

LÜTFİYE GÜL ÇALIŞKAN	DICLE ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.	DOKTORA TEZİ	DIYARBAKIR-2022
----------------------	------------------------------------	--------------	-----------------



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

2007-2020 TARİHLERİ ARASINDA KEMİK İLİĞİ TARAMASI
YAPILAN HASTALARIN KROMOZOM ANALİZ
SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Lütfiye Gül ÇALIŞKAN
DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mahmut BALKAN

DİYARBAKIR-2022



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

2007-2020 TARİHLERİ ARASINDA KEMİK İLİĞİ TARAMASI
YAPILAN HASTALARIN KROMOZOM ANALİZ
SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Lütfiye Gül ÇALIŞKAN
DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mahmut BALKAN

DİYARBAKIR-2022



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ONAY

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi **Lütfiye Gül ÇALIŞKAN**'ın hazırladığı “**2007-2020 TARİHLERİ ARASINDA KEMİK İLİĞİ TARAMASI YAPILAN HASTALARIN KROMOZOM ANALİZ SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ**” başlıklı tez Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih:

Danışman; Prof. Dr. Mahmut BALKAN Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi

Jüri Başkanı

Üye

Üye

Üye

Üye

Prof. Dr. Mahmut BALKAN

Dicle Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve tezimi Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzu standartlarına uygun bir şekilde hazırladığımı beyan ederim.

23/06/2022

Lütfiye Gül ÇALIŞKAN

İmza

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin başlangıcından itibaren bana yol gösteren, verdiği derslerle Tıbbi Biyoloji bilgilerimin temelini atan, çalışma disiplini, öğrencisini iyi yetiştirme gayreti ve iş ahlakı ile örnek olan, tez hazırlık sürecimde ilgi ve katkısını esirgemeyen danışmanım olduğu için büyük onur duyduğum çok değerli hocam Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Mahmut BALKAN'a, eğitim hayatımda bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, her biri alanında uzman çok kıymetli hocalarım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Diclehan ORAL, Doç. Dr. Selahattin TEKEŞ, Arş. Gör. İlyas YÜCEL ve Arş. Gör. Mahir BİNİCİ'ye sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmalarında pratik bilgilerini paylaşan ve yardımlarını esirgemeyen tüm laborant arkadaşlara, bölümde yazışmalarımızı düzenleyen değerli sekreterimiz Sayın Asiye BAYRAK'a, bugüne kadar bana sevgi ve desteğini esirgemeyen, akademisyenlik hayatındaki tecrübeleriyle yoluma ışık tutan kıymetli eşim Doç. Dr. Ahmet ÇALIŞKAN'a ve çalışma hayatımdaki zorlukları görüp fedakârlık yapan sevgili çocuklarıma, eğitim hayatımda desteklerini her zaman yanımda hissettiğim aileme sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Bizlere bıraktığı bilimsel çalışmalarıyla saygıyla hatırladığımız hocamız Prof. Dr. Hilmi İSİ'yi de rahmetle anıyorum.

Diyarbakır-2022

Lütfiye Gül ÇALIŞKAN

İÇİNDEKİLER

ONAY	I
BEYAN.....	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
KISALTMALAR VE SİMGELER	VIII
ŞEKİLLER	X
TABLolar	XI
RESİMLER	XII
1. ÖZETLER	1
1.1 TÜRKÇE ÖZET	1
1.2. ABSTRACT.....	3
2. GİRİŞ VE AMAÇ	5
3. GENEL BİLGİLER.....	7
3.1. Kemik iliği	7
3.2. Hematopoez.....	9
3.3. Kanser	11
3.3.1. Kanser tarihçesi	12
3.3.2. Kanserin oluşum mekanizması ve kanser genetiği.....	13
3.3.3. Kansere neden olan genetik mekanizmalar	13
3.3.3.1. Protoonkogenler ve onkogenler	14
3.3.3.2. Tümör süpresör genler	17
3.3.3.3. DNA tamir genleri	18
3.3.3.4. Virüsler	19
3.4. Hematolojik kanserler	19

3.4.1. Lösemi	19
3.4.1.1. Akut lenfoblastik lösemi (ALL).....	20
3.4.1.1.1. Tanım ve tarihçe	20
3.4.1.1.2. Epidemiyoloji.....	20
3.4.1.1.3. Sınıflandırma.....	20
3.4.1.1.4. Prognoz	21
3.4.1.1.5. Etiyoloji.....	21
3.4.1.1.6. Klinik	21
3.4.1.1.7. ALL’de gözlenen sitogenetik değişiklikler.....	22
3.4.1.1.7.1. Yapısal anomaliler	22
3.4.1.1.7.2. Sayısal anomaliler.....	23
3.4.1.2. Akut miyeloid lösemi (AML)	24
3.4.1.2.1. Tanım ve tarihçe	24
3.4.1.2.2. Epidemiyoloji.....	25
3.4.1.2.3. Sınıflandırma.....	25
3.4.1.2.4. Prognoz	25
3.4.1.2.5. Etiyoloji.....	25
3.4.1.2.6. Klinik	26
3.4.1.2.7. AML’de gözlenen sitogenetik değişiklikler.....	26
3.4.1.2.7.1. Yapısal anomaliler	26
3.4.1.2.7.2. Sayısal anomaliler.....	27
3.4.1.3. Kronik lenfositik lösemi (KLL)	28
3.4.1.3.1. Tanım ve tarihçe	28
3.4.1.3.2. Epidemiyoloji.....	28
3.4.1.3.3. Sınıflandırma.....	28
3.4.1.3.4. Prognoz	29
3.4.1.3.5. Etiyoloji.....	29
3.4.1.3.6. Klinik	29
3.4.1.3.7. KLL’de gözlenen sitogenetik değişiklikler.....	29
3.4.1.3.7.1. Yapısal anomaliler	29
3.4.1.3.7.2. Sayısal anomaliler.....	30
3.4.1.4. Kronik miyeloid lösemi (KML).....	30
3.4.1.4.1. Tanım ve tarihçe	30
3.4.1.4.2. Epidemiyoloji.....	31
3.4.1.4.3. Sınıflandırma.....	31
3.4.1.4.4. Prognoz	31
3.4.1.4.5. Etiyoloji.....	31
3.4.1.4.6. Klinik	32
3.4.1.4.7. KML’de gözlenen sitogenetik değişiklikler.....	32
3.4.2. Lenfoma.....	33
3.4.2.1. Tanım ve tarihçe	33
3.4.2.2. Epidemiyoloji.....	33

3.4.2.3. Sınıflandırma	33
3.4.2.4. Prognoz	34
3.4.2.5. Etiyoloji	34
3.4.2.6. Klinik	34
3.4.2.7. Lenfoma’da gözlenen sitogenetik değişiklikler	34
3.4.3. Multiple myeloma (MM).....	35
3.4.3.1. Tanım ve tarihçe	35
3.4.3.2. Epidemiyoloji.....	35
3.4.3.3. Prognoz	36
3.4.3.4. Etiyoloji	36
3.4.3.5. Klinik	36
3.4.3.6. Multiple myeloma’da gözlenen sitogenetik değişiklikler.....	36
3.4.4. Miyelodisplastik sendrom (MDS)	37
3.4.4.1.Miyelodisplastik sendrom’da gözlenen sitogenetik değişiklikler.....	37
3.4.5. Kronik miyeloproliferatif hastalıklar (KMPH)	37
3.5. Hematolojik Kanselerde Genetik Değişiklikler	37
3.5.1. Kromozom anomalileri.....	37
3.5.1.1. Sayısal kromozom anomalileri	38
3.5.1.2. Yapısal kromozom anomalileri.....	39
3.5.1.2.1. Dengeli yapısal kromozom anomalileri.....	39
3.5.1.2.2. Dengesiz yapısal kromozom anomalileri.....	39
3.6. Hematolojik Kanselerde Kullanılan Tanı Yöntemleri	40
3.6.1. Konvansiyonel sitogenetik analiz.....	40
3.6.1.1. GTG bantlama tekniği	41
3.6.2. Moleküler sitogenetik yöntemler: FISH (Fluoresan In Situ Hibridizasyon)	41
3.6.2.1. FISH tekniğinde kullanılan problar	42
3.6.2.2.Hematolojik kanselerde moleküler sitogenetik yöntem (FISH) ile tespit edilen genetik değişiklikler	43
3.6.2.3. Hematolojik kanser hastalarında gözlemlenen kromozom anomalileri için kullanılan spesifik prob çeşitleri	43
4. GEREÇ VE YÖNTEM	45
4.1. Gereç ve Cihazlar	45
4.1.1. Kullanılan cihazlar	45
4.1.2. Kullanılan malzemeler	46
4.1.2.1. Kullanılan kimyasal maddeler	46
4.1.2.2. FISH problemleri	46
4.2. Konvansiyonel sitogenetik analiz	47
4.2.1. Çözeltiler ve tamponlar	47

4.3. Moleküler sitogenetik (FISH) yöntem	48
4.3.1. Çözeltiler ve tamponlar	48
4.4. Çalışma metodu.....	48
4.4.1. Kemik iliği kültüründen sitogenetik çalışma yöntemi (24 ve 48 saatlik kültür yöntemi).....	48
4.4.2. Kromozom eldesi.....	49
4.4.3. Bantlama	50
4.4.4. FISH yöntemi	50
4.5. İstatistiksel yöntemler	51
5. BULGULAR	52
5.1. Sitogenetik bulgular	59
5.2. Moleküler sitogenetik “FISH” bulguları	63
6. TARTIŞMA	66
7. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	72
8. KAYNAKLAR.....	73
9. ÖZGEÇMİŞ	86
10.EKLER.....	87
10.1. ETİK KURUL ONAYI	87
10.2. MAKALE.....	88
10.3. İNTİHAL RAPORU	89
10.4. ORJİNALLİK BEYANI	90

KISALTMALAR ve SİMGELER

Abl	: Abelson protoonkogeni
ALL	: Akut Lenfoblastik Lösemi
AML	: Akut Miyeloid Lösemi
BCR	: Breakpoint Cluster Region
CCND1	: Siklin D1 geni
DAPI	: 4,6-Diamino-2-fenilindol
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EGR1	: Early Growth Response 1 geni
ET	: Esansiyel Trombositoz
FAB	: Fransız-Amerikan-İngiliz
FISH	: Floresan In Situ Hibridizasyon
G-CSF	: Granülasit koloni uyarıcı faktör
GM-CSF	: Granülasit-makrofaj koloni uyarıcı faktör
GTG	: Giemsa-Tripsin-Giemsa
IGH	: İmmünoglobülin ağır lokusu geni
IPSS	: Uluslararası prognostik skorum sistemi
ISCN	: International System for Human Cytogenetic Nomenclature
KCl	: Potasyum klorür
KH₂PO₄	: Mono Potasyum Fosfat
KLL	: Kronik Lenfositik Lösemi
KML	: Kronik Miyeloid Lösemi
KMPH	: Kronik Miyeloproliferatif Hastalık
M	: Molar
MDS	: Miyelodisplastik Sendrom
MM	: Multiple Myeloma
mg	: Miligram
n	: Number (sayı)
NaCl	: Sodyum klorür
Na₂HPO₄	: Disodyum fosfat
NP40	: Nonil fenoksipolietoksiletanol

p : Petit (Kromozomun kısa kolu)
q : Kromozomun uzun kolu
PBS : Phosphate Buffer Saline
PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH : Potansiyel Hidrojen
Ph : Philadelphia kromozomu
PHA-M: Fitohemaglutinin-M
PV : Polisitemia Vera
RAS : Rat Sarcoma geni
RNA : Ribonükleik Asit
Rpm : Revolutions Per Minute
RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR: Moleküler Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TPO : Trombopoietin
SCF : Kök hücre faktörü
SSC : Salin-sodyum sitrat
WHO : World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü, DSÖ)
µL : Mikrolitre

ŞEKİLLER

Şekil 1. Kemik iliği makro (a) ve mikro (b) ortamındaki stromal hücreler	7
Şekil 2. Kemik iliği mikroçevresi “niş”	8
Şekil 3. Trabeküler kemik kavitesindeki hemotopoetik nişlerin lokalizasyonu	9
Şekil 4. Aorta-gonad-mezonefroz (AGM): Fetal hematopoetik kök hücrelerin primer orijini	10
Şekil 5. Hematopoez	10
Şekil 6. Hematopoez ve kanın şekilli elemanları	11
Şekil 7. İmmünoglobülin gelişimi	11
Şekil 8. Kolon kanserinde RAS onkogeni ve 12. kromozomda glisinin valine değişimi	15
Şekil 9. Burkitt Lenfoma translokasyon örneği [46,XY t(8;14)(q24;q32)]	16
Şekil 10. BCR/ABL translokasyonu şematik çizimi.	16
Şekil 11. DNA'nın amplifiye olmuş parçaları, normal olarak bantlanmayan ve belirli DNA parçasının çok sayıda amplifiye olmuş kopyalarını içeren (double minutes) çok küçük ek kromozom ve (homogenously staining regions) homojen olarak boyanan bölgeler (HSR) olarak izlenir.	17
Şekil 12. HPV enfeksiyonu sonrası P53 fonksiyon kaybının şematik gösterimi	19
Şekil 13. 17. kromozomdaki RARA ve PML genlerinin şematik görünümü.	26
Şekil 14. 21. kromozomda AML1 geni ile 8. kromozomda ETO translokasyonu şeması.	27
Şekil 15. MLL geni prob spesifikasyonu şematik görünümü.	27
Şekil 16: 13q14 delesyonu şematik çizimi.	30
Şekil 17. Philadelphia kromozomunun şematik yapısı	32
Şekil 18. FISH tekniğinde kullanılan prob çeşitleri	42
Şekil 19. 5/5q31 (EGR1) FISH probu	43
Şekil 20. BCR/ABL-t(9;22) FISH probu	44
Şekil 21. P53 (17p13.1) FISH probu	44
Şekil 22. t(11;14) FISH probu	44
Şekil 23. Çalışma popülasyonundaki hasta gruplarının dağılımı.....	59
Şekil 24. Kromozom anomalilerinin cinsiyete göre dağılımı.	60

TABLÖLAR

Tablo 1. DNA tamir genleri.....	18
Tablo 2: Hematolojik kanserlerde sık görülen yapısal ve/veya sayısal kromozom anomalileri.....	43
Tablo 3. Hastaların demografik özellikleri.....	52
Tablo 4. KML ön tanı/tanısı taşıyan hastaların sitogenetik bulguları.	53
Tablo 5. KLL ön tanısına sahip hastaların sitogenetik bulguları.....	54
Tablo 6. AML ön tanı/tanılı olguların sitogenetik bulguları.	54
Tablo 7. ALL ön tanısı almış hastaların sitogenetik bulguları.	55
Tablo 8. Kronik Miyeloproliferatif Hastalık ön tanılı hastaların sitogenetik bulguları.	56
Tablo 9. Lenfoma ön tanılı/tanılı olguların sitogenetik bulguları.	56
Tablo 10. M. Myeloma ön tanılı hastaların sitogenetik bulguları.	56
Tablo 11. Miyelodisplastik sendrom (MDS) tanılı/ön tanılı hastaların sitogenetik bulguları.	57
Tablo 12. Diğer kan hastalıkları tanılı olguların sitogenetik bulguları.....	58
Tablo 13. Çalışma grubunun cinsiyete göre dağılımı ve yaş ortalamaları.	59
Tablo 14. Çalışma grubundaki tüm hastaların kromozom anomalisi bakımından dağılımı.....	60
Tablo 15. Çalışma grubundaki kadın/erkek hastaların kromozom anomalisi açısından dağılımı.....	60
Tablo 16. Hasta gruplarındaki sayısal-yapısal kromozomal anomali dağılımı.	63
Tablo 17: Anormal karyotip saptanan 141 olgudaki kromozom düzensizlikleri	65

RESİMLER

Resim 1: Karyotip normal kadın ve erkek konvansiyonel sitogenetik görüntüsü..... 63

Resim 2: KML hastasında görülen t(9;22) (Cytocell Aquarius BCR/ABL Translocation Probe) analizi. İlk hücrede 3 kırmızı, 1 sarı ve 1 yeşil sinyal görülmüştür. Sarı sinyal gözlenen hücrede Ph kromozomu t(9;22) pozitiftir. 64

Resim 3: AML hastasında gözlenen t(9;22) (Cytocell Aquarius BCR/ABL Translocation Probe) analizi. 22. kromozomun BCR gen bölgesi yeşil, 9. kromozomun ABL1 gen bölgesi kırmızı renkte sinyal verir. 9. kromozomun BCR bölgesinde 3 tane kırmızı sinyal gözlenir..... 65

1. ÖZETLER

2007-2020 Tarihleri Arasında Kemik İliği Taraması Yapılan Hastaların Kromozom Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Öğrencinin Adı- Soyadı: Lutfiye Gül ÇALIŞKAN

Danışmanı: Prof. Dr. Mahmut BALKAN

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji

1.1 TÜRKÇE ÖZET

Amaç: Hematolojik kanserler, kemik iliğinden kaynaklanan hücrelerin aşırı proliferasyonu sonucu ortaya çıkan neoplazmlardır. Kemik iliği incelemesi, hematolojik kanserlerle ilişkili olan kromozom anomalilerinin belirlenmesinde önemlidir. Çalışmamızda; hematolojik kanser ön tanılı hastalarda, konvansiyonel sitogenetik analiz ve FISH yöntemleri kullanılarak elde edilen sonuçları retrospektif olarak değerlendirip literatüre katkı sağlamayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada, 2007-2020 yılları arasında, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na bağlı Genetik Tanı laboratuvarı'na, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilimdalı ile Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'ndan gönderilen hematolojik kanser ön tanılı 310 olgudan konvansiyonel sitogenetik analiz ve FISH yöntemleri ile elde edilen sonuçlar retrospektif olarak değerlendirildi.

Bulgular: Genetik Tanı laboratuvarı'nda 2007-2020 yılları arasında yaşları 2-91 arasında değişen 149 kadın ve 161 erkekten oluşan toplam 310 hastadan alınan kemik iliği aspirasyon materyali konvansiyonel sitogenetik analiz ve FISH yöntemiyle incelendi. 67 kadın (%47,5) ve 74 erkek (%52,5) toplam 141 olguda normal karyotip, 68 kadın (%48,2) ve 73 erkek (%51,8) toplam 141 hastada anormal karyotip gözlemlendi. 28 olguda metafaz bulunamadı. Olguların hastalık gruplarına

göre dağılımı; Kronik Miyeloid Lösemi (KML) 92 (%29,7), Myelodisplastik Sendrom (MDS) 49 (%15,8), Multiple Miyeloma (MM) 41 (%13,2), Akut Miyeloid Lösemi (AML) 40 (%12,9), Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) 30 (%9,7), Kronik Miyeloproliferatif Hastalıklar (KMPH) 13 (%4,2), Lenfoma 12 (%3,9), Kronik Lenfositik Lösemi (KLL) 8 (%2,6), diğer kan hastalıkları 25 (%8,0) vakada gözlemlenmiştir.

Sonuçlar: Çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre hematolojik kanser ön tanılı hastalarda, konvansiyonel sitogenetik analiz ve FISH yöntemlerinin birlikte kullanımı sonucunda gözlenen kromozom analizinin, hastalıkların tanı, tedavi, prognoz ve genetik danışmasına katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Anahtar sözcükler: Hematolojik kanser, sitogenetik analiz, konvansiyonel sitogenetik, FISH, kromozom anomalileri.

Evaluation of Chromosom Analysis Results of Patients Who Underwent Bone Marrow Screening between 2007 and 2020

Student's Surname and Name: ÇALIŞKAN, Lütfiye Gül

Adviser of Thesis: Prof. Dr. Mahmut BALKAN

Department: Medical Biology

1.2. ABSTRACT

Aim: Hematological cancers are neoplasms that arise as a result of excessive proliferation of cells originating from the bone marrow. Bone marrow examination is important in identifying chromosomal abnormalities associated with hematological cancers. In our study; it is aimed to contribute to the archive by retrospectively evaluating the results determined using conventional cytogenetic analysis and FISH methods in patients with pre-diagnosis of hematological cancers.

Material and Method: In this study, between 2007 and 2020, conventional cytogenetic analysis and FISH method results of 310 patients who were admitted to Dicle University Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, from Dicle University Faculty of Medicine, Department of Hematology and Department of Child Health and Diseases with the diagnosis of hematological cancers will be evaluated retrospectively.

Results: Bone marrow aspiration material obtained from a total of 310 patients, 149 female and 161 male, aged between 2 and 91, studied in the genetic laboratory between 2007 and 2020, were examined by conventional cytogenetic analysis and FISH method. 67 female (47.5%) ve 74 male (52.5%) normal karyotype was observed in a total of 141 cases, and abnormal karyotype was observed in a total of 141 patients in 68 females (48.2%) and 73 males (51.8%). Metaphase was not found in 28 cases. The distribution of cases according to disease groups was as follows: Chronic Myeloid Leukemia (CML) 92 (29.7%), Myelodysplastic Syndrome (MDS) 49 (15.8%), Multiple Myeloma (MM) 41 (13.2%), Acute Myeloid Leukemia (AML)

40 (12.9%), Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) 30 (9.7%), Chronic Myeloproliferative Diseases (CMPH) 13 (4.2%), Lymphoma 12 (3.9%), Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) 8 (2.6%), other blood diseases were observed in 25 (8.0%) cases.

Conclusion: According to the data we found in our study, we think that the chromosome analysis observed as a result of the use of conventional cytogenetic analysis and FISH method in patients with pre-diagnosis of hematological cancers will contribute to the diagnosis, treatment, prognosis and genetic counseling of the diseases.

Keywords: Hematological cancers, cytogenetic analysis, conventional cytogenetics, FISH, chromosomal abnormalities.

2. GİRİŞ ve AMAÇ

Hematolojik kanserler, kemik iliğinden türeyen ve tüm kan hücrelerini üreten hematopoetik kök hücrelerde görülen genetik düzensizlikler sonucu hücrelerin düzensiz ve kontrolsüz bölünmesi, aşırı proliferasyonu ve anormal farklılaşması ile ortaya çıkan kötü huylu tümöral hastalıklardır. Günümüze kadar yapılan çok sayıdaki çalışmada, hematolojik kanserlere sayısal veya yapısal kromozom anomalilerinin neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca hematolojik kanserlerde bilinen veya spesifik kromozomal düzensizliklerin tespiti; hastalığın tanısı, tedavisinin planlanması ve prognozunun takibinde önemli bir yer tutar (1).

Hematolojik kanserlerde görülen anormallikleri belirlemede konvansiyonel sitogenetik analiz ve FISH yöntemleri etkin olarak kullanılır. Konvansiyonel sitogenetik analizin, FISH ve diğer moleküler yöntemlere göre avantajı, oluşabilecek tüm sayısal ve yapısal anomalilerin birlikte görülüp değerlendirilebilmesine olanak sağlamasıdır. Ancak kanser hastalarında özellikle kemoterapi sonrası mitotik aktivitenin düşmesiyle kemik iliğinde değerlendirilecek hücre sayısının azalması ve incelenecek metafaz bulunamaması bu yöntemin ana dezavantajıdır. Ayrıca kanser sitogenetiğinde görülen submikroskopik yeniden düzenlemeler ve nokta mutasyonlar, konvansiyonel sitogenetik analizde rezolüsyonun sınırlı olması nedeniyle saptanamamaktadır (2).

Kanser genetiğinde FISH yöntemi, konvansiyonel sitogenetik analize göre daha çok tercih edilmektedir. Çünkü FISH yönteminde metafaz hücrelerinin hazırlanmasına gerek duyulmadan interfaz hücreleriyle de çalışılabilmektedir. Hematolojik kanser tiplerinde araştırılan anormalliğe özgü problemlerle çalışılması da FISH yönteminin klasik sitogenetik analize göre daha hızlı, hassas ve güçlü olmasını sağlamıştır. Ancak sadece belli bir anormalliği tespit etmek için inceleme yapması ve teknik kısıtlamalardan dolayı araştırılmak istenen anormalliğe özgü probun her zaman bulunamaması FISH yönteminin ana dezavantajıdır (3).

Hematolojik kanser hastalarında sitogenetik analiz ve FISH yöntemi için gereken tümör hücresine, kemik iliği aspirasyon materyalinden ulaşılır. Hastadan aspire edilen kemik iliği yeterli miktarda değilse, kemik iliği biyopsisi yapılır. Kronik miyeloid lösemi gibi kanser tiplerinin sitogenetik analizinde ise kemik iliği aspirasyonu tercih edilir. Multiple miyeloma hastalarında da tanı aşamasında kemik

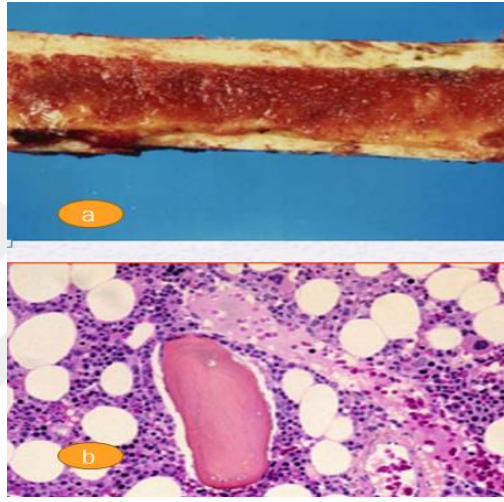
iliği aspirasyonu önemli bir yer tutar. Kemik iliği hücrelerinin mitotik aktivitesinin düşük olması, yeterli sayıda metafaz elde edilememesi, kısıtlı ve zor şartlarda, az miktarda kemik iliğinin alınması gibi nedenlerden dolayı kemik iliği aspirasyon materyali çalışma sırasında ziyan edilmeden dikkatlice kullanılmalıdır (4).

Kemik iliğinin sitogenetik incelemesi, hematolojik kanserlerle ilişkili olan kromozom anomalilerinin belirlenmesinde büyük önem taşımaktadır. Çalışmamızdaki asıl amacımız; hematolojik kanser ön tanısı ile Tıbbi Biyoloji bölümüne yönlendirilen hastalarda, konvansiyonel sitogenetik analiz ve FISH yöntemleri kullanılarak elde edilen moleküler analiz ve karyotip sonuçlarını retrospektif olarak değerlendirip literatüre katkı sağlamaktır. Çalışmamızda olgu sayısı yüksek tutulmuş olup ülkemizdeki hematolojik kanser temelindeki kromozomal anomalilerin ortaya konmasında yararlı olacağı kanaatindeyiz. Ayrıca hematolojik kanser patogenezinin anlaşılmasında kaynak rolü oynayabileceğini düşünüyoruz.

3. GENEL BİLGİLER

3.1. Kemik iliği

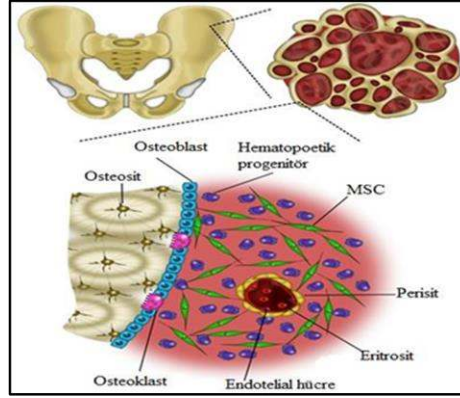
Kemik iliği, büyük kemiklerin merkezinde bulunan katı ve sert yapılar içindeki trabeküler ve stromadan oluşan tüm vücut kitlesinin %4-5'ini meydana getiren, vücudun en büyük organlarından biridir. Kemik iliği; kırmızı (aktif, hematopoetik) ve sarı (inaktif, yağlı) olmak üzere ikiye ayrılır ve temel bileşeni yağdır (5). Erişkin genç bireylerin sarı kemik iliğinde %15 su, %5 protein, %80 yağ bulunurken, kırmızı kemik iliğinde %40 yağ, %20 protein, %40 su vardır (Şekil 1).



Şekil 1. Kemik iliği makro (a) ve mikro (b) ortamındaki stromal hücreler (6).

Kırmızı ilik; eritrosit, lökosit ve trombositlerin üretildiği miyeloid dokudan zengindir. Her iki ilikte de yaygın damar ağı mevcuttur. Doğumda tüm kemik iliği kırmızıdır ve yaş ile beraber sarı ilik oluşmaya başlar. Erişkin birinde kırmızı ilik yassı kemikler ve uzun kemiklerin proksimal ucunda yer alırken sarı ilik uzun kemiklerin orta kısımlarında yerleşmiştir.

Erişkinlerde tüm kan hücrelerinin kökeni, kemik iliğindeki hematopoetik kök hücrelerden gelir (7). Kendi kendini yenileyebilme, çoğalabilme, tüm kan hücrelerini üretme, immün hücreleri yapılandırıp şekillendirme kabiliyetine sahip hücrelere hematopoetik kök hücreler (HKH) adı verilir (8). En önemli bileşeni hematopoetik hücreler olan kemik iliğinde ayrıca sitokinler, stromal hücreler, büyüme faktörleri, hücre dışı matriks ve kemokinler içeren özel mikroçevreler bulunmaktadır. Bütün bu hücre içi bileşenlerin etkileşim içinde bulunduğu yapıya “niş” adı verilir (5).



