

**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**PHILADELPHIA POZİTİF KRONİK MİYELOSİTER LÖSEMİLİ
OLGULARDA *ASS* GEN BÖLGESİ YENİDEN
DÜZENLENMELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUBA MUTLU

DANIŞMAN

YRD. DOĐ. DR. BEYHAN DURAK ARAS

HAZİRAN 2011

KABUL VE ONAY SAYFASI

Tuba MUTLU' nun Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "*Philadelphia Pozitif Kronik Miyelositer Lösemili Olgularda ASS Gen Bölgesi Yeniden Düzenlenmelerinin Araştırılması*" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "**KABUL**" edilmiştir.

07.06.2011

Üye: Prof.Dr. Sevilhan ARTAN

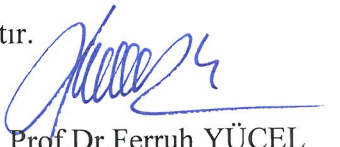
Üye: Doç.Dr. Olga Meltem AKAY

Üye: Yrd.Doç.Dr. Muhsin ÖZDEMİR

Üye: Yrd.Doç.Dr. Beyhan DURAK ARAS (Danışman)

Üye: Yrd.Doç.Dr. Oğuz ÇİLİNGİR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 16./06/2011.. tarih ve 879./4058 sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof.Dr.Ferruh YÜCEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Giriş: Klonal myeloproliferatif bir hastalık olan kronik myeloid lösemi (KML), sitogenetik olarak 9. ve 22. kromozomlar arasındaki translokasyon ile karakterizedir. Philadelphia pozitif (Ph⁺) KML olgularının %10-15'inde yeniden düzenlenme sonucu oluşan der(9) kırık noktası olan *ASS* (9q34) gen bölgesinde büyük submikroskopik delesyonlar bildirilmiştir. Prognostik önemi tartışmalı olan *ASS* (9q34) delesyonları, klasik kemoterapi ve IFN-alfa tedavisi alan olgularda düşük oranda tedavi yanıtı ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Imatinib kullanımı sonrası literatürde yer alan az sayıdaki çalışmada olgular geç kronik fazda değerlendirilmiştir. Bu çalışmalarda *ASS* delesyonlarının prognostik önemine ait çelişkili sonuçlar elde edilmiş olmakla birlikte erken kronik faz KML olgularına ait yeterli veri mevcut değildir.

Amaç: Çalışmamızda Ph⁺ KML olgularında *ASS* gen bölgesi delesyon oranının saptanması ve prognostik etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler: Çalışmamıza 2001-2010 arasında KML tanısı almış ve Ph kromozomu tanımlanmış yaş dağılımı 22-66 arasında olan toplam 30 olgu dahil edildi. Olguların 23'ü yeni tanı aşamasında çalışmaya alınmış olup 22'sine imatinib, 1'ine hidroksiüre tedavisi verilmiştir. Kalan 7 olgu takip aşamasında çalışmaya alınmış 6'sına imatinib, 1'ine hidroksiüre tedavisi verilmiştir. *ASS* (9q34) delesyonu saptanması için LSI 9q34 probu kullanılarak FISH analizi yapılmıştır. Çalışmaya dahil edilen olgularda 3.ayda hematolojik yanıt, 12. ayda sitogenetik yanıt ve 18. ayda moleküler yanıt değerlendirilmiştir.

Bulgular: Yapılan FISH analizleri sonucu 30 Ph⁺ KML olgusunun 11'inde (%36.6) *ASS* delesyonu saptanmıştır. *ASS* delesyonu saptanan 11 hastanın 10'unda (10/11) hematolojik yanıt saptanmış fakat bu 11 hastanın 6'sında (6/11) sitogenetik/moleküler sitogenetik yanıt saptanmamıştır. *ASS* delesyonu saptanmayan 19 (19/30) hastadan 12.ayını tamamlayan 16 hastanın 13'ünde sitogenetik yanıt, 11'inde de moleküler yanıt görülmüştür.

Sonuç: Çalışmamız sonucunda *ASS* delesyonu bulunan olgularımızda sitogenetik yanıt oranımızın daha düşük olduğu izlenmiştir.

Anahtar kelimeler: KML, *ASS* delesyonu, FISH.

SUMMARY

Background: Chronic myeloid leukemia (CML) is a clonal myeloproliferative disorder characterized by presence of Philadelphia chromosome (Ph), resulting translocation between chromosome 9 and 22. Large, submicroscopic deletions have been reported the breakpoint of *ASS* (9q34) gene region on rearranged der(9) in %10-15 of patient with (Ph⁺) CML. *ASS* (9q34) deletions have been associated with lower response rates and with adverse outcome in CML treated patients with conventional chemotherapy and interferon alfa (IFN- α). In studies following the usage of imatinib a few reported cases were evaluated at the chronic phase. In these studies, contradictory results were obtained about the importance of *ASS* (9q34) deletions yet not enough information were available regarding early chronic phase of CML cases.

Aim: Detecting deletion of *ASS* (9q34) gene region rates and its prognostic effects.

Material and methods: In our study, 30 patients with Ph⁺ CML were included between 2001-2010. Patient age is between 22-66. Twenty three of thirty patients are pretreatment; 22 of 23 patients were treated with imatinib and 1 of 23 patients was treated with hydroxyurea. 7 of 30 CML patients were being followed-up, 6 of 7 patients were treated with imatinib and 1 of the cases treated with hydroxyurea. FISH analysis was performed for detection of *ASS* (9q34) deletions LSI 9q34 probe were used. Hematologic response at the end of 3rd month, cytogenetic response at the end of 12th month and molecular response at the end of 18th month after initiation of treatment were evaluated in the cases.

Findings: *ASS* (9q34) deletions were detected in 11 of 30 Ph⁺ CML patients in FISH analysis. Among cases who had *ASS* (9q34) deletions (n:11), 10 of them showed hematological response but 6 of them didn't have cytogenetic/molecular response. 19 of 30 patients were found not having *ASS* (9q34) deletion. Among 16 patients who completed 12 months, 13 of them had cytogenetic response and 11 had molecular response.

Results: In our study, lower cytogenetic response rates were detected in *ASS* (9q34) deleted cases.

Keywords: CML, *ASS* deletion, FISH.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	v
SUMMARY.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Kanser.....	2
2.2. Hematopoez (Kan Hücrelerinin Yapımı).....	2
2.3. Lösemiler	3
2.3.1. Kronik Miyeloid Lösemi.....	4
2.3.1.1. KML' nin Etiyolojisi.....	6
2.3.1.2. KML Genetiğinin Tarihçesi.....	7
2.3.1.3. BCR-ABL Translokasyonunun Moleküler Anatomisi	7
2.3.1.4. BCR-ABL Aracılı Malign Transformasyon.....	10
2.3.1.5. ASS Gen Bölgesi.....	11
2.3.1.6. Varyant Ph Kromozomu.....	14
2.3.1.7. KML' de Tedavi.....	15
2.4. Hematolojik Malignansilerde Sitogenetik ve Moleküler Sitogenetik Analiz.....	16
2.4.1. Hematolojik Malignansilerde Sitogenetik Analizler.....	16
2.4.2. Hematolojik Malignansilerde Moleküler Sitogenetik Analizler.....	17
2.4.3. FISH Tekniğinde Kullanılan Problar ve Özellikleri.....	17
2.4.4. FISH Tekniğinin Temel Mekanizması.....	18
2.4.5. FISH Tekniğinin Kullanım Alanları.....	18
2.4.6. FISH Tekniğinin Avantajları ve Dezavantajları.....	19

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	20
3.1. Gereç.....	20
3.1.1. Araştırma Grubu	20
3.1.2. Kullanılan Aygıtlar	20
3.1.3. Cam Malzeme.....	21
3.1.4. Kimyasal Maddeler.....	21
3.1.5. Kullanılan Problar	22
3.2. Yöntem.....	22
3.2.1. Materyal Alımı.....	22
3.2.2. Sitogenetik Analiz.....	23
3.2.2.1. Preparatların Boyanması.....	24
3.2.3. Moleküler Sitogenetik Analiz.....	25
3.2.3.1. FISH Tekniğinin Uygulanması.....	25
3.2.3.1.1. Preparatların Ön Yıkaması ve Denatüre Edilmesi .25	
3.2.3.1.2. Prob Denatüre Edilme Aşamaları.....	26
3.2.3.1.3. Hibridizasyon Aşamaları.....	26
3.2.3.1.4. Hibridizasyon Sonrası Yıkama İşlemi.....	26
3.2.3.1.5. Hibridize Olan Bölgelerin Görülür Hale Getirilmesi.....	27
3.2.3.1.6. Hazırlanan Preparatların Mikroskopta İncelenmesi.....	27
3.2.3.1.7. Değerlendirme.....	27
3.3. Kullanılan Stok Solüsyonlar	28
4. BULGULAR.....	31
4.1. Olgularımızın Demografik Bulguları.....	31
4.2. Kronik Miyelositer Lösemi Tanısı Alan Olgularda Klasik Sitogenetik Analiz Verileri.....	32
4.3. Kronik Miyelositer Lösemi Tanısı Alan Olgularda FISH Analiz Verileri..	33
4.3.1. Philadelphia Kromozomunun Belirlenmesine Yönelik Yapılan FISH Analizi.....	33
4.3.2. ASS Gen Bölgesi Delesyonuna İlişkin FISH Bulguları.....	33

4.4. Çalışmaya Dahil Edilen Olgulara Ait Hematolojik, Klasik Sitogenetik/Moleküler Sitogenetik ve Moleküler Yanıt Bilgileri ve ASS (9q34) Delesyonu İle İlişkileri.....	34
5. TARTIŞMA.....	42
5.1. Olguların ASS (9q34) Gen Bölgesi Yeniden Düzenlenmesine Ait Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	42
5.2. Olgulara Ait Hematolojik, Klasik Sitogenetik/Moleküler Sitogenetik ve Moleküler Yanıt Bilgilerinin ASS (9q34) Delesyonu İle İlişkisinin Değerlendirilmesi.....	48
5.3. İlave Anomali Belirlenen Olgularda ASS (9q34) Gen Bölgesi Yeniden Düzenlenmesine Ait Sonuçlarının Değerlendirilmesi	52
5.4. Varyant Ph Belirlenen Olgularda ASS (9q34) Gen Bölgesi Yeniden Düzenlenmesine Ait Değerlendirilmesi.....	53
6. SONUÇ.....	55
7. KAYNAKLAR DİZİNİ	56
ÖZGEÇMİŞ	

TABLULAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 2.1. Hematolojik malignansilerin sınıflandırılması (FAB 1999).....	3
Tablo 2.2. Kronik miyeloproliferatif hastalıkların sınıflandırılması (FAB 1999)..	4
Tablo 2.3. KML' nin tarihçesi.....	7
Tablo 2.4. Hematolojik, sitogenetik ve moleküler yanıt kriterleri.....	16
Tablo 3.1. Hipotonik solüsyon (0.075 M).....	28
Tablo 3.2. Carnoy's Fiksatif solüsyonu.....	28
Tablo 3.3. GTG bantlama solüsyonları.....	28
Tablo 3.4. Preparatların ön yıkama solüsyonları.....	29
Tablo 3.5. Preparatların denatürasyon solüsyonu.....	30
Tablo 3.6. Hibridizasyon sonrası solüsyonlar.....	30
Tablo 3.7. Görüntüleme solüsyonları.....	30
Tablo 4.1. Hastaların cinsiyetlerine göre dağılımı.....	31
Tablo 4.2. Hastaların aldığı tedaviler	32
Tablo 4.3. Olgulara ilişkin takip ve FISH sonuçları.....	35
Tablo 5.1. Philadelphia pozitif KML olgularında ASS (9q34) gen bölgesi delesyonlarına ait verilerin literatür bilgileriyle karşılaştırılması...	47
Tablo 5.2. Varyant Ph olarak belirlenen KML olgularında ASS (9q34) gen bölgesi delesyonlarına ait verilerin literatür bilgileriyle karşılaştırılması.....	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. KML'de t(9;22) translokasyonu.....	9
Şekil 2.2. BCR-ABL'nin etkilediği sinyal iletim yolları.....	10
Şekil 2.3. ASS delesyonlarının belirlenmesi için mevcut ticari problemler.....	11
Şekil 2.4 Philadelphia translokasyonu ve ASS delesyonlarını belirleyen FISH sistemi.....	13
Şekil 2.5. One step varyant Philadelphia translokasyonu oluşum mekanizması..	15
Şekil 2.6. Two step varyant Philadelphia translokasyonu oluşum mekanizması...	15
Şekil 4.1. Philadelphia pozitif bir olgunun karyotip görüntüsü.....	39
Şekil 4.2. Philadelphia pozitif metafaz FISH görüntüsü.....	39
Şekil 4.3. Philadelphia pozitif interfaz FISH görüntüsü	40
Şekil 4.4. Varyant Ph translokasyonu saptanan bir olgunun karyotip görüntüsü...	40
Şekil. 4.5. ASS (9q34) delesyonu saptanan bir olgunun FISH görüntüsü.....	41

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
µl	Mikrolitre
ABL	Abelson geni
AKHN	Allogenic Kök Hücre Nakli
ALL	Akut Lenfoblastik Lösemi
AML	Akut Miyeloid Lösemi
ASS	Arginino Succinate Synthetase
BCR	Breakpoint Cluster Region
BCR/ABL	Füzyon geni
°C	Santigrat
DAPI	4,6-Diamino-2-fenil-indol
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
FAB	French-American-British
FISH	Floresan In Situ Hibridizasyon
GTG	Giemsa-Tyripsin-Giemsa
HRB	High Resolution Banding
IFN-α	Interferon α
Kb	Kilobaz
KML	Kronik Miyeloid Lösemi
M	Mol
(MAP) kinazlar	Mitogen Aktivated Protein Kinazlar
Mb	Megabaz
ml	mililitre
mRNA	messenger RNA
Ph	Philadelphia kromozomu
Ph+	Philadelphia kromozomu pozitif
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase

PDF Eraser Free

Ph++

Rpm

RT-Q-PCR

SSC

STAT

İlave Philadelphia kromozomu

Bir dakikadaki devir sayısı (Rotation per minute)

Real Time Polymerase Chain Reaction

NaCl₇ Trisodyum Sitrat

Signal Transducers Activators of Transcription

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik miyelositer lösemi (KML), Ph (Philadephia) kromozomu ile karakterize olan klonal hematopoetik bir kök hücre hastalığıdır ve tüm lösemilerin %14'ünü, erişkin lösemilerin ise %20'lik kısmını oluşturmaktadır. İnsidansı 1.6/100.000'dir. Erkeklerde daha sık (E/K: 1.4/1) görülür. Bu hastalıkta malign transformasyon, 9 ve 22 numaralı kromozomların uzun kollarında lokalize *ABL* ve *BCR* genlerinin anormal yerleşimi ile sonuçlanan t(9;22)(q34;q11) oluşumu ile meydana gelir. Sonuçta ortaya çıkan *BCR-ABL* füzyon proteini, birçok sinyal yolağının aktivasyonuna sebep olan yapısal bir protein olan tirozin kinazı kodlar ve böylece artmış bir tirozin kinaz aktivitesi meydana gelir (11, 34, 59). Kronik miyelositer lösemi durağan olarak seyredebileceği gibi bifazik ve trifazik olarak da ilerleyebilir. Genellikle bu hastalık kronik fazda tanı alır (34, 62).

Kronik miyelositer lösemi tedavisinde ve prognozunda, 1960 yılında Ph kromozomunun keşfedilmesiyle anlamlı değişiklikler kaydedilmiştir. Klasik tedaviye (bisulfan, hidroksiüre gibi) ek olarak bir tirozin kinaz inhibitörü olan imatinib de tedavi seçenekleri arasına girmiş ve hedeflenmiş tedavide yeni bir çığır açmıştır (27).

Son zamanlarda Ph pozitif (Ph⁺) KML olgularında yapılan çalışmalarda derivatif kromozom 9'da saptanan delesyonlar adeta prognostik bir marker olarak ifade edilmektedir. Farklı tedavi modellerine tabi tutulan KML hastalarında kötü prognozla ilişkilendirildiği görülmektedir (10).

Çalışmamızda Ph⁺ KML olgularında, *ASS* (9q34) gen bölgesi delesyonlarının klasik sitogenetik ve FISH yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Derivatif 9 kırık noktası olan *ASS* gen bölgesi kayıplarının tedaviye yanıt, remisyona girme süresi, relaps ile ilişkisi araştırılarak prognostik değeri belirlenmeye çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser; ölüm nedeni olarak, kalp ve damar hastalıklarının hemen ardından gelmesi sebebiyle önemli bir sağlık ve yaşam sorunudur. Yaş ilerlemesiyle birlikte kanser sıklığı daha da artmaktadır. Kanser tedavi harcamaları, toplam sağlık harcamalarının büyük bir bölümünü oluşturmaktadır (54).

Yaşamın ve canlılığın en temel birimi olan hücrenin, iç ve dış çevresiyle haberleşmesini sağlayan sinyal iletimi; normal hücrelerde sınırlı ve kontrollü bölünmeyi sağlarken, kanser hücrelerinde kontrolsüz bölünme ve büyümeye neden olur (46).

2.2. Hematopoez (Kan Hücrelerinin Yapımı)

Hematopoetik kök hücrelerin malign neoplazmi olan lösemilerde, kemik iliği yaygın olarak neoplastik hücreler ile dolar. Çoğu vakada, çok sayıda lösemik hücre kana yayılmıştır. Her ne kadar periferik kanda çok sayıda anormal hücrenin varlığı lösemisinin en belirgin sonucu olsa da, bu hastalıktaki asıl sorun kemik iliğinden kaynaklanmaktadır (42).

Tüm kan hücreleri, kemik iliğindeki ilkel bir pluripotent kök hücresinden köken almaktadır. Pluripotent kök hücresi farklılaşarak lenfoid kök hücrelerini ve multipotent hematopoetik hücreleri oluşturur. Lenfoid kök hücreleri farklılaşarak B ve T lenfoidleri oluştururken; multipotent hematopoetik kök hücreleri de farklılaşarak, eritrosit, granülosit, monositik ve megakaryositik hücreleri meydana getirirler (22, 42, 72).

