

Ülkü ÖZBEY  
Hüseyin YÜCE  
Halit ELYAS

Fırat Üniversitesi  
Tıp Fakültesi,  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik  
Anabilim Dalı,  
Elazığ-TÜRKİYE

## Kronik Myeloid Lösemili Hastalarda Kromozomal Anomalilerin Belirlenmesi için Sitogenetik ve FISH Tekniği Uygulamaları

Kronik myeloid lösemi (KML), olgularının % 95'inde oluşan kromozom 9 ve 22 arasındaki resiprokal translokasyon t(9;22)(q34;q11.2) sonucunda meydana gelen Philadelphia (Ph) kromozomuyla tanımlanmaktadır. Translokasyon sonucunda Ph kromozomu üzerinde BCR/ABL kimerik geni oluşmaktadır. Bu çalışmada, t(9;22) taşıyan hücrelerde, BCR/ABL füzyon sinyallerini ortaya koyan DNA problemlerinden faydalanılarak, bu tekniğin güvenilirliği ve spesifitesini değerlendirmek için İnterfaz Floresans in-situ Hybridizasyon (FISH) tekniğiyle KML'li 22 hasta değerlendirilmiştir.

Çalışma materyali olarak, KML ön tanısı konan hastalardan alınan periferik kan (PK) ve kemik iliği (Kİ) örnekleri analiz edildi. Patolojik olarak normal olduğu bilinen PK ve Kİ örneği, negatif kontrol grubu olarak kullanıldı. İnterfaz-FISH ve konvansiyonel sitogenetik tekniklerle elde edilen PK ve Kİ sonuçları karşılaştırıldı.

İstatistik analiz sonuçlarına göre, Kİ örneklerinden yapılan interfaz-FISH ve sitogenetik sonuçlar arasında anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü. Sonra PK ve Kİ örneklerinden yapılan interfaz-FISH sonuçları karşılaştırıldı ve bu iki sonuç arasında anlamlı düzeyde bir ilişki bulundu. Çalışmanın sonuçları, interfaz Dual-FISH (D-FISH)'in, tanı esnasında KML'li hastalarda BCR/ABL yeni düzenlenmelerinin tespit edilmesinde güvenilir ve kısa sürede sonuç veren etkili bir teknik olduğunu gösterdi. D-FISH, Ph(+) KML'li hastaların tanısında ilk olarak kullanılabilir bir test olarak göz önünde bulundurulabileceğini düşündürür.

**Anahtar Kelimeler:** KML, BCR/ABL yeni düzenlenmeleri, interfaz D-FISH, Philadelphia kromozom, konvansiyonel sitogenetik

### The effect of interval from first detected mounting activity to artificial insemination on conception rates in cows

Chronic myeloid leukemia (CML) is characterized by the Philadelphia (Ph) chromosome in about %95 of patients, resulting from the translocation t(9;22)(q34;q11.2). This translocation leads to the formation of the chimeric BCR/ABL gene on the Ph chromosome. In this study, 22 cases with CML were investigated by Interphase Fluorescence in situ Hybridization assay which utilizes DNA probes that detect BCR/ABL fusion signal in cells carrying t(9;22) to evaluate the reliability and specificity of this method.

Peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) samples collected from pre-diagnosed CML patients were analyzed as study materials. PB and BM specimens known to be normal pathologically were used as negative control group. PB and BM results obtained by interphase-FISH and conventional cytogenetic techniques were compared.

According to statistical analyze, between interphase-FISH and cytogenetic results obtained from BM samples showed that there was no significant difference. The PB and BM results obtained by interphase-FISH were later compared, and were found a strong correlation between these two specimens. Our results confirmed that interphase Dual-FISH (D-FISH) is a sensitive technique for the evaluation of patients with CML. Interphase D-FISH emerges as a reliable and fast tool for the detection of BCR/ABL rearrangements in CML patients at diagnosis. D-FISH might be considered as the initial test for the diagnosis of Ph(+) CML.

**Key Words:** CML, BCR/ABL rearrangements, Interphase D-FISH, Ph chromosomes, conventional cytogenetics

### Giriş

Kronik Myeloid Lösemi (KML), multipotent kök hücrelerin neoplastik transformasyonundan ortaya çıkan klonal myeloproliferatif bir hastalıktır (1, 2). KML'nin sitogenetik belirtisi hastaların yaklaşık %90-95'inde bulunan Philadelphia (Ph) kromozomudur. Sitogenetik incelemelerle, vakaların %90-95'inde KML tanısı konmaktadır ve bu vakaların karyotipinde 22 numaralı kromozom küçülmüştür (3).

Ph(+) olduğu durumda ABL onkogeni, 9 numaralı kromozom üzerinde bulunan 9q34.1 bölgesinden 22 numaralı kromozom üzerindeki 22q11.2 (BCR) bölgesine aktarılmaktadır.

