

## Lösemilerin Genetik Tanısında Sitogenetik ve Floresan In Situ Hibridizasyon Yöntemlerinin Etkinliğinin Değerlendirilmesi

### Efficiency Of Cytogenetic And Fluorescence In Situ Hybridization Techniques In Genetic Evaluation Of Leukemia

Yasemin SOYSAL<sup>1</sup>, Muhterem BAHÇE<sup>2</sup>,  
M.Cengiz YAKICIER<sup>3</sup>, Ahmet İFRAN<sup>4</sup>, A. Emin KÜREKÇİ<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD, Afyonkarahisar

<sup>2</sup> Gülhane Askeri Tıp Akademisi Tıbbi Genetik BD, Ankara

<sup>3</sup> Bilkent Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Ankara

<sup>4</sup> Gülhane Askeri Tıp Akademisi Hematoloji BD, Ankara

<sup>5</sup> Gülhane Askeri Tıp Akademisi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD, Ankara

**ÖZET:** **Amaç:** Lösemi hastalarının tanı alması aşamasında malign hücrenin kökeni, klinik özellikler ve tespit edilen genetik anomaliler önemli rol oynamaktadırlar. Genetik düzensizliğin tespiti tanıda ve hastalığın prognozunun takibinde önemli bilgiler verdiği için hassas ve uygun yöntemlerin kullanılması gereklidir. Çalışmamızda, lösemi hastalarında belirli genetik düzensizliklerin sitogenetik analiz ve Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) yöntemleri kullanarak araştırılması ve yöntemlerin etkinliğinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Çalışmamızda, 2003-2005 yılları arasında Gülhane Askeri Tıp Akademisi Tıbbi Genetik Bilim Dalı'na, Hematoloji BD ve Çocuk Hastalıkları Hematoloji BD'lerinden refere edilen toplam 64 hastadan alınan kemik iliği örnekleri konvansiyonel sitogenetik ve FISH yöntemleri kullanılarak incelenmiştir.

**Sonuç:** Kullanılan yöntemler içinde sitogenetik analizin sonuç vermede yüksek oranda yetersiz kalmasına karşın FISH yönteminin başarı oranının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

**Tartışma:** Sitogenetik analiz ile öngörülemeyen yeni anomalilerin bulunabilir olması bu yöntemin altın standart olarak çalışmasını desteklemektedir. Diğer yandan, FISH yönteminin interfaz hücrelerinde bile çalışmaya olanak sağlaması sonuç elde etme şansını arttırmaktadır. Bununla birlikte, Lösemilerin genetik açıdan takibinde, kriptik anomalilerden şüphelenildiğinde, tanı ve takip bilgileri dikkate alınarak sitogenetik ve moleküler sitogenetik yöntemlerinin sıralı olarak amaca uygun bir şekilde kullanılmasının faydalı olacağı kanaatine varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Lösemi, FISH, sitogenetik, genetik tanı

**ABSTRACT: Objective:** Genetic studies in leukemias are useful in giving accurate diagnosis, selecting appropriate therapy, monitoring the effect of therapy, detecting minimal residual disease, and determining overall prognosis. The goals of our study were to compare efficiency of cytogenetic analysis and Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) together or alone in detection of some genetic rearrangements in leukemia patients.

**Methods:** 64 patients' bone marrow samples from Gülhane Medical Academy (GATA) Department of Hematology and Department of Child Health and Diseases were studied by using conventional cytogenetic analysis and FISH methods in the GATA Department of Medical Genetics.

**Results:** Our results showed that in cytogenetic evaluation of leukemia patients, conventional cytogenetic analysis has insufficient than FISH in some respects.

**Conclusion:** Classical cytogenetic banding analysis is considered the gold standard for the detection of chromosome abnormalities in leukemias at diagnosis and prognosis. However, we found that FISH for known anomalies in remission and relaps of patients and for the patients whose karyotype analysis failed, is more benefit than classic cytogenetic banding analysis. We suggest that conventional cytogenetic analysis and FISH methods should be used together for better diagnosis.

