tedavinin bu döneminde kortizon, vinkristin, antrasiklin ve L-asparaginaz kullanılır. Tüm bu ilaçların kullanılmasına rağmen, %2 olguda remisyon sağlanamayabilir. Yine bu dönem hastaların tedavi komplikasyonları ve enfeksiyonlardan dolayı en sık kaybedildiği dönemdir (Celkan, 2007).

2.2.7.2.2 Santral Sinir Sistemi Profilaksisi

ALL hücreleri, genellikle “meninksler” olarak adlandırılan beyin ya da omurilik zarlarında toplanırlar. Tedavi edilmezlerse meninksler lösemi hücrelerini barındırabilir ve böylece bu bölgede yineleme görülür. Bu nedenden dolayı “merkezi sinir sistemi profilaksisi” olarak adlandırılan tedavi, bu bölgelerde de uygulanır. Tedavi methotrexate gibi ilaçların

spinal kolona enjekte edilmesinden, ya da X ışınlarıyla merkezi sinir sisteminin kaplanmasıdır. Bazen iki tedavi yöntemi de kullanılır (<http://www.hematology.org/>).

2.2.7.2.3 Güçlendirme Tedavisi

Tedavinin bu bölümünün amacı, saptanabilen blastların temizlendiğini varsayarak ortalama dört aylık bir tedaviden sonra, saklı kalabilen tüm blastları temizleyerek olası nüksü engellemektir (Celkan, 2007). Tam remisyonu takiben uygulamaya başlanır. Rezidü blastların ortadan kaldırılması amaçlanır. İndüksiyondaki ilaçlarla, çapraz direnç oluşturmeyen ilaçlar kullanılarak yapılır (Neimenger and Sallan, 1993). Dikkat edilmesi gereken ortalama altı aylık bir tedavi sonrasında hastanın febril nötropeniden kaybedilmemesidir.

2.2.7.2.4 İdame Tedavisi

Remisyon elde edildikten ve MSS profilaksisinden sonra tedaviye devam edilmezse hastalık kısa süre içinde nükseder. Bu nedenle, remisyon sağlandıktan sonra nüksleri önlemek ve dolayısıyla remisyon süresini uzatmak için yoğun konsolidasyon tedavileri ile birlikte ayrıca düşük dozda antilösemik ajanlarla idame kemoterapisi uygulanır (Kurt ve Çetinkaya, 2006). İdame tedavisi, ALL tedavi sürecindeki en uzun fazlardandır ve genellikle devamlı tam remisyon sağlanması için, iki ila üç yıl kadar devam edebilir (Seibel, 2008).

2.2.7.2.5 Kemik İliği Transplantasyonu (Kit)

Hematopoetik kök hücre transplantasyonu (HKHT), malign ve malign olmayan hastalıklarda, üç dekattan daha fazla süredir tedavi yaklaşımlarından biridir. HKHT, kök hücre kaynağı olarak kemik iliği, periferik kan ya da kordon kanı kullanılarak elde edilen kök hücrelerin, çoğu zaman hazırlayıcı bir rejim uygulaması sonrasında, bazen de direkt olarak, hastaya intravenöz olarak verilmesiyle gerçekleştirilmektedir. HKHT, bir vericiden alınan hematopoetik kök hücrelerin (HKH), bir alıcıya verilmesi işlemidir. HKH, üç çeşit kan hücresine (eritrositler, lökositler ve trombositler) de farklılaşma özelliğine sahiptir. HKHT, otolog ya da allojeneik olabilir (Hazar, 2008).

Otolog HKHT: Bu transplantasyon yönteminde kullanılan kök hücreler, hastanın kendi kemik iliği ya da periferik kanından elde edilir. Toplanan hücreler, olası tümörden ayıklama işleminden (purging) geçirilebilir ve dondurularak saklanır. Daha sonra olguya kemik iliğini yok eden hazırlayıcı rejim (kemoterapi ve/veya radyoterapi) uygulanır. Ardından, daha önce alınıp dondurulmuş kök hücreler eritilerek damar yoluyla olguya geri verilir. Hazırlayıcı rejim,

alıcıda kalan tümör hücrelerini ortadan kaldırmak amacı ile kullanılır. Verilen kök hücrelerin alıcıya uyum sağlayıp, fonksiyona başlaması için yaklaşık üç ila altı hafta geçer

Allojeneik HKHT: Bu tedavi yaklaşımında kök hücreler, alıcı ile HLA açısından uyumlu bir vericinin periferik kanından, kemik iliğinden ya da göbük kordon kanından elde edilir. Daha sonra olguya kemik iliğini yok eden hazırlayıcı rejim (kemoterapi ve/veya radyoterapi) uygulanıp ardından kök hücreler verilir. Hazırlayıcı rejim, alıcıda kalan tümör hücrelerini ortadan kaldırmak ve vericiden gelen hücrelere karşı alıcının immün yanıtını baskılamak amacı ile kullanılır. Allojeneik transplantasyon da, otolog transplantasyonun aksine, toplanan kök hücrelerle, olası bir tümör hücrelerinden bulaşma riski yoktur (Hazar, 2008).

Tam remisyon bir de, ALL tanılı hastalarda HKHT endikasyonu, olguların %8-10'unu oluşturan yüksek riskli ALL hastaları için geçerlidir. Birçok çalışma grubu verilerine göre, bu grup hastaların olaysız sağkalım hızları %50'den daha düşüktür. HKHT'nun yararlı olacağını gösteren risk faktörleri, bazı moleküler biyolojik belirteçler (minimal rezidüel hastalık gibi) ya da kromozomal değişiklikler (t(9;22), t(4;11) gibi), kötü prednisolon yanıtı ve başlangıç tedavisine dirençtir. Erken kemik iliği relapsı gelişen hastaların, başlangıçta konvansiyonel kemoterapiye yanıtları iyi olmasına karşın, kısa sürede progressif hastalık gelişmesi nedeniyle, prognozları kötüdür. Bu hastalarda tam remisyon iki de, tam uyumlu kardeş donör (MSD) ya da iyi uyumlu akraba dışı donör (MUD) allojeneik HKHT endikasyonu vardır. Bu donörler bulunamazsa alternatif olarak, kord kanı, tam uyumlu olmayan akraba dışı donör (MMUD) ya da haploidentik aile içi donör kullanılabilir. Otolog HKHT endikasyonu, geç kemik iliği relapsı ya da ekstramedüller relaps gelişen hastalar için önerilebilir.

Allojenik kök hücre nakli yapılan ALL'li hastalarda, beş yıllık sağkalım yaklaşık %50 olarak bildirilmektedir. Otolog nakilde ölüm riski, allojenik nakile göre daha azdır fakat hastalığın nüks etme riski fazladır

2.3 Hematolojik Malignitelerde Genetik Tanı Yöntemleri

2.3.1 Sitogenetik Yöntemler

Sitogenetik yöntemler, genetik hastalıkların prenatal ve postnatal tanısında, kanser rutin çalışmalarında ve temel tıp araştırmalarında sık kullanılan önemli bir tanı yöntemidir. Geliştirilen yeni sitogenetik analiz yöntemlerinin hematolojik malignitelerde kullanımı, bu hastalıkların etiopatolojisinin anlaşılmasında çok önemli bulgular vermiştir (Güran, 2005).

Son yıllarda, lösemi hastalarının hayatta kalma sürelerinde ilerlemeler olmasına rağmen hastaların önemli bir kısmı lösemiye direnç, relaps ve/veya kemoterapinin şiddetli erken toksik etkisi nedeniyle ölmektedirler. Ayrıca pek çok hasta kemo ve radyoterapinin geç ortaya çıkan yan etkileriyle mücadele etmekte ve hayat kaliteleri düşmektedir. Ortak olarak kullanılan klinik, hematolojik ve immunolojik prognostik faktörlere ilave olarak karyotip analizinin, çocukluk çağı ALL'sinde, diğerlerinden bağımsız olan bir prognostik değeri olduğu kanıtlanmıştır. Kötü prognoz belirtisi olan, özel translokasyonlar (BCR-ABL, MLL-AF4) tedavinin seçiminde belirleyici olarak kullanılmaktadırlar. Tedavi protokollerinde yer almıyor olsa da hiperdiploidi veya TEL/AML1 yeniden düzenlenmesi iyi prognoz belirtisidir ve karyotipi normal hastalarla aynı tedavi protokolünü görmekte olup, bunlara özel, düşük risk protokolü uygulanmamaktadır. Karyotip ve FISH sonuçları hastaların prognozu hakkında önemli bilgiler vermektedir. Bu nedenle en doğru ve etkili yöntemi kullanarak genetik sonuca ulaşmak, lösemi hastalarının tedavi protokollerinin belirlenmesinde önem taşımaktadır (Soysal ve ark., 2009).

Lösemilerde örnek, genellikle kemik iliği aspirasyon materyalinden elde edilir. Eğer kemik iliği aspirasyon materyali elde edilemezse, kemik iliği biyopsi materyali de kullanılabilir. Beyaz hücre sayısı 10000/ml'den fazla, immatür miyeloid ve lenfoid hücre oranı %10'dan fazla olan olgularda periferik kan hücresinden de sitogenetik çalışma yapılabilir (Pala, 2005).

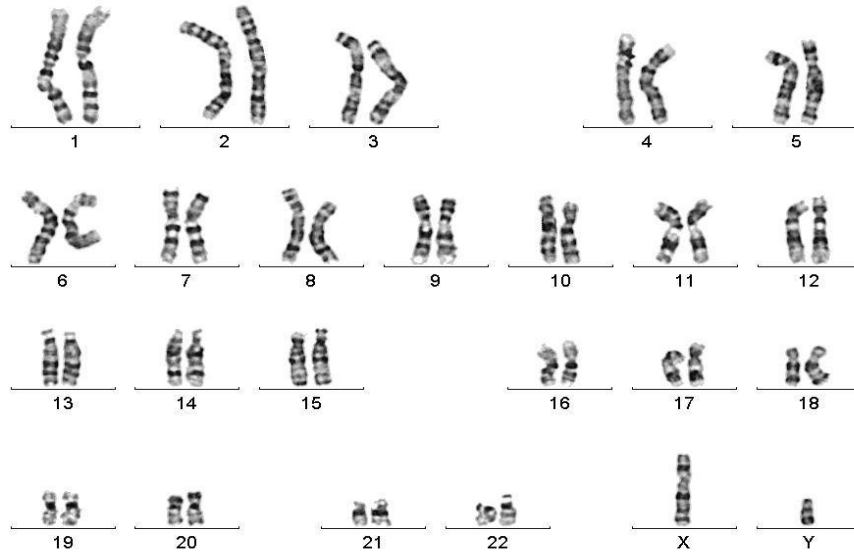
Kromozom İnceleme Yöntemleri

- **Floresans bantlama yöntemi:** Çoğunlukla "Quinacrine" kullanılır. Özellikle 1, 9, 16 numaralı kromozomların sentromerik ve akrosentrik bölgeleri ve Y kromozomunun polimorfik varyasyonları gözlenir.



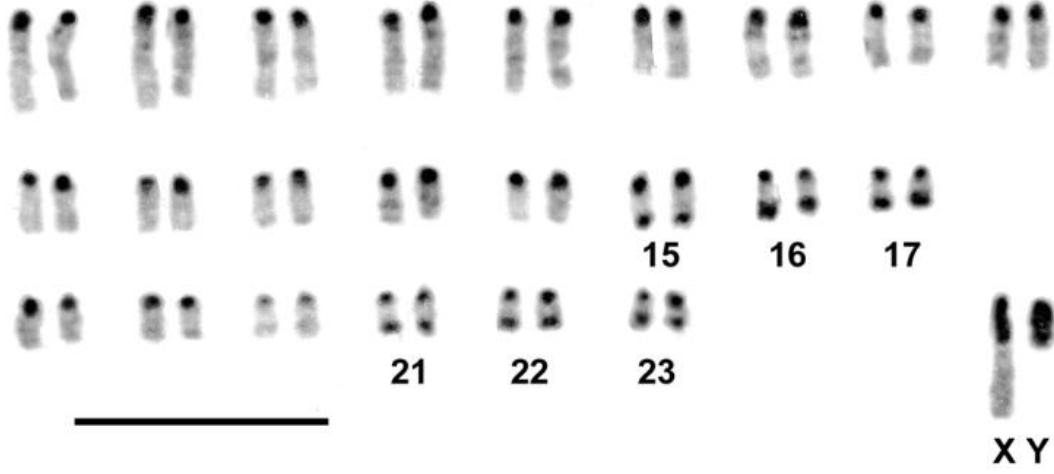
Şekil 2.8. Q bantlama

- **Giemza bantlama:** En sık kullanılan yöntemdir. Kromozomların, elde edilen bant özelliklerine göre, hem fonksiyonel hem de yapısal kompozisyonu yansıtılmaktadır.



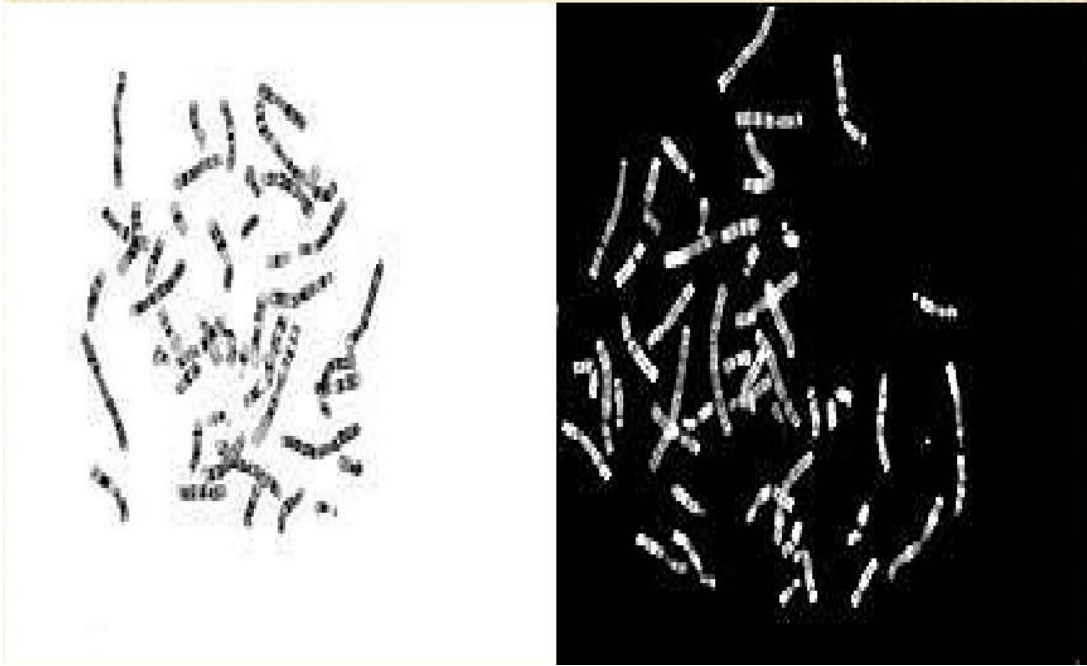
Şekil 2.9. G Bantlama

- **Konstitif heterokromatin bantlama:** C bantlama da denir. Çünkü satellit DNA'sı insitu hibridizasyon ile koyu boyanan C bant bölgelerini göstermektedir.



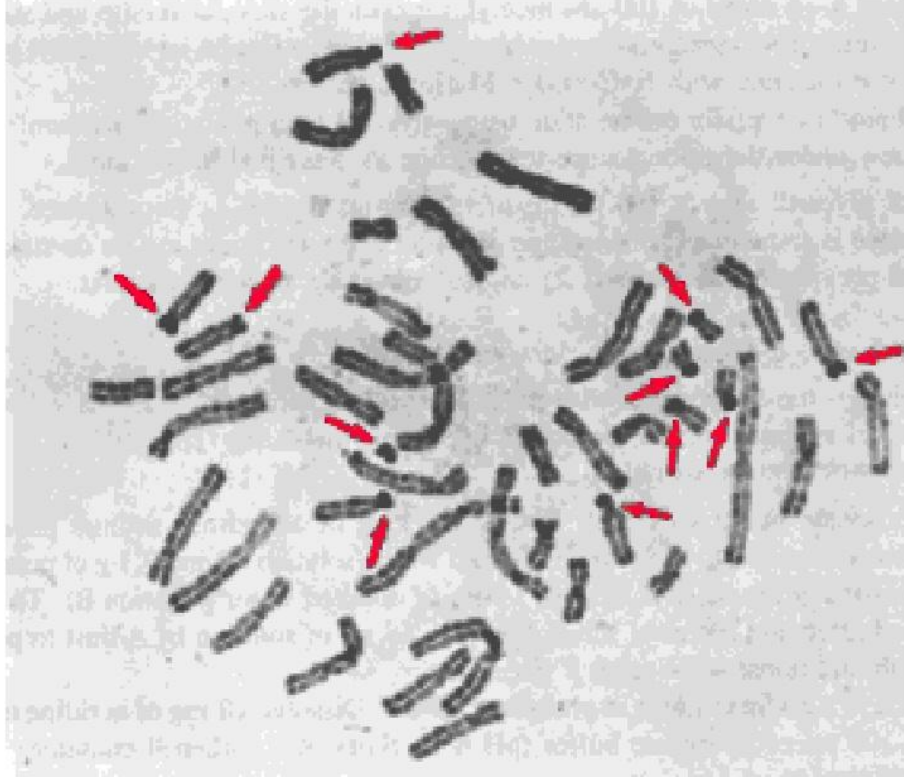
Şekil 2.10. C bantlama

- **Reverse bantlama:** G bantlama ile koyu boyanan bölgeler açık, açık boyanan bölgeler koyu boyanır.



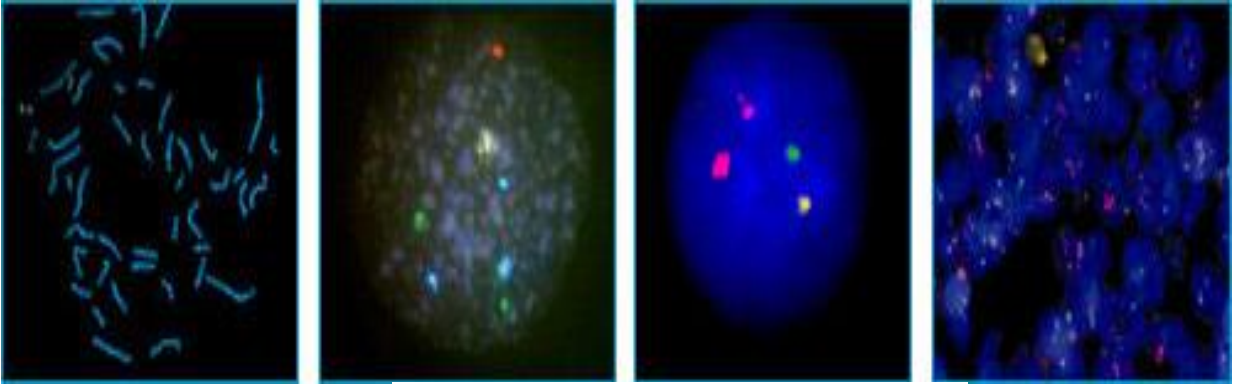
Şekil 2.11. G ve R bantlama

- **NOR(Nucleator organizier region) boyama:** Gümüş ile özel boyama yöntemidir. Gümüş boyama ile akrosentrik kromozomların kısa kollarını boyayarak, belirginleştirir.



Şekil 2.12. NOR bantlama

- **Floresan In situ hibridizasyon (FISH):** Bu yöntem denatüre haldeki kromozomlara floresan ile işaretlenmiş problemlerin bağlanmasına bağlı bir yöntemdir. Bu teknik ile birçok gen veya kromozom bölgesi ile ilgili bilgi elde edilebilmektedir (Güran, 2006).



Şekil 2.13. Floresan in situ hibridizasyon (FISH) tekniği

Klasik bantlama yöntemlerinde analizi yapılan materyalin metafaz hücresi olması, lösemi olgularında yeterli ve kaliteli metafaz elde edilememesi araştırmacıları yeni teknikler geliştirmeye itmiştir. Hem interfaz hem de metafaz hücrelerinde analize olanak sağlayan FISH yöntemi ve tüm genomdaki aberasyonları aynı anda taramaya olanak sağlayan aCGH yöntemi

son yıllarda kromozomal aberasyonların analizinde uygulanan konvansiyonel sitogenetik yöntemlere alternatif olarak gösterilmeye başlanmıştır.

2.3.2 Real Time PCR Yöntemi

Araştırmacıların, bir milyar kattan daha fazla DNA'nın belirli parçalarını çoğaltmaya olanak sağlayan PCR'in devrimci metodu "real time PCR", 1980'lerde Kary Mullis tarafından keşfedilmiştir (Valasek and Repa, 2005). Gen anlatımının analizini değiştiren bu metod ile geleneksel PCR yöntemi ve gen analizi birleştirilmiştir. PCR çoğaltımını görünür hale getiren ve monitörize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir. Birçok isimlendirilme yapılan bu teknoloji, yabancı yayınlarda "kinetik PCR", "homojen PCR", "kantitatif real time PCR" gibi çeşitli adlarla da isimlendirilmektedir.

Kantitatif real time PCR (Q-RT-PCR) sayesinde kanser çalışmalarının farklı alanlarında, gen anlatımını sayısal bir değer olarak ölçmek mümkün olmaktadır (Sayitoğlu, 2005). Ayrıca biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme ve mRNA'nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilme en çok kullanılan alanlarını oluşturmaktadır. Bu amaçlarla kullanımının yanı sıra tek nokta mutasyonlarını belirleme, patojen belirleme, DNA hasarı belirleme, metilasyon tespiti, SNP analizi, kromozom bozukluklarının tespiti gibi çalışmalarda da kullanım alanları mevcuttur (Günel, 2007).

Q-RT-PCR'in, füzyon genlerinin eksprese ettiği transkriptlerin saptanmasında gerek sitogenetik, gerekse moleküler sitogenetik (FISH) yöntemlere göre üstün yönleri vardır. Bu üstünlüğün nedeni bir milyon hücreden bir tanesindeki değişimi bile saptama olanağına sahip olmasıdır. Kromozomal kaynaklı sayı ve yapı kusurlarının yanı sıra, çocukluk çağı lösemilerinde, özellikle bazı tümör süpresör genlerinde oluşan delesyon ya da mutasyonlar da görülmektedir. Bunlar başlıca p53, p19, p16 ve BCL-2 genlerinde görülmektedir. Örneğin; p16 tümör süpresör genindeki homozigot delesyonun karsinogenik sürecin erken aşamalarında rol aldığı ve ALL'lerde kötü prognoz ile uyumlu olduğu bilinmektedir (Yakut ve Gülten, 2005).