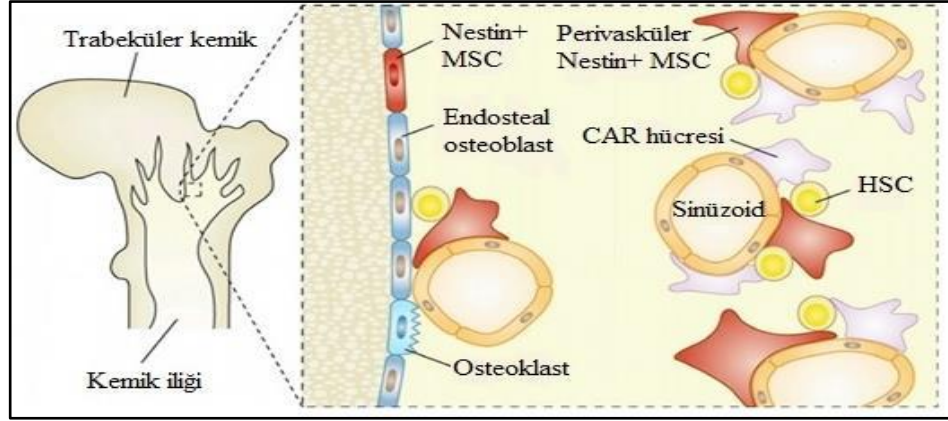
Şekil 2. Kemik iliği mikroçevresi “niş” (9).

Farklılaşmamış hematopoetik hücreler kemik yüzeyine yakın, farklılaşmış hücreler ise kemik iliği merkezine daha yakın bulunmaktadır. Hücredeki kromatin düzeyinde modifikasyonlar ve epigenetik değişiklikler hematopoetik kök hücrelerin oluşum mekanizmasında önemli yer tutar. Kemik iliği mikroçevresinden (niş) ve hücre içi düzenleyici sistemlerden aldıkları sinyallerle kök hücreler ya dinlenme fazında kalır ya da farklılaşır (6). Kemik iliği nişi hemotopoetik kök hücrelerin beklemede kalmalarını, çoğalmalarını, farklılaşmalarını ve göçlerini düzenler.

Kemik iliği nişi'nin önemli hücresel bileşenleri şunlardır:

1. Osteoblastik hücreler
2. Endotelial hücreler
3. Osteoklastlar

Bu hücreler mezenkimal hücrelerden köken alırlar ve niş'in fiziksel yapısını meydana getirirler. Osteoblastlar; kemik dokudaki matriks oluşumdan sorumludur ve kemik mineralizasyonunda görev alır. Endotelial hücreler HKH mikroçevresi oluşumunda önemli yere sahiptir. Osteoblastlar ve endotelial hücreler sırasıyla endosteal ve vasküler niş'i meydana getirerek HKH'nın kendilerini yenilemesi, farklılaşması ve fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için gereken mikroçevreyi oluşturması bakımından son derece önemlidirler. Kemik iliğinde osteoblastik ve vasküler nişlerin birbirleri ile ahenk içinde çalıştıkları belirtilmiştir (10). Osteoblastik nişte hematopoetik kök hücreler adezyon molekülleri aracılığıyla bir arada dururlar ve bu da kök hücrelerin sessiz kalmasına katkıda bulunur (11). Şekil 3'te hematopoetik nişlerin trabeküler kemik kavitesindeki yerleşimleri gösterilmiştir.



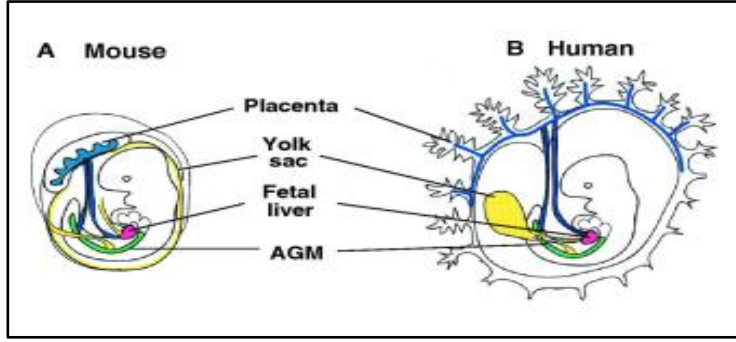
Şekil 3. Trabeküler kemik kavitesindeki hemotopoetik nişlerin lokalizasyonu (9).

Osteoklastlar çok sayıda makrofaj-granülosit öncül hücrelerin füzyonu ile oluşur ve endosteal nişte bulunurlar. Yapılan çalışmalar, HKH'ler ve nişleri arasındaki ilişkiyi artıran faktörlerin, osteoklastlardan salgılanan enzimler tarafından aktif hale geldiğini göstermiştir (12).

Kemik iliği hücre çeşitleri işlevsel olarak hematopoetik, stromal ve parankimal olarak gruplandırılabilir. Hematopoez hematopoetik hücrelerle, ekstraselüler matriks ve stromal hücreler arasındaki etkileşimler reseptör aracılı sinyaller ile düzenlenir (13).

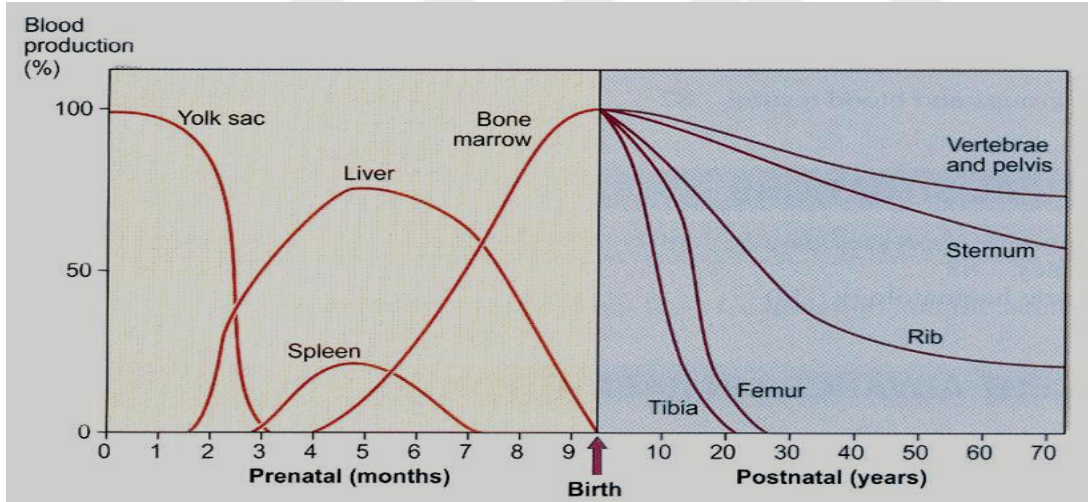
3.2. Hematopoez

Hematopoez kelime manası olarak kan hücrelerinin oluşumunu ifade eder. Embriyolojik hayattan başlayarak erişkinlik döneminde kan hücrelerinin üretilmesi ve yenilenmesi süreçlerinin tamamıdır. Omurgalı canlılarda hematopoez, primitif dalga ve kalıcı dalga olmak üzere iki dalgadan oluşur (14). Primitif dalga erken embriyolojik gelişim döneminde eritroid progenitörler ile eritrosit ve makrofaj üretiminde etkilidir (15). Primitif dalga geçici bir süreçtir, eritroid progenitörlerin kendini yenileme özelliği yoktur, yolk sak kesesinden üretilir ve embriyonun büyümesi sırasında oksijenlenmesinde rol oynar. Ancak adaptif bağışıklık sisteminin hücrelerini üretmez (16). Kalıcı dalga kalıcı hematopoez gelişiminden sonra oluşur ve multipotent hematopoetik kök hücrelerini içerir. Kalıcı hematopoetik kök hücreler gelişmekte olan embriyoda aorta-gonad-mezonefroz bölgesinde oluşmaya başlar (Şekil 4), oradan fetal karaciğere ve sonra da doğum sonrası mekanı olan kemik iliğine göç ederler (17).



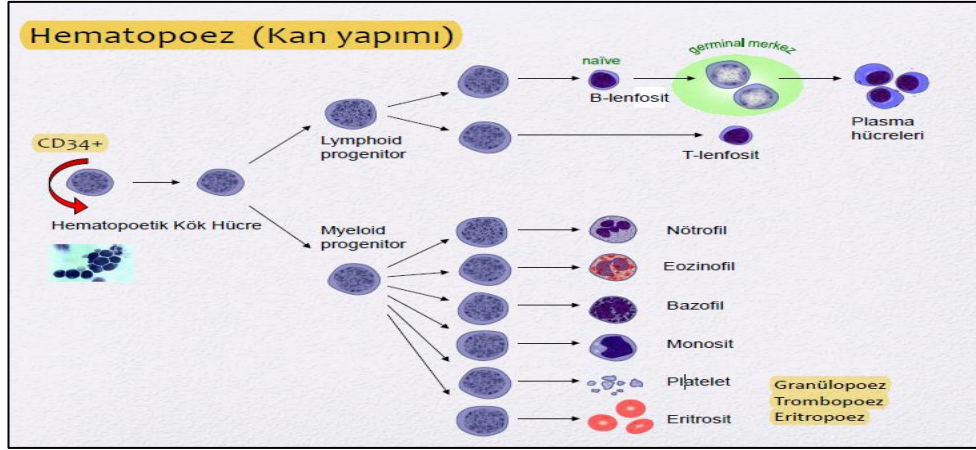
Şekil 4. Aorta-gonad-mezonefroz (AGM): Fetal hematopoietik kök hücrelerin primer orijini (16).

Primitif hematopoez dalgasının ortaya çıktığı zamanda, kan üretimi sadece ekstraembriyonik dokularda görülürken, kalıcı hematopoez dalgası sırasında hem ekstraembriyonik hem de intraembriyonik dokularda kan oluşturma aktivitesi belirgindir. İnsanlarda hematopoez Şekil 5’de gösterildiği gibi yolk sak kesesinde başlar (9-10 gün) oradan karaciğere (5-6 hafta) sonrasında kemik iliği (2-3.aydan sonra) ve timusa göç eder.



Şekil 5. Hematopoez (16).

Lenfoid ve myeloid hücreler, kemik iliğinin içindeki pluripotent kök hücrelerden meydana gelir (18). Lenfoid hücreler B ve T lenfositleri, myeloid hücreler ise eritrosit, granülosit, monosit ve megakaryosit gibi diğer kan hücrelerini oluştururlar. Bu olaya hematopoez adı verilmektedir (Şekil 6).



Şekil 6. Hematopoez ve kanın şekilli elemanları (19,20).

Kemik iliği içerisinde gelişen B hücreleri herhangi bir uyarı aldığında farklılaşır ve plazma hücrelerine dönüşerek immün sistemin önemli bir elemanı olurlar. Vücuda bir virüs veya bakteri girdiğinde yüzeylerindeki IgM/D molekülleri sayesinde B lenfositleri plazma hücrelerine dönüşür ve immüoglobülin (Ig) yapısındaki antikorları meydana getirerek savunmada görev yaparlar (Şekil 7) (21).



Şekil 7. İmmüoglobülin gelişimi (21).

3.3. Kanser

Hücre fonksiyonları bir denge üzerine kurulmuştur. Hücrelerdeki bölünme ve farklılaşma süreçleri dokuların ihtiyacına göre bir düzen içindedir, bu denge durumuna “homeostaz” denir. Bu denge herhangi bir mekanizma ile sekteye uğrarsa anormal hücre büyümesi yani kanser olarak tanımlanan durum meydana gelir.

3.3.1. Kanser tarihçesi

Kanserin tarihçesi insanlık kadar eski olmakla beraber net bir tanımlama yapmak zordur. Kanser bugün bizim için kötü büyüme anlamına gelmektedir ama yazılı tarihte salgın, veba yerine de kullanılabilmektedir. Bu yüzden papirüslerde ve mağara yazılarında tanımlar üzerine yorum yapabilmekteyiz. Paleopatolojik olarak kanserin tarih öncesi meydana gelmesine ilişkin kanıtlar nadir ve nispeten geçtir. Bazı osteosarkom izlerine mağara ayısı ve pleistosen atlarının kemik incelemesinde rastlanmıştır. İnsanda bu tür ilk tümörler M.Ö. 3400 yılından itibaren Mısır kafatasında tanımlanmıştır. Neolitik Avrupa ve Kolombiya öncesi Kuzey Amerika kemiklerinde multiple myeloma kanıtı izler bulunmuştur. Mısır papirüslerinde tanımlanan en iyi kanser tanımı deri, meme ve dişi üreme organlarındaki bazı şişlik ve ülserlerin varlığı idi (M.Ö. 1500). Günümüzde olduğu gibi eksizyon veya çeşitli merhemler ile muamele gördüler. Aynı tanımlar Mezopotamya, Hindistan ve Pers'in antik tıbbi yazılarında da bulunur. Kanser kavramının başlangıcını, çoğu tıbbi kavramlar gibi Hipokrat yazılarında (M.Ö. 400) buluyoruz. İnflamatör olmayan, sert şişlikler ve ülserler, genelleşme eğilimi olan dişi göğüs ve üreme eğilimi olan karkinos veya karkinom isimleri altında tanımlanır ve daha sonra Latince'ye kanser olarak çevrilir (22). Türk Tıp tarihine bakacak olursak kansere Hipokrat ve Galen de olduğu gibi hümorale patolojilerin sebep olduğu kara safraya bağlanarak “seratan” adı verilmektedir. Tarsuslu Osman Hayri Efendi'nin “Kenzü's Sıhhati'l Ebdaniye” (1298) adlı eserinde seratan küçük topuz büyüklüğünde ağırlı, damarlı bir yapı olarak tanımlanmaktadır. İshak bin Murad “Havasüledviye” eserinde kanser tedavisi ile ilgili önerilerde bulunmaktadır. Şerafeddin Sabuncuoğlu'nun “Cerrahiye-i İlhaniye” (1945) isimli eserinde kanserin dağlanarak kitlenin çıkarılması, açık yara varsa kurşun merhemlerin kullanılması gibi önerilerde bulunmuştur (23). Multidisipliner kanser ile mücadele tarihçesi ise 1700'lerin cerrahi ve korunma tavsiyeleriyle başlar ve 2009'daki prostat kanseri önlemede selenyum ve vitamin E koruyucu etkisinin incelendiği 35.535 erkek hasta üzerinde yapılan Selenyum ve Vitamin E Kanseri Önleme Çalışmasının (SELECT) sonuçlarına kadar gelir. Bu tarih hem klinik öncesi hem de klinik olarak etkili bir dizi kimyasal önleyici, aşı, cerrahi ve yaşam tarzı değişikliklerinin araştırılmasını içerir. Kanserden korunmanın klinik öncesi kilometre taşları, 1929'da kimyasal olarak indüklenen fare karsinogenezini önleme, 1940-

50'lerde enerji kısıtlaması çalışmaları, Lathrop ve Loeb tarafından yapılan 1913 ve 1916 fare çalışmalarını içerir. Alan kanserleşmesi ve çok basamaklı karsinogenezin keşfi ve sonraki moleküler karakterizasyonları, obezite kontrolü 1841 araştırmalarına ve genetik danışmanlık ve kanserden kurtulma çalışmalarına dayanmaktadır (24).

3.3.2. Kanser oluşum mekanizması ve kanser genetiği

Normal hücresel düzenleme bozulursa kanser olarak bilinen düzenlenemeyen ve kontrol edilemeyen hücre bölünmeleri oluşur. Protoonkogenler, normal hücre büyümesi ve gelişimini düzenleyen proteinleri üretir. Protoonkogenleri değiştiren herhangi bir durumda (mutasyon vb.) kansere sebep olan onkogenler ortaya çıkar, ayrıca tümör baskılayıcı genlerin de etkisiz hale gelmesi ile kanser için zemin hazırlanmış olur. Genetik mutasyonların yanında epigenetik değişiklikler de hücre bölünme ve farklılaşmasını etkileyerek kanser oluşturabilirler (25).

3.3.3. Kansere neden olan genetik mekanizmalar

Genetik ve epigenetik varyasyonlar oluşturarak kansere neden olan faktörlere “karsinojen” denir. Karsinojenler “endojen (vücudun ürettiği)” ve “ekzojen (dışarıdan maruz kalınan çevresel faktörler)” olmak üzere ikiye ayrılır. Çevresel faktörler; beslenme alışkanlıkları, sigara ve zararlı madde kullanımı, radyasyon ve UV ışığa maruz kalma yanında yaşın ilerlemesine bağlı mutasyon kümülasyonlarındaki artış da etkilidir. Epigenetik etkileri olan çevresel faktörler arasında beslenme, kimyasallar ve endüstriyel kirleticiler bulunur. Epigenetik mekanizmalar ayrıca utero ve hücresel düzeyde gelişim sırasında rol oynar, bu nedenle çevresel maruziyetler, yaşamın ilerleyen dönemlerinde hastalık riskini değiştirmek için gelişen organizmanın epigenomunu bozarak fetüse zarar verebilir. Buna karşılık, biyoaktif gıda bileşenleri yaşam boyunca koruyucu epigenetik modifikasyonları tetikleyebilir ve erken yaşamda beslenme özellikle önemlidir. Genetik özelliklerin ötesinde, bir bireyin genel sağlık durumu, gebelikte başlayan ve epigenetik değişiklikler yoluyla hareket eden birçok çevresel sinyalin entegrasyonu olarak kabul edilebilir (26). Kemik iliği mikroçevresi lösemnin ve diğer kanser türlerinin gelişiminde ve ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır. Birçok yönden, kemik iliği malign hücrelerin büyümesi için ideal bir mikroçevre sağlamaktadır (1).

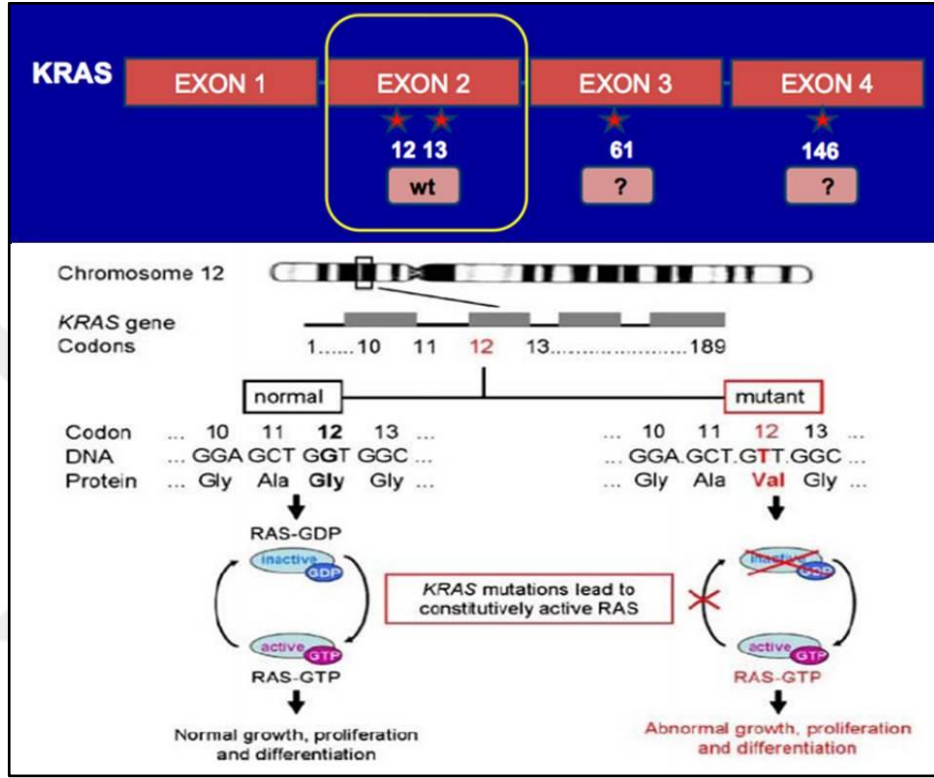
Son yıllarda yapılan araştırmalar sonrasında hücre çoğalması ve ölmesini kontrol eden genlerdeki mutasyonların kanserden sorumlu olduğu bildirilmiştir (27).

3.3.3.1. Protoonkogenler ve onkogenler

Normal hücre bölünme ve farklılaşmasının düzenlenmesinden sorumlu olan genler aynı zamanda protoonkogen olarak da adlandırılmaktadır. Protoonkogenlerdeki herhangi bir mutasyon sonrası gelişen fonksiyon artışı onları onkogene dönüştürebilmektedir. Bir protoonkogenin onkogene dönüşmesi, dominant bir mutasyon olayını temsil eder, yani mutasyona uğramamış ikinci allel, aktive edilmiş allelin fenotipini telafi edemez. Bu baskın mutasyon, aktive edilmiş bir onkoprotein sentezine yol açar ve böylece bir fonksiyon mutasyonu kazancını temsil eder. Aktive edilmiş onkoproteinler genellikle hücre döngüsünü aktive ederek, farklılaşmayı inhibe ederek veya apoptozu bloke ederek hücre proliferasyonu üzerinde uyarıcı etkilere neden olur ve böylece bir hücrenin tümörjenik fenotipinin gelişimine katkıda bulunur. Ayrıca tümör süpresör genlerin de mutasyonla inaktive olması ile kanserojenik etki sirkülasyonu tamamlanır (28). Onkogenler ilk olarak kuşlarda ve kemirgenlerde viral enfeksiyondan sonra tümör üreten retroviral olarak kodlanmış genler olarak kabul edildi. Retroviral onkogenler, mutasyona uğramış ve böylece aktive edilmiş bir biçimde virüs genomuna dâhil edilmiş normal hücre genlerinin türevleri olarak tanımlanabilir (29). Protoonkogenlerin onkogenlere dönüşümünü aktifleyen çeşitli yollar bulunmaktadır:

Nokta mutasyonlar: İnsan tümörlerinde en sık rastlanan onkogenlerden birisi “Ras” onkogenidir. GTP hidrolize edici protein Ras, tüm insan tümörlerinin %20-30’unda (kolon kanserlerinin %50’sinde, akciğer kanserlerinin %25’inde) mutasyona uğramış bir protoonkogenin ürünüdür. GDP/GTP’yi yüksek afinite ile bağlar ve GTPaz aktive edici proteinlerin (GAP) varlığında yüksek GTP hidroliz aktivitesi sergiler. Protoonkojenik “normal” Ras, hücre büyümesini, hücre farklılaşmasını, apoptozu ve diğer hücre olayları etkileyen sinyal iletim yollarında düzenlenmiş bir moleküler anahtar olarak işlev görür. Ras, GTP’ye bağlı veya GTP’nin GDP’ye hidrolize olduğu iki durum arasında geçiş yapar. Ras’ın onkojenik varyantları, GAP varlığında ve yokluğunda GTPaz aktivitesini bloke eden nokta mutasyonları içerir. Bu şekilde keşfedilen ilk mutasyon pozisyon 12’deki glisinin valine değişmesi ile

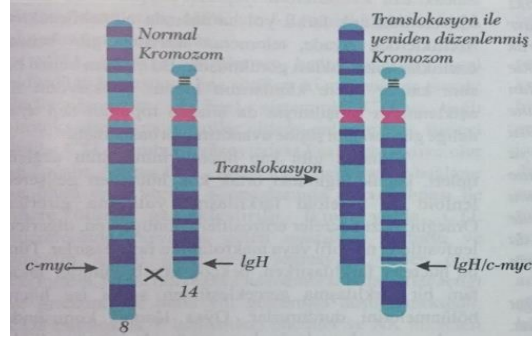
gerçekleşmiştir. Aynı şekilde 13. ve 61. pozisyonlardaki amino asit değişimleri de insan tümörlerindeki Ras onkogenlerinde sık rastlanır. Bu da GTP'den GDP formuna geçişi engeller, aktif Ras birikimine yol açar ve böylece tümör gelişimine katkıda bulunur (Şekil 8).



Şekil 8. Kolon kanserinde RAS onkogeni ve 12. kromozomda glisin valine değişimi (29).

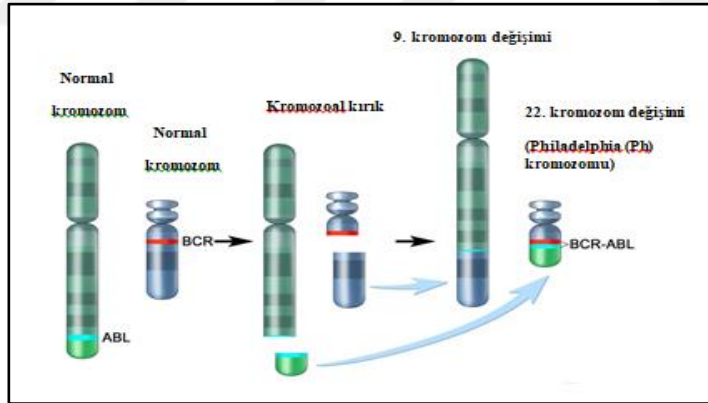
Translokasyonlar: Protoonkogenlerin onkogenlere dönüşümü sırasında kromozom yapısında translokasyon (duplikasyon ve delesyonları içeren anomali) sonrası lösemi ve lenfomalar ortaya çıkar. Kromozom translokasyonu ile meydana geldiği tanımlanan hastalık Burkitt Lenfomasıdır. Burkitt Lenfoma olgularında saptanan en sık ve en önemli genetik anomali 8. kromozomun q24 bandına lokalize MYC geninin, 14. kromozom q32 bandına lokalize Ig ağır zincir bölgesine translokasyonudur ve t(8;14) şeklinde ifade edilir (Şekil 9).

Bu translokasyon dışında daha az sıklıkla da olsa görülen translokasyonlar MYC geni ile Ig hafif zincir bölgesini ilgilendiren 2q11 lokusu arasındaki translokasyon t(2;8) ve yine MYC geni ile 22q11 lokusu arasındaki translokasyondur t(8;22).



Şekil 9. Burkitt Lenfoma translokasyon örneği [46,XY t(8;14)(q24;q32)].

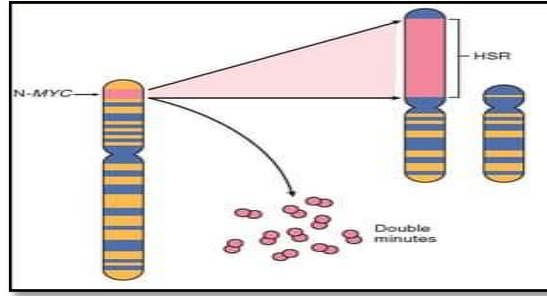
Diğer protoonkogenlerin translokasyonları, sıklıkla anormal gen ürünü oluşumuna neden olan kodlama dizilerinin yeniden yapılanması ile sonuçlanmıştır. ABL onkogeni, 9. kromozom üzerinde bulunan 9q34.1 bölgesinden 22 numaralı kromozom üzerindeki 22q11.2 (BCR) bölgesine aktarılmaktadır. Bu translokasyon, KML'nin patogenezinde merkezi rol oynadığı düşünülen BCR/ABL füzyon geninin oluşmasına neden olmaktadır (Şekil 10). Philadelphia (Ph) kromozomu olarak adlandırılan bu füzyon gen, tanıda ve prognozda etkilidir (29).



Şekil 10. BCR/ABL translokasyonu şematik çizimi.

Gen Amplifikasyonu: Birçok kanserde görülen bir diğer sitogenetik değişiklik, bir hücrede bulunan genomun bir parçasının birçok kopyasının var olması olarak bildiğimiz “gen amplifikasyonu” dur. Gen amplifikasyonu, nöroblastoma, baş-boyun yassı hücreli kanseri, kolorektal kanser ve beyinde malign glioblastoma gibi birçok kanserde sık görülür. Bu amplifiye bölgelerin hücre büyümesini uyarıcı ya da apoptozu durduran veya her ikisine de neden olan MYC, RAS ve EGF reseptörünü

kodlayan genler gibi protoonkogenlerin fazladan kopyalarını içerdiği bilinmektedir. Örneğin; N-MYC'i kodlayan MYCN protoonkogeni çocukluk çağı nöroblastomunun ileri evrelerinin %40'ında 200 kez amplifiye olmuştur (Şekil 11) (28).



Şekil 11. DNA'nın amplifiye olmuş parçaları, normal olarak bantlanmayan ve belirli DNA parçasının çok sayıda amplifiye olmuş kopyalarını içeren (double minutes) çok küçük ek kromozom ve (homogenously staining regions) homojen olarak boyanan bölgeler (HSR) olarak izlenir.

Protoonkogenler tarafından kodlanan proteinler normal hücre bölünmesini düzenlerken, onkogenler tarafından kodlanan proteinler kontrolsüz bölünmeye neden olarak kanser oluşumuna sebep olur. Ayrıca farklılaşmadaki aksamalar ve programlanmış hücre ölümündeki başarısızlıklar da kanser hücrelerinin özelliğidir.

