

Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi bünyesinde kemoterapi tedavisi gören lösemi vakalarında G-Bantlama metodu ile sitogenetik analizler

Ayşe Yiğit*, Efkan Uz*, H. Ramazan Yılmaz*, Barbaros Yiğit**, E. Güçhan Alanoğlu***, Ali Ayata****, Pınar Aslan Koşar*

* Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD, Isparta.
** Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya AD, Isparta.
*** Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dahiliye AD, Isparta.
**** Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatri AD, Isparta.

Özet

Amaç: Çalışmada Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Uygulama Hastanesi Dahiliye Anabilim Dalı Hematoloji Kliniği ve Pediatri Anabilim Dalı Çocuk Hematolojisi Kliniğinde tedavisi ve takibi yapılan lösemi tanısı almış vakalarda olabilecek muhtemel kromozom anomalilerinin gözlenmesi amaçlandı. **Gereç ve Yöntem:** Çalışmada 12 post-kemoterapik, 17 remisyonu sağlanmış ve tedavisinin herhangi bir basamağında olan 29 lösemi vakası ile yaş ve cinsiyet olarak uyumlu 30 kontrol birey sitogenetik olarak değerlendirildi. **Bulgular:** Lösemi grubunun 15'i akut lenfoblastik lösemi, 5'i kronik lenfoblastik lösemi, 5'i kronik myeloid lösemi ve 4'ü akut myeloid lösemi idi. 15 akut lenfoblastik lösemi vakasının 4'ünde, 5 kronik lenfositik lösemi ve kronik myeloid lösemi vakalarının birer tanesinde anomali tespit edilmiştir. Kronik myeloid lösemi vakalarının birinde t(9;22)(q34;q11), 4 akut lenfoblastik lösemi vakasında sırasıyla; del(17q), inv(9), inv(1) ve t(12;15), kronik lenfositik lösemi vakalarından birinde ise t(9;22)(q34;q11) tespit edilmiştir. Periferik kandan konvansiyonel sitogenetik analizler daha ileri genetik tetkiklere temel oluşturmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Lösemi, GTG bantlama, Kemoterapi, Kromozom, Periferik kan.

Abstract

Aim: This study aimed to determine the possible chromosomal abnormalities in leukemia patients who were diagnosed and treated in Hematology Clinics of Internal Medicine Department and Pediatric Hematology Clinic of Pediatrics Department in Süleyman Demirel University Research Hospital. **Material and Method:** In study 29 patients of whom 12 in post-chemotherapeutic period, 17 in remission periods with any stage of treatment in leukemia group and 30 age- and gender-matched control person were evaluated cytogenetically. **Results:** Of the leukemia group; 15 had acute lymphoblastic leukemia, 5 had chronic lymphoblastic leukemia, 5 had chronic myeloid leukemia and 4 had acute myeloid leukemia. Four out of 15 patients with acute lymphoblastic leukemia, 1 of 5 with chronic lymphoblastic leukemia and 1 of 5 with chronic myeloid leukemia had different cytogenetic aberrations. t(9;22)(q34;q11) was detected in two patients, one with chronic myeloid leukemia and the other with chronic lymphoblastic leukemia.; del(17q), inv(9), inv(1), and t(12;15) are found in four ALL cases respectively. Conventional cytogenetic analysis of peripheral blood is fundamental for advanced genetic study.

Key words: Leukemia, GTG banding, Chemotherapy, Chromosome, Peripheric blood.

Yazışma Adresi/Corresponding: Arş. Gör. Ayşe Yiğit
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi
Morfoloji Binası Tıbbi Biyoloji AD, Çünür/Isparta Tel: 0246 211 3283
E-mail: ayyigit@med.sdu.edu.tr