DNA amplifikasyon ilerlemesini, Q-RT-PCR, gerçek zamanlı olarak izlemeye olanak sağlamaktadır. Bu özel kimyasallar ve probalar tarafından gerçekleştirilir. Genellikle, PCR içindeki kimyasallar, özel floresan probalar içerir. Bu probalar "Özgül Floresan İşaretli Probalr" ((FRET) Fluorescence Resonance EnergyTransfer), Taqman, Molecular Beacons, Scorpion

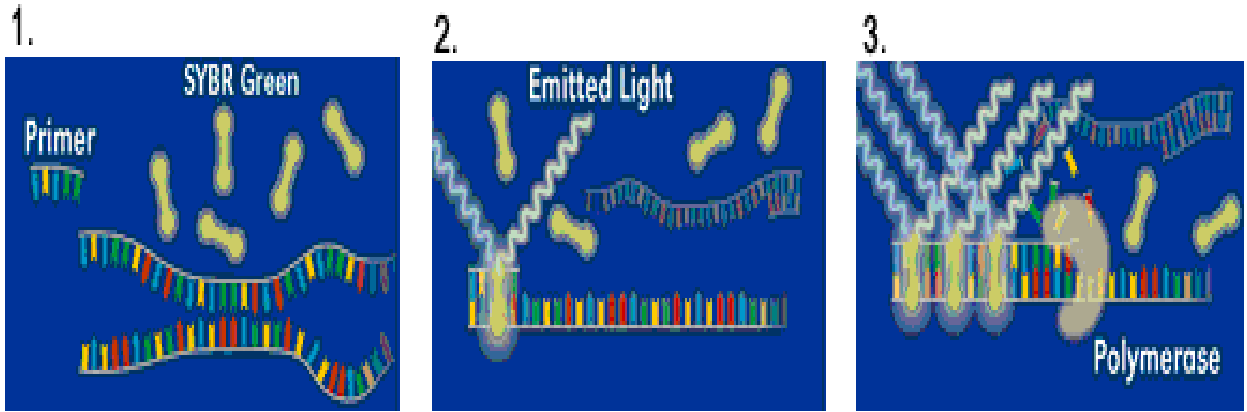
Primerleri, Hibridizasyon Problemleri) ve “Özgül Olmayan Floresan İşaretli Problemler” (Syber Green I, Etidyum Bromid) olmak üzere ikiye ayrılır (Sayitoğlu, 2005; Valasek and Repa, 2005).

2.3.2.1 Özgül Olmayan Belirleme Sistemi

SYBR Green I: Spesifik olmayan çift zincirli DNA'nın çoğaltımında “SYBR Green I” yöntemi kullanılır. Bu yöntemde kullanılan floresan boya sadece çift zincirli DNA'ya bağlandığından, çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel olarak real time PCR cihazında okunan floresanın miktarı da eş zamanlı olarak artar. “SYBR Green I” en fazla kullanılan boya çeşitidir.

Çoğaltımın başında, reaksiyon karışımında çift zincirli DNA molekülü, primerler ve “SYBR Green I” boyası bulunmaktadır. Bağlı olmayan serbest DNA molekülü çok az bir floresan ışığa yapar. Primerler bağlanıp uzama başladığında boya molekülü çift zincirli DNA'nın arasına girer ve floresan yayılımı başlar. Başlangıçtaki döngü boyunca sinyal zayıftır; ürün miktarı arttıkça floresan miktarı hızla artar ve bu artış cihazın monitöründen izlenebilir.

Bu yöntem optimize edilmiş PCR şartlarında ve dizaynı iyi yapılmış primerler ile çok fazla sayıda hedef genin çoğaltılmasına olanak verir (Günel, 2007).

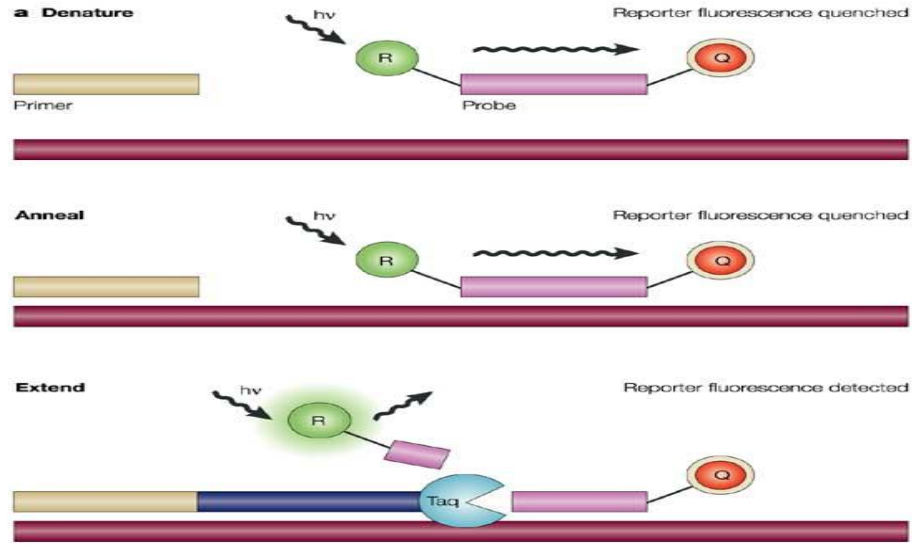


Şekil 2.14. Syber Green 1 yöntemi (<http://www.dkfz.de/gpcf/lightcycler480.html>)

2.3.2.2 Özgül Belirleme Sistemi

DNA parçasının çoğaltılmak istenilen bölgesi, özel bir bölge ise bu bölgenin saptanmasında floresan işaretli problemler kullanılır. Bu tekniklerin başında “TaqMan” prob, “Molecular Beacon”, “Light-up” prob, hibridizasyon prob ve “Scorpion” primer gibi floresan işaretli problemler kullanılarak yapılanlardır.

“TaqMan® Probe” yöntemi: Taqman sisteminde, 5’ ve 3’ uçlarından florokrom maddelerle işaretli, prob kullanılmaktadır. Probun 5’ ucunda raportör florokrom, 3’ ucunda ise baskılayıcı florokrom bulunmaktadır. Prob, tek sarmal hale getirilen hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Prob-hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece, raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3’ uçtaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması, probun bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için Taq DNA polimeraz enzimi 5’ →3’ nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5’ uçtan yıkmaya başlar. Böylece raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. Her siklusta üretilen amplicon miktarına paralel olarak sinyal şiddeti artmaktadır (Durmaz, 2001).

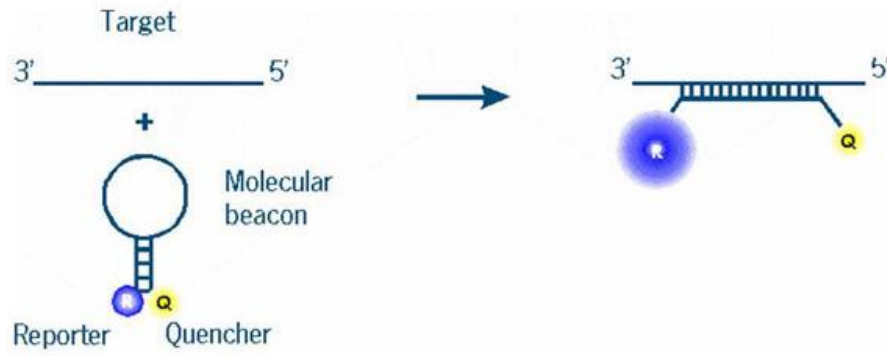


Şekil 2.15. “TaqMan® Probe” Yöntemi

“TagMan® Probe” yönteminde mutasyon tespiti ile birlikte sayısal değerlere de ulaşılabildiğinden araştırmacılar için avantaj sağlar. Bu yöntem standart bir protokolü, kolay bir dizaynı ve çok az bir optimizasyonla gerçekleştiği için hem allelik diskriminasyon hem de ekspresyon profilinin çıkartılmasında kolaylıkla kullanılır (Günel, 2007).

Molecular Beacons (Moleküler boncuk) yöntemi : Moleküler boncuk yöntemi, hem yapısı hem de çalışma prensibi ile “TagMan® probe” ve “SYBR Green I” yönteminden çok farklıdır. Saç tokası şeklindeki yapının yuvarlak uç kısmı, çoğaltılacak DNA ile komplementer tek zincirli DNA dizisini içerir. Bu yapının düz olan uç kısımlarında, iki adet florokrom boya

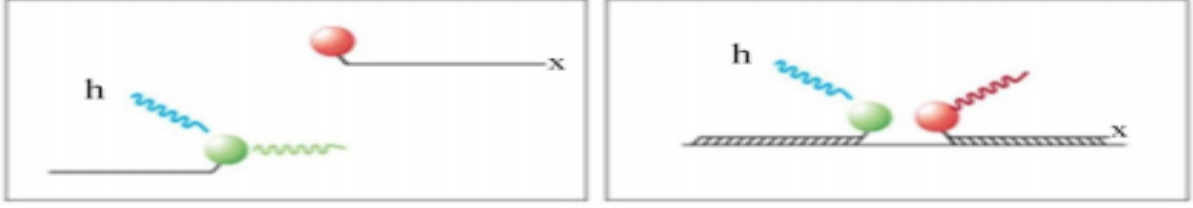
içermektedir. Bunlardan baskılayıcı olan, diğer boyanın floresansını engeller. Moleküler boncuk probu solüsyon içerisinde serbest halde iken ışığa yapmaz. Çoğaltılmak istenilen DNA bölgesi, PCR ile çoğalmaya başladığında, prob, hedef DNA dizisine göre dizayn edildiğinden birbirleri ile karşılaştıklarında konformasyonu değişir ve düz, çift zincirli hale geçer. Çünkü bu yapı termodinamik olarak saç tokası şeklinden daha karardır. Moleküler boncuk, hedef nükleik asit dizisi ile hibridize olur olmaz boncuk molekülünün yapısı değiştiğinden ve boyalarda birbirlerinden uzaklaştığından floresan miktarı artar. Bu teknikte, oluşan floresanın ölçümüne dayanmaktadır (Günel, 2007).



Şekil 2.16. Moleküler boncuk yöntemi (<http://www.pri.wur.nl>)

Moleküler boncuk yönteminin en fazla kullanıldığı alanlar; genetik tarama, SNP çalışmaları, farmakogenetik çalışmalarıdır. Bu yöntemde prob dizaynı çok önemlidir ve optimal şartlar sağlanmadığında özellikle uygun sıcaklık bulunamamışsa probun saç tokası şeklindeki yapısı değişmeyeceğinden, ortamda hedef DNA dizisi bulunsa bile floresan ışığa elde edilemeyebilir.

Hibridizasyon prob yöntemi: Bu yöntem Roche tarafından “LightCycler” PCR cihazında kullanılmak üzere geliştirilmiştir. İki farklı prob dizayn edilmiştir. 3' ucunda floresans işaretli boya (donor), 5' ucunda alıcı boya (acceptor) bulunmaktadır. PCR reaksiyonu sırasında bu iki prob, hedef nükleik asit dizisine bağlanıp birbirine yaklaştığında bir enerji yayılımı olur (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer). Enerji “donor” boyadan “acceptor” boyaya transfer olur. Bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı, PCR süresince oluşan ürün miktarı ile doğru olarak artar (Chaplin et al., 1999).



Şekil 2.17. Hibridizasyon Problemleri (<http://mbg.jrc.ec.europa.eu>)

2.3.2.3 Real time PCR Yönteminin Avantajı

Real time PCR yöntemi, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalinin ölçülmesiyle, kantitatif sonuç alınabilen bir PCR yöntemidir. Sıcaklık döngüleri ve floresan okunması, aynı cihaz içinde ve aynı tüp içinde gerçekleşmektedir. Böylece hedef bölge, elektroforeze gerek kalmadan kısa bir süre içinde saptanabilmektedir. Aynı cihaz içerisinde hem çoğaltma işleminin, hem de çoğaltılan ürünleri saptama işleminin yapılabilmesi, bu yöntemi çok pratik bir yöntem haline getirmiştir (Pınar, 2009). Ayrıca tüpler açılmadan test tamamlandığı için kontaminasyon riski de azalmaktadır (Valasek and Repa, 2005). Konvansiyonel ölçümlerden bin kat daha az RNA ile çalışılabilir ve iki kat artmış değişimi bile belirleyebilme hassasiyetindedir. Tümör hücrelerinin ilaç dirençlerinden kemoterapi taramalarına ve tümör evrelerinin moleküler saptanmasına kadar uzanan bir çok farklı alanda gen anlatımını sayısal bir değer olarak ölçmek mümkün olmaktadır. Bu yüzden kanser çalışmalarında da önemli bir yeri vardır (Sayitoğlu, 2005)

2.3.2.4 Real time PCR Yönteminin Dezavantajı

Real time PCR yöntemi bir tarama değil, saptama yöntemidir. Bu yüzden sadece önceden belirlenmiş aberasyonların saptanmasında kullanılır. Ayrıca standardizasyon problemi olduğundan dolayı, optimize etmek zordur.

2.3.3 Yüksek Çıktılı BAC Tabanlı Moleküler FISH Analizleri

“Yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri” yöntemi FISH ve BAC tabanlı aCGH tekniklerini kapsayan kompleks bir yöntemdir.

Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH), radyoaktif olmayan molekül ile kimyasal olarak değiştirilen DNA problemlerinin immünolojik ya da afinite reaksiyonlarını kullanarak kromozom veya kromozom parçalarının floresans olarak görüntülenmesine olanak sağlayan bir tekniktir. Bu yöntemle sayısal ve yapısal anomalileri hem interfaz hem de metafaz hücrelerinde saptamak mümkündür (Pala, 2005). Bu teknikle kromozomal DNA veya RNA'nın hücre yapısı bozulmaksızın incelenebilmesi, yöntemin en önemli özelliklerinden birisidir. Kolay

uygulanabilir olması, duyarlılığı ve güvenilirliğinin yüksek olması, diğer moleküler DNA hibridizasyon yöntemlerine göre rezolüsyon gücü, mozaizm tanısı gibi avantajlarının olması FISH tekniğinin moleküler tekniklerdeki ilerlemelere paralel olarak gelişmesine ve geniş bir uygulama alanı bulmasına neden olmuştur (Durak, 2006).

Belirli bir kromozomal bölgenin veya DNA kesiminin FISH yöntemi ile görünür hale gelebilmesi için o bölgeye spesifik bir probun kullanılması gerekir. FISH yönteminde, hedef DNA/RNA molekülüne komplementer işaretli nükleik asit dizisine “prob” denir. Problar haptentler, florokromlar, enzimler veya kolloidal altın ile işaretli olabilirler. Ancak bugün pratik olmaları ve ticari olarak bulunabilmeleri nedeniyle direkt ve florokromlarla işaretli problemler kullanılmaktadır. Aranılan anomalinin doğru bir şekilde tespit edilebilmesi için amaca uygun prob seçimi çok önemlidir (Bayani and Squire, 2004).

Moleküler sitogenetik metodları (ISH, FISH, CGH), klasik sitogenetik yöntemlerle tanımlanamayan kromozomal mikrodelsiyonlar ve yeniden düzenlenmeleri ortaya koyma olanağı sağlar. Sitogenetikte rutin GTG bantlama tekniğinde dört Mb’ten büyük, HRB (High Resolution Banding-ikibin band düzeyinde) tekniğinde de iki Mb’den büyük olan düzensizlikler saptanabilmektedir. Bu boyutlardan daha küçük olan yapısal düzensizlikler ancak FISH (bir ila üç Mb) ile saptanabilmektedir. İnterfaz nükleusunda kromozomlar daha az yoğun ve metafaza göre on ila yirmi kat daha uzun olduğu için rezolüsyon yüz kb’ye kadar çıkabilir. FISH analizi metafaz kromozomlarının yanı sıra interfaz nükleusunda da analizi olanaklı kılması nedeniyle kanser genetiğinde önemli bir tanı testi olarak kullanılabilir (Durak, 2006).

FISH lösemilerde; lösemi tipine ait spesifik karyotipik yapıyı belirlemek, hastalığın relapsında karyotipik değişikliği belirlemek, kemik iliği nakli sonrası hastanın kemik iliğinde oluşan hücre popülasyonunun orjininin belirlenmesi gibi amaçlar için kullanılmaktadır (Başaran, 1996)

Sitogenetik ve moleküler sitogenetik yöntemlerin dayandığı teknolojidən kaynaklanan bazı sınırlamaları ortadan kaldıracak bir moleküler genetik/sitogenetik yöntem olarak “karşılaştırmalı genomik hibridizasyon” (comparative genomic hybridization(CGH)) ortaya çıkmıştır. İlk geliştirildiğinde CGH analizi için substrat olarak normal metafaz kromozomları kullanılmıştır. (Kallioniemi et al., 1992). Ancak klasik CGH yöntemi zorluğu ve değerlendirme kriterlerinin güçlüğü nedeniyle pratik uygulamada yaygınlaşmamıştır. CGH

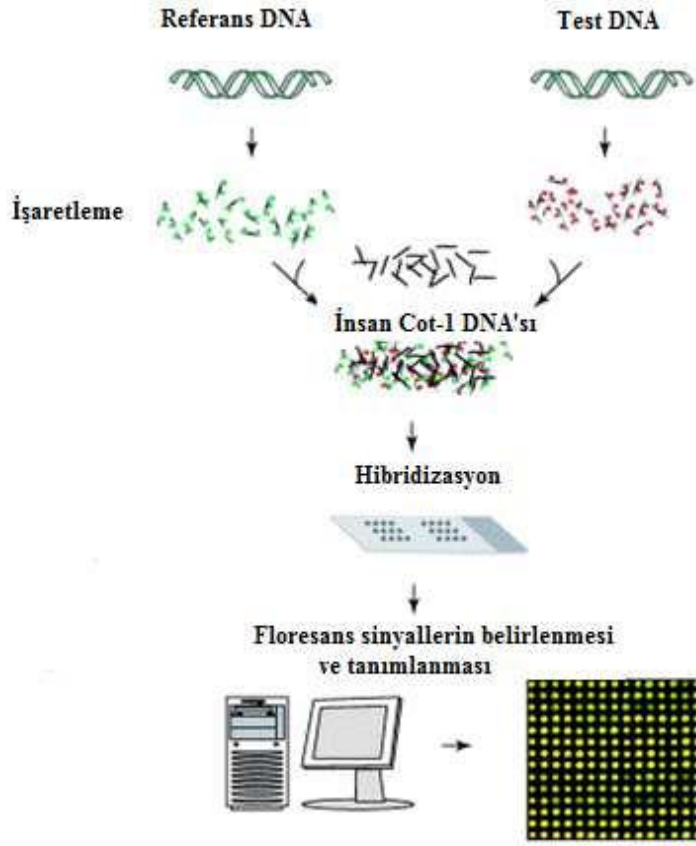
yönteminin artılarını daha da geliştiren, hassasiyet ve özgüllüğünü artıran, uygulama ve değerlendirme zorluklarını ise azaltan bir yöntem olan “Dizi karşılaştırmalı genomik hibridizasyon” (aCGH) yöntemi kullanılmaya başlanmıştır.

aCGH, geleneksel sitogenetik ve moleküler sitogenetik tekniklerin üzerinde avantajlara sahiptir (Shaffer and Bejjani, 2004). Dizi karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (aCGH), segmental genomik CNV’leri genom boyunca yüksek çözünürlükte taramayı sağlayan bir tekniktir. Bu teknik, yavaş yavaş sitogenetik yöntemlerin yerini almaya ve klinikte rutin tanı aracı olmaya başlamıştır. Klinik olarak kullanılan aCGH platformlarının çoğu kromozomal anöploidiler, iyi karakterize mikrolelesyon/mikroduplikasyon sendromları ve subtelomerik veya diğer dengesiz kromozom düzenlenmelerini tespit etmek için tasarlanmıştır. Buna ek olarak insan genomu boyunca dağılmış, önemi tam olarak bilinmeyen çok sayıda CNV’leri de ortaya çıkarabilmektedir. aCGH tekniğinin, zeka geriliği, otizm, multipl konjenital anomali ve dismorfizmi olan hastalarda, segmental genomik CNV’leri saptama özelliği yüksektir ve hastalık geninin keşfi ve prenatal tanıda teşhis için güçlü bir araç haline gelmiştir. Bu teknik aynı zamanda, kanser araştırmalarında, tanısında, sınıflandırılmasında ve farklı malignitelerin önceden tahmin edilmesinde umut verici bilgiler göstermektedir (Shinawi and Cheung, 2008).

Bu teknikte, test için eşit miktarda etiketli DNA ve referans DNA örneği, hedef DNA içeren dizi ile hibridize edilmektedir. Hasta ve kontrolün genomik DNA’sı farklı renkteki florokrom olan Cyanine 3 (Cy3) ve Cyanine 5 (Cy5) ile işaretlenmektedir. Cy5 ve Cy3 iki farklı boya olup farklı emme ve uyarılma özelliğine sahip olmalarından dolayı iki farklı renk, kırmızı ve yeşil olarak üretilirler. Tekrarlayan dizilerin hibridizasyonundan kaynaklanan hatalar Cot1-DNA’nın eklenmesiyle bloke edilmektedir. Bu iki örnek karıştırılır ve hedef genomik DNA içeren lekelenmiş cam slaytlarla hibridize edilmektedir. Slaytlar mikroarray tarayıcısı kullanılarak görüntü dosyası biçiminde taranılmaktadır ve uygun bilgisayar programlarıyla yorumlanılmaktadır (Shinawi and Cheung, 2008). aCGH metodunda metafaz kromozomları kullanılmak yerine, prob olarak bilinen küçük DNA segmentlerinin düzenli bir şekilde yerleştirilmesiyle tasarlanan slaytlar kullanılmaktadır (Lucito et al., 2003).