3.3.3.2. Tümör süpresör genler

Tümör baskılayıcı genler, hücre büyümesinin negatif düzenleyicileridir. Normal işlevleri tehlikeye girdiğinde, engelleyici etkilerinin yokluğu, sınırsız hücre döngüsüne ve büyümesine yol açabilir. Son zamanlarda ortaya çıkan güçlü kanıtlar, bu genlerin işlev kaybının kansere yol açan yaygın bir olay olduğunu doğrulamaktadır. Tümör süpresör genlerin başarısızlıkları, gen DNA'sındaki değişikliklerden veya protein ürünlerinin arızalanmasından kaynaklanabilir. Bu genler hakkında son zamanlardaki olağanüstü bilgi birikimi, normal karsinogenezin normal düzenleyici süreçlerin bozulmasını temsil ettiğini ortaya koymaktadır (30). P53, RB, INK4-ARF ailesi ve PML gibi tümör baskılayıcı genler, hücre döngüsü ilerlemesini düzenleyerek, DNA replikasyonunun ve kromozomal ayrışmanın aslına uygunluğunu sağlayarak veya apoptozu indükleyerek malign transformasyonu baskılar. Miyeloid lösemide, miyeloid transkripsiyonunun ve çözünür sinyal faktörlerinin yüksek düzeyde koordineli, aşamalı ifadesinden kaynaklanan hematopoetik farklılaşma bozulur, terminal farklılaşma ve kontrolsüz

proliferasyonda bir bloğa yol açar. Bu, hemen hemen her zaman, kontrol noktası kontrolünü ve apoptozu indükleyen fonksiyonlarını atlatmak için bir veya birkaç tümör baskılayıcı genin fonksiyonel inaktivasyonunu veya genetik bozulmasını içerir (31). Tümör baskılayıcı genlerde meydana gelebilecek delesyon, genin kodlanan bölgesinde stop kodonu (AUG, UGA, UAA) oluşumu gibi genetik mutasyonlar inaktivasyonuna neden olurlar.

3.3.3.3. DNA tamir genleri

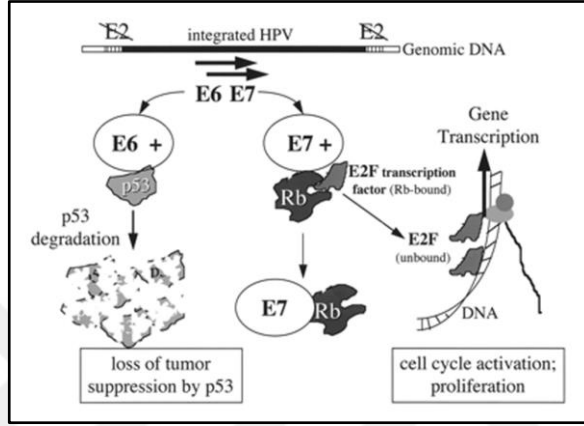
DNA’da çeşitli nedenler ile hasarlar oluşabilir, bu hasarlar onarılmadığı takdirde ise hücreler neoplastik transformasyona uğrarlar. Hücrelerimiz DNA hasarını onarabilme kabiliyetine sahiptir. Bunu da DNA onarım genleri aracılığıyla sağlamaktadır. DNA tamir genlerinde işlev kaybı için her iki allel birden inaktif hale gelmelidir. DNA onarım genlerinde kalıtsal mutasyona sahip olan bireyler kanser riski yüksek bireylerdir. DNA tamir genlerinin sınıflaması ve bazı örnekleri Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. DNA tamir genleri.

Sınıfı	Genler
Baz Eksizyon Tamiri (BER)	APEX1, APEX2, CCNO, LIG3, MPG, MUTYH, NEIL1, NEIL2, NEIL3, NTHL1, OGG1, PARP1, PARP2, PARP3, POLB, SMUG1, TDG, UNG, XRCC1
Nükleotit Eksizyon Tamiri (NER)	ATXN3, BRIP1, CCNH, CDK7, DDB1, DDB2, ERCC1, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERCC6, ERCC8, LIG1, MMS19, PNKP, POLL, RAD23A, RAD23B, RPA1, RPA3, SLK, XAB2, XPA, XPC
Yanlış Eşleşme Tamiri (MMR)	MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH4, MSH5, MSH6, PMS1, PMS2, POLD3, TREX1
Çift Zincir Kırıkları Tamiri (DSB)	BRCA1, BRCA2, DMC1, FEN1, LIG4, MRE11A, PRKDC, RAD21, RAD50, RAD51, RAD51C, RAD51B, RAD51D, RAD52, RAD54L, XRCC2, XRCC3, XRCC4, XRCC5, XRCC6
DNA Tamiri ile ilişkili Diğer Genler	ATM, ATR, EXO1, MGMT, RAD18, RFC1, TOP3A, TOP3B, XRCC6BP1

3.3.3.4. Virüsler

Papillomavirüs (HPV) enfeksiyonları sonucu oluşan servikal tümörlerde, viral protein E6 p53'e bağlanır ve viral protein E7 de Rb'ye bağlanır. HPV pozitif tümörlerde, p53'ün viral protein E6'ya bağlanması hızlıca yıkılmasına neden olur (Şekil 12). P53 fonksiyon kaybının, kanserin önemli oluşum nedenlerinden biri olduğu, kanserin önlenmesindeki önemini vurgulamaktadır.



Şekil 12. HPV enfeksiyonu sonrası P53 fonksiyon kaybının şematik gösterimi (32).

3.4. Hematolojik kanserler

3.4.1. Lösemi

Genetik anomali sebebi ile hematopoezin durmasına ve hematopoetik kök hücrelerin klonal çoğalmalarına neden olan kan hastalığıdır. Kelime manası olarak kanın beyazlaşması anlamına gelen lösemi ilk olarak 1827 yılında Valpeau tarafından terminolojiye kazandırılmıştır. Lösemiler geliş ve ilerleyiş açısından “akut” ve “kronik” olarak sınıflanmaktadır. Olgunlaşmamış hücrelerden (blast) köken alanlar akut olarak adlandırılır, ilerlemesi biraz daha hızlıdır. Çoğunluğu olgun hücrelerden oluşan arada olgunlaşmamış hücreleri de içeren tipi ise kronik olarak adlandırılır, ilerlemesi ise daha yavaştır. Lösemiler köken aldıkları yapıya göre lenfoid veya miyeloid olarak sınıflandırılır. Böylece iki ana başlıkta ve dört grupta incelenir (33,34):

1. Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)
2. Akut Myeloid Lösemi (AML)
3. Kronik Myeloid Lösemi (KML)

4. Kronik Lenfoblastik Lösemi (KLL)

3.4.1.1. Akut lenfoblastik lösemi (ALL)

3.4.1.1.1. Tanım ve tarihçe

ALL, kemik iliğinde klonal lenfoblastların anormal proliferasyonu ile kendini belli eden hematolojik bir kanserdir. Malign lenfoblastların davranışı yalnızca genomik anormalliklerine bağlı değil, aynı zamanda niş ile kompleks ilişkilerine de bağlıdır. Bu anormal çoğalma sonrası fonksiyonlarını yerine getiremeyen kemik iliğinde pansitopeni meydana gelir. Pansitopeni sonucunda da halsizlik, solukluk, ateş ve sonuçları ağır olabilen enfeksiyonlara zemin hazırlanır. Lenfoblastların iç organlarda birikmesi sonrası organomegaliye neden olabilir (35).

3.4.1.1.2. Epidemiyoloji

Çocukluk çağında gözlemlenen en yaygın kanserdir. Bu dönemde gözlenen kanserlerin %25'ini oluşturur (36). ALL yıllık insidansı Türkiye'de 1,5/100.000 olarak bildirilmiştir. Son çalışmalarda eskisine göre ciddi remisyon oranları (%90) bildirilmektedir. Yüksek riskli vakalarda tedavi dozu riske göre ayarlanmakta ve gerekirse kemik iliği kök hücre nakli seçeneği göz önünde bulundurulmaktadır (37). Çocukluk çağında erkeklerde görülme olasılığı kızlara göre daha yüksektir. Kardeşlerden birinin ALL tanısı alması ile diğer kardeşlerde risk artmaktadır. Çift yumurta ikizlerinde bu oran 2-4 kat artmış iken tek yumurta ikizlerinde 5 yıl içinde görülme olasılığı %20 olarak bildirilmiştir (38).

3.4.1.1.3. Sınıflandırma

Akut Lösemileri sınıflandırmak için kullanılan FAB (French American British) ve WHO (World Health Organization) olmak üzere iki sınıflama mevcuttur. Bu iki sınıflama kemik iliği blast sayılarına yaklaşımın yanı sıra FAB sınıflaması daha çok sitokimyasal ve morfolojik boyanma özelliklerinden yararlanırken, WHO sınıflaması sitogenetik, immünofenotipleme ve moleküler anomalilerden yararlanır (39). WHO 2008 sınıflaması, öncü B ve T hücrelerinin farklılaşması, proliferasyonu sırasında oluşan hatalar sonucu oluşan ALL'yi üç gruba ayırmıştır: **Prekürsör B-lenfoblastik lösemi/lenfoma**: t(9;22) pozitif B- lenfoblastik lösemi; BCR-ABL1, t(12;21)(p13.2;q22.1) pozitif B-lenfoblastik lösemi; ETV6-RUNX1, hiperdiploidi pozitif B-lenfoblastik lösemi, hipodiploidi pozitif B- lenfoblastik lösemi,

t(5;14)(q31.1;q32.3) pozitif B-lenfoblastik lösemi; IL3-IGH, t(1;19)(q23;p13.3) pozitif B-lenfoblastik lösemi; TCF3-PBX1, **Prekürsör T-lenfoblastik lösemi/lenfoma** ve **Burkitt lösemi/lenfoma** olarak sınıflanmıştır (40).

FAB sınıflandırması, 1976 yılında morfolojiyi temel alarak ALL'yi L1, L2, L3 olmak üzere üç gruba ayırmıştır (41): **L1 tip** / Çocukluk ALL (B-ALL ve T-ALL), **L2 tip** / Yetişkin ALL (çoğunlukla T-ALL), **L3 tip** / Burkitt tipi ALL (B-ALL) olarak adlandırılır.

3.4.1.1.4. Prognoz

Morfolojik olarak 3 alt tipe ayrılan ALL'de L1 ve L2 immünofenotipik olarak fark göstermezken tedaviye yaklaşım açısından fark oluşturan olgun B hücreli ALL'yi gösteren L3 ayrımı yapılmalıdır. Yaş bu hastalarda prognozu belirleyen en önemli faktördür. Çocukluk çağı ALL'lerde %90'a yakın kür sağlanması beklenirken erişkin dönemde bu oran %40'lar civarındadır (42). Erişkin dönemde cinsiyet prognozda dikkate alınmaz iken çocukluk çağında erkek cinsiyet kötü prognoz olarak bildirilmiştir (43).

3.4.1.1.5. Etiyoloji

ALL patogenezinde birçok faktör bulunmak ile beraber (kimyasallar, ilaçlar, radyasyon, genetik ve çevresel faktörler vb.) etiyojisi tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Viral unsurların da patogeneizde önemli yeri bulunmaktadır. Örneğin; çocuklarda L3 tipi ALL ve Burkitt lenfomaya Epstein-Barr Virüsünün (EBV) neden olduğu bildirilmiştir (44)

3.4.1.1.6. Klinik

ALL tanısı konulan hastalar kliniğe genellikle kemik iliği tutulumu nedeniyle kemik ağrıları, halsizlik, yorgunluk, ciltte ve ağız içinde kanama, enfeksiyona açık olduklarında sıkça ateş ve laboratuvar olarak da pansitopeni ile başvurabilirler. Kemik iliği tutulumuna böbrek tutulumu, hepatosplenomegali, lenfadenopati yanı sıra santral sinir sistemi (SSS) tutulumu da eşlik edebilir. SSS tutulumu B-ALL %20-30 gibi yüksek oranlardadır ve prognozda önemlidir. Tedavide kemoterapi önemli bir yer tutar. Erişkin dönemde yan etkiler fazla gözlendiğinde dozu yeterli olarak verilemeyebilmektedir (45).

3.4.1.1.7. ALL’de gözlenen sitogenetik değişiklikler

Çocukluk dönemi ALL’de kromozomal anomali varlığı %80 olarak bildirilmektedir. Bu anomalilerin tespiti, tanı, prognoz ve tedavi seçiminde yol göstermektedir. Hiperdiploidi çocukluk çağı B hücreli ALL’lerde en çok gözlenen sayısal anomali olup iyi prognoz göstergesidir. Hipodiploidilerden kromozom sayısı 40’ın altında olanlar kötü prognoz gösterir. ALL’de sayısal anomalilerle birlikte çok sayıda yapısal anomaliler de gözlenmektedir. (46).

3.4.1.1.7.1. Yapısal anomaliler

- **t(12;21)(p13;q22):** Çocukluk çağı B-ALL’lerde %25 oranında görülmekle birlikte, yetişkin ALL’lerde çok daha az görülmektedir. Tespiti için konvansiyonel sitogenetik teknikler yetersiz kaldığından FISH yöntemi tercih edilir. 12p13’te bulunan ETV6(TEL) geni ile 21q22’de bulunan AML1(CBFA2) geni arasında resiprokal bir translokasyon sonucunda ETV6/AML1 füzyon proteini oluşmaktadır. Bu translokasyonun görüldüğü hastalarda iyi prognoz görülmektedir (47).
- **t(9;22)(q34;q11):** Burada Ph “Philadelphia kromozomu” olarak bilinen 22q11’de bulunan BCR geni ile 9q34’te bulunan ABL protoonkogeninin yapışması neticesinde BCR-ABL olarak adlandırılan kimerik bir protein yapısı oluşmaktadır. ALL vakalarında kırık noktası BCR geninin ekson 1 ile ekson 2 arasında “m-BCR (minör breakpoint cluster region)” diye bilinen bölgededir ve p190 BCR-ABL olarak isimlendirilir. KML olgularında ise ekson 14 ile 15 ya da ekson 13 ile 14 arasında bulunan “major breakpoint cluster region (M-BCR)” diye isimlendirilen bölgededir ve p210 BCR-ABL olarak adlandırılır. Her iki durumda da oluşan füzyon protein, sitoplazmada yerleşmekte ve hücrenin apoptoza dirençli hale gelmesine neden olmaktadır. Çocukluk çağı ALL’lerinde Ph pozitifse kötü prognoz habercisidir ve hastaların yoğun tedaviye alınması gerekmektedir (48).
- **t(1;19)(q23;p13):** Çocukluk çağı pre-B ALL’lerinde %20-25 oranında gözlenirken, diğer türlerde %5-6 oranında görülmektedir. Translokasyon, 19. kromozomdaki E2A bölgesi ile 1. kromozomdaki hox geni olan PBX1 bölgesi arasındadır. Sonucunda E2A/PBX1 adı verilen füzyon proteini oluşmaktadır. Kötü prognoz görülür (49).

- **t(8;14)(q24;32) ve varyant formları olan t(2;8)(p12;q24) ve t(8;22)(q24;q11):** Burkitt lenfoma, olgun B ALL veya Burkitt tipi ALL'de (FAB L3) görülmektedir. B hücreli ALL'de olguların %85'ini t(8;14)(q24;32), %5'ini t(2;8)(p12;q24), %15'ini ise t(8;22)(q24;q11) oluşturmaktadır (50).
- **MLL translokasyonları:** ALL olgularının yaklaşık %8'inde MLL genini içeren 11q23 bölgesini tutan translokasyonlar bulunur. Bu translokasyonlar t(4;11), t(9;11) ve t(11;19)'dur. t(11;19) MLLT1/ENL hem erken B-ALL hem de T-ALL de görülür. MLL gen yeniden düzenlemeli hastalar genellikle kötü prognozludur. İlginç bir şekilde MLL gen delesyonlu olgularda kötü prognoz gösterilmemiştir (51).
- **TCF3/PBX1 translokasyonu:** ALL olgularının yaklaşık %5'inde t(1;19) translokasyonu bulunur. Bu translokasyonla kromozom 19'daki TCF3 geni ile kromozom 1'de yer alan PBX1 geni füzyonu gerçekleşir. t(1;19) başlıca pre-B ALL'de gözlenmektedir (52).
- **Delesyonlar:** Çocukluk çağı ALL'lerinde 9p delesyonu %10 sıklıkta rastlanmaktadır. 9p'de meydana gelen delesyon, p16 INK4A, p15 INK4B, p14 ARF69,70 gibi hücre siklusunu düzenleyen genler üzerinedir ve bu da 9p'de lokalize olan tümör baskılayıcı genler üzerine etkilidir. 6q delesyonlarının sıklığı ise %7'lerdedir. Burada kırık noktası 6q15, 6q21 ve 6q23 arasındadır (53). 12p'deki anomaliler ise %10 civarındadır, delesyon ve translokasyon olarak gözlenmektedir. T-ALL'de de gözlenmektedir. İyi prognoz işaretidir (54).

3.4.1.1.7.2. Sayısal anomaliler

- **Yüksek hiperdiploidi:** 50'den fazla kromozom sayısı olan vakalarda bu adı alır. Normal ve blast içindeki DNA'nın akım sitometrisi ile ölçülmesiyle çıkan oranları 1.16'dan büyükse hiperdiploidi olarak kabul edilmektedir. Çocukluk çağı ALL'lerin %25-30'unda gözlenmektedir. Yetişkinlerde daha azdır. En sık olarak 21. kromozomun artışı gözlenmekle birlikte 4.6.10.14.17.18.20. kromozomların ve X kromozomunun artışı da

görülebilmektedir. Kromozom sayısı 56-67 olanlarda iyi prognoz, 51-56 ise daha kötü, 82-94 aralığında ise en kötü prognoz gösterir (55).

- **Düşük hiperdiploidi:** 47-50 arası kromozom sayısına sahip olan durumlardır. Çocukluk çağı ALL'lerin %10-15'ini oluşturmakla birlikte, yetişkinlerde %7-17 oranında görülmektedir. Prognozu yüksek hiperdiploidi olanlara oranla daha kötüdür. Bu hiperdiploidi çeşidinde 8.10.21. kromozomlarda artış gözlenmektedir (56).
- **Hipodiploidi:** 46 kromozomdan az olan durumlara denir. 41-45 olanlar, 30-40 olanlar, 30'dan az olanlar olmak üzere üç alt gruba ayrılmaktadır. Çocukluk çağı ALL'lerin %7-8'ini oluştururken, yetişkinlerde %2-8 oranında görülmektedir. Kromozomlardaki kayıp, dengesiz translokasyonlar ve disentrik kromozomlar hipodiploidiye neden olur. 20. kromozomun kaybı sıklıkla karşımıza çıkmakla beraber 1.5.6.10.11.18.19.21.22. kromozomlardaki kayıplar da buna eşlik edebilir. Prognozu kötüdür (57).
- **Diploidi:** 46 kromozom vardır. %10-15 oranında görülmektedir. Prognoz orta seviyededir (58).

3.4.1.2. Akut miyeloid lösemi (AML)

3.4.1.2.1. Tanım ve tarihçe

Kemik iliğinde hematopoetik kök hücrelerinin klonal çoğalması ile oluşan durumdur. Akut miyeloid lösemide normal olgunlaşma süreci sekteye uğrayan blast hücreleri olgunlaşamaz, kemik iliği ve kanda birikir. Bunun sonucunda ise normal olgunlaşması gereken kan hücrelerinin çoğalması durur ve anemi, trombositopeni, lökopeni ortaya çıkar. Hipokrat'tan beri klinik tarifleri dile getirilmiş olsa da yeterli tanımlama 1827 yılında Velpau tarafından kaleme alınmıştır. Hastada mikroskobik olarak lösemi varlığı 1845'de Carigie ve Bennett, ardından 1846'da Virchow tarafından olmuştur. 1847'de Virchow "leukemia" kelimesi ile hastalığın adını koymuştur. 1913 yılında bir Türk hematoloğu olan Hasan Reşad Sığındı ile birlikte Schilling-Torgau ilk monositer lösemiye tanımlamışlardır (56).

3.4.1.2.2. Epidemiyoloji

AML çocukluk dönemi lösemi olgularının %15-20'sini, yetişkinlerde akut lösemilerin %80'ini meydana getirmektedir. Yaşla beraber sıklığı artmakla beraber erkeklerde daha sık görülür. En sık 60-65 yaş arasında gözlemlenir.

3.4.1.2.3. Sınıflandırma

Sıklıkla FAB ve WHO sınıflaması kullanılır. Akut lösemilerin sitokimyasal ve morfolojik boyanma niteliklerine göre FAB sınıflaması yapılmıştır. FAB sınıflamasına göre M0-M7 arasında sınıflanmıştır. FAB'a göre, M0: Minimal farklılaşma gösteren akut miyeloblastik lösemilerle başlayıp olgunlaşır. M7: Akut megakaryoblastik lösemilere giden 8 grup olarak tanımlanmıştır (57). 2001 yılında Dünya Sağlık Örgütü akut lösemilerde lenfoid ve hematopoetik kökenli kanserler için yeni bir gruplandırma oluşturmuştur. Buna göre Akut miyeloid lösemiler:

- a) Tekrarlayan sitogenetik anomalilerle seyreden AML
- b) Çoğul seri displazi ile seyreden AML
- c) Tedaviye ikincil AML ve MDS
- d) Tanımlanan gruplara girmeyen AML olmak üzere dört grupta incelenir (40).

3.4.1.2.4. Prognoz

Çok değişkenli prognoz çalışmalarında yaş önemli bir faktördür (59). Sitogenetik özelliklerine göre prognoz 3 gruba ayrılmıştır:

A) İyi prognoz: t(8;21), t(15;17), inv(16) veya t(16;16) kromozom anomalileri gözlenen 60 yaş altı hastalar iyi prognozludur.

B) Kötü prognoz: İki'den fazla kromozomda sitogenetik anomali gözlenen AML'li olgularda 5. kromozom uzun kol delesyonu, kromozom 5 veya 7 monozomisi gözlenmesi kötü prognoza işaret eder.

C) Orta Prognoz: İyi ve kötü prognozlularda görülen genetik bozukluklardan farklı karyotip sergilerler.

3.4.1.2.5. Etiyoloji

Çevresel ve genetik faktörlerin yanı sıra kimyasallar, radyasyon ve predispozan hastalıklar etiyolojide sorumlu tutulmaktadır. Radyasyona maruz kalan

insanlarda AML 15-20 kat fazla gözlenmektedir. Ayrıca sigara, böcek ilaçları gibi kimyasallar da insidansı artırır. Genetik geçiş için yeterli delil olmamakla beraber ikizlerde kardeşte görülme sıklığı fazla bulunmuştur. Normal çocuklar ile genetik hastalıklara sahip çocuklar kıyaslandığında AML görülme sıklığının sendromlu çocuklarda fazla olduğu bildirilmiştir (59).

3.4.1.2.6. Klinik

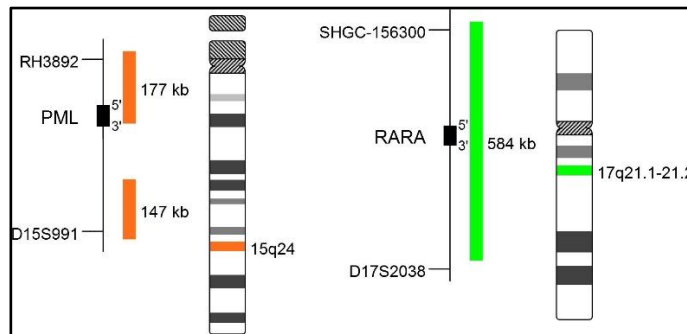
Anemi, trombositopeni ve lökopeniye bağlı olarak halsizlik, yorgunluk ve enfeksiyonlara açık olduğundan ateş ile kendini gösterir. İştahsızlık ve kilo kaybı sık rastlanan durumdur, tedavi edilmez ise mortal seyredebilir.

3.4.1.2.7. AML’de gözlenen sitogenetik değişiklikler

Kompleks bir hastalık olan AML’de çeşitli genlerde meydana gelen mutasyon ve sitogenetik anomaliler belirtilmiştir. AML oluşumuna neden olan genler translokasyonlarda yer alan genlerin klonlaması ile belirlenmiştir.(60).

3.4.1.2.7.1. Yapısal anomaliler

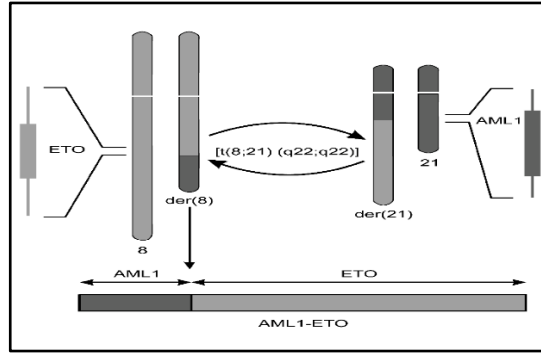
- **t(15:17)(q22:q11):** AML M3’de prognoz belirlemede önemli bir özellik olan 15. kromozomdaki PML geni ile 17. kromozomdaki RARA geninin yapışması ile oluşan translokasyondur (Şekil 13) . Hastaların %95’inde tanı sırasında pozitifdir (61).



Şekil 13. 17. kromozomdaki RARA ve PML genlerinin şematik görünümü.

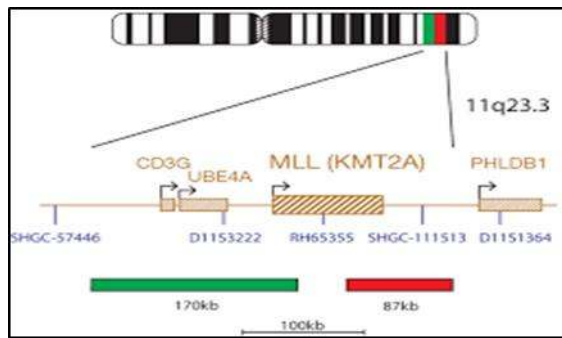
- **t(8:21)(q22:q22):** AML M2’de gözlemlenen 21. kromozom üzerindeki AML1 geni ile 8. kromozom üzerindeki ETO geninin füzyonu ile oluşan bir

translokasyondur (Şekil 14). AML hastalarının %5-10'unda, AML-M2 hastalarının %30-40'ında görülen bu translokasyon iyi prognoza sahiptir (62).



Şekil 14. 21. kromozomda AML1 geni ile 8. kromozomda ETO translokasyonu şeması.

- **Inv (16):** AML M4'te gözlemlenen ve CFB-MYH11 gen bölgesinde oluşan farklılaşma ile meydana gelir. İyi prognoz belirteci olan inv(16) AML'li olguların yaklaşık %10-12'sinde gözlenir (62).
- **MLL geni translokasyonları:** 11q23 bölgesini içeren translokasyonlardır (Şekil 15). 1 yaş altı AML'lerin %60'ında yetişkin AML'lerin %10'unda bulunabilir. Bugüne kadar en yaygın yer değiştirmeler sonucunda , MLL-AF4 füzyon geni; t(4;11)(q21;q23), MLL-AF9 füzyon geni; t(9;11)(p22;q23) ve MLL-ENL füzyon geni; t(11;19)(q23;p13.3) olduğu belirlenmiştir. Akut lösemilerin hepsinde t(4;11) translokasyonu kötü prognoz belirtecidir (63).



Şekil 15. MLL geni prob spesifikasyonu şematik görünümü.

3.4.1.2.7.2. Sayısal anomaliler

- AML'ye spesifik olarak monozomi 5 ve monozomi 7 hem çocuklarda hem de yetişkinlerde kötü prognozla ilişkilidir. Monozomi 7 karyotipli

pediatrik AML'li hastalar aynı zamanda relaps açısından yüksek risk taşımaktadırlar. En sık olarak hipodiploidi ayrıca 5 ve 7 numaralı kromozomları içeren kompleks karyotiplerle karşılaşılabılır. AML M3'te yapısal anomalilere ek olarak trizomi 8 eşlik edebilir (64).

3.4.1.3. Kronik lenfositik lösemi (KLL)

3.4.1.3.1. Tanım ve tarihçe

Kronik lösemiler arasında en sık gözlenen türüdür. Olgun B lenfositlerin kemik iliğinde, periferik kanda, lenf düğümlerinde, karaciğer ve dalakta aşırı artışı ile karakterizedir. Lösemi tanısı tarihte tanımlandıktan sonra 1893 yılında Kundrat, lösemiye lenf düğümlerini tutan kronik bir hastalık olarak tanımlarken “lenfosarkoma” deyimini kullanmıştır (65). Ancak KLL'nin klinik olarak ilk ayrıntılı tanımı Minot ve Isaacs tarafından 1924 yılında yapılmıştır (66).

3.4.1.3.2. Epidemiyoloji

Erişkinlerde gözlemlenen en sık lösemi tipidir. Tanı konulan KLL olgularının %95'i B-KLL'dir. Toplumda insidansı 4/100.000 olarak bildirilmiştir ve yaş ile beraber artmaktadır. 60-70 yaş arası bildirimi sıklığıdır. 70 yaşın üzerinde 50/100.000 olarak bildirilmiştir. Erkeklerde görülme olasılığı kadınlardan fazladır (67).

3.4.1.3.3. Sınıflandırma

KLL lenfositleri farklılaşmasını ve olgunlaşmasını tamamlamış, yaşam süresi uzun monoklononal hücrelerden oluşmaktadır. Sınıflamasında B-KLL ve T- KLL olarak ikiye ayrılmaktadır: **B-Hücreli KLL** (B Kronik lenfositik lösemi, B Prolenfositik lösemi, Tüylü (Hairy) hücreli lösemi, Plazma hücre lösemisi, Lösemi-lenfoma sendromları) **T-Hücreli KLL** (T Kronik lenfositik lösemi, T Prolenfositik lösemi, Erişkin T hücreli lösemi-lenfoma, Sezary sendromu, Periferik T-hücreli lenfoma) olarak sınıflandırılır (68).