Müracaat tarihi: 03.08.2010
Kabul tarihi: 06.09.2010

Giriş

Kanser oluşumu pek çok dokuda genelde tek bir mutant hücreden (klonal) köken alarak başlar. Lösemiler de kan hücrelerinin üretildiği kemik iliğinin klonal habis hastalığıdır. Lösemiler, köken aldıkları hücre grubuna, semptomlarına, ortaya çıkış ve ilerleme hızlarına ayrıca klinik seyirlerine göre gruplara ayrılabilirler. Ortaya çıkış hızlarına göre öncelikle akut ve kronik olmak üzere 2 ana gruba ayrılırlar. Her iki grup da kendi içinde köken aldıkları hücre grubuna göre ikiye alt sınıfa ayrılır. Böylece lösemiler 2 ana başlıkta 4 grupta incelenir. 1. Akut Myelositer Lösemi (AML) 2. Akut Lenfositör Lösemi (ALL) 3. Kronik Myelositer Lösemi (KML) 4. Kronik Lenfositör Lösemi (KLL) (1, 2). Hematolojik malignensilerin sınıflandırılmasında French-American-British (FAB) skorlamasının yanı sıra; tanı, tedavi, sınıflama ve prognozu belirlemede çok daha pratik ve doğruluğu uluslararası geçerlilik teşkil eden kemik iliği ve periferik kandan sitogenetik incelemeler de yapılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar lösemilerin büyük çoğunluğunun yapısal ve/veya sayısal kromozom anomalileri ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Bir sitogenetik değişim bir lösemi türünde kötü prognostik etkiye sahipken diğerinde iyi prognoz belirteci olabilmektedir. Oluşan bu kromozomal değişimler gen ekspresyonunun bozulmasına ya da yeni bir füzyon proteininin oluşmasına yol açarak lösemiye neden olabilmektedir.

Maligniteli olgularda sitogenetik çalışma yapabilmek için tümör hücresi gerekmektedir. Lösemilerden alınacak örnek, genellikle kemik iliği aspirasyon materyalinden elde edilir. Eğer kemik iliği aspirasyon materyali elde edilemezse kemik iliği biyopsi materyali de kullanılabilir. Beyaz hücre sayısı $>10.000/ml$, immatür miyeloid ve lenfoid hücre oranı $\%10$ 'dan fazla olan olgularda periferik kan hücresinden de sitogenetik çalışma yapılabilir (3).

Lösemik dönüşüme neden olduğu düşünülen genetik değişikliğin tespiti kemik iliğine göre periferik kanda daha zor olmaktadır. Çünkü

transforme bir hücrenin kemik iliğindeki oranı periferik kandan daha yüksektir (4, 5). Ayrıca kültür koşulları sağlıklı hücrelerin daha da hızlı üremesine zemin hazırlayarak anomalili hücreleri ve hücre oranını gölgelemektedir.

Çalışmamız kapsamında Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi bünyesinde tedavi gören lösemi vakaları değerlendirilmiştir. Hasta açısından kliniği ağır olan kemik iliği aspirasyon uygulaması yerine periferik kandan lösemi vakalarının sitogenetik olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Olası sitogenetik değişimlerin periferik kandan tespiti ve tespit edilen bir değişimin teşhis ve tedavinin yönlendirilmesindeki katkısı araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmanın gelişim süreci içerisinde kemoterapi ajanları uygulanmayan lösemi vakalarının periferik kanlarında sitogenetik değerlendirme yapıldı. Bu amaçla tercih edilen hastalar ya indüksiyon kemoterapisini almış ve remisyonu sağlanmış hastalar ya da kemoterapi sürecini tamamlamış ve ilaçsız rutin kontrolde tutulan vakalardı. Çünkü özellikle kemoterapi ajanlarına maruz bireylerde kültür ortamında maligniteli hücreleri çoğaltması zordur (6). Çalışma kapsamında Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi Dahiliye Anabilim Dalı Hematoloji bölümü ve Pediatri Anabilim Dalı Çocuk Onkolojisi Bölümlerinde lösemi tanısı almış ve tedavi görmekte olan 29 hasta ile hastalarla yaş ve cinsiyet olarak uyumlu 30 kontrol bireyin sitogenetik değerlendirmeleri yapıldı.

Kromozomların elde edilmesinde kısa dönem hücre kültürü tekniği (7, 8) veya anomalili hücreleri tespit edebilme imkanı daha yüksek olan 'eş zamanlı kültür' metodu (9) ile kromozomlar elde edilmiştir.

Kemoterapi kür tedavisinden en az bir hafta sonra lösemi vakalarından heparinize edilmiş enjektörler ile 5 cc periferik kan alındı. Alınan kanlar zenginleştirilmiş fitohemaglutininli ve fitohemaglutininsiz besiyerleri (% 20 fetal calf serum, % 2 penisilin-streptomisin, % 2-3

fitohemaglutinin, % 2 L-glutamin) içerisinde 24, 48 ve 72 saatlik kültürlere alındı. Kültür sürelerinin dolmasına 2 saat kala kültür ortamına eklenen kolşisin (10µg/ml) ile metafaz aşamasında durdurulan hücreler kültür sürelerinin sonunda harvest edildi. Harvest işlemi için hücreler hipotonik solüsyon (0,075 M KCl) ve fiksatifle (1/3, v/v, Glasiyal asetik asit/methanol) muamele edildikten sonra lam üzerine yayılan hücreler boyanmak üzere 37 °C'de 3 gün etüvde tutuldu. Böylece yaşlanan hücreler Giemsa-Tripsin-Giemsa (GTG) bantlama yöntemi (7) ile boyandıktan sonra preparatlar değerlendirildi.