**Key Words:** Leukemia, FISH, cytogenetic, genetic diagnosis

## GİRİŞ

Kanser, çeşitli genetik ve çevresel faktörlerin çok basamaklı bir süreç içinde hücrenin farklılaşması, bölünmesi ve çoğalması üzerindeki etkileriyle ortaya çıkan bir hastalıktır. Lösemi hastalarının malign hücreleri klonal kromozom anormallikleri gösterirler. Bu tekrarlayan anormalliklerin birisini tespit etmek, doğru teşhisi koymakta yardımcı olabilir, tedavinin seçimini etkiler ve prognozla ilgili bilgi verir. Lösemilerde görülen anormallikleri tespit etmede kullandığımız metodlar arasında, kemik iliği veya periferik kan örneklerinden konvansiyonel sitogenetik ile kromozomların karyotip analizi, moleküler sitogenetik yöntemlerden birisi olan FISH (Floresan In Situ Hibridizasyon) ve kantitatif PCR metodları sayılabilir.

Son yıllarda, lösemi hastalarının hayatta kalma sürelerinde ilerlemeler olmasına rağmen hastaların önemli bir yüzdesi lösemiye direnç, relaps ve/veya kemoterapinin şiddetli erken toksik etkisi nedeniyle ölmektedirler. Ayrıca pek çok hasta kemo- ve radyoterapinin geç ortaya çıkan yan etkileriyle mücadele etmekte ve hayat kaliteleri düşmektedir (1). Ortak olarak kullanılan klinik, hematolojik ve immunolojik prognostik faktörlere ilave olarak karyotip analizinin çocukluk çağı Akut Lenfoblastik Lösemilerinde (ALL) diğerlerinden bağımsız olan bir prognostik değeri olduğu kanıtlanmıştır (2). Kötü prognoz belirtisi olan özel translokasyonlar (ABL/BCR, MLL/AF4) tedavinin seçiminde belirleyici olarak kullanılmaktadırlar (3). Tedavi protokollerinde yer almıyor olsa da hiperdiploidi veya TEL/AML1 yeniden düzenlenmesi iyi prognoz belirtisidir ve karyotipi normal hastalarla aynı tedavi protokolünü görmekte bunlara özel “düşük risk protokolü” uygulanmamaktadır. Karyotip ve FISH sonuçları hastaların prognozu hakkında önemli bilgiler verirler bu nedenle en doğru ve etkili yöntemi kullanarak genetik sonuca ulaşmak lösemi hastalarının tedavi protokollerinin belirlenmesinde önem taşımaktadır.

Çalışmamızın amacı lösemi hastalarının teşhisi sırasında kullandığımız metodların güvenilirliğini, doğruluğunu, sonuç vermedeki yeterliliğini, başarı oranını, uygulanabilirliğini belirlemek ve lösemi hastalarının tanı ve takibi sırasında kullanılan bu metodların etkinliğini araştırmaktır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda, 2003-2005 yılları arasında Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA) Tıbbi Genetik Bilim Dalı'na, GATA Hematoloji BD'dan ve GATA

Çocuk Hastalıkları Hematoloji BD'ndan refere edilen toplam 64 hastadan alınan kemik iliği örnekleri incelenmiştir. Bu hastalardan KML hasta grubunda 20 hasta (8 kadın ve 12 erkek), ALL hasta grubunda 14 erişkin (7 kadın ve 7 erkek), 11 çocuk (8 kız ve 3 erkek) olmak üzere toplam 25 hasta, AML hasta grubunda 16 erişkin (6 kadın ve 10 erkek), 3 çocuk olmak üzere (2 kız ve 1 erkek) toplam 19 hasta ve genel toplamda 64 hasta konvansiyonel sitogenetik ve FISH yöntemleri kullanılarak çalışılmıştır.

Kemik iliği örneklerinde direkt hücre kültürü ve 24 saatlik hücre kültürü mitojen kullanılmadan %20 fetal calf serum ve antibiyotik eklenmiş RPMI 1640 (Biological Industries) besi yeri kullanılarak yapılmıştır. Hücreler rutin metodlara göre harvest edilmiş ve preparatlar hazırlanmıştır. Hazırlanan preparatlardan “International System for Human Cytogenetic Nomenclature” (ISCN) 2005'e göre her hastadan 20 GTG-bantlı metafaz alanı analiz edilmiştir (4). Yeterli metafaz bulunmadığında ise elde edilen sayıda metafaz, analiz edilmiştir. Çalışmamızda konvansiyonel sitogenetik için hazırlanan fiksatiflerden FISH analizi için yaymalar yapılmış ve bu preparatlara lösemi tipine göre en sık rastlandığı bilinen kromozom yeniden düzenlenmelerine ait LSI BCR/ABL ES (extra signal) Dual Color Translocation Probe, LSI AML1/ETO Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe, LSI CFBF Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe, LSI PML/RARA Dual Color Translocation Probe, LSI TEL/AML1 ES Dual Color Translocation Probe, LSI MLL Dual Color, Break Apart Rearrangement Problemleri (Vysis) kullanılarak FISH yöntemi uygulanmıştır. Her hasta için 100 interfaz hücresindeki FISH sinyalleri analiz edilmiştir.