2.3. Lösemiler

Yunanca beyaz anlamına gelen “leukos” ve kan anlamına gelen “haima” sözcüklerinin bir araya gelmesiyle “leukemia“ terimi oluşmuştur (75).

Lösemiler, kan hücrelerinin sınırsız ve kontrolsüz bir şekilde bölünüp çoğalması sonucu meydana gelen klonal malign neoplazik hastalıklardır. Aşırı çoğalıp farklılaşamayan lökositler, başta kemik iliği olmak üzere karaciğer, lenf bezleri, dalak, deri, testis ve merkezi sinir sistemi gibi organ ve sistemlerde üretilebilir. Tam anlamıyla farklılaşmamış ve kendi kendini yenileyemeyen hücreler ‘blast’ adını almaktadır. Lösemilerin kendi içindeki alt sınıflamalarında bu blastların oranı ve yapısı dikkate alınmaktadır (21).

Lösemiler, köken aldıkları hücre grubuna göre myeloid ve lenfoid lösemiler olarak iki sınıfa ayrılır. Bu iki sınıf da hastalığın semptomlarına, ortaya çıkış, ilerleme hızlarına ve klinik seyirlerine göre akut ve kronik lösemiler olmak üzere iki alt gruba ayrılır. Akut lösemiler ya farklılaşmamış ya da çok az farklılaşmış immatür hücreler ile karakterize ve ölümcül olan lösemilerdir. Buna karşın kronik lösemiler ileri düzeyde farklılaşmış hücreler ile karakterizedir (3, 20).

Hematolojik malignansilerin 1999 yılında yayınlanan FAB sınıflandırılması Tablo 2.1. ve Tablo 2.2.’de görülmektedir.

Tablo 2.1. Hematolojik malignansilerin sınıflandırılması (FAB 1999) (33)

Kronik miyeloproliferatif hastalıklar
Miyelodisplastik Sendromlar
Akut miyeloid lösemiler

Tablo 2.2. Kronik miyeloproliferatif hastalıkların sınıflandırılması (FAB 1999) (33)

Kronik miyelositer lösemi (KML)
Miyelofibrosizli agnojenik miyeloid metaplazya (MF) (Idiyopatik miyelofibrosiz)
Polisitemi vera (EV)
Esansiyel trombositemi (ET)

2.3.1. Kronik Miyeloid Lösemi

Klonal myeloproliferatif bir hastalık olan kronik myeloid lösemi (KML), kemik iliğinde aşırı myeloid hiperplazi, periferik kanda olgun myeloid hücrelerden oluşan yüksek lökosit sayısı ve splenomegali ile kendini gösterir. Akut lösemide varolan patolojik durumun aksine, lökosit sayısının yüksek olmasına karşın lösemi hücreleri farklılaşma yeteneklerini kaybetmemişlerdir (1, 29).

KML hastalarının %90-95'inde Philadelphia kromozomu görülmektedir. Kronik miyelositer lösemide 22. kromozomun q11 bandındaki *BCR* geni ile 9. kromozom q34 bandına lokalize *ABL* geninin füzyonu sonucu derivatif kromozom 22'de *BCR-ABL* füzyon geni oluşur ve bu genin ürünü olan p210 proteini, tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. Hastaların %90'ı kronik evrede KML tanısı alır. Hastalığın 3 evresi vardır (59, 71).

1. Kronik evre (% 90)
2. Akselere (hızlanmış) evre (%50)
3. Blastik evre (%30)

Kronik faz

Prelösemi olarak düşünölen bu faz immatür miyeloid hücrelerin, kemik iliği ve periferik kandaki matür granüositlerin aşırı üretimi ile karakterizedir. Hematopoetik alanlarda farklılaşma yeteneğini kaybetmemiş pluripotent kök hücrelerinde Ph⁺ lösemi klonunun aşırı artışı görülür. Bu evrede splenomegali, iştahsızlık, kilo kaybı, anemi ve halsizlik görölen belli başlı semptomlar arasındadır (59).

Akselere faz

Blastik faza geçiş ani veya yavaş olabilir. Genellikle fazın blastik faza ilerlemesi hastalığın teşhisinden sonraki ilk 2 yıl % 5 ve sonraki yıllarda ise % 20-25'tir. Periferik kandaki blast oranı % 5-30, kemik iliğinde ise bu oran % 10-30 arasındadır. Bu bulgular kronik faz ve blastik kriz arasındaki bir dönem olan akselere faza geçişin habercisidir (59).

Blastik faz

Blastik kriz blastların miyeloid, lenfoid, eritroid olarak farklılaşmamış olduğu akut bir lösemidir. Bu evre yeni kromozomal anomalileri içerdiği için direkt olarak genomik instabilite ile ilişkilidir. Translokasyon sonucu oluşun *BCR-ABL* füzyon proteininin hücrenel aktivitesi; çok sayıda efektör protein yoluyla, gen transkripsiyonunun aktivasyonunu veya baskılanmasını, apoptoz yanıtının mitokondrial işlevini, hücre iskeletinin organizasyonu ve inhibitör proteinlerin bozulması sonucunda onkogenik sinyallerin oluşması gibi birçok olayı tetikler.

Etkileşimde anahtar rol oynayan yolaklar *RAS*, *MAP* kinazlar, *STAT*, *Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)*, ve *MYC* olarak sayılabilir. Bu yolaklar KML' nin seyrini kronik fazdan kötü prognoza götürebilir. Oluşan *BCR-ABL* füzyon geni tirozin kinaz aktivasyonunu artırır ve DNA hasarının tamiri güçleşir. Apoptozisi durduran genler devreye girerek hücrede oksidatif hasara neden olur. Genetik instabilite kromozomal bozukluklara, mutasyonlara, gen ekspresyonundaki değişikliklere ve progresyon özelliğine zemin hazırlamaktadır (62).

Blastik fazdaki vakaların %80'inde Ph^+ hücrelere ek olarak kromozomal düzensizlikler görülmektedir. En yaygın olan kromozomal değişiklikler, ilave bir *Ph* kromozomu, trizomi 8, 17. kromozomun uzun kolunun izokromozomu, trizomi 19, trizomi 21 ve monozomi 7'dir (11, 45, 62).

Vakaların % 20'sinde izokromozom 17q görülmektedir. İzokromozom 17q, bu kromozoma lokalize tümör baskılayıcı bir gen olan *P53* geninin tek kopyasının kaybına sebep olur. Bu genin inaktivasyonunun hastalığın blastik fazındaki progresyonu ile bağlantısı yeterince açık değildir (32).

Kronik miyelositer lösemi olgularında, özellikle blastik fazda olguların büyük bir kısmında ilave bir *Ph* kromozomu görülmektedir. Bunun sebebi, KML olgularında 22. kromozomun *BCR* bölgesinin 5' uçtan kırılarak oluşan birinci *Ph* kromozomunun duplikasyonu ile ya da 3' uçtan kırılarak oluşan ilave bir translokasyon ve izokromozom oluşumudur. Blastik fazda görülen bu düzensizliklerin, hastalığın prognozunda önemli rol oynadığı savunulan bir görüştür (32, 62).

2.3.1.1. KML' nin etiyolojisi

Miyeloid öncül hücrelerin anormal klonal çoğalması ile karakterize bir kök hücre hastalığı olan KML, tüm lösemilerin %14'ünü, erişkin lösemilerin ise %20'lik kısmını oluşturmaktadır. İnsidansı 1.6/100.000'dir. Erkeklerde daha sık (E/K: 1.4/1) görülür.

Ortalama olarak 65 yaşında kendini gösterir ve yaşla birlikte insidansı artar. Nadiren çocuklarda görülür (59).

2.3.1.2. KML genetiğinin tarihçesi

Tablo 2.3. KML' nin tarihçesi (38, 52, 59, 73,)

1845	Craigie, Bennet, Virchow tarafından KML tanımlanmıştır.
1914	Boveri tarafından kanserin orjiniinde somatik mutasyonlar tanımlanmıştır.
1960	Novel ve Hungerford tarafından Ph kromozomu tanımlanmıştır.
1973	Rowley tarafından 9. ve 22. kromozomlar arasında resiprokal translokasyon tanımlanmıştır.
1982	Heisterkamp ve ark. tarafından 9. kromozoma lokalize <i>ABL</i> geni tanımlanmıştır.
1984	Prakash ve Yunis tarafından 22. kromozomdaki kırık noktasına “break point cluster region” adı verilmiştir.
1985	Kanapka ve ark. Ph^+ KML'li hastalarda füzyon gen ürününün tirozin kinaz aktiviteli bir protein olduğunu bulmuştur.
2000	Claudia ve ark. tarafından <i>BCR-ABL</i> füzyon geninin ekspresyonu baskılanarak tamamen remisyonun gözleendiği bildirilmiştir.

Son zamanlarda ise *ASS* bölgesini içeren üçlü prob setleri kullanılarak, bu bölgedeki delesyonların KML hastalarının prognozuna etkisi araştırılmaktadır (10).

2.3.1.3. *BCR-ABL* translokasyonunun moleküler anatomisi

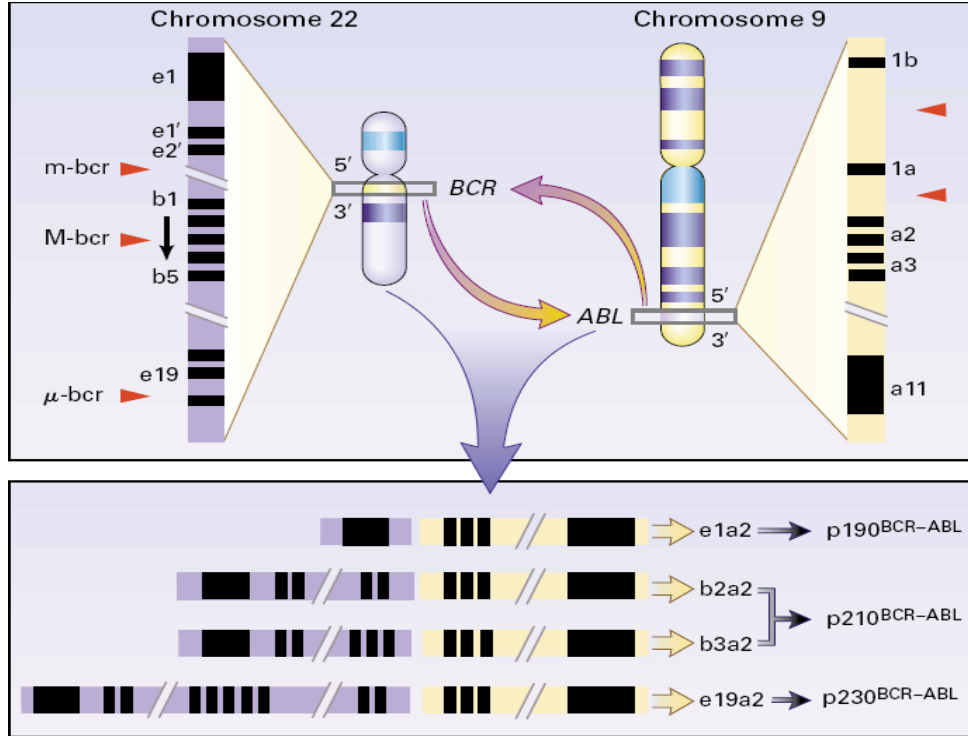
Resiprokal bir translokasyon sonucu oluşan *BCR-ABL* füzyon geni 9. kromozomdaki *ABL* ve 22. kromozomdaki *BCR* protoonkogenin olaya katılması

sayesinde meydana gelir. Normal hücrelerde *ABL* protoonkogeni hücre gelişiminde kontrol edici bir roldeyken, meydana gelen translokasyon sonucu bu fonksiyonunu kaybeder ve bir onkogen halini alır (47, 64, 67).

Abelson geni (*ABL*) üzerindeki kırılma bölgeleri çoğunlukla, 5' segmentinin ekzon 1b ve ekzon 1a arasındadır (18). Yapılan çalışmalarda *ABL* geninin tirozin kinaz aktivitesine sahip bir proteini kodladığı, oluşan *BCR-ABL* füzyon geninde tirozin kinaz aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (9, 39).

Kromozom 22'de lokalize *BCR* geninde ise üç kırılma noktası vardır ve kırılmanın en çok olduğu bölge "major breakpoint cluster region" adı verilen 5,8 kb büyüklüğündeki bölgedir. Bu bölge, e12-e16 (eski isimleri ile ekzon b1-b5) olarak adlandırılmış 5 adet ekzondan oluşmaktadır. Sıklıkla kırılma noktası ekzon 13 ve ekzon 14 arasındadır.

Oluşan *BCR-ABL* füzyonu, *BCR* ekzonlarının *ABL* ekzon 2a'ya katılması ile oluşur ve transkriptler e13a2(b2a2) veya e14a2(b3a2) bileşiklerinden üretilir. Her iki durumda da mRNA, 8.5 kb'lik bir sekanstan oluşan p210 *BCR-ABL* 'yi kodlar. Böylece *BCR-ABL* bir onkoproteine çevrilir (13, 49).

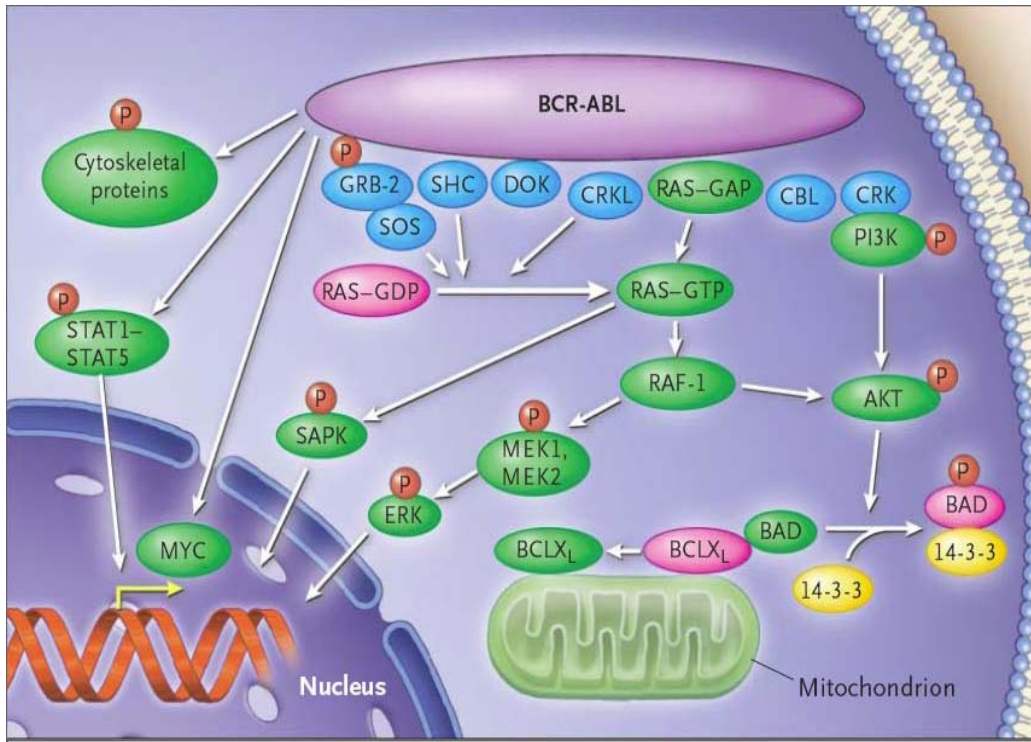


Şekil 2.1. KML'de t(9;22) (19).

Kronik miyelositer lösemi olgularının büyük bir kısmında hücrelerin b2a2 veya b3a2 transkriptleri olurken olguların % 5'inde farklı füzyon proteinleri oluşabilir. Hücrelerinde b2a2 ve b3a2 transkripti olan KML olgularında klinik özellikler, tedaviye cevap ve prognoz benzerdir. Fakat b3a2 transkripti olanlarda yüksek trombosit sayısı görülür. Philadelphia pozitif ALL'li erişkinlerin %50'sinde, çocukların %80'inde ve nadiren KML'li vakalarda 22. kromozomdaki kırılma, M-bcr'nin 5' ucunda yer alan ve minor breakpoint cluster region (m-bcr) olarak adlandırılan bölgede gerçekleşir. Ekzon 1 ve ekzon 2'nin *ABL* genindeki ekzonlarla birleşmesiyle ortaya çıkan *BCR-ABL* transkriptinin translasyonu sonucu *BCR* geninde 210 kd.'luk *BCR-ABL* füzyon proteini oluşur. Üçüncü kırılma noktası ise μ -bcr adı verilen m-bcr bölgesinin 3' ucundaki e19 ve e20 ekzonları arasındaki bölgedir. Ekzon 19 ve ekzon a2 birleşimi sonucu p230 *BCR-ABL* proteini oluşur (Şekil 2.1). Kronik miyelositer lösemideki p230 *BCR-ABL* ekspresyonu trombositozla, p190 *BCR-ABL* ekspresyonu ise monositozla ilişkilendirilmiştir (43, 44, 50, 51, 56, 57, 66, 70).

2.3.1.4. BCR-ABL aracılı malign transformasyon

Oluşan *BCR-ABL* füzyon geninin tirozin kinaz enzimatik aktivitesi *ABL*'de yer alan SH1 parçası tarafından taşınır. Normalde kontrol edilebilir özellikte olan tirozin kinaz aktivitesi *ABL* proteinine *BCR* dizisinin eklenmesiyle kontrol edilemez duruma gelmektedir. Meydana gelen *BCR-ABL* füzyon proteininde *ABL* cap bölgesinin yokluğu ve *BCR*'nin ilk ekzonunda taşınan dimerizasyon parçası, *ABL* SH1 parçasının aktivasyonundan sorumludur (25). Bu iki *BCR-ABL* molekülü tirozin eklerini fosforlar (48). Daha sonra normal *ABL* enzimi efektör protein ile etkilenir.