3.4.1.3.4. Prognoz

Hastaların çoğunluğu asemptomatik seyrettiği için tedaviye başlama süresi prognozu etkilemektedir. Evre 0 düşük riskli hastalar, evre I ve II orta riskli hastalar, evre III ve IV yüksek riskli hastalardan oluşmaktadır. Düşük riskli hastalarda beklenen yaşam 12 yılın üzerindeyken, orta risk grubunda 8 yıl, yüksek risk grubunda ise 2 yıla düşmektedir (69). Ayrıca IgVH gen mutasyon varlığı, CD-38 ekspresyonu, $\beta 2$ mikroglobülin ve timidin kinaz aktivitesindeki artış, P53 inaktivasyonu varlığı prognozda kötü işaret olarak değerlendirilmektedir (70).

3.4.1.3.5. Etiyoloji

Akut ve kronik myeloid lösemiden farklı olarak radyasyon, kimyasal ilaç, viral enfeksiyonlar ile direkt bağlantısı gösterilememiştir. Fakat aile öyküsü olan kişilerde görülme olasılığı %10-15 oranında arttığı bildirilmiştir (71).

3.4.1.3.6. Klinik

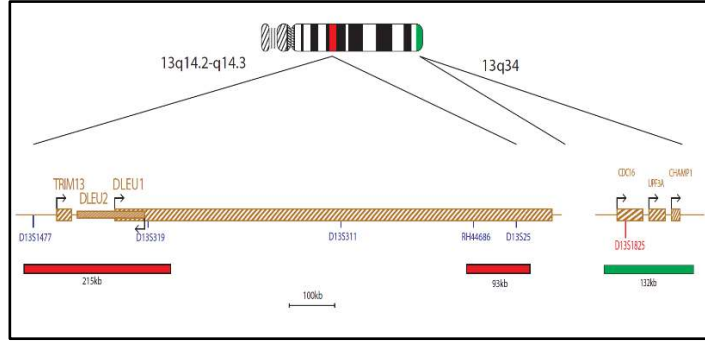
Hastaların birçoğunda erken evrede semptom vermeyebilir ve rutin tam kan sayımı sırasında tanı konulabilmektedir. Ayrıca ateş, iştahsızlık, yorgunluk, kilo kaybı, gece terlemesi, lenf bezlerinde büyüme, sık sık enfeksiyon geçirme, splenomegali ve buna bağlı ağrı ile de kendini belli edebilmektedir. Rai ve Binet evreleme sistemleri kullanılarak, KLL klinik evrelere ayrılır (72).

3.4.1.3.7. KLL’de gözlenen sitogenetik değişiklikler

KLL de klasik sitogenetik taramalar B hücrelerinin in vitro proliferasyonu zor olduğu için kullanılamamaktadır. FISH yöntemi uygulanarak KLL hastalarının %80’inde p53 ve 13q14 delesyonları tespit edilebilmektedir (73).

3.4.1.3.7.1. Yapısal anomaliler

- **13q14 delesyonu:** KLL hastalarında en sık görülen anomalilerinden biri 13q14 bölgesinin delesyonudur ve Rb tümör baskılayıcı geni bu bölgede yer alıp hematolojik kanserlerde önemli role sahiptir. 13q14 bölgesinde MDR dışındaki genlerin KLL patogenezinde rol aldıklarını destekler niteliktedir (Şekil 16)(74).



Şekil 16: 13q14 delesyonu şematik çizimi.

- **11q22.3 delesyonu:** 11q22.3 bölgesinin delesyonu KLL’li hastaların yaklaşık %15’inde kötü prognoz bulgusu verir (67).
- **17p13 delesyonu:** 17p13 bölgesinde yer alan p53 tümör baskılayıcı geni apoptozisde görevlidir. 17p13 bölgesi delesyona uğrayan hastaların %80’inde p53 geni de mutasyona uğrayarak fonksiyonunu kaybeder. KLL’de kötü prognozu gösterir (67).

3.4.1.3.7.2. Sayısal anomaliler

- **Trizomi 12:** Orta seviyede prognoz ile ilişkilidir ve genellikle diğer kromozomal anomalilerle birlikte görüldüğü bildirilmiştir.

3.4.1.4. Kronik miyeloid lösemi (KML)

3.4.1.4.1. Tanım ve tarihçe

Hematopoetik kök hücrelerin kontrolden çıkarak klonal çoğalması ile ortaya çıkan malign karakterli bir hastalıktır. Myeloid elemanların (monosit, eritrosit, megakaryosit, B lenfoid ve T lenfoid) proliferasyonu, apoptozisin azalması sonucu oluşur. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), KML hastalığını miyeloproliferatif bir malignite olarak sınıflamaktadır (75). KML 1845’te “splenomegali ve lökositoz nedeniyle ölüme yol açan bir hastalık” olarak ilk defa John Hughes Bennet tarafından tariflenmiştir (76). Fakat 1891 yılında Paul Erlich tarafından Lösemilerin sınıflaması ile ayrıntılı tarif edilerek “splenomiyelojenik lösemi” adını almıştır (77). Nowel ve Hungerford 1960 yılında anormal bir kromozom tespit ederek, “Philadelphia kromozomu” olarak adlandırmışlardır (78). Janet Rowley 1973 yılında,

Ph kromozomun yapısındaki anormalliğin 9. Kromozom ve 22. kromozom arasındaki translokasyon olduğunu tanımlamıştır (79).

3.4.1.4.2. Epidemiyoloji

Erişkin dönemi Lösemilerin %15-20'sini oluşturur. Toplumda insidansı 2/100.000 olarak bildirilmiştir. Her yaşta görülmek ile birlikte 25-60 yaş arası sıktır. Erkek/kadın görülme oranı 3/2 olarak bildirilmektedir.

3.4.1.4.3. Sınıflandırma

KML, kronik miyeloproliferatif hastalıklardan (KMPH) bir tanesidir. Miyeloproliferatif hastalıkların hepsinde neoplastik kök hücrelerin proliferatif kapasitesi kontrolsüzdür ve aşırı hematopoez meydana gelir. Klasik tip Ph kromozomu olguların %85'inde bulunurken kompleks olarak adlandırılan tipi yani en az bir farklı kromozomun daha translokasyona dahil olduğu tipi olguların %15'inde görülür. Olguların %2-5'inde Ph kromozomu görülmez. Olguların %10-15'inde tipik görülen t(9;22)'ye ek +der (22), +8, i(17q), +19, +21, -Y, -7, -17, +17 gibi başka kromozomal anomaliler de görülür. Bu anomaliler hastalık sırasında gelişmesi durumunda kötü prognoza işaret eder.

3.4.1.4.4. Prognoz

KML hastalarında Sokal ve Hasford skorlama sistemleri kullanılarak yapılan sağ kalım analizlerinde, Sokal da kronik evrede olan hastaların yaklaşık yaşam süresi 4,5 yıl, hızlanmış akselere evrede 3,5 yıl ve blastik yüksek risk grubunda 2,5 yıldan az olarak bildirilmiştir (80). Hasford'da ise kronik grupta sağ kalım yaklaşık 96 ay iken, akselere grupta sağ kalım yaklaşık 42 ay tespit edilmiştir (81).

3.4.1.4.5. Etiyoloji

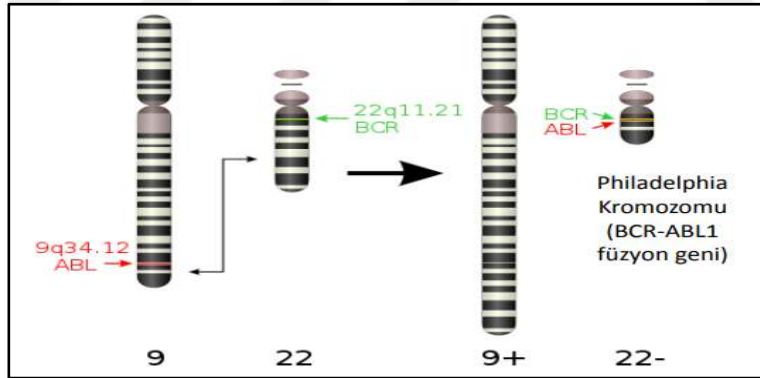
Tam netlik kazanmamakla beraber genetik ve çevresel faktörler etkilidir. Özellikle radyasyon maruziyetinde görülme olasılığı artmaktadır.

3.4.1.4.6. Klinik

Hastaların %30-40'ı asemptomatik seyreder, en sık şikayetler halsizlik, kilo kaybı ve splenomegaliye bağlı yan ağrısıdır. Eski zamanlarda KML tanılı hastalarda splenomegali sıklığı %90'larda iken günümüzde erken tarama testleri ile bu sıklık %50'lere gerilemiştir. KML'de kronik, hızlanmış ve blastik olmak üzere üç klinik evre gözlemlenmektedir. Kronik evrede %85 oranında tanı almış hasta bulunur. Hızlanmış evre %10 hasta içerirken blastik evrede %5 civarında hasta saptanır. Kronik evrede tedavi başlanmaz ise hızlanmış evre ve blastik evreye geçiş yaparak 3-5 yıllık survey belirtilmektedir (82).

3.4.1.4.7. KML'de gözlenen sitogenetik değişiklikler

Ph "Philadelphia kromozomu"nun resiprokal translokasyon sonucu ortaya çıkan anormal 22. kromozom olduğu bilinmektedir (83). 9.kromozomda bulunan "Abelson (ABL)" protoonkogeni ile 22. kromozomda bulunan "Breakpoint Cluster Region (BCR)" geninin 22. kromozom üzerinde yapışması sonucunda meydana geldiği gösterilmiştir (Şekil 17).



Şekil 17. Philadelphia kromozomunun şematik yapısı

FISH sinyallerinin değerlendirilmesi, floresan mikroskop yardımı ile yapılmaktadır. Kaynaşmış ışınları translokasyon ışınası olarak değerlendirilmekte, normalde 2n DNA miktarında beklenen BCR ve ABL1 bölgelerine ait sinyal paternleri ikişer tane görülmesi gerekirken translokasyon sebebiyle birer tane görülecektir. Hassasiyet açısından FISH yönteminin, konvansiyonel sitogenetik analizlere göre daha hassas olduğu bilinmektedir. KML hastalarının takibinde

kullanılan yöntem RT-PCR yöntemidir. Bu yöntemin çalışma prensibi, BCR/ABL1 füzyon genine ait transkriptlerin, ABL1 genine ait transkriptlere oranlanması esasına dayanır (83).

3.4.2. Lenfoma

3.4.2.1. Tanım ve tarihçe

Lenfositlerden kaynaklanan ve lenfoid dokuların neoplazisi ile karakterize bir hastalıktır. Lenfoid hücreler kemik iliği dışında lenfoid dokularda gelişmeye devam eder. Kemik iliğindeki gelişmemiş lenfoid hücrelerde veya ekstramedüller lenfoid dokudaki daha olgun lenfoid hücrelerde oluşan bazı genetik değişikliklere bağlı olarak gelişir. Ekstramedüller lenfoid dokudan gelişen lenfoid kanserler lenfoma olarak adlandırılır (84). Lenfomanın ilk tanımı 1832 yılında Thomas Hodgkin tarafından yapılarak ismi ile anılmaya başlanmıştır. 1982 yılından sonra ise yeterli olmadığı düşünülerek Hodgkin ve Non-Hodgkin lenfoma olarak iki büyük gruba ayrıldı.

3.4.2.2. Epidemiyoloji

Lenfomalar çocukluk çağı kanserleri arasında gelişmiş ülkelerde 3. sırada iken, gelişmekte olan ülkelerde 2. sırada yer almaktadır. Afrika ülkelerinde ise en sık kanserler olarak gözlenmektedir (85).

3.4.2.3. Sınıflandırma

Lenfomaların sınıflamasında 3 tür sistem kullanılmaktadır. Working formülü, REAL sınıflaması ve WHO sınıflamasıdır ki en son güncel kabul edilen WHO sınıflamasıdır (86).

- **Hodgkin lenfoma (HL):** Lenfoid kökenlidir ve patolojik numunelerde “Reed-Sternberg hücresi” görülmesi ile saptanır. WHO sınıflamasına göre üç gruba ayrılır:

1. Nodüler Lenfosit Predominant HL
2. Klasik HL
 - a. Nodüler sklerozan
 - b. Mikst selüler

- c. Lenfositten zengin
- d. Lenfositten yoksun

3- Sınıflandırılmayan HL

- **Non-Hodgkin lenfoma (NHL):** Histolojik ve immünolojik olarak üç alt gruba ayrılır:
 - 1- B-hücre kökenli (küçük ve farklılaşmamış) (Burkitt ve Burkitt olmayan)
 - 2- T-hücre kökenli (yaygın T hücre işaretleri verdiği için prolenfositik lösemi tanısı konmuştur, nadir görülür)
 - 3- Büyük hücreli lenfomalar (T ve B hücre kökenlidir ve hızlı gelişir)

3.4.2.4. Prognoz

Hastaların prognoz takibinde lenfomanın tipi, alt grupları, evresi etkilidir. Tedaviye ulaşım süresi de survey üzerine etkili olabilmektedir. Lenfoma kombine kemoterapi ile tam remisyon sağlanabilen bir hastalıktır. Lenfomada gözlenen I. ve II. klinik evreler lokalize hastalık gösterirken, III ve IV. evreler yaygın, ilerlemiş hastalık göstergesidir (87).

3.4.2.5. Etiyoloji

Tam olarak aydınlatılabilmiş değildir. EBV virüsünün etkili olduğunu söyleyen yayınlar mevcuttur. Ayrıca aile bireylerinde olması durumunda kişide olma olasılığının yüksek olması genetik geçişi desteklemektedir (88).

3.4.2.6. Klinik

Hastalar genellikle boyun ve koltuk altında şişlikler ile başvurur, organ basısı olursa nefes darlığı, ağrı ile de kendini belli edebilir. Ateş, kilo kaybı ve gece terlemesi de semptomlar arasındadır (89).

3.4.2.7. Lenfoma'da gözlenen sitogenetik değişiklikler

- **MYC/IG [t(8;14), t(2;8) ve t(8;22)]:** t(8;14)(q24;q32) translokasyonu ve varyantları olan t(2;8)(p11;q24) ve t(8;22)(q24;q11) Burkitt lenfoma (BL) ile ilişkilidir. Olguların %85'inde t(8;14) bulunurken diğer iki translokasyon %15 olguda görülür. Her üç translokasyonda da C-MYC onkogeni IG ağır ve

hafif zincirlerinin lokuslarıyla yapmış olduğu resiprokal translokasyonlar sonucunda artmış MYC transkripsiyonuna yol açarlar. WHO 2008 hematopoetik neoplazmlar sınıflandırmasında, MYC translokasyonlarının BL için özgül olmadığı belirtilmiştir (90). Endemik BL’de gözlemlenen MYC/IG kırılma noktaları anormal somatik hipermutasyondan kaynaklanmaktadır. C-MYC anormallikleri ise BL gelişiminde önemli bir basamaktır. Hücre döngüsü kontrolü, hücre bölünmesi, anjiyogenez ve apoptoz gibi çok sayıda kritik biyolojik süreci düzenler. Bu etkiler C-MYC’nin insan tümör oluşumundaki patogenetik önemini ortaya koyan verilerdir. Birçok sitogenetik çalışma, Non-Hodgkin lenfomalarda, lenfoid tümörün klinik fenotipine sitogenetik anormalliklerin etki ettiğini ortaya koymaktadır. İkincil kromozom değişikliklerinin çoğunluğu, DNA kayıp veya kazancına neden olan, dengesiz yeniden düzenlemelerdir. Ek olarak tekrarlayan kromozomal anormallikler genellikle kromozom 1, 6, 7, 12, 13, 17 ve 22’yi ilgilendirmektedir. Uzun kol kromozom kazançları 1 (+1q), 7 (+7q) ve 12 (+12q), yanısıra 17p13 delesyonları ve 13q34 bantını ilgilendiren değişimler yetişkin BL’ında sık görülür. Sekonder anormalliklerden bazıları, 1q, + 7q ve del(13q) gibi değişimler, kötü prognozla ilişkilidir (91).

3.4.3. Multiple myeloma (MM)

3.4.3.1. Tanım ve tarihçe

Kemik iliği içerisinde bulunan plazma hücrelerinin kontrolsüz çoğalması sonrası oluşan bir kanserdir. Plazma hücreleri B-lenfositlerin olgun hali olup farklılaşması sonucunda meydana gelir En tipik özelliği idrarda ya da serumda monoklonal immüoglobülinlerin saptanmasıdır. İlk Myeloma tanımı Solley tarafından 1844 yılında “Sarah Newbury” olarak bildirilmiştir. Prof. Henry Bence Jones adını verdiği idrarda saptanan anormal bir protein “Bence-Jones Proteinürisi”ni 1945’te tanımlamıştır. Rustizky ise 1873 yılında “Multiple Myeloma” terimini çoklu kemik tümörüne sahip bir hasta için tanımlamıştır (92).

3.4.3.2. Epidemiyoloji

MM hematolojik kanserlerin %10-15’inde, bütün kanserlerin ise %1’inde gözlenmektedir. Toplumda görülme sıklığı 2/100.000 olarak bildirilmiştir. Irklara

bakacak olursak Afrika kökenli Amerikalılar'da sık rastlanmakta iken Orta Doğu ve Asya ırkında daha az rastlanmıştır (93).

3.4.3.3. Prognoz

MM hücre fenotipleri ve klinik düzeyi prognozda etkilidir. Plazma hücreleri antijenlerinin kaybı (CD27), Kanser Testis Antijenleri (CTA) veya T hücresi antijeni CD28 ekspresyonu, CD221 / IGF1R'nin anormal ekspresyonu ve CD45 eksikliği, kötü prognoz ile ilişkilidir ve agresif MM klinik seyri izlenir. MM'nin zamanla AML'ye dönüşmesi kötü prognoz işaretidir (92).

3.4.3.4. Etiyoloji

Tam olarak açıklık getirilememek ile birlikte genetik ve çevresel faktörler (radyasyon, böcek ilaçları gibi kimyasallar, sigara kullanımı vb.) sorumlu tutulmaktadır (92).

3.4.3.5. Klinik

MM'de plazma hücrelerinin kemik iliği ve organlarda birikmesi ile klinik bulgular ortaya çıkmaya başlar. Normalde kemik iliğinde plazma hücreleri %5'in altında iken bu oranın artması ile kemik ağrıları, hematopoezi etkileyerek anemi ve enfeksiyonlara açık hale gelmeye neden olabilir. Malign plazma hücrelerinin salgıladığı sitokinler kemik erimesi ve patolojik kırıklara neden olabilir (94).

3.4.3.6. Multiple myeloma'da gözlenen sitogenetik değişiklikler

MM kemik iliği ve niş arasında etkileşimle (hücre-hücre, hücre matriks) büyüme faktörleri ve sitokinlere odaklanır. Kemik iliği stromal hücreleri ile myeloma hücreleri; ICAM-1, CD49d/VCAM-1, CD138 gibi çok sayıda adezyon molekülleri sayesinde sürekli etkileşim halindedir (94). -13, del13q MM'de %40-50 oranıyla en sık gözlenen anomalilerden biridir. Monozomi 13 yaklaşık %80-90 MM olgusunda gözlenirken, diğer bölgesel delesyonlar %10-20 şeklinde gözlenmektedir (95). MM'de tanımlanan diğer genetik değişiklikler ise 8q24(c-myc), 18q21(bcl-2), 1p11-13(N-ras), 12p11-12(K-ras), 17p13(p53), 13q14(Rb1) olarak bildirilmiştir (96).

3.4.4. Miyelodisplastik sendrom (MDS)

MDS pansitopeni, displazi ve inefektif eritropoez ile karakterize bir kök hücre hastalığıdır. Erişkinlerde çocukluk çağına göre daha sık gözlenir. Şikayetlerin çoğu pansitopeniye bağlıdır (halsizlik, solukluk, enfeksiyona açık olma, ateş) (97). Olguların yaklaşık 1/3 AML'ye dönüşmektedir. Sitoetik tanı önemlidir.

3.4.4.1.Miyelodisplastik sendrom'da gözlenen sitogenetik değişiklikler

MDS hastalarında en sık gözlenen anomaliler del5q, del8, del17q, monozomi 7, trizomi 8 ve -Y anomalileridir. Eğer AML hastalarında 5. ve 7. kromozoma ait anomaliler gözlenirse bu durum "MDS'den geçişli AML" şeklinde yorumlanır. MDS olgularının alt tiplerine özgü spesifik kromozom anomalisi ise bildirilmemiştir.

3.4.5. Kronik miyeloproliferatif hastalıklar (KMPH)

Myeloid kökenli hücrelerin aşırı proliferasyonu sonucu meydana gelen hastalık grubudur. En bilinen üyesi KML'dir. Onun dışında Polisitemia vera, İdiyopatik myelofibrozis, Esansiyel trombositemi bu grupta bulunan hastalıklardır. KMPH grubunda diğer hematolojik kanser çeşitlerine göre maligniteye geçiş daha az görülür. Klasik sitogenetik yöntemler, hastalığın prognozunu takip etmede önemli bir yere sahiptir. Gruba özgü spesifik kromozomal anomali saptamak güçtür. t(9,22), -5q, -7, +8; +9, i(17q), -20q sık görülürken inv(16), t(8,21) ve t(15,17) kromozom anormallikleri daha az görülür. Bu sitogenetik anomalilerin KMPH'de görülmesi kötü prognoza işaret etmektedir (98).

3.5. Hematolojik Kanserlerde Genetik Değişiklikler

3.5.1. Kromozom anomalileri

Kromozomlar çok uzun DNA sarmalı ve buna bağlı histon proteinlerinden meydana gelen, hücre bölünmesi sırasında kromatin ipliklerin kısalıp kalınlaşmasıyla oluşan, canlılarda genetik bilgiyi depolayan, genleri nesilden nesile taşıyarak kalıtımı sağlayan yapılardır. İnsan somatik hücrelerinde 22 çift otozomal kromozom, dışında iki X, erkekte ise bir X ve bir Y toplamda bir çift cinsiyet kromozomu olmak üzere 46 kromozom bulunur (99).

Kromozom anomalileri, kromozomlarda meydana gelen sayısal ve yapısal değişikliklerdir. Sitogenetik yöntemlerle metafaz kromozomlarını bulup mikroskopik olarak gözleyerek kromozom anomalilerini tespit etmek, kanser patogeneğinde önemli rol oynar. Kromozomlardaki sayısal veya yapısal bazı değişikliklerin, onkogenleri aktif edip tümör baskılayıcı genleri baskılamasına veya füzyon proteinlerin oluşumuna yol açtığı bilinmektedir (100).

3.5.1.1. Sayısal kromozom anomalileri

İnsanda kromozom sayısı haploid setin (n) tam katları şeklinde değişiyorsa (n , $3n$, $4n$...) öploid, bir ya da iki kromozomun artması veya eksilmesi olarak değişiyorsa ($2n+1$, $2n-1$...) buna da anöploid denir (101).

I. Öploid: Hücrelerdeki kromozom sayısının, insan için normal diploid ($2n=46$) sayısının dışında, haploid ($n=23$) kromozom takımının tam katları olarak değişimine (n , $3n$, $4n$...) öploid denir.

a) Triploid: Hücredeki temel kromozom sayısının üç kat oranında artması ($3n=69$) durumudur.

b) Tetraploid: Temel kromozom sayısının dört kat oranında artması ($4n=92$) durumudur, nadir görülür (102).

c) Endoredüplikasyon: Mitozda, sitoplazma bölünmesinin gerçekleşmemesi nedeniyle duplike olmuş kromozomların ikişer kromatidli kromozom çiftleri halinde olmasıdır. Tümör dokularında bu hatalara rastlanır (103).

d) Yüksek poliploidiler: $4n$ 'den fazla kromozomun karyotipte görülmesi durumudur.

II. Anöploid: Bir veya iki kromozom artma ya da eksilmesiyle oluşan, poliploidiye göre daha sık gözlenen anöploid, en çok monozomi ve trizomi olarak karşımıza çıkar (104).

a) Hiperploid: $2n+1$ ve $2n+2$ şeklindeki kromozom sayısındaki artmalara hiperploid denir ve en iyi örnek trizomilerden Down Sendromu olarak bilinen trizomi 21'dir.

- b) **Hipoploidi:** $2n-1$ ve $2n-2$ gibi kromozom sayısındaki azalmalara hipodiploidi denir ve en iyi örnek monozomilerden Turner Sendromu olarak bilinir.

3.5.1.2. Yapısal kromozom anomalileri

Yapı anomalilerinin esas nedeni, hücre döngüsünün herhangi bir evresinde kromozomlarda meydana gelen kırılmalardır. İyonize radyasyon, bazı kimyasal ajanlar ve viral enfeksiyonlar kromozomlarda bu kırık ve yeniden düzenlemelere neden olur. Bunun sonucunda kromozom materyalinin normal miktarı korunuyorsa yapısal anomali dengeli olarak, kalıtsal materyal miktarında artma veya eksilme oluyorsa dengesiz olarak tanımlanır (105).

3.5.1.2.1. Dengeli yapısal kromozom anomalileri

1. **Ters dönme (inversiyon):** Bir kromozomda iki kırık oluşması sonucunda kopan segmentin 180° dönerek eski yerine ama ters şekilde yapışmasına denir. Ters dönen kromozom segmenti sentromer içeriyorsa perisentrik inversiyonlar, sentromer içermiyorsa parasentrik inversiyonlar diye iki şekli bulunur (106).
2. **Yer değiştirme (translokasyon):** Eş olmayan kromozomlar arasındaki kırılmalar sonucu bir kromozomdan kopan parçanın başka bir kromozoma yapışması ile oluşan parça değişimleridir. Resiprokal (karşılıklı), robertson (sentrik füzyon) ve insersiyon olmak üzere üç ayrı gruba ayrılır (105).

3.5.1.2.2. Dengesiz yapısal kromozom anomalileri

1. **Eksilme (delesyon):** Kromozomun küçük bir parçasının kırılma veya kopma sonucu kaybolması durumudur.
2. **Artma (duplikasyon):** Homolog kromozomlardan birinden kopan parçanın diğer kromozoma eklenmesiyle meydana gelen artma durumudur. Duplikasyon sonucunda kromozomun bir segmenti iki kopya olarak bulunur.
3. **Halka kromozom (ring):** Bir kromozomun her iki ucunun kırılması ile oluşan kırık uçların birleşerek halka veya yüzük görünümünü aldığı nadir gözlenen kromozom anomalisidir (107).

4. **İzokromozom:** Hücre bölünmesinin anafaz evresinde kromozomların sentromerinden enine yanlış bölünmesi sonucu oluşan kusurlu kromozomlardır.
5. **Marker kromozom:** Normal kromozom setine ek olarak bulunan, sitogenetik G-bantlama yöntemi ile tespit edilemeyen çok küçük kromozom parçalarıdır.
6. **Disentrik kromozom:** Normal kromozom bir sentromer içerirken disentrik kromozomların iki sentromer taşıdığı nadir görülen kromozomlardır.

3.6. Hematolojik Kanserlerde Kullanılan Tanı Yöntemleri

Hematolojik kanserlerde görülen kromozom anomalilerini tespit etmek için konvansiyonel sitogenetik analiz, moleküler sitogenetik yöntemlerden FISH (Floresan In Situ Hibridizasyon) ve PCR kullanılmaktadır (108).

3.6.1. Konvansiyonel sitogenetik analiz

Sitogenetik, sitoloji (hücre bilimi) ve genetik bilimlerinin birleşmesiyle ortaya çıkan, kromozomların yapı ve fonksiyonlarını hücre bölünmesinin metafaz safhasında inceleyen bilim dalıdır. Sitogenetik içinde karyotipleme ve FISH yöntemleri çok önemli bir yere sahiptir. Karyotipleme, herhangi bir genetik hastalığın kromozom anomalisini tespit etmek için yapılan kromozom analizi yöntemidir (109).

Hematolojik hastalıklarda kromozom analizleri için materyal olarak genellikle hastadan aspire edilen kemik iliği, en geleneksel ve kolay çalışılabilen doku olduğu için periferik kan kullanılmaktadır (109). Kemik iliği gibi kendiliğinden bölünme hızı yüksek hücrelerde direkt, periferik kan lenfositleri gibi bölünme hızı düşük hücreler ise önce kültüre edilerek uyarıcılarla bölünmeye zorlanır, çoğaltılır ve sitogenetik çalışma için kullanılır.