Değerlendirilen metafaz plaklarındaki kromozomlar International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN)'e göre sınıflandırılıp olası anomaliler değerlendirildi (10).

Bulgular

Çalışmamızda lösemi tanısı almış tedavi ve takipleri sürdürülen 29 olguya ait sitogenetik analiz sonuçları incelenmiştir. Çalışmamız kapsamındaki vakaların klinik teşhisleri 15'i ALL (% 52), 5'i KLL (% 17), 5'i KML (% 17) ve 4'ü de AML (% 14) şeklinde dağılım göstermiştir. Çalışmada incelenen hastalardan 8'i çocuk, 4'ü adölesan dönemde ve 17'si erişkindi. Olguların yaşları 3 ile 83 arasında değişmekte olup çalışma grubunun yaş ortalaması 37,07±22,9'dur. Grupların yaşları aritmetik ortalama ± standart sapma şeklinde; ALL grubunda 22.6±16.8, KLL grubunda 67.0±6.6, KML grubunda 50.8±5.1, AML grubunda 49.5±26.6'dır. Vaka grubunun cinsiyet olarak dağılımı 15 erkek, 14 bayan şeklindedir.

Çalışmaya katılan vakalardan yapılan periferik kan kültüründen elde edilen preparatlarda farklı lösemi gruplarında gözlenen değişimler Tablo 1'de verilmiştir. Her bir vakadan hazırlanan preparatlarda öncelikle 20 metafaz plağı değerlendirilmiş, gerekli görüldüğü durumlarda değerlendirilen metafaz sayısı 40'a çıkarılmıştır.

Tablo 1: Sitogenetik anomali gösteren bireylerin yaş, cinsiyet ve tanıya göre dağılımı.

Sıra	Cinsiyet	Yaş	Tanı	Bulgu
1	K	21	ALL-L2 Post İndüksiyon	del (17q)
2	K	47	ALL-Post İndüksiyon	t (12;15)
3	E	2	ALL-Post İndüksiyon	Perisentrik inv(9)
4	K	19	ALL-Post Kemoterapi	Perisentrik inv(1)
5	K	62	KML-Post İndüksiyon	t (9;22)
6	K	52	KLL Post İndüksiyon (Glivec +)	t (9;22)

AML grubundaki 4 vakanın hiç birinde sitogenetik bir anomali tespit edilmemiştir. KLL grubundaki 5 hastadan 1 tanesinde KML'ye spesifik bir translokasyon olan t(9;22)(q34;q11) tespit edilmiştir. t(9;22)(q34;q11) değerlendirilen KLL vakasının 20 sahasının 3 tanesinde görülmüştür. İleri yaştaki bayan hastanın genel durumu iyiydi. ALL grubundaki 4 vakada sitogenetik değişimler tespit edilmiştir. Vakalardan birinde sayılan 20 metafaz plağının 1 tanesinde del(17q) tespit edilmiştir. Sayılan metafaz plağının 40'a çıkarılması ile yeni bir anomalili alan tespit edilememiştir. Nakil önerilen hasta nakil olmadan kaybedilmiştir. İki vakada inversiyon gözlenmiş; biri perisentrik inv(1) iken diğeri perisentrik inv(9)'dur. Perisentrik inv(1) durumu yine değerlendirilen 40 metafaz plağında 1 kez görülmüştür. Ancak perisentrik inv(9) değerlendirilen 20 metafaz plağının büyük bir kısmında gözlenmiştir. Bu vakalardan ilki kemoterapisini tamamlamış diğeri ise remisyonda idi. Başka bir ALL vakasında ise t(12;15) gözlenmiştir. Genel durumu iyi olmayan hasta kemoterapi tedavisine devam etmekte idi.

Bir KML vakasının sahaslarının bir çoğunda KML'ye spesifik olan t(9;22)(q34;q11) saptanmış olup hasta Glivec tedavisi almakta idi. Kontrol grubundaki bireylerin sitogenetik taramasında herhangi bir kromozomal düzensizliğe rastlanmamıştır.

