

**T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİLERDE GÖRÜLEN  
PROGNOSTİK KROMOZOMAL ANOMALİLERİN  
TANIMLANMASINDA RUTİN TEKNİKLERLE BERABER  
MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE  
AMPLIFICATION (MLPA) YÖNTEMİNİN KULLANILMASI**

**UZMANLIK TEZİ  
DR. AKİF AYAZ**

**DANIŞMAN  
DOÇ. DR. EMRE TEPELİ**

**DENİZLİ-2013**

**T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİLERDE GÖRÜLEN  
PROGNOSTİK KROMOZOMAL ANOMALİLERİN  
TANIMLANMASINDA RUTİN TEKNİKLERLE  
BERABER MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE  
AMPLIFICATION (MLPA) YÖNTEMİNİN KULLANILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**

**DR. AKİF AYAZ**

**DANIŞMAN**

**DOÇ. DR. EMRE TEPELİ**

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 14.05.2012 tarih ve 04 sayılı 2012TPF013 no'lu kararı ile desteklenmiştir.

**DENİZLİ-2013**

Doç. Dr. Emre TEPELİ danışmanlığında Dr. Akif AYAZ tarafından yapılan “Kronik Lenfositik Lösemilerde görülen prognostik kromozomal anomalilerin tanınmasında rutin tekniklerle beraber multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) yönteminin kullanılması” başlıklı tez çalışması 22/10/2013 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN : Prof. Dr. Gülseren BAĞCI



ÜYE : Prof. Dr. Füsun DÜZCAN



ÜYE : Doç. Dr. Emre TEPELİ



Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

24.10.2013

Prof. Dr. Hasan HERKEN  
Pamukkale Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Dekanı



## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım tez danışmanım, çok saygıdeğer hocam Doç. Dr. Emre TEPELİ'ye, katkılarından dolayı Anabilim Dalı başkanımız değerli hocamız Prof. Dr. Gülseren BAĞCI, değerli hocalarım Prof. Dr. Füsun DÜZCAN, Prof. Dr. N. Lale ŐATIROĐLU TUFAN, Doç. Dr. C. Nur SEMERCİ ve Yrd. Doç. Dr. G. Ozan ÇETİN'e, moleküler çalışmalarında bana yardımcı olan Halime ZIRH ve Sevilay Atlı TEKİN'e, sitogenetik çalışmalarında bana yardımcı olan Nazife BESİM, Betül ŐENLİKÇİ ve Yasemin GÜRSOY'a, FISH çalışmalarındaki desteklerinden dolayı Berrin BÜKE GÜRSOY'a, FISH analizlerinde yardım ve desteğinden dolayı Uzm. Dr. Metin ESER'e, asistanlık eğitimim sürecinde bana destek olan tüm asistan arkadaşlarıma, çalışma grubumuzdaki hastaların seçiminde katkılarından dolayı Hematoloji Bilim Dalı'nda görev yapan Doç. Dr. H. İsmail SARI, Yrd. Doç. Dr. Sibel KABUKÇU HACIOĞLU ve Uzm. Dr. M. Hilmi DOĞU'ya,

Ayrıca bu süreçte desteğini sürekli yanımda hissettiğim, varlıkları ile hayatı bana daha değerli kılan eşim ve oğluma, bugünlere gelmemde maddi ve manevi emeği geçen anne ve babama çok teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ONAY SAYFASI.....	III
TEŞEKKÜR.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XII
ÖZET.....	XIV
İNGİLİZCE ÖZET.....	XV
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ'YE GİRİŞ.....	3
TANI.....	3
EVRELEME.....	4
PROGNOZ.....	5
IgVH Mutasyonu.....	6
ZAP-70 Proteini.....	6
CD38.....	7
Lenfosit Katlanma Süresi.....	7
Kemik İliği İnfiltrasyon Tipi.....	7
β2 Mikroglobulin Düzeyi.....	7
Timidin Kinaz Aktivitesi.....	7
LDH Düzeyi.....	8
Serum CD23 Düzeyi.....	8
Kromozomal Değişiklikler.....	8
13q14 Delesyonu.....	8
Trizomi 12.....	8

<i>17p13 Delesyonu</i> .....	9
<i>11q22.3 Delesyonu</i> .....	9
<b>KLL'DE KONVANSİYONEL SİTOGENETİK VE FISH YÖNTEMİ</b> .....	9
<b>MLPA YÖNTEMİ VE KLL</b> .....	10
<b>TEDAVİ</b> .....	13
<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	15
<b>OLGULARIN SEÇİMİ</b> .....	15
<b>KONVANSİYONEL SİTOGENETİK</b> .....	15
<b>FISH YÖNTEMİ</b> .....	16
<b>MLPA YÖNTEMİ</b> .....	18
<b>Periferik Kan Ve Kemik İliğinden DNA İzolasyonu</b> .....	18
<b>İzole Edilen DNA'nın Saflık Değerlendirilmesi</b> .....	18
<b>DNA Denatürasyonu ve SALSA Prob Miks ile Hibridizasyonu</b> .....	18
<b>Ligasyon Reaksiyonu</b> .....	19
<b>PCR</b> .....	19
<b>Beckman GenomeLab GeXP CEQ 8000 Cihazına Yükleme</b> .....	24
<b>MLPA Sonuçlarının Değerlendirilmesi</b> .....	25
<b>BULGULAR</b> .....	27
<b>DEMOGRAFİK VE KLİNİK ÖZELLİKLER</b> .....	27
<b>KONVANSİYONEL SİTOGENETİK BULGULAR</b> .....	29
<b>FISH BULGULARI</b> .....	34
<b>MLPA BULGULARI</b> .....	43
<b>DNA İzolasyonu</b> .....	43
<b>MLPA Analizi</b> .....	44
<b>SİTOGENETİK, iFISH VE MLPA SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI</b> .....	55
<b>TARTIŞMA</b> .....	60
<b>KLL'DE KONVANSİYONEL SİTOGENETİK YÖNTEMLERDE MİTOTİK AKTİVATÖRLER</b> .....	61

<b>KLL' DE SIK GÖRÜLEN KROMOZOMAL ANOMALİLER VE YÖNTEMLERE GÖRE SAPTANABİLİRLİLİKLERİ.....</b>	<b>61</b>
<b>13q14 Delesyonu.....</b>	<b>61</b>
<b>Trizomi 12.....</b>	<b>63</b>
<b>Saptanan Diğer Kromozomal Yeniden Düzenlenmeler.....</b>	<b>64</b>
<b>SAPTANAN BULGULARIN YÖNTEMLER AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ.....</b>	<b>65</b>
<b>SONUÇLAR.....</b>	<b>67</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>69</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>β2MG</b>	: Beta 2 Mikroglobulin
<b>CCND2</b>	: Siklin D2
<b>CDK4</b>	: Siklin Bağımlı Kinaz 4
<b>CHFR</b>	: Checkpoint with forkhead and ring finger domains
<b>DAPI</b>	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
<b>DLEU1</b>	: Deleted in lymphocytic leukemia 1
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>EDTA</b>	: Etilen Diamin Tetra Asetik asit
<b>EIFH</b>	: Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit H
<b>ESR1</b>	: Estrogen receptor 1
<b>FAM</b>	: N-(3-fluoranthyl) maleimide
<b>FISH</b>	: Floresan İn Situ Hibridizasyon
<b>Hb</b>	: Hemoglobin
<b>HM</b>	: Hepatomegali (Karaciğer büyüklüğü)
<b>iFISH</b>	: İnterfaz FISH
<b>IFNG</b>	: İnterferon, gamma
<b>IGF2R</b>	: İnsulin-like growth factor 2 receptor
<b>IgVH</b>	: İmmünglobulin ağır zincir değişken bölgesi
<b>IL-2</b>	: İnterlökin-2
<b>ISCN</b>	: International System for Chromosome Nomenclature
<b>IWCLL</b>	: Uluslar arası Kronik Lenfositik Lösemi Çalıştayı
<b>KCl</b>	: Potasyum Klorür
<b>KCNRG</b>	: Potassium channel regulator
<b>KLL</b>	: Kronik Lenfositik Lösemi
<b>LDH</b>	: Laktat Dehidrogenaz
<b>LDLR</b>	: Düşük dansiteli lipoprotein reseptörü
<b>LPS</b>	: Lipopolisakkarit



<b>LRMP</b>	: Lymphoid-restricted membrane protein
<b>MLPA</b>	: Multiplex Ligation-Dependent Probe-Amplification
<b>mRNA</b>	: Haberci ribonükleik asit
<b>MYC</b>	: V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
<b>MYCN</b>	: V-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)
<b>NCIWG</b>	: Ulusal Kanser Enstitüsü Çalışma Grubu
<b>NP40</b>	: Nonidet P40
<b>PAH</b>	: Fenilalanin hidroksilaz
<b>PARK2</b>	: Parkinson protein 2, E3 ubiquitin protein ligaz (parkin)
<b>PCR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>PTEN</b>	: Phosphatase and tensin homolog
<b>RB</b>	: Retinoblastom
<b>RDX</b>	: Radiksin
<b>Rpm</b>	: Dakikadaki dönüş sayısı
<b>RKPATD</b>	: Referans Kontrol Prob Pik Alanları Toplam Değeri
<b>RPMI</b>	: Rosswell Park Memorial Insititute
<b>RT-PCR</b>	: Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>SM</b>	: Splenomegali (Dalak büyüklüğü)
<b>SSC</b>	: Saline -sodyum Citrate
<b>TPA</b>	: 12-O-Tetradekanolforbol 13-asetat
<b>TPAD</b>	: Test piki alan değeri
<b>WBC</b>	: White Blood Cells (Beyaz kan hücreleri)

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

<b>Şekil 1</b>	MLPA problemlerinin şematik gösterilmesi.....	11
<b>Şekil 2</b>	MLPA Aşamaları.....	13
<b>Şekil 3</b>	Beckman CEQ 8000 Yürütme Şartları.....	25
<b>Şekil 4</b>	CpG DSP30+IL-2 Kombinasyonunun mitotik indeks üzerine pozitif etkisi (x10 büyütme).....	30
<b>Şekil 5</b>	Trizomi 12’li bir olgunun karyotipi.....	30
<b>Şekil 6</b>	H35 no’lu hastanın karyotipi.....	31
<b>Şekil 7</b>	H08 no’lu hastanın der(12;13)(p10;q10) parsiyel karyotip.....	31
<b>Şekil 8</b>	H09 no’lu hastanın der(9;13)(p10;q10) parsiyel karyotipi.....	31
<b>Şekil 9</b>	H19 no’lu hastanın t(7;13)(q22;q34),del(13)(q14) parsiyel karyotipi.....	31
<b>Şekil 10</b>	H31 no’lu hastanın der(7;13)(q36;q10),+13 parsiyel karyotipi.....	32
<b>Şekil 11</b>	H08 no’lu hastaya ait 13q14 probuyla yapılan çalışmada monoallel- biallelik delesyonlu ve normal nükleusların bir arada bulunduğu bir görüntü.....	34
<b>Şekil 12</b>	H08 no’lu hastaya ait 13q14 probuyla yapılan çalışmada metafaz görüntüsü.....	35
<b>Şekil 13</b>	H03 no’lu hastaya ait sentromerik 12 probu ile çalışılan mozaik trizomi 12 olarak değerlendirilen bir iFISH görüntüsü.....	35
<b>Şekil 14</b>	H33 no’lu hastaya ait 17p13 probu ile çalışılan 17p13 delesyonu olarak değerlendirilen bir iFISH görüntüsü.....	36
<b>Şekil 15</b>	H23 no’lu hastaya ait 11q22 probu ile çalışılan mozaik 11q22 delesyonu olarak değerlendirilen bir iFISH görüntüsü.....	36
<b>Şekil 16</b>	H09 No’lu hastaya ait 13q14 probuyla yapılan çalışmada metafaz görüntüsü.....	37
<b>Şekil 17</b>	H19 No’lu hastaya ait 13q14 probuyla yapılan çalışmada metafaz görüntüsü.....	37
<b>Şekil 18</b>	H26 no’lu hastaya ait 13q14 probu ile çalışılan metafaz ve interfaz nükleuslarında mozaik 13q14 delesyonu olarak değerlendirilen bir FISH görüntüsü.....	38

<b>Şekil 19</b>	H41 no'lu hastaya ait 17p13 probu ile çalışılan bir metafaz FISH görüntüsü.....	38
<b>Şekil 20</b>	H38 no'lu hastaya ait normal olarak değerlendirilen P037-A2 probmiks ile çalışılan MLPA pik görüntüsü.....	47
<b>Şekil 21</b>	H20 no'lu hastaya ait normal olarak değerlendirilen P038-A2 probmiks ile çalışılan MLPA pik görüntüsü.....	47
<b>Şekil 22</b>	H28 no'lu hastaya ait 12. kromozoma spesifik problarda amplifikasyon tespit edilen P038-A2 probmiksi ile çalışılan hastanın MLPA pik görüntüsü.....	50
<b>Şekil 23</b>	H10 no'lu hastaya ait 13q14 bölgesine spesifik problarda delesyon tespit edilen P037-A2 probmiksi ile çalışılan hastanın MLPA pik görüntüsü.....	50
<b>Şekil 24</b>	P038-A2 probmiks ile çalışılan, 13q14, 17p13 delesyonu olarak değerlendirilen H33 no'lu hastaya ait MLPA pik görüntüleri.....	51
<b>Şekil 25</b>	H33 no'lu hastaya ait 13q14 ve 17p13 delesyonuna ek olarak 9p21 delesyonunun P037-A2 probmiksi ile görüldüğü MLPA pik görüntüleri.....	51
<b>Şekil 26</b>	iFISH ve MLPA bulgularının karşılaştırılması.....	59