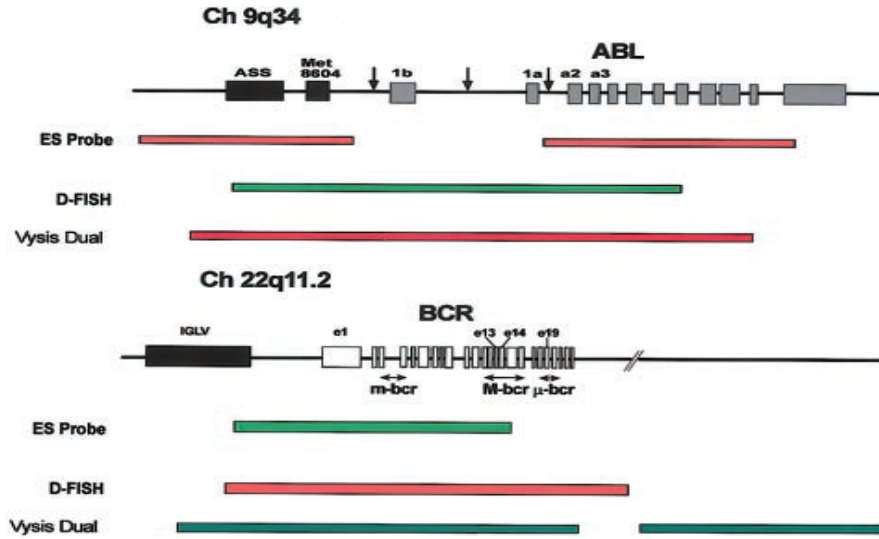
Şekil 2.2. BCR-ABL'nin etkilediği sinyal iletim yolları (13).

Bu efektör proteinler vasıtasıyla kimerik *BCR-ABL* geninde, gen transkripsiyonunun aktivasyonu veya baskılanması, apoptoz yanıtı, hücre iskeletinin organizasyonu ve inhibitör proteinlerin yıkımı ile karakterize çeşitli onkojenik sinyallere dönüşüme neden olan birçok olay gerçekleşir. Bu olayda rol oynayan

yolaklar *RAS*, MAP kinazlar, STAT, PI3K ve *MYC* olarak sayılabilir (Şekil 2.2). Bu yolaklarla etkileşim tirozinin fosforilasyonu sayesinde gerçekleşir. Böylece malign transformasyonun temel mekanizması olan kontrolsüz hücre çoğalması, lösemik hücrelerin mutajenik uyarılara verdiği apoptoz yanıtında azalma olarak özetlenebilir (26, 60).

2.3.1.5. *ASS* gen bölgesi

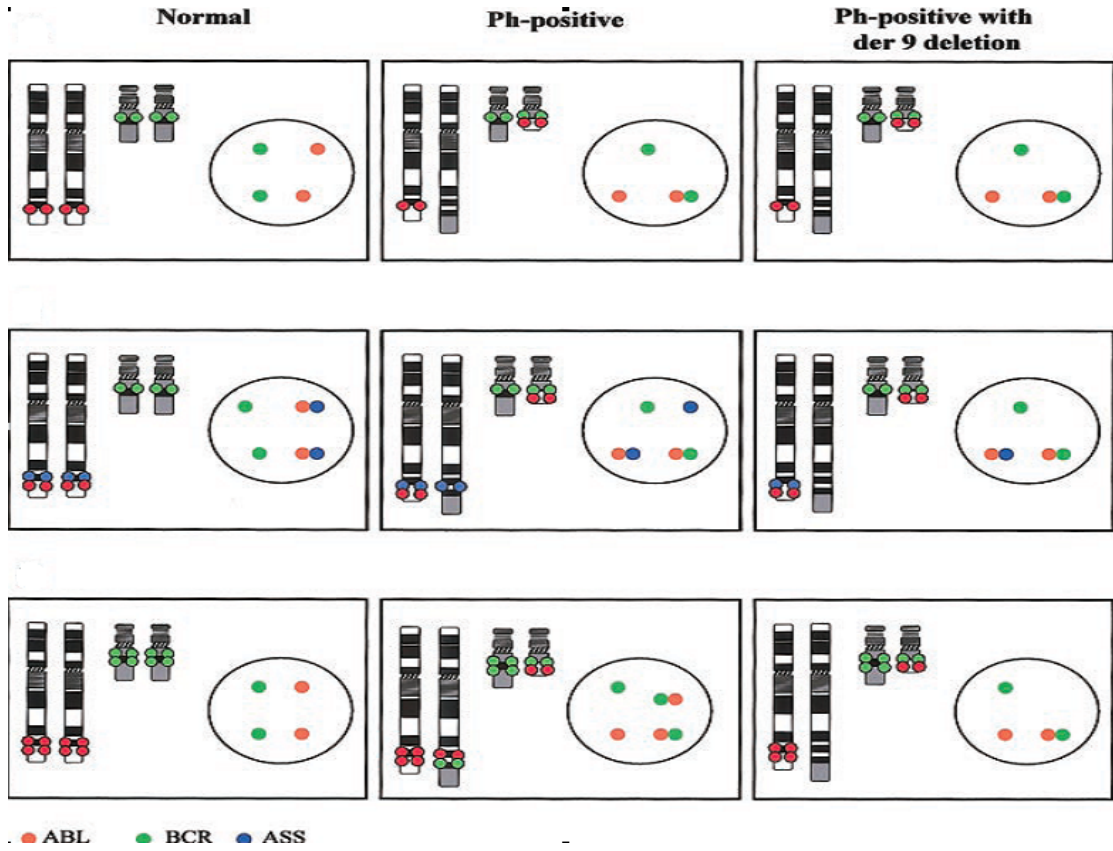
Son yıllarda Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalara göre; Arjinin süksinat sentetaz (*ASS*) olarak bilinen ve immunoglobulin lamda hafif zincir (IGLV) lokusunu da içeren 9q34 bölgesi delesyonları, Ph translokasyonu ile eş zamanlı olarak gerçekleşmekte ve kötü prognoza ilişkilendirilmektedir (10, 34).



Şekil 2.3. ASS delesyonlarının belirlenmesi için mevcut ticari proplar (34).

Kırılma noktalarına komşu olan *ASS* gen bölgesi delesyonları, geniş ve submikroskopik delesyonlardır. Kronik miyelositer lösemi tanısı alan hastalarda %10-15 oranında görülmektedir. Genellikle FISH yöntemi ile belirlenip PCR ile varlığı doğrulanmaktadır. Belirlenen *ASS* delesyonlarının büyüklüğü 0.5Mb-8Mb arasındadır. Genellikle translokasyon kırık noktalarını ve 9. ve 22. kromozom sekanslarını kapsar. Bu delesyonların gen içeriği 300'den fazladır (10, 61).

Füzyon proteini olan *BCR/ABL*'yi belirlemeye yönelik dizayn edilmiş ilk FISH problemleri uygulandığında, neoplastik hücrelerin bir *ABL*, bir *BCR* ve bir *BCR/ABL* füzyon sinyal paternini gösterdiği belirlenmiştir. Böyle sinyal paternlerinin, neoplastik hücrelerin normal hücrelerden ayırt edilmesini güçleştirdiği görülmüştür. Çünkü normal hücreler tesadüfi olarak üst üste gelmekte ve neoplastik hücrelerle aynı sinyal paternini oluşturmaktadır. Böylece neoplastik hücreler ve normal olan hücrelerin ayırt edilmesi zorlaşmıştır ve %5 oranında bu kimerik genin yanlış pozitifliği tespit edilmiştir (2, 68). Bu problemi çözmek için üçlü prob setleri geliştirilmiştir (Şekil 2.3.). Bu yeni problemler *ABL* ve *BCR*'ye ek olarak *ASS* bölgesini de içerir (12, 34, 68,71).



Şekil 2.4. Philadelphia translokasyonu ve *ASS* delesyonlarını belirleyen FISH sistemi (34).

Üçlü prob setini uyguladığımız hastalarda tek füzyon paterni gördüğümüzde (Şekil 2.4.) derivatif kromozom 9'daki hücrelerin *ASS*, *ABL*, *BCR* sinyallerini içermediği görülmüştür. Fakat *BCR/ABL* tek füzyon sinyali derivatif 22 (Ph kromozomu) üzerinde bulunmaktadır. Bunun aksine üst üste gelmiş *BCR* ve *ABL* sinyal paterni gösteren normal hücrelerin *ASS* lokusunun iki kopyasını bulundurduğu saptanmıştır. Geliştirilen bu prob tekniği sayesinde yanlış pozitiflik cut-off oranları düşürülmüştür (34).

Saptanan delesyonların üç temel özelliği vurgulanmaktadır:

- 1- Bu delesyonlar 9q üzerindeki translokasyon kırık noktalarını kapsarlar ve bu noktalara komşu durumdadırlar.

- 2- Bu delesyonlar oldukça geniştir ve 9. ve 22. kromozomların birkaç megabazlık sekanslarını içerirler.
- 3- Bu delesyonların boyutları önemli farklılıklar gösterir (34).

Yapılan çalışmalarda, 9q34 bölgesinde yer alan *ASS* gen lokusu delesyonları normal Ph kromozomu belirlenen vakaların %15'inde ve variant Ph kromozomu belirlenen vakaların ise % 45'inde saptanmıştır. Belirlenen *ASS* delesyon oranı varyant Ph belirlenen hastalarda daha yüksektir (10,12).

İmatinib tedavisi alan hastalarda *ASS* (9q34) bölgesi delesyonlarının önemi henüz tam anlamıyla bilinmemektedir. Bazı çalışmalar delesyon saptanan hastalarda hematolojik ve sitogenetik yanıt oranlarının düşük olduğunu verirken, bazı çalışmalar ise bu delesyonların prognozla ilişkisini belirlememiştir (2, 34, 68).

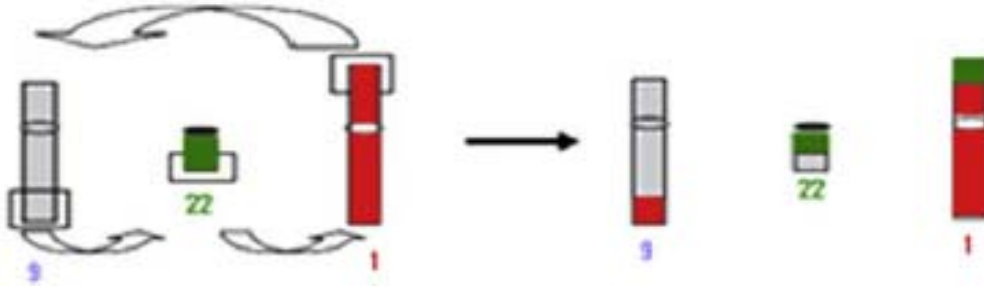
2.3.1.6. Varyant Ph kromozomu

Varyant Ph kromozomu ilk defa 1973 yılında bildirilmiştir. Bu kromozomun saptandığı olguların %5-10'unda bir veya birkaç kromozomun olaya karıştığı kompleks translokasyonlar sonucu oluşan varyant Ph kromozomu görülmektedir. Translokasyona 9q34, 22q11.2 ve bir veya daha fazla ilave genomik bölgenin karışmasıyla da bu kimerik gen oluşabilir. Y kromozomu haricinde tüm kromozomların varyant Ph translokasyonu oluşturduğu görülmüştür (8, 53).

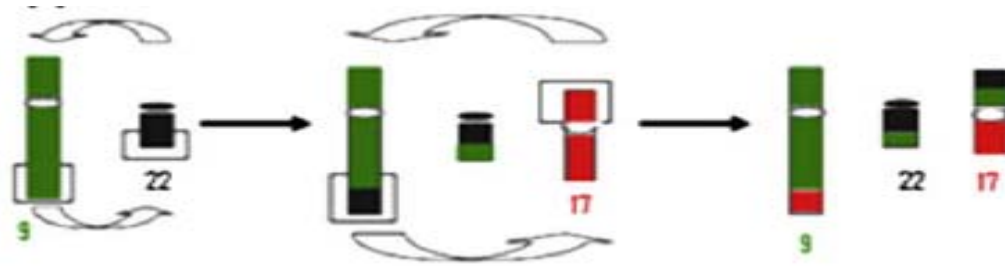
Varyant Ph oluşumu iki mekanizmayla açıklanabilir:

One-step: Aynı anda 3'lü, 4'lü veya 5'li resiprokal bir translokasyon gerçekleşir.

Two-step: Kromozom 9 ve 22 arasında gerçekleşen translokasyonu takip eden ilave translokasyon şeklinde gerçekleşebilir (7).



Şekil 2.5. One step varyant Philadelphia translokasyonu oluşum mekanizması (7).



Şekil 2.6. Two step varyant Philadelphia translokasyonu oluşum mekanizması (7).

2.3.1.7. KML' de tedavi

Philadelphia pozitif KML'de; yaklaşık 5 yıl öncesine kadar tedavi seçenekleri olarak, lökosit sayısının azaltılmasına yönelik tedavi (busulfan, hydroxyurea gibi), IFN- α ve AKHN sayılmaktaydı (5, 24, 36). Son 10 yıldır ise; hastalığın patogenezinden sorumlu olan *BCR-ABL*'nin dahil olduğu tirozin kinaz ailesinin inhibisyonu ile hastalığın tedavi basamaklarında belirgin değişiklik ortaya çıkmıştır. Bir tirozin kinaz inhibitörü olan imatinib mesilat, diğer tedavi seçeneklerinden farklı olarak hedefe yönelik bir ajan olarak geliştirilmiştir. Philadelphia pozitif KML'li hastaların füzyon ürünlerini inhibe etmek için geliştirilen imatinib, fosfatın substrata *BCR-ABL* bağımlı transferini bozmaktadır (30, 65).

İmatinib mesilat yapılan klinik çalışmalar sonucunda, yeni tanı almış Ph⁺ kronik faz KML'li hastaların ilk sıra tedavisinde tercih edilen ajan haline gelmiştir (14, 55).

Tablo 2.4. Hematolojik, sitogenetik ve moleküler yanıt kriterleri (6).

Tam hematolojik yanıt	-WBC<10×10 ⁹ immatür granülosit olmaması, %5 daha az bazofil olması, plt<450×10 ⁹ , dalağın palpe edilmemesi
Tam sitogenetik yanıt	-%0 Ph +metafaz
Kısmi sitogenetik yanıt	-% 1-35 Ph +metafaz
Minör sitogenetik yanıt	-%36-65 Ph +metafaz
Minimal sitogenetik yanıt	-%66-94 Ph +metafaz
Sitogenetik yanıt yok	-≥%95 Ph +metafaz
Major moleküler yanıt	-BCR-ABL:ABL≤%0.1 uluslararası ölçekte
Tam moleküler yanıt	-BCR-ABL RT-Q-PCR transkript saptanmaması

2. 4. Hematolojik Malignansilerde Sitogenetik ve Moleküler Sitogenetik Analiz

2.4.1. Hematolojik Malignansilerde Sitogenetik Analizler

Konvansiyonel sitogenetik; in vitro koşullarda elde edilen metafaz kromozomları ile mikroskopik olarak saptanabilen tüm kromozom anomalilerini karyotip üzerinde görebilme imkanı sağlar (15, 17).

Nowell ve Hungerford tarafından 1960'lı yıllarda KML olgularında Ph kromozomunun tanımlanmasıyla tanının konması, prognozun izlenmesi açısından sitogenetik analizler oldukça önemli bir yere sahiptir (15, 16, 27, 28).

2.4.2. Hematolojik Malignansilerde Moleküler Sitogenetik Analizler

Malign hücrelerden konvansiyonel sitogenetik yöntemle kaliteli metafaz elde etmek güç bir olaydır. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) yöntemi ile submikroskopik anomaliler in vitro proliferen hücrelere gerek kalmadan belirleyebilmektedir. Fakat bu anomalilerin tanımlanmış olması ve o anomaliye spesifik prob veya primerlerin bulunması gerekir. Prob ve/ veya primerler analiz edilecek DNA ile anahtar kilit ilişkisi içerisinde (15, 17).

Sitogenetik rutin GTG bantlama tekniğinde > 4 Mb, HRB (2000 band düzeyinde) tekniğinde de >2 Mb' ye kadar olan düzensizlikler belirlenebilmektedir. Floresan In Situ Hibridizasyon tekniği ile çok daha küçük (1-3 Mb' a kadar) olan yapısal düzensizlikler saptanmaktadır (17).

Floresan In Situ Hibridizasyon, nükleik asit problemleri vasıtasıyla preparat üzerinde bulunan hücresel veya kromozomal DNA/RNA'nın incelenmesi temeline dayanan bir tekniktir (4).

2.4.3. FISH Tekniğinde Kullanılan Problar ve Özellikleri

Floresan In Situ Hibridizasyon yönteminde hedef DNA/RNA molekülüne komplementer işaretli nükleik asit dizisine "prob" denir. Kullanılacak probun amaca yönelik olması, incelenecek materyale, değerlendirilecek anomali tipine ve bölgesine (kromozom analizi) uygun olması gerekir.

Sitogenetik alanındaki Floresan In Situ Hibridizasyon tekniği kullanımında sinyal özelliklerine göre problemler;

- Lokus spesifik problemler
- Translokasyon problemleri
 - Tek füzyon (single fusion)

- Çift füzyon (dual fusion)
- Tek füzyon ekstra sinyal (extra signal)
- -Kırık noktası yeniden düzenlenme (break apart rearrangement) problemleri
- α -satellit problemleri
- Tüm kromozom problemleri
- Telomer problemleri

şeklinde sınıflandırmak mümkündür.

Bu problemler kullanım şekilleri ve özelliklerine göre tek ve/veya çift renkli, prob setlerinde; üç ve/veya beş farklı renkle işaretli olabilirler (18).