Geliş Tarihi : 20.03.2005  
Kabul Tarihi : 09.12.2006

### Yazışma Adresi

Ülkü ÖZBEY  
Fırat Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik  
Anabilim Dalı  
23100  
Elazığ-TÜRKİYE

uozbey76@hotmail.com

Bu translokasyon sonucunda KML'nin pathogenezinde merkezi rol oynadığı düşünülen BCR/ABL füzyon geninin oluşmasına neden olmaktadır. Bu durum kendini lösemi olarak ortaya koymaktadır. Yeni gen, artmış tirozin kinaz aktivitesine sahip onkoprotein olan p210BCR-ABL şifreler (3, 4, 5). BCR/ABL'in tirozin kinaz aktivitesi, BCR/ABL pozitif lösemilerin fenotipini ortaya koymada önemlidir. Ekstra Ph kromozomu, KML'de blastik fazın gelişimiyle ortaya çıkan en yaygın sekonder değişiklikler (6). Ph kromozomları, pediatrik akut lenfoblastik (ALL) hastaların %5'inde, yetişkin ALL hastaların %15-30'unda ve akut myeloid lösemi hastaların %2'sinde bulunmaktadır. Bulunmaması halinde, hastalık olağandan daha süratle ilerler ve daha kötü prognoz gösterir (7). KML, benign kronik fazda özellikle periferik kan (PK) ve kemik iliği (Kİ) blastlarında lökosit miktarının artışıyla ortaya çıkıp, blastik faz ve hızlanmış fazda transforme olmaktadır (8, 9). Hastalık blastik faza ilerlediğinde vakaların yaklaşık %85'inde ek kromozomal anormallikler geliştiği bilinmektedir.

Yaygın kromozomal anormallikler; trizomi 8, ekstra Ph, (+Ph), izokromozom 17q, trizomi 19, trizomi 20, Y kromozom kaybı, trizomi 17, monozomi 7, +21'dir. Hastalığın ilerlemesine neden olan etkenlerin mekanizması hala anlaşılammıştır (3, 7). KML tanılı hastaların %5-10'unda Ph tespit edilememiştir. Ph(-) KML'li hastaların, kısa ömürlü, tedaviye cevap vermeme, bazofil yokluğu ve trombositopeni gibi farklı klinik özelliklere sahip oldukları bildirilmiştir (10, 11, 12). Ortalama yaşam süresi; Ph(+) vakalarda 4 yıldan fazla, Ph(-) vakalarda 1 yıldan az ve Y kromozom kaybı meydana gelen Ph(+) vakalarda ise 6 yıldan fazladır (12). Hastaların %5'inde varyant yeni düzenlenmeler konvansiyonel sitogenetik analizlerle görüntülenemez ve bundan dolayı fluoresans in-situ hibridizasyon (FISH) tekniğiyle veya polimeraz zincir reaksiyonu ile tespit edilebilir (13).

Bu çalışmanın amacı, KML ön tanısıyla gelen vakalarda, meydana gelen kromozomal anormallikleri tespit etmektir. Ayrıca sitogenetik olarak gösterilemeyen Ph(+) vakaların ne kadarının FISH tekniğiyle net olarak ortaya konulabileceği, D-FISH probunun güvenilirlik ve hassasiyetinin ölçülmesi ve FISH'in doğruluğunu ve kullanılabilirliğinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Çalışmaya 2000-2002 tarihleri arasında Fırat Tıp Merkezi'ne başvuran ve KML ön tanısı konulan hastalar incelemeye alındı. Çalışma materyali olarak, KML ön tanılı 21 hastadan alınan PK ve Kİ örnekleri kullanıldı. Patolojik olarak normal olduğu bilinen 21 Kİ ve PK örneği, BCR ve ABL sinyallerinin görüldüğü interfaz hücrelerinin ortalama yüzdesini değerlendirmek ve test materyalinin hibridizasyon kalitesini hesaplamak için kontrol grubu olarak kullanıldı. PK ve Kİ örneklerinden standart sitogenetik tekniklerle metafaz kromozomları ve interfaz hücreleri elde edilerek inceleme yapıldı. Kİ ve PK kültürü standart prosedürlere göre yapıldı. Hastalardan aspire kemik iliğinden 03-05 ml alındı ve %20 fetal bovin serum, 2mM L-glutamin ve penisilin (100U/ml)

streptomisin (100µg/ml) içeren RPMI 1640 bazal medyumda süspanse edildi. Hafif karıştırdıktan sonra 37 °C'deki etüvde inkübe edildi. Kültürün 70. saatinde 0.01 ml (10 µg/ml) kolşisin ilave edilerek etüvde 2 saat kadar bekletildi. Hücreler 20 dakika kadar 0.075 M KCl muamele edildikten sonra 1/3 glasiyel asetik asit /metanol fiksatifinde yıkandı. Fiksasyon işlemi üç kere tekrarlandı. Kromozomlar GTG bantlama tekniğiyle bantlandı ve 25 metafaz analiz edildi. Kromozomal anormallikler International System For Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) 1995'e göre rapor edildi. Sitogenetik incelemeler sonucunda pozitif sonuç veren vakalarda kromozoma özgü prob kullanılarak interfaz-FISH metodu ile bu vakalar tekrar kontrol edildi.