## TABLolar DİZİNİ

		Sayfa No
<b>Tablo 1</b>	KLL Tanı Kriterleri(NCIWG).....	4
<b>Tablo 2</b>	KLL Tanı Kriterleri(IWCLL).....	4
<b>Tablo 3</b>	Modifiye Rai Evreleme Sistemi.....	5
<b>Tablo 4</b>	Binet Evreleme Sistemi.....	5
<b>Tablo 5</b>	KLL’de Prognostik Faktörler.....	6
<b>Tablo 6</b>	KLL’de Tedavi Başlama Kriterleri.....	14
<b>Tablo 7</b>	SALSA MLPA P037-A2 KLL Probmiks-1.....	20
<b>Tablo 8</b>	SALSA MLPA P038-A2 KLL Probmiks-1.....	21
<b>Tablo 9</b>	P037-A2 KLL Probmiks Özellikleri.....	22
<b>Tablo 10</b>	P038-A2 KLL Probmiks Özellikleri.....	23
<b>Tablo 11</b>	MLPA Reaksiyonu İçin Thermocycler Programı.....	24
<b>Tablo 12</b>	Yaş Gruplarına Göre Hastaların Dağılımı.....	27
<b>Tablo 13</b>	Rai Evrelemesi ve Hasta Dağılımı.....	27
<b>Tablo 14</b>	Olguların Demografik Özellikleri.....	28
<b>Tablo 15</b>	Kültürde Başarı Durumları.....	29
<b>Tablo 16</b>	Olguların Karyotipleri.....	33
<b>Tablo 17</b>	Sitogenetik Anomali Yüzdeleri.....	34
<b>Tablo 18</b>	Olguların iFISH Sonuçları.....	40
<b>Tablo 19</b>	iFISH ile Saptanan Anomalilerin Yüzdesi.....	43
<b>Tablo 20</b>	DNA örnekleri spektrofotometri ölçümleri.....	44
<b>Tablo 21</b>	H38 no’lu hastaya ait P037-A2 probmiksi ile çalışılan normal doz oranı analiz görüntüsü.....	48
<b>Tablo 22</b>	H20 no’lu hastaya ait P038-A2 probmiksi ile çalışılan normal doz oranı analiz görüntüsü.....	49
<b>Tablo 23</b>	H28 no’lu hastaya ait 12. kromozoma spesifik problarda amplifikasyon tespit edilen P038-A2 probmiksi ile çalışılan hastanın doz oranı sonuçları.....	52
<b>Tablo 24</b>	H10 no’lu hastaya ait Rb1 probu haricinde 13q14 bölgesine spesifik problarda delesyon tespit edilen P037-A2 probmiksi ile çalışılan hastanın doz oranı sonuçları.....	53

<b>Tablo 25</b>	P037-A2 probmiks ile çalışılan, 13q14, 17p13, ve 9p21 delesyonu olarak değerlendirilen H33 no'lu hastaya ait doz oranı sonuçları...	54
<b>Tablo 26</b>	MLPA Bulgularının Yüzdesi.....	55
<b>Tablo 27</b>	Olguların Sitogenetik, FISH ve MLPA Sonuçları.....	57
<b>Tablo 28</b>	Kullanılan yöntemlere göre tespit edilen sitogenetik anormallikler	58

## ÖZET

### **Kronik Lenfositik Lösemilerde görülen prognostik kromozomal anomalilerin tanımlanmasında rutin tekniklerle beraber Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification(MLPA) Yönteminin Kullanılması**

Dr. Akif AYZAZ

Kronik Lenfositik Lösemi, prognostik öneme sahip kromozomal anormalliklerin sık görüldüğü, klinik olarak heterojen seyirli bir hastalıktır. KLL'de tanımlanan sitogenetik anomaliler oldukça fazladır. Bu anomaliler prognoz, tedaviye başlama ve tedaviyi yönlendirme açısından önemlidir. 13q14 delesyonu, trizomi 12, 11q22 delesyonu, 17p13 delesyonu, KLL'de en sık görülen kromozomal anormalliklerdir. Bu çalışma ile 41 KLL hastasının SALSA Probmix P037-A2/P038-A2 kiti ile yapılan MLPA sonuçlarını, konvansiyonel sitogenetik ve FISH sonuçları ile karşılaştırıp, MLPA tekniğinin kullanılabilirliği araştırıldı. Ayrıca KLL hücrelerinin proliferasyon yeteneğinin düşük olmasından dolayı, konvansiyonel sitogenetikte birer mitotik stimulan olan DSP30+IL-2 kombinasyonu kullanıldı. FISH çalışmasında, 11q22.3(ATM), 13q14.3 ve 17p13(p53) lokus spesifik problemleri ve sentromerik 12 problemleri kullanıldı.

Periferik kan ve kemik iliği kültürlerinde %80.4 oranında başarı elde edildi. Konvansiyonel sitogenetik ve FISH ile trizomi 12 saptanan 13 olgudan 5'i MLPA ile normal değerlendirildi. Ayrıca FISH ile 13q14 delesyonu tespit edilen 20 olgudan 6'sı MLPA ile normal değerlendirildi. Konvansiyonel sitogenetik ve FISH ile tespit edilemeyen 17p13 delesyonu ve 9p21 delesyonu MLPA ile tespit edildi. MLPA ile düşük düzey mozaiklikli anomaliler yanlış negatif olarak yorumlandı. Bu çalışmada MLPA tekniğinin mozaiklikleri tespit edebilme aralığı %25-30 olarak belirlendi. Ayrıca FISH ve MLPA ile 13q14 delesyonu tespit edilen 5 olgunun *Rb geni* bölgesi MLPA ile normal değerlendirildi.

Sonuç olarak MLPA yöntemi kolay uygulanabilir, düşük maliyetli bir yöntemdir. Düşük düzey mozaikliklerin MLPA ile tespit edilememesi ve MLPA ile tespit edilen bazı anomalilerin FISH ile tespit edilememesi nedeniyle, KLL'de MLPA yönteminin konvansiyonel sitogenetik ve FISH ile birlikte kullanılmasının uygun olduğu görüldü.

**Anahtar Kelimeler:** Kronik Lenfositik Lösemi, MLPA, DSP30, IL-2.

## SUMMARY

### **Contribution of MLPA to routine testing used to determine the prognostic chromosomal abnormalities in chronic lymphocytic leukemia.**

**Dr. Akif AYZ**

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a clinically heterogeneous disease and chromosomal abnormalities with prognostic impact are frequently detected in CLL patients. CLL is characterized by a variety of chromosomal abnormalities detected by conventional cytogenetics. These abnormalities are important as prognostic indicators and key strategies for making treatment decisions. Deletions of 13q14, 11q22, and 17p13, and trisomy 12 are the most frequent chromosomal abnormalities in CLL.

In this study, MLPA results using SALSA MLPA kit P037-A2/P038-A2 were compared with results from conventional cytogenetics and FISH and assessed the suitability of MLPA technology as a method for detecting a variety of known chromosomal abnormalities in 41 CLL patients. It is also used DSP30+IL-2 combinations as mitotic stimulant agents because of the low mitotic index of CLL cells in conventional cytogenetics. Locus-specific probes for 11q22.3 (ATM), 13q14.3, and 17p13 (p53), and centromeric probe for chromosome 12 were used for FISH analysis.

Informative results were obtained from 80.04% of peripheral blood and bone marrow cultures. Among the 13 positive patients for trisomy 12 by conventional cytogenetics and FISH, 5 patients were normal by MLPA. The 13q14 deletions were detected in 20 patients by FISH and only 6 patients were normal by MLPA. In contrast, the 17p13 and 13q14 deletions were detected by MLPA but not conventional cytogenetics and FISH. We concluded that MLPA will give false negative results in patients of low level mosaicism for any abnormalities. In this study, it was determined that MLPA was not as sensitive at detecting mosaicism below 25-30% of cells as conventional cytogenetics and FISH.

In conclusion, MLPA is a simple and cost-effective technique. But, we suggested that MLPA technique should be used with conventional cytogenetics and FISH in detection of chromosomal abnormalities with potential clinical significance in CLL.

because MLPA technique was unsuitable for reliable detection of low level mosaicism and some abnormalities were detected by MLPA but not FISH.

**Key Words** : Chronic Lymphocytic Leukemia, MLPA, DSP30, IL-2.



## GİRİŞ

Kronik lenfositik lösemi (KLL), olgun görünümlü küçük lenfositlerin kan, kemik iliği, lenf bezi ve dalağı infiltre etmesi ve lenfositlerin fonksiyon bozukluğu göstermesi ile karakterize kemik iliğinin malign bir hastalığıdır (1).

Yetişkinlerde özellikle Kuzey Amerika ve Avrupa ülkelerinde en sık görülen lösemi türüdür (2). Tüm yetişkin lösemilerin %30'unu oluşturmaktadır. KLL'li hastalarda erkek kadın oranı 2/1'dir (3). Bütün lösemilerde olduğu gibi kronik lenfositik lösemnin de nedensel faktörü bilinmemektedir. Ancak genetik faktörlerin KLL oluşumunda etkili olabileceği bilinmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalara rağmen KLL'nin moleküler patogenezinin tam olarak aydınlatılamamasının nedenlerinden biri de, KLL hücrelerinin metafaz analizindeki zorluklardır.

Lösemide tanımlanan sitogenetik anomaliler oldukça fazladır. 13q14 delesyonu, trizomi 12, 11q22 delesyonu, 17p13 delesyonu, KLL'de en sık görülen kromozomal anormalliklerdir (4). Bunlar sadece tek bir tipe veya subtipe özgün sitogenetik anomaliler değildir. Bu nedenle ayırıcı tanıda sitogenetik anomalinin diğer klinik ve laboratuvar sonuçları ile birlikte değerlendirilmesi gerekir. Her olguda rutin sitogenetik analiz yapılmalı, elde edilen bulgulara göre moleküler analizler sürdürülmelidir.

Bu çalışmanın amacı; gerek konvansiyonel teknikler gerekse FISH tekniği ile hematopoetik malignitelerin bir grubunu oluşturan KLL' de, olabilecek kromozomal yeniden düzenlenmelerin sıklıklarını belirlemek ve hastalıkla ilişkisine, kullanılan klasik moleküler sitogenetik yöntemler ve PCR' a dayalı güncel bir moleküler yöntem olan MLPA tekniğini kullanarak cevap aramaktır. Ayrıca KLL hücrelerinin mitotik indeksinin düşük olması nedeniyle farklı mitotik stimulanların kullanımı amaçlanmıştır. Bu çalışmada, farklı merkezlerde etkinliği bildirilmiş mitotik stimulanlardan CpG DSP30 ve IL-2, lenfosit kültürü aşamasında kullanılarak etkinliklerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır (5).

KLL'li hastalarda yapılan bir çalışmada, MLPA ve FISH tekniği arasında %95 konkordans saptanmıştır (6). Bu projede Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) tekniği ile KLL'ye spesifik dizayn edilmiş Salsa MLPA Probemiks 037-A2 / 038-A2 kitleri kullanarak, KLL ile ilişkilendirilmiş farklı kromozom ve gen bölgelerindeki delesyon ve / veya amplifikasyonların incelenmesi amaçlanmıştır. MLPA tekniği ile elde edilen bu sonuçlar, konvansiyonel sitogenetik ve FISH yöntemi ile elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılacak ve hematolojik malignensilerin taramasında kullanılan diğer genetik tekniklerin birbirine avantaj veya dezavantajları, duyarlılıkları ve güvenilirlikleri de bu çalışmada incelenecektir. Bu proje ile KLL'de, MLPA ve FISH tekniği karşılaştırılmış olacaktır. Ayrıca MLPA tekniğinin KLL hastalarının rutin taramalarında kullanılabilirliği bu çalışmanın sonuçları ile değerlendirilmiş olacaktır.

Çalışmamızda Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı'nda takip edilen KLL tanısı almış 41 hastanın konvansiyonel sitogenetik, FISH ve MLPA analizi sonuçları incelenecektir. MLPA tekniği ile elde edilen bu sonuçlar, konvansiyonel sitogenetik ve FISH yöntemi ile elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılacak ve hematolojik malignensilerin taramasında kullanılan diğer genetik tekniklerin birbirlerine avantaj veya dezavantajları, duyarlılıkları ve güvenilirlikleri de bu çalışmada değerlendirilecektir. Ayrıca MLPA tekniğinin KLL hastalarının rutin taramalarında kullanılabilirliği bu çalışma ile saptanmış olacaktır.

## GENEL BİLGİLER

### KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ'YE GİRİŞ

Kronik lenfositik lösemi (KLL), B veya T lenfositlerin nispeten olgun hücre döneminden köken alan, olgun görünümlü küçük lenfositlerin kan, kemik iliği, lenf bezi ve dalağı infiltrate etmesi ve lenfositlerin fonksiyon bozukluğu göstermesi ile karakterize kemik iliğinin malign bir hastalığıdır (1). KLL olgularının %95'i B lenfosit kökenlidir (2).

KLL, Batı dünyasında erişkinlerde görülen en sık lösemi formudur (7). Batı dünyasında, erişkin lösemilerin %30'undan fazlasını oluşturmaktadır (8). Batı toplumlarının; Çin, Hindistan, Japonya gibi toplumlara göre, 20-30 kat daha fazla yakalandığı bildirilmiştir (9). KLL'li hastalarda erkek/kadın oranı 2/1'dir (3). KLL, ileri yaş hastalığıdır. Vakaların %20-30 kadarı, 55 yaşın altındadır (10).