2.4.4. FISH Tekniğinin Temel Mekanizması

Floresan In Situ Hibridizasyon yönteminde temel olay, iki DNA sarmalı arasındaki komplementerliktir. Prob DNA molekülü işaretlenir. Hedef hücre ya da metafaz kromozomları genellikle bir lam üzerine fikse edilmiştir. Hücredeki proteinler ortamdan uzaklaştırılır ve genomik DNA denatüre edilir. Spesifik olarak eşleşmenin ideal olduğu koşullarda, DNA'nın erime noktasından daha düşük olduğu bir ısıda işaretli DNA dizisi ile genomik DNA hibridize edilir. Oluşan hibrid ve kimyasal olarak modifiye edilen DNA problemlerinin uygulanması sayesinde immünojenik ya da afinite reaksiyonları ile floresan ya da enzimatik olarak görüntülenir (4).

2.4.5. FISH Tekniğinin Kullanım Alanları

Floresan In Situ Hibridizasyon tekniğinin kullanım alanlarını tanısal ve araştırma amaçlı kullanım olarak iki ana başlık altında toplamak mümkündür.

1. Tanısal amaçlı kullanılan FISH

- Klinik sitogenetik
- Prenatal tanı
- İnterfaz sitogenetiği
- Mikrodelesyon sendromlarının tanısı
- Dokuda enfeksiyon ajanlarının tanısı
- Kanser sitogenetiği
- Dokuda mRNA düzeyinde onkogenlerin değerlendirilmesi.

2. Araştırma amaçlı kullanılan FISH

- Gen haritalanması
- Tümör biyolojisi
- Mikrobiyoloji/ viroloji
- Gen ekspresyon analizi
- Somatik hücre hibrid analizleri
- Mayoz/ mitoz analizleri
- Hücre tanımlanması (4).

2.4.6. FISH Tekniğinin Avantajları ve Dezavantajları

Floresan In Situ Hibridizasyon tekniğinin moleküler tekniklerdeki ilerlemelere paralel olarak gelişmesi ve geniş bir uygulama alanı bulmasının altında yatan gerçek, bu tekniğin kolay uygulanabilir olması, duyarlılığının ve güvenilirliğinin yüksek olması, diğer moleküler DNA hibridizasyon yöntemlerine göre rezolüsyon gücü, mozaikizm tanısı gibi avantajlarının olmasıdır. Fakat bu tekniğin dezavantajı ise sadece kullanılan proba yönelik analiz yapabilmesidir (4).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1.Gereç

3.1.1. Araştırma Grubu

Kronik miyelositer lösemi tanısı alan olguların kemik iliği örneklerinden konvansiyonel sitogenetik ve FISH analizleri, 2001-2010 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Kanser Sitogenetiği Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Araştırma grubunu, KML tanısı almış ve Ph⁺ olarak belirlenmiş 30 olgu oluşturmuştur. Olguların 28'i Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı'ndan, 2'si ise Eskişehir Özel Ümit Hastanesi Hematoloji Bölümü'nden Anabilim Dalı'mıza ulaşmıştır.

3.1.2. Kullanılan Aygıtlar

Bek

Binoküler araştırma mikroskobu (Olympus BX-40)

Buzdolabı (Arçelik 415)

Cam kalemi

Sensys Kamera

Deep Freeze (Heraeus)

Elektronik Terazı (Seuter, Aınworth-AA-250, Setra-M2000L)

Enjektör

Etüv (Friocell MMM Med Center)

Floresan mikroskop (NIKON ECLIPSE 80i)

Image Analyser (Applied Imaging)

Kronometre

Lamin Air Flow (Heraeus ELB2448)

Mikropipet (Eppendorf)

Mikrosantrifüj (Eppendorf Centrifuge 5415)

pH metre (Jenco)

Pipet uçları

Termometre

Vortex (Janke and Kunkel, UF-2)

Zaman Ayarlı Santrifuj (Heraeus)

Su banyosu (Genosys BM402)

3.1.3. Cam Malzeme

Beher (500 ml, 1000 ml)

Cam pipet

Erlenmayer (500 ml, 1000 ml)

Lam ve lamel

Mezür

Şale

3.1.4. Kimyasal Maddeler

Absolü alkol (Merck)

Antibiyotik (Biological Industries)

Antifade (Vector)

Bone Marrow (Biological Industries)

Colcemid Solution (Biological Industries)

DAPI (Sigma)

Distile su

Entellan (Merck)

Giemsa (Merck)

Glacial acetic acid (Merck)

HCl (Merck)

İmmersiyon yağı (Merck)

KCL (Merck)
KH₂PO₄ (Merck)
Ksilol (Merck)
Methanol (Merck)
Na₂HPO₄ (Merck)
NaCl (Merck)
NaOH (Merck)
RPMI (Biological Industries)
Rubber sement (Sanford 00491)
Parafilm (Pechiney)
Serum Fizyolojik
Sitrik asit (Merck)
Trypsin (Sigma)
Tween 20 (Sigma)

3.1.5. Kullanılan Problar

LSI 9q34 Spectrum Aqua Probe (Vysis 32-191072-15)

3.2. Yöntem

Kronik miyelositer lösemi tanısı almış olgulardan alınan kemik iliği örneklerinde, konvansiyonel sitogenetik ve moleküler sitogenetik analizler gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Materyal alımı

Kronik miyelositer lösemi tanısı alan olgulardan steril şartlarda heparinize enjektöre 2-3 ml olacak şekilde kemik iliği aspirasyonu gerçekleştirilmiş ve alınan örnek Anabilim Dalımız Laboratuvarı'na ulaştırılmıştır.

3.2.2. Sitogenetik Analiz

Araştırma serisinde sitogenetik analizler standart kemik iliği yöntemine göre yapılmıştır. Çalışmada 24 ve 48 saatlik kemik iliği yöntemi kullanılmıştır.

- Aseptik koşullarda 5-6 damla heparinize kemik iliği 5ml'lik RPMI ve Bone Marrow besi ortamına eklenmiştir.

- Tüpler, 24 ve 48 saatlik kültür yapmak üzere 37°C'deki etüve kaldırılmıştır.

- 0,1 ml (10µ/ml)' lik colcemid ilavesi, 24 saatlik kültürlerde 5. saatte, 48 saatlik kültürlerde ise 46. saatte (yaklaşık olarak harvest aşamasından 2 saat önce) gerçekleştirilmiştir.

- Tüpler birkaç defa ters çevrilerek karıştırılmış ve 37°C' lik etüve konulmuştur.

- Kültür sonrası tüpler 1300 rpm de 8 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır.

- Her tüpe önceden 37°C'ye getirilmiş hipotonik solüsyon (0,075 M'lık KCl) vorteksle karıştırılarak eklenmiştir.

- Tüpler 37°C'lik etüvde 30 dakika bekletilmiştir.

- Etüvden çıkan tüplerin üstüne 3-5 damla Carnoy's fiksatif (3:1 methanol/ glacial acetic acid) ilave edilerek ve prefiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

- Tüpler 1300 rpm de 8 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atılmış ve tüplere vorteks kullanılarak 5 ml Carnoy's fiksatif eklenmiştir.

- Tüpler yeniden santrifüj edilmiş ve üst kısmındaki süpernatant atılmıştır. Bu işlem 2-3 defa daha tekrar edilmiştir.
- Bu işlemlerden sonra pelet süspansiyon haline getirilmiştir. Elde edilen bu pelet daha önceden temizlenmiş ve buzdolabında +4 °C’de bekletilen lamlara yaklaşık 30 cm yükseklikten yayılmıştır. Yayma yapılan preparatların bir bölümü FISH çalışması için -20°C’ye kaldırılmıştır.
- Geri kalan preparatlar ise 65°C’ye ayarlı hot-plate üzerine 1 gece süreyle yaşlandırma işlemini gerçekleştirmek üzere yerleştirilmiştir.
- Ertesi gün preparatlara GTG bantlama uygulanmıştır.

3.2.2.1. Preparatların boyanması

- Yaşlandırılmış preparatlar 26,5°C’deki tripsin solüsyonunda 8 saniye bekletildikten sonra, tripsinden arınması için önce PBS ile ardından çeşme suyu ile muamele edilmiştir.
- Preparatların üzerine boya solüsyonundan (PBS 2ml, Leishman 0,5ml) 2 ml eklenmiş ve boya alması için 2 dakika bekletilmiştir.
- Süre bitiminde preparatlar çeşme suyu ile muamele edilmiştir.
- Boyanmış olan preparatlar oda ısısında kurutularak entellan ile kalıcı preparat haline getirilmiştir.
- Hazırlanan preparatlar mikroskopta incelenmiştir.

Sitogenetik değerlendirme International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN 2009) kriterlerine göre yapılmıştır. Karyotip analizinde her olgu için en az 20 metafaz plağı değerlendirilmiştir.

3.2.3. Moleküler Sitogenetik Analiz

Moleküler sitogenetik analizlerde preparasyon aşaması çok önemlidir. Kaliteli sinyal almak ve ideal şartlarda analizi gerçekleştirmek için lamın belirli bölgelerine yayılmış yeterli sayıda ve kalitede (protoplazmadan arındırılmış) metafaz plaklarının ya da interfaz hücrelerinin bulunması gerekir.

3.2.3.1. FISH tekniğinin uygulanması

Floresan In Situ Hibridizasyon tekniğinde Rieder ve arkadaşları tarafından geliştirilen protokol laboratuvar şartlarımıza uygun hale getirilerek uygulanmıştır (74).

3.2.3.1.1. Preparatların ön yıkaması ve denatüre edilmesi

- Preparatlar her biri 1 dakika olmak üzere sırasıyla % 100-70-50-30'luk alkol serilerinden ve 1 dakika 0.1XSSC solüsyonundan geçirilerek dehidre edilmiştir.
- Preparatlar hemen 70°C'deki 2XSSC solüsyonuna alınmış ve bu ısıda 30 dakika bekletilmiştir.
- 30 dakika sonunda 2XSSC solüsyon ısısının 37°C'ye gelmesi beklenmiştir.
- Daha sonra preparatlar 0,07 M'lık NaOH solüsyonunda denatüre edilmiştir.
- Denatürasyonu takiben her biri 1 dakika olmak üzere sırasıyla +4°C deki 0,1XSSC-+4°C deki 2XSSC de bekletilmiştir. Preparatlar % 30-50-70-100'lük alkol serisinde dehidrate edilip, kurumaya bırakılmıştır.

3.2.3.1.2. Probların denatüre edilme aşaması

Hazırlanan problemler benzeri usulü 70°C’de 5 dakika denatüre edilmiştir.

3.2.3.1.3. Hibridizasyon aşaması

- Lokus spesifik ve translokasyon problemlerinin bulunduğu ependorf tüpleri santrifüj edilerek tüm problemin dibine çökmesi sağlanmıştır.
- Denatüre edilen preparatlarda belirlenen alanlara prob (5 µl) eklenmiş ve üzerlerine 24mm’lik lamel kapatılmıştır.
- Lamel çevresi su girmemesi için rubber cement ile yalıtılmıştır.
- Preparatlar nemli bir ortamda 37°C’lik etüvde hibridizasyona bırakılmıştır.

3.2.3.1.4. Hibridizasyon sonrası yıkama işlemi

Bu yıkamalarda spesifik olarak bağlanmayan prob DNA’sının ortamdan uzaklaştırılması ve olgu DNA’sına tam komplementer olan (%80-100) dizilerin hedef bölgede sabit hale getirilmesi amaçlanmaktadır. Aşamaları:

- Hibridizasyonu tamamlanan preparatlar etüvden çıkartılarak lamellerin çevresindeki yalıtım maddesi dikkatlice temizlenmiştir.
- Preparatlar, oda ısısındaki 2XSSC solüsyonunda hafifçe karıştırılarak lameller preparatlardan uzaklaştırılmıştır.
- Preparatlar 74°C’deki 1XSSC solüsyonu ile 5 dakika yıkanmıştır.
- Sonrasında 2XSSC/ Tween 20 solüsyonunda 5 dakika yıkanmıştır.

3.2.3.1.5. Hibridize olan bölgelerin görülür hale getirilmesi

Bu aşamada prob ve nükleus DNA'sının hibridize olduğu bölgelerin görülür hale getirilmesi amaçlanmaktadır.

Hibridizasyon sonrası yıkamaları yapılan preparatlar 4XSSC/DAPI solüsyonunda 2 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda 15µl antifade eklenmiş ve lamel ile kapatılmıştır. İnceleme aşamasına kadar -20°C'de ve karanlıkta bekletilmişlerdir.

3.2.3.1.6. Hazırlanan preparatların mikroskopta incelenmesi

Preparatlar Olympus BX-61 Floresan mikroskobunda uygun filtrelerde incelenmiştir. Floresan mikroskoba bağlı soğutmalı kamera ve görüntü analiz sistemi (Applied Imaging) aracılığıyla her olguya ilişkin FISH analiz verileri fotoğraflanmış ve arşivlenmiştir.

3.2.3.1.7. Değerlendirme

Kronik miyelositer lösemi tanısı alan ve Ph⁺ olarak belirlenen her olgunun kemik iliği örneklerinden hazırlanan preparatlarda gerçekleştirilen FISH analizlerinde her olguda ASS (9q34) probu için en az 200 interfaz nükleusu değerlendirilmiştir. Sinyaller değerlendirilirken birbirine çok yakın olan sinyaller ve sinyal çap büyüklüğü birbirinden farklı olan sinyaller değerlendirmeye alınmamıştır.

Kullanılan LSI 9q34 Spectrum Aqua Probe (Vysis) probu için cut-off değeri %10 olarak belirlenmiştir.

3.3. Kullanılan Stok Solüsyonlar

Tablo 3.1. Hipotonik solüsyon (0.075 M)

KCL	1.398 gr
Distile su	250 ml

Tablo 3.2. Carnoy's Fiksatif solüsyonu

Methanol	3 kısım
Glacial Acetic Acid	1 kısım

Tablo 3.3. GTG bantlama solüsyonları

<u>Fosfat Buffer Salin (PBS)</u>	
Sodyum klorid (NaCl)	4 gr.
Potasyum klorid (KCl)	0,1 gr.
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	0,1 gr.
Disodyum hidrojen fosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,57 gr.
Distile su	500ml.

<p style="text-align: center;"><u>Trypsin Solüsyonu</u></p> <p style="text-align: center;">Trypsin toz (Sigma) PBS</p> <p style="text-align: center;"><u>Leishman Solüsyonu</u></p> <p style="text-align: center;">Leishman PBS (1 preparat için)</p>

Tablo 3.4. Preparatların ön yıkama solüsyonları

<p style="text-align: center;"><u>20XSSC Solüsyonu</u></p> <table><tr><td>NaCl (3M)</td><td>175,3 gr.</td></tr><tr><td>Tri Sodyum Sitrata (0,3M)</td><td>88,24 gr.</td></tr><tr><td>Distile su</td><td>1000 ml.</td></tr></table> <p>HCl ile pH 7.0 a ayarlanır.</p>	NaCl (3M)	175,3 gr.	Tri Sodyum Sitrata (0,3M)	88,24 gr.	Distile su	1000 ml.
NaCl (3M)	175,3 gr.					
Tri Sodyum Sitrata (0,3M)	88,24 gr.					
Distile su	1000 ml.					
<p style="text-align: center;"><u>2XSSC Solüsyonu</u></p> <table><tr><td>20XSSC</td><td>40 ml</td></tr><tr><td>Distile Su</td><td>360 ml</td></tr></table> <p>HCl ile pH 7.0'a ayarlanır.</p>	20XSSC	40 ml	Distile Su	360 ml		
20XSSC	40 ml					
Distile Su	360 ml					
<p style="text-align: center;"><u>0.1XSSC Solüsyonu</u></p> <table><tr><td>20XSSC</td><td>3ml</td></tr><tr><td>Distile su</td><td>597ml</td></tr></table>	20XSSC	3ml	Distile su	597ml		
20XSSC	3ml					
Distile su	597ml					

Tablo 3.5. Preparatların denatürasyon solüsyonu

0,07 M NaOH	14ml
Distile su	200ml

Tablo 3.6. Hibridizasyon sonrası solüsyonlar

<u>1XSSC Solüsyonu</u>	
20XSSC	10ml
Distile su	190ml

2XSSC/ TWEEN-20 Solüsyonu	
20XSSC	20ml
TWEEN-20	100µl
Distile su	180ml

Tablo 3.7. Görüntüleme solüsyonları

DAPI Solüsyonu	
2XSSC	20ml
DAPI	100µl
Distile su	80ml

4. BULGULAR

Çalışmamız 2001-2010 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı'nda ve Eskişehir Özel Ümit Hastanesi Hematoloji Bölümü'nde KML tanısı almış toplam 30 olgu ile gerçekleştirilmiştir. Olguların heparinize enjektörde gelen kemik iliği örneklerinin klasik sitogenetik ve FISH analizleri, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nın Kanser Sitogenetiği Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

4.1. Olgularımızın Demografik Bulguları

Çalışmamıza dahil edilen KML olgularının yaş aralığı 22-66 olarak tespit edilmiş olup yaş ortalaması 45'dir. Olgularımızın erkek/ kadın oranı 15/15 olarak saptanmıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Hastaların cinsiyetlerine göre dağılımı

Cinsiyet	N	%
Kadın	15	50
Erkek	15	50
Toplam	30	100

Çalışmaya alınan 30 olgunun 23'ü yeni tanı aşamasında olup 22'si imatinib, 1'i hidroksiüre tedavisi almıştır; 7 olgu ise takip aşamasında olup 6'sı imatinib, 1'i hidroksiüre tedavisi almıştır (Tablo 4.2). Çalışmaya dahil edilen olgularımızda 3.ayda hematolojik yanıt, 12.ayda sitogenetik yanıt ve 18. ayda moleküler yanıtlar değerlendirilmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.2. Hastaların aldığı tedaviler

OLGU SAYISI	ALDIGI TEDAVI	TEDAVI ALAN OLGU SAYISI
30	HİDROKSİÜRE	2 • 1'i takip • 1'i yeni tanı
	İMATİNİB	28 • 22'si yeni tanı • 6'sı takip

4.2. Kronik Miyelositer Lösemi Tanısı Alan Olgularda Klasik Sitogenetik Analiz Verileri

Yeni tanı aşamasında çalışmaya dahil edilen 30 olguda klasik sitogenetik analiz sonucunda tüm olgular Ph⁺ olarak saptanmıştır (Tablo 4.3).