Tartışma ve Sonuç

Kan hücrelerinin çoğalması, farklılaşması ve programlanmış ölümleri (apoptosis) arasındaki dengeyi sağlayan mekanizmalarda görev alan genlerdeki mutasyonlar lösemiye neden olmaktadır (11). Bu sebeple genetik anomalilerin tanımlanması için, kromozomal değişim noktalarının tespiti ve bununla bağlantılı olarak bu noktalardaki genlerin lösemi ile bağlantısı araştırılan konuları oluşturmaktadır. Kromozom anomalilerinin belirlenmesi, hastalığın tanısındaki şüpheleri ortadan kaldırarak, hastalığın alt tipinin belirlenmesi, prognozun iyi veya kötü olduğunun belirlenmesi, hastalığın hangi safhada seyrettiğinin kontrolü ve tedavi protokollerinin nasıl olması gerektiği ve etkinliği yönlerinde hekimi yönlendirmektedir. Tespit edilen kromozom anomalileri lösemi oluşumuna sebep olabilecek şekilde karyotipte primer olarak bulunabileceği gibi bazen kemoterapi ajanlarının etkisi ile de sekonder olarak oluşabilmektedir (12, 8).

Vakalardan iki tanesinde bulunan t(9;22) KML'de iyi prognostik öneme sahiptir ve Glivec tedavisine iyi cevap vermiştir (13, 14). Vakanın periferik kanında KML'ye spesifik olan bu translokasyonun belirgin şekilde görülmesi periferik kandan da bu grupta hastalar için değerlendirme yapılabileceğini düşündürmektedir.

KLL'de t(9;22) anlamlı bir translokasyon olmayıp tedavi esnasında kemoterapi ajanlarının etkisi ile oluşabileceğine dair literatürler de vardır (15, 16). Vakamızda da görülme durumunun literatürlerce desteklendiği şekilde kemoterapi ajanların etkisi ile oluşabileceğini de düşünmekteyiz.

ALL vakalarında gözlenen iki inversiyondan biri perisentrik inv(9) ve diğeri perisentrik inv(1)'dir. Perisentrik inv(9) normal olarak populasyonda görülen genel bir heteromorfizmdir. Perisentrik inv(9)'lu lösemi vakalarının sunulduğu çeşitli çalışmalarda kötü prognozunun olduğu yönünde bir açıklama yapılmamıştır (17, 18). Vakamızda perisentrik inv(9), sahaların S.D.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi Sayı. 1/ Cilt.1// 2010

büyük çoğunluğunda görülmüştür. Literatürde perisentrik inv(1), t(12;15) gibi sitogenetik değişimlerin kemoterapi sonrası olduğu ifade edilmektedir (19). Vakalarımızdaki değişimlerin yalnızca birer sahada tespit edilmesi bu durumların kemoterapi etkisiyle yada kültür koşullarının etkisiyle oluşabileceğini düşündürmektedir.

17. kromozomun uzun kolundaki delesyon [del(17q)] genellikle kompleks translokasyonlarla birlikte bulunmakta ve Liu ve arkadaşları tarafından bu durumun, hastalığın seyrini ağırlaştırdığı ifade edilmektedir (20).

Sonuç olarak; belirli kanserlerde primer ve sekonder kromozomal değişikliklerin bilinmesi, tanının kesinleşmesinde, prognozda, tedavi protokollerinin düzenlenmesinde, minimal rezüdüel hastalığın takibinde oldukça önemlidir.

Çalışmamızda periferik kandan konvensiyonel sitogenetik metod ile lösemi vakaları taranmıştır. Ancak bu metodun gerektiğinde moleküler sitogenetik ve moleküler metodlar ile desteklenmesi gerektiği de bir gerçektir. Tedavi gören hastalara periferik kandan kromozom analizinin yapılması ile daha ileri tetkikler olan kemik iliği analizleri öncesi hekime fikir vermesi ve zaman kazandırması açısından önem arz etmektedir.

Kemik iliği kromozom analizleri daha güvenilir sonuç vermesine rağmen çalışmamızda hedeflediğimiz periferik kan analizinin hasta açısından daha konforlu bir invaziv girişim olduğu düşüncesindeyiz. Alternatif olarak uygulanabileceği literatürde de ifade edilmektedir (21).

Fakat bu hastalarda kullanılan kemoterapötik ajanların da periferik kan hücrelerinde gözlenen anomalilere sebep olup olmadığına dair ileri çalışmaların yapılması uygundur. Bu amaçla lösemi hastalarına uygulanan kemoterapötik ajanların uygun dozlarda sağlıklı kontrollerin *in vitro* olarak kültüre

edilmesi ile elde edilebilecek kromozomları değerlendirmeyi hedefliyoruz.