KLL'nin etiyojisi henüz aydınlatılamamıştır. Radyasyon, viral enfeksiyonlar, kimyasal ajanlar ve otoimmün hastalıkların KLL ile olan ilişkisi kanıtlanmamıştır. Birinci veya ikinci derece akrabalarda KLL öyküsü, KLL'ye yakalanma olasılığını %10'a kadar arttırmaktadır (11). Bu durum KLL etiyojisinde, genetik faktörlerin önemli olduğunu göstermektedir. Geniş çaplı vaka-kontrol çalışmalarında, birinci derece akrabalarında diğer kanser türlerine göre en yüksek risk oranı KLL'de bildirilmiştir (12). Ayrıca kromozomal anormalliklerin KLL prognozunu etkilediği bildirilmiştir (13). 17p13 ve 11q22 delesyonu kötü prognozla ilişkilendirilmiştir ve bu bireylerde ilaç tedavisine direnç bildirilmiştir; normal karyotipe sahip ve 13q14 delesyonu ise, nispeten daha iyi prognoz göstergesidir (4,13,14). Trizomi 12'li bireylerde ise, prognoz orta-kötü arasında değişkenlik göstermektedir (13,14).

KLL'de prognozu etkileyen diğer faktörler ise; periferik kandaki atipik lenfosit oranı,  $\beta$ 2 mikroglobulin düzeyi, timidin kinaz, lenfositlerin iki katına çıkış süresi, CD23 ve CD38 ekspresyonudur (15).

### TANI

KLL'li bireylerin önemli bir kısmı, özellikle de erken evrede olanlar asemptomatiktir. Halsizlik, ateş, iştahsızlık, kilo kaybı, gece terlemesi, egzersiz

intoleransı, enfeksiyonlara sık yakalanma gibi belirtiler görülebilir. En sık görülen fizik muayene bulgusu lenfadenopatidir. Lenfadenopati genellikle ağrısız, lastik kıvamında ve mobildir. Lenfadenopati sayısı ve hacmi değişkenlik gösterir. Splenomegali ve hepatomegali ise, diğer muayene bulgularıdır.

Genellikle farklı nedenlerle yapılan rutin kan tahlillerinde lenfositöz saptanması, olguyu KLL açısından değerlendirmenin başlangıç ayağını oluşturmaktadır. Tabloya ilerleyen dönemlerde, anemi ve trombositopeni eklenebilir. KLL tanısı için birçok kriter geliştirilmesine rağmen, en sık kullanılan 1988’de “National Cancer Institute-sponsored Working Group(NCIWG)” ve “International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL)”nin ortaya koyduğu kriterlerdir (1). Aynı zamanda NCIWG ve IWCLL’nin, KLL’de evreleme ve tedavi yöntemleri üzerinde de çalışmaları mevcuttur.

**TABLO 1: KLL Tanı Kriterleri (NCIWG)**

1.Periferik kanda lenfositöz : 5.000/mm <sup>3</sup>
2.İmmunfenotipleme : En az 1 adet B hücre işareti (CD19, CD20, CD23) + CD5
3.Kemik iliğinde lenfositöz: ≥ %30
4.Atipik hücre oranı :< %50

Tanı: 1 no’lu kriter ile birlikte 2 veya 3 no’lu kriter; ya da lenfosit sayısı 5.000/mm<sup>3</sup>’ten düşükse, 2 ve 3 no’lu kriter birlikte bulunmalıdır.

**TABLO 2: KLL Tanı Kriterleri (IWCLL)**

≥10.000 lenfositöz + B fenotipi veya kemik iliği tutulumu
<10.000 lenfositöz+ B fenotipi + kemik iliği tutulumu
>%30 kemik iliği lenfosit oranı

## **EVRELEME**

KLL hastalarında klinik seyir oldukça değişkendir. KLL evreleme sistemleri, bireysel prognozu tayin etmek için kullanılan sistemlerdir. KLL’de güncel olarak 2

evreleme sistemi kullanılır. Bunlar Modifiye Rai ve Binet evreleme sistemleridir (16,17). Bu evreleme sistemleri ile tahmini sağ kalım süresi belirlenebilir.

**TABLO 3: Modifiye Rai Evreleme Sistemi (19)**

<b>Evre</b>	<b>Klinik</b>	<b>Medyan Sağkalım</b>
<b>0</b>	Lenfositoz	>10 yıl
<b>1</b>	Evre 0 ve LAP	7
<b>2</b>	Evre 0 veya 1 ve splenomegali ve/veya	7
<b>3</b>	Evre 0, 1 veya 2 ve anemi (Hb <11 gr/dl)	2
<b>4</b>	Evre 0-3 ve trombositopeni(Plt <100.000/mm <sup>3</sup> )	2

Evre 0: Düşük risk Evre 1-2: Orta risk Evre 3-4: Yüksek risk

**TABLO 4: Binet Evreleme Sistemi (20)**

<b>Evre</b>	<b>Klinik</b>	<b>Lenfoid Sayısı</b>	<b>Medyan Sağkalım</b>
<b>A</b>	Hb≥10gr/dl; Plt≥100.000/mm <sup>3</sup>	<3	>10 yıl
<b>B</b>	Hb≥10gr/dl; Plt≥100.000/mm <sup>3</sup>	≥3	5
<b>C</b>	Hb<10gr/dl veya Plt<100.000/mm <sup>3</sup>		2

### **PROGNOZ**

Prognoz olarak çok değişkenlik gösteren bir hastalık olan KLL'de, yaşam ömrü aylarla sınırlı olabileceği gibi, dekadlarca uzun da olabilir. Rai ve Binet evreleme sistemleri, KLL hastalarının klinik seyrinin, sağkalım süresinin ve tedavi gereksiniminin belirlenmesinde klinisyenin başvurduğu kaynaklardır (2,18). 1981'de NCIWG KLL'de her iki sistemin birlikte kullanılmasını önermiştir (16). Fakat bu evreleme sistemleri, özellikle erken evre hastalarda tedavi gereksinimi olan hastaların belirlenmesinde yetersiz kalmaktadır (19). Binet A ve Rai 0 veya 1 evresinde, tedaviye başlamak için hastalığın progressif olduğunun bilinmesi gerekir. Erken evrede tespit edilen KLL'li hastaların %40-%50'si progressif olup, tedavi gereksinimi mevcutken, hastaların %50-60'ında tedavi gereksinimi yoktur (20,21). Rai ve Binet evreleme sistemlerinin bu ayrımı yapmada yetersiz kalması nedeniyle, prognozu belirlemeye katkı sağlayabilecek farklı faktörler üzerinde çalışmalar yapılmaktadır (22). Bunlardan başlıcaları; cinsiyet, kemik iliği tutulum şekli,

kromozomal değişiklikler, kemik iliğinde lenfosit oranı, lenfosit morfolojisi,  $\beta 2$  mikroglobulin düzeyi, immunglobulin ağır zincir mutasyonu, timidin kinaz, ZAP70 ekspresyonu, CD38 pozitiflik oranı ve p53 mutasyonu sayılabilir (Tablo 5).

**TABLO 5:** KLL’de Prognostik Faktörler

Parametre	Düşük Risk	Yüksek Risk
Binet evre	A	B ve C
Rai evre	0-I	II-III-IV
Kİ tutulum şekli	Non-diffuz	Diffuz
Kİ lenfosit oranı	$\leq 80$ lenfosit	$> 80$ lenfosit
Lenfosit morfolojisi	Tipik	Atipik
Kromozomal Anomaliler	Normal-13q14 delesyonu	Trizomi 12-del17p-del11q
Kanda lökosit sayısı	$\leq 30-50 \times 10^9/L$	$> 30-50 \times 10^9/L$
Timidin Kinaz	Normal	Artmış
Zap70	Negatif	Pozitif
CD38	Negatif	Pozitif
IgVH mutasyonu	Mutant	Non-mutant
$\beta 2$ Mikroglobulin düzeyi	Normal	Artış

### **IgVH Mutasyonu**

B lenfositleri, antijeni tanıyabilme ve antikor sentezleyebilme özelliğine sahiptir. IgVH mutasyonu sayesinde B-lenfositler antijene tam uyumlu antikorları sentezleyebilmektedir. KLL olgularının yaklaşık %50’sinde IgVH mutasyonu bildirilmiştir (33). IgVH mutasyonu tespit edilen olgularda, yaşam süresi ve tedavisiz geçen sürenin daha uzun ve prognozun daha iyi olduğu bildirilmiştir (22,34). Dolayısıyla IgVH mutasyonu KLL’de iyi prognoz göstergesi olarak yerini almıştır.

### **ZAP-70 Proteini**

ZAP-70, T-hücre aktivasyonunun erken aşamasında görev yapan, sitoplazmik bir protein tirozin kinazdır. Erken evre KLL’de ZAP-70 protein pozitifliği, tedavi ihtiyacının daha kısa sürede ortaya çıkacağı yönünde yorumlanmaktadır. Çok parametrelili akım sitometresi ve Revers Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile ZAP-70 mRNA saptanabilmektedir. KLL hücrelerinde ZAP-70 protein pozitifliği ve IgVH mutasyonu arasında yakın bir ilişki bildirilmiştir (35-36).

## **CD38**

B hücre yüzeyinde, monositlerde ve natural killer (NK) hücrelerinde bulunan, siklaz ve hidrolaz aktivitesi bulunan bir ektoenzimdir. CD38, KLL için bağımsız bir prognoz göstergesidir. Yüksek CD38 ekspresyonu, kısa bir sürede tedaviye başlama ve kısa yaşam süresi ile ilişkilendirilmiştir (39,40). IgVH mutasyonu saptanmayan durumlarda CD38 ekspresyonu bildirilmiştir (37). 13q delesyon ile CD38 negatifliği ve 17p ve 11q delesyonu ile CD38 pozitifliğinin korele olduğu iddia edilmektedir (38).

### **Lenfosit Katlanma Süresi**

Mutlak lenfosit sayısının ikiye katlanma zamanının ay olarak hesaplanmasına “lenfosit katlanma süresi” denir (42). NCIWG klavuzunda bu sürenin 6 aydan daha kısa olması tedavi endikasyonu olarak bildirilmiştir (1). Enfeksiyonlar başta olmak üzere kortikosteroid alımı, lenfosit sayısını etkileyerek, lenfosit katlanma süresinin kullanımını zorlaştırmaktadır.

### **Kemik İliği İnfiltrasyon Tipi**

KLL’de 4 farklı kemik iliği infiltrasyon tipi tanımlanmıştır:

- 1.Nodüler Tip
- 2.İnterstisyel Tip
- 3.Karışık Tip (Nodüler+İnterstisyel)
- 4.Yaygın Tip

Nodüler, interstisyel ve karışık tip sınırlı tutulum olarak da bilinmektedir ve sağ kalım daha uzundur (43,44). Yaygın infiltrasyon tipi ise, kötü prognoz göstergesidir (45).

### **$\beta$ 2 Mikroglobulin Düzeyi**

Hastalık evresi ve tümör kitlesi ile ilişkili bir serum belirtecidir. Serum  $\beta$ 2MG düzeylerinin toplam sağ kalım ve kemoterapi yanıtı ile ters orantılı olduğu bildirilmiştir (45).

### **Timidin Kinaz Aktivitesi**

Timidin kinaz DNA sentezinde rol alan bir enzimdir. Neoplastik hücrelerin bölünme sayısının, serum timidin kinaz aktivitesinin belirlenmesinde rol oynadığı

düşünülmektedir (46). Serum timidin kinaz aktivitesinin, sağ kalım ile ters ilişkili olduğu bildirilmiştir (45).

### **LDH Düzeyi**

5 Farklı tetramerik izoenzimden oluşur. Yüksek tümör yükünün tespitinde kullanılır. Rambotti ve ark.nın yaptığı çalışmada, normal B hücrelerinde tespit edilen LDH aktivitesinin, B-KLL hücrelerine göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (47).

### **Serum CD23 Düzeyi**

CD23 B-KLL hücrelerinin yüzeyinde bulunmaktadır. Yüksek serum CD23 düzeyleri, kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (48).

### **Kromozomal Değişiklikler**

Döhner ve ark.nın çalışmasında KLL'li hastaların %85'inde kromozomal anomali bildirilmiştir (4). En sık görülen kromozomal anormallikler 13q14 delesyonu (%50-60), trizomi 12 (%12-25), 11q22.3 (ATM) (%10-20) ve 17p13 (TP53) (%5-10) delesyonlarıdır. 17p13 ve 11q22 delesyonları prognozu en olumsuz etkileyen kromozomal değişiklikler iken, 13q14 delesyonu en iyi prognoz göstergesidir. Trizomi 12 ve normal karyotipe sahip bireylerde ise, prognoz değişken olmakla birlikte, orta-ılımlı düzeydedir.

### ***13q14 Delesyonu***

Tümör süpresör gen ailesinden ilk bulunan Rb geni, bu bölgeye lokalizedir. Hücre siklusunun G1 ve S fazı arasında önemli görevlere sahiptir. KLL'li olguların 13q14 bölgesinde %63 gibi yüksek bir oranda delesyon bildirilen çalışmalar mevcuttur (50). Olguların yaklaşık 3'te birinde her iki allelde delesyon tespit edilmektedir (51). Delesyon tek allelde ve eşlik eden başka kromozomal anormallik yoksa, iyi prognoz belirteçidir (51). Ortanca sağ kalım 133 ay olarak bildirilmiştir (4).

### ***Trizomi 12***

Prognoz değişken olmakla birlikte orta-ılımlı düzeydedir. Trizomi 12 lösemik hücrelerde atipik morfolojiyle ilişkilidir. Sıklıkla diğer kromozomal anomalilerle birliktelik gösterdiği bildirilmiştir (51). Metafaz kalitesinin kötü olduğu durumlarda kolaylıkla tespit edilebilir. Ortanca sağ kalım 114 ay olarak bildirilmiştir (4).