Takipteki 7 hastanın 1'inde (1/7) orjini belirlenemeyen bir marker kromozom saptanırken, 1 olguda da (1/7) hastalığın ileriki dönemlerinde trizomi 8 belirlenmiştir. Yeni tanı aşamasındaki 1 hastada ise trizomi 9 ve ilave bir Ph kromozomu belirlenmiştir (Tablo 4.3).

Çalışmamıza dahil edilen 30 olgudan 1'i (1/30) varyant Ph olarak belirlenmiştir. Belirlediğimiz bu varyant translokasyon 9, 6. ve 22. kromozomlar arasında gerçekleşmiştir (Şekil 4.4).

4.3. Kronik Miyelositer Lösemi Tanısı Alan Olgularda FISH Analiz Verileri

Araştırmayı oluşturan 30 olguda lokus spesifik, sentromerik ve translokasyon problemleri uygulanarak FISH analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.3.1. Philadelphia Kromozomunun Belirlenmesine Yönelik Yapılan FISH Analizi

Çalışmaya dahil edilen 30 olguda Ph kromozomunu belirlemek amacıyla FISH analizi gerçekleştirilmiş ve tüm olgular Ph⁺ olarak belirlenmiştir. Takip aşamasındaki 7 olgunun 1'inde klasik sitogenetik yöntemiyle trizomi 8 olarak belirlenen ilave anomali FISH analizi ile doğrulanmıştır. Yeni tanı aşamasındaki 1 olguda da Ph⁺⁺ ve trizomi 9 saptanmıştır.

4.3.2. ASS Gen Bölgesi Delesyonuna İlişkin FISH Bulguları

Çalışmaya dahil edilen 30 Ph⁺ KML olgusuna LSI 9q34 probu uygulanarak ASS (9q34) gen bölgesindeki delesyonlar incelenmiştir. Her olguda 250-300 hücre analiz edilmiştir. Yapılan FISH analizleri sonucu 30 Ph⁺ KML olgusunun 11'inde (%36.6) ASS (9q34) delesyonu saptanmıştır (Tablo 4.3).

İlave anomali olarak trizomi 8 ve marker kromozom belirlenen takip aşamasındaki 2 olguda ASS (9q34) delesyonu saptanmamıştır (Tablo 4.3).

Yine varyant Ph olarak belirlenen 1 olguda ise ASS delesyonuna rastlanmamıştır (Tablo 4.3).

4.4. Çalışmaya Dahil Edilen Olgulara Ait Hematolojik, Klasik Sitogenetik/Moleküler Sitogenetik ve Moleküler Yanıt Bilgileri ve ASS (9q34) Delesyonu İle İlişkileri

Çalışmaya dahil edilen olgularda, *ASS* delesyonu saptanan 11 hastanın 10'unda (10/11) hematolojik yanıt saptanmıştır. Fakat bu 11 hastanın 6'sında (6/11) sitogenetik/moleküler sitogenetik yanıt saptanmamıştır. Delesyon saptanmayan 19 (19/30) hastadan, imatinib tedavisi altında 12. ayını tamamlayan 16 hastanın 13'ünde sitogenetik yanıt, 11'inde de moleküler yanıt görülmüştür (Tablo 4.3).

İmatinib tedavisi alan 28 olgunun 2'sinde 12. ay sitogenetik/moleküler sitogenetik ve 18. ay moleküler analiz değerlendirilmesi yapılmış, yanıt alınamamış ve tedavinin 1. kuşak sonrası tirozin kinaz inhibitörlerine geçişi görülmüştür. Bu belirlenen 2 olgudan sadece 1'inde *ASS* delesyonu saptanabilmiştir (Tablo 4.3).

Çalışmaya dahil edilen olgularımızın ortalama hayatta kalma süresi, hastalarımızın tümünün hayatta olması sebebiyle hesaplanamamıştır.

Çalışmamız sonucunda *ASS* (9q34) delesyonu belirlenen olgularımızda 12. ay sitogenetik yanıt oranımızın daha düşük olduğu izlenmiştir.

Olgu Özellikleri		Kullanılan İlaç	TAKİP			FISH Del(9q34)	İlave Anomali
Olgu No	Tam Yaşı		3. ay hematolojik yanıt	12. ay sitogenetik/ FISH yanıt	18. ay moleküler (PCR) yanıt		
1.	29	İmatinüb, Dasatinüb, Nilotinüb	var	yok	yok	+	yok
2.	54	Hidroksiüre	yok	yok	yok	+	yok
3.	37	İmatinüb	yok	var	var	-	yok
4.	61	İmatinüb	var	var	yok	-	yok
5.	32	İmatinüb	var	var	var	+	yok
6.	50	Hidroksiüre	var	yok	yok	+	yok
7.	46	İmatinüb	yok	var	var	-	yok

Tablo 4.3. Olgulara ilişkin takip ve FISH sonuçları

Kırmızı: ASS (9q34) delesyonu saptanan Ph⁺ KML olguları

Tablo 4.3. Olgulara ilişkin takip ve FISH sonuçları

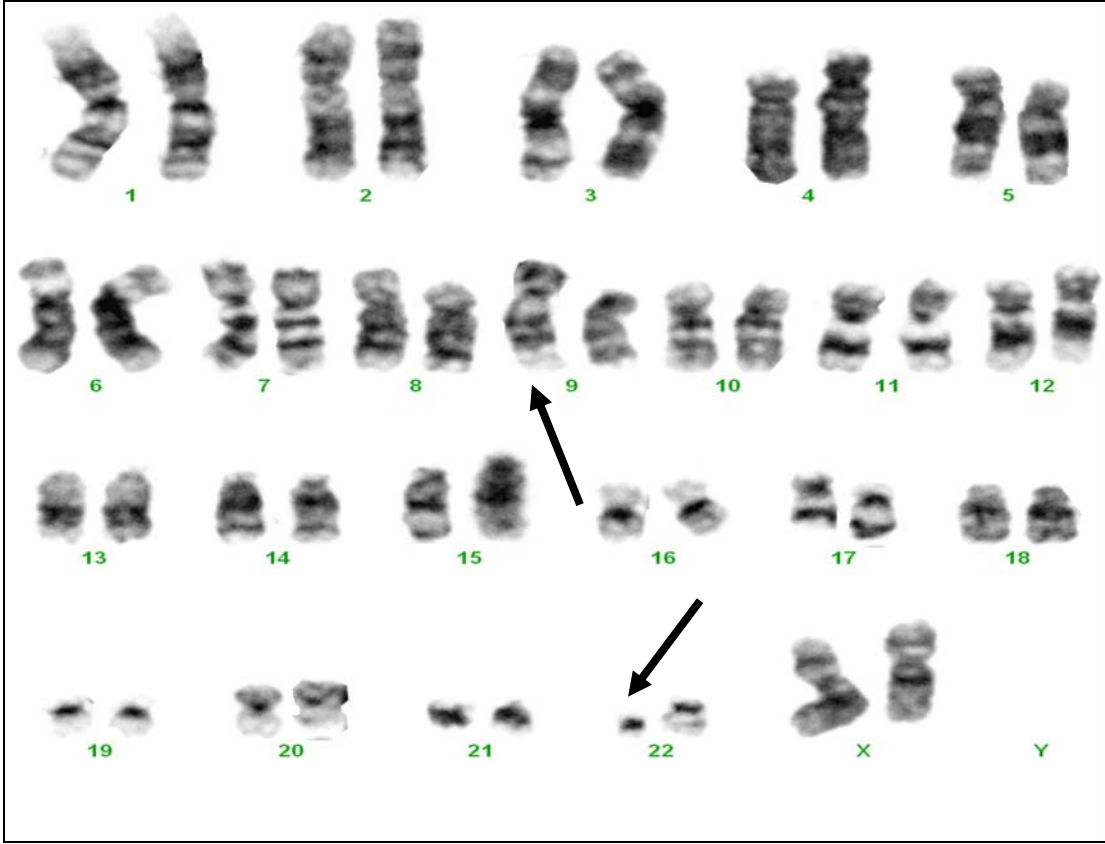
8.	42	İmatinüb, Nilotinüb, Dasatinüb	var	yok	yok	-	yok
9.	26	İmatinüb	var	var	var	+	yok
10.	60	İmatinüb	var	var	var	+	yok
11.	29	İmatinüb	var	yok	yok	+	yok
12.	66	İmatinüb	var	var	var	-	yok
13.	62	İmatinüb	var	var	yok	-	yok
14.	42	İmatinüb	var	var	var	-	yok
15.	59	İmatinüb	var	yok	yok	-	Trizomî 8
16.	35	İmatinüb	var	yok	yok	+	yok
17.	54	İmatinüb	var	var	var	-	yok

Tablo 4.3. Olgulara ilişkin takip ve FISH sonuçları

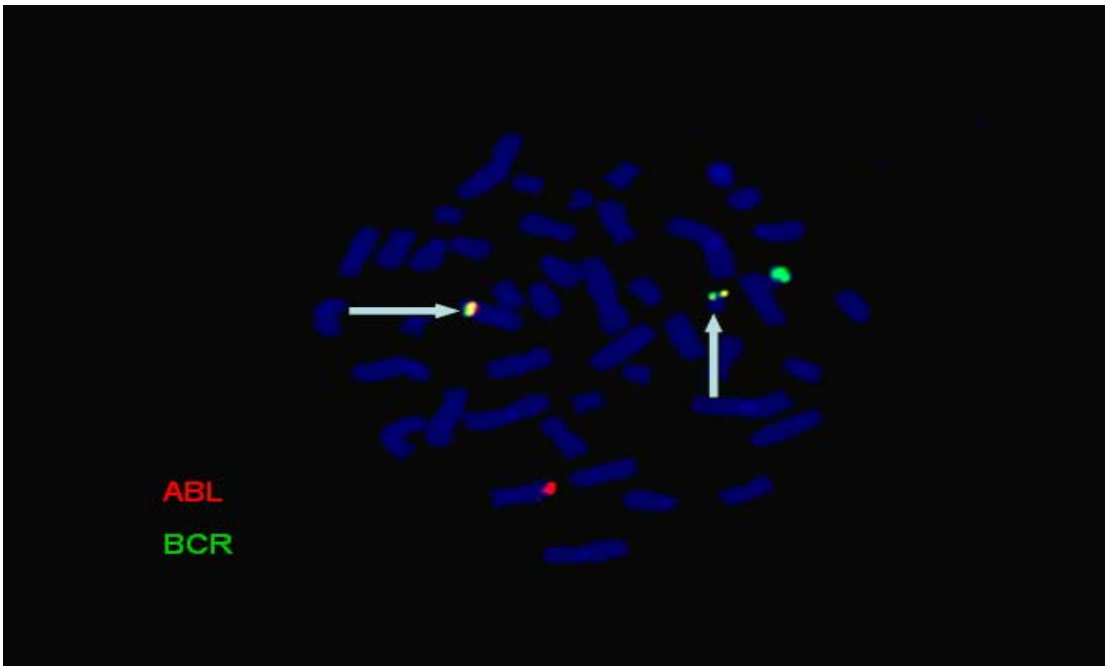
18.	45	İmatinüb	var	var	var	var	-	yok
19.	35	İmatinüb	var	var	var	var	-	Kromozom 6 yeniden düzenlenmesi (varyant)
20.	57	İmatinüb	var	var	var	var	-	yok
21.	38	İmatinüb	var	yok	?	?	-	yok
22.	59	İmatinüb	var	var	?	?	+	yok
23.	68	İmatinüb	var	var	?	?	+	yok
24.	24	İmatinüb	var	?	?	?	-	Ph ++, Trizomi 9
25.	51	İmatinüb	var	?	?	?	-	yok
26.	41	İmatinüb	var	?	?	?	-	yok
27.	66	İmatinüb	var	var	var	var	-	yok

Tablo 4.3. Olgulara ilişkin takip ve FISH sonuçları

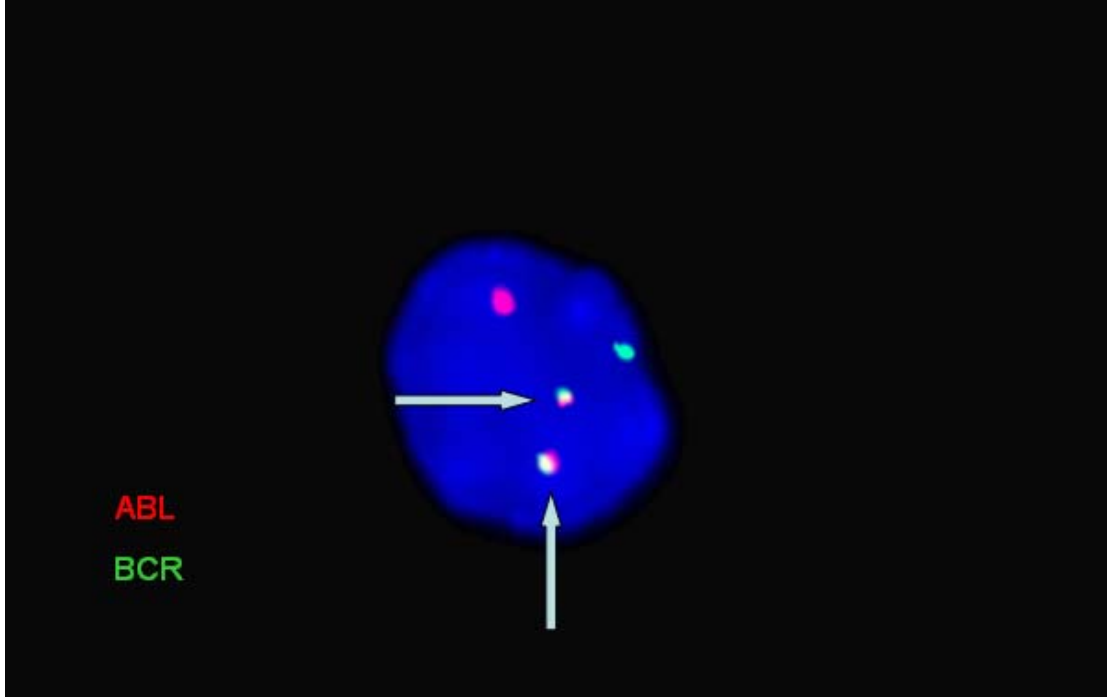
28.	42	İmatinüb	var	var	var	-	yok
29.	45	İmatinüb	var	var	var	-	+ mar
30.	22	İmatinüb	var	yok	yok	+	yok



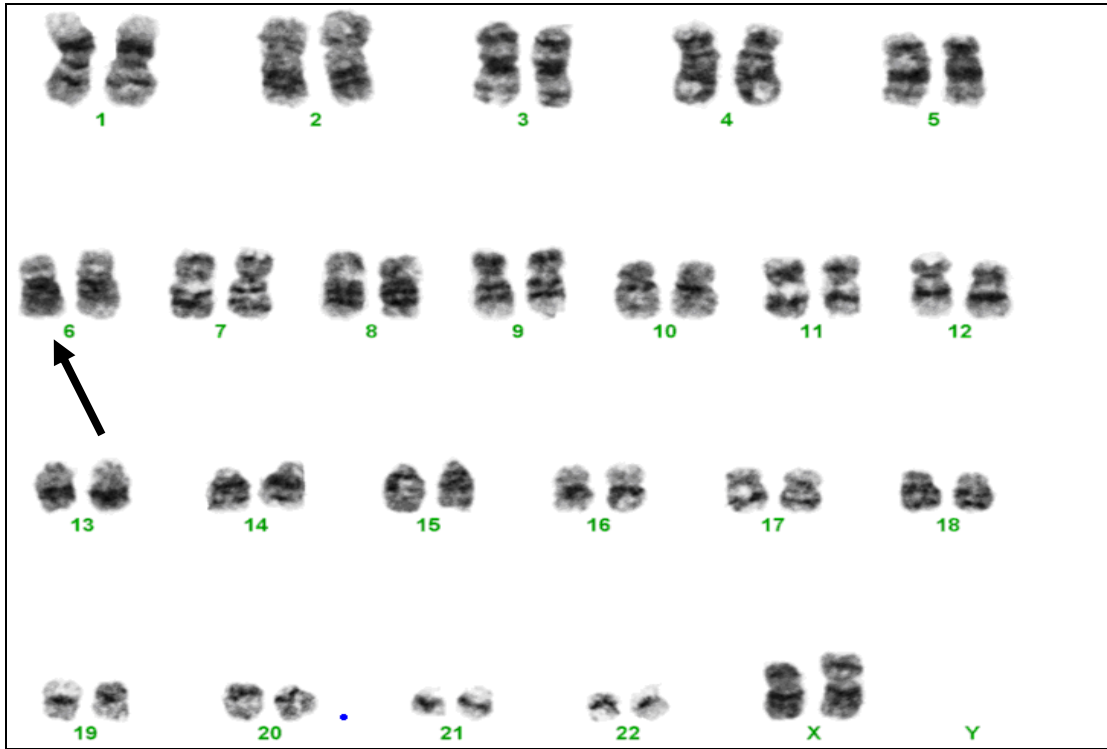
Şekil 4.1. Philadelphia pozitif bir olgunun karyotip görüntüsü.