DNA problemlerinin uzunluğu ve aralıkları, farklı aCGH platformlarının genomik çözünürlüklerini belirlemektedir (Shinawi and Cheung, 2008). aCGH teknolojisinde iki ana metod kullanılmaktadır: BAC (Bakteri Yapay Kromozomu) ve oligonükleotitler. BAC’lar uzun DNA parçalarının bakterilerde klonlanması amacıyla kullanılan bir vektör tipidir

(Nussbaum, 2005). BAC tabanlı aCGH'lerin yüksek hassasiyeti sayesinde, ilk genomik diziler hayata geçirilmiş ve rutinde kullanılan tek kopya değişiklikleri saptanabilmiştir (Wicker, 2007). Kullanılan aCGH datalarının çoğu, BAC aCGH kullanılarak oluşturulmuştur. BAC'ların uzunluğu 150 ile 200 kb arasında değişmektedir (Ylstra et al., 2006).



Şekil 2.18. aCGH tekniğinin basamakları

FISH ve BAC aCGH metodlarını baz alan, “yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri” yönteminde, hedef gendeki genomik değişikliklerin bulunması ve haritalanması BAC problemleri sayesinde, FISH metodu esas alınarak sağlanmaktadır. Bu metod konvansiyonel tekniklere göre daha hızlı ve daha kolay analiz sağlamaktadır. Bu sayede hematolojik malignitelerin tanısal ve prognostik takibinde bu yöntem oldukça önemli olmaktadır.

2.3.3.1 Yüksek Çıktılı BAC Tabanlı Moleküler FISH Analizleri Yönteminin Avantajı

İnsan genomunun tümündeki DNA kopya sayısı değişimlerini analiz etmek için yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri güçlü bir yöntemdir (Saito et al, 2011). En önemli avantajı, aynı anda genomdaki birçok delesyon/duplikasyonu tarayarak, hızlı sonuç elde edilmesi ve güvenilir olmasıdır. Konvansiyonel sitogenetik yöntemi, tümör hücrelerinden

metafaz elde etmenin zor olması ve elde edilen metafazların morfolojilerinin kötü olmasından dolayı yapısal ve sayısal anomalilerin belirlenmesinde yetersiz kalabilmektedir. Deneyin uzun sürmesi ve analizinin zor olmasından dolayı kısıtlamalara neden olmaktadır. Yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri, konvansiyonel tekniklere göre daha hızlı ve daha kolay analiz sağlamaktadır. Ayrıca sitogenetik yöntemlerle belirlenemeyen mikrobelesyon ve mikroduplikasyonların tanımlanmasına da olanak sağlanmaktadır. Otomasyona adapte edilebilir olması nedeniyle rutin analizlerde kullanılma avantajı bu teknolojinin hızla yaygınlaşmasına neden olmuştur. Bu yüzden hematolojik malignitelerin tanısı ve prognostik takibinde bu yöntem oldukça önemlidir.

2.3.3.1 Yüksek Çıktılı BAC Tabanlı Moleküler FISH Analizleri Yönteminin Dezavantajı

Yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri yönteminin birçok avantajının yanında bazı dezavantajları da mevcuttur. Genomdaki dengeli translokasyonları saptayamaması bu yöntemin en önemli dezavantajıdır. Ayrıca bu teknolojinin diğer konvansiyonel tekniklere göre pahalı olması araştırmacıları kısıtlamaktadır.

3. GEREÇ-YÖNTEM

3.1. Yöntem

Çalışmada, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Genetik laboratuvarına rutin tanı amaçlı, genetik inceleme için Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Hematoloji Servis ve Polikliniğinden ve Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Onkoloji Servis ve Polikliniği tarafından gönderilen 29 hasta yer aldı. Çalışmadaki hastalar; cinsiyet farkı gözetmeksizin 0-18 yaş arası ALL tanısı/ön tanısı almış olanlar arasından seçilmiştir. Her bir hastadan, mor kapaklı EDTA'lı hemogram tüpüne yaklaşık 3 ml periferik kan alındı ve kan materyalinin 500 uL kadarı yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizi çalışması için genomik DNA izolasyonunda kullanıldı. DNA izolasyonu için MagNA Pure Compact Nükleik Asit İzolasyon Kiti I (Roche Diagnostic GmbH Germany) kullanıldı. DNA kalitesi agaroz jel elektroforezi ile kantitesi ise spektrofotometre (NanoDrop ND-1000; NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) kullanılarak tayin edildi. Yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizi platformu olarak CytoChip Focus Haematology (BlueGnome Limited, Cambridge, UK) slaytı kullanıldı. Yeterli kalite ve kantiteye sahip hasta DNA'sı ve referans DNA (Human Genomic DNA: Male/Female; Promega Corporation, Madison, USA) CytoChip protokolüne uygun olarak lekelenildi. Lekelenen hasta DNA'sı ile referans DNA birleştirildi ve protokole uygun olarak CytoChip Focus High Throughput FISH analysis (BlueGnome Limited, Cambridge, UK) formatındaki slaytlar ile 47°C'lik su banyosunda (GFLR, 1003, Germany) 16-21 saat hibridizasyona bırakıldı. Hibridizasyon süresi sonunda CytoChip protokolüne uygun olarak yıkanan slaytlar, Agilent Mikroarray G2505B tarayıcı (Agilent Microarray Scanner; Agilent Technologies, Palo Alto, CA) ile tarandı. Görüntü yoğunluğu verileri kaydedildi ve BlueGnome'un BlueFuse Multi v2.0 (BlueGnome Limited, Cambridge, UK) analiz programı kullanılarak analiz edildi. Analiz sonrası elde edilen görüntü ve gen listesi kaydedildi. Hastalardan alınan periferik kan örneğinin 500 uL kadarı kantitatif real time PCR çalışması için RNA izolasyonunda kullanıldı. RNA izolasyonu için HighPure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) kullanıldı. RNA kantitesi spektrofotometre (NanoDrop ND-1000; NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) kullanılarak tayin edildi. Yeterli kalite ve kantiteye sahip hasta RNA'larından, cDNA sentezlendi (LightCycler R t(9;22) Quantification Kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Elde edilen cDNA örneklerinden t(9;22)(LightCycler R t(9;22) Quantification Kit,

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) ve t(4;11) (Way2Gene Tibmolbiol Syntheselabor GmbH, Berlin, Germany) translokasyonları LightCycler 1.5 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) cihazında saptandı ve LightCycler Software v3.5 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) yazılım programında kantifikasyon ve erime eğrisi analizleri gerçekleştirildi.

3.1.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

Toplanan örneklerden, MagNA Pure Compact Instrument cihazı kullanılarak magnetik yöntem ile DNA elde edildi. Çalışma da DNA eldesi için MagNA Pure Compact Nükleik Asit İzolasyon Kiti I (Roche. Diagnostics GmbH, Germany) kullanıldı. İzolasyon kitinin kartuşu cihazın yuvasına yerleştirildikten sonra hastanın 500 µL örneği 2 ml'lik ependorf tüpe konularak cihazda ilgili yerlere yerleştirildi. Son olarak DNA toplanacak (elution) tüpler cihaza yerleştirildikten sonra cihaz çalıştırılarak 25 dakika içinde 100 µL izole edilmiş DNA elde edildi. 260 ve 280 nm dalga boyundaki absorbanslar spektrofotometre (NanoDrop, ND-1000) kullanılarak ölçüldü. A260/A280 oranı 1,7 ile 2,0 arasında olan DNA'lar çalışmaya alındı.

3.1.2. Periferik Kandan RNA İzolasyonu

Toplanan örneklerden High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) kullanılarak RNA izolasyonu işlemi gerçekleştirildi.

1. 1,5 ml'lik eppendorf tüpe 1000 µl Red Blood Cell Lysis Buffer ve 500 µl kan veya kemik iliği pipetlendi.
2. Karışım 15-25 C°'de 10 dakika çalkalandı.
3. Sonrasında karışım 2500 rpm, 15-25 C°'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pelletin üzerine 1000 µl Red Blood Cell Lysis Buffer eklendi.
4. Karışım 2500 rpm, 15-25 C°'de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pellet üzerine 200 µl PBS ve 400 µl Lysis/Binding Buffer eklenip karışım 15 saniye vortekslendi.
5. Karışımın tümü High-Pure Filter kolonuna eklenip 8000 g'de 15 saniye santrifüj edildi.
6. Kolonun dibinde toplanan sıvı atıldı. Filtre yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne konuldu.
7. Filtreye 500 µl Wash Buffer I eklendi ve 8000 g'de 15 saniye santrifüj edildi.
8. Kolonun dibinde toplanan sıvı atıldı. Filtre yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne konuldu.
9. Filtreye 500 µl Wash Buffer II eklendi ve 8000g'de 15 saniye santrifüj edildi.
10. Kolonun dibinde toplanan sıvı atıldı. Filtre yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne konuldu.

11. Filtreye 200 µl Wash Buffer II eklendi ve maksimum devirde 2 dakika santrifüj edildi.
 12. Kolonun dibinde toplanan sıvı atıldı.
 13. Tüp boş olarak maksimum devirde 1 dakika santrifüj edildi.
 14. Filtre 1,5 ml'lik eppendorf tüp içine yerleştirildi ve üzerine 50 µl Elution Buffer eklendi.
 15. Oda sıcaklığında 1 dakika inkube edildikten sonra 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Filtre atıldı. Elde edilen RNA miktarı 260 ve 280 nm dalga boyundaki absorbanlar spektrofotometre (NanoDrop, ND-1000) kullanılarak ölçüldü. A260/A280 oranı 1,8 ile 2,0 arasında olan RNA'lar çalışmaya alındı.

3.1.3. DNA ve RNA'ların Kantite ve Kalite Tayini

DNA ve RNA'ların kantitesi NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) cihazında DNA için DNA-50, RNA için RNA-40 opsiyonu kullanılarak yapıldı. DNA ve RNA'ların 260/280 oranlarının 1,8-2,0 arası; 260/230 oranlarının ise 2,0 ve üzeri olmasına dikkat edildi.



Şekil 3.1. NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE)

DNA ve RNA'ların kalite tayinleri agaroz jel elektroforez yöntemi ile yapıldı. Ön işlem olarak 1XTBE hazırlandı. Bu işlem için 100 mL 10XTBE (Tris, Borik Asit, EDTA- AppliChem, Germany) 900 mL distile su içinde çözüldü. %1'lik agaroz jel hazırlamak için 0,5g agaroz tartılıp 50 ml 1XTBE içerisinde kaynatılarak çözüldü. Çözünen agaroz jelin içine 2 µL etidyum bromid eklenerek jel içinde homojen olarak dağılması sağlandı. Katılaşmayacak kadar soğutulan agaroz çözeltisi tarak içeren jel tablasına dökülerek jelin polimerleşmesi beklendi. Jel içine yerleştirilmiş tarak çıkartıldıktan sonra oluşan kuyuların ilkinde markır yüklendi. Örnek ürün miktarı 80-100 ng olacak şekilde, 1,5 µL yükleme boyası, 5 µL nükleaz

içermeyen su ile karıştırılarak pipetlendi. Jel elektroforez tankı güç kaynağına bağlandı ve 50 amper, 100 voltta 60 dakika yürütüldü. Jelde yürütülen ürünler UV transilluminatör ile görüntülenip, fotoğrafı çekilerek değerlendirildi.

3.1.4. Yüksek Çıktılı BAC Tabanlı Moleküler FISH Analizi Metodu

3.1.4.1. DNA Lekeleme

1. 0,2 ml'lik PCR tüplerine DNA miktarı 50 µl de 400 ng olacak şekilde nükleaz içermeyen su ve genomik DNA konuldu. DNA ve nükleaz içermeyen su miktarı 23 µl olacak şekilde ayarlandı.

2. Lekeleme karışımı aşağıda verildiği gibi hazırlandı ve genomik DNA üzerine eklendi.

Lekeleme Karışımı	Miktar
Reaction buffer	10 µl
Cy3-dCTP veya Cy5-dCTP	1 µl
Primer solution	10 µl
dCTP-Labeling Mix	5 µl
Toplam Hacim	26 µl

3. Örnekler 94 C°'de 5 dakika inkube edilip, süre sonunda buz üstünde 5 dakika bekletildiler.

4. Karışımın üzerine 1 µl Klenow enzimi eklendi.

5. 2000 g' de 30 saniye santrifüj edildi.

6. Karışım 37 C°'de 16-20 saat inkübasyona bırakıldı.

7. İnkübasyon sonrası karışıma 5 µl EDTA solusyonu pipetlendi.

8. 2000 g' de 30 saniye santrifüj edildi.

3.1.4.2. DNA' nin Pürifikasyonu

Pürifikasyon aşamasının ilk basamağını Autoseq™ G50 kolonlarının hazırlanması işlemi oluşturdu.

1. Kolonlar vortekslendi.

2. Kolonların kapakları ortadan açılıp, dip kısımdaki kapak kırıldı.

3. Kolonlar 2 ml'lik toplama tüplerine yerleştirilip 2000 g' de 1 dakika santrifüj edildiler.

4. Toplama tüpleri atıldı. Kolonlar 1,5 ml'lik eppendorf tüplere yerleştirildi.

5. Örnekler kolonlara yüklenip 2000 g' de 1 dakika santrifüj edildi.

6. Kolonlar atıldı. Pürifiye olmuş örnekler NanoDrop, ND-1000 cihazı kullanılarak A260nm (DNA), A550 (Cy3) ve A650 (Cy5) absorbans değerleri ölçüldü. DNA miktarının 180-325 ng/ μ l ve boya katılım miktarının 6-15 pmol / μ l olmasına dikkat edildi.

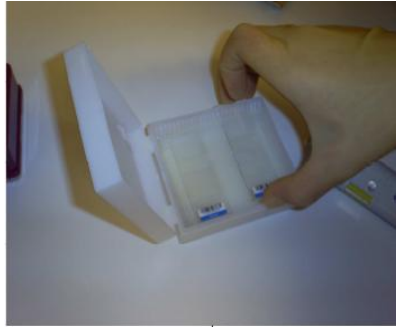
3.1.4.3. Örneklerin Kurutulması

1. Her bir hasta DNA'sı ile Referans DNA'sı aynı tüpte birleştirildi.
2. Birleşimin üzerine 25 μ l COT-I Human DNA eklendi.
3. 60 C°'de, yüksek vakumda, 60 dakika örnekler kurutuldu.

3.1.4.4. Hibridizasyon

Hibridizasyon işlemine geçmeden önce 20XSSC (Sodyum Salin Sitrat) ve 2XSSC +%50 formamid karışımı hazırlandı. 20XSSC; 175,3 gr NaCl (3M'lik) ve 88,2 gr Sodyum Sitratın tartılıp 1000 ml'ye kadar deiyonize suyla tamamlanmasıyla hazırlandı. Bu karışımın çözünmesi magnetik karıştırıcı kullanılarak sağlandı. Elde edilen 20XSSC'nin pH'ı 7 olarak ayarlandı. 2XSC + %50 formamid karışımı; 1ml 20XSSC (pH: 7), 5 ml formamid ve 4 ml deiyonize su konularak hazırlandı. Daha sonra slayt kutusu içerisine kurutma kağıtları yerleştirildi ve 2XSSC + % 50 formamid karışımı ile kurutma kağıtlarının çok iyi ıslanması sağlandı. Bu ön hazırlıklardan sonra aşağıdaki basamaklara geçildi.

1. Kurutulan örnekler üzerine 75°C'de ısıtılmış Dekstran Sulfat (DS) Hibridizasyon solüsyonundan 21 μ l eklendi.
2. Örnekler 75°C'de 10 dakika denatüre edildi. Pelletin iyice çözünmesi elle karıştırılarak sağlandı.
3. Örnekler tekrar 75 °C'de 10 dakika denatüre edildi.
4. Her örnekten 19 μ l CytoChip Focus High Throughput FISH analysis slaytlarına yükleme yapıldı.



Şekil 3.2. Yükleme yapılan slaytlar

5. Yükleme yapılan slaytlar önceden hazırlanmış olan slayt kutusunun içerisine yerleştirildi ve slayt kutusu parafinle sarıldı (Şekil 3.2.).

6. İçerisinde yükleme yapılan slaytlar olan slayt kutusu 47 °C' lik su banyosunda 16-21 saat hibritlenmeye bırakıldı.

3.1.4.5. Yıkama

Yıkama işlemine geçmeden önce aşağıda gösterilen solüsyonlar hazırlandı.

2XSSC + %0,05 Tween20 Karışımı Hazırlanışı

- 100 ml 20XSSC (pH=7)
- 0,5 ml Tween20 → 1000 ml' ye tamamlandı

1XSSC Hazırlanışı

- 25 ml 20XSSC (pH=7) → 500 ml'ye tamamlandı.

0,1XSSC Hazırlanışı

- 5 ml 20XSSC (pH=7) → 1000 ml' ye tamamlandı.

1. 3 adet 1000 ml'lik cam kap ve 1 adet şale çıkarıldı.

2. Yıkama işlemine geçmeden önce HYBEX inkübatör içerisine 0,1XSSC solüsyonu koyulup sıcaklığın 60 C°'ye çıkması sağlandı.

3. Yıkama işlemi aşağıdaki koşullar altında gerçekleştirildi.

	Yıkama Solusyonu	Koşul	İşlem
Şalede	2xSSC + %0,05 Tween 20	Oda sıcaklığı	2 dakika içerisinde lamellerin düşmesi sağlandı
1.Kap	2xSSC + %0,05 Tween 20	Oda sıcaklığı 10 dakika manyetik karıştırıcı ile	CytoChip Focus High Throughput FISH analysis slaytları yıkandı
2.Kap	1xSSC	Oda sıcaklığı 10 dakika manyetik karıştırıcı ile	CytoChip Focus HighThroughput FISH analysis slaytları yıkandı
HYBEX Inkubator	0,1x SSC	HYBEX Inkübator içerisinde 5	CytoChip Focus High Throughput FISH analysis

		dakika bekletildi	slaytları yıkandı
3.Kap	0,1xSSC	Oda sıcaklığında 1dakika bekletilir	CytoChip Focus High Throughput FISH analysis slaytları yıkandı



Şekil 3.3. HyBex İnkübatörde yıkanan slaytlar

4. Yıkanan slaytlar falkon tüpe yerleştirildi.
5. 200 g'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra hızlı bir şekilde çıkartılıp, tarama işlemine geçildi.

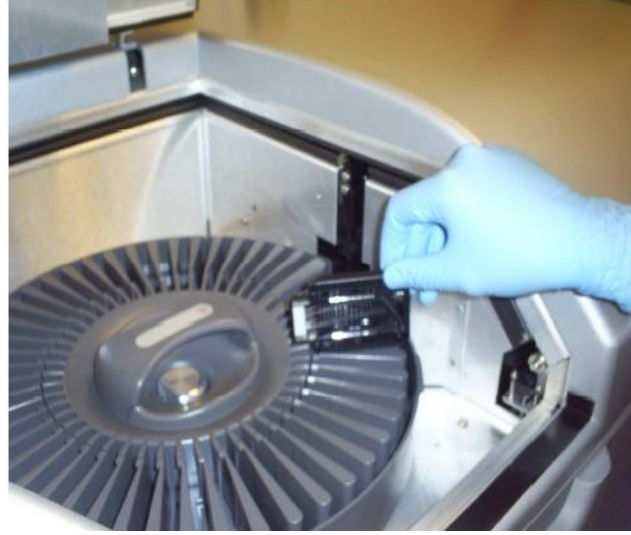
3.1.4.6. Tarama

1. Slaytlar Haematology kısımları üste gelecek şekilde tarayıcı kasetlerine yerleştirildi.



Şekil 3.4. Tarayıcı kasete yerleştirilen slayt

2. Tarayıcı karuselinde “Home” pozisyonu haricindeki numaralı her yere slayt’lar yerleştirilebilir (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. Tarayıcı karuseline yerleştirilen slaytlar

3. Agilent tarayıcı yazılım programı, masa üstündeki “Agilent Scan Control” ikonu yardımıyla açıldı.

4. Tarama işlemi aşağıdaki ayarlara göre yapıldı.

Slayt	Slayt’lar karusel üzerinde kaç numaralı pozisyonlarda yerleştirilmişse işaretlendi
Tarama alanı (Scan Region)	52 x 19.50 mm
Channels (Kanallar)	Red&Gren
Resolution (Rezolüsyon)	10 um
TIFF	16 bit
PMT	%100
XDR	İşaretlenmeyecek
Browse	Tarayıcıdan çıkan görüntünün kayıt yeri seçildi

5. Ayarlama işlemi bitince “Scan Slot” ikonuna basıldı ve tarama işlemi başlatıldı.

3.1.4.7. Veri Analizi

Tarama işleminden sonra elde edilen veriler TIF uzantılı dosyalardır. Bu dosyadan, Feature Extraction yazılım programı ile txt, xml, pdf gibi uzantısı olan ve slayt hakkında çeşitli bilgiler içeren dosyalar oluşturuldu. Bu dosyalardan pdf uzantılılar, kalite kontrol (QC-Quality Control) dosyaları olup hibridizasyonun kalitesi hakkında çeşitli parametreler sunmaktaydı. Sonuçların doğruluğu için kalite kontrol dosyalarındaki parametreler kontrol

edildi. Veriler BlueFuse Multi v2.0 analiz programı aracılığıyla analiz edildi. Analiz aşamasından sonra elde edilen görüntü ve gen listesi kaydedildi.

3.1.5. Kantitatif Real Time PCR Metodu

3.1.5.1. cDNA sentez aşaması

1. t(9;22) (Light cycler t(9;22) quantification kit) kitinin içerisinden çıkan üç standart (9a,9b ve 9c), pozitif kontrol, negatif kontrol ve hastalar için birer 0,2 ml'lik PCR tüpleri hazırlandı.
2. Her bir hasta için hazırlanmış olan PCR tüplerine 10µL hasta RNA'sı pipetlendi. Thermal cycler (Applied Biosystems 2720) da 65°C'de 10 dakika denatüre edildi.
3. Tüp sayısı kadar aşağıda gösterilmiş olan cDNA karışımı hazırlandı.

Materyal	Reaksiyon Başına
H ₂ O	4,4 µl
RT Buffer	4,0 µl
Random Primer p(dN) ₆	0,2 µl
AMV Reverse Transcriptase	0,4 µl
RNase Inhibitor	0,6 µl
Deoxynucleotid mix	0,4 µl

4. Karışımdan 0,2 ml'lik tüplere 10'ar µl pipetlendi.
5. Thermal cycler cihazında aşağıda verilen PCR protokolü uygulandı.