### ***17p13 Delesyonu***

KLL'li olguların %5-10'unda 17p13 delesyonu bildirilmiştir (4, 14, 52). Bu bölgede bir tümör süpresör gen olan p53 lokalizedir. Apoptozisin düzenlenmesinde görev alır (51,53). 17p13 delesyonlu olgularda kemoterapi direnci bildirilmiştir ve prognoz kötüdür (54). Daha çok ileri yaş KLL hastalarında bildirilmiştir (55). 17p13 delesyonu kısa tedavisiz izlem süresi ile ilişkilidir (56). Ortanca sağ kalım 32 ay olarak bildirilmiştir (4).

### ***11q22.3 Delesyonu***

11q22.3 delesyonu KLL'li olguların %10-20'sinde raporlanmıştır (4,14,52). KLL'de kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. Bu bölgede, tümör oluşumu riskinin arttığı hereditör bir sendrom olan ataksi telenjektazi ile ilişkili ATM geni lokalizedir. Apoptozis sürecinde önemli görevleri olan bu genin, delesyonu ile bazı malignitelerin sıklığının arttığı bildirilmiştir (51). ATM geni, p53 geninin apoptozis sürecinde üstlendiği rolü aktive eder (53). 11q22.3 delesyonu daha çok genç olgularda raporlanmıştır ve büyük lenf bezleri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ortanca sağ kalım 79 ay olarak bildirilmiştir (4).

Daha az sıklıkta görülen kromozomal değişiklikler ise, 6q24-25, 9p21 ve 10q23 delesyonları; 2p24, 8q24 ve 18q21 artışları ve 19. kromozomun trizomisi. Genellikle bu kromozomal değişiklikler kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (23-29). Trizomi 8, 14q32 translokasyonu ve trizomi 3 ise, iyi prognozla ilişkilendirilmiştir (4, 49).

### **KLL'DE KONVANSİYONEL SİTOGENETİK VE FISH YÖNTEMİ**

KLL'de kromozomal değişikliklerin prognostik önemi bilinmesine rağmen, konvansiyonel sitogenetik çalışmalarda başarı oranı düşüktür. Çünkü KLL hücrelerinin in vitro proliferasyon yeteneği düşüktür. Bu nedenle bu hücrelerdeki mitotik indeksi arttırmak için çeşitli stimulanlar tercih edilebilmektedir. En sık kullanılanlar ise, interlökin 4 (IL-4), lipopolisakkarit (LPS), 12-O-tetradekanolforbol 13-asetat (TPA), CpG-oligonükleotid DSP 30 + İnterlökin 2 (IL-2)'dir. Biz bu çalışmada, Dicker ve ark.nın 2006 yılında kültürde yakaladıkları yüksek başarı oranı nedeniyle, DSP30+IL-2 kombinasyonunu tercih ettik (30). CpG-ODN'nin normal ve B-KLL hücrelerde proliferasyonu ve sitokin üretimini arttırdığı ve yüzey molekül regülasyonunu sağladığı gösterilmiştir (31). Siklin D3, normal B hücrelerin hücre

siklusunun G1 evresine girmesini sağlayan D tip siklidir; fakat B-KLL hücrelerinde siklin D2 ve siklin D3 birlikte güçlü bir stimulyasyon oluştururlar. Siklin D2 ve D3 cdk4 ile ilişkilidir ve normal B hücrelerde D tip siklinleri katalize ederler. İn vitro ortamda siklin D2 ve cdk4 veya siklin D3 ve cdk4, Rb proteininin fosforilasyonunu ve fonksiyon görmesini sağlarlar. B lenfositlerde, hücre siklusu inhibitörü olarak p27'nin önemli bir yeri vardır. B-KLL hücrelerinde p27'nin overekspresyonu gösterilmiştir. B-KLL hücrelerinde, RB protein fosforilasyonu ve indüklenmesi, DSP30 ve IL-2 ile birlikte sağlandığı bildirilmiştir (32). CpG-ODN DSP 30, malign B hücrelerde normal B hücrelere oranla IL-2 reseptör  $\alpha$  zincirini etkili bir şekilde indüklediği bildirilmiştir (31). Dolayısıyla KLL'de konvansiyonel sitogenetik çalışmalarda, DSP30 ve IL-2 birlikte kullanımı önerilmektedir.

KLL sitogenetiğinde kullanılan bu stimulanlara rağmen, metafaz analizlerindeki ve mikrolezyonların tespitindeki zorluklar, farklı teknikleri gündeme getirmiştir.

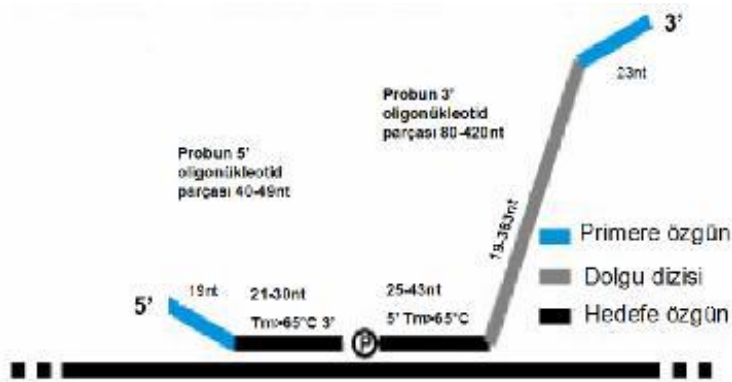
KLL'de en sık görülen kromozomal anormallikler, moleküler sitogenetik olarak da adlandırılan “ Fluorescence İn Situ Hybridization (FISH)” tekniği ile yüksek oranlarda saptanabilmektedir. FISH, B-KLL hücrelerinin in vitro proliferasyon yeteneğinin düşük olması nedeniyle, kromozomal anormalliklerin sadece metafaz evresinde değil interfaz evresinde de tespit edilmesine imkan sağlamaktadır. Fabris S. ve ark. I-FISH ile sentromerik 12, 17p13.1, 11q22.3 ve 13q14.3 lokus problemleriyle, olguların % 81'inde kromozomal anormalliklerin tespit edildiğini bildirmişlerdir (6). Biz bu projede, KLL'de en sık görülen kromozomal anormallikler olan trizomi 12, 17p13.1, 11q22.3 ve 13q14.3 delesyonlarını tespit etmek için dizayn edilen problemleri kullandık.

### **MLPA YÖNTEMİ VE KLL**

KLL'de ilgili kromozomal ve gen bölgelerindeki değişikliklerin tespitinde kullanılan bir diğer yöntem “Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)” ise, güncel bir yöntemdir ve tek reaksiyonla 50'ye yakın ilişkili gen bölgesinin değerlendirilmesine imkan vermektedir. MLPA ilk defa 2002 yılında Schouten ve ark. tarafından tanımlanan (57) ve “relatif kantitatif PCR” olarak da adlandırılan bir yöntemdir. MLPA, uygulaması kolay bir yöntemdir ve 45 dizinin amplifikasyonu için 20ng DNA yeterlidir. MLPA reaksiyonunda amplifiye olan

hedef dizi değil, hedef diziye hibridize olan MLPA problemleridir. Standart bir multipleks PCR'dan farklı olarak, sadece bir tek primer çifti kullanılır. Elde edilen amplifikasyon ürünleri 130-490 baz çifti uzunluğunda olup, jelde yürütülür ve kapiller elektroforez sistemi yardımıyla pikler elde edilir. Bu pikler referans örnekler ile karşılaştırılarak, delesyonlar veya amplifikasyonlar tespit edilebilir.

MLPA problemleri hedef diziye hibridize olduklarında, her prob için birbirine eklenebilecek iki oligonükleotid dizisi tasarlanmıştır. Bütün hibridize problemler, 5' ve 3' uçlarında PCR ile aynı anda tek primer çifti ile amplifiye olmaları için sabit evrensel primer dizileri içermektedir. Prob uzunluğunun ayarlanması için genellikle her iki oligonükleotid parçasında dolgu (stuffer) dizisi bulunmaktadır. 3' oligonükleotid parçası, 5' ucundan fosforiledir. Dolayısıyla 5' oligonükleotid parçası ile birleşebilir. Her MLPA probleminin 5' oligonükleotid parçasının 5' ucunda 19 nükleotidlik evrensel primer dizisi; 3' ucunda ise, 21-30 nükleotid uzunluğunda hedefe özgü dizi bulunmaktadır. 3' oligonükleotid parçasının 3' ucunda ise, 23 nükleotid uzunluğunda evrensel primer dizisi; 5' ucunda ise, 25-43 nükleotid uzunluğunda ilk proba komşu hedef diziye hibridize olacak dizi bulunmaktadır. 19-370 nükleotid uzunluğundaki dolgu dizisi de problemin 3' oligonükleotid ucuna eklenerek, toplam prob uzunluğu ayarlanır.

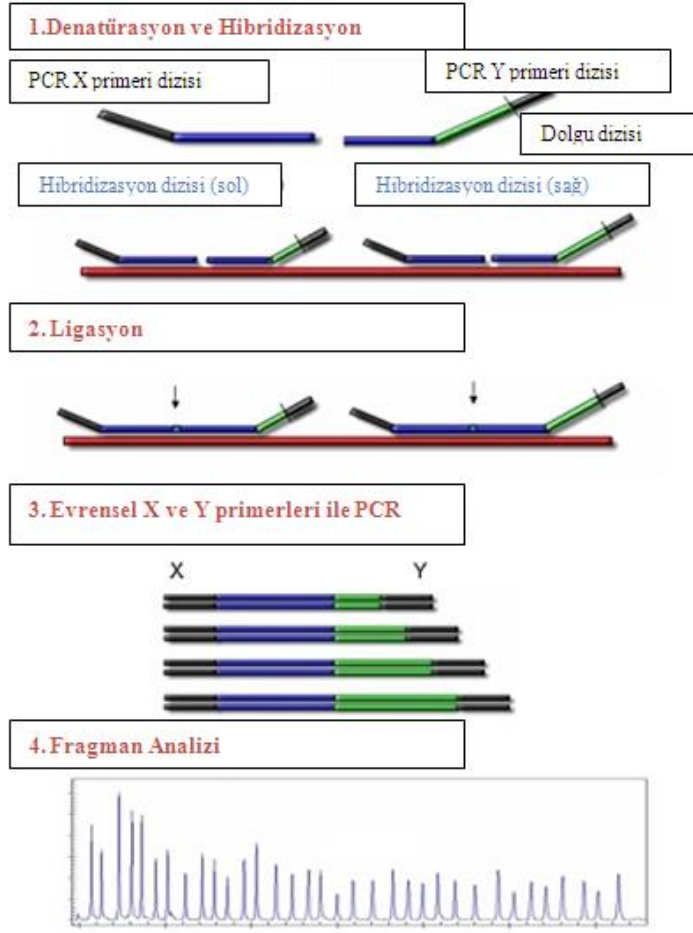


**Şekil 1:** MLPA problemlerinin şematik gösterilmesi  
Kozłowski P. ve ark.'dan Türkçeleştirilerek alınmıştır (58).

80-440 nükleotid uzunluğundaki oligonükleotidler, MLPA kalitesini olumsuz etkilediklerinden kimyasal olarak sentezlenmektedir. Bu oligonükleotidler, M13 klonlarının tek zincirli DNA'sı ile sentezlenmektedir. MLPA'da kullanılan kitlerin çoğu 35-42 prob içermektedir ve problemler arasında 6-9 baz çiftlik uzunluk farkı vardır.

Bu problemler farklı M13 kaynaklı vektörlerden tasarlanmıştır. Bu problemler arasında heterodupleks oluşumunu engellemek için sadece uç kısımlarının ortak dizi içermesine dikkat edilir. M13 kaynaklı ,118 farklı dizide ve uzunlukta dolgu dizisi içeren MLPA vektörü bulunmaktadır. Gerekli fragman uzunluğu, bu vektörlerin hedef diziye spesifik oligonükleotidlere eklenmesi ile elde edilir. Amplifikasyon ürünü 94-124 baz çifti olan problemler, MLPA yönteminde başarılı bir şekilde kullanılabilir (57). M13 kaynaklı oligonükleotid problemlerinin hibridize olmayan dolgu dizilerinin farklı uzunlukta olması önemli avantajlar sağlamaktadır. Amplifikasyon ürünlerinin farklı özellikleri bu sayede değerlendirilebilir. Hibridizasyonu gerçekleşen hedefe özgü kısa diziler ise, yarışmalı olarak bağlanmadıklarından tek nükleotid polimorfizmleri ve mutasyonu değerlendirmede kolaylık sağlamaktadır.

MLPA tekniği, 4 temel aşamadan oluşmaktadır. Denatürasyon, hibridizasyon, ligasyon ve son olarak PCR ile amplifikasyon aşamasıdır. PCR aşamasında bütün problemler tek bir primer çifti ile amplifiye edilir. Primer çiftlerinden bir tanesi N-(3-fluoranthyl) maleimide (FAM) ile işaretlenmiştir. Elde edilen PCR ürünleri kapiller elektroforez yardımıyla kontrol grubu pikleri esas alınarak değerlendirilir. MLPA yöntemi genomik DNA'da olduğu gibi mRNA çalışmalarında da kullanılabilir.



**Şekil 2:** MLPA aşamaları

Kaynak 59'dan Türkçeleştirilerek alınmıştır (59).

Literatürde KLL'de MLPA yöntemi ile yayınlanmış sınırlı sayıda çalışma mevcut iken, ülkemizde bu konuda henüz bir çalışma yayınlanmamıştır. MRC-Holland firmasının KLL'ye spesifik olarak tasarladığı P037-A2/P038-A2 kitleri kullanılarak birçok bölge tek bir reaksiyonla değerlendirilebilmektedir (Tablo 7-8). Fabris S ve ark. MLPA ve FISH yöntemi ile tedavi almamış 100 KLL hastasının 79 (%79)'unda sitogenetik anomali bildirmişlerdir (6).