BCR/ABL yeni düzenlenmelerini tespit etmek için lokus spesifik BCR/ABL kosmid prob sırasıyla kromozom 9 ve 22 için kullanıldı. 22q11.2'de lokalize olan BCR prob biotinle işaretlenmiş, kırmızı (K) renkte sinyal vermekte ve yaklaşık 500 kb uzunluğunda olup ekzon 12 16 civarındaki majör bölgeyi ve ekzon 2'nin 5' bölgesinde meydana gelen daha çok sentromerik minör bölgeyi içermektedir. 9q34.1'de lokalize olan ABL prob digoxigeninle işaretlenmiş, yeşil (Y) renkte sinyal vermekte ve yaklaşık 600 kb'lık bir kısmı ABL'nin 200 kb'lık kırık nokta bölgesine tutunmaktadır (Cytocell, Banbury Business Park Addenbury, United Kingdom). İnterfaz çekirdeğinde FISH tekniğiyle elde edilen sinyaller normal çekirdekte, 2K sinyal (BCR) ve 2Y sinyal (ABL) olarak 4 farklı bölge şeklinde görülmektedir. 1K ve 1Y sinyalin olduğu çekirdekte bu sinyaller birbirine yakınsa ama hala sarı bir sinyal oluşmamışsa bu sinyal karışık (ambiguous) olarak değerlendirilmektedir.

Normal kromozom 9 ve 22'den sırasıyla Y ve K renkli sinyaller ve derivatif kromozom 9 ve derivatif kromozom 22'den (Philadelphia kromozom) gelen Y ve K renkli sinyallerin kaynaşmasıyla sarı (S) renkte bir füzyon sinyal oluşacaktır. Birleşmiş kırmızı ve yeşil sinyaller bir veya iki sarı füzyon şeklinde görüldüğünde BCR/ABL yeni düzenlemeleri için pozitif olarak değerlendirilmektedir (14). FISH uygulaması, üretici firmanın protokolüne göre yapıldı. Preparatlar, 2XSSC solüsyonunda 2 dakika bekletildi (20-25 °C) ve %70, %85, %100'lük alkol serilerinde 2'er dakika tutuldu. Lam üzerine 15µl hibridizasyon solüsyonu koyularak prob lameliyle kapatıldı ve lamelin kenarları rubber solüsyonu ile yapıştırıldı. 37 °C etüvde 3-4 dakika bekletildi. Preparatlar, PCR cihazında 76 °C'de 5 dakika denatüre edildi ve bir gece 37 °C benmaride bekletilerek prob ile hedef DNA'nın hibridizasyonu sağlandı. Hibridizasyondan sonra, preparatlar 72 °C benmaride 0.4XSSC solüsyonunda 2 dakika bekletildi. Oda ısısında NP-40 yıkama solüsyonunda 30 saniye kadar bekletildi.

Hedef alana, sırasıyla Reagent 1 tespit solüsyonundan 50 µl koyulup preparatın üzeri parafilmle kapatıldı ve 37 °C benmaride 10 dakika bekletildi. Parafilm uzaklaştırıldı ve oda ısısında 1XST buffer yıkama solüsyonunda 5 dakika bekletildi. Bu işlem Reagent 2, Reagent 3 tespit solüsyonu için tekrarlandı. Hedef alana 10 µl DAPI eklenerek lamel ile kapatıldı. +4-°C'de en az 1 saat bekletildikten sonra fluoresans

mikroskopta (Nikon Eclipse E600) incelendi (15, 16). Her bir hastadan 200 interfaz hücresi incelenerek elde edilen sonuçlar değerlendirildi.

### İstatistik Analizler

Veriler SPSS (Statistical Packages of Social Sciences, SPSS for Windows, Version 10.0, Inc, Chicago, IC,USA) programına kaydedildi. Hata kontrolleri, tablolar ve istatistik analizler yine bu programda yapıldı, hasta grubu ile kontrol grubundaki bireylerden elde edilen parametreler arasındaki ilişki korelasyon ve regresyon analizine göre yapıldı ve Ph(+) pozitif hücreleri yüzdeleri Pearson korelasyon katsayısıyla ifade edildi. Bu iki grup arasındaki parametrelerin karşılaştırılması t testine göre yapıldı ve aritmetik ortalamaları standart sapma ile gösterildi.

**Tablo 1. Kontrol grubundaki bireylerin yaşı, tanıdaki sitogenetik ve interfaz-FISH sonuçları.**

Vaka No	Yaş	PK		Kİ	
		interfaz-FISH Ph (+) %	Karyotip	interfaz-FISH Ph(+) %	Karyotip
22	23	0	46,XX	MY	MY
23	55	0	46,XX	7,5	46,XX
24	7	0	46,XX	MY	MY
25	8	MY	MY	0	46,XX
26	13	0	46,XY	0	46,XY
27	16	MY	MY	0	46,XY
28	14	0	46,XX	0	46,XX, 22pstk (+)
29	6	0	46,XX	MY	MY
30	7	MY	MY	0	46,XX
31	16	MY	MY	0	46,XX
32	16	0	46,XX	0	46,XX
33	3	0	46,XY	0	46,XY
34	55	1	46,XX	0,5	46,XX
35	64	0	46,XX	MY	MY
36	19	0	46,XY	MY	MY
37	31	0	46,XY	MY	MY
38	59	MY	MY	0	46,XY
39	30	MY	MY	MY	46,XX
40	12	MY	MY	MY	46,XX
41	50	1	46,XY	0	46,XY
42	63	0	46,XX	0	46,XX