## BULGULAR

Çalışmada, kemik iliği örnekleri kullanılan hastaların yaş ortalaması, KML hasta grubunda 39.25, ALL hasta grubunda erişkinlerde 42.71, çocuklarda 4.36, AML hasta grubunda erişkinlerde 47.87 ve çocuklarda 5.00 olarak tespit edilmiştir.

### A. Konvansiyonel sitogenetik bulguları

KML hasta grubundaki 20 hastanın 8'inde sitogenetik açıdan analiz edilebilir metafaz elde edilememiştir (%42.1). Altı hastada 46,XX,t (9;22)(q34;q11) yeniden düzenlenmesi bulunmuştur (%54.54), 5 hastada normal kromozom yapısı bulunmuştur (%45.4). Hastaların birinde 46,XX,t (9;22)(q34;q11) [4]/46,XX[4] mozaik kromozom yapısı, birinde de 38-45,XY[11]/46,XY[8] kromozom yapısı

bulunmuştur. Metafaz elde edilen 12 hastada anomali saptanma oranı %63.63'tür. ALL hasta grubundaki analiz edilen 14 hastanın 7'sinde sitogenetik açıdan analiz edilebilir metafaz elde edilememiştir (%50). Yedi hastanın 5'inde normal kromozom yapısı bulunmuştur (%71.42). Bir hastada 46,XX,t(9;22)(q34;q11) [4]/46, XX, t(9;22)(q34;q11), -2,+9[1] / 48,XX, t(9;22)(q34;q11), +21, +22[1] yeniden düzenlenmesi bulunmuştur. Bir hastada 40,X,2q+,-3,-7,-7,der(13;14)(q10;q10),-13,-15,-16,-17,dup(21)(q11.2q22),-22,-20,+mar kromozom yapısı bulunmuştur. Metafaz elde edilen hastalar arasında anomali saptanma oranı %28.57'dir. ALL hasta grubundaki 11 çocuk hastanın 1 tanesine sitogenetik çalışma yapılamamıştır. Analiz edilen 10 hastanın 7'sinde sitogenetik açıdan analiz edilebilir metafaz elde edilememiştir (%70). Preperatı analiz edilebilir 3 hastanın 3'ünde normal kromozom yapısı bulunmuştur (%100).

AML hasta grubundaki 13 hastanın 4'ünde sitogenetik açıdan analiz edilebilir metafaz elde edilememiştir (%30.76). Dokuz hastanın 6'sında normal kromozom yapısı bulunurken (%66.66) 1 hastada 47,XY,+5[5]/46,XY[5], 1 hastada 46, XX, t(15;17)(q22;q21)[20] klonal, diğer 1 hastada ise 47,XXX[1]/46,XX[19] kromozom yapısı bulunmuştur. Metafaz elde edilen hastalar arasında anomali saptanma oranı %33.33'dür. AML hasta grubundaki 3 çocuk hastanın 1 tanesinde normal kromozom yapısı bulunurken (%33.33) 1 tanesinde 47,XX,+21 kromozom yapısı ve diğer 1 hastada ise 46,XX,t(15;17)(q22;q21) [20] kromozom yeniden düzenlenmesi klonal olarak bulunmuştur.

#### B. Moleküler sitogenetik (FISH) bulguları

KML hasta grubunda LSI BCR/ABL ES (extra signal) Dual Color Translocation Probu kullanılmıştır. Analiz edilebilen 18 hastanın 8'inde major kırık noktaya ait yeniden düzenlenmenin pozitif sinyalleri tespit edilmiştir (%44.44), 18 hastanın 9'u normal sinyaller vermiştir (%50). ALL hastalarında t(9;22)(q34;q11) ve t(12;21)(p13;q22) kromozom ye-