Sıcaklık (°C)	Süre (Dakika)
37°C	60 dakika
65°C	10 dakika
4°C	∞

6. Elde edilen cDNA örneği -20°C'de muhafaza edildi.

3.1.5.2. t(9;22) LightCycler (LC) aşaması

cDNA eldesinden sonra LC aşaması için aşağıda verilen 2 farklı karışım hazırlandı.

G6PDH Karışımı		BCR-ABL Karışımı	
Materyal	Reaksiyon başına	Materyal	Reaksiyon başına
H ₂ O	9,2 µl	H ₂ O	6,8 µl
Reaction mix, 10x	2 µl	Reaction mix, 10x	2 µl
G6PDH Detection mix	3,8 µl	t (9;22) Detection mix	6,2 µl

1. Her bir örnek için 2 tane LC kapiller tüpü kullanıldı.
2. Hastaya ait cDNA örneğinden 5µL kapiller tüpü içerisine pipetlendi.

3. cDNA'lar üzerine 15µL G6PDH ve BCR-ABL karışımı pipetlendi.

4. Kapiller tüpler LightCycler 1.5 (Roche Diagnostic GmbH, Germany) cihazına yüklendi ve aşağıda gösterilen programlarda çalışma gerçekleşti.

Denatürasyon	
Döngü program verileri	Değer
Döngü sayısı	1
Analiz modu	Yok
Sıcaklık Hedefi	Segment 1
Hedef Sıcaklık (C°)	95
İnkübasyon Zamanı	00:30
Sıcaklık Değişim Hızı (C° /saniye)	20.0
Basamak Ölçüsü	0
Basamak Gecikmesi (Döngülerde)	0
Kazanım modu	Yok

Amplifikasyon			
Döngü program verileri	Değer		
Döngü sayısı	45		
Analiz modu	Kantifikasyon		
Sıcaklık Hedefi	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Hedef Sıcaklık (C°)	95	64	72
İnkübasyon Zamanı	00:00:01	00:00:10	00:00:26
Sıcaklık Değişim Hızı (C° /saniye)	20.0	20.0	2.0
Basamak Ölçüsü	0.0	0.0	0.0
Basamak Gecikmesi (Döngülerde)	0	0	0
Kazanım modu	Yok	Tek	Yok

Erime Eğrisi			
Döngü program verileri	Değer		
Döngü sayısı	1		
Analiz modu	Yok		
Sıcaklık Hedefi	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Hedef Sıcaklık (C°)	95	42	80
İnkübasyon Zamanı	00:01:00	00:02:00	00:00:00
Sıcaklık Değişim Hızı (C° /saniye)	20.0	20.0	0.1
Basamak Ölçüsü	0.0	0.0	0.0
Basamak Gecikmesi (Döngülerde)	0	0	0
Kazanım modu	Yok	Yok	Devam

Soğutma	
Döngü program verileri	Değer
Döngü sayısı	1
Analiz modu	Yok
Sıcaklık Hedefi	Segment 1
Hedef Sıcaklık (C°)	40
İnkübasyon Zamanı	00:00:60
Sıcaklık Değişim Hızı (C° /saniye)	20.0
Basamak Ölçüsü	0.0
Basamak Gecikmesi (Döngülerde)	0
Kazanım modu	Yok

5. Çalışma bittikten sonra kantifikasyon analizi yapıldı.
6. Analiz sonrası bcr-abl değeri olanlar pozitif, olmayanlar negatif kabul edildi.
7. Pozitif olanlara sonuçlar verilirken, bcr-abl değeri G6PDH değerine bölünerek füzyon değeri hesaplandı.

3.1.5.3. t(4;11) LightCycler (LC) aşaması

cDNA eldesinden sonra LC aşaması için aşağıda verilen 2 farklı karışım hazırlandı.

t(4;11) Karışımı	
Materyal	Reaksiyon başına
H ₂ O	3,4 µl
Mg	1,6 µl
TEL-C primer	2 µl
AML1 primer	2 µl
FL prob	2 µl
LC prob	2 µl
M mix	2 µl

G6PDH Karışımı	
Materyal	Reaksiyon başına
H ₂ O	9,2 µl
Reaction mix, 10x	2 µl
G6PDH Detection mix	3,8 µl

1. Her bir örnek için 2 tane LC kapiller tüpü kullanıldı.
2. Hazırlanan iki karışım kapiller tüplerine 15µL olacak şekilde pipetlendi.
3. Karışımlar üzerine hastalara ait olan 5µL cDNA örneği ilave edildikten sonra 20 µl'lik son reaksiyon hacmi standardize edildi.
4. Kapiller tüpler LightCyclerR 1.5 cihazına yüklendi ve aşağıda gösterilen programlarda çalışma gerçekleştirildi.

Denatürasyon	
Döngü program verileri	Değer
Döngü sayısı	1
Analiz modu	Yok
Sıcaklık Hedefi	Segment 1
Hedef Sıcaklık (C°)	95
İnkübasyon Zamanı	00:10:00
Sıcaklık Değişim Hızı (C° /saniye)	20.0
Basamak Ölçüsü	0.0
Basamak Gecikmesi (Döngülerde)	0
Kazanım modu	Yok

Amplifikasyon			
Döngü program verileri	Değer		
Döngü sayısı	45		
Analiz modu	Kantifikasyon		
Sıcaklık Hedefi	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Hedef Sıcaklık (C°)	95	55	72
İnkübasyon Zamanı	00:00:10	00:00:10	00:00:30
Sıcaklık Değişim Hızı (C° /saniye)	20.0	20.0	20.0
Basamak Ölçüsü	0.0	0.0	0.0
Basamak Gecikmesi (Döngülerde)	0	0	0
Kazanım modu	Yok	Tek	Yok

Erime eğrisi			
Döngü program verileri	Değer		
Döngü sayısı	1		
Analiz modu	Erime eğrisi		
Sıcaklık Hedefi	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Hedef Sıcaklık (C°)	95	40	85
İnkübasyon Zamanı	00:01:00	00:02:00	00:00:00
Sıcaklık Değişim Hızı (C° /saniye)	20.0	20.0	0.2
Basamak Ölçüsü	0.0	0.0	0.0
Basamak Gecikmesi (Döngülerde)	0	0	0
Kazanım modu	Yok	Yok	Devam

Soğutma	
Döngü program verileri	Değer
Döngü sayısı	1
Analiz modu	Yok
Sıcaklık Hedefi	Segment 1
Hedef Sıcaklık (C°)	40
İnkübasyon Zamanı	00:00:30
Sıcaklık Değişim Hızı (C° /saniye)	20.0
Basamak Ölçüsü	0.0
Basamak Gecikmesi (Döngülerde)	0
Kazanım modu	Yok

5. Çalışma bittikten sonra erime eğrisi analizi işlemi gerçekleştirildi

4. BULGULAR

Deneyler, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Genetik Laboratuvarında Şubat 2010-Kasım 2011 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir. Rutin tanı amaçlı genetik inceleme için, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Hematoloji Servis ve Polikliniğinden ve Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Onkoloji Servis ve Polikliniği tarafından gönderilen, 0-18 yaş arası 29 hasta yer aldı. Çalışmadaki toplam kız çocuk sayısı 12 (%41,4), erkek çocuk sayısı ise 17 (%58,6) idi. Çalışmaya dahil edilen hastaların cinsiyet dağılımı çizelge 4.1.'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.1. Cinsiyetin hastalar üzerindeki dağılımı

	ALL	
Cinsiyet (n,%)	Erkek	17 (%58,6)
	Kız	12 (%41,4)
	Toplam	29 (%100)

Tüm hastaların yaş ortalaması $6,79 \pm 4,6$ (0-18 yaş arası); erkek çocuk hastalar için yaş ortalaması $6,71 \pm 4,3$ ve kız çocuk hastalar için yaş ortalaması $6,92 \pm 5,3$ olarak saptandı. ALL ön tanıli hastaların cinsiyetlerine göre yaş ortalaması dağılımları çizelge 4.2.'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.2. ALL ön tanıli hastaların yaş ortalaması dağılımı

	ALL	
Yaş (Ortalama \pm SS) (Alt - Üst Değer)	Erkek	$6,71 \pm 4,3$ (1-13)
	Kız	$6,92 \pm 5,3$ (0-18)
	Toplam	$6,79 \pm 4,6$ (0-18)

Çalışmaya katılan ALL hastalarından 2'si (%6) tedavileri sırasında exitus oldu. Toplam 2 hastanın 1'i (%50) kız, 1'i (%50) erkek idi. Exitus hastaların yaş ortalaması $9,5 \pm 12,0$ (1-18) olarak hesaplandı.

Flow sitometri ile yapılan immünofenotipik incelemede ALL'li (n=29) olguların 7'si (%24,13) pre B ALL, 3'ü (%10,34) B lineage akut bifenotipik lösemi, 3'ü (%10,34) prekürsör B ALL CALLA(+), 1'i (%3,4) ALL CALLA(+), 3'ü (%10,34) common pre B ALL, 1'i (%3,4) T ALL, 3'ü (%10,34) common B ALL, 1'i (%3,4) pre T ALL, 1'i (%3,4) pro B ALL olarak sınıflandırıldılar, 6'sının (%20,6) sınıflandırma bilgisine ulaşamamıştır. Hastaların immünofenotipik olarak sınıflandırılması çizelge 4.3'te özetlenmiştir. Exitus olan hastaların 1'i Pro B ALL iken diğer hastanın immünofenotipine ulaşamamıştır.

Çizelge 4.3. ALL olgularının immünofenotipik olarak sınıflandırılması

ALL	
	Hasta Sayısı (n,%)
Pre B ALL	7(%24,13)
B lineage akut bifenotipik lösemi	3(%10,34)
Prekürsör B ALL CALLA(+)	3(%10,34)
ALL CALLA(+)	1(%3,4)
Common Pre B ALL	3(%10,34)
T -ALL	1(%3,4)
Common B ALL	3(%10,34)
Pre T ALL	1(%3,4)
Pro B ALL	1(%3,4)
Bilinmeyen	6(%20,6)

Yapılan yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri sonucu tüm hastaların içinde, 17 (%58,6) hastada genomun farklı bölgelerinde, çeşitli boyutlarda aberasyonlar saptanmıştır. Bu 17 hasta içerisindeki 1 (%3,4) olguda bulunan aberasyonlara ek olarak Q-RT-PCR yöntemi ile MLL-AF4 füzyon geni varlığı saptanmıştır. 17 hasta dışındaki 2 (%6,9)

olguda Q-RT-PCR yöntemi ile BCR-ABL füzyon geni ve MLL-AF4 füzyon geni varlığı saptanırken, bu hastalarda yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri sonucu genom düzeyinde aberasyona rastlanmamıştır. Tüm hastaların 10 (%34,5)'nunda hem yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri sonucu herhangi bir aberasyonun varlığına, hem de Q-RT-PCR yöntemiyle herhangi bir translokasyonun varlığına rastlanılmamıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Olgularda saptanan aberasyonların yöntemlere göre dağılımı

Yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri sonucu aberasyon; saptanan olgular: (+) saptanmayan olgular: (-)	Q-RT-PCR yöntemi sonucu translokasyon; saptanan olgular:(+) saptanmayan olgular: (-)	Kişi Sayısı (n)	Toplam hasta sayısına göre yüzde (%)
+	-	16	%55,2
-	+	2	%6,9
+	+	1	%3,4
-	-	10	%34,5

ALL olgularında saptanan aberasyonlar (duplikasyon/delesyon) çizelge 4.5 de özetlenmiştir.

Çizelge 4.5. Aberasyon saptanan olguların dağılımı

Saptanan Aberasyon	Aberasyonun görüldüğü hasta sayısı ve yüzdesi
del(1)(q32.1q44)	1(%3,4)
dup(11)(q13.4q25)	1(%3,4)
dup(8)(q23.3q24.3)	1(%3,4)
dup(21)(q11.2q22.12)	1(%3,4)
del(11)(q23.1q25)	1(%3,4)

dup(X)(q21.31q28)	1(% 3,4)
Tri 4	4(% 13,8)
Tri 2	1(% 3,4)
Tri 6	4(% 13,8)
Tri 8	3(% 10,3)
Tri 10	4(% 13,8)
Tri 14	4(% 13,8)
Tri 16	1(% 3,4)
Tri 17	3(% 10,3)
Tri 18	3(% 10,3)
Tri 21	6(% 20,7)
Dup X	6(% 20,7)
Dup Y	1(% 3,4)
del(7p)	1(% 3,4)
del(3)(p21.31p21.2)	1(% 3,4)
del(14)(q24.3)	1(% 3,4)
dup(17)(q21.31q25.3)	1(% 3,4)
dup(1)(p12q44)(qter)	1(% 3,4)
del(6)(q14.2q16.3)	1(% 3,4)
del (12)(p13.31p12.3)	1(% 3,4)
del (14)(q32.33)	1(% 3,4)
dup (22)(q12.11qter)	1(% 3,4)
del (9p)	2(% 6,9)
del (11)(q14.1q23.2)	1(% 3,4)
del Y	1(% 3,4)
del(5)(q35.2q35.3)	1(% 3,4)
dup(9)(q21.11q34.3)	1(% 3,4)
dup (4)(q34.3q35.2)	1(% 3,4)
del (6)(q14.3q27)	2(% 6,9)
del (9)(p24.3p22.2)	1(% 3,4)

dup (X)(q28)	1(%3,4)
dup (9)(q34.11q34.3)qter	1(%3,4)

Toplam 3 (%10,3) olguda, Q-RT-PCR ile translokasyon saptanırken, bu 3 olgunun sadece 1'inde yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri sonucunda aberasyon saptanmıştır. (Çizelge 4.6)

Çizelge 4.6. Q-RT-PCR sonucu aberasyon saptanan olgular

Olgu	Cinsiyet	İmmüfenotip	Yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri sonucu	Q-RT-PCR sonucu	Sağ Kalım
1	1/E	Pro B ALL	Dup X	MLL-AF4(+) Bcr-abl (-)	exitus
2	13/E	Pre B ALL	normal	MLL-AF4(+) Bcr-abl (-)	hayatta
3	3/K	-----	normal	MLL-AF4(-) Bcr-abl (+)	hayatta

Toplam 17 (%58,6) olguda, yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri sonucu genomun farklı bölgelerinde farklı boyutlarda delesyon/duplikasyon saptanmışken, sadece bir olguda Q-RT-PCR yöntemi ile translokasyon saptanmıştır.(çizelge 4.7)

Çizelge 4.7. Aberasyon saptanan olgular

Olgu	Cinsiyet/Yaş	İmmüfenotip	Yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri sonucu	QRT-PCR sonucu	Sağ Kalım
1	E/10	Pre-B ALL	del(1)(q32.1q44), dup(11)(q13.4q25), tri 21	MLL-AF4(-) Bcr-abl (-)	Hayatta
2	E/5	Prekürsör B-ALL CALLA(+)	del(6)(q14.2q27), dup(8)(q23.3q24.3), dup(21)(q11.2q22.12)	MLL-AF4(-) Bcr-abl (-)	Hayatta
3	E/4	All CALLA(+)	del(11)(q23.1q25), dup(X)(q21.31q28)	MLL-AF4(-) Bcr-abl (-)	Hayatta
4	K/7	-----	tri 4,6,10,14,17,18,21, dup X	MLL-AF4(-) Bcr-abl (-)	Hayatta

5	E/4	Prekürsör B-ALL CALLA(+)	tri 4,6,8,10,14,17,18,21,dup X,dup Y	MLL-AF4(-) Bcr-abl (-)	Hayatta
6	K/5	Common Pre B ALL	del(7p)	MLL-AF4(-) Bcr-abl (-)	Hayatta
7	E/10	Common Pre B ALL	Tri 2, tri 16,del(3)(p21.31p21.2), del(14)(q24.3),dup(17)(q21.31q25.3)	MLL-AF4(-) Bcr-abl (-)	Hayatta
8	E/2	Common Pre B ALL	tri 4,dup X	MLL-AF4(-) Bcr-abl (-)	Hayatta
9	K/11	T ALL	dup(1)(p12q44)	MLL-AF4(-) Bcr-abl (-)	Hayatta
10	E/12	Common B ALL	del(6)(q14.2q16.3), del(12)(p13.31p12.3),del(14)(q32.33) ,dup(22)(q12.1-13.3),tri 10	MLL-AF4(-) Bcr-abl (-)	Hayatta
11	E/1	Common B ALL	tri 6,8,10,14,18,21 ,dup X	MLL-AF4(-) Bcr-abl (-)	Hayatta
12	E/13	-----	del (9p),del (11)(q14.1q23.2), del (Y)(p11.31q11.23)	MLL-AF4(-) Bcr-abl (-)	Hayatta
13	K/4	Pre T ALL	del(5)(q35.2q35.3),del(9), dup(9)(q21.11q34.3)	MLL-AF4(-) Bcr-abl (-)	Hayatta
14	K /0	-----	tri 21, dup (X)(q28)	MLL-AF4(-) Bcr-abl (-)	Hayatta
15	E/9	Pre B ALL	dup(4)(q34.3q35.2),del(6)(q14,3q27), del(9)(p24.3p22.2),dup(9)(q34,11q34)	MLL-AF4(-) Bcr-abl (-)	Hayatta
16	E/7	Common B ALL	tri 4,6,8,14,17,21 ,dup(X)	MLL-AF4(-) Bcr-abl (-)	Hayatta
17	E/1	Pro B ALL	dup (X)	MLL-AF4(+) Bcr-abl (-)	Exitus

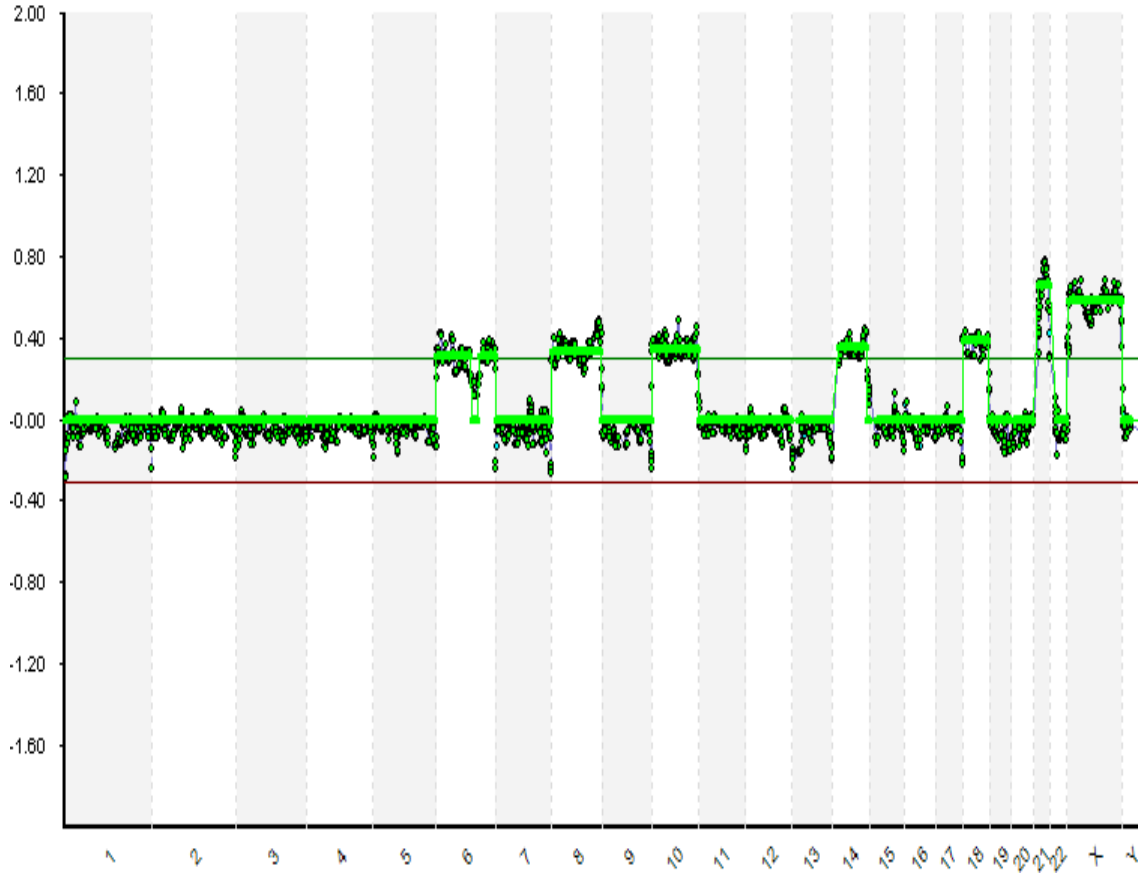
Toplam 10 (%34,5) olguda iki yöntemle de aberasyon saptanmamıştır. (Çizelge 4.8)

Çizelge 4.8. Her iki yöntemle de aberasyon saptanmayan olgular

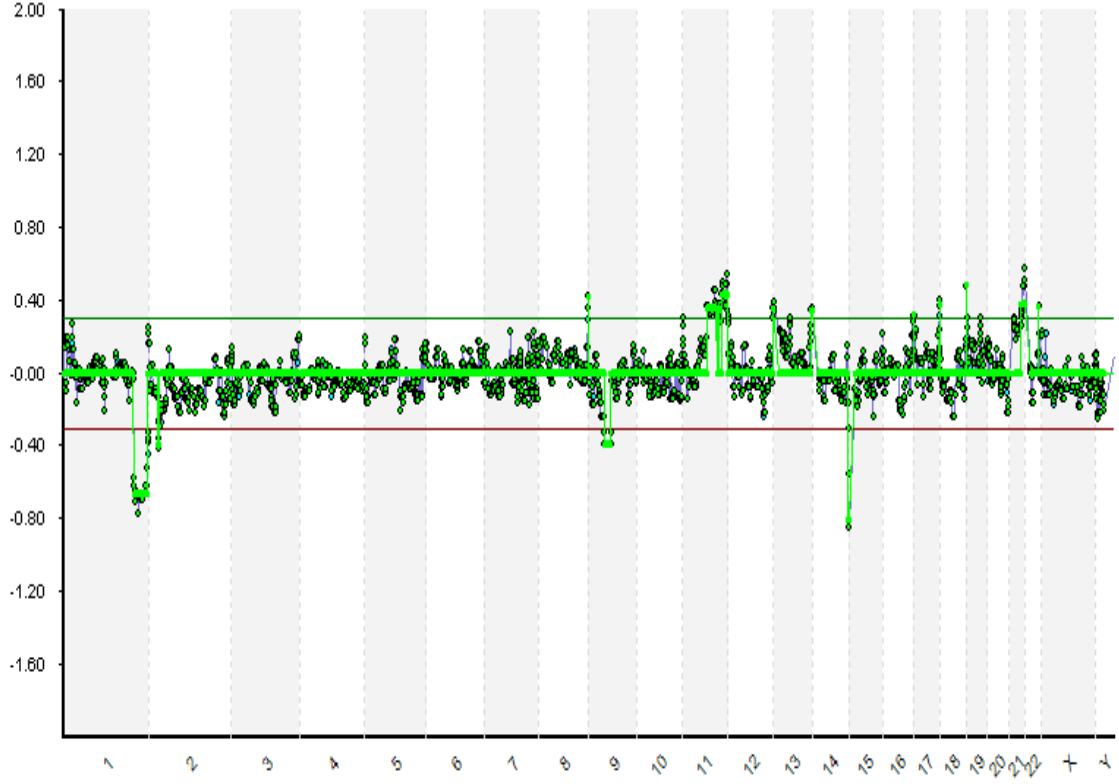
Olgu	Yaş/Cinsiyet	Sağ Kalım	İmmünofenotip
1	6/K	Hayatta	B lineage akut bifenotipik lösemi
2	12/E	Hayatta	Prekürsör B ALL CALLA(+)