**MY:** Materyal yok **PK:** Periferik kan **Kİ:** Kemik iliği

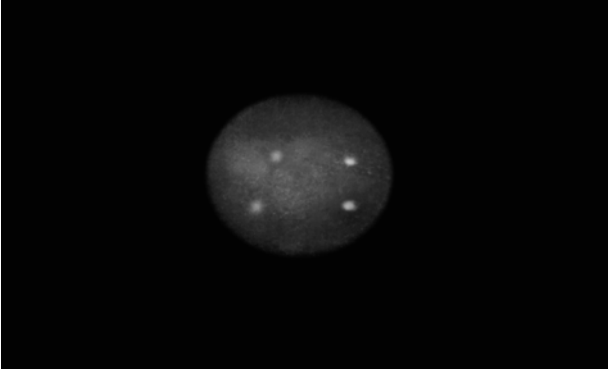
İnterfaz-FISH ve sitogenetik sonuçları karşılaştırıldı. Kontrol grubu bireylerinin hepsinde BCR/ABL yeni düzenlenmesinin olmadığı FISH'le tespit edildi. İnterfaz-FISH'le analiz edilen hücrelerin çoğunluğunda görülen 2Y2K sinyaller normal olarak değerlendirilmektedir (Şekil 1). ve az bir kısmında görülen 3Y2K sinyaller ise anormal sinyal kalıbı olarak kabul edilmektedir (Şekil 2).

Kontrol grubu Kİ örneklerinden elde edilen sitogenetik ve interfaz-FISH sonuçları karşılaştırılmıştır. Tablo 1'de görüldüğü gibi 28 numaralı bireyde Kİ örneğinde anormal bir 46,XX, 22 pstk(+) karyotipi tespit edilmesine rağmen Ph kromozomu, sitogenetik ve interfaz-FISH incelemelerinde tespit edilememiştir. Bu karyotip Ph kromozomundan başka bir kromozomal anomalliktir. Elde edilen verilerin ışığı altında, kontrol grubu Kİ ve PK hücrelerinden yapılan interfaz-FISH analiz sonuçları birbiriyle tutarlılık göstermektedir. Bu iki analiz arasında mükemmel bir uyum bulundu ( $P < 0.001$ ). Özellikle farklı sitogenetik bulgulu gruplarda herhangi bir ayrılık bulunmadı.

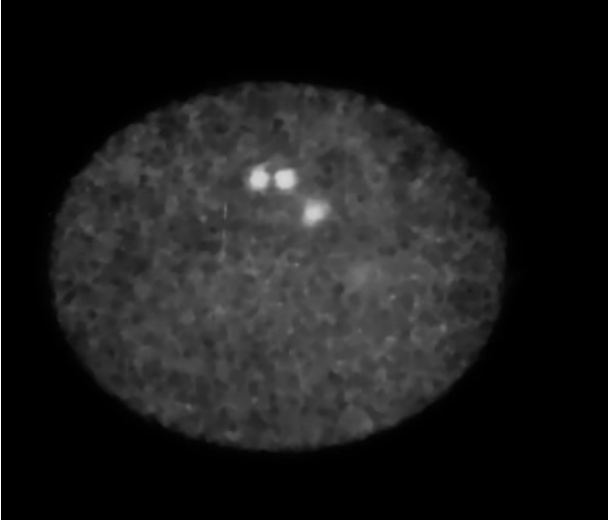
### Bulgular

Çalışmaya alınan toplam 42 vakadan 1'den 21'e kadar olan numaralar hasta grubunu, 22'den 42'ye kadar olan numaralar ise kontrol grubunu göstermektedir. Hasta grubu yaş ortalaması 40,10 (2-80) (Standart sapma  $\pm 27,124$ ), kontrol grubu bireylerinin yaş ortalaması 23,89 (3-64) (Standart sapma  $\pm 19,740$ ) ve iki grup arasındaki yaş ortalaması ise 32,40 (2-80) (Standart sapma  $\pm 24,985$ ) olarak belirlendi. Çalışmaya alınan 40 vakadan, 21'i erkek (E), 19'u dişidir (K). Konvansiyonel sitogenetik incelemeler sonucunda kontrol grubundaki bütün bireylerin normal karyotip taşıdığı tespit edildi (Tablo 1).

Hasta grubunda, PK ve Kİ örneklerinden yapılan sitogenetik ve interfaz-FISH sonuçları karşılaştırıldı. Hastaların yaşı, tanıdaki karyotip ve interfaz-FISH sonuçları Tablo 2'de sunulmuştur. Hasta grubunda PK örneklerinde normal karyotip görülürken, Kİ örneklerinde Ph translokasyonundan başka kromozomal anomallikler saptanmıştır. Tanıda, 4 numaralı hastada yeteri kadar metafaz olmadığından dolayı sitogenetik inceleme yapılamadı ancak bu hastanın interfaz-FISH analizlerinde Ph tespit edildi. Sitogenetik Ph kromozomu gösterilemeyen hastalarda (1, 3, 5, 6, 7, 9,10, 12, 14, 15, 19, 21), FISH'le BCR/ABL yeni düzenlenmelerinin pozitif olduğu tespit edildi (Şekil 3, Şekil 4, Şekil 5, Şekil 6). Her bir vaka için 200 çekirdek analiz edildiğinde t(9;22)(q34;q11.2)'nin varlığında ABL (yeşil) ve BCR (kırmızı) sinyallerin kaynaşmasıyla sarı bir füzyon sinyal gösterildi.