## TEDAVİ

Genel olarak erken evrede, alkileyici ajanların sağ kalımı etkilememesi nedeniyle "bekle-gör" politikası uygulanmaktadır. Ateş, gece terlemesi, kilo kaybı, güçsüzlük gibi belirtiler, sorun oluşturan lenfadenopati, splenomegali, hızla artan lenfosit sayısı, trombositopeni ( $100.000 \times 10^9/L$ ) tedaviyi başlatan nedenlerdir (Tablo 6).

**Tablo 6: KLL’de Tedavi Başlama Kriterleri**

Rai Evre $\geq 2$ ve yaşamsal aktiviteyi sınırlayacak kadar yorgunluk
$\geq 2$ hafta B semptomların varlığı
$>10$ cm lenf nodu veya lenfadenomegalinin yol açtığı semptomların varlığı
SM veya HM’ye bağlı semptomların varlığı
Anemi (Hb $<11$ g/dL)
Trombositopeni ( $100.000 \times 10^9/L$ )
Tedaviye cevapsız otoimmün hemolitik anemi veya ITP varlığı
WBC $>300 \times 10^9/L$ (2 hafta arayla 2 defa saptanması) ve alternatif komorbid bir hastalığın bulunmaması
Klasik tedaviye cevap vermeyen ağır paraneoplastik (hipersensitivite...) süreç

HEMATOLOGY Basic Principles And Practice’dan Türkçeleştirilerek alınmıştır(60).

İleri evre semptomatik hastalığın tedavisinde başlıca seçenekler; klorambusil ve siklofosfomid gibi oral alkilleyiciler, fludarabin, kladribin gibi pürin analogları, kemoterapi kombinasyonları, monoklonal antikolar ve transplantasyondur. Mevcut veriler, 11q22.3 veya 17p13.1 delesyonlu olgularda, bu bölgeler açısından normal olan olgulara göre, klorambusil’e cevap oranı düşük ve kısa remisyon süresi bildirilmiştir (41).

## **GEREÇ VE YÖNTEM**

### **OLGULARIN SEÇİMİ**

Bu projeye Pamukkale Üniversitesi Hematoloji Bilim Dalı tarafından flow sitometri ve periferik yayma ile Kronik Lenfositik Lösemi tanısı almış, 28'i erkek 13'ü kadın olmak üzere 41 olgu dahil edildi. Bu proje, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Komisyonu tarafından 18.02.2012 tarihli B.30.2.PAÜ.0.20.05.09/56 sayı ile onaylanmış ve Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2012TPF013 sayı ile desteklenmiştir. Projede yer alan hastalara çalışmamızla ilgili bilgi verildi ve bilgilendirilmiş gönüllü olur formu ve genetik olur formu imzalatılarak onayları alındı. Çalışmaya katılan tüm bireylerden 1 adet K3 EDTA'lı tüpe (VACUETTE®) ve 1 adet de heparinli enjektöre olmak üzere, toplam 2 adet 2-3'er ml periferik kan ya da kemik iliği örneği alındı. Kemik iliği örneği rutin istemi yapılan KLL'li hastalarda gelen materyal miktarının fazla olması durumlarında tercih edildi.

### **KONVANSİYONEL SİTOGENETİK**

RPMI 1640 (Panbiotech), 200 mmol L-Glutamin (Panbiotech), fetal dana serumu (Panbiotech), penisilin (Panbiotech), streptomisin (Panbiotech), 100 U/ml IL2 Hu Interleukin-2 Rekombinant (Panbiotech), fitohemaglutinin(BIOLOGICAL INDUSTRIES), 1µM CpG-ODN DSP30 (Metabion) ile besiyeri hazırlanıp, 5'er ml olacak şekilde 15 ml'lik tüplere ayrıştırıldı. Kemik iliği kültürlerine, periferik kandan farklı olarak, fitohemaglutinin eklenmedi.

1. Hücre sayısı  $2 \times 10^6$ /ml olacak şekilde, çeker ocakta (Holten LaminAir) periferik kan ya da kemik iliği ekimi besiyerine yapıldı.
2. 37°C kapalı sistem etüvde (memmert) 70 saat 45 dakika bekletildi.
3. 70 saat 45. dakikada 50 µl kolsemid (BIOLOGICAL INDUSTRIES) damlatıldı. 1 saat 15 dk bekletildi.
4. 72. saatte 1500 rpm'de 10 dk santrifüj (nüve NF800) edildi.
5. Süpernatant kısmı aspiratör (plusMED 7E-A) ile atıldı, pelet kısmı hafif manipülasyonlarla kaldırıldı.
6. Hipotonik bir solüsyon olan KCl, pastör pipeti (ISOLAB glass-225 mm) ile kaldırılan peletin üstüne aynı anda vortekslenerek (Yellowline TTS-2), damla damla 10 ml olarak eklendi.

7. 20 dk 37°C’de kapalı etüvde bekletildi.
8. Etüvden çıkarıldıktan sonra, 1500 rpm’de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı.
9. Hafif manipülasyonlarla kaldırılan pelete, daha önce 1/3 oranında hazırlanmış, -20°C’de bekletilen glisial asetik asit (MERCK) ve metanol (MERCK) solüsyonu 10 ml kadar vorteksenerek damlatıldı.  
(8. ve 9. Aşamalar pelet miktarı ve santrifüj sonrası renk dikkate alınarak en az 3, en fazla 7 defa tekrarlandı.)
10. Son santrifüjden sonra süpernatant kısmı atılan pelet, hafif manipülasyonlarla kaldırıldıktan sonra, +4°C’de bekleyen distile suda yıkanmış 76x26 mm’lik yaklaşık 45° açı ile tutulan lamlara (Superfrost-ThermoSCIENTIFIC) yoğunluk esas alınarak, tercihen 2-3 damla 30-40 cm yükseklikten pastör pipeti yardımıyla damlatıldı.  
(Metafaz sayı ve kalitesine göre, en az 5, en fazla 9 lama yayma yapıldı.)
11. Yayma yapılan lamlar kapalı sistem etüvde 70°C’de 16 saat eskitmeye bırakıldı.
12. Etüvden çıkan lamlar oda ısısında bir süre bekletildikten sonra, ortalama 30 sn tripsinde bekletildikten sonra çeşme suyunda yıkandı.
13. 2 cc PBS ve 6 damla giemsa (MERCK) boyası, pastör pipeti ile pipetaj yapıldıktan sonra, lamların üstüne yayıldı ve 3 dk bekletildi.
14. Son olarak Nikon ECLIPSE E600 mikroskopu ve Mackytype 5.6 image programında 5 metafaz analiz edildi, 15 metafaz ise, sayım için kullanıldı.
15. Kromozomal anormallikler ISCN 2009 referans alınarak tanımlandı.

### **FISH YÖNTEMİ**

RPMI 1640 (Panbiotech), 200 mmol L-Glutamin (Panbiotech), fetal dana serumu (Panbiotech), penisilin (Panbiotech), streptomisin (Panbiotech) ile besiyeri hazırlanıp, 5'er ml olacak şekilde 15 ml'lik tüplere ayrıştırıldı. Pelet olarak, 24 saatlik hücre kültüründen elde edilen peletler kullanıldı.

1. -20°C’de bekleyen peletler 1500 rpm’de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı.
2. Daha sonra +4°C’de bekleyen distile suda yıkanmış 76x26 mm’lik lamlar 2 dakika metanolde bekletildi.



- 3.** Lamlar kuruduktan sonra yoğunluk esas alınarak, 10-20µl pelet pipet (BIOHIT PROLINE) yardımıyla her hasta için 4 lama yayıldı.
- 4.** Daha önce hazırlanmış, +4°C'de bekleyen 2xSSC [45ml distile su+5ml 20SSC(amResco)], %70, %85 ve %100'lük etil alkol oda ısısında bekletildi. Kurumaya bırakılmış lamlar her solüsyonda sırasıyla 2'şer dakika bekletildi.
- 5.** Lamlar tekrar kurumaya bırakıldı. Bu arada -20°C'de bekleyen FISH probları 37°C'de kapalı etüvde 5-10 dakika kadar bekletilir. (Probların direkt ışık almamasına dikkat edilmelidir.)
- 6.** Sentromerik 12 probu (Sentromer FISH probu GREEN 1002-C12-Diagen), 13q14 probu (CGI-14-018), 11q22 probu (ATM/D11S 1251 DEL 11q22/11p15-CGI-14-018) ve 17p13 probu (TP53 17p13/ RARA deletion probu red/green (CGI-14-015) 10'ar µl olacak şekilde lamlara daha önce yayılmış peletin en yoğun bölgesine damlatıldı.
- 7.** Lamların üstü lameller (HONKA) ile kapatıldıktan sonra Rubber Cement ile lamellerin etrafı kapatıldı.
- 8.** Lamlar thermobrite (StatSpin)'a yerleştirildi. İlk olarak denatürasyon aşamasının gerçekleşmesi için 75°C'de 4 dakika bekletildi. Daha sonra hibridizasyon aşamasının gerçekleşmesi için en az 17 saat 37°C'de bekletildi.
- 9.** Lameller kaldırıldı ve lamlar 73°C'de bekleyen 2xSSC NP40[45 ml distile su+5 ml 20SSC+25µl NP40(AppliChem)]'de 2 dk ve oda ısısında bekleyen 0.4XSSC(49ml distile su+1ml 20 SSC)'de ise, 30 sn bekletildi.
- 10.** Daha sonra lamlar kurumaya bırakıldı. -20°C'de bekleyen DAPI oda ısısında 5-10 dakika bekletildikten sonra 10'ar µl olacak şekilde lamlara damlatıldı.
- 11.** Lameller ile kapatılan lamlar, -20°C'de beklemeye bırakıldı.
- 12.** Analizler Metasystems Isis Programında ve Zeizz Axio Imager M1 mikroskobu ile yapıldı.
- 13.** Analizler alanında deneyimli 2 kişi tarafından yapıldı. Her prob bölgesi için 200'e kadar sayım yapıldı. Mozaiklik durumlarında sayı arttırıldı.
- 14.** Sonuçlar ISCN 2009 referans alınarak tanımlandı.

## **MLPA YÖNTEMİ**

### **Periferik Kan Ve Kemik İliğinden DNA İzolasyonu**

Kan örneklerinden ve kemik iliğinden DNA saflaştırılması, Fujifilm Quick Gen-Mini 80 DNA Ekstraksiyon Cihazı kullanılarak yapıldı. Saflaştırma işleminde aşağıdaki sıra izlenmiştir.

1. 1.5 ml'lik ependorf tüpüne (greiner bio-one), 30 µl QuickGen proteaz konuldu.
2. Daha sonra EDTA'lı tüp içerisinde bulunan periferik kan örneğinden veya kemik iliğinden 200 µl alınıp tüpe aktarıldı.
3. 250 µl Lysis Buffer eklenip, 10 saniye vortekslenerek karıştırıldı.
4. 1.5 ml'lik ependorf tüpünün kapağına yapışan kısmının düşmesi için kısa süreli santrifüj yapıldı.
5. Daha sonra 56 °C'de 2 dakika inkübasyona (BOECO Bio TDB-100) bırakıldı.
6. Ependorflara %96'lık 250 µl etanol eklendi, 15 saniye vortekslendikten sonra tekrar kısa süreli santrifüj yapıldı.
7. QG-Mini80 cihazındaki tüp taşıyıcılarından, ön kısmına atık kabı (W), arka tarafına (E) DNA'nın toplanacağı 1,5 ml'lik yeni ependorf tüpü yerleştirildi. Filtreli kartujlar atık kaplarının üstlerine yerleştirildikten sonra lizatın tamamı bu kartujlara aktarıldı.
8. QG-Mini80 cihazında basınçlama işlemi yapıldı. Kartuja 750 µl yıkama tamponu eklendikten sonra QG-Mini80'de basınçlama işlemi yapıldı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı.
9. QG-Mini80 cihazında ön kısmına yerleştirilmiş olan DNA'nın bulunduğu kartuj, arka kısmındaki saf DNA'nın toplanacağı ependorf tüpünün üstüne transfer edildi.
10. Filtratı içeren atık tüpler atıldı.
11. 200 µl elüsyon tamponu (Elution Buffer) kartuja eklendi ve basınçlama işlemi yapıldı.
12. Elde edilen DNA'lar, -20 °C de saklandı.

### **İzole Edilen DNA'nın Saflık Değerlendirmesi**

İzole edilen DNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık tayini ThermoScientific Nanodrop 2000c spektrofotometre cihazı ile yapıldı (Tablo 18).

### **DNA Denatürasyonu ve SALSA Prob Miks ile Hibridizasyonu**

1. İzole edilen DNA örneklerinden 5 µl (50-150 ng DNA) alındı.

2. Alınan örnekler 0.2 ml'lik PCR tüplerine aktarıldı.
3. Thermal Cycler (TECHNE TC-412) cihazında 98°C'de 5 dakika bekletilerek, DNA denatürasyonu gerçekleştirildi.
4. Daha sonra örnekler Thermal Cycler cihazında 25°C'ye kadar soğutuldu ve bekleme alını.
5. 25 °C'de bulunan DNA örneğine, 1.5 µl SALSA MLPA P037-A2 KLL veya SALSA MLPA P038-A2 KLL Prob Miks ve 1.5 µl MLPA Buffer olmak üzere 3'er µl eklenip pipetaj yapıldı ve homojenize edildi.
6. 95 °C de 1 dakika inkübe edilen örnekler daha sonra 60°C'de 16-20 saat hibridizasyona bırakıldı.