3	3/E	Hayatta	B lineage akut bifenotipik lösemi
4	6/E	Hayatta	Bi fenotipik lösemi
5	2/E	Hayatta	Pre B ALL
6	4/K	Hayatta	Pre B ALL
7	1K	Hayatta	-----
8	18/K	Exitus	-----
9	12/K	Hayatta	Pre B ALL
10	12/K	Hayatta	-----

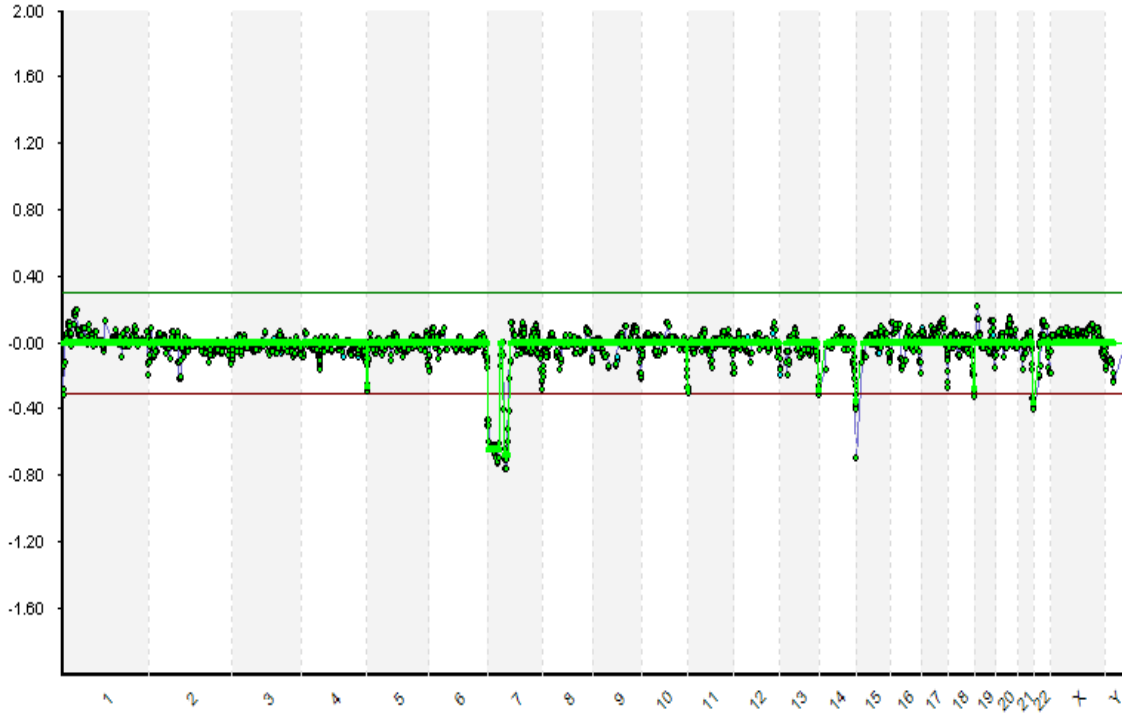
Yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri sonucu, hastalarda saptanan aberasyonlara ait görüntüler aşağıdaki şekillerde gösterildiği gibidir.



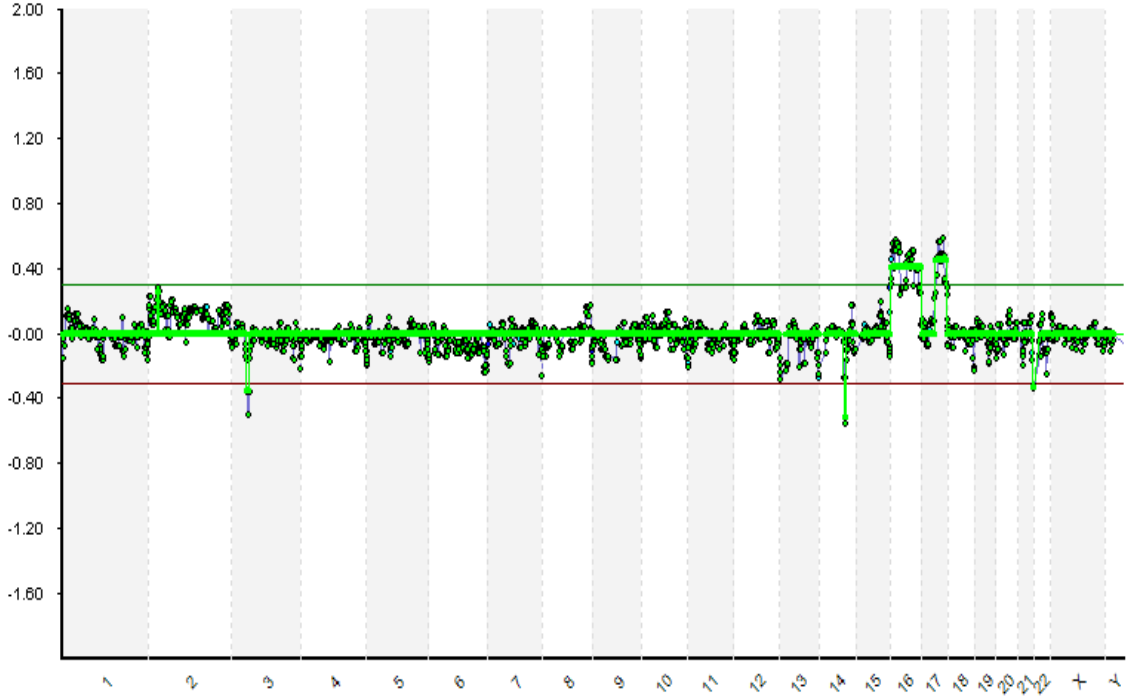
Şekil 4.1. ALL tanılı hasta: tri (6,8,10,14,18,21) , dup (X)



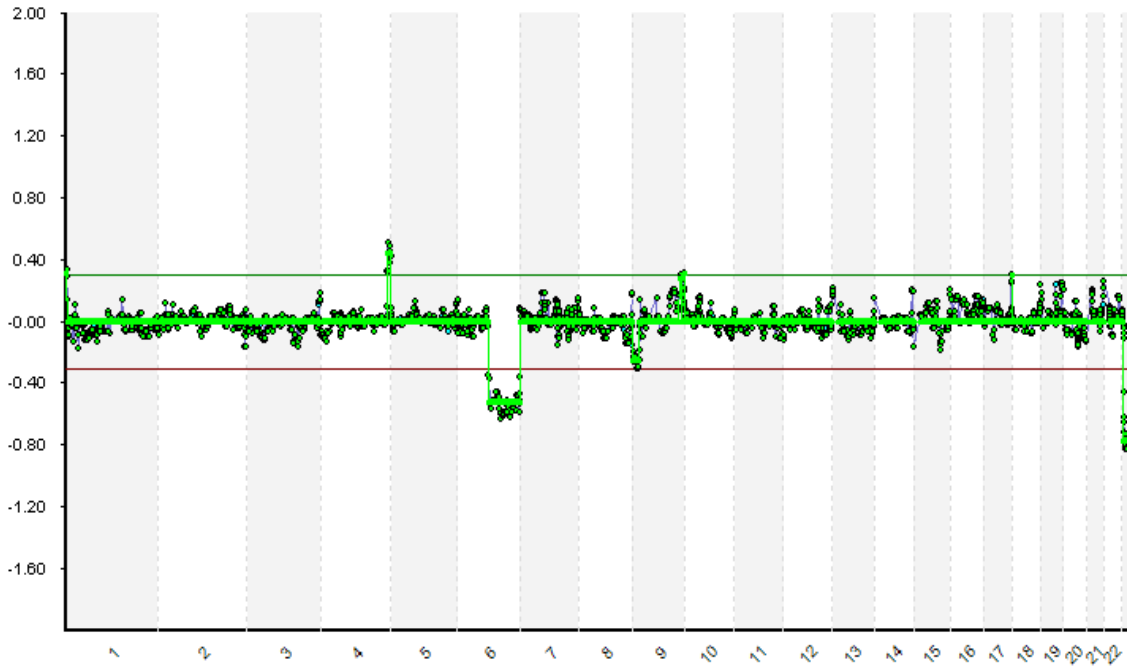
Şekil 4.2. ALL tanılı hasta: del(1)(q32.1q44), dup(11)(q13.4q25), tri 21



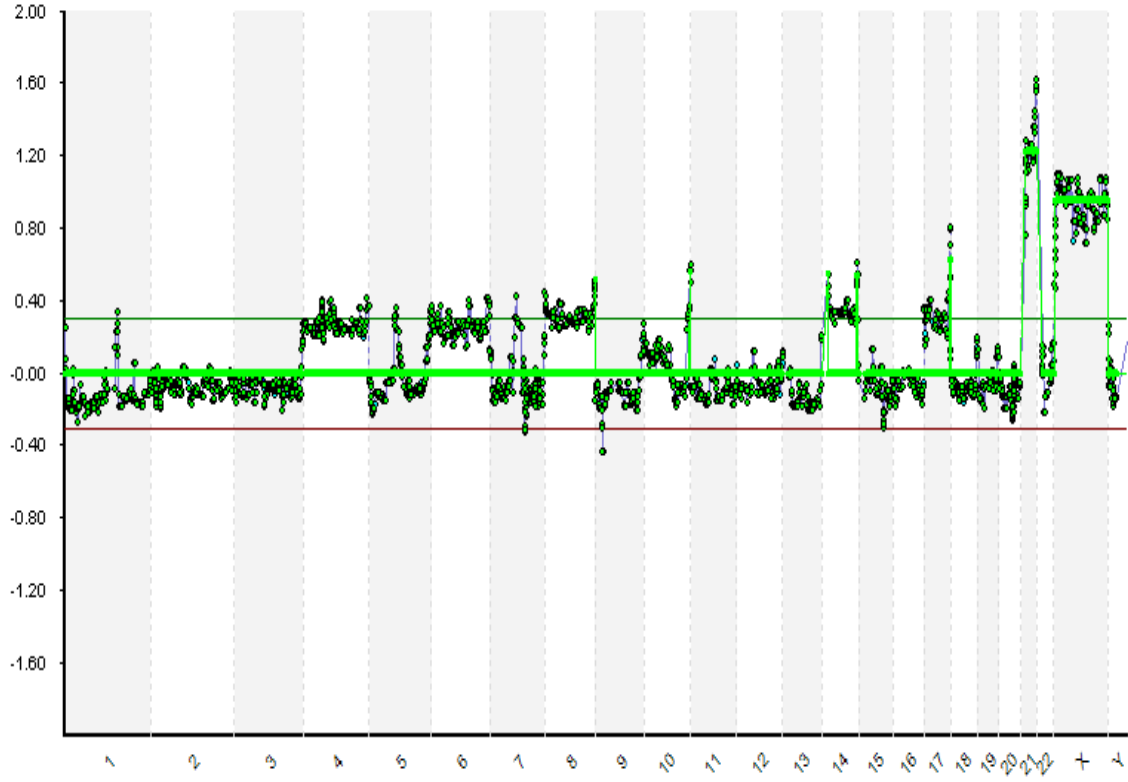
Şekil 4.3. ALL tanılı hasta: del (7p)



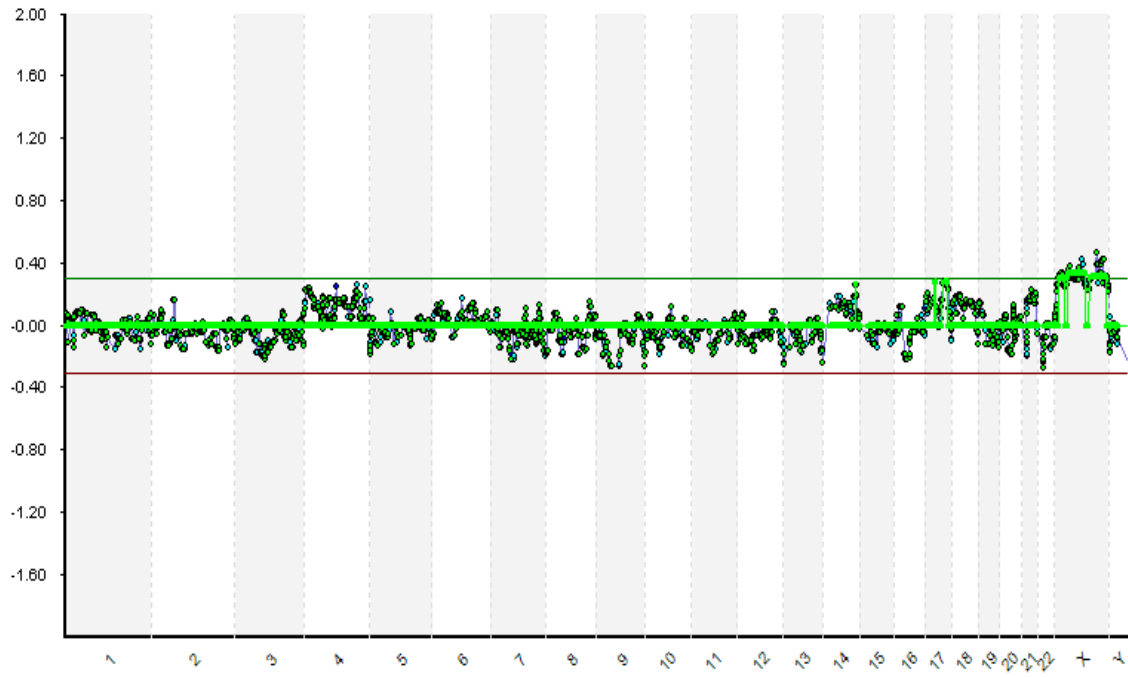
Şekil 4.4. ALL tanılı hasta: tri 2, tri 16, del(3)(p21.31p21.2), del(14)(q24.3), dup(17)(q21.31q25.3)



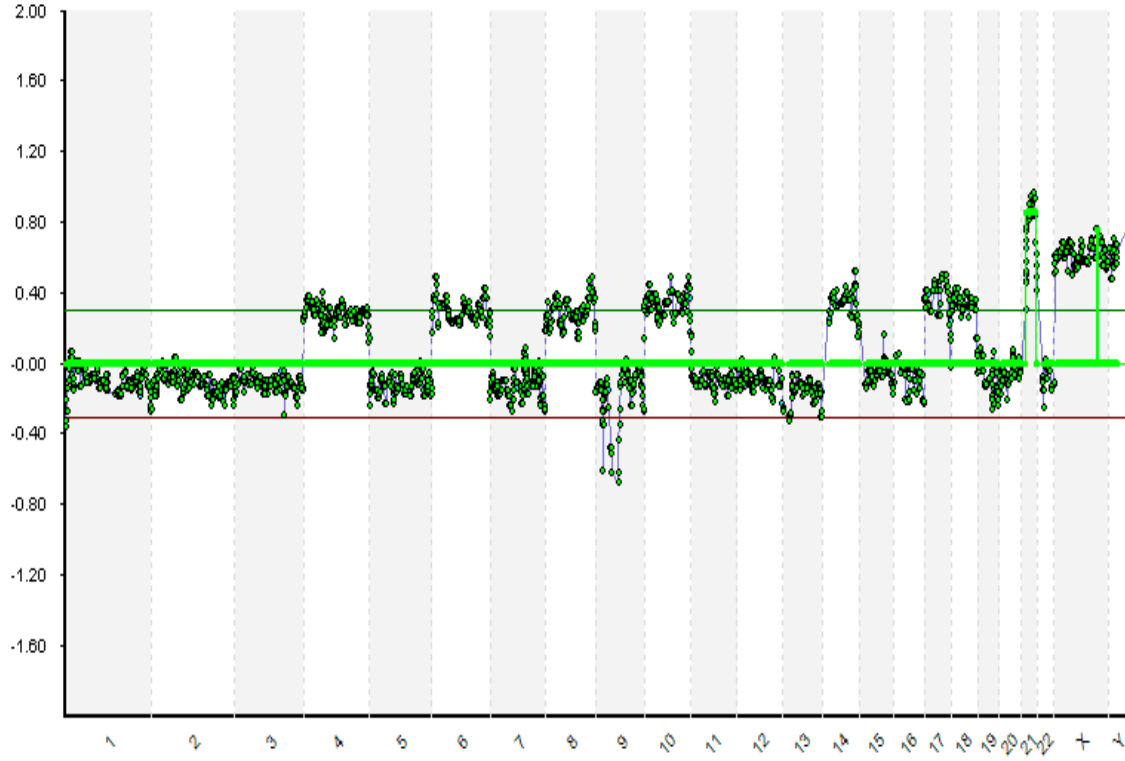
Şekil 4.5. ALL tanılı hasta: dup (4)(q34.3q35.2), del(6)(q14.3q27), del(9)(p24.3p22.2), dup(9)(q34.11q34.3)



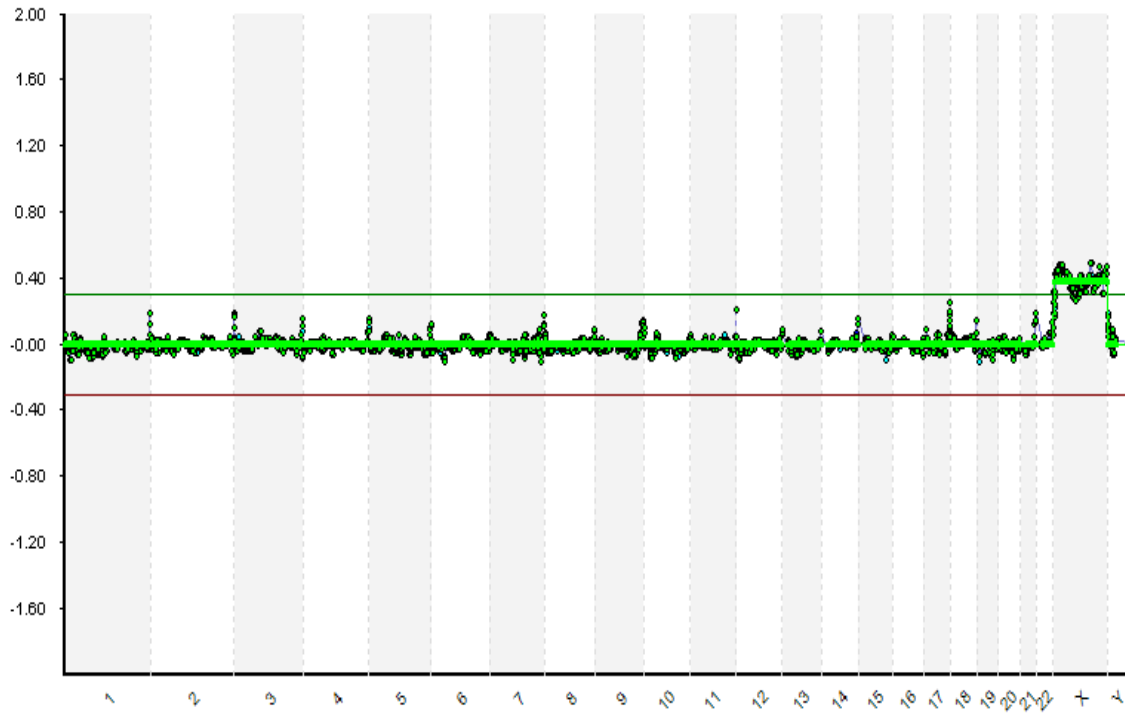
Şekil 4.6. ALL tanılı hasta: tri (4,6,8,14,17,21) ,dup (X)



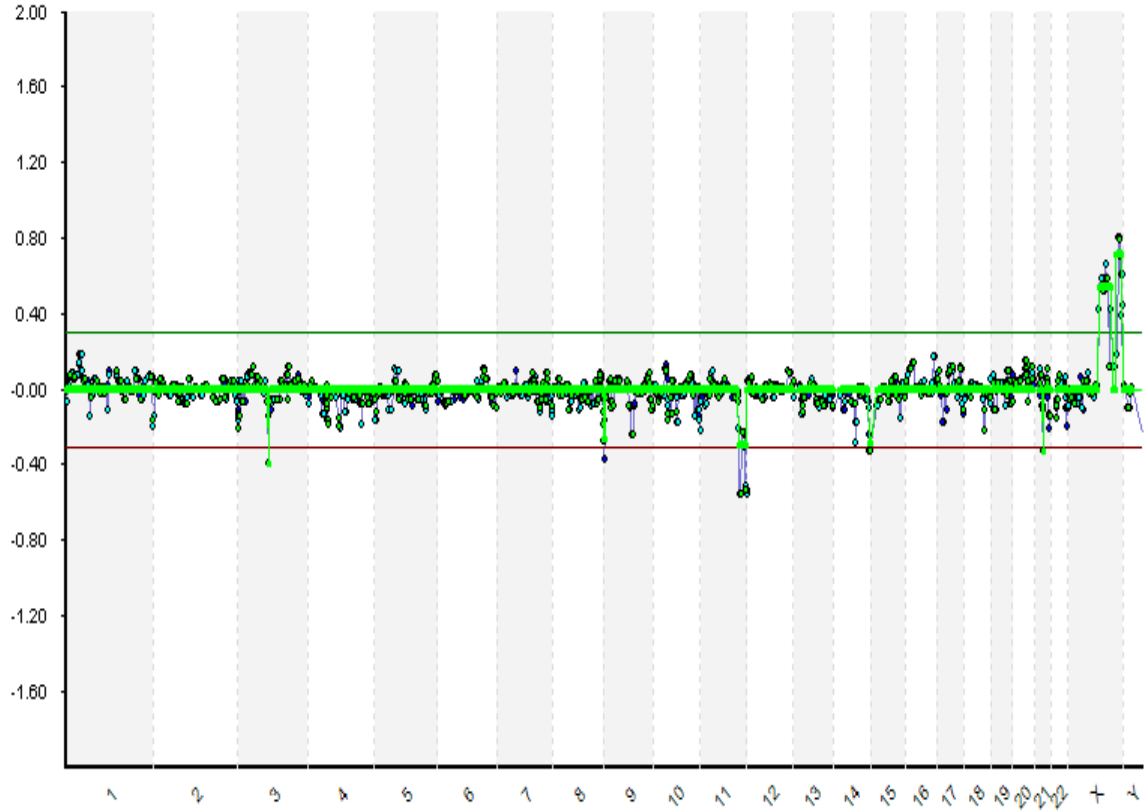
Şekil 4.7. ALL tanılı hasta : tri 4,dup (X)