Şekil 1. Normal sinyal kalıbı (2Y2K)

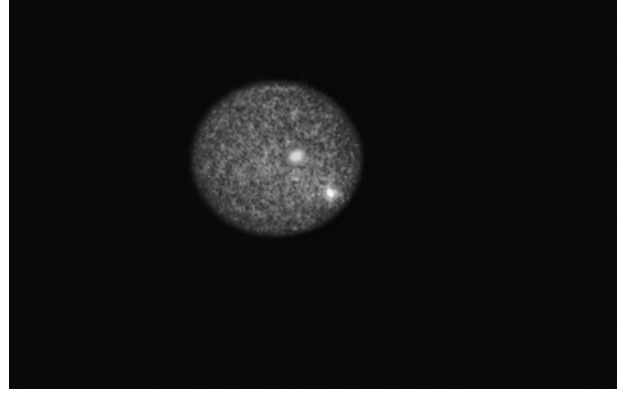


Şekil 2. Anormal sinyal kalıplı hücreler (3Y2K)

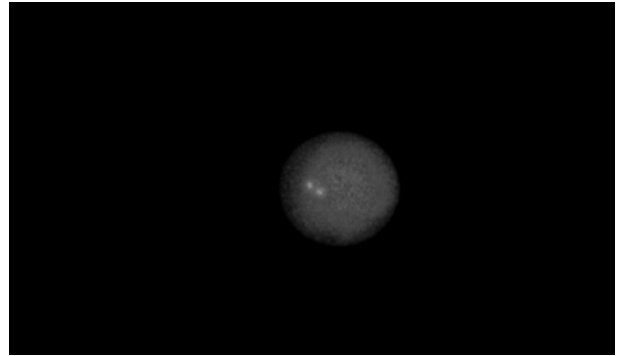
Bu vakaların 7'sinde (12, 14, 17, 18, 19, 20, 21) basit Ph kromozomlu olduğu karyotipik analizlerle gösterildi (Tablo 2).

Hasta grubunda, istatistik analiz sonuçlarına göre Kİ Ph Sitogenetik ve PK Ph Sitogenetik sonuçları arasında anlamlı bir ilişki olmadığı görülürken ( $P>0.05$ ), Kİ Ph Sitogenetik (%) ve Kİ Ph interfaz FISH (%)'den elde edilen sonuçların yüksek derecede uyumlu olduğu görülmüştür ( $P<0.001$ ).

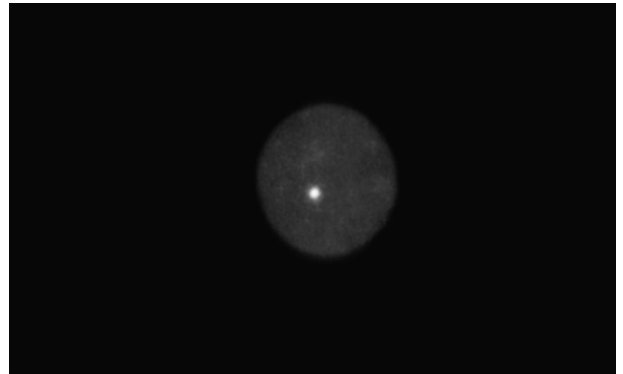
Kontrol grubu ve hasta grubu arasındaki sitogenetik ve FISH sonuçlarının istatistik analizi yapıldığında, hasta grubunda bir sahada görülen BCR/ABL füzyon geni oranı, PK hücrelerinde % 60-96.5'a kadar çıkarken tüm sahada görülen toplam füzyonlu hücrelerin oranı da % 64-100'e kadar çıkmaktadır. Kİ hücrelerinde ise bir sahada görülen BCR/ABL füzyon geni oranı, % 81.3-100 ve tüm sahada görülen toplam füzyonlu hücrelerin oranı ise % 94.1-100'dir. Kontrol grubunda, bir sahada görülen BCR/ABL füzyonlu hücrelerin ortalama oranı, %0.6-7.7 ve ortalama standart hata (SEM) oranı  $\pm$  %0.31-3.47'dir. Tüm sahada görülen toplam füzyonlu hücrelerin ortalama oranı %1.5-13.9 ve SEM oranı da  $\pm$  %0.55-6.8'dir. KML'li hastalar ve kontrol grupları arasındaki farklılıklar yüksek düzeyde anlamlıdır ( $P<0.001$ ).



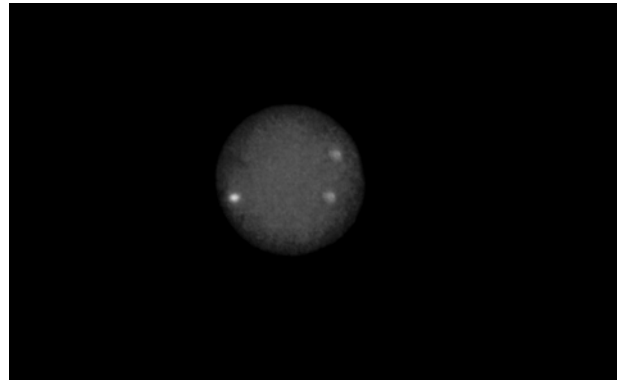
Şekil 3. Klasik konfigürasyonlu bir Ph(+) hücre.



Şekil 4. Double füzyon sinyal (+Ph) paternli hücre.