#### **Ligasyon Reaksiyonu**

1. Hibridizasyon süresi bitimi ile Termal Cycler cihazının ısısı 54 °C'ye getirildi.
2. 54°C'de örneklere 32 µl ligasyon miks solusyonu (25µl distile su, 3 µl Ligase-65 buffer A, 3 µl Ligase-65 buffer B ve 1 µl Ligase-65 ) ilave edildi ve pipetaj yapılarak homojenize edildi.
3. Örnekler 54 °C de 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
4. Daha sonra ligaz enzimini inaktive etmek için örnekler 98°C de 5 dakika bekletildi.
5. Örnekler 20°C'ye soğutuldu ve Thermal Cycler cihazı 20°C'de bekleme alını.

#### **PCR (Polymerase Chain Reaction)**

1. Polimeraz master misk (7.5µl distile su + 2µl SALSA PCR primer miks +0.5 µl SALSA Polimeraz) hazırlandı ve 10'ar µl PCR tüpüne eklendi. Pipetaj yapılarak homojenize edildi.
2. Daha sonra PCR reaksiyonu başlatıldı.

PCR basamakları:

#### **Amplifikasyon (35 döngü)**

Denatürasyon	95 °C 30 saniye
Eşleşme (Annealing)	60 °C 30 saniye
Uzama (Ekstansiyon)	72 °C 1 dakika
<b>Son Ekstansiyon</b>	72 °C 10 dakika

Daha sonra 15°C'de bekleme alını.

**Tablo 7 :SALSA MLPA P037-A2 KLL Probmiks-1**

Uzunluk(nt)	SALSA MLPA Probu	Kromozom Pozisyonu	
		Referans	Gen
64-70-76-82	Q Fragmanları		
88-92-96	D Fragmanları		
100	X Fragmanı		
105	Y Fragmanı		
136	<i>Referans Probu</i>	4q12	
142	IGF2R Probu		6q26
148	KCNRG Probu		13q14
154	MYC Probu		8q24
159	<i>Referans Probu</i>	5q35	
166	MIRN15A Probu		13q14
172	MYCN Probu		2p24
184	<i>Referans Probu</i>	4q35	
193	DLEU2Probu		13q14
202	CDKN2A Probu		9p21
211	IFNG Probu		12q24
217	MYCN Probu		2p24
229	<i>Referans Probu</i>	7q11	
238	MYC Probu		8q24
247	TP53 Probu		17p13
256	<i>Referans Probu</i>	2q13	
265	LDLR Probu		19p13
274	CDK4 Probu		12q14
282	TP53 Probu		17p13
292	TP53 Probu		17p13
301	ESR1 Probu		6q25
310	<i>Referans Probu</i>	3p25	
319	LRMP Probu		12p12
328	ATM Probu		11q23
337	<i>Referans Probu</i>	1p32	
346	PARK2 Probu		6q26
355	CCND2 Probu		12p13
364	MYCN Probu		2p24
371	ATM Probu		11q23
382	RB1 Probu		13q14
391	<i>Referans Probu</i>	16q24	
400	CHFR Probu		12q24
409	TP53 Probu		17p13
418	<i>Referans Probu</i>	20q11	
427	EIF3S3 Probu		8q24
436	MYCN Probu		2p24
445	<i>Referans Probu</i>	16p13	
454	CDKN2B Probu		9p21
463	DLEU7 Probu		13q14
475	<i>Referans Probu</i>	22q13	

Kaynak 59'dan Türkçeleştirilerek alınmıştır (59).

**Tablo8: SALSA MLPA P038-A2 KLL Probmiks-2**

Uzunluk(nt)	SALSA MLPA Probu	Kromozom Pozisyonu	
		Referans	Gen
64-70-76-82	Q Fragmanları		
88-92-96	D Fragmanları		
100	X Fragmanı		
105	Y Fragmanı		
130	<i>Referans Probu</i>	<i>5q31</i>	
136	ATM Probu		11q22
142	SMAD4Probu		18q21
148	PTEN Probu		10q23
154	<i>Referans Probu</i>	<i>15q21</i>	
160	RB1 Probu		13q14
166	CCNE1 Probu		19q12
173	ATM Probu		11q23
178	PAH Probu		12q23
184	<i>Referans Probu</i>	<i>9q34</i>	
193	TP53 Probu		17p13
202	ATM Probu		11q23
211	<i>Referans Probu</i>	<i>9q21</i>	
221	KCNRG Probu		13q14
229	PAH Probu		12q23
238	ATP7B Probu		13q14
247	<i>Referans Probu</i>	<i>21q11</i>	
256	TP53 Probu		17p13
265	CDKN2D Probu		19p13
274	<i>Referans Probu</i>	<i>22q12</i>	
281	RDX Probu		11q23
292	PTEN Probu		10q23
301	<i>Referans Probu</i>	<i>1q21</i>	
310	IGF1 Probu		12q23
319	LDLR Probu		19p13
329	<i>Referans Probu</i>	<i>2p21</i>	
337	DLEU1 Probu		13q14
346	TP53Probu		17p13
355	<i>Referans Probu</i>	<i>2p13</i>	
361	ATM Probu		11q23
373	DLEU1 Probu		13q14
382	<i>Referans Probu</i>	<i>2p16</i>	
391	TP53 Probu		17p13
400	DLEU1 Probu		13q14
409	<i>Referans Probu</i>	<i>2p16</i>	
418	CHMP2A Probu		19q13
427	APAF1 Probu		12q13
436	<i>Referans Probu</i>	<i>1p36</i>	
444	CD27 Probu		12p13
454	<i>Referans Probu</i>	<i>15q26</i>	

Kaynak 59'dan Türkçeleştirilerek alınmıştır (59).

**Tablo 9 : P037-A2 KLL Probmik Özellikleri (Lokalizasyonlarına Göre)**

Referans Prob	11
Q, D, X, Y Fragmenti	4
13q14 Problemi	6
KCNRG	
MIRN15A	
DLEU2	
DLEU7	
RB1	
DLEU7	
17p13 Problemi (TP53)	4
12. Kromozom Problemi	5
IFNG	
CDK4	
LRMP	
CCND2	
CHFR	
11q23 Problemi (ATM)	2
6q25-6 Problemi	3
IGF2R	
ESR1	
PARK2	
8q24 Problemi	3
MYC (2)	
EIF3S3	
9p21 Problemi	2
CDKN2A	
CDKN2B	
2p24 Problemi (MYCN)	3
19p13 (LDLR)	1
<b>TOPLAM PROB SAYISI</b>	<b>44</b>

**Tablo 10 : P038-A2 KLL Probmiks Özellikleri(Lokalizasyonlarına Göre)**

Referans Prob	13
Q, D, X, Y Fragmenti	4
13q14 Problemleri	6
RB1	
KCNRG	
ATP7B	
DLEU1 (3)	
12. Kromozom Problemleri	5
PAH (2)	
IGF1	
APAF1	
CD27	
17p13 Problemleri (TP53)	4
11q23 Problemleri	5
ATM(4)	
RDX	
19. Kromozom Problemleri	4
CCNE1	
CDKN2D	
LDLR	
CHMP2A	
18q21 Probu	1
10q23 Problemleri (PTEN)	2
Toplam Prob Sayısı	44

**Tablo 11 : MLPA Reaksiyonu İçin Thermocycler Programı**

<b>A) DNA Denatürasyonu</b>		
1.	98°C	5 dakika
2.	25°C	Pause
<b>B) Hibridizasyon Reaksiyonu</b>		
3.	95°C	1 dakika
4.	60°C	Pause
<b>C) Ligasyon Reaksiyonu</b>		
5.	54°C	Pause
6.	54°C	15 dakika
7.	98°C	5 dakika
8.	20°C	Pause
<b>D) PCR Reaksiyonu</b>		
9.	35 Siklus	
	• 95°C	30 saniye
	• 60°C	30 saniye
	• 72°C	60 saniye
10.	72°C	10 dakika
11.	15°C	Pause

**Beckman GenomeLab GeXP CEQ 8000 Cihazına Yükleme**

1. PCR ürünleri elde edildikten sonra, 32 µl Sample Loading Solüsyon, 0.2 µl DNA Size Standart-600 ve 0.8 µl PCR ürünü olmak üzere, 33'er µl platelere aktarıldı.
2. 1'er damla mineral yağ eklendi.
3. CEQ 8000 cihazında; kapiller sıcaklığı 50°C; denatürasyon için 90°C'de 120 saniye; 1.6 kV' da 45 saniye injeksiyon zamanı; 4.8 kV'da 60 dakika yürütme zamanı şartları ayarlandı (Şekil 3).
4. Sonuçlar MAP ezersoftware programı ile değerlendirildi
5. Örneklerle ait pik görüntüleri ve pik alanları alındı.



	1	2	3	4	5	6	7	8
A	A1	A2	H01.A03	H08.A04	A5	A6	A7	A8
B	B1	B2	H02.B03	H09.B04	B5	B6	B7	B8
C	C1	C2	H03.C03	H10.C04	C5	C6	C7	C8
D	D1	D2	H04.D03	H11.D04	D5	D6	D7	D8
E	E1	E2	H05.E03	H12.E04	E5	E6	E7	E8
F	F1	F2	H06.F03	H13.F04	F5	F6	F7	F8
G	G1	G2	H07.G03	K3.G04	G5	G6	G7	G8
H	H1	H2	K2.H03	K4.H04	H5	H6	H7	H8

MLPA MLPA

Note Method Analysis

Method Name: MLPA

Capillary  
Temperature: 50 °C  
Wait for Temp: Yes

Denature  
Temperature: 90 °C  
Duration: 120 sec.

Inject  
Voltage: 1.6 kV  
Duration: 45 sec.

Separate  
Voltage: 4.8 kV  
Duration: 60.0 min.

Pause: 0 min.

Edit..

Şekil 3 : Beckman CEQ 8000 Yürütme Şartları

### MLPA Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Kapiller elektroforez cihazında yürütme işlemi bittikten sonra, örneklere ait pik alanları ve prob uzunlukları Microsoft Office Excel dosyası formatında kaydedildi. İlgili probmikslere özgün olmayan pikler kaldırıldı. Elde edilen veriler, MAP ezersoftware programına yüklendi. Her reaksiyonda sağlıklı olduğu bilinen, ailesinde kanser öyküsü olmayan 4 bireyin DNA'sı internal kontrol olarak kullanıldı. SALSA MLPA P037-A2 KLL ve SALSA MLPA P038-A2 KLL Probmiksi blok normalizasyonuna göre, hesaplandı. Blok normalizasyonu, her hasta için, her bir prob amplifikasyon ürününe ait pik alanı, kit içerisinde bulunan referans problemleri amplifikasyon ürünleri pik alanları toplamına bölündü. MAP ezersoftware programı ile aşağıdaki formüle göre, her bir spesifik prob bölgeleri için doz oranı belirlendi.

$$\text{Doz Oranı Tayini} = \frac{\text{Hasta -TPAD}}{\text{Hasta -RKPATD}} = \frac{\frac{\text{Kontrol 1-TPAD}}{\text{Kontrol 1-RKPATD}} + \frac{\text{Kontrol 2 -TPAD}}{\text{Kontrol 2 - RKPATD}} + \frac{\text{Kontrol 3 -TPAD}}{\text{Kontrol 3- RPATD}}}{3}$$

TPAD : Test Piki Alan Değeri

RKPATD : Referans Kontrol Prob Pik Alanları Toplam Değeri

Programda tespit edilen her prob bölgesi için, 0.7 ile 1.3 arası normal doz; 0.5 ile 0.7 arası ve 1.3 ile 1.5 arası gri alan; <0.5 ise delesyon yani doz eksikliği, >1.5 ise amplifikasyon yani doz fazlalığı olarak tanımlanmaktadır. Gri alan bölgelerinde ise, gerçek bir delesyon ya da amplifikasyon olup olmadığı, bu pik değerinin elde edildiği hastanın sentetik prob büyüklüğü ile kontrollerin sentetik prob büyüklükleri karşılaştırılarak belirlenmektedir.

Hasta Spesifik Prob Alanı

-----  
Hasta Mutasyonlu Prob Alanı

Gri Alan Formülü: -----

Kontrollerin Ortalama Spesifik Prob Alanı

-----  
Kontrollerin Ortalama Hasta Mutasyonlu Alana  
Karşılık Gelen Bölge Alanı

## BULGULAR

Çalışmaya Pamukkale Üniversitesi Hematoloji Bilim Dalı'nda periferik yayma ve flow sitometri ile KLL tanısı almış, 28'i erkek, 13'ü kadın olmak üzere toplam 41 hasta dahil edildi. Olguların yaşı, cinsiyeti, takip süresi, evresi, kemoterapi öyküleri, lenfosit ve lökosit sayısı gibi özellikleri sorgulandı. Konvansiyonel sitogenetik ve moleküler sitogenetik çalışmalar için heparinli tüpler; MLPA çalışması için ise, EDTA'lı tüpler kullanıldı. Çalışmada periferik kan veya kemik iliği materyalleri kullanıldı.

### DEMOGRAFİK VE KLİNİK ÖZELLİKLER

Çalışma grubumuzda E/K oranı 2.1 olarak hesaplandı. Olguların yaşı 36 ile 88 arasında değişmekle beraber ortalama yaş 65 olarak hesaplandı. Sadece 12 hastanın tanı anındaki yaşı 55'in altındadır. Hastaların 2'si yeni tanı almış; 39'u takipli hastalardır. Hastaların 16 (%39.2)'sında kemoterapi öyküsü mevcuttur. Hastaların 9 (%21.9)'u Rai Evre 0; 9 (%21.9)'u Rai Evre 1; 12 (%29.2)'si Rai Evre 2; 9 (%21.9)'u Rai Evre 3; 2 (%4.8)'si Rai Evre 4'tür. Olguların 36'sı periferik kan, 5'i ise kemik iliği örnekleri ile çalışıldı. Kemik iliği, rutin istemi yapılan hastalardan tercih edildi.