niden düzenlenmesi en sık görülen düzensizliklerdendir. On dokuz hastaya LSI TEL/AML1 ES Dual Color Translocation Probu kullanılmış ve t(12;21)(p13;q22) translokasyonu açısından değerlendirilmiştir, bu hastaların 13'ü normal sinyal vermiştir. Yedi hastaya LSI BCR/ABL ES (extra signal) Dual Color Translocation Probu kullanılmış ve t(9;22)(q34;q11) translokasyonu açısından değerlendirilmesinde 1 hasta minör kırık noktasını oluşturan kromozom yeniden düzenlenmesi açısından pozitif bulunmuştur. AML hastalarında yaygın olarak görülen translokasyonlar t(15;17)(q22;q21), t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13;q22) ve t(9;22)(q34;q11) olduğu için çalışmamızda da bu translokasyonlar araştırılmıştır. Bu amaçla yapılan analizlerde 15 hasta LSI PML/RARA Dual Color Translocation Probu kullanılarak t(15;17)(q22;q21) translokasyonu açısından değerlendirilmiş ve 5 tanesi normal bulunmuş, 7 hasta t(15;17)(q22;q21) translokasyonu açısından pozitif bulunmuştur. On beş hasta LSI AML1/ETO Dual Color, Dual Fusion Translocation Probu kullanılarak t(8;21)(q22;q22) translokasyonu açısından değerlendirilmiş ve 13'ü normal bulunmuştur. Sekiz hasta LSI CBFB Dual Color, Break Apart Rearrangement Probu kullanılarak inv(16)(p13;q22) kromozom yeniden düzenlenmesi açısından incelenmiş ve 7'si normal bulunmuştur. İki hasta t(12;21)(p13;q22) translokasyonu açısından değerlendirilmiş ve normal bulunmuştur. Bir hasta MLL probu kullanılarak 11q23 kromozom yeniden düzenlenmesi açısından değerlendirilmiş ve 11q23 bölgesine ait pozitif sinyal verdiği tespit edilmiştir. FISH uygulaması yapılan 64 hastaya ait 92 örneğin 11 tanesinden sonuç alınamamıştır (%11.95), 64 hastanın 22 tanesinde pozitif FISH sonucu elde edilmiştir (%34.37). ALL ve AML hastalarının konvansiyonel sitogenetik ve FISH sonuçları Tablo I ve II'de sunulmuştur. Konvansiyonel sitogenetik ve FISH çalışması sonucunda testlerin sonuç vermedeki başarı oranları Tablo III ve Tablo IV'te sunulmuştur.

Tablo 1. ALL hastalarındaki anomalilerin test yöntemlerine göre sonuçları

Hasta No	Tanı	Sitogenetik	FISH
23	ALL	Metafaz bulunamadı	p190 pozitif
24	ALL	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[4]/ 46,XX,t(9;22)(q34;q11),-22,+9[1]/48,XX,t(9;22) (q34;q11),+21,+22, [1]	Çalışma yapılamadı
25	ALL	46,XX	11q23 pozitif
31	ALL	Metafaz bulunamadı	-
45	ALL	Metafaz bulunamadı	-
46	ALL	40,X,2q+,-3,-7,-7,der(13;14)(q10;q10),-13,-15,-16,- 17,dup(21)(q11.2q22),-22,-20,+4mar [10],46,XX[10]	-

**Tablo 2.** AML hastalarındaki anomalilerin test yöntemlerine göre sonuçları

Hasta No	Tanı	Sitogenetik	FISH
48	AML	46,XX	t(15;17) pozitif
50	AML	46,XY,+5[5]/46,XY[5]	
52	AML	46,XY	t(15;17) pozitif
53	AML	46,XY,t(10;11)	11q23 pozitif
55	AML	46,XX,t(15;17)(q22;q21)	t(15;17) pozitif
56	AML	46,XX,t(15;17)(q22;q21)	t(15;17) pozitif
57	AML	46,XY	t(15;17) pozitif
59	AML	46,XX	t(15;17) pozitif
61	AML	Metafaz bulunamadı	t(15;17) pozitif
62	AML	54,XY,+2,+6,+7,+8,+9,+14,+15,+19,+20,-16[7]/46,XY[3]	

**Tablo 3.** Sitogenetikte sonuç alınmayan hasta oranları

Tanı	Sitogenetik çalışma sonucunda metafaz elde edilemeyen hastalar (%)
KML	8/19 (%42.10)
ALL (Erişkin)	7/14 (%50)
ALL (Çocuk)	7/10 (%70)
AML (Erişkin)	4/13 (%30.76)
AML (Çocuk)	0/3(%0.0)
Toplam	26/59 (%44.06)