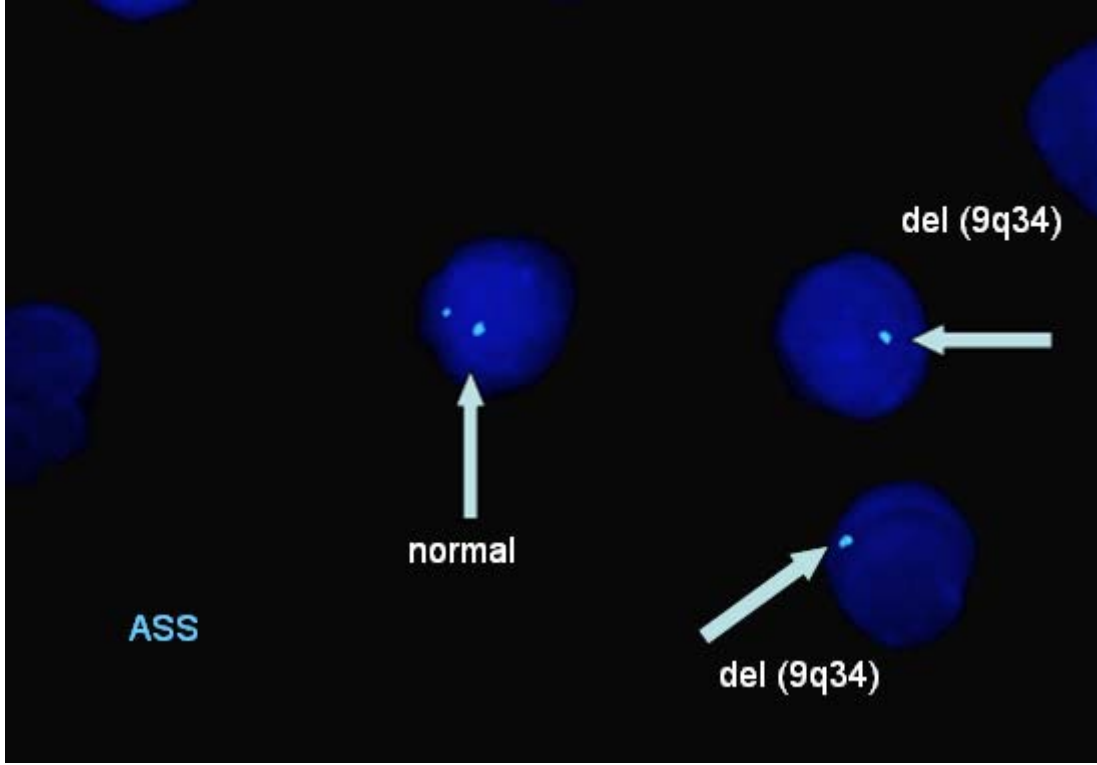
Şekil 4.2. Philadelphia pozitif metafaz FISH görüntüsü.



Şekil 4.3. Philadelphia pozitif interfaz FISH görüntüsü.



Şekil 4.4. Varyant Ph translokasyonu saptanan bir olgunun karyotip görüntüsü.



Şekil 4.5. ASS (9q34) delesyonu saptanan bir olgunun FISH görüntüsü.

5. TARTIŞMA

Kronik miyelositer lösemi tanısı alan olguların kemik iliği örneklerinde klasik sitogenetik ve FISH analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmamıza dahil edilen 30 Ph⁺ KML olgusunun kemik iliği örneklerine FISH analizi ile *ASS* (9q34) gen bölgesi yeniden düzenlenmeleri değerlendirilmiş ve prognozla ilişkisi araştırılmıştır. Çalışmamızın sonuçları literatürler ile karşılaştırılarak tartışılmıştır.

5.1. Olguların *ASS* (9q34) Gen Bölgesi Yeniden Düzenlenmelerine Ait Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Çalışmamıza konu olan *ASS* (9q34) gen delesyonlarının oranı, oluşum mekanizması ve sonuçları konusunda literatüre bakıldığında oldukça farklı sonuçlar dikkati çekmektedir. Yapılan ilk çalışmalarda *ASS* (9q34) delesyonlarının hastalığın ileriki dönemlerinde meydana geldiği bildirilmiştir. Fakat sonraki çalışmalar da bu delesyonların Ph translokasyonu ile eş zamanlı olarak gerçekleştiğini göstermektedir. Malign hücrelerde Ph translokasyonu ile eş zamanlı oluşan delesyonlar var olan genetik instabiliteyi arttırmakta ve bu sebeple kötü prognozla ilişkilendirilmektedir (34). Çalışmamıza dahil ettiğimiz olgularımızın tümü yeni tanı aşamasındadır ve olgular tedavi öncesi dönemde *ASS* (9q34) delesyonu açısından değerlendirilmiştir. Çalışmamızda *ASS* (9q34) delesyonları %36.6 oranında gözlenmiştir. Delesyon belirlediğimiz olgularımızda 12. ay sitogenetik yanıt oranının düşük olduğu görülmüş ve *ASS* (9q34) delesyonları kötü prognostik olarak değerlendirilmiştir.

Herens ve arkadaşlarının 2000'de yaptığı çalışmada, Ph⁺ KML hastalarındaki 9q delesyonlarının prognostik önemi araştırılmıştır. Çalışmaya 31'i erkek, 20'si kadın olmak üzere yeni tanı aşamasında toplam 51 olgu dahil edilmiştir. Bu çalışmada *ASS* (9q34) delesyonu %9.8 olarak saptanmıştır (31).

Cohen ve arkadaşları 2001 yılında yapmış oldukları çalışmaya 34'ü yeni tanı, 60'ı hastalığın çeşitli fazlarında olan Ph⁺ olarak belirlenen toplam 94 hasta dahil

etmişlerdir. Çalışmaya dahil edilen 94 hastada %15 oranında *ASS* (9q34) delesyonu saptamışlardır. Yapılan analizlerde FISH yönteminin yanısıra hastalara array yöntemi de uygulanmıştır (12).

Quintas-Cardama ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları çalışma 152'si erken kronik fazda tanımlanan toplam 320 KML hastasını içermektedir. Bu çalışmada %9 oranında *ASS* (9q34) delesyonu saptanmıştır (61).

Çalışmamızda *ASS* (9q34) delesyon oranımız %36.6 olup; *Herens, Cohen, Quintas-Cardama ve arkadaşlarının* elde ettiği delesyon oranından yüksek bulunmuştur. *Herens, Cohen, Quintas-Cardama ve arkadaşları* Ph^+ KML hastalarını FISH yöntemiyle ekstra sinyal (ES) prob kullanarak çalışmıştır. Ekstra sinyal FISH problemleri Ph^+ hücrelerde iki *ABL/ASS* (kırmızı), bir *BCR* (yeşil) ve bir *BCR/ABL* füzyon sinyal paterni göstermektedir. Birbirine komşu olan *ASS* ve *ABL* gen bölgeleri aynı renkle işaretlenmiş olup aynı sinyal paternini göstermektedir. Dual color dual fusion FISH probu ise Ph^+ hücrelerde bir *ABL/ASS* (kırmızı), bir *BCR* (yeşil) ve iki *BCR/ABL* füzyon sinyal paterni göstermektedir. Ekstra sinyal FISH problemlerinin duyarlılığı dual color dual fusion FISH problemlerinin duyarlılığından düşük olduğu bilinmektedir. Bizim çalışmamızda ise Ph^+ hücrelerin belirlenmesine yönelik dual color dual fusion FISH probu kullanılırken, *ASS* (9q34) delesyonlarının belirlenmesi için tek renk ile işaretli lokus spesifik *ASS* (9q34) aqua prob uygulanmıştır. Delesyon oranlarının farkının kullanılan problemlerin duyarlılığı ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Sinclair ve arkadaşları tarafından 2000 yılında yapılan çalışmada Ph^+ KML tanılı 55 hastada t(9;22) kırık noktalarında tanımlanan ve yaygın olan büyük delesyonların prognostik önemi araştırılmıştır. Çalışmaya dahil edilen olgular yeni tanı aşamasındadır. Çalışmada yer alan 55 olgunun 16'sında yani %29 oranında *ASS* (9q34) delesyonu saptanmıştır (69).

Huntly ve arkadaşları 2001 yılında farklı fazlardaki 253 Ph^+ KML olgusunda 9q delesyonlarının önemini araştırmışlardır. Çalışmaya dahil edilen 253 hastanın 39'u (%15) delesyon taşıyıcısı olarak belirlenmiştir (35).

Lim ve arkadaşları 2005 yılında, Ph^+ olarak belirlenmiş ve kronik fazda olan 96 KML olgusunda FISH tekniğini kullanarak 9q bölgesinin proksimalindeki delesyonlar üzerinde çalışma yapmışlardır. Çalışmaya dahil edilen 96 olgunun 13'ünde (%13.5) delesyonu saptamışlardır. *Lim ve arkadaşları* 9q sekansının proksimalindeki delesyonların Ph kromozomunun oluşumuyla eş zamanlı olarak gerçekleşebileceğini düşünmüşlerdir. Araştırmacı bu delesyonların *BCR* ve *ABL* bölgelerinde yüksek oranda görülmesinin, yoğun *Alu* tekrar dizileriyle ilişkili olabileceğini düşünmüştür (71).

Fourouclas ve arkadaşlarının 2006 yaptığı çalışmada 69 Ph^+ KML hastası ele alınmıştır. Hastalarda herhangi bir faz sınıflamasına gidilmemiştir. Bu hastalardan alınan kemik iliği örnekleri kültüre edildikten sonra FISH tekniği ile BAC/PAC (Bacterial Artificial Chromosome/P1 Artificial Chromosome) kullanılarak analiz edilmiş ve 9q delesyonları belirlenmiştir. Bu 69 hastanın 13'ünde (%19) 9q bölgesindeki delesyonlar tespit edilmiştir (23).

Kim ve arkadaşlarının 2008 yılında 9q delesyonları üzerinde yapmış oldukları çalışmada farklı fazlarda bulunan ve imatinib tedavisi öncesindeki KML hastalarını ele almıştır. Yapılan FISH analizlerinde Ph^+ olarak belirlenmiş 163 KML hastasının 22'sinde (%13.5) 9q delesyonu saptanmıştır (37).

Delesyon oranımız *Sinclair, Huntly, Lim, Fourouclas, Kim ve arkadaşlarının* çalışmasından yüksektir. Araştırmacılar çalışma gruplarına oldukça fazla hasta dahil etmişlerdir. Bizim çalışma grubumuzu ise yeni tanı aşamasındaki 30 Ph^+ KML hastası oluşturmaktadır. Olgularımızda *ASS* (9q34) delesyon oranımızın araştırmacıların belirlediği delesyon oranından yüksek olması, olgu sayısındaki farklılıktan ve olgu grupları arasındaki heteojeniteden kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.. Hasta sayısı ve heteojenitesi arttıkça, seçilen hasta popülasyonundaki delesyon oranının düşebileceğini düşünmekteyiz. Bu konuda yapılacak, geniş olgu serilerinin dahil olduğu çalışmalara ihtiyaç vardır.

Patel ve arkadaşları 2009 yılında Ph⁺ KML hastalarında 9q ve 22q'daki kırılma ve füzyon noktalarındaki kayıpların prognostik etkilerini belirlemek üzere bir çalışma gerçekleştirmiştir. Çalışmaya 90 KML hastası dahil edilmiştir. Yöntem olarak FISH ve klasik sitogenetik yöntemi kullanılmıştır. Olguların kemik iliği ve periferik kan örneklerinde çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu 90 hastanın 78'i tedavi öncesindedir. Tedavi öncesi hastalarda ASS (9q34) delesyonunun görülme oranı %11 olarak belirlenmiştir (58).

Bizim çalışmamızda ise analizlerimiz, olgularımızdan alınan kemik iliği örneklerinde gerçekleştirilmiştir. Farklı doku örneklerinde gerçekleştirilen analizler sonucu belirlenen anomali oranları farklılık gösterebilir. Kanser hücrelerinde bir anomalinin kemik iliğinde görülme oranı periferik kanda görülme oranından yüksek olabilir. Kemik iliği hücreleri “blast” adını alan olgunlaşmamış hücrelerden oluşmaktadır. Delesyon oranımız *Patel ve arkadaşlarının* delesyon oranından yüksektir. Farklı materyal kullanımı delesyon görülme oranları arasındaki farklılığın nedeni olabilir.

Castagnetti ve arkadaşlarının 2010 yılında yapmış oldukları bir çalışmada yeni tanı almış kronik fazdaki KML hastalarında 9q delesyonlarının önemi araştırılmıştır. Erken kronik fazdaki 521 KML hastasına 9q34 probu uygulanmıştır. Bu 521 hastanın 60 'ında (%12) ASS (9q34) delesyonu saptamışlardır (10).

Castagnetti ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada Ph⁺ KML hastalarında tedavi öncesi ASS (9q34) delesyonları %10-12 oranında görülmüştür. Castagnetti ve arkadaşlarının çalışması 2010 yılında İtalya' da gerçekleştirilmiştir. Çalışma grubunu ülke sınırları içerisindeki Ph⁺ KML hastaları oluşturmaktadır ve dolayısıyla heterojen bir olgu grubu halindedir. Bizim çalışmamızı ise Eskişehir ile sınırlı kalmış bir olgu grubu oluşturmaktadır. Olgularımızda ASS (9q34) delesyon oranımızın araştırıcının belirlediği delesyon oranından düşük olması, olgu sayısındaki farklılık ve olgu grupları arasındaki heteojeniteden kaynaklanabileceği gibi farklı populasyonlarda anomali görülme insidansının farklılığı ile de açıklanabilir. Bunların yanında çalışmamız olguların yeni tanı aşamasında olması ve kullanılan yöntem açısından araştırıcının

çalışmasıyla uyumlu görülmektedir. Çalışmamız göstermektedir ki Ph^+ KML hastalarında resiprokal translokasyonu oluşturan rekombinasyon olayları büyük genomik delesyonları meydana getirebilir. Philadelphia kromozomu erken kronik fazda oluştuğundan hastaların bir bölümünde genetik bir heterojenite oluşturmaktadır. Bu heterojenitenin sebebi 9q üzerinde yer alan *ASS* (9q34) gen bölgesi kayıpları olabilir. Bu delesyonlarla ilgili daha fazla çalışma yapılması ve anomali oranının geniş olgu serilerinde incelenerek ortaya konması gerekmektedir.

Çalışma bulgularımızın literatür ile karşılaştırılması Tablo 5.1'de verilmiştir.

Tablo 5.1. Ph⁺ KML olgularında ASS (9q34) gen bölgesi delesyonlarına ait verilerin literatür bilgileriyle karşılaştırılması .

Araştırma Grubu	Yıl	Olgu Sayısı	Kullanılan Yöntem	ASS (9q34) Delesyon Oranı	Prognoz Değerlendirmesi
Herens ve ark.	2000	51	FISH	%9.8	Kötü prognoz
Sinclair ve ark.	2000	55	FISH PCR	%29	Kötü prognoz
Cohen ve ark.	2001	94	FISH Array RT-PCR	%15	Kötü prognoz
Kolomietz ve ark.	2001	250	FISH Klasik sitogenetik	%9	Kötü prognoz
Huntly ve ark.	2001	253	FISH	%15	Kötü prognoz
Lim ve ark.	2005	96	FISH	%13.5	Kötü prognoz
Quintas-Cardama ve ark.	2005	320	FISH	%9	Kötü prognoz
Fourouclas ve ark.	2006	69	FISH	%19	Kötü prognoz
Kreil ve ark.	2007	339	MLPA	%17	Kötü prognoz
Kim ve ark.	2008	163	FISH	%13.5	İlişkili değil
Patel ve ark.	2009	78	FISH Klasik sitogenetik	%11	İlişkili değil
Castagnetti ve ark.	2010	521	FISH Klasik sitogenetik RT-PCR	%12	İlişkili değil
Bizim çalışmamız	2011	30	FISH Klasik sitogenetik	%36.6	Kötü prognoz

5.2. Olgulara Ait Hematolojik, Klasik Sitogenetik/Moleküler Sitogenetik ve Moleküler Yanıt Bilgilerinin *ASS* (9q34) Delesyonu İle İlişkisinin Değerlendirilmesi

Prognostik önemi tartışmalı olan *ASS* (9q34) delesyonları; klasik kemoterapi, interferon- α ve imatinib tedavisi alan olgularda düşük oranda tedavi yanıtı ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Yapılan çalışmalarda *ASS* delesyonlarının prognostik önemine ait farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Herens ve arkadaşlarının çalışmalarına dahil ettikleri 51 olgu, IFN- α ve hidroksiüre tedavisi almıştır. Delesyon belirlenen 5 hastada hematolojik, sitogenetik ve moleküler yanıt değerlendirmesi yapılmıştır. Yapılan incelemelerde delesyon saptanan 5 hastada, hastalığın faz değiştirdiği tespit edilmiştir. Hastalar takip aşamasındayken kaybedilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada *ASS* (9q34) delesyonları kötü prognostik faktör olarak belirlenmiştir (31).

Sinclair ve arkadaşları çalışmalarına dahil ettikleri 55 Ph⁺ KML olgusunun klinik özellikleri, tedavi geçmişleri ve bu hastaların hayatta kalımlarına dair bilgiler değerlendirilmiştir. Hastalar IFN- α tedavisi almıştır. Elde edilen analiz sonuçlarına göre varlığı belirlenen *ASS* (9q34) delesyonları kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (69).

Huntly ve arkadaşları, IFN- α ve hidroksiüre tedavisi alan hastalarda yaptıkları analizler sonucunda meydana gelen *ASS* (9q34) delesyonlarının Ph kromozomu ile eş zamanlı olarak gerçekleştiğini belirlemiştir. Hastaların yaşam eğrileri bu delesyonlarla ilişkilendirilmiş ve *ASS* (9q34) delesyonlarının güçlü bir prognostik belirleyici olabileceği düşüncesi tartışılmıştır. Belirlenen *ASS* (9q34) delesyonları kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (35).