**Tablo 12:** Yaş Gruplarına Göre Hastaların Dağılımı

Yaş Grupları	Hasta Sayısı	Yüzde(%)
≤55	8	19.5
55-65	14	34.1
>65	19	46.3

**Tablo 13:** Rai Evrelemesi ve Hasta Dağılımı

Rai Evrelemesi	Hasta Sayısı	Yüzde (%)
Evre 0	9	21.9
Evre 1	9	21.9
Evre 2	12	29.2
Evre 3	9	21.9
Evre 4	2	4.8

**Tablo 14:** Olguların Demografik Özellikleri

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	Materyal Türü	RAİ Evre	Kemoterapi +/-	Takip süresi (yıl)
H01	E	75	PK	0	-	1
H02	E	36	PK	0	-	1
H03	E	61	PK	1	-	1
H04	K	66	PK	2	+	1
H05	E	58	PK	3	+	4
H06	E	62	PK	2	+	3
H07	E	60	PK	3	+	2
H08	E	60	PK	1	-	1
H09	E	76	PK	1	-	2
H10	E	66	PK	2	-	2
H11	K	62	PK	2	-	5
H12	K	77	PK	3	+	4
H13	E	60	PK	2	-	5
H14	E	60	PK	2	+	4
H15	K	81	PK	4	+	3
H16	K	50	PK	1	-	2
H17	E	83	PK	0	-	1
H18	E	49	PK	0	-	2
H19	K	56	PK	3	+	5
H20	E	52	PK	1	-	1
H21	E	74	PK	2	-	1
H22	E	50	PK	2	-	1
H23	E	68	PK	3	+	3
H24	E	71	PK	0	-	4
H25	E	73	PK	2	+	1
H26	E	54	PK	1	-	2
H27	E	88	PK	0	-	6
H28	E	78	PK	2	-	7
H29	E	71	PK	3	+	4
H30	K	58	PK	3	+	3
H31	E	75	PK	0	-	2
H32	K	69	PK	3	+	6
H33	E	81	Kİ	4	+	2
H34	E	59	Kİ	0	-	3
H35	K	63	PK	2	-	1
H36	E	78	PK	2	+	5
H37	K	65	Kİ	0	-	Yeni tanı
H38	E	51	PK	1	-	Yeni tanı
H39	K	79	Kİ	3	+	1
H40	K	54	PK	1	-	1
H41	K	58	Kİ	1	-	1

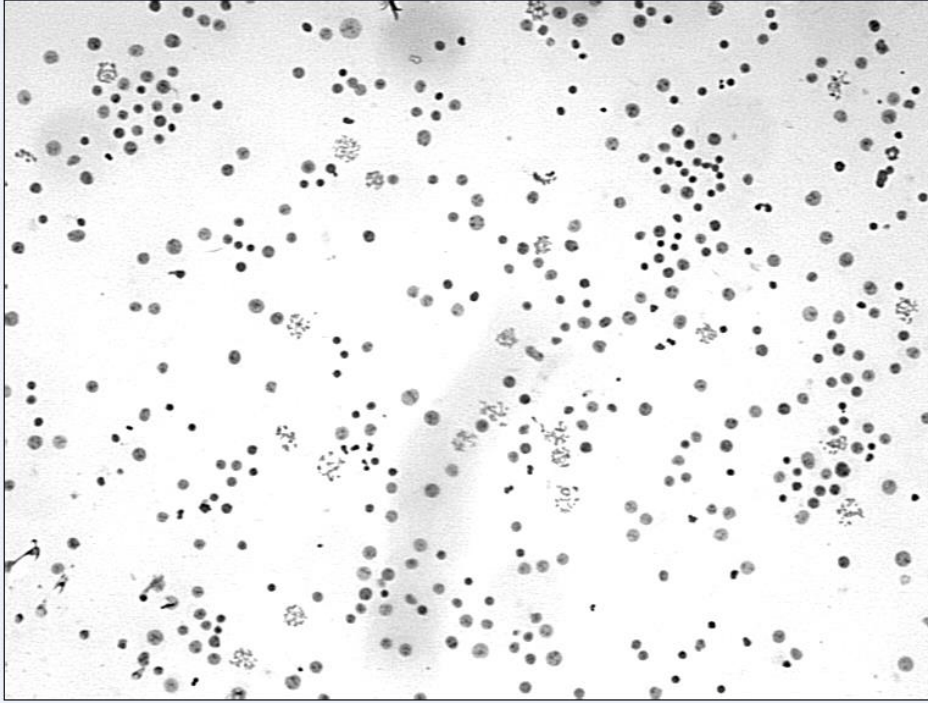
PK: Periferik kan Kİ: Kemik iliği

## KONVANSİYONEL SİTOGENETİK BULGULAR

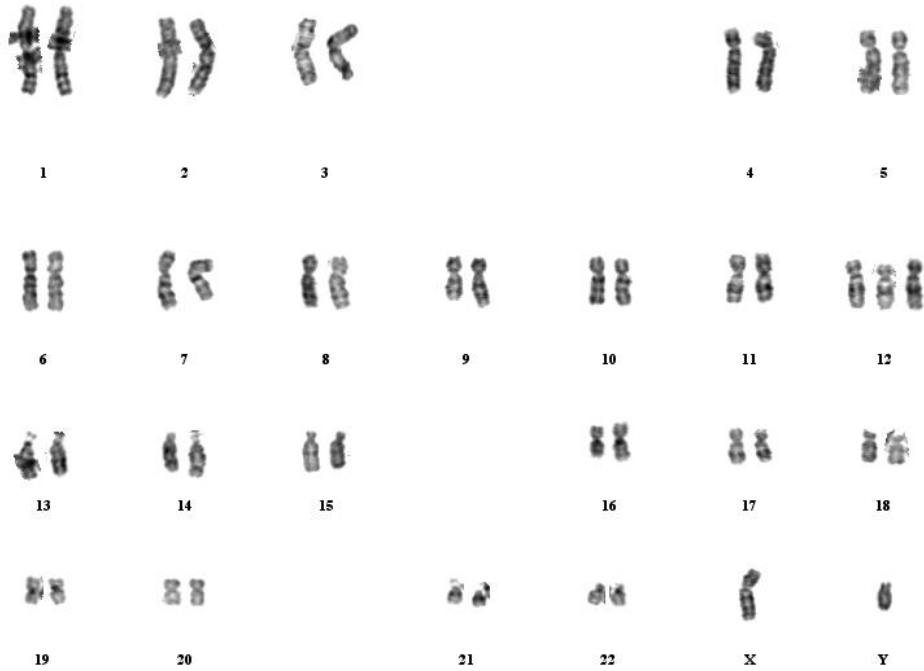
Heparinli tüplere alınan periferik kan ve kemik iliği materyalleri, CpG ODN DSP30 ve IL-2 kombinasyonu ile hazırlanmış besiyerine ekildi. Bu projede 36'sı periferik kan, 5'i kemik iliği olmak üzere toplam 41 kültür çalışmaya alındı. 72 saatlik kültür sonucunda 5 metafaz tam analiz edildi, 15 metafazda ise sayım yapıldı. Toplam 20 metafaz değerlendirilemeyen kültürler başarısız olarak tanımlandı. Buna göre, 33 (%80.4) kültürde yeterli sayıda metafaz elde edilirken, 8 (%19.6) kültürde yeterli sayıda ve kalitede metafaz elde edilemedi. Başarı sağlanamayan 8 kültürün 7'si periferik kan, 1'i de kemik iliği materyaline aitti (Tablo 15).

**Tablo 15:** Kültürde Başarı Durumları

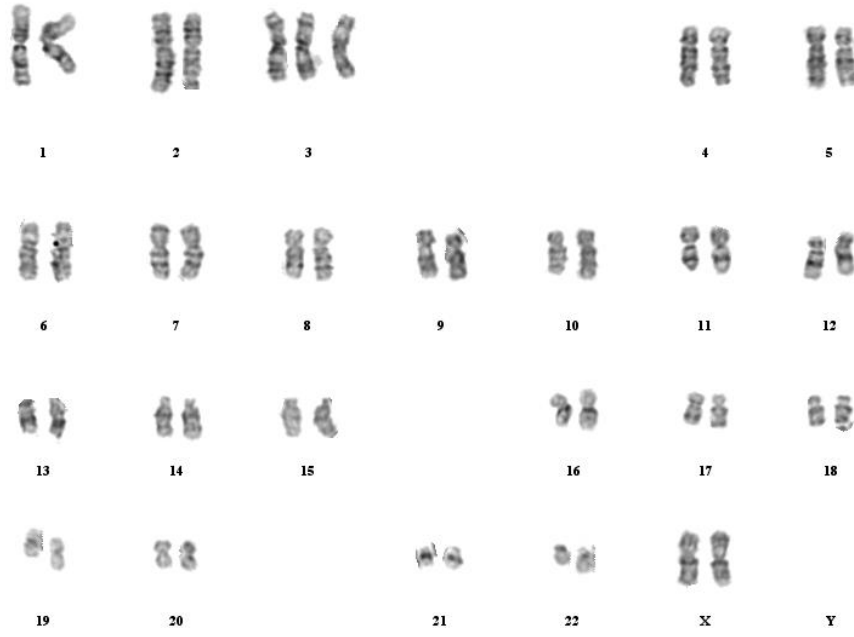
<b>Materyal Türü</b>	<b>Kültürü Başarılı</b>	<b>Kültürü Başarısız</b>	<b>Toplam</b>
Periferik Kan	29 (%80.5)	7 (%19.5)	36
Kemik İliği	4 (%80)	1 (%20)	5
Toplam	33 (%80.4)	8 (%19.6)	41



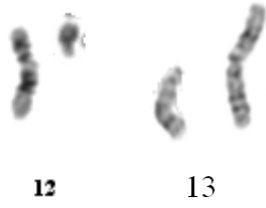
**Şekil 4:** CpG DSP30+IL-2 Kombinasyonunun mitotik indeks üzerine pozitif etkisi (x10 büyütme)



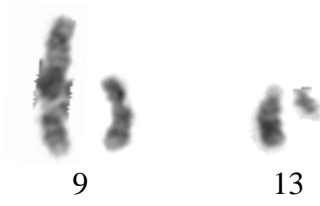
**Şekil 5:** Trizomi 12'li bir olgunun karyotipi



**Şekil 6 :** H35 no'lu hastanın trizomi 3 karyotipi



**Şekil 7 :** H08 no'lu hastanın der(12;13)(p10;q10) parsiyel karyotipi



**Şekil 8:** H09 no'lu hastanın der(9;13)(p10;q10) parsiyel karyotipi



**Şekil 9:** H19 no'lu hastanın t(7;13)(q22;q34),del(13)(q14) parsiyel karyotipi



**Şekil 10:** H31 no'lu hastanın der(7;13)(q36;q10),+13 parsiyel karyotipi

Kültürde başarı sağlanan 33 olgunun karyotipi incelendiğinde; 14 (%42.4) olgu normal karyotip olarak değerlendirildi. 12 (%36.3) olgu, %5 ile %85 arasında değişen oranlarda mozaik trizomi 12 olarak değerlendirildi. 4 (%12.1) olguda, 13. kromozom yeniden düzenlenmeleri tespit edildi. Daha az sıklıkta ise; mozaik trizomi 3 (1 olgu), marker kromozom (1 olgu) ve 1 olguda da kompleks karyotip gözlenmiştir. Trizomi 3 tespit edilen olgunun mozaiklik yüzdesi %20 olarak değerlendirildi. Marker kromozom ise 2 (%10) metafazda tespit edildi. Olguların karyotipleri ISCN 2009 referans alınarak Tablo16'da, karyotip yüzdeleri ise, Tablo 17 'de yer almaktadır.