Kromozom analizleri için ideal kültür süresi kemik iliği lenfositleri için 24-48 saat, periferik kan için 72 saat'tir. Kemik iliği lenfositlerine 24 saatlik kültür için mitojen kullanılmazken, T lenfositleri mitozu sokmak için kültür ortamına Fitohemaglutinine (PHA) eklenir. Mitozu metafaz safhasında durdurmak için ortama iğ ipliklerinin oluşumunu engelleyen Kolşisin (Colcemid) eklenir. Uygun bir metafaz

yaymasına ulaşmak ve kromozomları birbirinden ayırmak için önemli bir aşama olan hipotonik uygulamasında, hücrelere 20-25 dakika hipotonik solüsyonla muamele edilir. Daha sonra hücre fazının üç kez fiksatif ile yıkanmasıyla hücrelerin fiksasyonu yapılır. Bu işlemle boya alma yetenekleri artan ve dehidre olan hücreler lamlara yayılarak boyanır. Son olarak boyama ve bantlama işlemleri yapılarak elde edilen kromozomların ışık mikroskopunda karyotip analizleri yapılır. Modern sitogenetik analizlerde sıklıkla kullanılan boyama yöntemleri GTG (Giemsa-Tripsin-Giemsa), HRB, NOR, R, Q ve C bantlama yöntemleridir (110).

3.6.1.1. GTG bantlama tekniği

Günümüz sitogenetik laboratuvarlarında en yaygın kullanılan bantlama tekniği Giemsa bantlama (G-bantlama)'dır. Bu yöntemde, histonlar tripsinle denatüre edilerek DNA açıkta bırakılır, Giemsa ile boyanır ve enine açık ve koyu bantlar elde edilir. Adenin ve Timin'den zengin gen bölgeleri koyu bant, Guanin ve Sitozin'den zengin genler açık renk bant olarak gözlenir. GTG bantlama ile 400-700 arasında bantın değerlendirilebilmesi, bu tekniğin hematolojik hastalıklarda periferik kan ve kemik iliğinde sitogenetik inceleme için yaygın olarak kullanılmasını sağlamıştır. Çünkü karyotip analizi için kanda ideal bant aralığı 500-550, kemik iliğinde ise 400 bant düzeyinin üstündedir (111). 1971 yılında Paris konferansında ilk kez kromozomların sitogenetik isimlendirilmesi belirlenmiş ve zamanla güncellenmiştir. Günümüzde de halen kromozomların değerlendirilmesi "International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 2005)"e göre yapılmaktadır (112).

3.6.2. Moleküler sitogenetik yöntemler: FISH (Fluoresan In Situ Hibridizasyon)

Günümüz kanser genetiğinde kromozomal yeniden düzenlemelerin gösterilmesi için en sık kullanılan moleküler sitogenetik yöntemdir. Klasik sitogenetik yöntemlerle saptanamayan küçük ve tespiti zor delesyonların, kriptik translokasyonların, duplikasyonların, marker kromozomların ve tümör gelişimine neden olan anomalilerin araştırılmasında kullanılan etkili ve hızlı bir tekniktir. Klasik sitogenetik çalışmalarda metafaz kromozomları gerekirken, FISH hem metafaz kromozomlarını hem de interfaz hücre çekirdeğini değerlendirir (113). FISH tekniği, hedef DNA/RNA bölgesinin floresan veya radyoaktif işaretli DNA veya RNA

dizileri ile hibridizasyonu sonrası “in situ” olarak floresan mikroskopta görüntülenmesinde kullanılır. Araştırılan kromozomal bölgenin veya hedef DNA/RNA dizisinin FISH tekniği ile görüntülenebilmesi için o bölgeye özgü, komplementer ve florokromlarla işaretlenmiş tek zincirli DNA veya RNA dizilerine “prob” denir.

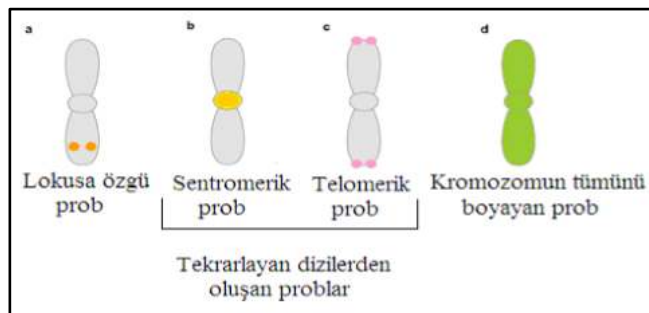
3.6.2.1. FISH tekniğinde kullanılan problemler

FISH yönteminde 3 tip prob kullanılır (Şekil 18). Bunlar (114);

a. Tüm kromozom boyama (painting) problemleri: Kromozomun tamamını ya da kromozomun p ve q kollarını ayrı renklerde boyayarak tanımlanmasını sağlayan, yapısal anomalilerin, marker ve ring kromozomların tespitinde kullanılan kromozomun tümüne veya bir parçasına özgü problemlerdir.

b. Lokus spesifik problemler (tek gen problemleri): İncelenen genin yerini belirlemek, gen amplifikasyonlarını ve delesyonlarını saptamak için kanser genetiğinde sıklıkla kullanılan gen spesifik veya lokusa spesifik problemlerdir.

c. Tekrarlayan dizi (alfa satelit) problemleri: Kromozomun sentromeri yakınındaki alfa satelit bölgesine spesifik, sayısal anomalilerin belirlenmesinde kullanılan tekrarlayan dizilere sahip problemlerdir. Kromozomların telomer bölgelerindeki delesyonları ve yeniden düzenlemeleri araştıran kromozoma özgü telomerik problemler de bu grup içerisinde yer alır.



Şekil 18. FISH tekniğinde kullanılan prob çeşitleri (114).

3.6.2.2. Hematolojik kanserlerde moleküler sitogenetik yöntem (FISH) ile tespit edilen genetik değişiklikler

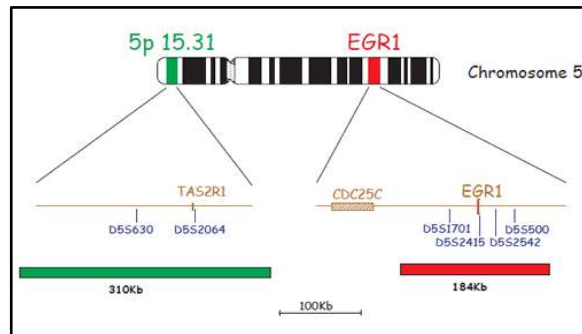
Son yapılan araştırmalar, hematolojik malignite çeşitlerinin çoğunda görülen farklı kromozomlardaki translokasyon, inversiyon, delesyon gibi anomalilerin hastalıkların tanı ve prognozu ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Tablo 2) (83).

Tablo 2: Hematolojik kanserlerde sık görülen yapısal ve/veya sayısal kromozom anomalileri.

Hematolojik kanser adı	Sık gözlenen kromozom anomalileri
Akut lenfoblastik lösemi	TEL/AML1t(12.21), trizomi/monozomi7, Trizomi/monozomi8 MLL/AF4-t(4,11)(q21,q23), t(8;14)(q14;q32)(Burkitt tipi ALL) t(9;22), t(1.19), del 13q14.3,
Akut miyeloid lösemi	AML1/ETO-t(8.21)(q22;q22), PML/RARA-t(15.17)(q22;q12), CBFB-t(16;16) inv(16q22), del11q23, del 5q, del 7q, +8
Kronik miyeloid lösemi	BCR/ABL-t(9,22)(q34,q11)
Kronik lenfositik lösemi	t(11,14)(q13;q32), t(14;18)(q32;q21) (BCL-1,BCL-2) del-ATM(11q22.3), del-P53(17p13.1), del 13q14, +12
Miyelodisplastik sendrom	trizomi/monozomi7, del 5q/5q31(EGR1), del 7q
Multiple Miyeloma	Trizomi 7, IGH/FGFR3-t(4.14), t(11.14), t(6.14), t(14.16) ,del13q, del-P53(17p13.1),
Burkit Lenfoma	IGH/MYC-t(8,14)(q24.1;q32), t(11.14), del-P53(17p13.1),
Kronik miyeloproliferatif hastalıklar (KronikMPH)	JAK2 V617F mutasyonu, BCR/ABL-t(9,22) (q34,q11)

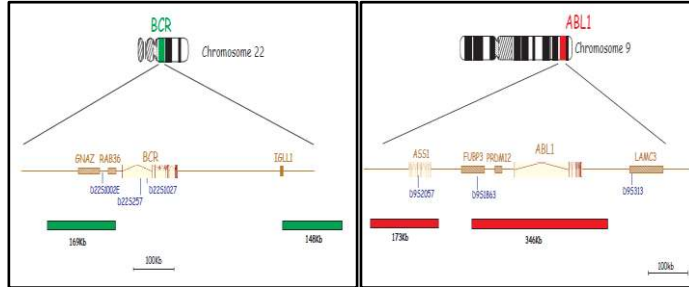
3.6.2.3. Hematolojik kanser hastalarında gözlemlenen kromozom anomalileri için kullanılan spesifik prob çeşitleri

- **5/5q31 (EGR1) FISH analizi:** Miyeloid kökenli kanserlerden Akut miyeloid lösemi (AML) ve Miyelodisplastik sendrom (MDS)'larda 5q delesyonunu saptamak için kullanılan probdur (Şekil 19). Bu hastalıklarda 5. kromozomun kısa kolunda delesyon görülmesinin, hastalığın tanı, prognoz ve tedavisinde etkili olduğu bildirilmiştir (115).



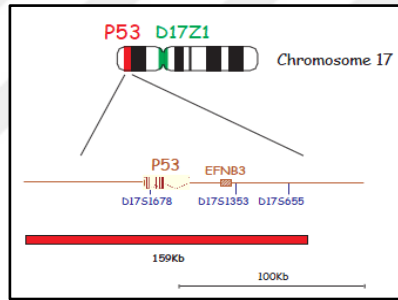
Şekil 19. 5/5q31 (EGR1) FISH probu (116).

- **t(9;22)-BCR/ABL FISH analizi:** BCR/ABL gen bölgelerinin translokasyonu sonucu oluşan füzyon geni, KML olgularının hemen hepsinde ve ALL olgularında da gözlenmekte olup kötü prognoz gösterir (Şekil 20).



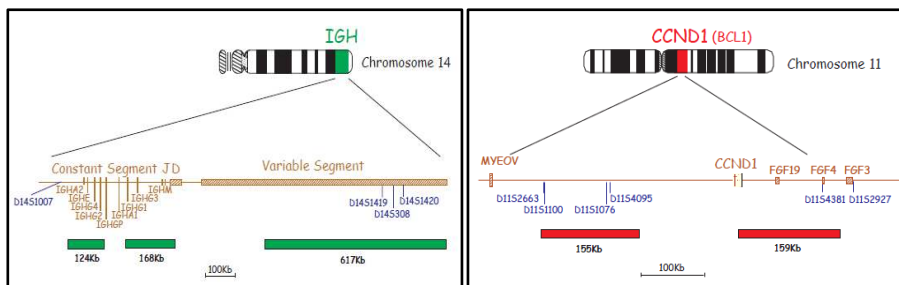
Şekil 20. BCR/ABL-t(9;22) FISH probu (117).

- **TP53 (17p13.1) FISH analizi:** KLL ve Multiple myeloma gibi lösemilerin çoğunda gözlenen kötü prognozla ilişkili p53 bölgesinin delesyonunu saptamak için kullanılan probdur (Şekil 21)(118).



Şekil 21. P53 (17p13.1) FISH probu (119).

- **IGH/CCND1-t(11;14) FISH analizi:** 11. ve 14. kromozomların translokasyonu ile oluşan IGH/CCND1 gen bölgeleri füzyonu Multiple myeloma ve lenfoma çeşitlerinin çoğunda gözlenir ve kötü prognozludur (Şekil 22).



Şekil 22. t(11;14) FISH probu (120).

4. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda, 2007-2020 yılları arasında Dicle Üniversitesi (DÜ) Tıp Fakültesi Hematoloji ile Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalları'nda hematolojik kanser ön tanısı almış, DÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Genetik Tanı laboratuvarında konvensiyonel sitogenetik analiz ve FISH yöntemi çalışılmış 310 hastanın, sitogenetik analiz ve FISH yöntemi sonuçları retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Hastaların yaş, cinsiyet, ön tanı ve demografik özellikleri, olguların var olan dosyalarından elde edilmiştir.

KML grubunda 92, AML grubunda 40, KLL grubunda 8, MDS grubunda 49, ALL grubunda 30, MM grubunda 41, KMPH grubunda 13, Lenfoma grubunda 12, diğer kan hastalıkları grubunda 25 olmak üzere toplam 310 hastadan kemik iliği örnekleri alınmıştır.

Çalışmada kemik iliği aspirasyon materyaline 24 ve 48 saatlik kemik iliği kültür yöntemi uygulandıktan sonra hastaların kromozom analizi için GTG-Bantlama yöntemi uygulanmıştır. Ayrıca kromozom trizomisini, monozomisini, delesyonlarını ve translokasyonlarını gözlemlemek amacıyla farklı problemler ile Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) yöntemi uygulanmıştır.

Tez çalışmamız, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu'nun 25.03.2021 tarih ve 379 karar numarası ile onaylanarak kabul edilmiştir.

4.1. Gereç ve Cihazlar

4.1.1. Kullanılan cihazlar

37 °C Etüv	Distile su cihazı
Laminal air flow kabini	Mikrofotografi aygıtı
Zaman ayarlı santrifüj	+4/-20°C Buzdolabı
Işık mikroskobu (Olympus Cx31)	Hot plate
Floresan mikroskobu (Olympus Bx51)	Su banyosu
Floresan mikroskobu filtreleri	Manyetik karıştırıcı
Hassas terazi	Ph stick (Isolab)
Vorteks mikser	Laboratuvar saati
Hibridizasyon cihazı	

4.1.2. Kullanılan malzemeler

15 mL steril kültür tüpü	Beher
6 mL Heparinli tüp	Plastik eldiven
Tek kullanımlık Steril Pasteur Pipetleri	Değişik çapta enjektörler
Lam ve Lameller	Kronometre
Dikey şaleler	Termometre
Mezür (100 mL)	Erlenmayer
Filtrelı pipet uçları	Elmas uçlu kalem
Mikropipet	Yapıştırıcı

4.1.2.1. Kullanılan kimyasal maddeler

RPMI 1640 Medium (Biological Industries, 944113)	İzotonik (Eczacıbaşı)
PHA-M Pytohemagglutinin M	Penicillin / Streptomycine Solution (Biological Industries 722867)
Fetal Calf Serum (Biological Industries)	Trypsin-EDTA Solution C (Biological Industries 814619)
Acetic Acid (Glacial) (Riedel-de Haen)	Sodium phosphate diabolic anhydrous (Na ₂ HPO ₄ ,H ₂ O)
Colcemide Solution (Biological Industries 816646)	Potassium Phosphate monobasic(KH ₂ PO ₄)
Xylol (Merck)	20XSSC (Serve)
Methanol(Riedel-de Haen)	0.075 M KCl (Sigma)
Etil Alkol (Sigma)	Tween-20 (Merck)
Giemsa Stain (Sigma)	Ethanol %100 (Sigma)
Heparin (Mustafa Nevzat)	L- Glutamin Solution(Biological Industries 746245)
Ethanol Absolut(Riedel-de Haen)	Distile Su

4.1.2.2. FISH probları

FISH Probu t(9;22)(q34;q11)(Cytocell, UK)	FISH Probu t(2;8)(q24;q11)(Cytocell, UK)
FISH Probu t(4;11)(q21,q23)(Cytocell, UK)	FISH Probu t(15;17)(q22;q2)(Cytocell, UK)
FISH Probu t(9;11)(p22,q23) (Cytocell, UK)	FISH Probu t(12;21)(p13;q22) (Cytocell, UK)
FISH Probu t(11;19)(q23;p13) (Cytocell, UK)	FISH Probu t(4.14)(Cytocell, UK)
FISH Probu t(11;14)(Cytocell, UK)	FISH Probu t(8.14) (Cytocell, UK)
FISH Probu t(14;16)(Cytocell, UK)	FISH Probu del 13q14(Cytocell, UK)
FISH Probu t(8;21)(q22;q22)(Cytocell, UK)	FISH Probu del 17p13(Cytocell, UK)
FISH probu del 20q (Cytocell UK)	FISH Probu del 7q(Cytocell, UK)
FISH Probu del 5q(Cytocell, UK)	FISH Probu inv(16) (Cytocell, UK)

4.2. Konvansiyonel sitogenetik analiz

4.2.1. Çözeltiler ve tamponlar

A. Besiyeri hazırlanması

RPMI 1640 Kemik iliği besiyeri medium (Biological Industries, 944113) 100 mL

Fetal calf serum (Biological Industries) 10 mL

Penicillin / Streptomycine (Biological Industries 722867) 1 mL

L-Glutamin (Biological Industries) 2 mL

Hazırlanan besiyeri ağzı kapaklı steril santrifüj tüplerine 5'er mL koyularak -20°C'de saklandı.

B. Kolşisin (Colchicine) solüsyonu: 40 mg Colchicine + 100 mL distile su

C. Tespit solüsyonu (Carnoy fiksatif): 3 kısım metanol + 1 kısım acetic acit glacial

Karışım -20°C'de saklandı. İçindeki alkolün uçuculuğundan dolayı her deney aşamasında taze olarak hazırlandı.

Ç. Hipotonik solüsyonu (0;075 M KCl): 1000 mL distile su + 5,6 gr KCl

Deneye başlamadan 1-2 saat önce hazırlanarak 37°C'lik etüve konulur.

D. Streptomycine solüsyonu: 1 gr Streptomycine sulfate +10 mL steril distile su

E. Penicilline solüsyonu: 1.000.000 U Penicilline-G potassium + 10 mL distile su

F. Serum solüsyonu: Fetal Calf Serum dessicated + 30 mL distile su

G. PBS (Phosphate buffer saline) çözeltisi: 1 PBS tableti (Amresco, AIE404-100) + 100 mL distile su

H. Trypsin çözeltisi: PBS tampon solüsyonu + 0,05 gr Tripsin

I. Söransan tamponu:

a. 11,88 g Na₂HPO₄ + 1000 mL distile su

b. 9,08 g KH₂PO₄ + 1000 mL distile su

(a ve b solüsyonları karıştırılıp pH=6,8'e ayarlanır.)

İ. Fitohemaglutinine solüsyonu: 5 mg Pytohemaglutinine (M. Bacto, Difco) + 5 mL distile su

J. Giemsa boya tamponu (Düz boyama için): 5 mL Giemsa stain stock solution + 95 mL steril distile su

4.3. Moleküler sitogenetik (FISH) yöntem

4.3.1. Çözeltiler ve tamponlar

a. Yıkama solüsyonları:

- 20X SSC stok solüsyonu: 87,66 gr NaCl + 44,12 gr Na sitrat +1000 mL distile su.

- 2X SSC tamponu: 10 mL 20X SSC + 90 mL distile su ile 100 mL'ye tamamlanır (20X SSC'nin 1/10 dilüsyonu oluşur).

- 0,4X SSC tamponu: 2 mL 20X SSC + 98 mL distile su ile 100 mL'ye tamamlanır (20X SSC'nin 1/50 dilüsyonu oluşur).

b. Etil alkol çözeltileri:

- %70'lik Etil alkol: 70 mL Etil alkol + 30 mL distile su

- %85'lik Etil alkol: 85 mL Etil alkol + 15 mL distile su 100 mL'ye tamamlanır.

- %100'lük Etil alkol: 100 mL Etil alkol ile hazırlanır.

c. NP40 ile hazırlanan solüsyonlar:

- 0,4X SSC tamponu + %0,3 NP40 solüsyonu: 2 mL 20XSSC + 98 mL distile su + 300 mL NP40

- 2X SSC tamponu + %0,1 NP40 solüsyonu: 10 mL 20X SSC + 90 mL distile su + 300 mL NP40

ç. Prob karışımı: 1 µL Prob + 7 µL Hibridizasyon tampon çözeltisi + 2 µL Distile su

4.4. Çalışma metodu

4.4.1. Kemik iliği kültüründen sitogenetik çalışma yöntemi (24 ve 48 saatlik kültür yöntemi)

- Çalışmamızda, kemik iliği materyallerine 24 ve 48 saatlik kültür metodu uygulanmıştır. Kültür sonrası preparatlar GTG-bantlama tekniğiyle boyanmış ve "International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 2005)"e göre yorumlanmıştır.

- Hastaların sternum veya iliak kemiklerinden steril bir şekilde aspire edilen yaklaşık 5 mL kemik iliği aspirasyon materyalleri heparinle yıkanmış enjektör kullanılarak alınır.

- Kùltür medyumunu olarak kemik iliği için RPMI 1640 kullanılır. Hazırlanmış medyumlar ortamda kapaklı tüplere 5'er mL olacak şekilde konur.
- 5 mL medyum içeren kùltür tüplerine, her hasta için 7-8 damla kemik iliği ekilir.
- 37°C'deki etüve konulan tüplerin hücre kùltürü başlatılır.
- Kemik iliği numunelerine 24 ve 48 saatlik kùltür yapılır. Kemik iliği ekiminden sonraki 22. ve 46. saatlerde hücreleri metafaz evresinde durdurabilmek için her bir tüpün içine ię ipliklerinin oluşumunu engelleyen Colsemid solüsyonu 0.1 mL olacak şekilde 2 damla eklenir ve hafifçe karıştırılır. Sonra 30 dakika tekrar 37°C'lik etüve konularak bekletilir.
- Bu süre sonunda kùltür sonlandırılır ve kromozom eldesi işlemlerine geçilir.

4.4.2. Kromozom eldesi

- Etüvden çıkarılan tüpler 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edilir.
- Bu sürenin sonunda süpernatant kısmı pastör pipeti ile atılarak vorteks yardımıyla her tüpe yavaşça 6 mL hipotonik (0,075 M KCl) solüsyon eklenir.
- Tüpler 25 dakika etüvde 37°C sıcaklıkta hipotonik şok için bekletilir.
- Hipotonik şok tamamlandıktan sonra 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edilir. Süpernatantlar atılıp pellet üzerine vorteks eşliğinde karıştırılma sırasında pipetle damla damla 10 mL Carnoy fiksatif ilave edilir.
- Fiksatif eklendikten sonra tüpler yıkama için tekrar 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edilir. Supernatant bölümü atılıp üzerine fiksatif eklenir.
- Üç kez tekrarlanan fiksatifle yıkama işleminden sonra preparatlar yayma işlemine hazırlanmış olur.
- Son santrifüjden sonra tüplerin dibinde kalan pellet üzerine 1 mL fiksatif eklenir ve pasteur pipeti ile yavaş yavaş pipetaj yapılır.
- Yayma sırasında 30 cm yüksekten 45 derecelik açı ile soğuk ıslak lam üzerine pastör pipeti ile 2-3 damla yayılır.
- Yayma işlemi yapılan lamlar havada kurutulduktan sonra laboratuvar ortamında oda sıcaklığında hot plate üzerinde 1 gün bekletilerek yaşlandırılır.
- Lamlar GTG (Giemsa ile boyanmış Tripsin uygulanmış G-bantlama) bantlama yöntemi ile boyanır.

4.4.3. Bantlama

- Kurutulan lamalar önce soğuk tripsinde 55 sn bekletilir, süre bitiminde soğuk salin ve buffer solüsyonlarından geçirilir.
- Lamlar %3'lük Giemsa boya çözeltisinde yaklaşık 3-5 dk bekletilip boyanır.
- Boyanan preperatlar suyla yıkandıktan sonra kurutma kağıdında kurutulup ışık mikroskobunda en az 20 metafaz değerlendirilir.

4.4.4. FISH yöntemi

- Kemik iliği kültür çalışmasından sonra hazırlanan tüplerdeki süpernatant atılıp pelletinden 10 µL slayta tam ortaya gelecek şekilde damlatılır. Damlatılan yer elmas uçlu kalem ile işaretlenir.
- Yayma işleminden sonra slayt 37°C'de kurumaya bırakılır.
- Slaytlar kuruduktan sonra önceden hazırlanmış çözeltilerde sırasıyla 2X SSC, %70'lik, %85'lik, %100'lük etil alkol serilerinde 2 dk bekletilir.
- Preperatlar seri çözeltiden sonra 37°C'lik etüvde 1 dk bekletilir.
- Karanlık bir odada çıkarılan preperatların üzerine 5 µL çalışılacak prob damlatılır ve üzeri lamel ile kapatılır.
- Lamelin hava almaması ve probun buharlaşmasını önlemek için lamelin etrafı yapıştırıcı ile yapıştırılır.

a) Denatürasyon

Hazırlanan slaytlar önceden 75°C'ye ayarlanmış hot plate üzerinde 10 dk bekletilir.

b) Hibridizasyon

Nemli ve karanlık bir kutuya yerleştirilen preperatlar 37°C'lik etüvde 1 gün bekletilir.

c) Hibridizasyon sonrası yıkama

1. Etüvden çıkarılan slaytların üzerindeki lamel dikkatlice kaldırılır.
2. Preperatlar önce benmari yardımıyla ısısı 71°C ve pH'sı 7-7,4 ayarlanan 20X SSC tamponunda 1 dk yıkanır.
3. Sonra 10 µL tween 20 içeren 2X SSC tamponunda 30 sn yıkanır.
4. Preperatlar dik olacak şekilde bir süre kurumaya bırakılır.

5. Kuruyan preperatlarda prob muamelesi yapılan bölgelere 10 µL DAPI Antifade damlatılır ve lamelle kapatılır.

6. Hazırlanan slaytlar ışık almayan bir kutuya yerleştirilip +4°C'lik buzdolabında saklanır.

7. Preperatlar karanlık ortamda ve floresan mikroskopunda 100X objektifle taranır.

8. Her bir hasta için sinyalleri güçlü ve net görülen 100-200 hücre incelenir. İncelemede, metafaz ve interfaz hücreleri sayılarak otomatik görüntüleme sisteminde fotoğraflanır.

4.5. İstatistiksel yöntemler

İstatistiksel incelemeler için IBM SPSS Statistics 23.0. programı kullanılmıştır. Hastalara ait veriler; sayı ve yüzde, standart sapma, ortalama şeklinde verilmiştir. Hastaların kemik iliğinde konvansiyonel sitogenetik analiz ve FISH yöntemi sonuçlarının literatürle uyumlu olup olmadığı karşılaştırılmıştır. Verilerin analizinde t-test ve ki-kare testi kullanılmıştır.

5. BULGULAR

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nın Genetik Tanı Laboratuvarında yürütülen çalışmamızda hematolojik kanser ön tanısı almış 310 hastadan alınan kemik iliği aspirasyon materyaline uygulanan kemik iliği kültürü, GTG-bantlama ve FISH tekniği ile elde edilen sonuçlar retrospektif olarak değerlendirilmiştir.

Çalışma grubumuzu oluşturan hastaların yaş ortalaması $53,57 \pm 21,99$ (2-91 yıl arası) ve kadın/erkek sayıları 149/161 olarak bulunmuştur. Hastalardan aspire edilen 310 kemik iliği örneğine uygulanan GTG-bantlama yöntemi sonucunda 28 örnekte istenen kalite ve sayıda metafaz bulunamazken 282 örnekte metafazlar incelenmiştir. Olgularımızın; yaş, cinsiyet, gönderildiği klinik, ön tanı, çalışılan materyal, kromozomal inceleme tekniği, kromozom analizinde görülen düzensizlikler ve karyotip görüntülerine ait veriler dosyalarından elde edilmiştir.

Çalışmamız; KML grubunda yaş ortalaması $59,34 \pm 17,6$ olan 46 (%50) kadın ve 46 (%50) erkek; KLL grubunda yaş ortalaması $55,29 \pm 8,2$ olan 3 (%37,5) kadın ve 5 (%62,5) erkek; AML grubunda yaş ortalaması $63,03 \pm 11,67$ olan 21 (%52,5) kadın ve 19 (%47,5) erkek; ALL grubunda yaş ortalaması $9,83 \pm 5,48$ olan 12 (%40) kadın ve 18 (%60) erkek; KMPH grubunda yaş ortalaması $48,54 \pm 16,65$ olan 8 (%61,5) erkek ve 5 (%38,5) kadın; Lenfoma grubunda yaş ortalaması $49,25 \pm 19,99$ olan 8 (%66,7) erkek ve 4 (%33,3) kadın; Multiple Myeloma grubunda yaş ortalaması $58,02 \pm 18,09$ olan 22 (%53,7) kadın ve 19 (%46,3) erkek; MDS grubunda yaş ortalaması $59,96 \pm 18,28$ olan 24 (%49) kadın ve 25 (%51) erkek; diğer kan hastalıkları grubunda yaş ortalaması $53,88 \pm 20,93$ olan 13 (%52) erkek ve 12 (%48) kadın olmak üzere toplam 310 hastada gerçekleştirilmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. Hastaların demografik özellikleri.

Tanı	n	%	Yaş (Ort.+SD)	Cinsiyet (E/K)
KML	92	%29,7	$59,34 \pm 17,6$	46/46
MDS	49	%15,8	$59,96 \pm 18,28$	25/24
MM	41	%13,2	$58,02 \pm 18,09$	19/22
AML	40	%12,9	$63,03 \pm 11,67$	19/21
ALL	30	%9,7	$9,83 \pm 5,48$	18/12
Diğer kan hastalıkları	25	%8,1	$53,88 \pm 20,93$	13/12
KMPH	13	%4,2	$48,54 \pm 16,65$	8/5
Lenfoma	12	%3,9	$49,25 \pm 19,99$	8/4
KLL	8	%2,6	$55,29 \pm 8,2$	5/3

Ort.: Ortalama, SD: Standart sapma

Çalışma grubumuza ait toplam 310 hastanın sitogenetik analizine ait tüm bilgiler, hastalarımızı gruplandırdığımız 9 grup altında Tablo 4-12’de verilmiştir.