**Tablo 4.** FISH yöntemi uygulanarak sonuç alınmayan hasta oranları

Tanı	FISH yöntemi uygulanarak sonuç elde edilemeyen hasta (%)
KML	1/17 (%5.8)
ALL	3/21 (%14.28)
AML	7/17 (%41.17)
Toplam	11/55 (%20)

## TARTIŞMA

Konvansiyonel sitogenetik ve FISH metodları lösemi hastalarının tanı ve takiplerinde etkin olarak kullanılmaktadır. Dengeli translokasyonlar lökemojenik olayların başlıca sorumlularındandır. Klinik göstergeler ve basit laboratuvar testleri hastanın prognozu hakkında bilgi verse de sitogenetik değişiklikler hastanın uzun süre hayatta kalması ve tam remisyona ulaşması için en önemli dikkat edilmesi gereken göstergelerdir (5). Kan hastalıklarının tanı ve tedavilerini yürütmekte olan merkezlerde metodlar mümkün olduğunca çok genetik bilgiyi ortaya çıkarmaya olanak vermelidir. Böyle bir girişim ilk olarak, her hastanın tanısına ve bu tanıya uygun tedavi programlarının oluşturulmasına katkıda bulunur. İkincil olarak, hastada saptanan translokasyon yeterli sayıda hastada karakterize edilerek tanı, tedavi ve prognoza etkisi ortaya konulmamış ise bu translokasyona sahip hastaların takibi hastalığın biyolojisini anlamaya yardımcı olur (5).

Konvansiyonel sitogenetik analiz yöntemleri bilinen bir genetik değişikliği öngörmeksizin incelenen örnekteki kromozomal yapının analizine olanak

sağlar. Yöntemi FISH ve PCR yöntemlerinden ayrıran başlıca avantajı bu yöntemin yönlendirilmemiş bir yapıda olmasıdır (6). Bizim çalışmamızda bir AML hastasında 47,XY,+5[7]/46,XY[5] kromozom anomalisi bulunmuştur. Sayısal kromozom anomalileri AML'de tek başına % 14 oranında görülmektedir (7). En sık görülenleri +4, -5, -7, +8, +9, +11, +13, +21, +22 ve -Y'dir. Trizomiler belirli genlerin kopya sayılarının artmasına neden olarak gen dozajı etkisi ile hücre proliferasyonunda pozitif bir etki ortaya çıkarabilirler (8). Sayısal değişiklikler yapısal kromozom anormallikleri gibi AML'de prognoza ait işaretler olabilirler. -5 ve -7 kötü prognozla ilişkili iken +21 yüksek remisyona oranı ile dikkat çekmektedir (9,10). Trizomi 5 AML'de nadir görülen bir olaydır (8). Yapılan bir çalışmada 242 hasta arasından akut monositik lösemili 2 hastada (%0.83) hiperdiploid kromozom sayısı olan klonilerde +5 anomalisini gösterdiği tespit edilmiş olup aynı çalışmada yapılan literatür taramasında toplam 19 vaka bu trizominin bulunduğu belirtilmiştir. On dokuz vaka içinde sadece 2 vaka trizomi 5'in tek başına bir anomali olarak bulunduğu, ayrıca trizomi 5'in tüm AML FAB alt tiplerinde bulunabilirken

akut promyelositik lösemide bulunmadığı tespit edilmiştir. Bu tarama sonucunda ilk olarak trizomi 5'in diğer karyotipik değişikliklerle beraber ortaya çıktığı ve tek başına trizomi 5 varlığının çok nadir bulunduğu belirtilmiştir (8). Çalışmamızda 47,XY,+5[7]/46,XY[5] kromozom anomalisine sahip AML hastamızda tek başına klonal olarak +5 anomalisi bulunması nedeniyle nadir görülen bu hasta grubuna girmektedir. Hastanın kısa sürede ölmesi trizomi 5'in gen düzeyinde proliferasyonu arttırarak lökemojenik olayları hızlandırmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Çalışma grubumuzda yer alan ve AML-M7 tanısı olan bir çocuk hastada da 54,XY,+2,+6,+7,+8,+14,+15,+19,+20,-16[7]/46,XY[3] anomalisi bulunmuştur. Hiperploidik alanda görülen fazla kromozomlar en sık rastlanılan kromozomlar arasında olmasa da hastanın prognozunu takibi açısından önemlidir. Kötü prognozla seyreden bir ALL hastamızda da 40,X,2q+,-3,-7,-7,der(13;14)(q10;q10),-13,-15,-16,-17,dup(21)(q11.2q22),-22,-20,mar[10]/46,XX[10] kromozom yapısı bulunmuş olup aynı hastanın TEL/AML1 FISH probu ile yapılan çalışmada izokromozom 21q tespit edilmiştir.