Teşekkür: Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 1093-YL-2005 nolu proje olarak desteklenmiştir. Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Müftüoğlu E. Klinik Hematoloji, Şahin Basım, Diyarbakır, 1995;13:363-7.
- Lerner A. Leukemia (Perspectives on Diseases and Disorders). Greenheven 2009.
- Fıratlı T. Akut lösemi etyopatogenezi: Demek sitogenetik önemli! XXX. Ulusal Hematoloji Kongresi III. Hematoloji ilk Basamak Kursu. 10-14 Ekim 2003. İstanbul: Bilimsel Tıp Evi; 2003;119-26.
- Shingyoji M, Takiguchi Y, Watanabe R, Hiroshima K, Motoori K, Kurosu K, Kasahara Y, Tanabe N, Tatsumi K, Kuriyama T. Detection of tumour specific gene expression in bone marrow and peripheral blood from patients with small cell lung carcinoma. Cancer 2003;97:1057-62.
- Jim EJ, Peh SC. Bone marrow and peripheral blood changes in Non-Hodgking lymphoma. Singapore Med J 2000;41:279-85.
- Bora G, Yurter HE. Epigenetik hastalıklar ve tedavi yaklaşımları. Hacettepe Tıp Dergisi 2007;38:48-54.
- Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. Exp Cell Res 1960;20:613-6.
- Rooney D.E.: Human Cytogenetics malignancy and acquired abnormalities (Thrid Edition). Oxford University Pres, New York, 2001.
- Gupta R, Korpatkin S, Basch RS. Hematopoiesis and stem cell renewal in long-term bone marrow cultures containing catalase. Blood 2006;107:1837-46.
- Karger S. ISCN. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. 1995:1-114.
- Schuler D, Szende B. Apoptosis in acute leukemia. Leukemia Research 2004;28:661-6.
- Nevruz O, Guran Ş, Beyan C, Irfan A, Tunca Y, Kaptan K, Çetin T, Fen T, Ural AU. Kronik Myelösiter Lösemi olgularında Philadelphia kromozomu haricindeki sitogenetik anomalilerin prognoza etkisi. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2005;25:174-7
- Nakazato T, Suzuki K, Mihara A, Sanada Y, Kakimoto T. Successful induction of complete cytogenetic response with low-dose imatinib mesylate in an accelerated phase chronic myelogenous leukemia patient who developed severe bone marrow aplasia following standard-dose imatinib mesylate therapy. Gan To Kagaku Ryoho 2010;37:539-42.
- Cortes JE, Kantarjian HM, Goldberg SL, Powell BL, Giles FJ, Wetzler M, Akard L, Burke JM, Kerr R, Saleh M, Salvado A, McDougall K, Albitar M, Radich J. Rationale and Insight for Gleevec High-Dose Therapy (RIGHT) Trial Study Group. High-dose imatinib in newly diagnosed Chronic-phase CML: high rates of rapid cytogenetic and molecular responses. J Clin Oncol 2009;27:4754-9.
- Block AW, Carrol AJ, Hagemeyer A, Michaux L, van Lom K, Olney HJ, Baer MR. Rare Recurring balanced chromosome abnormalities in therapy-related myelodysplastic syndromes and acute leukemia: report from an international workshop. Gene, Chromosome, Cancer 2002;33(4):401-12.
- Gargallo P, Cacchione R, Chena C, Dupont J, Garay G, Riveros D, Larripa I and Slavutsky I. Chronic lymphocytic leukemia developing in a patient with chronic myeloid leukemia: evidence of distinct lineage-associated genomic events. Cancer Genet and Cytogenet 2005;161(1):74-7.
- Jaime L. Betz, Ahmed S. Behairy, Rabionet P, Tirtorahardjo B, Moore MW, Cotter P. Acquired inv(9): what is its significance?, Cancer Genet and Cytogenet 2005;160:76-8.
- Keung YK, Knovich MA, Powell BL, Buss DH, Pettanati M. Constitutional

pericentric inversion of chromosome 9 and acute leukemia. *Cancer Genet and Cytogenet* 2003;145:82-5.

19. Herens C, Baron F, Croisiu C, Tassin F, Bours V. Clonal chromosome aberrations in Philadelphia-negative cells from chronic myelocytic leukemia patients treated with imatinib: report of two cases, *Cancer Genet and Cytogenet* 2003;147:78-80.

20. Liu S, Li Q, Pang W, Bo L, Qin S, Liu X, Teng Q, Qian L, Wang J. A new complex variant t(4;15;17) in acute promyelocytic

leukemia: FISH confirmation and literature review, *Cancer Genet and Cytogenet* 2001;130:33-7.

21. Hussein K, Ketterling RP, Dewald GW, Van Dyke DL, Mesa R, Hanson CA, Tefferi A. Peripheral blood cytogenetic studies in myelofibrosis: overall yield and comparison with bone marrow cytogenetic studies. *Leuk Res* 2008;32:1597-600.