Tablo 4. KML öntanı/tanısı taşıyan hastaların sitogenetik bulguları.

Sıra	Yaş	Cinsiyet	Tanı	Sitogenetik sonuç
1	68	K	KML	46,XX
2	71	E	KML	46,XY
3	63	E	KML	46,XY
4	27	E	KML	46,XY(1)/45,X0(4)
5	54	E	KML	46,XY, t(9;22)(q34,q11)Ph(+)
6	61	K	KML	46,XX
7	46	K	KML	46,XX, del (17p13)
8	72	K	KML	46,XX, t(9;22)Ph(+)(20)
9	57	K	KML	46,XX, Ph(-)
10	76	E	KML	46,XY, t(9;22)Ph(+)(20)
11	59	K	KML	46,XX, t(9;22)Ph(+)(20)
12	63	E	KML	46,XY, t(9;22)Ph(+)(20)
13	40	K	KML	46,XX, t(9;22)(q34,q11)Ph(+)
14	83	E	KML	Metafaz bulunamadı
15	17	E	KML	46,XY, t(9;22)(q34,q11)Ph(+)
16	67	K	KML	Metafaz bulunamadı
17	68	E	KML	46,XY, Ph(-)
18	80	E	KML	46,XY
19	67	K	KML	Metafaz bulunamadı
20	47	K	KML	46,XX
21	48	E	KML	46,XY
22	41	K	KML	46,XX, Ph(-)
23	53	K	KML	46,XX, Ph(-)
24	60	E	KML	46,XY
25	67	K	KML	46,XX, t(9;22)(q34,q11)Ph(+)
26	56	E	KML	46,XY, t(9;22)Ph(+)(23)
27	42	K	KML	46,XX, Ph(-)
28	50	E	KML	46,XY, t(9;22)Ph(+)(22)
29	91	E	KML	46,XY, t(9;22)(q34,q11)Ph(+)
30	70	E	KML	46,XY, t(9;22)Ph(+)(17)
31	18	K	KML	46,XX, t(9;22)(q34,q11)Ph(+)
32	38	E	KML	46,XY, t(9;22)(q34,q11)Ph(+)
33	35	K	KML	46,XX, t(9;22)(q34,q11)Ph(+)
34	77	E	KML	46,XY
35	84	K	KML	Metafaz bulunamadı
36	57	E	KML	46,XY
37	21	K	KML	46,XX, Ph(-)
38	84	K	KML	Metafaz bulunamadı
39	61	E	KML	46,XY (17)/45X0(3)/47 XY(1)
40	16	K	KML	Metafaz bulunamadı
41	58	K	KML	46,XX(6)/45,X0(5)
42	59	K	KML	46,XX, t(9;22)Ph(+)(20)
43	69	E	KML	46,XY, Ph(-)
44	49	K	KML	46,XX, t(9;22)(q34,q11)Ph(+)
45	48	E	KML	46,XY, t(9;22)Ph(+)(20)
46	55	K	KML	46,XX, t(9;22)Ph(+)(20)
47	35	K	KML	46,XX, t(9;22)Ph(+)(20)
48	19	E	KML	46,XY, Ph(-)
49	71	E	KML	46,XY,t(9;22)Ph(+)(20)
50	40	E	KML	46,XY, t(9;22)Ph(+)(20)
51	81	K	KML	46,XX, t(9;22)(q34,q11)Ph(+)
52	50	K	KML	46,XX(5)/45,X0(15)
53	85	K	KML	46,XX, t(9;22)Ph(+)(22)

54	44	K	KML	46,XX(6)/45,X0 (4)
55	73	E	KML	46,XY
56	81	E	KML	46,XY, Ph(-)
57	70	E	KML	46,XY, Ph(-)
58	64	K	KML	46,XX, Ph(-)
59	60	E	KML	46,XY, t(9;22)Ph(+)(20)
60	70	K	KML	46,XX, Ph(-)
61	76	K	KML	46,XX, Ph(-)
62	86	E	KML	46,XY, t(9;22)(q34,q11)Ph(+)
63	77	E	KML	46,XY, Ph(-)
64	68	K	KML	46,XX, t(9;22)Ph(+)(20)
65	72	E	KML	46,XY, t(9;22)(q34,q11)Ph(+)
66	61	E	KML	46,XY, Ph(-)
67	72	E	KML	46,XY, t(9;22)Ph(+)(20)
68	65	K	KML	46,XX, Ph(-)
69	67	E	KML	46,XY, Ph(-)
70	69	E	KML	46,XY, Ph(-)
71	62	E	KML	46,XY, Ph(-)
72	65	E	KML	46,XY, Ph(-)
73	61	K	KML	46,XX, Ph(-)
74	55	K	KML	46,XX, t(9;22)(q34,q11)Ph(+)
75	89	K	KML	Metafaz bulunamadı
76	77	E	KML	46,XY, t(9;22)(q34,q11)Ph(+)
77	79	E	KML	46,XY, t(9;22)(q34,q11)Ph(+)
78	69	E	KML	46,XY, t(9;22)(q34,q11)Ph(+)
79	48	K	KML	46,XX, t(9;22)(q34,q11)Ph(+)
80	66	E	KML	46,XY, Ph(+)
81	47	K	KML	46,XX, t(9;22)Ph(+)(20)
82	41	K	KML	46,XX, t(9;22)(q34,q11)Ph(+)
83	42	K	KML	46,XX, t(9;22)(q34,q11)Ph(+)
84	65	E	KML	46,XY, t(9;22)(q34,q11)Ph(+)
85	57	K	KML	46,XX, t(9;22)(q34,q11)Ph(+)
86	70	E	KML	46,XY
87	73	E	KML	46,XY
88	85	K	KML	46,XX, Ph(-)
89	46	K	KML	46,XX, t(9;22)(q34,q11)Ph(+)
90	54	K	KML	46,XX, del(22q11.23)(2),Ph(-)
91	25	E	KML	46,XY, t(9;22)(q34,q11)Ph(+)
92	34	K	KML	Metafaz bulunamadı

Tablo 5. KLL ön tanısına sahip hastaların sitogenetik bulguları

Sıra	Yaş	Cinsiyet	Tanı	Sitogenetik sonuç
1	47	E	KLL	46,XY(10)/47,XY,+12,(1)/45,X0(5)
2	49	E	KLL	46,XY,del(17p)
3	49	K	KLL	46,XX
4	68	E	KLL	46,XY
5	64	K	KLL	46,XX
6	58	E	KLL	46,XY
7	48	K	KLL	46,XX
8	52	E	KLL	46,XY

Tablo 6. AML ön tanı/tanlı olguların sitogenetik bulguları.

Sıra	Yaş	Cinsiyet	Tanı	Sitogenetik sonuç
1	69	K	AML	46,XX,45,XX (1)
2	72	E	AML	46,XY

3	64	K	AML	Metafaz bulunamadı
4	62	K	AML	Metafaz bulunamadı
5	76	E	AML	46,XY(18),45,XY(4)
6	77	K	AML	46,XX(4),45,XX(8)
7	80	E	AML	46,XY(3),45,XY(7)47,XY(2)
8	64	K	AML	Metafaz bulunamadı
9	67	K	AML	46,XX
10	53	K	AML	46,XX(8),45,XX(4) 47,XX(1)
11	64	K	AML	Metafaz bulunamadı
12	60	E	AML	45,XY,-11
13	66	K	AML	46,XX
14	42	K	AML	46,XX(9), 45,XX (5)
15	58	K	AML	46,XX (13),45,XX,44,XX
16	64	K	AML	46,XX,-del(5q31.2)
17	55	E	AML	46,XY,-del(5q31.2)
18	61	E	AML	46,XY
19	55	E	AML	46,XY
20	75	E	AML	46,XY
21	27	E	AML	46,XY
22	71	K	AML	46,XX
23	71	K	AML	46,XX
24	64	K	AML	46,XX
25	61	K	AML	46,XX
26	54	E	AML	46,XY (13),44,XY(3)
27	45	K	AML	46,XX (13),44,XX(5)
28	83	K	AML	46,XX,Ph(+),4,Ph(-)13
29	53	E	AML	46,XY,Ph(-)
30	59	E	AML	Metafaz bulunamadı
31	62	E	AML	46,XY,inv(9)(p13q21)
32	67	K	AML	46,XX
33	63	E	AML	Metafaz bulunamadı
34	57	K	AML	46,XX
35	84	E	AML	Metafaz bulunamadı
36	74	E	AML	Metafaz bulunamadı
37	70	K	AML	46,XX(13),44,XX(10)
38	45	E	AML	46,XY
39	77	K	AML	46,XX
40	70	E	AML	Metafaz bulunamadı

Tablo 7. ALL ön tanısı almış hastaların sitogenetik bulguları.

Sıra	Yaş	Cinsiyet	Tanı	Sitogenetik sonuç
1	8	K	ALL	46,XX, 45,XX (3), 47,XX (3)
2	6	E	ALL	46,XY, 45,XY (1), 47,XY (3)
3	4	E	ALL	46,XY, 45,XY (4)
4	3	E	ALL	46,XY (2) / 9qh+ / 45,XY (2)
5	18	E	ALL	46,XY (18), 45,XY (4)
6	13	E	ALL	46,XY
7	18	K	ALL	46,XX
8	7	E	ALL	46,XY
9	5	K	ALL	46,XX
10	6	E	ALL	46,XY, t(9;22)Ph(+)(60)
11	9	E	ALL	(%25) 46 XY, (%75) 45,XY, 44,XY
12	8	K	ALL	46,XX, Ph(+)
13	4	E	ALL	46,XY, Ph(-)
14	5	K	ALL	46,XX (8), 45,XX (3)
15	13	K	ALL	46,XX
16	4	E	ALL	46,XY
17	15	K	ALL	46,XX
18	8	E	ALL	46,XY

19	18	K	ALL	46,XX (10), 45,XX (8)
20	14	E	ALL	46,XY (14), 45,XY (4)
21	9	E	ALL	46,XY (11), 45,XY (3)
22	18	E	ALL	46,XY
23	14	K	ALL	46,XX (16), 45,XX (12), 47,XX (2)
24	18	K	ALL	46,XX
25	6	E	ALL	46,XY Ph(-) 17
26	2	E	ALL	Metafaz bulunamadı
27	7	E	ALL	46,XY, t(9;22)Ph(+)(80)
28	20	K	ALL	Metafaz bulunamadı
29	5	K	ALL	46,XX, Ph(+)(5)
30	10	E	ALL	46,XY

Tablo 8. Kronik Miyeloproliferatif Hastalık ön tanılı hastaların sitogenetik bulguları.

Sıra	Yaş	Cinsiyet	Tanı	Sitogenetik sonuç
1	52	E	Myelofibrozis	46,XY
2	64	E	Myelofibrozis	46,XY (15), 45,XY (2), 47,XY (1)
3	22	K	Esansiyel Trombositoz	46,XX (12), 45,XX (4)
4	39	E	Myelofibrozis	46,XY
5	52	E	Myelofibrozis	46,XY (5), 45,XY (13)
6	34	E	Polisitemi Vera	46,XY
7	65	E	Myelofibrozis	46,XY
8	62	K	Myelofibrozis	46,XX
9	32	K	Polisitemi Vera	46,XX
10	27	K	Myelofibrozis	46,XX (19), 45,XX (3)
11	76	E	Myelofibrozis	46,XY
12	47	E	Myelofibrozis	Metafaz bulunamadı
13	59	K	Myelofibrozis	46,XX

Tablo 9. Lenfoma ön tanılı/tanılı olguların sitogenetik bulguları.

Sıra	Yaş	Cinsiyet	Tanı	Sitogenetik sonuç
1	36	E	Non-Hodgkin Lenfoma	46,XY (10), 45,XY (5), 47,XY (1)
2	35	E	Hairy cell Lösemi/Lenfoma	46,XY (7), 45,XY(6), 9qh+
3	17	E	Burkitt Lenfoma	46,XY
4	26	K	Lenfoma	46,XX
5	68	E	Lenfoma	46,XY (4), 45,XY (4)
6	55	E	Lenfoma	46,XY
7	78	K	Lenfoma	46,XX
8	62	E	Non-Hodgkin Lenfoma	46,XY
9	56	K	Lenfoma	Metafaz bulunamadı
10	28	E	Lenfoma	46,XY
11	71	E	Burkitt Lenfoma	46,XY
12	59	K	Non-Hodgkin Lenfoma	46,XX

Tablo 10. M. Myeloma ön tanılı hastaların sitogenetik bulguları.

Sıra	Yaş	Cinsiyet	Tanı	Sitogenetik Sonuç
1	32	E	Multipl Myeloma	46,XY / 45,XY / -21
2	63	E	Multipl Myeloma	46,XY
3	56	K	Multipl Myeloma	46,XX (5) / 45,X0 (3) / 47,XX (2)
4	79	E	Multipl Myeloma	46,XY (5) / 45,X0 (13)
5	66	E	Multipl Myeloma	46,XY (3) / 45,X0 (9)
6	43	E	Multipl Myeloma	46,XY (10)
7	34	K	Multipl Myeloma	46,XX (16) / 45,X0 (7)
8	66	E	Multipl Myeloma	46,XY (5) / 45,X0 (2)
9	54	E	Multipl Myeloma	46,XY / 45,XY / -16

10	55	K	Multipl Myeloma	46,XX
11	39	E	Multipl Myeloma	46,XY
12	77	E	Multipl Myeloma	46,XY
13	35	K	Multipl Myeloma	46,XX (18) / 45,X0 (5) / t(11,14)
14	38	K	Multipl Myeloma	46,XX
15	74	E	Multipl Myeloma	46,XY(7) / 45,XY(3)
16	67	E	Multipl Myeloma	46,XY
17	43	E	Multipl Myeloma	46,XY
18	20	E	Multipl Myeloma	46,XY / 1qh+ / 9qh+
19	84	K	Multipl Myeloma	46,XX
20	48	K	Multipl Myeloma	46,XX (9) / 45,X0 (13)
21	40	K	Multipl Myeloma	46,XX
22	46	E	Multipl Myeloma	46,XY(5) / 45,X0 (3)
23	56	K	Multipl Myeloma	45,X0 (9)
24	87	K	Multipl Myeloma	46,XX
25	40	K	Multipl Myeloma	46,XX
26	80	E	Multipl Myeloma	Metafaz bulunamadı
27	61	K	Multipl Myeloma	46,XX
28	86	E	Multipl Myeloma	46,XY(10) / 45,X0 (11) / 47,XY (1) / del(4)(q31.1-qter)
29	62	K	Multipl Myeloma	46,XX
30	49	K	Multipl Myeloma	46,XX
31	82	K	Multipl Myeloma	46,XX (12) / 45,X0 (2)
32	44	K	Multipl Myeloma	46,XX (16) / 45,X0 (7)
33	49	K	Multipl Myeloma	46,XX
34	56	K	Multipl Myeloma	46,XX
35	72	K	Multipl Myeloma	46,XX
36	82	E	Multipl Myeloma	46,XY
37	71	K	Multipl Myeloma	46,XX
38	44	K	Multipl Myeloma	46,XX
39	34	E	Multipl Myeloma	46,XY
40	72	K	Multipl Myeloma	46,XX / inv(9)(p11q12) / 45,X0 (20)
41	83	E	Multipl Myeloma	46,XY

Tablo 11. Miyelodisplastik sendrom (MDS) tanılı/ön tanılı hastaların sitogenetik bulguları.

Sıra	Yaş	Cinsiyet	Tanı	Sitogenetik sonuç
1	66	E	MDS	46,XY
2	29	K	MDS	46,XX
3	72	E	MDS	46,XY (10), 45,XY (5)
4	66	E	MDS	46,XY (6), 45,XY (3)
5	59	K	MDS	46,XX (3), 45,XX (1)
6	77	E	MDS	46,XY (4), 45,XY (6)
7	45	E	MDS	46,XY (6), 45,XY (2)
8	28	K	MDS	46,XX (5), 45,XX (1)
9	76	E	MDS	46,XY, del 5q
10	56	K	MDS	46,XX (19), 44,XX (2)
11	33	K	MDS	46,XX (6), 44,XX (4), 47,XX (1)
12	85	E	MDS	46,XY (15), 45,XY (2)
13	84	K	MDS	46,XX
14	36	E	MDS	46,XY (16), 45,XY (1)
15	61	K	MDS	46,XX (15), 45,XX (2), 44,XX (3)
16	62	E	MDS	46,XY
17	60	K	MDS	46,XX
18	81	E	MDS	46,XY
19	79	K	MDS	46,XX, t (9;22)
20	51	E	MDS	46,XY
21	37	K	MDS	46,XX
22	73	K	MDS	46,XX
23	35	K	MDS	46,XX (9), 45,XX (3)
24	58	K	MDS	46,XX
25	70	E	MDS	46,XY (5), 45,XY (5)

26	78	E	MDS	46,XY
27	51	E	MDS	46,XY
28	24	E	MDS	46,XY
29	82	E	MDS	46,XY
30	33	K	MDS	46,XX
31	83	E	MDS	46,XY (9), 47,XY (3), 45,XY (2)
32	61	E	MDS	46,XY (9), 45,XY (8)
33	89	K	MDS	46,XX (8), 44,XX (4), 47,XX (1)
34	78	K	MDS	46,XX
35	72	K	MDS	46,XX
36	45	E	MDS	46,XY (3), 44,XY (7)
37	76	K	MDS	46,XX, 16qh+ (13), 45,XX (3)
38	60	E	MDS	46,XY (16), 45,XY (5)
39	45	K	MDS	46,XX (17), 45,XX (3), -del(5q31.2)
40	48	K	MDS	46,XX (13), 44,XX (2)
41	72	E	MDS	46,XY (12), 44,XX (3)
42	82	K	MDS	46,XX (15), 44,XX (4)
43	33	K	MDS	46,XX (13), 44,XX (10)
44	74	E	MDS	46,XY, 9qh+
45	68	K	MDS	Metafaz bulunamadı
46	73	K	MDS	46,XX (5), 44,XX (3)
47	50	E	MDS	46,XY (15), 44,XY (1)
48	38	E	MDS	46,XY
49	44	E	MDS	46,XY

Tablo 12. Diğer kan hastalıkları tanılı olguların sitogenetik bulguları.

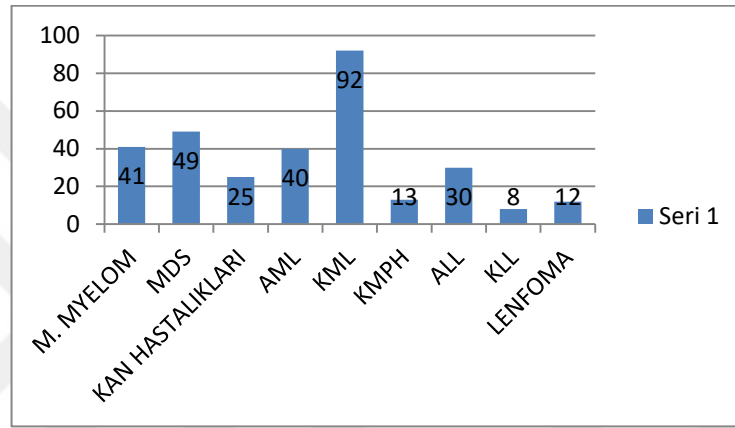
Sıra	Yaş	Cinsiyet	Tanı	Sitogenetik sonuç
1	46	E	Beta Talasemi	46,XY
2	36	K	?	46,XX
3	72	E	?	46,XY
4	28	K	?	46,XX
5	33	K	?	46,XX
6	79	E	?	46,XY
7	48	K	Aplastik anemi	46,XX (2), 45,XX (3), 47,XX (1)
8	80	E	?	46,XY (6), 45,XY (5)
9	45	K	Hemoglobinopati	46,XX, -del(17p13)
10	85	K	Hemoglobinopati	46,XX (5), 45,XX (10)
11	38	K	Anemi	46,XX
12	27	E	Fankoni anemisi/Aplastik anemi	Metafaz bulunamadı
13	69	K	Hemoglobinopati	46,XX, 46,XX, t(1:12), 47,XX, +21
14	81	K	Hemolitik anemi	46,XX (12), 45,XX (2), 44,XX (1)
15	79	E	Anemi	46,XY
16	24	K	Aplastik anemi	46,XX, -del(5q31.2)
17	78	E	Anemi	46,XY
18	29	E	Hepatosplenomegali/anemi	46,XY
19	73	E	Hemoglobinopati	46,XY
20	45	K	Pansitopeni	46,XX, inv9(p12q13)(14), 44,XX (10)
21	54	K	Hematomegali	46,XX (19), 45,XX (2), 46,XX, 17q+1
22	74	E	Romatoid artrit	46,XY Ph(-)
23	58	E	Anemi	46XY,
24	30	K	Aplastik anemi	Metafaz bulunamadı
25	27	E	Lökopeni	46,XY (14), 45,XY (2)

Çalışma grubumuzun cinsiyet dağılımı ve yaş ortalamaları Tablo 13'te gösterilmiştir.

Tablo 13. Çalışma grubunun cinsiyete göre dağılımı ve yaş ortalamaları.

Cinsiyet	n	%	Yaş (ort.+SD)
KADIN	149	48,1	52,67 ± 20,69
ERKEK	161	51,9	54,40 ± 23,28
TOPLAM	310	100	

Çalışma grubumuz içerisindeki 310 hastanın gruplara göre dağılımına bakıldığında; 92 KML (%29,7), 49 MDS (%15,8), 41 MM (%13,2), 40 AML (%12,9), 30 ALL (%9,7), 25 Diğer kan hastalıkları (%8,1), 13 KMPH (%4,2), 12 Lenfoma (%3,9) ve 8 KLL (%2,6) gözlenmiştir.



Şekil 23. Çalışma popülasyonundaki hasta gruplarının dağılımı.

5.1. Sitogenetik bulgular

Hastalardan aspire edilen kemik iliği örneklerine 24 ve 48 saatlik kültür ve GTG bantlama yöntemleri uygulanması sonrası bulunan metafazlara konvansiyonel ve moleküler (FISH) sitogenetik yöntemler uygulanmış, elde edilen bütün kromozom analizleri bu kemik iliği örneklerinden çalışılmıştır. Konvansiyonel ve moleküler (FISH) sitogenetik incelemeleri “International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN,2005)” kurallarına uygun şekilde gerçekleştirilmiştir.

Konvansiyonel ve moleküler (FISH) sitogenetik kromozom analizlerine göre; 80 (%25,8) hastada sayısal anomali saptanırken, 61 (%19,7) hastada yapısal anomali tespit edildi, 141 (%45,5) hastada herhangi bir anomali saptanmadı, 28(%9) hastada ise metafaz elde edilemediği için değerlendirme yapılamadı (Tablo 14).

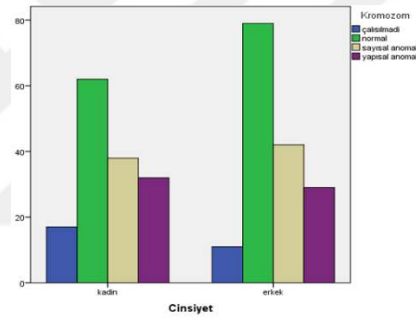
Tablo 14. Çalışma grubundaki tüm hastaların kromozom anomalisi bakımından dağılımı.

	n	%
SAYISAL ANOMALİ	80	25,8
YAPISAL ANOMALİ	61	19,7
ANOMALİ YOK	141	45,5
METAFAZ YOK	28	9,0
TOPLAM	310	100

Tablo 15. Çalışma grubundaki kadın/erkek hastaların kromozom anomalisi açısından dağılımı.

		Anomali (+)	Anomali (-)
KADIN	n	68	67
	%	48,2	47,5
ERKEK	n	73	74
	%	51,8	52,5
TOPLAM	n	141	141
	%	100	100

Çalışma grubumuzdaki kadın/erkek hastaların kromozom analizi sonuçları Şekil 24'te gösterilmiştir.



Şekil 24. Kromozom anomalilerinin cinsiyete göre dağılımı.

Çalışma popülasyonundaki 310 olgunun gruplara göre kromozomal anomali dağılımlarına bakıldığında;

- AML hastalarına ait kültüre edilmiş toplam 40 kemik iliğinden elde edilen metafaz hücrelerinde yapılan konvansiyonel sitogenetik ve FISH incelemeleri sonucunda; 46,XX,Ph(+),4,Ph(-)13 ve 46,XY,inv(9)(p13q21) yapısal anomalileri 2 (%5) hastada, 46,XX,44XX(5),46,XY,45,XY,-11(6) sayısal anomalileri 11 (%27,5) hastada gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre hastaların 18'inde sayısal ve yapısal kromozom anomalileri gözlenmezken, 9 hastanın kemik iliği materyalinde metafaz gözlenmedi.
- KML hastalarına ait kültüre edilmiş toplam 92 kemik iliğinden elde edilen metafaz hücrelerinde yapılan konvansiyonel sitogenetik ve FISH incelemeleri

sonucunda; 46XY,t(9;22)(q34,q11)Ph(+)(42), 46XX,del(17p13)(1), 46XX,del(22q11.23)(2), Ph(-)(1) yapısal anomalileri 44 (%47,8) hastada, 46 XX/45X0(5) sayısal anomalileri 5 (%5,4) hastada gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara göre kemik iliği örneklerinin 35'inde sayısal ve yapısal kromozom anomalileri gözlenmezken, 8 kemik iliği örneğinde yeterli sayı ve kalitede metafaz bulunamadı.

- KMPH hastalarına ait kültüre edilmiş toplam 13 kemik iliğinden elde edilen metafaz hücrelerinde yapılan konvansiyonel sitogenetik ve FISH incelemeleri sonucunda; 46,XX,45,XX ve 46,XY,45,XY,47,XY anöploidi (sayısal anomali) 4 (%30,8) hastada tespit edilirken, yapısal anomali gözlenmemiştir. Bu sonuçlara göre kemik iliği örneklerinin 7'sinde sayısal ve yapısal kromozom anomalileri gözlenmezken, 2 numunede metafaz gözlenmedi.
- ALL hastalarına ait kültüre edilmiş toplam 30 kemik iliğinden elde edilen metafaz hücrelerinde yapılan konvansiyonel sitogenetik ve FISH incelemeleri sonucunda; 46XY, t(9;22)Ph(+)(3), 46XX,Ph(+)(1) yapısal anomalileri 4 (%13,3) hastada, 46,XY,45,XY ve 46,XX,45,XX sayısal anomalileri 11 (%36,7) hastada gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre kemik iliği örneklerinin 13'ünde kromozomal anomali gözlenmezken, 2 kemik iliği örneğinde yeterli sayı ve kalitede metafaz elde edilemedi.
- KLL hastalarına ait kültüre edilmiş toplam 8 kemik iliğinden elde edilen metafaz hücrelerinde yapılan konvansiyonel sitogenetik ve FISH incelemeleri sonucunda; 46XY,del(17p) yapısal anomalisi 1 (%12,5) hastada, 46XY/47XY,+12,/45X0 sayısal anomalisi 1 (%12,5) hastada saptanmıştır. Bu sonuçlara göre kemik iliği örneklerinin 6'sında sayısal ve yapısal kromozom anomalileri gözlenmemiştir. Hastalara ait kemik iliği örneğinden elde edilen metafaz hücrelerinde yapılan klasik sitogenetik ve FISH incelemelerinin tümünde sonuç elde edilmiştir.
- Lenfoma hastalarına ait kültüre edilmiş toplam 12 kemik iliğinden elde edilen metafaz hücrelerinde yapılan konvansiyonel sitogenetik ve FISH incelemeleri sonucunda; 46,XY,45,XY,47XY,9qh+ sayısal anomalisi 3 (%25) hastada saptanırken, yapısal anomali gözlenmemiştir. Bu sonuçlara göre kemik iliği

örneklerinin 8'inde kromozomal anomali saptanmamıştır. Kemik iliği örneklerinin 1'inde ise istenen kalite ve çoklukta metafaz bulunamamıştır.

- M. Myeloma hastalarına ait kültüre edilmiş toplam 41 kemik iliğinden elde edilen metafaz hücrelerinde yapılan konvansiyonel sitogenetik ve FISH incelemeleri sonucunda; 46XX/45X0/t(11,14), 46XY/45X0/47XY, del(4)(q31.1-qter), 46XX, inv(9)(p11q12)/45X0 yapısal anomalileri 3 (%7,3) hastada, 46XX/45X0 ve 46XY/45XY,-21 sayısal anomalileri 14 (%34,1) hastada saptanmıştır. Bu sonuçlara göre kemik iliği örneklerinin 23'ünde yapısal ve sayısal anomali gözlenmezken, 1 kemik iliği örneğinde yeterli sayı ve kalitede metafaz bulunamamıştır.
- MDS hastalarına ait kültüre edilmiş toplam 49 kemik iliğinden elde edilen metafaz hücrelerinde yapılan konvansiyonel sitogenetik ve FISH incelemeleri sonucunda; 46,XX (17),-del (5q31.2), 46,XY,del 5q, 46,XX, t (9;22) yapısal anomalileri 3 (%6,1) hastada, 46,XX,45,XX,44,XX ve 46,XY,45,XY,47XY hipodiploidi ve hiperdiploidi sayısal anomalileri 25 (%51,0) hastada gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre 20 hastada kromozomal anomali gözlenmezken, kemik iliği materyallerinin 1'inde yeterli miktarda metafaz saptanmamıştır.
- Diğer kan hastalıkları görülen hastalara ait kültüre edilmiş toplam 25 kemik iliğinden elde edilen metafaz hücrelerinde yapılan konvansiyonel sitogenetik ve FISH incelemeleri sonucunda; 46XX,-del(17p13), 46XX,-del(5q31.2), 46XX,inv9(p12q13)(14) ve 46,XX,t(1:12)47,XX,+21 yapısal anomalileri 4 (%16) hastada, 46,XX, 45,XX, 44,XX ve 46,XY,45,XY sayısal anomalileri 6 (%24) hastada saptanmıştır. Bu sonuçlara göre 11 hastada kromozomal anomali görülmezken, kemik iliği örneklerinin 4'ünde istenen düzeyde metafaz elde edilememiştir.