Sitogenetik analiz yöntemi bilinen bir anomalie yönlendirilmemiş olması ile birlikte yöntemlerin rezolüsyonu sınırlıdır. Kanser sitogenetiğinde bu rezolüsyon genelde 10 Mb'dir (11). G bantlamanın özellikle mitotik aktivitenin azaldığı kemoterapi sonrası akut ve kronik lösemilerin remisyon dönemindeki kromozom yeniden düzenlenmeleri tespit etmede yeterince hassas olmadığı bilinmektedir (12). Lösemik blastların biyolojik ve/veya teknik nedenlerden ötürü in vitro ortamda düşük veya hiç proliferere olmamaları karyotip anormalliklerinin tespit edilememe nedenlerindedir. Kriptik yeniden düzenlenmeler 1-2 megabaz büyüklüğünden daha küçük oldukları için kromozom düzeyinde görüntülenemezler. Ayrıca nokta mutasyonları da konvansiyonel sitogenetik yöntemler ile tespit edilememektedir (13).

Sitogenetik analiz yöntemlerinin pek çok biyolojik ve teknik kısıtlamaları olması nedeniyle alternatif ve tamamlayıcı yeni yöntemlerin bulunmasına ihtiyaç duyulmuştur. FISH tekniği gen translokasyonlarını, delesyonlarını, amplifikasyonlarını ve kromozomal anöploidileri tespit etmek için güçlü ve uygun bir tekniktir, ancak araştırılan anormalliğe özgün probun bulunması gerekir (14). Belirli bir anormallikten şüphelenerek analiz yapılması bu tekniğin başlıca dezavantajıdır (6). FISH çalışmasının interfaz hücrelerinde yapılması metafaz FISH çalışmasına göre daha avantajlı-

dır çünkü metafaz hücrelerinin hazırlanmasına gerek yoktur ve klasik sitogenetik bilgisine ihtiyaç duyulmamaktadır.

AML'ye özel problemler ile 260 AML hastasının FISH ve kromozom bantlama analizi sonuçlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada kromozom bantlama ve FISH analizi sonucunda konvansiyonel sitogenetik analiz ile %41 oranında klonal anormallik, %39 oranında normal karyotip tespit edilmiştir. Diğer yandan, konvansiyonel sitogenetik analiz ile bu hastaların %20'sine sonuç vermede başarısız olunmuştur. Bu araştırmacıların yaptıkları çalışmaların sonucunda FISH yönteminin lösemiye özgün anormallikleri tespit etmede duyarlılığı %97.5, konvansiyonel sitogenetik analiz duyarlılığı % 78 olarak bulunmuştur (15). Bizim çalışmamızda da KML, ALL, AML hastalarının % 44.06'sına konvansiyonel sitogenetik analiz ile sonuç vermede başarısız olunmuştur. Hastaların % 63.63'ünde 20 metafaz alanından daha az alan analiz edilebilmiştir. FISH çalışmasında normal olduğu bildirilen hastaların % 27.27'sinde klonal kromozom düzensizliği bulunmuştur. Hastaların % 25'inde mevcut anomaliler hem konvansiyonel sitogenetik metodu hem de FISH analizi ile ortaya konulmuştur. Sitogenetik çalışmalarda analiz edilebilir metafaz plakları bulunmayan hastaların % 27.27'sinde (6/22) FISH ile anomali tespit edilirken normal sitogenetik raporu alan hastalarda ise % 44.44 (8/18) oranında FISH yöntemi ile anomali tespit edilmiştir. t(8;21), inv(16) ve t(12;21) konvansiyonel sitogenetik ve FISH ile hiçbir hastada bulunamamıştır. t(8;21), inv(16), t(12;21) ve t(4;11) gibi kriptik translokasyonların FISH yöntemi ile tespit edilmesi konvansiyonel sitogenetiğe göre daha başarılı sonuç vermektedir. Yapılan bir çalışmada, FISH yönteminin inv(16) ve 11q23 kromozom yeniden düzenlenmelerinin araştırılması için AML hastalarının ilk tanısında kullanılması önerilmektedir (16). Yine çalışma grubumuzdaki AML hastalarında t(15;17) için FISH analizi ile 7 hastaya pozitif sonuç verilirken bu hastalardan sadece 2 olguda (%28.57) sitogenetik olarak translokasyon doğrulanabilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada, 304 hematolojik maligniteli hastanın 919 örneğinde 18 ayrı FISH probu kullanarak FISH analizi ve GTG bantlama ile sitogenetik analiz yapılmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre FISH yöntemi uygulamak suretiyle elde edilen avantajlar içerisinde; translokasyona özgün bir prob ile hedef kromozomlar dışında başka bir kromozomda oluşmuş translokasyon bulunabilmesi, ploidi değişikliklerinin tespit edilmesinin mümkün olması, probun uygulandığı gen bölgesine ait delesyon ve amplifikasyonun