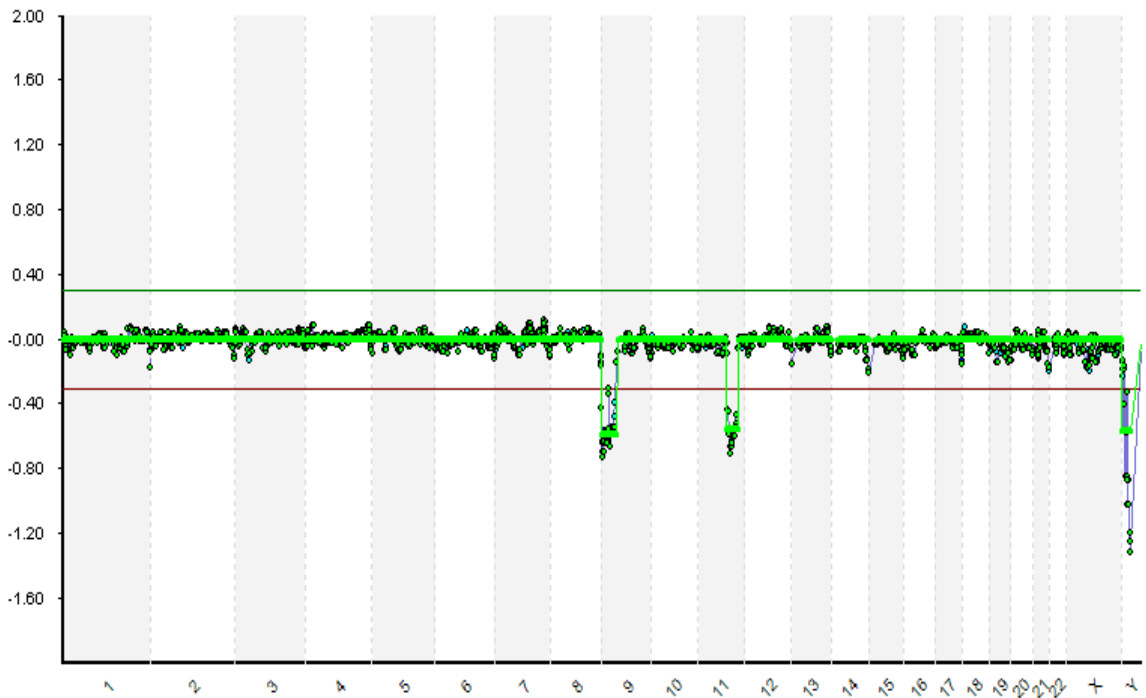
Şekil 4.8. ALL tanılı hasta: tri (4,6,8,10,14,17,18,21), dup(X), dup(Y)



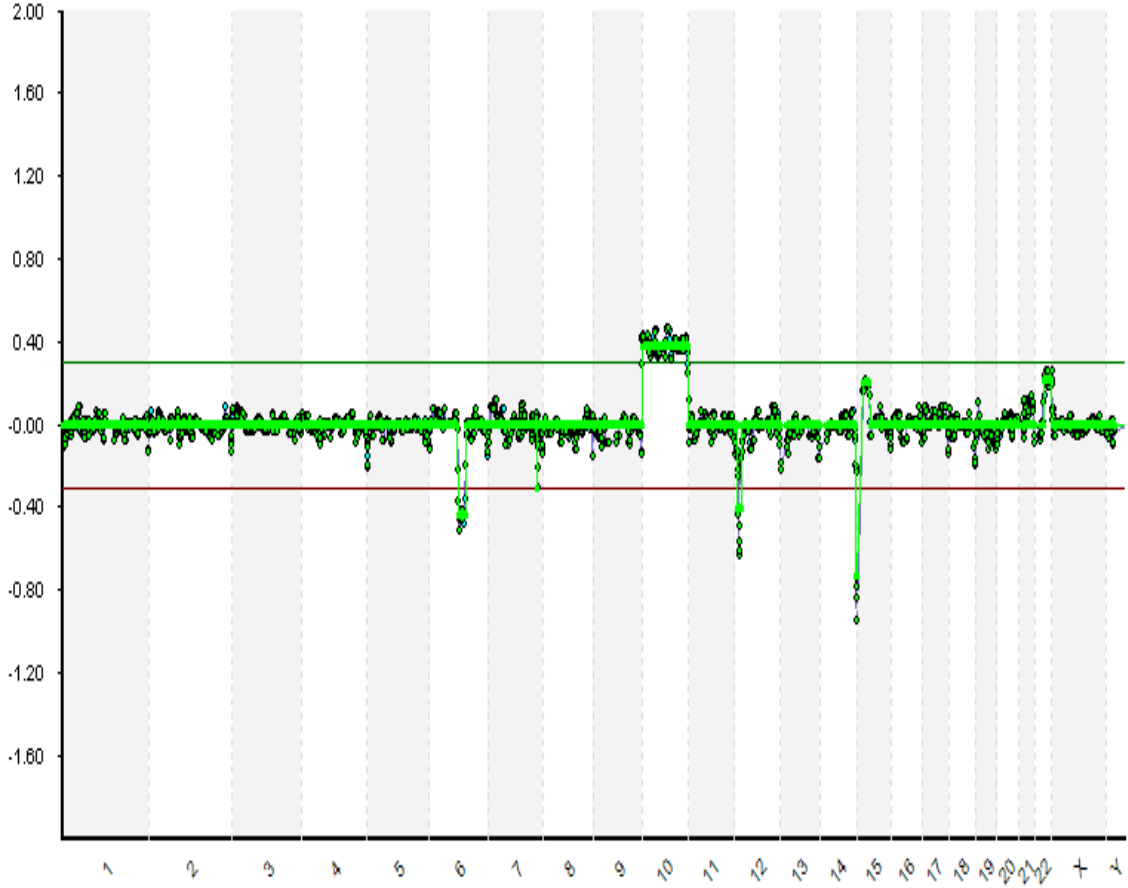
Şekil 4.9. ALL tanılı hasta: dup (X)



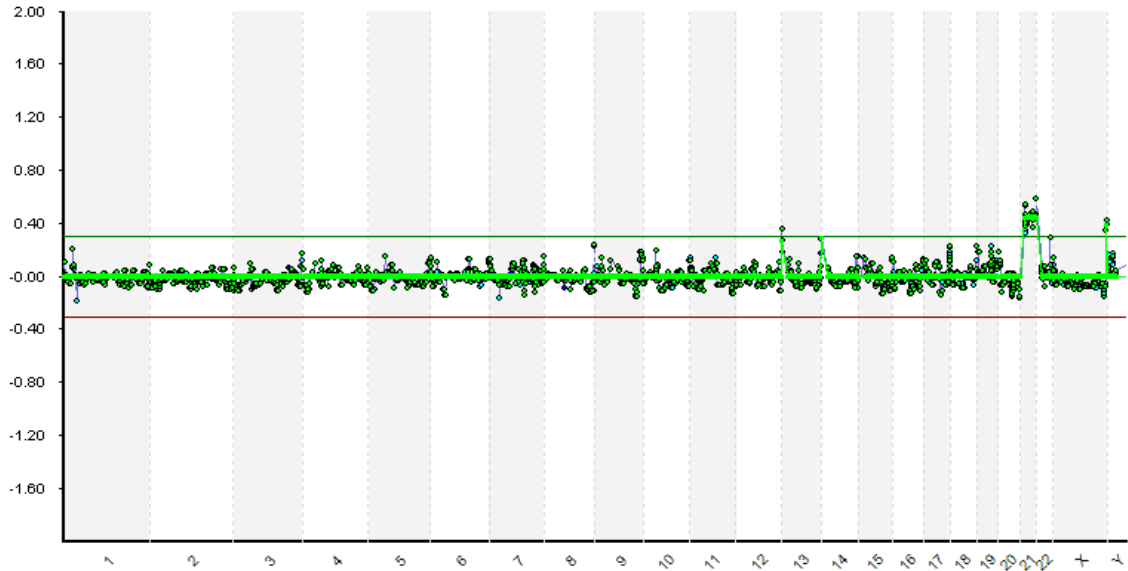
Şekil 4.10. ALL tanılı hasta: del(11)(q23.1q25), dup(X)(q21.31q28)



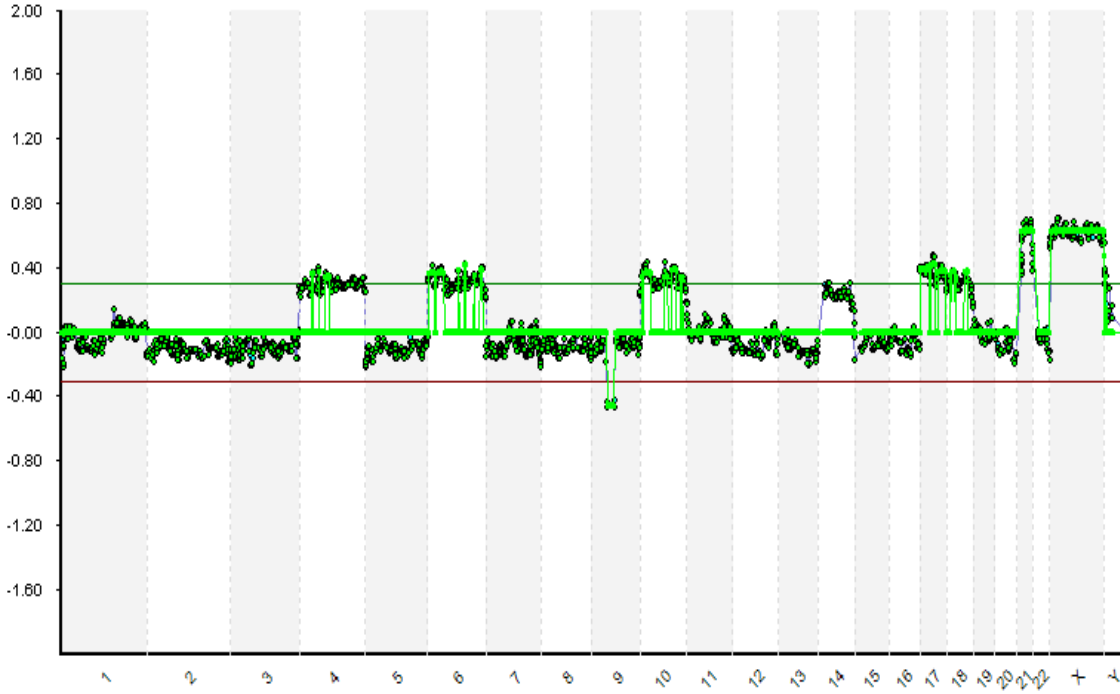
Şekil 4.11. ALL tanılı hasta: del (9)(p24.3p12),del (11)(q14.1q23.2),del (Y)(p11.31q11.23)



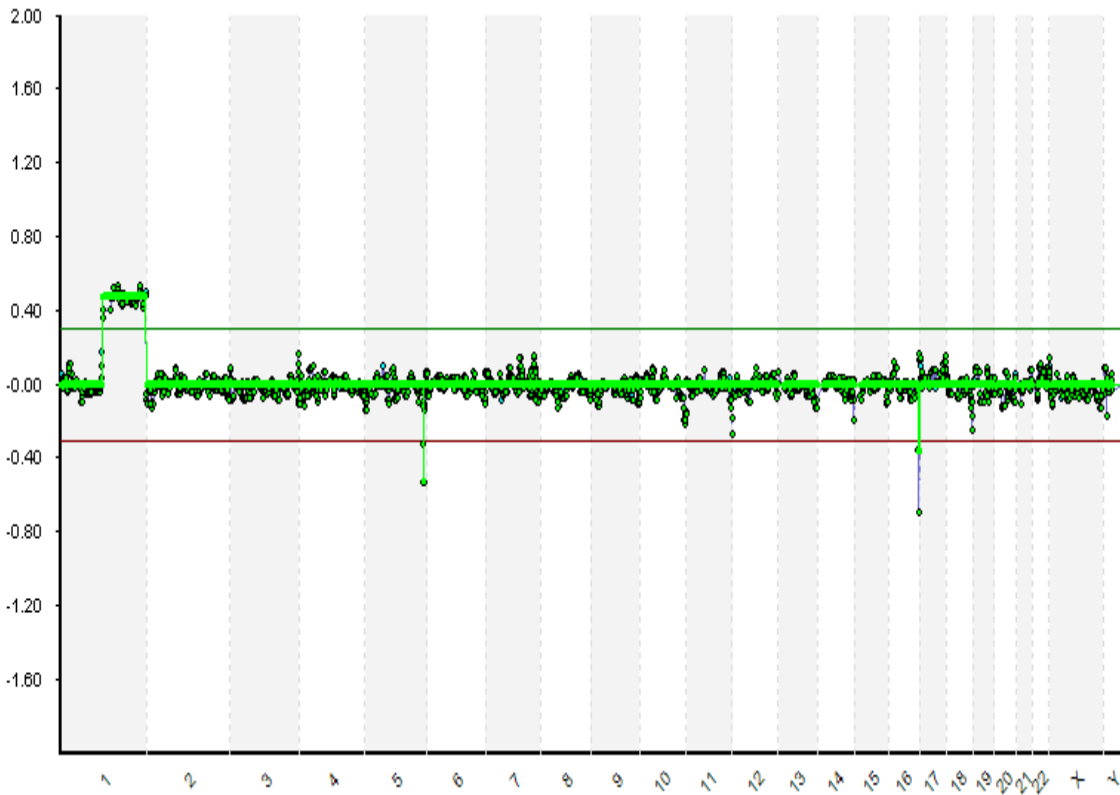
Şekil 4.12. ALL tanılı hasta: del(6)(q14.2q16.3), del(12)(p13.31p12.3), del(14)(q32.33), dup(22)(q12.1q13.3), tri 10



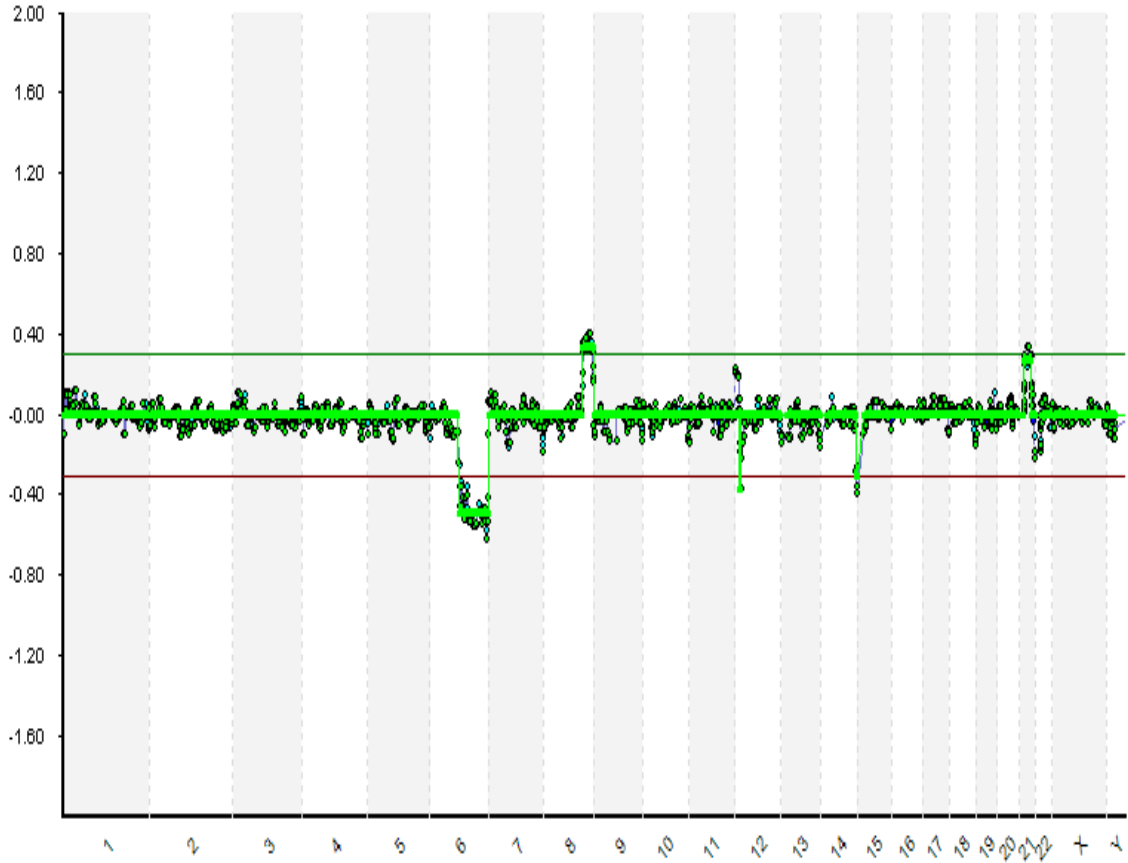
Şekil 4.13. ALL tanılı hasta: tri 21, dup (X)(q28)



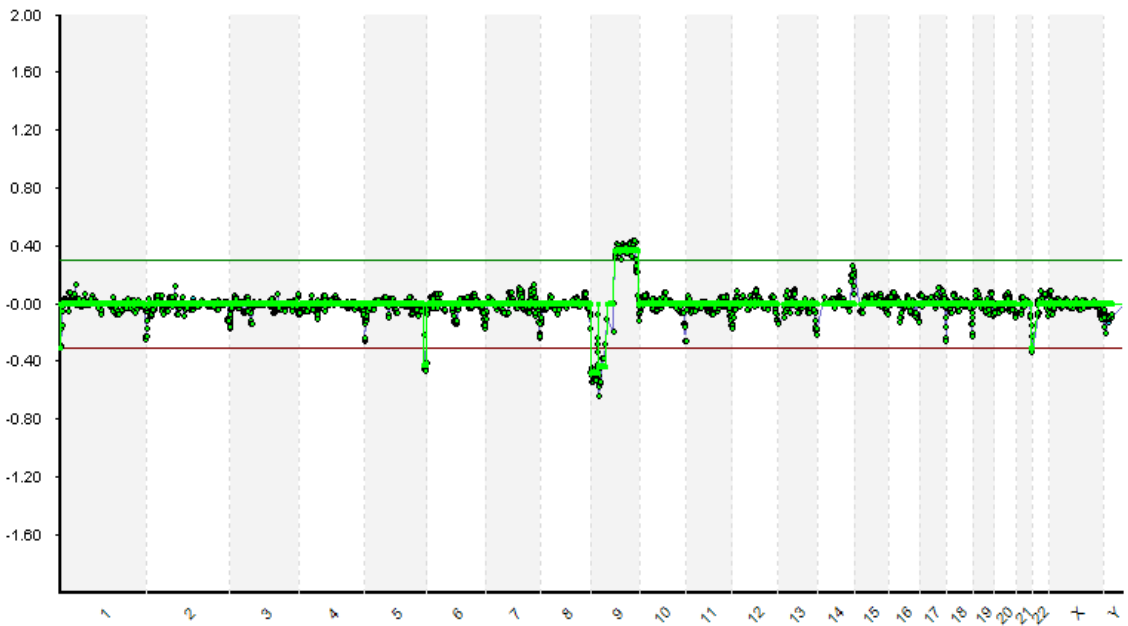
Şekil 4.14. ALL tanılı hasta: tri (4,6,10,14,17,18,21), dup (X)



Şekil 4.15. ALL tanılı hasta: dup(1)(p12q44)



Şekil 4.16. ALL tanılı hasta: del(6)(q14.2q27),dup(8)(q23.3q24.3),dup(21)(q11.2q22.12)



Şekil 4.17. ALL tanılı hasta: del(5)(q35.2q35.3), del(9)(p24.3p12), dup(9)(q21.11q34.3)

5- TARTIŞMA

Hematolojik malignitelerin tanısı ve hastaların uygun tedavisi için kromozomal aberasyonların tespitinin önemi bilinmektedir. Kromozomal aberasyonların tespitinde konvansiyonel sitogenetik, FISH, Q-RT-PCR yöntemleri kullanılmaktadır. Son yıllarda gelişmekte olan mikroarray teknolojisi, hematolojik malignitelerin genetik tanısında yeni bir sayfa açmıştır. Bu yöntem ile tespit edilebilen aberasyonlar, tümör gelişiminde hangi genlerin ve biyolojik olayların sorumlu olabileceğini gösterebilmektedirler. Ayrıca mikroarray'ler kullanılarak yapılan gen ifade profili çalışmaları, hematolojik malignitelerin patogenezinde etkili olmaya aday genleri anlamamıza yardımcı olmuştur. (Akyerli, 2005)

Kromozom anöploidileri ve tekrarlayan kromozom translokasyonları ALL'de sık olarak gözlenmektedir. Bu kromozomal aberasyonlar, hastalığın kliniğini ve prognozunu etkilemektedir (Veken and Buijs, 2011). Bu sebeple, genetik anomalilerin tanımlanması için kromozomal aberasyonların tespiti ve bununla bağlantılı olarak ilgili bölgedeki genlerin lösemi ile bağlantısı araştırılmaktadır.

Yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri ile, kromozomlardaki delesyon ve duplikasyonlar kısa bir süre içerisinde aynı anda tespit edilebilmektedir. Tanı ve prognostik açıdan, tanımlanmış dengeli kromozom anomalilerinin saptanmasında Q-RT-PCR yöntemi de sıklıkla kullanılmaktadır. Çalışmamızda, ALL ön tanılı 29 çocuk hasta üzerinde gerçekleştirdiğimiz yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri ve Q-RT-PCR çalışması sonucunda çeşitli aberasyonlar tespit ettik.

ALL'de en sık görülen sayısal anomali, 21. kromozom kazanımlarıdır. Bu anomali B-hücreli ALL fenotipiyle ilişkilendirilmiş olup, çocukluk çağı ALL'sinde 47-50 ve 50 üzeri kromozom içeren ploidi gruplarında sırasıyla %40 ve %80 oranında gözlemlendiği bildirilmektedir. 21. kromozomun kazanımı tek olarak bulunduğu, iyi prognozla ilişkili olduğu bildirilmiştir. 47-50 kromozomlu grupta, +21 ile birlikte, kötü prognozla ilişkisi olan başka aberasyon bulunmadığında, bu aberasyon çocukluk çağı ALL'si için oldukça iyi prognozu göstermektedir. Aynı ploidi grubundaki yetişkinlerde ise prognostik etkisi yoktur. Kromozom 21'in içerdiği genlerin lösemi patogenezinde etki mekanizması tam olarak aydınlatılmamış olup, 21q22 bölgesinin kritik bölge olabileceği düşünülmektedir (<http://atlasgeneticsoncology.org>). Jarosová ve arkadaşlarının, ALL tanılı 65 çocuk hasta

üzerinde yaptığı konvansiyonel sitogenetik, FISH ve aCGH çalışmasında, en sık rastlanan aberasyonun %35 oranla (23 olguda), 21. kromozomun artışı olduğunu rapor edilmiştir (Jarosová et al., 2000). Bizim çalışmamızda bu anomaliye 6 olguda (%20,7) rastladık ve çalışmamızdaki en sık rastlanan aberasyonlardan biri olarak literatürle uyumlu bulunmuştur.

X kromozomunun kaybı veya kazancı diğer kromozomal anomalilerle beraber görülebilmektedir ve başta çocukluk çağı ALL'si olmak üzere, neredeyse bütün hematolojik malignitelerde tanımlanmıştır (Yamamoto et al., 2004). Ancak, ALL'de tek başına anomali olarak ender görülmektedir. Larramendy ve arkadaşlarının çocukluk çağı ALL sinde CGH ile DNA kopya sayısı değişimlerinin tespiti ve benzer çalışmalardan yapılan derleme sonucunda, 193 hastada, X kromozomunun artışını %26 oranında bulduklarını rapor etmişlerdir. (Larramendy et al.,1998). Bizim çalışmamızda ise %20,7 (6 olguda) oranında bulduk. Larramendy ve arkadaşları X ve 21. kromozomun artışını %26-27 oranında çalışmadaki en sık aberasyon olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda X ve 21. kromozomun artışını aynı oranda, en sık görülen aberasyon olarak saptayıp, benzer çalışmalarla ilişkili olduğunu düşünmekteyiz. Prognoza etkisi tam olarak bilinmemekle beraber, bir çalışmada X kromozomu kazanımının hücresel çoğalma ve farklılaşmayı etkileyen onkogenlerin artışına ve yüksek onkojenik potansiyele yol açabileceği rapor edilmiştir (Yamamoto et al., 2004). Ayrıca bir olgumuzda t(4;11)'e ek olarak X kromozomunun artışına rastladık. Olgumuz pro B ALL immüfenotipinde 1 yaşında olup, tanı konduktan bir hafta sonra exitus olmuştur. Literatüre bakıldığında t(4;11)'in birlikte en sık X kromozomunun artışıyla saptandığını gördük (Johansson et al., 1998). t(4;11), tek başına kötü prognozu göstermektedir ve kompleks karyotiple prognozun değişmediği düşünülmektedir (<http://atlasgeneticsoncology.org/>).

Çalışmamızda X ve 21. kromozom artışından sonra en sık gözlenen trizomiler, %13,8 oranla (n=4) 4, 6, 10, 14, %10,3 oranla (n=3) 17, 8, 18 ve %3,4 oranla (n=1) 2 ve 16'dır. Literatür incelendiğinde, benzer çalışmalarda saptanan kromozom artışları karşılaştırıldığında, kromozom artışlarının oranlarında farklılıkla karşılaşılmış olup, bu farklılığın hasta sayısından kaynaklandığını düşünmekteyiz (Karhu et al., 1997; Larramendy et al.,1998; Jarosova et al., 2000; Wong et al, 1998).

9.kromozomun kısa kolundaki sitogenetik anomalilere çocukluk çağı ALL'sinde sıkça rastlanmaktadır. 9p21 bölgesi, tümör süpresör genleri olan p16INK4a, p14ARF ve p15INK4b kodlamaktadır (Nahi et al., 2008). p16 geni, hücre döngüsünü kontrol eden birçok genlerden

biridir ve homozigot delesyonu ALL patogeneziyle ilişkilendirilmektedir. Bu bulgunun klinikle ilişkisi önemlidir. (Jarosova et al.,2000). Heerema ve arkadaşlarının 1839 yeni tanı almış çocuk ALL hastasında yapmış olduğu çalışmada 201 (%11) olguda 9p aberasyonlarına rastladıklarını rapor etmişlerdir ve 9p anomalisi olan hastaların büyük kısmını yüksek riskli grup olarak sınıflandırmışlardır. 9p anomalisini kompleks karyotiple beraber gözlemlediklerini bildirmişlerdir. 1-9 yaş arası, WBC değeri 50000'den az ve 9p anomalisi olan hastaları standart risk grubu, yaşı 10'dan büyük, WBC değeri 50000'den fazla olan olguları da yüksek risk grubu olarak sınıflandırmışlardır. 9p anomalisi olan B ALL hastalarını için kötü risk faktörü olduğunu fakat T-ALL için olmadığını rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda, 3 olguda (%10,3) 9p anomalisi saptadık. Bu 3 olguda da 9p anomalisini kompleks karyotiple beraber gözlemledik. Heerema ve arkadaşlarının çalışmasına dayanarak, bizimde hastalarımız orta ve standart risk tedavi grubuna girmektedir. Standart risk grubunda, 9p anomalisi olan hastalarda, tedavi başarısızlığının arttığını rapor etmişlerdir (Heerema et al.,1999).

6. kromozomun uzun kolundaki delesyonlar, en sık olarak ALL, KLL, prolenfositik lösemi ve non-Hodgkin lenfoma gibi lenfoid kökenli lösemilerde gözlenmektedir. B hücreli ALL'de, 6q anomalisi prognoza etki etmezken, T hücreli ALL olgularında ise 6q anomalisi, %10-20 oranla en sık gözlenen anomalilerden biridir ve 14q11 veya del(9p) anomalileriyle beraber gözlenebilir. 6q delesyonuna sahip olguların prognozları, normal diploid karyotipli olgularla benzerdir. ALL'de, 6q anomalisi %30 oranla tek olarak saptanabildiği gibi, del(12p)(erken pre B ALL), del(9p)(B ve T hücreli immünofenotip) gibi yapısal anomaliler, t(4;11), t(1;19), t(9;22), t(12;21) gibi spesifik aberasyonlar veya rastgele kromozomal değişimlerle de beraber gözlenebilmektedir. 6q21 bölgesindeki kaybın, resesif tümör süpresör genlerin yokluğuna yol açtığı ve bunun sonucunda T ve B hücreli ALL nin meydana geldiği düşünülmektedir. 6q anomalileri, lenfoid lökomogenezisindeki basamaklarda etkiye sahiptir. 6q21-22 lokusunun, diaagnoz ve relapsta önemli bir yeri olduğu düşünülmektedir (<http://atlasgeneticsoncology.org/>). Larramendy ve arkadaşlarının literatürdeki benzer çalışmaların derlemesiyle yaptığı çalışmada, 193 çocukluk çağı ALL'si ile ilgili aberasyonları bildirmişlerdir (Larramendy et al., 1998). Çalışmada, 6q delesyonunu %3 oranında bulduklarını rapor etmişlerdir. Biz 29 olgudan 3(%10,3) olguda 6q bölgesine ait delesyon saptadık. 2 olguda del(6)(q14.2q27) ve 1 olguda del(6)(q14.2q16.3) saptadık. 3 olguda B hücreli ALL immünofenotipindeydi. 6q aberasyona ek olarak farklı aberasyonlarda saptadık.

Bu bölgede bulunan tümör süpresör genlerin, ALL üzerindeki etkilerine ait çalışmalara yoğunluk verilebileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda 3 (%10,3) olguda, 11q'ya ait aberasyonlar saptadık. Hastalarımızda aberasyonlar sırasıyla dup(11)(q13.4qter), del(11)(q23.1qter), del(11)(q14.1q23.2)'dir. Bunlara ek olarak farklı aberasyonlara da rastladık. Benzer çalışmalarda 11q ile beraber kompleks karyotip gözlenmiştir (<http://atlasgeneticsoncology.org/>). 11. kromozomun uzun kolunda, en önemli bölge 11q23 bölgesidir. 11q23'deki dengeli translokasyonlar spesifik klinik özellikler ve kötü prognoz ile ilişkilidir, ancak 11q23'ün içerdiği delesyonların önemi tam olarak aydınlatılamamıştır (Harbott et al., 1998). 11q23'te lokalize olan MLL geninin ALL'nin prognozunda oldukça büyük rolü vardır. ALL'li bebeklerin anne karnındayken, 11q23 anomalisinin meydana geldiğine dair çok güçlü moleküler deliller vardır. MLL geninin normal hematopoetik büyüme ve farklılaşmada önemli bir rolü vardır. Bu lokustaki anomaliler, hematopoetik kök hücre gelişimin erken safhasında meydana gelir. MLL geninin, apoptosis ve lökomogenezinin inhibisyonuna yol açtığı düşünülmektedir (<http://atlasgeneticsoncology.org/>). MLL geninin yer aldığı t(4;11) translokasyonunun tüm akut lösemiler için kötü prognostik özellikte olduğu kabul görünürken, diğer translokasyonları aynı kategoriye sokabilecek yeterli takip verisi henüz bulunmamaktadır (Özbek, 2006). Bu konudaki çalışmaların artırılması ve bu bölgedeki delesyonların prognoza etkilerinin aydınlatılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda 1'er kere gözlemlediğimiz delesyonlar, del(1)(q32.1qter), del(7p), del(3)(p21.31p21.2), del(14)(q24.3), del (14)(q32.33), del(Y), del(5)(q35.2qter), del(12)(p13.31p12.3) ve duplikasyonlar ise dup(8)(q23.qter), dup(21)(q11.2q22.12), dup(X)(q21.31qter), dup (Y), dup(17)(q21.31qter), dup(1)(p12qter), dup(22)(q12.11qter), dup (4)(q34.3qter), dup (X)(q28) şeklindedir. Az oranda gözlemlediğimiz bu aberasyonların içerdiği lokusların, benzer çalışmalarda, aberasyonlarının bildirilmediği gözlemlenmiştir (Karhu et al., 1997; Larramendy et al., 1998; Jarosova et al., 2000; Wong et al., 1998). Bu bölgeler hakkındaki yapılan çalışmalara yoğunluk verilmesi ve bu bölgedeki tümör süpresör genlerin aydınlatılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Kanser sitogenetiğinin iki ana hedefi vardır. Bunlardan birincisi, temel kanser araştırmalarına yönelik olup, spesifik kromozom anomalilerinin tanımlanması, primer ve sekonder değişikliklerin ve özellikle kırık noktalarının belirlenmesi, bu noktada üretimi

değişen ya da üretimi kaybedilen genlerin tanımlanarak, tümör gelişimindeki biyolojik mekanizmaların aydınlatılmasına olanak sağlamaktır. İkincisi ise klinik uygulamalardır. Belirli kanserlerde primer ve sekonder kromozom değişikliklerinin bilinmesi, tanının kesinleşmesinde, prognozda, tedavi protokolünün düzenlenmesinde, minimal rezidüel hastalığın takibinde büyük önem kazanmaktadır. Akut lenfoblastik lösemi de karyotip bulguları, anlamlı prognostik bilgi sağlamak ve sitogenetik bulguların değişkenliği bağımsız olarak prognostik önem taşımaktadır (Felix and Lange, 1999; Pala, 2005; Sreekantaiah, 2007; Yakut ve Gülten, 2005). Sitogenetik yöntemlerin, hematolojik malignitelerin tanısında önemli bir yeri olduğu bilinmektedir. Kemik iliği veya periferik kandan elde edilen metafaz plaklarından, hastanın karyotip bilgisine ulaşılmaktadır. Ancak bu yöntemle, deneyin uzun sürmesi ve analizinin zor olması, hastalığın takibi sırasında olumsuzluklara yol açmaktadır. Ayrıca elde edilen metafaz plaklarının morfolojilerinin kötü olması, sayısal veya yapısal anomalileri saptamada zorluk çıkarmaktadır. Hatta tümör hücrelerinin zor kültür olmasından dolayı sonuç bile verilemeyen durumlar olabilmektedir. Tüm bu zorluklardan dolayı araştırmacılar yeni bir teknoloji geliştirerek bu zorlukları ortadan kaldırmayı amaçlamışlardır. Yeni bir yöntem olan yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri, kromozomal kazanç ve kayıpları saptamada metafaz plaklarına ihtiyaç duymadan, az miktarda DNA'dan sonuç vermektedir. Kısa sürede genomdaki aberasyonları yüksek hassasiyetle tarayıp sonuç vermesi gelecekte sitogenetik yöntemlerin yerini alacağı düşündürmektedir. Ancak bu yöntem dengeli translokasyonları saptayamamaktadır. Bu yüzden Q-RT-PCR'nin önceden tanımlanmış dengeli translokasyonları doğru şekilde saptaması, bu iki yöntemin beraber kullanılmasının, lösemilerde hem ön tanı belirlenmesinde hem de takipteki olguların genomik değişikliklerinin izlenmesinde önemli sonuçlar ortaya çıkarmaktadır. Bu kombine yöntem sayesinde, hematolojik hastalıkların tanısı, hastalık alt gruplarının belirlenmesi, tedavi seçeneklerinin değerlendirilmesi gibi alanlarda yaygın olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Bu yöntemin, lösemideki değerinin gerçek sınırlarının tespiti için geniş hasta gruplarını içeren konfirmatif çalışmalar gerekmektedir.

6-SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, çocukluk çağı ALL ön tanılı 29 hasta yer almıştır. Yüksek çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizleri sonucu, 17 (%58,6) hastada genomun farklı bölgelerinde, çeşitli boyutlarda aberasyonlar saptanmıştır. Bu 17 hastanın 1'inde (%3,4) bulunan aberasyonlara ek olarak Q-RT-PCR yöntemi ile MLL-AF4 füzyon geni varlığı saptanmıştır. Hastaların 2'sinde (%6,9) ise yalnızca Q-RT-PCR sonucu olan, MLL-AF4 ve BCR-ABL füzyon geninin varlığına rastlanılmıştır.Çalışmada yer alan hastaların 10'unda (%34,5), her iki yöntemle de herhangi bir aberasyon saptanmamıştır.

Sonuç olarak, bu iki yöntemin beraber kullanılmasıyla elde edilen bilgiler, hematolojik malignitelerin erken tanısında ve prognozun seyrinin belirlenmesinde yeni bir yaklaşım sağlamaktadır. Kısa sürede alınan sonuçlar sayesinde erken tanıya olanak sağlayarak lösemi tedavisinin etkinliğinde oldukça önemli bir yer tutacağını düşünmekteyiz. Benzer verilerin izleyen çalışmalarda genişletilmesiyle, klinisyenlere hastalığın seyri ve takibi açısından yardımcı olabilecek yeni tanısal yaklaşımlar elde edilebileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Akyerli, C.B. (2005) Hematolojide mikroarray kullanımı. Temel Moleküler Hematoloji Kursu, Mersin, 23-24.
- Albayrak, A. (1983) Hematopoetik sistemin neoplastik hastalıkları. Erzurum, Atatürk Üniversitesi Yayınları.
- Ali, R. (2006) Akut lösemiler WHO sınıflandırması ve nadir akut lösemi tipleri. Türk Hematoloji Derneği Akut Lösemi Kursu, Ankara.
- Apak, H. (2006) Çocukluk Çağı lösemileri. Türk Pediatri Arşivi, 41:189-195.
- Ar, M.C., Öngören, Ş., Ferhanoglu, B., Aydın, Y., Eşkazan, E., Soysal, T., Ülkü, B., Başlar, Z., Çetin, G. (2008) Akut Lösemiler. Hematoloji Ders Kitabı, İstanbul, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları.
- Arico, M., Valsecchi, M.G., Camitta, B., Schrappe, M., Chessells, J., Baruchel, A., Gaynon, P., Silverman, L., Schaub, G.J., Kamps, W., Pu, C.H., Masera, G. (2000) Outcome of treatment in children with philadelphia chromosome positive in acute lymphoblastic leukemia, The New England Journal of Medicine, 342: 998-1006.
- Bassan, R., Gatta, G., Tondini, C., Willemze, R. (2004) Adult acute lymphoblastic leukaemia, Critical Reviews Oncology Hematology, 50: 223–261.
- Başaran, N. (1985) Tıbbi Genetik, 3.Baskı, Bilim Teknik Yayınevi, İstanbul.
- Başlar, Z. (2005) Erişkinlerde akut lösemiler. Hematolog olmayanlar için hematolojik maligniteler, Aydın, Y., Başlar, Z., Apak, H., e.d., İstanbul, 171-180.
- Bayani, J., Squire, J.A. (2004) Fluorescence in situ hybridization (FISH). Current Protocols in Cell Biology, 23:22.4.1-22.4.51.
- Behm, F.G., Raimondi, S.C., Frestedt, J.L., Liu, Q., Crist, W.M., Downing, J.R., Rivera, G.K., Kersey, J.H., Pui, C.H. (1996) Rearrangement of the MLL Gene Confers a Poor Prognosis in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Regardless of Presenting Age, Blood, 87: 2870-2877.
- Belson, M., Kingsley, B., Holmes, A. (2007) Risk Factors for acute leukemia in children: A Review, Environ Health Perspect, 115: 138–145.
- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Fladrin G., Galton, D.A.G., Gralnick H.R., Sultan C.(1981) French - American-British (FAB) Cooperative Group: The Morphological classification of acute lymphoblastic leukemia: concordance among observers and clinical correlations. Br J Hematol ,47: 533-561.
- Biondi, A., Masera, G. (1998) Molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukemia. Haematologica, 83(7): 651-659.
- Celkan, T. (2007) Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemisi. Klinik Gelişim, 20: 14-25.
- Chaplin, B.E., Rasmussen, R.P., Bernard, P.S., Wittwer, C.T. (1999) LightCycler™ hybridization probes the most direct way to monitor PCR amplification and mutation detection, Biochemica, 1:5-8.
- Chen, C.S., Sorenson, P.H.B., Domer, P.H., Reaman, G.H., Korsmeyer, S.J., Heerema, N.A., Hammond, G.D., Kersey, J.H. (1993) Molecular rearrangements on chromosome 11q23 predominate in infant acute lymphoblastic leukemia and are associated with specific biologic variables and poor outcome. Blood, 81:2386-2393.
- Chessells, J.M., Harrison, C.J., Kempski, H., Webb, D.K., Wheatley, K., Hann, I.M., Stevens, R.F., Harrison, G. (2002) Clinical features, cytogenetics and outcome in acute lymphoblastic and myeloid leukemia of infancy: report from MRC Childhood Leukemia working party. Leukemia, 16(5):776-784.
- Cimino, G., Elia, L., Rapanotti, M.C., Sprovieri, T., Mancini, M., Cuneo, A., Mecucci, C., Fioritoni, G., Carotenuto, M., Mora, E., Liso, V., Annino, L., Saglio, G., Rossi, G.D., Foa, R., Mandelli, F.A. (2000)

Prospective study of residual- disease monitoring of the ALL1/AF4transcript in patients with t(4;11) acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 95(1): 96-101.

Crist, W., Pullen, J., Boyett, J., Falletta, J., Eys, J., Jackson, J., Dowell, B., Russell, C., Quddus, F. (1988) Acute lymphoblastic leukemia in adolescents:clinical and biologic features predict a poor prognosis-A Pediatric Oncology Group study, *Journal of Clinical Oncology*, 6:34-43.

Crist,W.,Pullen, J., Boyett, J., Falletta, J., Eys, J., Jackson, J., Dowell, B., Russell, C., Quddus, F. (1986) Clinical and biologic features predict a poor prognosis in acute lymphoid leukemias in infants:A Pediatric Oncology Group Study, *Blood*, 67:135-140.

Dave, B.J., Wiggins, M., Higgins, C.M., Pickering, D.L., Perry, D., Aoun, P., Abromowich, M., Vetten, M.D., Sanger, W.G. (2005) 9q34 Rearrangements in BCR/ABL fusion-negative acute lymphoblastic leukemia, *Cancer Genetics and Cytogenetics*,162(1):30-37.

Durak, B. (2005) Hematolojide FISH. Türk Hematoloji Derneği- Moleküler Hematoloji Kursu, 13-17.

Durmaz, R., (2001) Polimeraz zincir reaksiyonunun tipleri. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, 35-43.

Ely, T., Giesler, D., Moore K. (1998) Çocukluk Kanseri, Hemşireler İçin Kanser El Kitabı, 2. Baskı, 361-64 Amerikan Kanser Birliği, Ankara.

Felix, C.A., Lange, B.J. (1999) Leukemia in infants. *The Oncologist*, 4: 225-240.

Günel, T. (2007) Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-Time PCR” Bilimsel Mektup. *Türkiye Klinikleri*, 27:763-767.

Güran, Ş. (2005) Hematolojik Hastalıklarda Sitogenetik. Türk Hematoloji Derneği Moleküler Hematoloji Kursu, Mersin.

Hammond, D., Sather, H., Nesbit, M., Miller, D., Coccia, P., Bleyer, A., Lukens, J., Siegel, S. (1986) Analysis of prognostic factors in acute lymphoblastic leukemia. *Medical and Pediatric Oncology*, 14:124-134.