Herens, Sinclair, Huntly ve arkadaşları konvansiyonel kemoterapi, IFN- α ve hidroksiüre ile tedavi edilen KML'li hastalarda *ASS* (9q34) delesyonlarını, tedaviye düşük yanıt oranı ve kötü prognozla ilişkilendirmiştir. Tirozin kinaz inhibitörlerinin kullanımından önce kronik faz Ph⁺ KML'de tedavi seçenekleri olarak, lökosit sayısının

azaltılmasına yönelik (busulfan, hydroxyurea gibi), IFN- α ve AKHN idi (5, 24, 36). Yapılan çalışmalar bu tedavi yöntemleriyle hasta takip süresinin günümüze göre kısa olduğunu ve sağ kalım oranının düşük olduğunu göstermektedir. Son 10 yıldır ise; imatinibin ilk basamak tedavi olarak yerini almasıyla hastalarda daha uzun takip süresi elde edilmiş ve sağ kalım oranı %90'ların üzerine çıkmıştır. Bizim çalışmamızda olgularımızın %93'ü imatinib tedavisi almıştır. Dolayısıyla hastaların takip süresi uzamıştır ve kaybedilen hasta bulunmamaktadır. İmatinibin keşfinden önce kötü prognoz, hastanın kaybedilmesiyle ilişkilendirilirken günümüzde tedaviye yanıtızlık veya geç yanıt alınması olarak tanımlanmaktadır. Dolayısıyla olgularımızın prognoz değerlendirmesi tedaviye yanıt kriterlerine bakılarak yapılmıştır. Çalışmamız delesyon bulunan hastalarımızda tedaviye yanıt oranının düşük görülmesi ve dolayısıyla ASS (9q34) delesyonlarının kötü prognozla ilişkilendirilmesi açısından uygunluk göstermiştir.

Cohen ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmaya dahil edilen 94 hastanın 29'unda 6. aydan sonraki hematolojik yanıt oranları ve sitogenetik yanıt oranları değerlendirilmiştir. Delesyon saptanan 14 hastanın 12'si IFN- α tedavisi aldığı bildirilmiştir. Yapılan bu çalışmada hastalığın faz farkları olmaksızın delesyonlu ve delesyonsuz olgular karşılaştırılmıştır. Delesyonsuz hastalarda tedaviye yanıt oranı %59 iken, ASS delesyonu belirlenen hastalarda bu oran %25'e düşmektedir. Yani ASS (9q34) delesyonu saptanan hastalar prognostik açıdan kötü olarak değerlendirilmiştir (12).

Çalışmamız *Cohen ve arkadaşlarının* çalışmasıyla farklı tedavi protokolleri izlenmesine rağmen, ASS (9q34) delesyonlarının kötü prognozla ilişkilendirilmesi açısından uyumludur.

Kolomietz ve arkadaşları ise çalışmalarında takibe alınan hastalarda delesyon saptanan olguların ilk 12. ay içinde hastalığın yüksek sıklıkta nüks ettiğini belirlemiştir. Hastalar IFN- α tedavisi almaktadır. Delesyon saptanan KML olguları delesyon saptanmayan olgularla karşılaştırıldığında bu büyük submikroskopik delesyonların hastalığı kötü prognoza götürebileceği belirlenmiştir (40)

Çalışmamızda ele aldığımız olgularımız yeni tanı aşamasındadır ve imatinib tedavisi altında 12 aylık süreyi doldurmamış az sayıda hastamız bulunmaktadır. Bu hastalar için delesyonların prognozu etkileyebileceğini söylemek henüz erkendir. Takip aşamasında 12. ay sitogenetik yanıt açısından değerlendirebildiğimiz hastalar için çalışmamız *Kolomietz ve arkadaşlarının* çalışmasıyla uygulanan tedavi protokolü bakımından uyum göstermezken, tedaviye yanıt açısından uyumludur.

Lim ve arkadaşları yaptıkları çalışmanın sonucunda *ASS* lokusunu da içeren major 9q delesyonunu standard doz imatinib tedavisi alan hastalarda tedaviye yanıt oranıyla ilişkilendirmişlerdir. Bu delesyonların KML için kötü prognostik bir marker olabileceği tartışılmıştır (71).

Quintas-Cardama ve arkadaşları, çalışmalarında belirledikleri *ASS* (9q34) delesyonunun imatinib alan erken kronik fazdaki olgularda tedaviye yanıt oranının düşmesine sebep olduğu sonucuna varmıştır (61).

Fourouclas ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışma ise daha çok 9q üzerinde tanımlanan büyük ve küçük delesyonların imatinib tedavisine verebilecekleri yanıtların farklı olup olmadığı sorgulanmıştır. Delesyon saptanan hastaların yaşam süreleri bakıldığında büyük delesyon taşıyan hastaların küçük delesyon taşıyanlara göre daha kısa bir yaşam süresine sahip oldukları sonucuna varılmıştır. Bunun sebebi olarak geniş bir alanın kaybının, tümör supressör gen kayıpları açısından önemli olabileceği tartışılmıştır (23).

Bizim çalışmamızda araştırma dahilindeki tüm olgular 3.ayda hematolojik yanıt, 12.ayda sitogenetik yanıt ve 18. ayda moleküler yanıt, tedavi geçmişleri açısından değerlendirilmiştir. Delesyon saptadığımız olgularımızda, ilaç alınımını takip eden 12.ay sitogenetik/moleküler sitogenetik yanıt oranı değerlendirilmiş ve bu olguların %54 oranında tedaviye yanıt vermediği saptanmıştır. Yaptığımız çalışma, *ASS* delesyonlarının kötü prognozla ilişkilendirilmesi açısından *Lim*, *Quintas-Cardama*, *Fourouclas ve arkadaşlarının* yapmış olduğu çalışmalarla uyumludur.

Kreil ve arkadaşlarının çalışmasına dahil edilen olgular kronik fazdaki Ph⁺ KML hastasıdır. Bu hastalara ilk basamak tedavi olarak interferon- α verilmiştir. Daha sonra hastaların bir kısmının imatinib tedavisine geçişi görülmüştür. Yapılan hematolojik, sitogenetik ve moleküler incelemeler sonucunda delesyonlu ve delesyonsuz hastalar arasında hayatta kalma süresi açısından bir fark görülmemiştir. Delesyon belirlenen 59 hastanın 47'sinde sitogenetik veriler elde edilmiştir. Belirlenen 47 olgunun 10'unda major sitogenetik yanıt elde edilirken 5'inde sitogenetik olarak tam remisyona görülmüştür (41).

Kim ve arkadaşları, 9q delesyonları üzerinde yapmış oldukları çalışmada KML'de *BCR-ABL* füzyon transkripsiyonu, sitogenetik ve moleküler yanıt, yanıt kaybı, imatinib tedavisinde başarısızlık gibi kriterlerin bu delesyonla ilişkisi ortaya konmuştur. Çalışmaya dahil edilen olgularda imatinib tedavisi alınmaya başlanan süreç boyunca hematolojik, sitogenetik ve moleküler yanıt açısından delesyon saptanan ve saptanmayan olgular karşılaştırılmıştır. İki grup arasında tedavi sürecinde sitogenetik ve moleküler yanıt açısından bir fark görülmemiştir (37).

Patel ve arkadaşları, KML hastalarında 9q ve 22q'daki kırılma ve füzyon noktalarındaki kayıpların prognostik etkilerini belirlemek üzere bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Hastalar alınan tedaviye yanıt oranlarına göre sınıflandırılmışlar ve 33'ünün tam yanıt, 3'ünün kısmi yanıt verdiği gözlenirken 54 hastanın ise yanıt vermediği belirlenmiştir. Tedaviye cevap vermeyen hastalarda 9q üzerinde *ABL-BCR* delesyonu %47.8 oranında görülmüştür. Tedavi öncesi hastalarda *ASS* (9q34) delesyonunun görülme oranı %11 olarak belirlenmiştir. Her iki grup karşılaştırılmış ve 9q'daki delesyonlar tedavi yanıtıyla ilişkilendirilmemiştir (58).

Castagenetti ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada, delesyonlu ve delesyonsuz hastaların imatinib tedavisi almaya başlamasından sonraki 46 aylık takip süreleri hematolojik, sitogenetik ve moleküler yanıt açılarından değerlendirilmiş ve iki grup arasında önemli bir fark görülmemiştir (10).

Kreil, Kim, Patel, Castagnetti ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada imatinib alan hastalarda tedavi öncesi delesyonlu ve delesyonsuz hastalar arasında hematolojik, sitogenetik ve moleküler yanıtlar açısından önemli bir farka rastlanmamıştır. Prognostik değerlendirme açısından çalışmamızla uyumlu bulunmamaktadır. Ancak literatürlere bakıldığında, çoğu çalışma *ASS (9q34)* gen bölgesi delesyonlarını kötü prognostik bir belirteç olarak göstermektedir ve prognostik açıdan çalışmamızla uyumludur. Az sayıda çalışma da *ASS (9q34)* gen bölgesi delesyonlarıyla tedaviye yanıt arasında bir ilişki kuramamıştır. Derivatif 9 kırık noktası olan *ASS (9q34)* gen bölgesi kayıplarının tedaviye yanıt, remisyona girme süresi, relaps ile ilişkisini araştırıp prognostik değerinin belirlenmesi için daha geniş olgu serilerine ihtiyaç vardır.

Çalışma bulgularımızın prognostik açıdan literatür bilgileriyle karşılaştırılması Tablo 5.1’de verilmiştir.

5.3. İlave Anomali Belirlenen Olgularda *ASS (9q34)* Gen Bölgesi Yeniden Düzenlenmesine Ait Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Bu konuda yapılan tek araştırma sonucu olan *Herens ve arkadaşlarının* çalışmasında ilave anomali saptanan hastaların blastik ve akselere fazlara geçtiği görülmüş ve bu hastalar takip aşamasındayken kaybedilmiştir. İlave anomali görülen bu olguların *ASS (9q34)* delesyonu açısından pozitif olduğu belirlenmiştir (31).

Bizim çalışmamızda ise takibini yaptığımız, ilave anomali belirlediğimiz olgularımız *ASS (9q34)* açısından negatif olarak değerlendirilmiştir. *Herens ve arkadaşlarının* çalışmasında hastalara IFN- α tedavisi uygulanırken, bizim çalışmamızda hastaların büyük bir kısmı imatinib tedavisi almaktadır. Çalışmamızın sonuçları *Herens ve arkadaşlarının* çalışma sonuçları ile uyumlu bulunmamıştır. Bu konuda literatürde yeterli veri bulunmadığından sonuçların bu çalışma verileri ile tartışılması gerektiği kanısındayız. Bu konuda yapılacak geniş olgu serilerinin dahil olduğu çalışmalara ihtiyaç vardır.

5.4. Varyant Ph Belirlenen Olgularda ASS (9q34) Gen Bölgesi Yeniden Düzenlenmelerine Ait Verilerin Değerlendirilmesi

Kronik miyelositer lösemide ASS (9q34) delesyonlarının görülme sıklığı klasik Ph saptanan olgularda %17 oranındayken varyant Ph saptanan olgularda bu oran %45'e çıkmaktadır (63).

Reid ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptıkları çalışmaya KML tanısı almış ve varyant Ph kromozomu saptanmış 2 olgu dahil edilmiştir. Hastalardan birinde 1, 9 ve 22. kromozomun dahil olduğu kompleks varyant Ph kromozomu görülürken diğer hastada ise 5, 9, 17, ve 22. kromozomların dahil olduğu kompleks varyant bir Ph kromozomu saptanmıştır. Bu olgularda ASS (9q34) delesyonu saptanmamıştır (63).

Huntly ve arkadaşları 2001 yılında, çalışmalarına dahil edilen 253 hastanın 41'inde ise varyant Ph kromozomu belirlemiştir. Varyant Ph translokasyon taşıyıcısı 41 hastanın 16'sında (%39) delesyon saptanırken klasik Ph saptanan 212 olgunun 25'inde yani %11 oranında ASS (9q34) delesyonu saptanmıştır. Klasik Ph belirlenen olgularda 9q delesyon oranı %11 iken varyant Ph bulunan olgularda delesyon oranı %41 olarak bulunmuştur (35).

Naumann ve arkadaşları 2003 yılında varyant Ph kromozomu taşıyan KML olgularını ele almışlardır. Blastik fazdaki 3 KML hastası GTG bantlama ve FISH tekniği kullanılarak analiz edilmiş ve bu olgularda varyant Ph kromozomu saptanmıştır. Varyant Ph saptanan olguların birinde ASS (9q34) delesyonu saptanmamıştır (53).

Yapılan çalışmalarda klasik Ph kromozomu ile karşılaştırıldığında ASS (9q34) delesyonlarına rastlanma oranının varyant Ph kromozomu saptanan olgularda 3 kat arttığı görülmektedir. Bizim çalışmamızda 1 olgumuzda 6. kromozom yeniden düzenlenmesi olarak tanımladığımız varyant Ph translokasyonu saptanmıştır. Fakat varyant olan bu olgumuzda ASS (9q34) delesyonu görülmemiştir. Görüldüğü gibi literatürde de çok az çalışmanın olması ve olgu serimizde sadece bir varyant Ph translokasyonu olan hastanın bulunması nedeniyle sonuçların sağlıklı değerlendirilmesi

oldukça zordur. Bu konuda yapılacak geniş olgu serilerinin dahil olduğu çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Tablo 5.2. Varyant Ph^+ olarak belirlenen KML olgularında *ASS* (9q34) gen bölgesi delesyonlarına ait verilerin literatür bilgileriyle karşılaştırılması .

Araştırma Grubu	Yıl	Varyant Olgu Sayısı	Kullanılan Yöntem	ASS (9q34) Delesyon Oranı
Reid ve ark.	2000	2	FISH Klasik sitogenetik	-
Huntly ve ark.	2001	41	FISH	%41
Naumann ve ark.	2003	3	FISH Klasik sitogenetik	%33
Bizim çalışmamız	2011	1	FISH Klasik sitogenetik	-

6. SONUÇ

Araştırma grubunu oluşturan 30 Ph⁺ KML olgusunun kemik iliği örneklerine *ASS* (9q34) delesyonunu değerlendirmek üzere FISH analizi yapılmıştır. İmatinib tedavisi altında 3. ay hematolojik yanıt, 12. ay sitogenetik/moleküler sitogenetik, 18. ay moleküler yanıtları değerlendirilmiştir.

Klasik sitogenetik ve FISH analizleri ile *ASS* (9q34) gen bölgesi kayıplarıyla olguların tedaviye yanıt oranları arasındaki ilişki ortaya konmaya çalışılmıştır.

1. Çalışmamıza dahil edilen Ph⁺ KML olgularında, FISH analizi ile *ASS* (9q34) gen bölgesi delesyonları %36.6 oranında saptanmıştır.
2. Delesyon görülen olgularımızda 12. ay sitogenetik yanıt oranının düşük olduğu saptanmış ve *ASS* (9q34) delesyonları kötü prognostik olarak değerlendirilmiştir.
3. Olgularımızın %13'ünde ilave kromozom anomalisi gözlenmiştir.
4. Varyant Ph ve ilave kromozom anomalisi belirlediğimiz olgularımızda *ASS* (9q34) delesyonu saptanmamıştır.
5. Çalışmamız Türk populasyonunda Ph⁺ KML olgularında *ASS* (9q34) gen bölgesi yeniden düzenlenmelerinin FISH yöntemi kullanılarak incelendiği ilk çalışmadır.

Gelecekte 9q delesyonları imatinib tedavisi alan hastalarda sitogenetik ve moleküler yanıtlar açısından prognostik bir marker olarak değerlendirilebilir. Gerçekleştirdiğimiz çalışma ve sonraki dönemlerde FISH tekniğine ek olarak planlanacak moleküler yöntemlerle de desteklenecek çalışmalar, yeni takip ve tedavi protokollerinin geliştirilmesinde klinisyenlere yol gösterici olabilecektir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Ali, R., 2006, Akut lösemiler WHO sınıflandırması ve nadir akut lösemi tipleri, TürkHematoloji Derneği' nin eğitim çalışmalarından bilimsel alt komite kursları akutlösemi kursu, Anemon Otel, Aydın.
2. Aoun, P., Wiggins, M., Pickering, D., Foran, J., Rasheed, H., Pavletic, S.Z. and Sanger, W., 2004, Interphase fluorescence in situ hybridization studies for the detection of 9q34 deletions in chronic myelogenous leukemia: a practical approach to clinical diagnosis, Elsevier, 154,138-143p.
3. Arrighi, F. and Rao, P.N.,1980, Genes, Chromosomes and neoplasia, Raven Pres, New York.
4. Artan, S., 1996, Teorik ve pratik floresan in situ hibridizasyon, Ed. Başaran, N., ETAM, Eskişehir, 5-35s.
5. Barrett, J., 2003, Allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia, Seminars in Hematology, 40(1),59-71p.
6. Baccarani, M. and Palandri, F., 2009, Response definitions and European Leukemianet Management recommendations, Best Pract. Res. Clin. Haematol, 22(3), 331-341p.
7. Bennour, A., Senana, H., Laatiri, M.A., Elloumi, M., Khelif, A. and Saad, A., 2009, Molecular cytogenetic characterization of variant philadelphia translocation in chronic myeloid leukemia, Genesis and Deletion of Derivatif Chromosome 9, Elsevier, 194,30-37p.
8. Bernstein, R., 1984, Pinto MR: "Masked" Ph chromosome abnormalities in CML: Areport of two unique cases, Blood, Vol.63, 2, 399-406p.
9. Boxer, LM., 1994, The Role of oncogenes in hematologic malignancies, Annu Rev. Med ,4,1-11p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