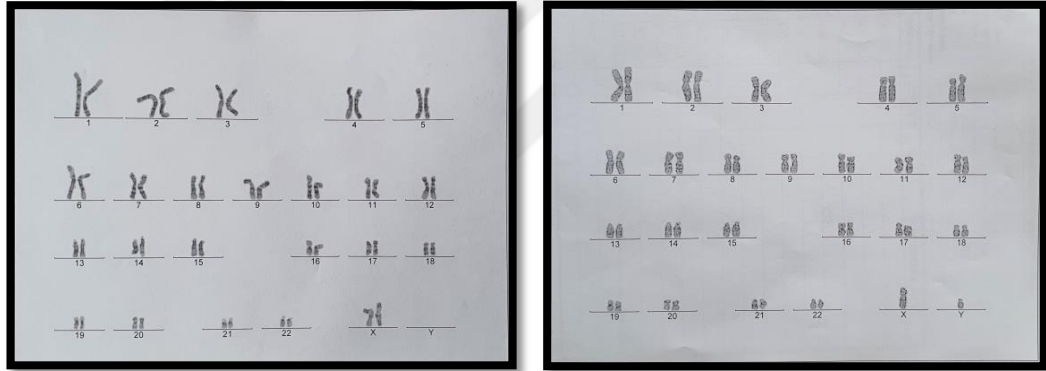
Hastaların konvansiyonel sitogenetik ve FISH analizi ile elde edilen verileri

Tablo 16'da yer almaktadır.

Tablo 16. Hasta gruplarındaki sayısal-yapısal kromozomal anomali dağılımı.

		Normal	Sayısal anomali (+)	Yapısal anomali (+)	Metafaz (-)	Toplam
AML	n	18	11	2	9	40
	%	%45	%27,5	%5,0	%22,5	%100
ALL	n	13	11	4	2	30
	%	%43,3	%36,7	%13,3	%6,7	%100
KML	n	35	5	44	8	92
	%	%38	%5,4	%47,8	%8,7	%100
KLL	n	6	1	1	0	8
	%	%75	%12,5	%12,5	%0,0	%100
KMPH	n	7	4	0	2	13
	%	%53,8	%30,8	%0	%15,4	%100
MDS	n	20	25	3	1	49
	%	%40,8	%51,0	%6,1	%2,1	%100
MM	n	23	14	3	1	41
	%	%56,1	%34,1	%7,3	%2,4	%100
Lenfoma	n	8	3	0	1	12
	%	%66,7	%25,0	%0,0	%8,3	%100
Diğer kan hastalıkları	n	11	6	4	4	25
	%	%44	%24,0	%16,0	%16	%100

Kadın ve erkek hastalara ait sitogenetik analiz ile elde edilen normal karyotip örnekleri Resim 1’de verilmiştir.



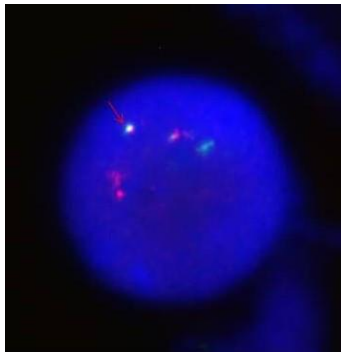
Resim 1. Normal karyotipli kadın ve erkek hastaların kromozomlarının konvansiyonel sitogenetik görüntüsü.

5.2. Moleküler sitogenetik “FISH” bulguları

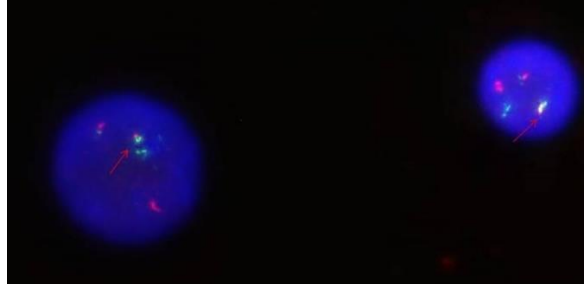
Çalışmamızda, hastalarımızın FISH incelemesinde hematolojik kanserlerin tanı, tedavi ve prognozunu belirlemek amacıyla en yaygın translokasyon ve delesyon FISH problemleri kullanılmıştır. Çalışma popülasyonunun gruplara göre dağılımı:

1. 9q34.1(ABL1)/22q11.2(BCR) bölgelerine özgü translokasyon, BCR/ABL füzyonunu tespit etmek için t(9;22) probu “Cytocell Aquaris BCR/ABL Translocation Probe dual fusion (BCR gen bölgesi (22q11.2)S.Green ve ABL gen bölgesi (9q34)(S.Orange)” kullanılan FISH çalışmasında bu füzyon geninin ürünü olan Philadelphia kromozomu (Ph+);

- KML grubunda 42 hastada (Resim 2),
 - ALL grubunda 4 hastada,
 - AML grubunda 1 hastada (Resim 3),
 - MDS grubunda ise 1 hastada (Ph+) olarak bulundu.
2. IGH/CCND1 gen bölgesine özgü translokasyon t(11;14)(q13;q32) FISH probu ile yapılan FISH analizinde;
- M. Myeloma grubunda 1 hastada translokasyon pozitif bulundu.
3. 5q31.2 gen bölgesine özgü delesyon del5q problemleri “Cytocell Aquaris Deletion Probe” ile yapılan FISH çalışmasında;
- MDS grubunda 2 hastada,
 - Diğer kan hastalıkları grubunda ise 1 hastada delesyon pozitif olarak tespit edilmiştir.
 - 4 hastada ise metafaz bulunamadığından sonuca ulaşamamıştır.
4. 17p.13 bölgesine özgü delesyon del17q FISH problemleri ile yapılan FISH analizinde;
- KML grubunda 1 hastada,
 - Diğer kan hastalıkları grubunda 1 hastada,
 - KLL grubunda 1 hastada delesyon pozitif bulunmuştur.
5. 22q11.23 bölgesine özgü del22q FISH problemleri ile yapılan FISH analizinde;
- KML grubunda 1 kişide delesyon pozitif olarak analiz edilmiştir.



Resim 2. KML hastasında görülen t(9;22) (Cytocell Aquarius BCR/ABL Translocation Probe) analizi. İlk hücrede 3 kırmızı, 1 sarı ve 1 yeşil sinyal görülmüştür. Sarı sinyal gözlenen hücrede Ph kromozomu t(9;22) pozitifdir.



Resim 3. AML hastasında gözlenen t(9;22) (Cytocell Aquarius BCR/ABL Translocation Probe) analizi. 22. kromozomun BCR gen bölgesi yeşil, 9. kromozomun ABL1 gen bölgesi kırmızı renkte sinyal verdi. 9. kromozomun BCR bölgesinde 3 tane kırmızı sinyal gözlemlendi.

Çalışmamızda anormal karyotipli 141 hastamızın sitogenetik anomalileri Tablo 17’de verilmiştir.

Tablo 17: Anormal karyotip saptanan 141 olgudaki kromozom düzensizlikleri

n	KARYOTİP
25	46,XY, t(9;22) Ph(+)
23	46,XX, t(9;22) Ph(+)
2	46,XX, del (17p13)
1	46,XY, del (17p)
1	46,XX, del (22q11.23)
1	46,XY, del (5q)
2	46,XX, del(5q 31.2)
1	46,XY/45,X0/47,XY,del(4)(q31.1-qter)
2	46XX,inv(9)(p11q12)
1	46,XY,inv(9)(p13q21)
1	46,XX /45,X0 / t(11,14)
1	46,XX,46,XX,t(1:12),47,XX,+21
42	46,XY/45,X0/47,XY
38	46,XX/45,X0/47,XX

6. TARTIŞMA

Hematolojik hastalıkların tanısı, takibi, tedavi planlaması, tekrarlama riski ve ailesel tarama ihtiyacının gereksinimini belirlemek amaçlı kemik iliğinin taranması önemlidir. Bu hastalarda sırasıyla önce Konvansiyonel sitogenetik analiz, moleküler sitogenetik yöntemlerden FISH ve PCR (Polimerase Chain Reaction) çalışılması tavsiye edilmektedir (121). Her ne kadar hematolojik kanserlerde klinik takip, biyokimyasal laboratuvar testleri prognoz hakkında yorum yapmamıza yardımcı olsa da sitogenetik incelemeler hastada remisyonun değerlendirilmesi, prognoz takibi ve tedavi bitirilme zamanının belirlenmesinde aydınlatıcı bir role sahiptir. Soysal ve ark. bildirdiğine göre, hematolojik kanserlerde kullanılan sitogenetik analiz sonuçlarının yetersiz kalması durumunda FISH yönteminin anomali yakalamadaki başarı oranının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (2). Çalışmamızda hematolojik kanser tanı/ön tanısıyla bölümümüze yönlendirilen hastalardan aspire edilen kemik iliği örneklerinde klasik sitogenetik analiz ve FISH yöntemini kullanarak elde edilen kromozom analizlerini retrospektif olarak değerlendirdik. Klasik sitogenetik analiz sonuçlarının yetersiz kaldığı bazı vakalarda FISH yöntemi ile anomali tespit ettik.

Kromozom incelemelerinde önerilen yöntemlerin kendi aralarında tercih edilmelerini sağlayan avantaj ve dezavantajları mevcuttur. FISH yöntemi kompleks, spesifik ve submikroskopik taramalarda etkili olurken problemlerinin spesifik olması nedeniyle ön tanı gerektirmektedir. FISH iki ana bileşenin hazırlanmasını içerir; DNA probu ve probun hibridleştirileceği hedef DNA. Bu yöntemde başarılı bir yorumlama; seçilen malzemelerin kalitesine, hibridizasyon durumuna ve hibridizasyon sonrası yıkamaların ve antikor saptamalarının sıklığına bağlıdır (122). Konvansiyonel sitogenetik analiz ise ön tanı yönlendirmesi olmadığından genel taramalarda tercih edilen bir tekniktir. Kemik iliği yanında periferik kanda da direkt yöntem ile metafazlar elde edilebilmektedir. Genel karyotip görüntüsü konvansiyonel sitogenetik analiz ile saptanmaktadır. Kanser hastalıklarında tanı, takip ve prognozda görülecek yeni kromozom anormalliklerinin belirlenmesinde de önemli rol oynamaktadır (123).

Çalışma gruplarında “International System for Human Cytogenetic, ISCN, 2005” kriterlerine uyularak konvansiyonel sitogenetik analiz çalışılmıştır. Çalışmamızda laboratuvarımıza yönlendirilen çeşitli hematolojik kanser ön tanılı tüm

hastalar değerlendirmeye alınmıştır. Çalışmaya katılan 310 hastanın kemik iliği incelemesinde 80 (%25,8) sayısal ve 61 (%19,7) yapısal anomali tespit edildi. 141 (%45,5) hastada herhangi bir anomali saptanmazken 28 (%9) hastada ise metafaz bulunamadı. Cox ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada 260 AML ön tanılı hastalarda uygulanan konvansiyonel sitogenetik analizde %41 (n=105) anomali saptanırken, %39 (n=102) anomali saptanmadı ve %20 (n=53) metafaz elde edilmedi olarak raporlanmıştır (124). Metafaz elde etme konusundaki bu yüksek defekti numuneleri alma, saklama ve koruma tekniği ile açıklamaktadırlar. Literatürde bizim çalışmamız ile benzer olan Güran ve ark. çalışmalarında MDS ön tanısı ile tarama yaptıkları 68 hastanın 4 tanesinde metafaz elde edilememiş, 8 tanesinde anomali saptanırken ki bunlarda da en sık Y kromozom yokluğu tespit edilmiş, geri kalan hastalarda normal karyotip elde ettiklerini raporlamıştır (125).

Myelodisplastik sendrom vakalarında AML ile ortak anomalilere sık rastlanmaktadır. MDS tanılı hastaların yaşamlarının bir döneminde AML gelişme oranı yaklaşık %30-40 olarak bildirilmektedir (126). MDS ön tanılı hastalarda yapılan sitogenetik analizlerde hem sayısal hem de yapısal anomali tespit edilebilmektedir. Primer MDS olgularında %50-60 anomali bildirilirken, sekonder olgularda bu oran %80-85'leri bulabilmektedir. En tipik anomali ise 5q delesyonu olarak dikkati çeker ki bu da WHO sınıflamasında ayrı bir alt grup olarak kabul görmüştür (127). FAB ve WHO sınıflamalarına göre alt gruplarında farklı yaklaşım ve tedavi protokolleri uygulanmaktadır. Bunun yanında sitogenetik incelemeler tanı ve prognoz takibinde önemli bir yere sahiptir. Uluslararası prognostik skorlama sistemi (IPSS) MDS'li hastaları risk gruplarına göre üçe ayırır; iyi prognoz [normal karyotip, -Y, del(5q), del(20q)], kötü prognoz (kompleks yapıda anomaliler, 7. kromozom anomalileri), orta prognoz (diğer kromozom anomalileri) olarak değerlendirilir (128). Bernasconi tarafından bildirilen bir araştırmada 188 MDS'li olguda tespit edilen en sık anomaliler %12 del(5q), %6 ise monozomi 7 olarak bildirilmiştir (129). Ayrıca 1029 olgudan oluşan başka bir çalışmada ise MDS ön tanısı ile başvuran hastalarda sitogenetik inceleme ile %44 anormal karyotip saptanmış, ayrıca %18 del(5q), %6 trizomi 8, %4 del(20q) şeklinde kompleks anomaliler bildirilmiştir (130). Güran ve ark. 2011 yılında yayınladıkları bir araştırmada yaş ortalaması 54.53 ± 21.23 olan 68 MDS ön tanısı ile başvuran hastada

en sık Y kromozom yokluğu (%5,9) tespit ettiklerini bildirmişlerdir (125). MDS tanılı olgularda genellikle monozomi 7, del15q, trizomi 8 gibi sayısal anomaliler izlenmektedir. Ayrıca t(1;3)(p36;q21), t(1;7)(q10;p10) translokasyonları da yapısal olarak sık raporlanmaktadır (98). Bizim çalışmamızda ise literatür ile paralel olarak 59,96±18,28 yaş ortalamasına sahip 49 MDS tanılı hastanın 25'inde sayısal anomali, 3'ünde ise yapısal anomali tespit edilmiştir. 3(%6,1) hastada 46XX(17), -del(5q31.2), 46,XY,del5q, 46XX, t(9;22) yapısal anomalileri öne çıkarken, sayısal anomali gözlenen 25 (%51) hastada ise sıklıkla 46,XX, 45,XX, 44,XX ve 46,XY, 45,XY, 47XY hipodiploidi ve hiperdiploidi tespit edilmiştir.

Çalışmamızı oluşturan 310 hastanın, literatüre uygun olarak gruplarının yaş ortalamasına baktığımızda ALL'nin en düşük, MDS'nin ise en yüksek yaş ortalamasına sahip grup olduğunu tespit ettik. KLL hastaları genellikle orta yaş ve sıklıkla 60 yaş üstü tanı konulan hastalardır. Uzun yaşam süresine sahip olgun B lenfositlerin kemik iliği, periferik kan ve lenfoid dokularda artması ile karakterizedir. KLL'de standart sitogenetik analiz yapmak zordur, bunun sebebi ise düşük mitoz hızına sahip olmalarıdır (131). İzole 13q delesyonu iyi prognoz olarak bildirilmekteyken, 17p delesyonu hastalarda TP53 mutasyonu ile birlikte seyretmektedir ve bu da kötü prognoz olarak değerlendirilmektedir. Dohner ve ark. (132) 325 olgudan oluşan çalışmasında %55 13q delesyonu tespit ettiklerini, sonrasında sırası ile %18 11q delesyonu, %12 12q trizomisi ve %7 17q delesyonu saptadıklarını bildirmişlerdir. Lai ve ark. (133) 2011 yılında 275 Çinli KLL hastasında delesyon oranını Batı ülkelerinden farklı olarak %33,5 olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda KLL vakalarının yaş ortalaması 55,29±8,2 olup literatüre göre daha düşük çıkmak ile beraber istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. KLL ön tanısı konulan 8 hastanın 6'sında normal karyotip tespit edildi. Grupta 1 (%12,5) hastada 46XY,del(17p) yapısal anomalisi, 1 (%12,5) hasta da 46XY/47XY,+12,/45X0 sayısal anomalisi saptanmıştır. Bizim saptadığımız 17p delesyonu ise kötü prognostik özelliktedir.

KML tanısı ile başvuran hastaların %95'i gibi çok büyük bir oranında 9. kromozom ile 22. kromozom arasında resiprokal translokasyon t(9;22)(q34;q11.2) sonucunda oluşan derivatif kromozom "Philadelphia kromozomu" olarak adlandırılır. Nadir bir varyant ise t(9;22) translokasyonu, 22q11 delesyonundan

oluşan Ph kromozomu'dur. Bu varyant geninin oluşumu ile ilgili olarak, 9.-22. kromozom arasında resiprokal olmayan insersiyonu sonrası gen füzyonu ya da önce beklenen t(9;22)(q34,q11) translokasyonu gerçekleşmesi ardından diğer kromozomların katılımıyla farklı kırık noktası içeren revers translokasyonların izlemesi ile oluşabileceği iddia edilmiştir. Bu varyantın tespitinin önemi tam anlamıyla açıklanamayıp bu konu üzerinde çalışmalar devam etmektedir (128). Ayrıca Ph(-) KML tanılı hastalarda moleküler genetik BCR/ABL geni üzerinde yeni düzenlemeleri ortaya çıkarmıştır. Bu yeni düzenlemelerin varlığını ve lokalizasyonunu ortaya çıkaran moleküler inceleme aynı zamanda double füzyon geninin varlığını da ortaya çıkarmaktadır. Bu durum hastalığın prognozunun anlaşılmasına katkı sağlamaktadır (132,133). Bizim çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak 59,34±17,6 yaş ortalamasına sahip 92 hastanın 49 tanesinde anomali saptanırken 35 hastada normal karyotip bulunmuştur. Anomali tespit edilen hastalardan 44'ünde yapısal anomali mevcuttur. Yapısal anomaliye sahip 44 KML tanılı hastanın 42 (%95,45) 'sinde 46XY,t(9;22)(q34,q11)Ph(+)(21), 46XX,t(9;22)Ph(+)(21) iken 1 (%2,27) hastada 46XX,del(17p13), 1 (%2,27) hastada da 46XX,del(22q11.23)Ph(-)1 yapısal anomalileri gözlemlendi, 5 hastada ise 46XX/45X0(5) sayısal anomalisi gözlemlenmiştir.

ALL, lenfositlerin henüz olgunlaşmamış bir blast hücresinde oluşan anomali sonrası gelişen bir malignitedir. Bu değişimin farklı aşamalarda olması nedeniyle alt tipleri oluşmuştur: B lenfosit kaynaklı ise B-ALL, T lenfosit kaynaklı ise T-ALL olarak gruplandırılır. 15 yaş altı çocuklarda en sık görülen kanser ve en sık ikinci ölüm nedenidir (134). ALL'de sıklıkla görülen t(9;22) translokasyonudur, bu da hücre çoğalması ve döngüsünde önemli rolü olan tirozin kinaz aktivitesine neden olarak proliferasyonu tetikler, ayrıca P53 gibi tümör supresör genleri de bloke eder (135). Çocukluk çağı B-ALL'lerde en sık görülen sayısal anomali hiperdiploidi olup iyi prognoz olarak değerlendirilir. Kromozomu 40'ın altında olduğu hipodiploidi ise kötü prognoz olarak değerlendirilir (136). Bizim çalışmamızda da literatür ile benzer olarak 9,83±5,48 yaş ortalamasına sahip 30 hastanın 4'ünde (%13,3) 46XY, t(9;22)Ph(+)(3), 46XX,Ph(+)(1) yapısal anomalilerini, 11'inde (%36,7) 46,XY,45,XY ve 46,XX,45,XX sayısal anomalilerini tespit ettik.

AML, kemik iliği ve kanda myeloid birikimine neden olan hemotalojik bir neoplazidir. AML tanısı için WHO'ya göre kan ve kemik iliğinde çekirdekli hücrelerin %20'si (FAB'a göre %30) myeloblast içermelidir (137). AML tanılı hastalarda sitogenetik analiz sonuçları biraz daha karışıktır, 150'den fazla sayısal ve yapısal anomali olduğu bildirilmiştir (138). AML sınıflamasında yapılan düzenleme ile t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13.1;q22) veya t(16;6)(p13.1;q22), t(15;17)(q24.1;q21.1), t(9;11) (p21.3;q23.3), t(6;9)(p23;q34.1), inv(3) (q21.3;q26.2) veya t(3;3)(q21.3;q26.2), t(9;22) (q34;q11.2) prognozla ilişkilendirilen tekrarlayan anomalilerdir (139). Sayısal ve yapısal anomaliler değerlendirildiğinde en sık 21., 8., 17. ve 7. kromozomlarda anomali gözleendiği, tek kromozom değişikliği görülme oranının ise %40 ile en sık olduğu bildirilmiştir (140). Çalışmamızda 63,03±11,67 yaş ortalamasına sahip 40 hastanın 2'sinde (%5) sıklıkla 46,XX,Ph(+)4,Ph(-)13 ve 46,XY,inv(9)(p13;q21) yapısal anomalileri, 11'inde (%27,5) ise 46,XX,44XX(5),46,XY,45,XY,-11(6) sayısal anomalileri gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre hastaların 18'inde sayısal ve yapısal kromozom anomalileri gözlenmezken, 9 (%24,4) hastanın kemik iliği materyalinde üreme olmadığı için metafaz gözlenmedi. Kutluay ve ark. (138) bildirdiği AML tanılı 589 olgunun sitolojik incelemesinde metafaz elde etme oranı %71 olarak bildirilmiştir. Çalışmamızda ise bu oran AML grubunda %75,6 olarak literatür ile uyumlu bulunmuştur.

KMPH, KML dışındaki Polistemia vera, Trombositopeni ve Primer miyelofibrozisi içerir. Bu hastalıklarda tanıya özgü sitogenetik inceleme tanımlanmamıştır. Nevruz ve ark. (141) 2005 yılında yapmış olduğu çalışmada, KML dışı KMPH tanısı alan 38 hastadan sadece 1 tanesinde 46,XX,del(17)(q23-24) kromozomal anomali tespit edilirken diğerlerinde normal karyotip bildirilmiştir. KML dışında KMPH olgularında nadir de olsa Ph(+) kromozom gözlenebilir bu da kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir. Fakat tek bir klonda tanımlanan kromozomal anomalilerin ise prognoza etkisi açık değildir (142). Literatürde ayrıca Zamona ve ark. (143) 28 hastadan oluşan inceleme sonuçlarında 5 hastada del(20q) ve del(13q) anomalilerinin prognostik açıdan değerli olabileceğini ileri sürmüşlerdir. KMPH hastalığı ileri yaş hastalığı olarak tanımlanmakta, hastaların %25-50'si 60 ve üzeri yaş olarak bildirilmektedir (144). Çalışmamızda ise 48,54±16,65 yaş ortalamasına sahip 13 olgu literatürden farklı olarak daha genç yaşta olmasına rağmen istatistiksel

olarak anlamlı değildi. Kemik iliği incelenen 13 hastanın 4'ünde (%30,8) 46,XX,45,XX ve 46,XY,45,XY,47,XY anöploidi sayısal anomalisi tespit edilirken, yapısal anomali gözlenmemiştir. Bu sonuçlara göre kemik iliği örneklerinin 7'sinde sayısal ve yapısal kromozom anomalileri gözlenmeyerek literatür ile uyumluluk görülmüştür.

Lenfoma lenf dokusunun primer maligniteleridir. Lenfoid organlarda ve içinde lenf dokusu olan tüm organlarda görülebilmektedir ve primer yerinden kolay bir şekilde yayılım gösterebilir. Lenfoma türlerinden Burkitt lenfoma farklı epidemiyolojik, klinik, patolojik, immünolojik ve moleküler sitogenetik özelliklere sahip ektranodal bir malignitedir (145). Hastalığın tanı koyma yaşı 45-55 arası iken takipli hastaların yaş ortalaması ise 55-70 arasında ileri yaş hastalığıdır. Erkeklerde sık rastlanır. Sitogenetik analizde 17p ve del(6q) tespiti kötü prognozdur. Hodgkin Lenfomada PCR ile %80'e varan EBV pozitifliği bildirilmektedir (146). Literatürde ileri yaş hastalığı olarak bildirilen lenfoma bizim çalışmamızda farklı olarak $49,25 \pm 19,99$ olarak saptanmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi. Lenfoma hastalarına 12 kemik iliğinde incelenmesi ile 46,XY,45,XY,47XY,9qh+ sayısal anomalisi 3 (%25) hastada saptanırken, yapısal anomali gözlenmemiştir. Bu sonuçlara göre kemik iliği örneklerinin 8'inde kromozomal anomali saptanmamıştır.

7. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışma grubumuzu oluşturan Hematolojik kanser tanılı/ön tanılı 310 hastadan aspire edilen kemik iliği örneklerinde konvansiyonel sitogenetik analiz ve FISH yöntemleri kullanılarak elde edilen sonuçlar geriye dönük olarak değerlendirildi. Hematolojik kanserlerle ilişkili olan kromozomal anomaliler, literatürle uyumlu olarak çalışmamızda da sık görülen anomalilerdir.

Çalışmamızın sonuçlarına göre, kemik iliği kültürlerinde konvansiyonel sitogenetik analizlerin FISH tekniğiyle birlikte kullanımı ile başarı oranının daha yüksek olduğu tespit edildi. Bu da hematolojik kanserlerin tanı, tedavi ve prognozunu belirlemek amaçlı kemik iliği incelemesinde bu iki tekniğin birlikte kullanılmasının çok önemli olduğunu göstermiştir. Kanser genetiğinde her bir hastalık için sayısal ya da yapısal kromozomal değişikliklerin değerlendirilmesinde klasik sitogenetik analiz ve moleküler sitogenetik yöntem olan FISH sonuçlarının birbiriyle uyumlu olduğu, birbirini desteklediği ve literatüre de uygun olarak önemli olduğu kanaatine varılmıştır.

8. KAYNAKLAR

1. Gale RP, Rai KR. New insights into a chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 1978;1(9):677-679.
2. Soysal Y, Bahçe M, Yakıcıer MC, İfran A, Kürekçi AE. Lösemilerin genetik tanısında sitogenetik ve floresan in situ hibridizasyon yöntemlerinin etkinliğinin değerlendirilmesi. *The Medical Journal of Kocatepe* 2009;10:41-47.
3. Özbey Ü, Yüce H, Elyas H. Kronik myeloid lösemili hastalarda kromozomal anomalilerin belirlenmesi için sitogenetik ve FISH tekniği uygulamaları. *F.Ü. Sağ Bil Derg*, 2006;20(6):383-389.
4. Kacar F, Balta MÇ, Yavaş İ. Kemik İliği Biyopsilerinin Yeterlilik ve Kalitesinin Tanı Sürecine Etkileri. *Hitit Med J*. 2022;4(1):6-9.
5. Karadağ A, Altınok B, Özkan T, Hekmatshoar Y. Kemik İliği Stroması: Hücreleri ve Mikroçevresi. *Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi*. 2017;16(2):51-62.
6. Ören H. Kök Hücreler. *DEU Tıp Derg*. 2019;33(3):271-280.
doi: 10.5505/deutfd.2019.35693
7. Lai AY, Kondo MT. Blymphocyte differentiation from hematopoietic stemcell. *Seminars in Immunology*. 2008;20:207-21.
8. Özdilek A. Multipl miyelom hastalarında DEK proteinin analizi. Yüksek lisans tezi. Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, 2013. (Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ayten Kandilci)
9. Trumpp A, Ehninger A. The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in., *J Exp Med*. 2011;208(3):421-428.
10. Perry J.M, Li L. Disrupting the stem cell niche: good seeds in bad soil. *Cell*. 2007;129:1045-7.
11. Iwasaki H, Suda T. Cancer stem cells and their niche. *Cancer Science*. 2009;100:1166-72.
12. Ter Huurne M, Figdor CG, Torensma R. Hematopoietic stem cells are coordinated by the molecular cues of the endosteal niche. *Stem Cells Dev*. 2010;19:1131-41.