Harbott, J., Mancini, M., Verellen-Dumoulin, C., Moorman, A.V., Secker-Walker, L.M. Hematological malignancies with a deletion of 11q23: cytogenetic and clinical aspects. *European 11q23 Workshop participants. Leukemia*, 12(5):823-827.

Harbott, J., Viehmann, A., Borkhardt, A., Henze, G., Lampert, F. (1997) Incidence of TEL/AML1 fusion gene analyzed consecutively in children with acute lymphoblastic leukemia in relapse. *Blood*, 90:4933-4937.

Harrison, C.J., (2001) Acute lymphoblastic leukaemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 14(3):593-607.

Hazar, V. (2008) Çocukluk Çağı Kanserlerinde Kemik İliği Transplantasyonu. *Güncel pediatri*, 6:69-77.

Haznedaroğlu, İ.C. (2006) Kronik Miyeloid Lösemi(KML). Türk Hematoloji Derneği Moleküler Hematoloji Kursu, Ankara.

Heerema, N.A., Sather, H.N., Sensel, M.S., Liu-Mares, W., Lange, B.J., Bostrom, B.C., Nachman, J.B., Steinherz, P.G., Hutchinson, R., Gaynon, P.S., Arthur, D.C., Uckun, F.M. (1999) Association of Chromosome Arm 9p Abnormalities With Adverse Risk in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: A Report From the Children's Cancer Group. *Blood*, 94:1537-1544.

Heerema, N.A., Harbott, J., Galimberti, S., Camitta, B.M., Gaynon, P.S., Janka-Schaub, G., Kamps, W., Basso, G., Pui, C.H., Schrappe, M., Auclerc, M.F., Carroll, A.J., Conter, V., Harrison, C.J., Pullen, J., Raimondi, S.C., Richards, S., Riehm, H., Sather, H.N., Shuster, J.J., Silverman, L.B., Valsecchi, M.G., Aricò, M. (2004) Secondary cytogenetic aberrations in childhood Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia are nonrandom and may be associated with outcome. *Leukemia*, 18(4): 693-702.

Isıkdoğan, A., Ayyıldız, O., Tiftik, N., Altıntaş, A., Müftüoğlu, E. (2003) Diyarbakır ve Çevresinde Lösemi Olgularının Demografik Özellikleri. *Türk Hematoloji-Onkoloji Dergisi*, 13(3):134-137.

Jarosova, M., Holzerova, M., Jedlickova, K., Mihal, V., Zuna, J., Stary, J., Pospisilova, D., Zamanova, Z., Trka, J., Blazek, J., Pikolova, Z., Indrak, K. (2000) Importance of using comparative genomic hybridization to improve detection of chromosomal changes in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 123:114-122.

Johansson, B., Moorman, A.V., Haas, O.A., Watmore, A.E., Cheung, K.L., Swanton, S., Secker-Walker, L.M. (1998) Hematologic malignancies with t(4;11)(q21;q23) a cytogenetic, morphologic, immunophenotypic and clinical study of 183 cases. European 11q23 Workshop participants. *Leukemia*, 12(5):779-87.

Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J.W., Waldman, F., Pinkel, D. (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, 258:818-821.

Karhu, R., S., Taner, M., Keinänen, M., Mäkipernaa, A., Lehtinen, M., Vilpo, J.A., Isola, J. (1997) Genetic aberrations in pediatric acute lymphoblastic leukemia by comparative genomic hybridization. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 93:123-129.

Kebriaei, P., Anastasi, J., Larson, R.A. (2003) Acute lymphoblastic leukaemia: diagnosis and classification. *Best Practice and Research Clinical Haematology*, 15: 597-621.

Koleske, A.J., Hantschel, O., Furga, G.S. (2006) Abl Family Kinases in Development and Disease, *Eurekah Bioscience Database*.

Kowarz, E., Burmeister, T., Nigro, L.L., Jansen, M.W.J.C., Delabesse, E., Klingebiel, T., Dinger, T., Meyer, C., Marschalek, R. (2007) Complex MLL rearrangements in t(4;11) leukemia patients with absent AF4-MLL fusion allele. *Leukemia*, 21:1232-1238.

Krajcinovic, M., Labuda, D., Sinnett, D. (2001) Childhood acute lymphoblastic leukemia: genetic determinants of susceptibility and disease outcome. *Rev Environ Health*, 16(4):263-279.

Krajcinovic, M., Mikhail, F.M., Serry, K.A., Hatem, N., Mourad, Z.I., Farawela, H.M., Kaffash, D.M., Coignet, L., Nucifora, G. (2002) AML1 gene overexpression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 16: 658-668.

Lansky, P. 2000; *Leukemias. Manual of Pediatric Hematology and Oncology* 3rd ed. Churchill Livingstone, New York, 14: 359-411.

Larramendy, M.L., Hunta, T., Heinonen, K., Vettenranta, K., Mahlamäki, E., Riihonen, P., Pihkala, U., Knuutila, S. (1998) DNA copy number changes in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Hematologica*, 83:890-895.

Laurent, E., Talpaz, M., Kantarjian, H., Kurzrock, R. (2001) The BCR Gene and Philadelphia Chromosome-positive Leukemogenesis, *Cancer Research*, 61: 2343-2355.

Levanon, D., Glusman, G., Bangsow, T., Asher, E.B., Male, D.A., Avidan, N., Bangsow, C., Hattori, M., Taylor, T.D., Taudien, S., Blechschmidt, K., Shimizu, N., Rosenthal, A., Sakaki, Y., Lancet, D., Groner, Y. (2001) Architecture and anatomy of the genomic locus encoding the human leukemia-associated transcription factor RUNX1/AML1 Gene, 262(1-2): 23-33.

Lucito R, Healy J, Alexander, J., Reiner, A., Esposito, D., Chi, M., Rodgers, L., Brady, A., Sebat, J., Troge, J., West, J.A., Rostan, S., Nguyen, K.C.Q., Powers, S., Ye, K.Q., Olshen, A., Norton, L., Wigler, M. (2003) Representational oligonucleotide microarray analysis: A high-resolution method to detect genome copy number variation. *Genome Research* 13, 2291-2305.

Margolin, J.F., Poppo, D.G. (1997) *ALL, Principles and Practice of Pediatric Oncology*, 3rd edition, 409-447. Philadelphia.

McKenna, R.W. (2000) Multifaceted approach to the diagnosis and classification of acute leukemias. *Clinical Chemistry*, 46(8):1252-1259.

Menegaux, F., Baruchel, A., Bertrand, Y., Lescoeur, B., Leverger, G., Nelken, B., Sommelet, D., Hémon, D., Clavel, J. (2006) Household exposure to pesticides and risk of childhood acute leukaemia. *Occup Environ Medicine*, 63(2): 131-134.

Miller, D.R. Hematologic malignancies: leukemia and lymphoma, *Blood Diseases of Infancy and Childhood*, Xth. Edition, 660- 768. ed. Miller, R.M., Baehner, R.L., Miller, L.P., Mosby.

Miyoshi, H., Shimizu, K., Kozu, T., Maseki, N., Kaneko, Y., Ohki, M. (1991) t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. *Proc Natl Acad Sci*, 88(23): 10431-10434.

Mutlu, N. (2005) BFM-2000 Protokolü almış akut lenfoblastik lösemili çocuklarda miyeloid isaretiliyici pozitifliğinin prognostik değeri ve diğer prognostik faktörler ile ilişkisi, Uzmanlık tezi, Bakırköy Dogumevi Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Arastırma Hastanesi, İstanbul.

Nahi, H., Hägglund, H., Ahlgren, T., Bernell, P., Hardling, M., Karlsson, K., Lazarevic, V.L., Linderholm, M., Smedmyr, B., Åström, A., Hallböök, H. (2008) An investigation into whether deletions in 9p reflect prognosis in adult precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia: a multi-center study of 381 patients. *Haematologica*, 93(11):1734-1738.

Neimenger, C.M., Sallan, S.E. (1993) *Acute Lymphoblastic Leukemia, Hemathology of infancy and childhood*. 4th ed. 1249-1287. Philedelphia: W.B. Saunders.

Nussbaum, R.L., McInnes, R.R., Willard, H.F., Boerkoel, C.F. Thompson & Thompson Tıbbi Genetik (2005) 6.baskı, Güneş Kitapevi, Ankara

Oyan, B., Koç, Y. (2003) Akut Myeloid Lösemide Transplantasyon. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri*, 1(1).

Özbek, U. (2006) Akut lösemilerde moleküler genetik ve prognoz. *Türk Hematoloji Derneği Akut Lösemi Kursu*. Aydın, 19-25.

Pala, F.S. (2005) Hematolojik kanserlerde FISH uygulamaları. *Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 22: 132-136.

Pekçelen, Y. (2003) Lösemiler, *Klinik Hematoloji*. Nobel Tıp Kitabevleri.

Pınar, A. Pcr Ve Real-Time Pcr Hakkında Genel Bilgi (2009) *Real Time PCR Kursu*.

Rooney, D.H., Czepulkowski, B., Gibbons, B. (2001) *Human Cytogenetics, Malignancy and Acquired Abnormalities, The Practical Approach Series*, Oxford University Pres.

Rowe, J.M. (2010) Prognostic factors in adult acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 150: 389–405

Ryan, J., Quinn, F., Meunier, A., Boublikova, L., Crampe, R., Tewari, P., O'Marcaigh, A., Stallings, R., Neat, M., O'Meara, A., Breatnach, F., McCann, S., Browne, P., Smith, O., Lawler, M. (2008) Minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukaemia patients at multiple time-points reveals high levels of concordance between molecular and immunophenotypic approaches. *British journal of heamatology*, 144: 107–115.

Sayitoğlu, M.A. Hematoloji'de Real Time PCR (2005) *Temel Moleküler Hematoloji Kursu*.

Seibel, N.L. (2008) Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia in Children and Adolescents: Peaks and Pitfalls. *American Society of Hematology*, 374-380.

- Sen, P., Bailey, N.M., Hagemester, F.B., Liang, Ş.C. (1990) Induction of chromosome breaks and sister chromatid exchanges in patients with Hodgkin's disease by two 65 combination chemotherapy regimens of different leukemogenic potential. *Cancer Research*, 50(3):558-562.
- Shaffer, L.G., Bejjani, B.A. (2004) A cytogeneticist's perspective on genomic microarrays, *Human Reproduction Update*, 10(3):221-226.
- Shinawi, M., Cheung, S.W. (2008) The array CGH and its clinical applications *Drug, Discovery Today*, 13: 17-18.
- Silverman, L.B. (2010) Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Currently Applied Prognostic Factors, *International society of pediatric oncology*, 18-24.
- Soysal, Y., Bahçem, M., Yakicier, C., İfrana, A., Kürekçi E. Lösemilerin Genetik Tanısında Sitogenetik ve Floresan In Situ Hibridizasyon Yöntemlerinin Etkinliğinin Değerlendirilmesi (2009) *Kocatepe Tıp Dergisi* 10:41-47
- Spathas, D.H., Stewart, J., Singer, I.O., Theriault, A., Bovey, M., Connor, J.M. (1999) Detection of t(12,21) in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia by Fluorescence In Situ Hybridization, *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 110(1):7-13.
- Sreekantaiah, C. (2007) FISH panels for hematologic malignancies. *Cytogenet Genome Research*, 118: 284-296.
- Tiftik, E.N., Ayyıldız, M.O., Isıkakdoğan, A., Müftüoğlu, E. (2000) Erişkin Akut Lenfoblastik Lösemide Tedavi. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri*, 20: 245-254.
- Tekgündüz, E., Demir, M., Akpınar, S. (2010) Prognostik Faktörler Işığında Akut Lenfoblastik Lösemi. *Uluslararası Hematoloji-Onkoloji Dergisi*, 20(1): 57-66
- Uckun, M.F., Nachman, B.J., Sather, N.H., Sensel, G.M., Kraft, P., Steinherz, G.P., Lange, B., Hutchinson, R., Reagman, H.G., Gaynon, S.P., Heerama, A.N. (1998) Clinical significance of Philadelphia chromosome positive pediatric ALL in context of contemporary intensive therapies, A report from the Children's Cancer Group. *American Cancer Society*, 83(9):2030-2039.
- Ünal, Ş., Tuncer, A.M. (2004) Lösemide epidemiyoloji, tanısal yaklaşım ve sınıflandırma. *Katkı Pediatri dergisi*, 338-349.
- Valasek, M.A., Repa, J.J. (2005) The power of real-time PCR. *The American Physiological Society*, 29: 151-159.
- Van der Veken, L.T., Buijs, A. (2011) Array CGH in Human Leukemia: From Somatics to Genetics. *Cytogenetic and Genom Research*, 135(3-4): 260-270.
- Wicker, N., Carles, A., Mills, I.G., Wolf, G., Veerakumarasivam, A., Edgren, H., Boileau, F., Wasyluk, B., Schalken, J.A., Neal, D.E., Kallioniemi, O., Poch, O. (2007) A new look towards BAC-based array CGH through a comprehensive comparison with oligo-based array CGH. *Biomedcentral Genomics*, 8(8): 1471-2164.
- Williams, W.J., Beutler, E., Litchman, M.A., Coler, B.S., Kipps, T.J., Mauner, A.M. (1991) *William's Hematology*. McGraw Hill Company, New York, 2209-2349.
- Woerden, N.L, Pieters, R., Loonen, A., Hubeek, I., Drunen, E., Beverloo, H.B., Slater, R.M., Harbott, J., Seyfarth, J., Wering, E.R., Hahlen, K., Schmiegelow, K., Janka-Schaub, G.E., Veerman, A.J.P. (2000) TEL/AML1 gene fusion is related to in vitro drug sensitivity for Lasparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 98(3): 1094- 1099.
- Wong, N., Chen, S.J., Cao, Q., Su, X.Y., Niu, Ch., Wu, Q.W., Leung, T.W.T., Wickham, N., Johnson, J.P., Chen, Z. (1998) Detection of chromosome overand underrepresentations in hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia by comparative genomic hybridization. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 103:20-24.

Yakut, T., Gülten T. (2005) Çocukluk çağı Lösemilerindeki Genetik Değişiklikler ve Klinik Önemi. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 31: 57-62.

Yakut, T., Gülten, T. (2005) Çocukluk çağı Lösemilerindeki Genetik Değişiklikler ve Klinik Önemi. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Bursa.

Yamamoto, K., Hato, A., Minagawa, K., Yakushijin, K., Urahama, N., Sada, A., Okamura, A., Ito, M, Matsui, T. (2004) An extra X chromosome as a sole abnormality in relapse of an adult acute lymphoblastic leukemia. Cancer Genetics and Cytogenetics, 154-155.

Ylstra, B., IJssel, P., Carvalho, B., Brakenhoff, R.H., Meijer, G.A (2006) BAC to the future or oligonucleotides:a perspective for micro array comparative genomic hybridization(array CGH). Nucleic Acids Research, 34(2): 445-450.

Zuna, J., Ford, A.M., Peham, M., Patel, N., Saha, V., Eckert, C., Köchling, J., Grümayer, R.P., Trka, J., Greaves, M. (2004) TEL Deletion Analysis Supports a Novel View of Relapse in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. Clinical Cancer Research, 10(16): 5355-5360.

<http://atlasgeneticsoncology.org/>

<http://www.hematology.org/http://www.funakoshi.co.jp>

<http://www.dkfz.de/gpcf/lightcycler480.html>

<http://www.pri.wur.nl>

<http://mbg.jrc.ec.europa.eu>

ÖZGEÇMİŞ

1. Bireysel Bilgiler

- Adı Soyadı: Zeynep İLKAY
- Doğum Yeri ve Tarihi: 04.12.1985-Gölcük
- Uyruğu :TC
- Medeni Durumu: Evli
- Çalıştığı Kurum: Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik A.D.
- İletişim Adresi ve Telefonu: Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Binası
Tıbbi Genetik A.D. 41380 İzmit-KOCAELİ Tel: 0(262) 303 88 40

2. Eğitimi (tarih sırasına göre)

EĞİTİM DURUMU

2004- 2008 : Selçuk Üniversitesi
Biyoloji Bölümü

1999-2003 : Derince 19 Mayıs Süper Lisesi(Y.D.A.L)

STAJLAR

08 /2007- 09/2007 : Özel Konak Hastanesi
Mikrobiyoloji-Biyokimya Laboratuvarı

08/2005- 09/2005 : Gölcük Deniz Hastanesi
Kan Merkezi-Mikrobiyoloji-Biyokimya Laboratuvarı

YABANCI DİL

İngilizce

3. Ünvanları

2008- :Biyolog

4. Mesleki Deneyimi

- Kan, doku, idrar, vücut sıvıları ve nükleik asit taşıma ortamından DNA, RNA veya toplam nükleik asit izolasyonu (Manuel ve MagNa Pure Compact System).
- Agaroz jel elektroforezi ve jel görüntüleme, kaydetme, yorumlama.

- Thermal Cyclers'da PCR uygulamaları.
- NanoDrop ile nükleik asitlerin ve proteinlerin kalite ve kantite açısından incelenmesi
- LightCycler 1.5 cihazı uygulamalarının yapılması.
- LightCycler 480 cihazı uygulamalarının yapılması.
- Dizi Analizi uygulamaları.
- Periferik lenfosit kültürü
- Amniyon kültürü
- Postnatal-prenatal kromozom analizi

5. Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

6. Bilimsel Etkinlikler

- D Yavuz, N Cine, **Z İlkay**, B Dal, N Uzulmez, D Sunnetci, E Gumuslu, B Enguzel, S Eren, R Akkoyunlu, H Savli. *Mutations frequency of the thrombosis risk factor genes in habituel abortus patients in the region of Kocaeli.* (Poster Sunum) 9. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi-2010- İstanbul
- **Z İlkay**, N Cine, D Yavuz, B Dal, N Uzulmez, D Sunnetci, E Gumuslu, B Enguzel, S Eren, RU Akkoyunlu, H Savli. *Detection of MEFV gene mutation frequency patients Familial Mediterreanean Fever (FMF) in Kocaeli region.* (Poster Sunum) 9. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi-2010- İstanbul
- H Savli, D Sunnetci, N Uzulmez, E Gumuslu, D Yavuz, S Eren, B Enguzel, R Akkoyunlu, **Z İlkay**, N Cine. *Yüksek Çıktılı FISH Paneli (High – Throughput Fish Analysis) Analizleri: Hematolojik Malignite Analizinde Hassas Yeni Bir Tarama Seçeneği.* (Poster Sunum) 36. Ulusal Hematoloji Kongresi-2010-Antalya

- N Cine, N Uzulmez, D Sunnetci, E Gumuslu, B Enguzel, S Eren, **Z İlkay**, D Yavuz, R Akkoyunlu, H Savli. *High-throughput FISH analyses (HTFA): A new sensitive approach to screen hematological malignancies.* (Poster Sunum) 9. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi-2010- İstanbul

- B Enguzel, N Cine, S Eren, D Sunnetci, E Gumuslu, **Z İlkay**, D Yavuz, N Uzulmez, RU Akkoyunlu, H Savli. *Comparison of a-CGH and conventional cytogenetics in a primary amenorrhea case.* (Poster Sunum) 9. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi-2010- İstanbul

- B Enguzel, N Cine, S Eren, D Sunnetci, E Gumuslu, **Z İlkay**, D Yavuz, N Uzulmez, RU Akkoyunlu, H Savli. *Diagnostic value of a-CGH method for recurrent miscarriage and implantation failures.* (Poster Sunum) 9. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi-2010- İstanbul

- N Cine, RU Akkoyunlu, E Gumuslu, D Sunnetci, N Uzulmez, B Enguzel, S Eren, D Yavuz, **Z İlkay**, H Savli. *Value of array CGH in the evaluation of microdeletion syndromes.* (Poster Sunum) 9. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi-2010- İstanbul

- E Gumuslu, N Cine, B Kara, D Sunnetci, N Uzulmez, B Enguzel, S Eren, R Akkoyunlu, **Z İlkay**, D Yavuz, H Savli. *Application of array CGH method in two 18q21.31-q23 deletion patients.* (Poster Sunum) 9. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi-2010- İstanbul

- H Savli, D Sunnetci, N Uzulmez, E Gumuslu, D Yavuz, S Eren, B Enguzel, R Akkoyunlu, **Z İlkay**, N Cine. *Diagnostic use of targeted array CGH platforms: 2009-2010 Kocaeli University experience.* (Poster Sunum) 9. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi-2010- İstanbul



T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KAPSAM DIŞI ARAŞTIRMALARI DEĞERLENDİRME KURULU

ARAŞTIRMA ONAY FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROJE NO/ TEZ, AKADEMİK	2010/16	Tez
	ARAŞTIRMANIN ADI	Çocukluk çağı ALL olgularının tanısında yeni bir kombine yaklaşım: Real Time PCR ve Yüksek Çıktılı BAC Tabanlı Moleküler FISH Analizleri	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI	Zeynep İLKAY	
	DANIŞMAN	Doç.Dr. Hakan SAVLI	
	ARAŞTIRMANIN YERİ	KOÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	
DEĞERLEN DİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ 1. Koleksiyon materyal kullanılacak 2. Rutin hizmetlerden üretilecek 3. Dosya kayıtları incelenecek 4. Diğer.....	Rutin hizmetlerden üretilecek	
	GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME FORMU	—	
	AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU	—	
	ARAŞTIRMANIN BÜTÇESİ	—	

KARAR BİLGİLERİ	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelikte Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik (11 Mart 2010 tarih ve 27518 Sayılı Resmî Gazete) 2. Madde (aa) bendine göre kapsam dışı olan araştırma değerlendirilmiş ve onaylanmasına karar verilmiştir. 23.09.2010
------------------------	---

ÖNERİ	
--------------	--

KAPSAM DIŞI ARAŞTIRMALARI DEĞERLENDİRME KURULU BİLGİLERİ					
ÇALIŞMA ESASLARI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelikte Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik (11 Mart 2010 tarih ve 27518 Sayılı Resmî Gazete)				
ÜYELER					
Unvanı / Adı Soyadı	Uzmanlık	Kurumu	Cins	İlişki	Katılım/İmza
Prof. Dr. Arzu Arslan	Radyoloji	Tıp Fakültesi Dekan Yardımcısı	K		
Prof. Dr. Nermin Ersoy	Deontoloji	Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Etik AD.	K		
Prof. Dr. B.Faruk Erden	Farmakoloji	Tıp Fakültesi Farmakoloji AD.	E		