Şekil 5. Ph(+) hücre (1F).



Şekil 6. Ph(+) hücre (2Y1K1F).

**Tablo 2. Hastaların yaşı, tanıdaki sitogenetik ve interfaz-FISH sonuçları.**

Vaka No	Yaş	PK		Kİ	
		İnterfaz- FISH Ph (+) %	Karyotip	İnterfaz- FISH Ph(+) %	Karyotip
1	2	40	46,XY	43,5	46,XY (%94)/46,XY+mar (%6)
2	63	46	46,XX(%50)/46,XX9p(+);22q(+) (%50)	34,3	46,XX (%60)/46,XX 9p(+);22q(+) (%40))
3	80	1	46,XY	59,5	46,XY(%80)/45,X,-Y (%20)
4	60	55	46,XY(%78)/45,XY-5 (%16)/45,X -Y (%12)	60	ÜY*
5	2	12	46,XY	40	46,XY(%83)/45,XY -13(%5)/45,XY-19(%5)/42,XY -9 -13 -19 -19 (%3)/ 45,XY -16 (%4) 46,XY(%84)/47,XY+21(%10)/45,X -Y (%6)
6	65	15	46,XY (%88)/47,XY+21(%12)	16	MY**
7	29	28,5	46,XY,Yqh(+)	MY	46,XX(%60)/46,XX del(22) (%30)/ 45,X -6 (%5)/47,XX+21(%5)
8	24	29,5	46,XX(%36)/46,XXdel(22)(%64)	34,5	46,XX(%60)/46,XXdel(22q)(%30)/45,XX-21 (%10)
9	22	0,5	46,XX	36,5	MY
10	61	18,5	46,XX	MY	MY
11	19	6	46,XX(%84)/46,XX,del(16)(q22;qtel) (%8)/46,XX,del22(q12;qtel) (%8)	MY	MY
12	80	7,5	46,XX	5	46,XX (%75)/46,XX t(9;22)(%5)/45,XX -8 (%12)/45,XX -13 (%8)
13	13	MY	MY	1,5	46,XX (%90)/45,XX -21(%10)
14	57	1	46,XX	40	46,XX(%60)/46,XX t(9,22) (%40)
15	30	40	46,XX(%92)/45,XX-7 (%4)/45,XX -16 (%4)	MY	MY
16	8	MY	MY	44,1	46,XY(%70)/46,XY,del(22) (q13.2;q13.3) (%30)
17	57	40	46,XY(%64)/46,XYt(9;22)(%36)	90	46,XY(%50)/46,XY t(9;22)(%50)
18	3	34,5	46,XX(%55)/46,XXt(9;22)(%45)	55	46,XY(%50)/46,XY t(9;22)(%50)
19	32	0	46,XY	36	46,XY(%80)/46,XY t(9;22)(%20)
20	75	MY	MY	80	46,XY(%40)/46,XY t(9;22)(%60)
21	60	5	46,XY	100	46,XY t(9;22) (%100)

ÜY: Üreme yok MY: Materyal yok. PK: Periferik kan Kİ: Kemik iliği

### Tartışma

Toplam olarak 42 hastadan elde edilen Kİ ve PK hücrelerinin interfaz-FISH ve konvansiyonel sitogenetik analizleri karşılaştırıldı. Bu çalışmada, özel olarak BCR/ABL D-FISH translokasyon probunun hassasiyeti ve güvenilirliğinin ölçülmesi dikkate alındı. Çalışmada kullanılan Cytocell dual color, dual füzyon prob sistem; interfaz FISH çalışmalarını kolaylaştırmaktadır. BCR/ABL problemleri büyük boyutlu olduklarından sinyaller daha belirgindir ve daha bilgi verici sinyal kalıpları gözlemlenmektedir. Normal hücrelerin çoğunda dört sinyal görülürken, bazı hücrelerde 2K ve 2Y sinyalinden başka atipik sinyal paternleri bulunmaktadır. Bu hücrelerin, hücre siklusunun G2 fazında meydana geldiği ileri sürülmüştür (5, 17). 2K1Y1F sinyal kalıbı, kromozom 22'de kromozom 9 materyalinin resiprokal olmayan insersiyonu sonucu oluşabilir. Bu sinyal paternleri, kompleks yeni düzenlemeler ve kromozomal analizlerle bulunan kompleks kromozomal değişikliklerin gerçekleşmesi sonucunda ortaya çıkabilir (13). KML'de nadir varyant t(9;22) translokasyonlar, 22q11 üzerinde ek kromozomal materyali taşıyan bir ekstra Ph kromozomu oluşturabilir. Konvansiyonel sitogenetik analizler,

kompleks yeni düzenlemeler hakkında tam bir bilgi vermez. ABL/BCR füzyon gen, 22q11'den farklı kromozomal bölgede nadir olarak gözlenmiştir. Bu bulguların önemi tam olarak açıklanamamıştır (18). Varyant BCR/ABL yeni düzenlemelerinin nasıl oluştuğu hakkında iki mekanizma ileri sürülmüştür. En basit açıklama kromozom 9 ve 22 arasında kromozom materyalinin resiprokal olmayan insersiyonu sonucu gen füzyonu oluşmaktadır. Daha kompleks bir açıklama ardışık iki translokasyon gerçekleşmektedir. İki Philadelphia translokasyonu, t(9;22)(q34;q11)'dir. Bunu diğer kromozomların katılmasıyla farklı kırık noktaları içeren revers translokasyonlar izlemektedir. İkinci kırılma noktası distalde olursa füzyon genleri kendi normal lokuslarında ya da kırılma noktası proksimalde gerçekleşirse füzyon genleri resiprokal lokusta olabilir (13).