tespit edilebilmesi, retrospektif kromozom çalışmalarının yapılabilmesi, BCR/ABL yeniden düzenlenmelerinin minör ve major kırık noktalarının varlığını tek bir örnek çalışılarak tespit edebilmesi ve kemoterapi ve kök hücre transplantasyonundan sonra hücrelerin düşük proliferasyonu nedeniyle yanlış negatif kromozom sonucu verilmesi problemini ortadan kaldırılabildiğini ortaya konmuştur (16).

t(12;21), 12p13 üzerinde TEL geni, 21q22 üzerinde AML1 genini içermektedir. Bu anomali çocukluk çağı B-ALL'lerinin % 20-30'unda bulunmaktadır. Konvansiyonel sitogenetik ile gözlenmesi çok zor olan bu translokasyon FISH yöntemi kullanılarak tespit edilebilir. Bu translokasyon erken yaşta görülür, ve iyi prognoz belirtisidir. Otuz dokuz öncül-B ALL hastasında yapılan bir çalışmada TEL/AML1 yeniden düzenlenmesi olan hastaların % 40'ında normal TEL aleli bulunmadığı tespit edilmiştir (18). Bizim çalışma grubumuzda bulunan 5 ALL hastasında TEL/AML1 yeniden düzenlenmesi için yapılan FISH analizinde delesyon ve duplikasyonlar gözlenmiştir. TEL/AML1 yeniden düzenlenmesi olmayan 1 hastada TEL aleli interfaz hücrelerinin %86.23'ünde kaybolmuştur, bu hasta Alvarez ve ark.'larının çalışmasındaki 1 hasta ile aynı alel kaybı özelliklerini taşımaktadır (17). Diğer yandan TEL/AML1 yeniden düzenlenmesi ile ilgili olan AML1 geninin ekstra kopyası aynı çalışmadaki 2 hastada da tespit edilmiştir (17). Biz çalışmamızda 3 hastada AML1 ekstra kopyasını tespit ettik. Yapılan bir çalışmada sitogenetik analiz yapılabilen t(15;17)'li hastalarda FISH tekniğinin ek bir fayda sağlamadığı belirtilmiştir (18). Ancak, bizim çalışma grubumuzdaki sonuçlar sitogenetik yöntemimizdeki test başarısızlık oranının yüksek olması ve t(15;17)'nin kriptik olabilmesi nedeni ile FISH yönteminin kullanılmasının sitogenetik analize tercih edilmesini desteklemektedir.

Sonuç olarak gerek bizim çalışma sonuçlarımız gerekse de farklı çalışma gruplarının sonuçlarına göre FISH yönteminin, bilinen bir kromozomal düzensizliğin araştırılmasında sitogenetik analize göre daha etkin olduğunu ancak öngörülemeyen kromozomal düzensizliklerin ortaya konulabilmesi için sitogenetik analiz yöntemleri ile FISH metodunun rutin çalışmalarda beraber kullanılmasının en iyi yaklaşım olduğu sonucuna varılmıştır.