10. Castagnetti, F., Testoni, N., Luatti, S., Marzocchi, G., Mancini, M., Kerim, S., Giugliano, E., Albano, F., Cuneo, A., Abruzzese, E., Martino, B., Palandri, F., Amabile, M., Iacobucci, I., Alimena, G., Pane, F., Martinelli, G., Saglio, G., Baccarani, M. and Rosti, G., 2010, Deletions of the derivative chromosome 9 do not influence the response and the outcome of chronic myeloid leukemia in early chronic phase treated with imatinib mesylate: GIMEMA CML Working Party Analysis, Journal of clinical oncology, Vol.28, No:6.
11. Champlin, R.E. and Golde, D.W., 1990, Chronic myelogenous leukemia: Recent advances, Blood, Vol.65, No:5,10339-1047p.
12. Cohen, N., Rozenfeld-Granot, G., Hardan, I., Amariqlio, N., Rechavi, G. and Trakhtenbrok, L. and Brok-Simoni, F., 2001, Subgroup of patients with Philadelphia-positive chronic myelogenous leukemia characterized by a deletion of 9q proximal to ABL gene: Expression profiling, resistance to interferon therapy, and poor prognosis, Cancer genetics and cytogenetics, 128,114-119p.
13. Deininger, M.W., Goldman J.M. and Melo, J.V., 2000, The molecular biology of chronic myeloid leukemia, Blood, 96(10), 3343-3356p.
14. Druker, B.J., Guilhot, F., O'Brien, S.G., Gathmann, I., Kantarjian, H., Gattermann, N., Deininger, M.W.N., Silver, R.T., Goldman, J.M., Stone, R.M., Cervantes, F., Hochhaus, A., Powell, B.L., Gabrilove, J.L., Roussetot, P., Reiffers, J., Cornelissen, J.J., Hughes, T., Agis, H., Fischer, T., Verhoef, G., John Shepherd, J., Saglio, G., Gratwohl, A., Nielsen, J.L., Radich, J.P., Simonsson, B., Taylor, K., Baccarani, M., So, C., Letvak, L. and Larson, A.R., 2006, Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia, The New England Journal of medicine, 355(23), 2408-2417p.
15. Durak Aras, B., 2010, Hematolojide sitogenetik ve FISH kullanımı, Klinisyenler için uygulamalı moleküler hematoloji kursu, İstanbul.
16. Durak, B., 2006, Hematolojik malign hstalıklarda moleküler sitogenetik algoritmeler, 7. ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik kongresi, Kayseri.
17. Durak, B., 2006, Hematolojide FISH, Klinik hematoloji için pratik genel yaklaşım kursu, Antalya.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

18. Durak, B., 2005, Hematolojide FISH, Moleküler hematoloji ve sitogenetik alt komitesi temel moleküler hematoloji kursu, Mersin.
19. Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, Z., O'Brien, S., Kurzrock, R. and Kantarjian, H.M., 1999, The biology of chronic myeloid leukemia, The New England Journal of medicine, 341(3),164-172p.
20. Fırat, D., Akdaş, A., Atakan I.A., Baltalı E., Berk Ö., Berkardo B., Bilge N., Büyükpamukcu, M., Çevik N. (Çeviri), 1990, Klinik Onkoloji, Dördüncü baskı, Sağlık Bakanlığı Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Ortak Yayını.
21. Fialkow, P.J., Demmon, A.M. and Jacobson, R.J., 1978, Chronic myelocytic leukemia, Journal of clinical investigation, 62,823-825p.
22. Fialkow P.J., Jacobson, R. and Papayannopoulou, T., 1997, Chronic myelocytic leukemia: Clonal origin in a stem cell common to granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage, The American Journal of medicine, Vol. 63, 125-130p.
23. Fourouclas, N., Campbell, P.J., Bench, A.J., Swanton, S., Baxter, E.J., Huntly, B.J. and Gren, A.R., 2006, Size matters: The prognostic implications of large and small deletions of the derivative 9 chromosome in chronic myeloid leukaemia, Haematologica, 91, 952-955p.
24. Giles, F.J., Feldman, E.J., Roboz, G.J.,Larson, R.A., Mamus, S.V., Cortes, J.E., Verstovsek, S., Faderl, S., Talpaz, M., Beran, M., Albitar, M., O'Brien, S.M. and Kantarjian, H.M., 2003, Phase II study of troxacitabine, a novel dioxolane nucleoside analog, in patients with untreated or imatinib mesylate-resistant chronic myelogenous leukemia in blastic phase, Leukemia Research, 27(12),1091-1096p.
25. Goldman, J.M. and J.V. Melo, 2003, Chronic myeloid leukemia-advances in biology and new approaches to treatment, , The New England Journal of medicine 349(15), 1451-1464p.
26. Gordon, M.Y., 1987, Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia, Nature, 328(6128), 342-344p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

27. Gratwoh-Baldomero, A., Passweg, J., Frassoni, F., Niederwieser, D., Schmitz, N. and Urbano-Ispizua, A., 2003, Hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies in Europe, *Leukemia*,17(5), 941-959
28. Güran, Ş., Hematolojik hastalıklarda sitogenetik, Temel moleküler hemotoloji kursu, Ankara.
29. Haznedaroğlu, İ.C., 2010, BCR-ABL hedefine yönelik kronik miyeloid lösemi (KML) tedavisi, Klinisyenler için uygulamalı moleküler hematoloji kursu, İstanbul.
30. Heinrich, M.C., Griffith, D.J., Druker, B.J., Wait, C.L., Ott, K.A. and Zigler, A.J., 2000, Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor, *Blood*, 96(3), 925-932p.
31. Herens, C., Tassin, F., Lemaire, V., Beguin, Y., Collard, E., Lampertz, S., Croisiau, C., Lecomte, M., Prijk, B.D., Longree, L. and Koulischer, L., 2000, Deletion of the 5'-ABL region: A recurrent anomaly detected by fluorescence in situ hybridisation in about 10% of Philadelphia-positive chronic myeloid leukaemia patients, *British Journal of haematology*, 110, 214-216p.
32. <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Anomalies/t0922CML.html>
33. <http://xenia.sote.hu/depts/pathophysiology/hematology/e/who-classification.html>
34. Huntly, B.J., Bench, A. and Gren, A.R., 2003, Double jeopardy from a single translocation: Deletions of the derivative chromosome 9 in chronic myeloid leukemia, *Blood*, 102,1160-1168p.
35. Huntly B.J, Reid, A.G., Bench A.J., Campel, L.J., Telford, N., Shepherd, P., Szer, J., Prince, H.M., Turner, P., Grace, C., Nacheva E.P. and Green A.R., 2001, Deletions of the derivative chromosome 9 occur at the time of the Philadelphia translocation and provide a powerful and independent prognostic indicator in chronic myeloid leukemia, *Blood*, 98, 1732-1738p.
36. I., R., Larson R.S., 2004, Chronic Myeloid Leukemia, *Wintrobe's Clinical Hematology*. 11th ed. Volume 2:Lippincott Williams&Wilkins, 2235-2258.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

37. Kim D.H., Popradi, G., Sriharsha, L., Kamel-Reid, S., Chang, H., Messner, H.A. and Lipton J.H., 2008, No significance of derivative chromosome 9 deletion on the clearance kinetics of BCR/ABL fusion transcripts, cytogenetic or molecular response, loss of response, or treatment failure to imatinib mesylate therapy for chronic myeloid leukemia, *Cancer*,113, 772-781p.
38. Knudson, AG., 2001, Two genetic hits (more or less) to cancer, *Nature*, Vol.1, 157p.
39. Koeffler, H.P., and Golde, D.W., 1981, Chronic myelogenous leukemia-new concepts, *The New England Journal of medicine*, Vol.304, No:20, 1201-1209p.
40. Kolomietz, E., Al-Maghradi, J., Brennan, S., Karaskova, J., Minkin, S., Lipton, J. and Squire, J.A., 2001, Primary chromosomal rearrangements of leukemia are frequently accompanied by extensive submicroscopic deletions and may lead to altered prognosis, *Blood*, 97, 3581-3588p.
41. Kreil, S., Pfirrmann, M., Haferlach, C., Waghorn, K., Chase, A., Hehlmann, R., Reiter, A., Hochhaus, A. and Cross, N.C., 2007, Heterogeneous prognostic impact of derivative chromosome 9 deletions in chronic myelogenous leukemia, *Blood*, 110, 1283-1290p.
42. Kumar, V., Cotran, R.S. and Robbins, S.L., 2003, *Robbins Temel Patoloji*, (Çev:Çevikbaş U.), Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.
43. Kurzrock, R. and Gutterman, J.U., 1988, The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias, *The New England Journal of medicine*, Vol.1819, No:15, 990-998p.
44. Kurzrock, R., Shtalrid, M., Romero, P., Kloetzer, W.S., Talpas, M., Trujillo J.M., Blick, M., Beran, M. and Gutterman, J.U., 1987, A novel c-abl protein product in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia, *Nature*, 325(6105), 631-635.
45. Kurzrock, R. and Talpaz, M.,1999, *Molecular biology in cancer medicine*, Second edition, Martin Dunitz ltd., France.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

46. Lüleyap ,H. Ü., 2008, Moleküler genetiğin esasları, Nobel Kitabevi, Adana.
47. Mc Laughlin, J.C., 1987, In vitro Transformation of immature haematopoetic cells by the P210 bcr/abl oncogene product of the Philadelphia chromosome, Proc. Natl. Acad. Sci, USA, Vol.84, 6558-6562p.
48. McWhirter, J.R., Galasso, D.L., and Wang, J.Y., 1993, A coiled-coil oligomerization domain of BCR is essential for the transforming function of BCR-ABL oncoproteins, Molecular and cellular biology, 13(12), 7587-7595p.
49. Melo, J.V. and Deininger, M.W., 2004, Biology of chronic myelogenous leukemia signaling pathways of initiation and transformation, Hematology/Oncology Clinics of North America, 18(3), 545-568p.
50. Melo, J.V., 1996, The molecular biology of chronic myeloid leukaemia, Leukemia, 10(5),751-756p.
51. Melo, J.V., Myint, H., Galton, D.A. and Goldman, J.M.,1994, P190BCR-ABL chronic myeloid leukaemia: the missing link with chronic myelomonocytic leukaemia, Leukemia, 8(1), 208-211p.
52. Morris, C.M., Reeve, A.E. and Fitzgerald, P.H., 1986, Genomic diversity correlates with clinical variation in Ph negative chronic myeloid leukaemia, Nature, 281-283p.
53. Naumann, S. and Decker, H.J., 2003, Genesis of variant Philadelphia chromosome translocations in chronic myelocytic leukemia, Cancer genetics and cytogenetics, 47, 18-22p.
54. Nussbaum, R.L., Mc Innes, R.R. and Willard, H.F., 2005, Thompson&Thompson Tıbbi Genetik, Güneş Kitabevi, 311- 330p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

55. O'Brien, S.G., Guilhot, F., Larson, R.A., Gathmann, I., Baccarani, M., Cervantes, F., Cornelissen, J.J., Fischer, T., Hochhaus, A., Hughes, T., Lechner, K., Nielsen, J.L., Rousselot, P., Reiffers, J., Saglio, G., Shepherd, J., Simonsson, B., Gratwohl, A., Goldman, J.M., Kantarjian, H., Kerry Taylor, K., Verhoef, G., Bolton, A.E., Capdeville, R. and Drukeri, B.J., 2003, Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia, *The New England Journal of medicine*, 348(11), 994-1004p.
56. Oski F.A and Nathan, D.G., 1987, *Hematology of infancy and childhood*, W.B. Saunders Company, Philadelphia.
57. Pane, F., Frigeri, F., Sindona, M., Luciano, L., Ferrara, F., Cimino, R., Meloni, G., Saglio, G., Salvatore, F. and Rotoli, B., 1996, Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction), *Blood*, 88(7), 2410-2414p.
58. Patel, B.P., Trivedi, P.J., Brahmabhatt, M.M., Gajjar, S.B., Iyer, R.R., Dalal, E.N., Shukla, S.N., Shah, P.M. and Bakshi, S.R., 2009, Detection of derivative 9 deletion by BCR-ABL fluorescence in-situ hybridization signal pattern to evaluate treatment response in CML patients, *Vol 17, No 1-2*.
59. Provan, D., Gibben, J., 2010, *Molecular hematology*, 3. Edition, Blackwell Publishing ltd., UK.
60. Puil, L., Liu, J., Gish, G., Mbamalu, G., Bowtell, D., Pelicci, P.G., Arlinghaus, R. and Pawson, T., 1994, Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway, *The EMBO Journal*, 13(4), 764-773p.
61. Quintas-Cardama, A., Kantarjian, H., Talpaz, M., O'Brien, S., Manero, G., Verstovsek, S., Rios, M.B., Hayes, K., Glassman, A., Bekele, B.N., Zhou, X. and Cortes, J., 2005, Imatinib mesylate therapy may overcome the poor prognostic significance of deletions of derivative chromosome 9 in patients with chronic myelogenous leukemia, *Blood* 105, 2281-2286p.
62. Radich J. P., 2007, *The biology of CML blast crisis*, Clinical Research Division, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

63. Reid, A., Gribble, S.M., Huntly, B.J., Andrews, K.M., Campbell, L., Grace, C.D., Wood, M.E., Green, A.R. and Nacheva, E.P., 2001, Variant Philadelphia translocations in chronic myeloid leukemia can mimic typical blast crisis chromosome abnormalities or classic t(9;22): a report of two cases, 113, 439-442p.
64. Rowley, J.D., 1973, Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. Nature, 243(5405),290-293p.
65. Savage, D.G. and K.H. Antman, 2002, Imatinib mesylate-a new oral targeted therapy, The New England Journal of medicine, 346(9), 683-693p.
66. Shepherd, P., Suffolk, R., Halsey, J. and Allan, N., 1995, Analysis of molecular breakpoint and m-RNA transcripts in a prospective randomized trial of interferon in chronic myeloid leukaemia: no correlation with clinical features, cytogenetic response, duration of chronic phase, or survival, Journal of British Society of Haematology, 89(3), 546-554p.
67. Sawyers, C.L., Timson, L., Kawasaki, E.S. and Clark, S., 1990, Molecular relapse in chronic myelogenous leukemia patients after bone marrow transplantation detected by polymerase chain reaction, Proc.Natl. Acad. Sci, USA Vol.87, 563-567p.
68. Smoley, A.S. Brockman, S.R., Paternoster, S.F., Meyer, R.G. and Dewald, G.W., 2004, A novel tricolor, dual- fusion fluorescence in situ hybridization method to detect BCR/ABL fusion in cells with T(9;22)(q34;q11.2) associated with deletion of DNA on the derivative chromosome 9 in chronic myelocytic leukemia, Elsevier, 148,1-6p.
69. Sinclair , P.B., Nacheva, E.P., Leversha, M., Telford, N., Chang, J., Reid, A., Bench, A., Champion, K., Huntly, B. and Green, A.R., 2000, Large deletions at the t(9;22) breakpoint are common and may identify a poor prognosis subgroup of patients with chronic myeloid leukemia, Blood ,95, 738-744p.
70. Specchia, G., Minini, D., Guerrasio, A., Palumbo, G., Pastore, D. and Liso, V., 1995, Ph positive acute lymphoblastic leukemia in adults: molecular and clinical studies, Leukemia & Lymphoma,18 Suppl 1, 37-42p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

71. TH., Lim, Tien, S.L., Lim, P. and Lim, A., 2005, The incidence and patterns of BCR/ABL rearrangements in Chronic Myeloid Leukemia (CML) using fluorescence in situ hybridisation (FISH), The Annals academy of medicine, Singapore, Vol.34 No.9, 34, 533-538p.
72. Turgeon, M.L., 1999, Clinical hematology, theory and procedures (3. Edition) Lippincott Williams&Wilkins, USA.
73. Wiernik, P.H., Goldman, J.M., Dutcher, J.P. and Kyle, R.A., 2003, Neoplastic diseases of the blood, Fourth edition, UK,439p.
74. Wieser, R., Schreiner, U., Rieder, H., Pirc-Danoewinata, H., Gruner, H., Loncarevic, I.F. and Fonatsch, C., 2003, Interphase fluorescence in situ hybridization assay for the detection of rearrangements of the EVI-1 locus in chromosome band 3q26 in myeloid malignancies, Haematologica, 88(1), 25-30p.
75. Willams, W.S., Beutler, E., Litchman M.A., Coler, B.S., Kippt, S., Maurer, A.M., 1991, Willam's Hematology, 5. Edition, McGraw Hill Company, New York, 2209-2349p.

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Tuba MUTLU
Doğum tarihi ve yeri : 29.05.1983 İSTANBUL
Uyruđu : TC.
Medeni durumu : Bekar
İletişim adresleri : Paşabayır mah. Ordu cd. No: 14/3
Bandırma - Balıkesir
E-mail : tobemutlu@hotmail.com

Eğitim Durumu

1990-1998: Bandırma İlköğretim Okulu
1998-2002: Bandırma Anadolu Lisesi
2003-2007: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Biyoloji, Lisans
2008-2011: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakóltesi, Tıbbi Genetik A.D.,
Yüksek Lisans
Yabancı dil: İngilizce (iyi derecede)

Mesleki Deneyim

Stajer, Carlo Erba İlaç San. A.Ş., Mikrobiyoloji laboratuvarı, Topkapı – İstanbul,
2006
Stajer, Bandırma Kapıdağ Devlet Hastanesi, Biyokimya laboratuvarı, Bandırma –
Balıkesir, 2006
Laborant, Bandırma Özel Hastanesi, Biyokimya ve Mikrobiyoloji laboratuvarı,
Bandırma – Balıkesir, 2008
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Genetik A.D. (GENTAM), Kanser
Sitogenetiği ve Moleküler Sitogenetiği (FISH), Eskişehir, 2008-2011.

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar

Biyologlar Derneği

Yayımlar

1. Beyhan Durak Aras, Olga Meltem Akay, **Tuba Mutlu**, Vahap Aslan, Eren Gündüz, Sevilhan Artan, Zafer Gülbaş, Ph+ KML Olgularında ASS Gen Bölgesi Yeniden Düzenlenmelerini FISH Analizi İle Değerlendirilmesi, 36. Ulusal Hematoloji Kongresi, 2010, Antalya. (Poster)

Bilimsel Etkinlikler

:

- 2007 : GMP Eğitimi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir
- 2007 : ISO 9001-2000 Eğitimi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir
- 2009 : IV. Kök Hücre Sempozyumu, Bilkent Oteli, Ankara
- 2010 : Klinisyenler İçin Moleküler Hematoloji Kursu, Topkapı Eresin Otel, İstanbul
- 2010 : Türkiye Üniversiteleri Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürleri XXII. Toplantısı, ESOGÜ Kongre Merkezi, Eskişehir.