Moleküler incelemeler, Ph(-) KML vakalarında BCR/ABL yeni düzenlemelerin varlığını ortaya çıkarsa da interfaz çekirdeği ve metafaz, sitogenetikçiler için çok önemli bir araçtır. Çünkü bunlar sadece yeni düzenlemelerin varlığını ve lokalize olduğu yeri tespit etmekle kalmaz aynı zamanda double füzyon geninin

varlığı gibi bir çok olayı kapsayıp kapsamadığını ortaya çıkarmaktadır (17). Bu durum hastalığın prognozu ve gidişatının anlaşılması için önemli olabilir (10). Kemik iliği transplantasyonu süresince hastalar myelotoksik ilaçlar aldıklarından, sitogenetik analiz için yeteri kadar metafaz olmayabilir. FISH tekniği özellikle bu durumlarda değerlendirilebilir (19, 20). BCR/ABL problemleri günümüzde ve önceki yıllarda yapılan çalışmalarda BCR/ABL füzyonunu tanımlamak için kullanılmaktadır. Günümüzdeki çalışmalarda konvansiyonel sitogenetik ve FISH analizlerinden elde edilen sonuçlar, FISH'in KML'de varyant translokasyonları tespit etmek için daha etkili bir metod olduğunu öne sürmektedir. İnterfaz-FISH konvansiyonel sitogenetik analizler için metafaz yaymaları yetersiz olduğunda vakalarda BCR/ABL füzyonunun tespit edilmesine imkan sağlamaktadır (21). FISH, spesifik kromozomal aberasyonları tespit etmek için hassas ve kantitatif bir methodur. Ph(+) hastaların tespit edilmesinde FISH tekniğinin güvenilirliğini ortaya koymak için, yetişkin ALL'li hastalarda ve KML'li hastaların büyük çoğunluğunda BCR/ABL yeni düzenlenmelerini tespit eden dual colour problemleri, metafaz incelemelerinde tam doğruluk sağlarken, interfaz hücrelerinin değerlendirilmesinde sorunlar çıkarabilmektedir. Çünkü interfaz hücrelerinde yapılan FISH uygulamalarında bazen çapraz hibridizasyon veya spesifik olmayan prob bağlanmalarından dolayı artefakt sinyaller görülmektedir. Bu artefakt, sitogenetik düzeyde gösterilemeyen kromozomal anormalliklerin tespit edilmesinde interfaz-FISH'in spesifitesini sınırlandırır. Örneğin; bu durum Ph(+) lösemilerin interfaz-FISH ile tespit edilmesinde hata oranını yükseltebilir. Bu durumları ortadan kaldırmak için kontrol örneklerini analiz etmek gerekir. Bu çalışmada pozitif hata oranının insidansı %3 olarak bulundu. Önceki yıllarda yapılan çalışmalarda bu oranın %2-4 arasında olduğu gösterilmiştir (22). İnterfaz-FISH çalışmaları, konvansiyonel karyotiplerde gözlemlenmesi güç olan spesifik anormalliklerin tanımlanmasına yardımcı olabilir. Ama tek bir tanı koyucu teknik yapılırsa, problemlerin

güvenilirliği prognostik açıdan önemli diğer sitogenetik değişikliklerin varlığını tespit etme kabiliyeti sınırlı olabilir (14). Bu yüzden karyotipleme ve FISH tekniğinin birlikte yapılması gerektiğinin uygun olacağı düşünülmektedir. Sitogenetik analizler, KML'de altın standart diagnostik testtir. Bu teknikle aynı zamanda hastalık rezistansı ve transformasyonda meydana gelen ek kromozomal anormallikler de değerlendirilmektedir. Ama sitogenetik analizler uzun zaman almakta ve her örnekten sadece 20-25 metafaz incelenebilmektedir. FISH, metafaz ve interfaz hücrelerinin analiz edilmesine imkan sağlar. Basit, uygulanması kolay ve oldukça etkili bir tekniktir. İnterfaz-FISH tekniği çalışmaları için, incelenen materyalden kültür yapmak gerekmediğinden daha kısa sürede ve daha fazla sayıda hücre, interfaz-FISH'le analiz edilebilmektedir. FISH tekniğiyle, önemli belirtileri taşıyan çok kötü prognoza sahip olan KML'li hastalarda kısa sürede sonuç verilmektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada, PK Ph Sitogenetik ve PK Ph interfaz-FISH sonuçları ile Kİ Ph Sitogenetik ve Kİ Ph interfaz FISH sonuçları arasında, yüksek oranda anlamlı bir ilişki bulundu. Sitogenetik analizlerle Ph kromozomu tespit edilemeyen hastalarda, bu kromozomun varlığı interfaz-FISH analizleriyle gösterildi. Bu veriler ışığında, D-FISH probunun güvenilirlik ve hassasiyetinin oldukça yüksek olduğu, İnterfaz D-FISH'in, BCR/ABL yeni düzenlemelerin tespit edilmesi için çok güvenilir ve etkili bir metod olduğu sonucuna varılmıştır. D-FISH yüksek risk kategorilerindeki hastaların belirlenmesi için hızlı ve güvenilir olması açısından teşhiste bütün ALL'li ve KML'li vakalara uygulanabilir.