13. Tabe Y, Konopleva M. Advances In Understanding The Leukemia Microenvironment. *Br. J. Haematol.* 2014;164(6):767-78.
14. Palis J, Yoder MC. Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. *Exp. Hematol.* 2001;29:927-36.
15. Paik EJ, Zon LI. Hematopoietic development in the zebrafish. *Int. J. Dev. Biol.* 2010;54:1127-37.
16. Cumano A, Godin I. Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu. Rev. Immunol.* 2007;25:745-85.
17. Julien E, Omar RE, Tavian M. Origin of the hematopoietic system in the human embryo. *FEBS Lett.* 2016;590(22):3987-4001.
doi: 10.1002/1873-3468.12389. Epub 2016 Sep 22
18. Levitt L, Lin R. Biology and treatment of adult acute lymphoblastic leukemia. *West J Med.* 1996;164:143-55.
19. Özdemirli S. B hücreli akut lenfoblastik lösemilerde pax5 geninin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2010 (Danışman: Prof. Dr. Uğur Özbek)
20. Özer V. Akut lenfoblastik lösemi ve kronik myeloid lösemi ön tanılı olgularda füzyon gen ekspresyonlarının analizi. Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin, 2011. (Danışman: Prof. Dr. Özlem İzci Ay)
21. Özsan G. Multiple myelom biyolojisi. *Türkiye Klinikleri J Hem OncSpecial Topics.* 2008;1:5-8.
22. Ackerknecht EH. Historical notes on cancer. *Med Hist.* 1958;2(2):114-9.
23. Ünver SA. Türk tıp tarihinde kanser ve tedavisine dair. *İst Tıp Fak Mecmuası.* 1938;1(5):673-8.
24. Lippman SC, Hawk ET. Cancer prevention: from 1727 to milestones of the past 100 years. *Cancer Res* 2009;69(13):5269-84.
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1750. Epub 2009 Jun 2.
25. Baykara O. Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi.* 2016;5(3):154-65.
26. Tiffon C. The Impact of Nutrition and Environmental Epigenetics on Human Health and Disease. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11):3425.
doi: 10.3390/ijms19113425

27. Syaifudin M. Gene Mutation as Biomarker of Radiation Induced Cell Injury and Genomic Instability. *Atom Indonesia*. 2012;32(2):103-15.
28. Lüscher B, Nordheim A. Onkogene und Protoonkogene. In: Schmoll, HJ., Höffken, K., Possinger, K. (eds) *Kompendium Internistische Onkologie*. Springer, Berlin, Heidelberg. 2006;p21-22.
https://doi.org/10.1007/3-540-31303-6_4
29. Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell*. 1991;64:235-48.
30. Lee NK. Tumor suppressor genes. *Head Neck*. 1992;14(5):407-14.
doi: 10.1002/hed.2880140513
31. Britschgi C, Fey MF. Tumor suppressor genes in myeloid differentiation and leukemogenesis. *Future Oncol*. 2009;5(2):245-57.
doi: 10.2217/14796694.5.2.245
32. Celik B, Tuncer S.B. The Genetic Basis and Molecular Characteristics of Head and Neck Cancers. *Academic Developments on Health Sciences*. 2021;p103-26.
33. Williams WJ, Beutler E, Litchman MA, Coler BS, Kipps TJ, Mauner AM. *William's Hematology*. McGraw Hill Company, New York, 1991:2209-349.
34. Ünal Ş, Tuncer AM. Lösemide epidemiyoloji, tanısal yaklaşım ve sınıflandırma. *Katkı Pediatri dergisi*, 2004:338-49.
35. Pui C, Schrappe M, Masera G, Nachman J, Gadner H, Eden O, et al: Ponte di Legno Working Group. *Leukemia* 2004;18:1043.
36. Beral V, Fear NT, Alexander F, Appleby P. Breastfeeding and childhood cancer. *Br J Cancer*. 2001;85:1685-94.
37. Yöntem A, Bayram İ. Çocukluk Çağında Akut Lenfoblastik Lösemi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 2018;27(4):483-99.
38. Niemeyer CM, Sallan SE. Acute Lymphoblastic leukemia In: Oski FA, Nathan DG editors. *Hematology of Infancy and Childhood II*. Philadelphia; Saunders, 1993:1249-353.
39. Einungbrekke AJ, Plank L. Acute Leukemia in Children. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2016;4:457-71.
40. Yanada M, Suzuki M, Kawashima K, et al. Long-term outcomes for unselected patients with acute myeloid leukemia categorized according to the

World Health Organization classification: a single-center experience. *Eur J Haematol.* 2005;74:418-23.

41. Lilleyman JS, Hann IM, Stevens RF, Eden OB, Richards SM. "French American British (FAB) Morphological Classification of Childhood Lymphoblastic Leukaemia and Its Clinical Importance." *Journal of Clinical Pathology.* 1986;39:998-1002.
42. Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2006;354:166-78.
43. Hoelzer D, Gökbuget N. Acute lymphoblastic leukemia in adults. In: *Hematology Basic principles and practice.* Eds: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, McGlave P. Fourth edition, Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia, 2005;p1175-94.
44. Carroll WL, Bhatla T, Redner A, Kessel R. Acute Lymphoblastic & Myeloid Leukemia. In: *Lanzkowsky P, Jeffrey M. Lanzkowsky's Manual of Pediatric Hematology and Oncology.* 6th ed. Chennai, India: Elsevier; 2016;18-19:367-406.
45. Patte C, Auperin A, Michon J, et al. The Societe Française d'Oncologie Pediatrique LMB89 protocol: highly effective multiagent chemotherapy tailored to the tumor burden and initial response in 561 unselected children with B-cell lymphomas and L3 leukemia. *Blood.* 2001;97:3370-79.
46. Bozkurt S, Ünal Ş, Bayhan T, Gümrük F, Çetin M. Çocukluk Çağı Akut Lösemi Tanılı Hastalarda Karyotip Analizi ile Belirlenen Sitogenetik Anomaliler. *Acta Oncologica Turcica.* 2019;52(3):424-31.
47. Ma SK, Wan TSK, Chan LC. Cytogenetics and molecular genetics of childhood leukemia. *Hematological Oncology.* 1999;17:91-105.
48. Harrison CJ. The detection and significance of chromosomal abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2001;15:49-59.
49. Piccaluga PP, Malagola M, Romdoni M, Ottaviani E, Testoni Nicoletta ve ark. Poor outcome of adult acute lymphoblastic leukemia patients carrying the (1;19)(q23;p13) translocation. *Leukemia&Lymphoma.* 2006;47(3):469-72.

50. Harrison CJ. The genetics of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Best Practise&Research Clinical Hematology*. 2000;13(3):427-39.
51. Dorrance AM, Liu S, Yuan W, Becknell B, Arnoczky KJ, Guimond M, Strout Mp ve ark. MLL partial tandem duplication induces aberrant Hox expression in vivo via specific epigenetic alterations. *The Journal of Clinical Investigation*. 2006;116:2707-16.
52. Tirado CA, Shabsovich D, Yeh L, Pullarkat ST, Yang L, Kallen M, Rao N. A (1;19) translocation involving TCF3-PBX1 fusion within the context of a hyperdiploid karyotype in adult B-ALL: a case report and review of the literature. *Biomarker Research*. 2015;3(1):1-6.
53. Raimondi SC. Current status of cytogenetic research in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1993;81(9):2237-51.
54. Faderl S, Kantarjian HM, Talpaz M, Estrov Z. Clinical significance of cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1998; 91(11):3995-4019.
55. Chang HH, Lu MY, Jou ST, Lin KH, Tien HF, Lin DT. Cytogenetics in childhood acute lymphoblastic leukemia in Taiwan: A single-institutional experience. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2006;23(6):495-506.
56. Lichtman MA. Acute myelogenous leukemia. In: Williams Hematology, Eds: Beutler E, Lichtman MA, Coller BC, Kipps TJ, New York: McGraw-Hill Co., 1995;p:272-98.
57. Head DR. Classification and differentiation of the acute leukemias. In: Wintrobe's Clinical Hematology, Eds: Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2004;p:2063-76.
58. Oran B, Weisdorf DG. Survival for older patients with AML: a population based study. *Haematologica*. 2012;
59. Golub TR and Arceci RJ: Acute myelogenous leukemia. In Pizzo PA and Poplack DG eds: Principles and Practice of Pediatric Oncology 4th ed. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins Company. 2002;545-89.
60. Özbek U, Sırma S, Ağaoğlu L, Yüksel L, Anak S, Yıldız İ, Devocioğlu Ö, Timur Ç, Meral A, Gedikoğlu G. Prognostik Significance of The TEL/AML1

Fusion Gene in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia in Turkey. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2003;25(3):204-8.

61. Celkan T. Akut lösemiler. *Klinik Gelişim Dergisi*. 2007;20:14-32.
62. Ching H Pui. *Childhood Leukemias*. St Jude Children's Research Hospital Memphis, Tennessee, Cambridge University Press 2006;2-190.
63. Inokuchi T. *J Clin Exp Hematopathol*. 2010;50(2):91-8.
64. Ferhanoğlu B. *Kalitsal Hemolitik Anemiler*. İstanbul, 2005;98-100.
65. Rundles RW, Williams WS, Beutler E, Ersiau AJ, Lichtman MA. Chronic lymphocytic leukemia. 1986;1:981-93.
66. Rai KR, Savitsky A, Jagathambal K. Chronic lymphocytic leukemia; Symposium on Hematology and Hematologic Malignancies. *Medical Clinics of North America*. 1984;68:697-711.
67. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008;111:5446-56.
68. Yalçın A. Kronik Lenfositik Lösemi. *Klinik Hematoloji*. In: Yalçın A, Beyan C, Ural U, Çetin T, Kaptan K, Avcu F, eds. 1. Baskı. Ankara: GATA Basımevi. 2001;s158-62.
69. Karakuş S. Kronik Lenfositik Lösemide Tanı ve Prognoz. 2009;s129-31.
70. Kay NE, O'Brien SM, Pettitt AR, Stilgenbauer S. The role of prognostic factors in assessing "high risk" subgroups of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2007;48:2412-9.
71. Goldgar DE, Easton DF, Cannon-Albright LA, Skolnick MH: Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands. *J Natl Cancer Inst*. 1994;86:1600.
72. Kipps JH, Beutler E, Lichtman MA, Collier BS, Kipps TJ, Seligsohn U. Chronic lymphocytic leukemia and related diseases. *Williams Hematology*. New York: McGrawHill Co, 2001;1163-94.
73. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, Dohner K, Bentz M, Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000;343(26):1910-6.

74. Mosca L, Fabris S, Lionetti M, Todoerti K, Agnelli L, Morabito F, Neri A. Integrative genomics analyses reveal molecularly distinct subgroups of B-cell chronic lymphocytic leukemia patients with 13q14 deletion. *Clin Cancer Res.* 2010;16(23):5641-53.
doi:10.1158/1078-0432.Ccr-10-0151
75. Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia.* 2008;22(1):14-22.
76. Bennett J. Case of hypertrophy of the spleen and liver in which death took place from suppuration of the blood. *Edinb Med Surg J.* 1845;64:413-23.
77. Geary CG. Historical review: The story of chronic myeloid leukemia. *Brit J Haem.* 2001;112:282-92.
78. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960;132:1497.
79. Rowley J. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myeloid leukemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining. *Nature* 1973;243:290-3.
80. Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, Tura S, Gomez GA, Robertson JE et al. Prognostic discrimination in “good-risk” chronic granulocytic leukemia. *Blood* 1984;63:789-99.
81. Hasford J, Pfirrmann M, Hehlmann R, Allan NC, Baccarani M, Kluin-Nelemans JC et al. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90:850-8.
82. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O’Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 1999;341:164-72.
83. Erdem HB, Kaymak AÖ. Kronik Miyeloid Lösemide Genetik Tanı. *GMJ.* 2020;31:224-6.
84. Knowles MD. Neoplastic hematopathology. 2nd ed. New York: Lippincott Williams&Wilkins; 2001;p610-80.
85. Mozaheb Z. Epidemiology of hodgkin’s lymphoma. *Health.* 2013;5:17-22.

- 86.** Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood*. 2006;107:265-76.
- 87.** Altuntaş F, Eser B, Kaplan B, Canöz Ö, Gündoğan K, Özkan M, Er Ö, Çoşkun HS, Çetin M, Karahacoğlu E, Ünal A. Hodgkin hastalığında ilk basamak tedavi sonuçları: tek merkez deneyimi. *THOD* 2003;2(13):79-86.
- 88.** Straathof KC, Bollard CM, Rooney CM, Heslop HE. Immunotherapy for Epstein-Barr virus-associated cancers in children. *Oncologist* 2003;8(1):83-98.
- 89.** Eichenauer DA, Engert A, Diehl V. Hodgkin lymphoma. Clinical manifestations, staging and treatment In *Hematology Basic Principles and Practice*. Hoffman R, Benz EJ Jr, Silberstein LE, Heslop HE, Weitz JJ, Anastasi J eds sixth ed. 2013 Elsevier Inc. Canada pp:1139-56.
- 90.** Niitsu N, Okamoto M, Aoki S, Kurraishi Y, Okumura H, Hirano M. Kötü prognozlu agresif lenfomalı hastalar için CycloBEAP (CHOP-benzeri + etoposid ve bleomisin) rejiminin çok merkezli faz II çalışması. *Ann Haematol*. 2006;85:374-80.
- 91.** Kanungo A, Medeiros LJ, Abruzzo LV, Lin P. Eşzamanlı t(14;18) ve 8q24/c-MYC translokasyonu ile ilişkili lenfoid neoplazmalar genellikle kötü prognoza sahiptir. *Mod Pathol*. 2006;19:25-33.
- 92.** Kyle RA, Wiernik PH, Canellos GP. History Of Multiple Myeloma. In: *Neoplastic Diseases of the Blood*, 2 nd ed. Schiffer, C.A. ed. New York: Churchill Livingstone 1991;p325-32.
- 93.** Bowden M, Crawford J, Cohen HJ, Noyama O. A comparative study of monoclonal gammopathies and immunoglobulin levels in Japanese and United States elderly. *J Am Geriatr Soc*. 1993;41:11-4.
- 94.** Zhou J, Maurer K, Farina L, Gribben JG. The role of the tumor microenvironment in hematological malignancies and implication for therapy. *Frontiers in Bioscience*. 2005;10:1581-96.
- 95.** Aydın F. Multiple Myeloma Hastalarında Sitokin Gen Polimorfizmleri ve Kromozom 13 Delesyonu. *Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi*. 2020;3(3):179-85.

96. Gaidano G. Protooncogenes and tumor suppressor genes. In: Knowles DM ed. Neoplastic hemapathology. Baltimore: Williams&Wilkins, 1992:245-61.
97. Baumann I, Niemeyer C, Benett J. Childhood myelodysplastic syndrome. In: Swerdlow S, Campo E, Harris N. WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid tissues. Lyon: IARC Press. 2008:104-7.
98. Maciejewski JP, Selleri C. Evolution of clonal cytogenetic abnormalities in aplastic anemia. Leuk Lymphoma. 2004;45(3):433-40.
99. Alberts B, Brag D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Molecular Biology of the celi. 3rd Ed, Garland Publishing, Inc, NewYork, 1994;p164.
100. Jacobs PA, Hassold T. Chromosome abnormalities: origin and etiology in abortions and livebirths. In: Vogel F, Sperling K, eds. Human Genetics. Berlin: Springer-Verlag. 1987;233-44.
101. Başaran N. Tıbbi Genetik. Güneş&Nobel Tıp Kitabevi. 2003.
102. Ganem NJ, Storchova Z, Pellman D. Tetraploidy, aneuploidy and cancer. Curr Opin Genet Dev. 2007;17:157-62.
103. Storchova Z, Kuffer C. The consequences of tetraploidy and aneuploidy. J Cell Sci. 2008;121:3859-66.
104. Naylor RM, van Deursen JM. Aneuploidy in cancer and aging. Annu Rev Genet. 2016;50:45-6.
105. Vaz N, Shyama SK. Numerical chromosomal abnormalities in the malformed new borns. International Journal of Human Genetics. 2005;5:237-40.
106. Strachan T, Read AP. Human Molecular Genetics BIOS Scientific Publishers Limited. 1996;p596.
107. Aytan M. Digeorge Sendromu ve Konotrunkal Kalp Anomalili Olgularda 22q11.2 Bandındaki Mikrodelesyonların Fluoresan In Situ Hibridizasyon Tekniği ile Araştırılması. 1997, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 97 sayfa, İstanbul, (Danışman: Prof. Dr. Seher Başaran)
108. Foerster J, Lukens J, Pareskeras F, Greer JP, Rodgers GM. Wintrobe's Clinical Hematology. Lee GR (ed). 10th ed. Baltimore: WilliamsWilkins Com. 1999;p2763.

109. Zamani AG. Genetik tanı yöntemleri. Türk Toraks Derneği 10. Yıllık Kongresi, Kurs kitabı, Antalya 2007:143-61.
110. Evke E. Çeşitli lösemi tiplerinde tedavi öncesi ve sonrasında kromozom analizlerinin GTG bantlama tekniği ve ABL-BCR füzyon gen ekspresyonunun RTPCR yöntemi ile tespiti. Doktora tezi. Uludağ Üniversitesi, 2003 (Danışman: Prof. Dr. Ünal Egeli)
111. Altunbaşak, A. Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi bünyesinde kemoterapi tedavisi gören lösemi hastalarında G-bantlama metodu ile sitogenetik analizler (Master's thesis, Sağlık Bilimleri Enstitüsü 2006 (Danışman: Yrd. Doç. Dr. Efkân Uz)
112. Shaffer LG, Tommerup N. ISCN 2005: an international system for human cytogenetic nomenclature (2005): recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. Karger Medical and Scientific Publishers.
113. Çankaya T, Gündüz C, Özkınay F, Coğulu Ö, Sağol S, Özkınay C. İnterfaz hücrelerinde flüoresan in-situ hibridizasyon yöntemi ile anöploidi aranması. Ege Tıp Dergisi. 2006;45(3):149-54.
114. Durak B, Aslan V, Başaran N, Gülbaş Z. t(8;21)'in Saptanmasında FISH Yönteminin Konvansiyonel Sitogenetik Yöntemle Karşılaştırılması. Türk Hematoloji Derneği 29. Ulusal Kongresi 25-29 Ekim 2002, Kemer-Antalya. Turkish Journal of Haematology. 2002;19(3):121.
115. Özdemir, G. Çocuklarda miyelodisplastik sendrom. Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi. 2021;4(2):75-80.
116. Cytocell Oncology and Constitutional FISH Probe Catalogue. 2011/2012;p22.
117. Cytocell Oncology and Constitutional FISH Probe Catalogue. 2011/2012;p14.
118. Erdoğan Özunal I, Elverdi T, Salihoğlu A, et al. Genetic features and TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia. Cerrahpasa Med J. 2021;45:221-6.
doi: 10.5152/cjm.2021.21021

119. Cytocell Oncology and Constitutional FISH Probe Catalogue. 2011/2012;p4.
120. Cytocell Oncology and Constitutional FISH Probe Catalogue. 2011/2012;p30.
121. James W Vardiman. The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: An overview with emphasis on the myeloid neoplasms. *Chemico-Biological Interactions*. 2010;184:16-20.
122. Bayani J, Squire JA. Fluorescence in situ Hybridization (FISH). *Curr Protoc Cell Biol* 2004 Chapter 22.
doi: 10.1002/0471143030.cb2204s23.
123. Kurzrock R, Talpaz M. *Molecular Biology in Cancer Medicine*. Martin Dunitz Ltd. 1999;p1123.
124. Cox MC, Panetta P, Venditti A, Del Poeta G, Franchi A, Buccisano F, Tamburini A, Maurillo L, Amadori S. Comparison Between Conventional Banding Analysis and FISH Screening with an AML Specific Set of Probes in 260 Patients. *The Hematology Journal*. 2003;4:263-70.
125. Güran Ş, Beyan C, Tunca Y, Kozan S, Torun D, Ifran A, Bahçe M. Miyelodisplastik sendrom olgularında sitogenetik analiz sonuçlarının hasta prognozuna etkisi. *Gulhane Medical Journal*. 2011;53:104-6.
126. Hoffmen R, Benz JE, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, Mcglave P. *Hematology Basic Principles and Practice* 2005. Elsevir Inc. Edition 928-1253.
127. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hann I, Stevens R, Burnett A, Goldstone A. The Importance of Diagnostic Cytogenetics on Outcome in AML *J Mol Diagn*. 2004;6(1):22-7.
128. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997;89:2079-88.
129. Bernasconi P, Alessandrino EP, Boni M, et al. Karyotype in myelodysplastic syndromes: relations to morphology, clinical evolution, and survival. *Am J Hematol*. 1994;46:270-7.

- 130.** Pozdnyakova O, Miron PM, Tang G, et al. Cytogenetic abnormalities in a series of 1,029 patients with primary myelodysplastic syndromes: a report from the US with a focus on some undefined single chromosomal abnormalities. *Cancer*. 2008;113:3331-40.
- 131.** Yiğit A, Uz E, Yılmaz H, Yiğit B, Alanoğlu E, Ayata A, Koşar P. Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi bünyesinde kemoterapi tedavisi gören lösemi vakalarında G-Bantlama metodu ile sitogenetik analizler. *Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2010;1(1):1-6.
- 132.** Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine* 2000;343:1910-6.
- 133.** Lai YY, Huang XJ. Cytogenetic characteristics of B cell chronic lymphocytic leukemia in 275 Chinese patients by fluorescence in situ hybridization: a multicenter study. *Chinese medical journal*. 2011;124:2417-22.
- 134.** Kosary CL, Ries LAG, Miller BA, Hankey BF, Edwards BK. SEER cancer statistics review, 1973-1992: tables and graphs. Bethesda, Md: National Cancer Institute, 1995.
- 135.** Druker BJ, Lydon NB: Lesson learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronin myelogeneous leukemia. *J Clin Invest*. 2000;105:3-7.
- 136.** Manola KN. Cytogenetics of pediatric acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol*. 2009;83:391-405.
- 137.** Hasserjian RP. Acute Myeloid Leukemia: Advances in Diagnosis and Classification. *Int J Lab Hematol*. 2013;35:358-66.
- 138.** Yürür-Kutlay N, Tuncalı T, Karabulut HG, Sadeghi F, Akalın İ, Sağlam B, Tükün A. Akut Miyeloid Lösemide Kromozomal Anomaliler: Tek Merkezden 417 Olgunun Sitogenetik Sonuçları. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* 2017;70(1).

- 139.** Kansal R. Acute myeloid leukemia in the era of precision medicine: recent advances in diagnostic classification and risk stratification. *Cancer Biol Med.* 2016;13:41-54.
doi: 10.28092/j.issn.2095-3941.2016.0001
- 140.** National Cancer Institute. Cancer Genome Anatomy Project. Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer. <https://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/AbnCytSearch> Form Trends Genet. 2000;16(3):103-6.
doi: 10.1016/s0168-9525(99)01937-x.
- 141.** Nevruz O, Güran Ş, Beyan C, Ifran A, Tunca Y, Kaptan MK, Ural AU. Kronik miyelositer lösemi dışı kronik miyeloproliferatif hastalığı olan olgularımızda sitogenetik inceleme sonuçları. *Gülhane Tıp Dergisi.* 2005;47(1):11-3.
- 142.** Haim. S, Mitelman F. Chronic myeloid leukemia. In: Haim S, Mitelman F. *Cancer Cytogenetics.* 2nd Ed. Wiley Liss Inc. New York 1995;p33-68.
- 143.** Zamora L, Espinet B, Florensa L, Besses C, Woessner S, Serrano S, Sole. Is fluorescence in situ hybridization a useful method in diagnosis of polycythemia vera patients? *Cancer Genetics and Cytogenetics.* 2004;151:139-45.
- 144.** Atilla FD, Şahin F, Saydam G. Yaşlı Hastada Kronik Miyeloid Lösemi Dışı Kronik Miyeloproliferatif Hastalıklar. Nalçacı M, editör. *Hematolojide Geriatrik Yaklaşım. Türkiye Klinikleri.* 2018;p31-7.
- 145.** Liu RS, Liu HC, Bu JQ, Dong SN. Burkitt's Lymphoma Presenting With Jaw Lesions. *J Periodontol.* 2000;71:646-9.
- 146.** Benzer ES, Demir S, Bilir G, Akçay EY, Arabacı İE. Klasik hodgkin lenfomalarında ebv-imp 1 ekspresyonunun histopatolojik subtiplere göre dağılımı. *Ege Tıp Dergisi.* 2006;45(1):1-4.

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Lütfiye Gül	Soyadı	Çalışkan
Doğum Yeri		Doğum Tarihi	
Uyruğu	T.C.	GSM	
E-posta			

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurum	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Tezli Yüksek Lisans	Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	2016
Tezsiz Yüksek Lisans		
Lisans	Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2004

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)

Yabancı Dil Sınavı Notu								
KPDS/ÜDS/YDS	YÖKDİL	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
68,75								

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	74,89	79,02	72,98
(Diğer) Puanı			

10.EKLER

10.1. ETİK KURUL ONAYI

DİCLE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU DİCLE UNIVERSITY MEDICAL FACULTY ETHICS COMMITTEE FOR NONINTERVENTIONAL STUDIES					
379					
KARAR					
Prof. Dr. Mahmut BALKAN, Lütfe Gül ÇALIŞKAN isimli araştırmacılar tarafından planlanan "2007-2020 tarihleri arasında kemik iliği taraması yapılan hastaların kromozom analiz sonuçlarının değerlendirilmesi" başlıklı araştırmaya <i>Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul'u</i> tarafından toplantıda hazır bulunan üyeler tarafından oy birliği ile onay verilmiştir. Klinik araştırma tamamlanıp yayın aşamasına geldiğinde, yayına sunulan bildiri veya makalenin bir örneğinin Etik Kurul'a verilmesi zorunludur.					
DECISION					
The project titled as "Evaluation of chromosom analysis results of patients who underwent bone marrow screening between 2007-2020" planned by Mahmut BALKAN, Lütfe Gül ÇALIŞKAN has been approved by Ethics Committee of Dicle University Faculty of Medicine.					
Oturum No (Meeting number):		Tarih (Date): 25.03.2021		Saat (Hour): 14:00-17:00	
KURUL BAŞKANI (CHIEF)		Prof. Dr. Meral ERDİNÇ			
KURUL ÜYELERİ/ MEMBERS					
	ÜNVANI	ADI-SOYADI	KURUMU	BRANŞI	İMZA
1	Prof. Dr.	Meral ERDİNÇ	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Tıbbi Farmakoloji	
2	Prof. Dr.	Zeynep BAYSAL YILDIRIM	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	
3	Prof. Dr.	Zülfükar YILMAZ	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	İç Hastalıkları	
4	Doç. Dr.	M. Veysi BAHADIR	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Genel Cerrahi	
5	Doç. Dr.	İbrahim KAPLAN	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Tıbbi Biyokimya	
6	Dr. Öğretim Üyesi	İsmail YILDIZ	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Biyoistatistik	
7	Dr. Öğretim Üyesi	Diclehan ORAL	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Tıbbi Biyoloji	
8	Dr. Öğretim Üyesi	Gülşay AYDOĞDU	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Tıbbi Patoloji	
9	Dr. Öğretim Üyesi	Muhammed Akif DENİZ	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Radyoloji	
10	Avukat	Ronay TEKALP	Dicle Üniversitesi Hastaneleri	Hukuk İşleri Birimi	

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası Zemin Kat 21280 Kampüs/DİYARBAKIR
Telefon:+90.412 . 248 80 01-16/4631 Faks:+90.412. 248 84 40 kuruletikdiyar@gmail.com

10.2. MAKALE

31.05.2022

Ege Tıp Bilimleri Dergisi

İlgili makama

Lütfiye Gül ÇALIŞKAN, Mahmut BALKAN, Selahattin TEKEŞ, Diclehan ORAL, Mahir BİNİCİ, İlyas YÜCEL adlı yazarlar tarafından dergimize gönderilen "HEMATOLOJİK KANSER TANILI HASTALARIN KEMİK İLİĞİ ÖRNEKLERİNDEKİ KROMOZOMAL ANOMALİLER: TEK MERKEZDEN 109 OLGUNUN FISH SONUÇLARI" başlıklı tez çalışması orijinal makale kapsamında, "https://doi.org/10.33713/egetbd.1118486" DOI numarası ile 31.05.2022 tarihinde yayına kabul edilmiştir.

Aegean Journal of Medical Sciences

BAŞ EDITÖR

Yavuz KARAHAN

Uşak Üniversitesi Tıp Fakültesi

Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon AD

Doç. Dr. Alt

10.3. İNTİHAL RAPORU

Lütfiye Gül Çalışkan Doktora tezi

ORJİNALLIK RAPORU

%**14**
BENZERLİK ENDEKSİ

%**14**
İNTERNET KAYNAKLARI

%**4**
YAYINLAR

%**3**
ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRENCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%5
2	acikerisim.dicle.edu.tr İnternet Kaynağı	%2
3	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	%1
4	9lib.net İnternet Kaynağı	%1
5	hdl.handle.net İnternet Kaynağı	%1
6	Submitted to Dicle University Öğrenci Ödevi	<%1
7	openaccess.ogu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
8	drfevzialtuntas.com İnternet Kaynağı	<%1
9	www.scribd.com İnternet Kaynağı	<%1

10.4. ORJİNALLİK BEYANI