## TEŞEKKÜR

Çalışmanın moleküler sitogenetik uygulamaları kısmı GATA Araştırma Merkezi tarafından kabul edilen 2004/24 no'lu proje ile desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Schrappe M, Carnitta B, Pui CH, Eden T, et al. Long term results of large prospective trials in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Leukaemia* 2000; 12:2193-2194.
2. Moriche A, Zimmermann M, Reiter A, Gadner H, et al. Prognostic impact of age in children and adolescents with acute lymphoblastic leukaemia: data from the trials ALL-BFM 86, 90 and 95, *Klin Padiatr* 2005; 6:310-320.
3. Pui, C-H.: *Acute Lymphoblastic Leukemia*, Willams Hematology 6th Edition, (Eds) Beutler, E., Coller, B., Lichtman, M., Kipps, T., Seligsohn, U., New York, McGraw-Hill, 1141-1163, 2001.
4. Shaffer LG, Tommerup N. ISCN(2005): An international system for human cytogenetic nomenclature. S. Karger Publishers, Inc., Basel. 2005.
5. Hokland P, Pallisgaard N. Integration of Molecular Methods for Detection of Balanced Translocations in the Diagnosis and Follow-up of Patients With Leukemia. *Seminars in Hematology* 2000; 37: 358-367.
6. Anastasi J. Genetic and Molecular Genetic Studies in the Diagnosis of Myeloid Diseases. *Human Pathology* 2003; 34: 306-313.
7. Mitelman F, Heim S. Quantitative Acute Leukemia Cytogenetics. *Genes Chromosomes Cancer* 1992; 5: 57.
8. Ma SK, Wan TSK, Au WY, Chan LC. Trisomy 5 in Two Cases of Acute Monocytic Leukemia with Hyperdiploid Clones. *Leukemia Research* 1998; 22: 961-964.
9. Schoch C, Haase D, Fonatsch et. al. The Significance of Trisomy 8 in de novo Acute Myeloid Leukemia: the Accompanying Chromosome Aberrations Determine the Prognosis, *Br. J. Haematol* 1997; 99: 605.
10. Arthur DC, Berger R, Golomb HM, et al. The Clinical Significance of Karyotype in Acute Myeloid Leukemia, *Cancer Genet Cytogenet* 1989; 40: 303.
11. Kirsch IR, Ried T. Integration of Cytogenetic Data with Genome Maps and Available Probes: Present Status and Future Promise. *Seminars in Hematology* 2000; 37: 420-428.
12. Tanaka K, Mansyur A, Eguchi M, Shintani T, Kumaravel TS, Asaoku H, Kyo T, Dohy H, Kamada

- N. Interfase Fluorescence In Situ Hybridization Overcomes Pitfalls of G-Banding Analysis with Special Reference to Underestimation of Chromosomal Aberration Rates. *Cancer Genet Cytogenet* 1999; 115: 32-38.
13. Krauter J, Peter W, Pascheberg U, Heinze B, Bergmann L, Hoelzer D, Lubbert M, Schlimok G, Arnold R, Kirchner H, Port M, Ganser A, Heil G. Detection of Karyotypic Aberrations in Acute Myeloblastic Leukemia: a Prospective Comparison Between PCR/FISH and Standard Cytogenetics in 140 Patients De Novo AML. *Br J Haematol* 1998; 103: 72-78.
14. Fischer K, Scholl C, Salat J, Döhner H. Design and Validation of DNA Probe Sets for a Comprehensive Interphase Cytogenetic Analysis of Acute Myeloid Leukemia, *Blood* 1996; 88: 3962-3971.
15. Cox MC, Panetta P, Venditti A, Del Poeta G, Franchi A, Buccisano F, Tamburini A, Maurillo L, Amadori S. Comparison Between Conventional Banding Analysis and FISH Screening with an AML Specific Set of Probes in 260 Patients, *The Hematology Journal* 2003; 4: 263-270.
16. Lee DY, Cho HI, Kang YH, Yun SS, Park SY, Lee YS, Kim Y, Lee DS. The Role of Fluorescence in situ Hybridisation (FISH) for Monitoring Hematologic Malignancies with BCR/ABL or ETO/AML1 Rearrangement: a Comparative Study with FISH and G-Banding on 919 Consecutive Specimens of Hematologic Malignancies. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2004; 152: 1-7.
17. Alvarez Y, Gaitan S, Perez A, Bastida P, Ortega JJ, Dastugue N, Robert A, Aventin A, Badel I, Guitart M, Melo M, Caballin MR, Col MD. ETV6/RUNX1 Rearrangement in Childhood B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia with Normal Karyotypes or without Cytogenetic Results, *Cancer Genet Cytogenet* 2004; 152: 77-80.
18. Fröhling S, Skelin S, Liebisch C, Scholl C, Schlenk RF, Döhner H, Döhner K. Comparison of Cytogenetic and Molecular Cytogenetic Detection of Chromosome Abnormalities in 240 Consecutive Adult Patients with Acute Myeloid Leukemia, *J. of Clinical Oncology* 2002; 20: 2480-2485.