#### Teşekkür

Vakalarımın sağlanmasında yardımcı olan Hematoloji Anabilim Dalında görev yapan Yrd. Doç. Dr. Aziz Karaoğlu'na ve FÜBAP-761 numaralı proje kapsamında maddi destek sağlayan Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

#### Kaynaklar

1. Kabarowski JH, Witte ON. Consequences of BCR-ABL Expression within the Hematopoietic Stem cell in Chronic Myeloid Leukemia. *Stem Cells* 2000; 18:399-408.
2. O'Dwyer ME, Mauro MJ, Druker BJ. Recent advancements in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Annu Rev Med* 2002; 53: 369-81.
3. Storlazzi CT, Anelli L, Surace C and et al. Molecular cytogenetic characterization of a complex rearrangement involving chromosomes 9 and 22 in a case of Ph-negative chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;136:141-5.
4. Reddy KS, Sulcova V. A FISH of Variant Philadelphia Rearrangements. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;118:121-131.
5. Scappini B, Onida F, Kantarjian HM and et al. In Vitro Effects of ST1571-Containing Drug Combinations on the Growth of Philadelphia-Positive Chronic Myelogenous Leukemia Cells. *Cancer* 2002; 94: 2653-2662.
6. Huntly BJ, Bench A, Green AR. Double jeopardy from a single translocation: deletions of the derivative chromosome 9 in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2003;102:1160-8.
7. Lee DS, Lee YS, Yun YS and et al. A study on the incidence of ABL gene deletion on derivative chromosome 9 in chronic myelogenous leukemia by interphase fluorescence in situ hybridization and its association with disease progression. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 37:291-9.
8. Gribble SM, Roberts I, Grace C and et al. Cytogenetics of the Chronic Myeloid Leukemia. Derived Cell Line K562: Karyotype Clarification by Multicolor Fluorescence In Situ Hybridization, Comparative Genomic Hybridization, and Locus-Specific Fluorescence In Situ Hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;118: 1- 8.
9. Kurzrock R, Kantarjian HM, Talpaz M. Chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Curr Treat Options Oncol* 2001; 2: 245-252.

10. Costa D, Espinet B, Queralt R and et al. Chimeric BCR/ABL gene detected by fluorescence in situ hybridization in three new cases of Philadelphia chromosome-negative chronic myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;141:114-19.
11. Michalova K, Zemanova Z, Bkezinova J and et al. Location of the BCR/ABL fusion genes on both chromosomes 9q34 Ph negative chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2002;43:1695-700.
12. Sandberg AA. *The Chromosomes in Human Cancer and Leukemia*. Second Edition, New York: Elsevier Science Publishing, 1990: 440-445.
13. Haigh S, Cuthbert G. Fluorescence in situ hybridization characterization of different cryptic BCR-ABL rearrangements in chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;156:188-9.
14. Aoun P, Wiggins M, Pickering D and et al. Interphase fluorescence in situ hybridization studies for the detection of 9q34 deletions in chronic myelogenous leukemia: a practical approach to clinical diagnosis. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;154:138-43.
15. Kozubek S, Lukasova E, Mareckova A and et al. The topological organization of chromosome 9 and 22 in cell nuclei has a determinative role in the induction of t(9;22) translocations and in the pathogenesis of t(9;22) leukemias. *Chromosoma* 1999;108: 426-435.
16. Mohr B, Bornhauser M, Platzbecker U and et al. Problems with interphase fluorescence in-situ hybridization in detecting BCR/ABL-positive in some patients using a novel technique with extra signals. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;127: 111-117.
17. Mancini M, Nanni M, Sirleto P and et al. Detection of BCR/ABL rearrangements in adult acute lymphoblastic leukemia, using a highly sensitive interphase fluorescence in situ hybridization method (D-FISH). *The Hematology Journal* 2001;2:54-6.
18. Zagaria A, Anelli L, Albano F and et al. A fluorescence in situ hybridization study of complex t(9;22) in two chronic myelocytic leukemia cases with a masked Philadelphia chromosome. *Cancer Genet Cytogenet* 2004; 150:81-5.
19. Chauffaille M de L, Oliveira JS, Romeo M and et al. Fluorescent in-situ hybridization (FISH) for BCR/ABL in chronic myeloid leukemia after bone marrow transplantation. *Sao Paulo Med J* 2001; 119: 16-8.
20. Cureo A, Bigani R, Emmanuel B and et al. Fluorescence in situ hybridization for the detection and monitoring of the Ph-positive clone in chronic myelogenous leukemia: comparison with metaphase banding analysis. *Leukemia* 1998; 12: 1718-23.
21. Acar H, Stewart J, Boyd E, Connor MJ. Identification of variant translocations in chronic myeloid leukemia by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 93:115-8.
22. Koo SH, Kwon GC, Chun HJ and et al. Cytogenetic and fluorescence in situ hybridization analyses of hematologic malignancies in Korea. *Cancer Genet Cytogenet*. 1998;101:1-6.