**Tablo 16:** Olguların Karyotipleri

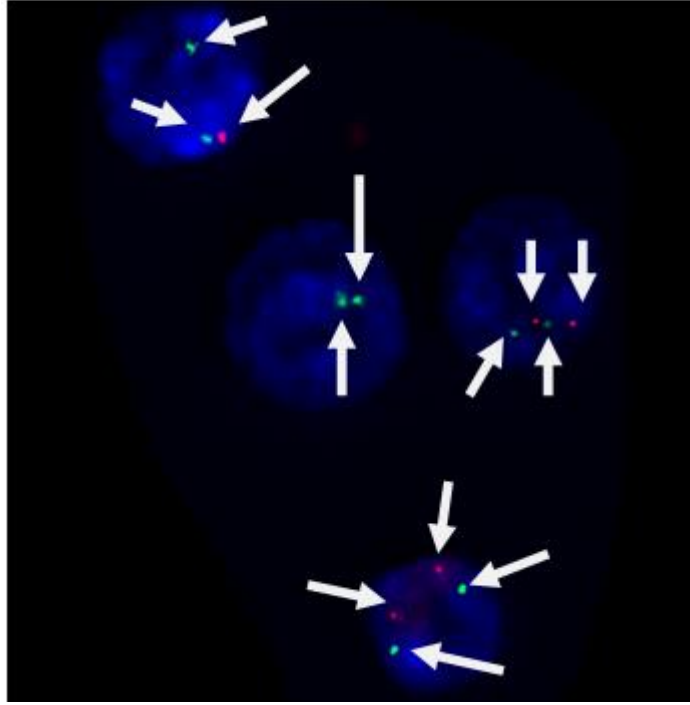
Hasta No	Cinsiyet	Yaş	Materyal Türü	RAİ Evre	Karyotip
H01	E	75	PK	0	47,XY,+12[3]/46,XY[17]
H02	E	36	PK	0	47,XY,+12[5]/46,XY[15]
H03	E	61	PK	1	47,XY,+12[14]/46,XY[6]
H04	K	66	PK	2	46,XX
H05	E	58	PK	3	46,XY
H06	E	62	PK	2	46,XY
H07	E	60	PK	3	46,XY
H08	E	60	PK	1	46,XY,der(12;13)(p10;q10)[6]/46,XY[14]
H09	E	76	PK	1	46,XY,der(9;13)(p10;q10)
H10	E	66	PK	2	Kültür başarısız
H11	K	62	PK	2	46,XX
H12	K	77	PK	3	Kültür başarısız
H13	E	60	PK	2	Kültür başarısız
H14	E	60	PK	2	46,XY
H15	K	81	PK	4	47,XX,+12[1]/46,XX[19]
H16	K	50	PK	1	47,XX,+mar[2]/46,XX[18]
H17	E	83	PK	0	47,XY,+12[2]/46,XY[18]
H18	E	49	PK	0	46,XY
H19	K	56	PK	3	46,XX,t(7;13)(q22;q34),del(13)(q14)[8]/46,XX[12]
H20	E	52	PK	1	46,XY
H21	E	74	PK	2	47,XY,+12[17]/46,XY[3]
H22	E	50	PK	2	46,XY
H23	E	68	PK	3	Kültür başarısız
H24	E	71	PK	0	46,XY
H25	E	73	PK	2	47,XY,+12[15]/46,XY[5]
H26	E	54	PK	1	46,XY
H27	E	88	PK	0	47,XY,+12[2]/46,XY[18]
H28	E	78	PK	2	47,XY,+12[16]/46,XY[4]
H29	E	71	PK	3	Kültür başarısız
H30	K	58	PK	3	46,XX
H31	E	75	PK	0	46,XY,der(7;13)(q36;q10),+13[6]/46,XY[14]
H32	K	69	PK	3	47,XX,+12[17]/46,XX[3]
H33	E	81	Kİ	4	46,XY[20]
H34	E	59	Kİ	0	47,XY,+12[12]/46,XX[8]
H35	K	63	PK	2	47,XX,+3[4]/46,XX[16]
H36	E	78	PK	2	46,XY
H37	K	65	Kİ	0	47,XX,+12[2]/46,XX[18]
H38	E	51	PK	1	Kültür başarısız
H39	K	79	Kİ	3	Kültür başarısız
H40	K	54	PK	1	Kültür başarısız
H41	K	58	Kİ	1	Kompleks Karyotip

**Tablo 17: Sitogenetik Anomali Yüzdeleri**

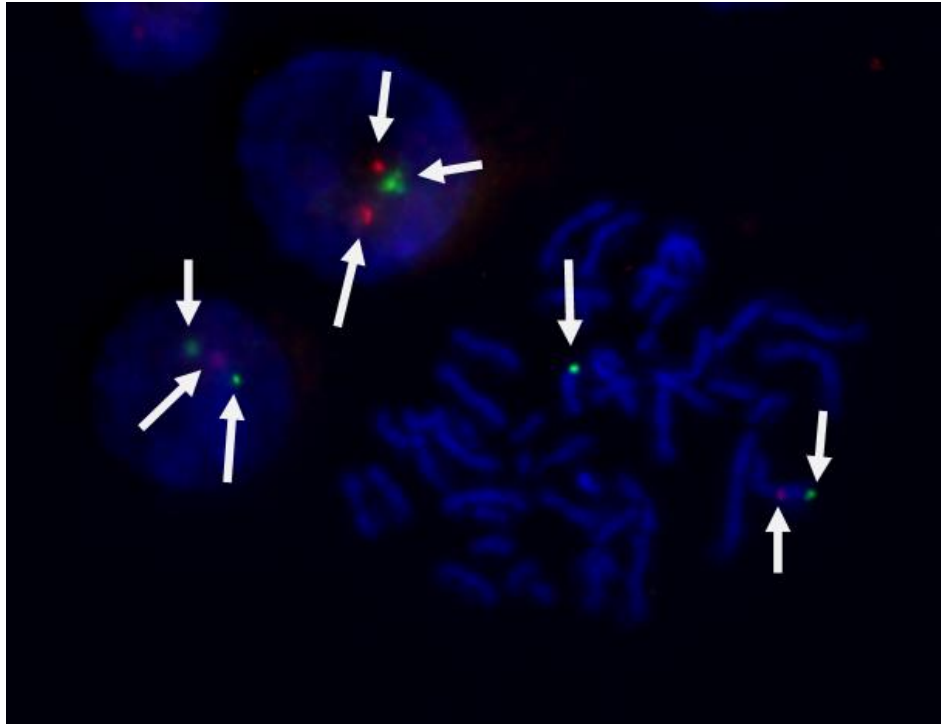
KARYOTİP	OLGU SAYISI	%
Trizomi 12	12	36.3
13. kromozom yeniden düzenlenmeleri	4	12.1
Trizomi 3	1	3
Diğer Kompleks Karyotip(1) Marker Kromozom(1)	2	6
Normal Karyotip	14	42.4

#### **FISH BULGULARI**

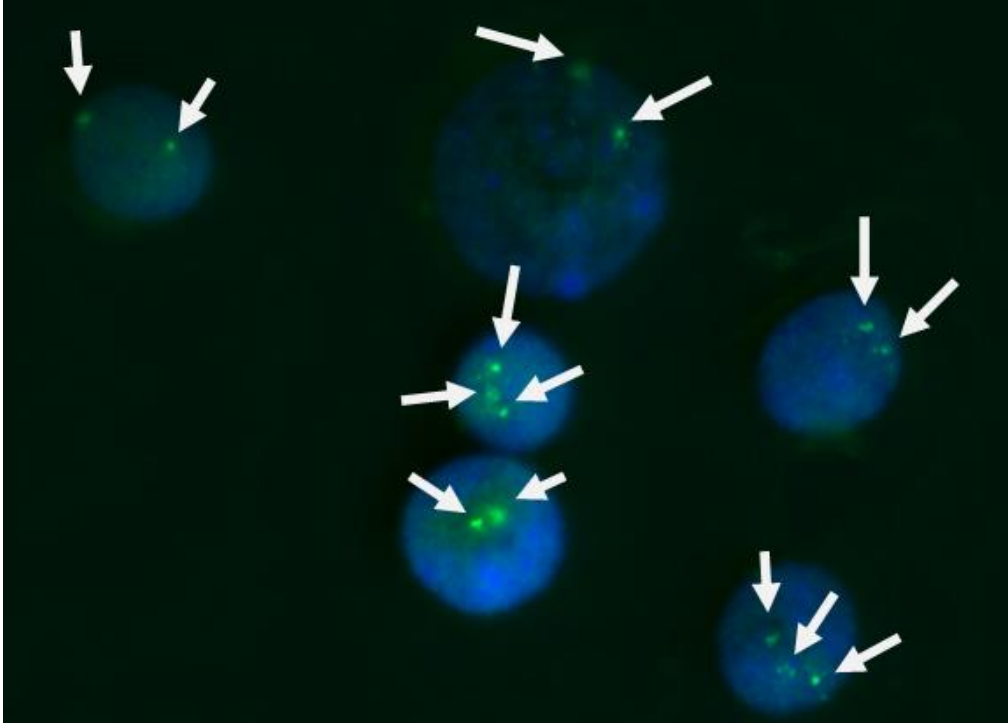
İnterfaz FISH, rutinde KLL’li olgularda en sık görülen kromozomal anormallikleri tespit etmek için kullanılan bir yöntemdir. 24 saatlik periferik kan ya da kemik iliği kültüründen çalışıldı. Her materyal, 11q22.3 (ATM), 13q14.3 ve 17p13 (p53) lokus spesifik problemleri ve sentromerik 12 problemleri ile çalışıldı. Toplam 200 interfaz nükleusu değerlendirildi. Konvansiyonel sitogenetikte translokasyon saptanan bazı olgularda metafaz görüntüleri alındı.



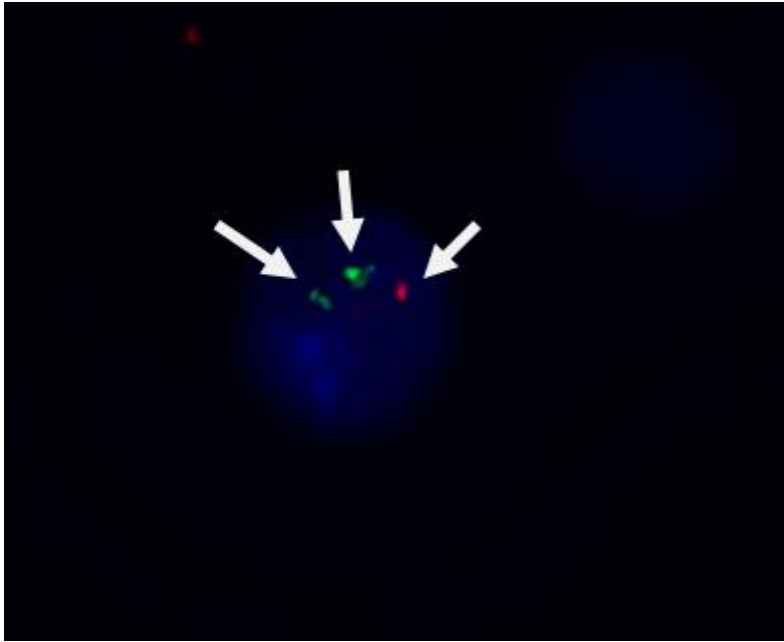
**Şekil 11:** H08 no'lu hastaya ait 13q14 probuyla yapılan çalışmada monoallelik-biallelik delesyonlu ve normal nükleusların bir arada bulunduğu bir görüntü. (13q14 bölgesi kırmızı, 13q34 kontrol bölgesi ise yeşil sinyal ile gösterilmiştir.)



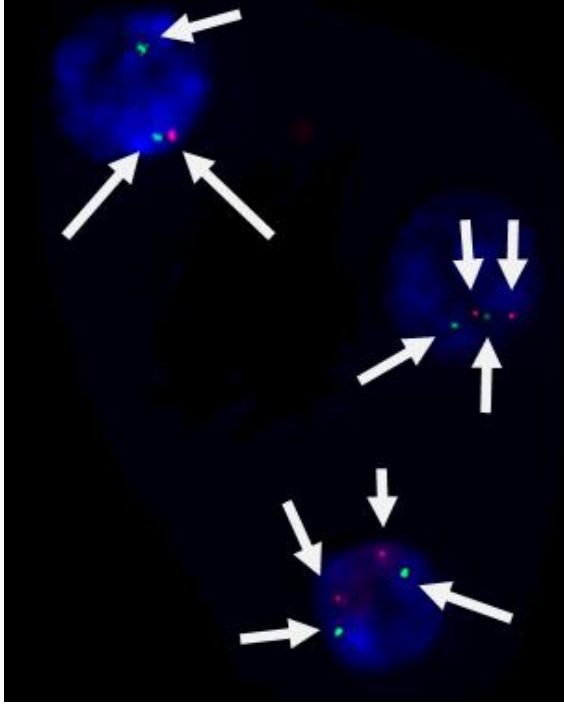
**Şekil 12:**H08 No'lu hastaya ait 13q14 probuyla yapılan çalışmada metafaz görüntüsü. Transloke 13. kromozomun 13q14 bölgesi normal olarak değerlendirildi. (13q14 bölgesi kırmızı, 13q34 kontrol bölgesi ise yeşil sinyal ile gösterilmiştir.)



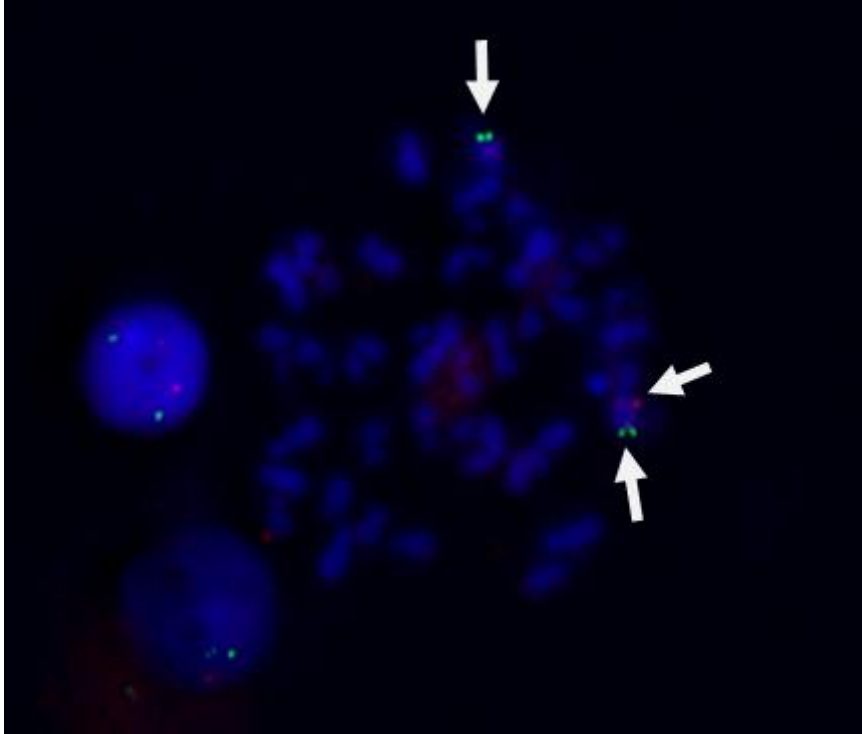
**Şekil 13:**H03 no'lu hastaya ait sentromerik 12 probu ile çalışılan mozaik trizomi 12 olarak değerlendirilen bir iFISH görüntüsü.



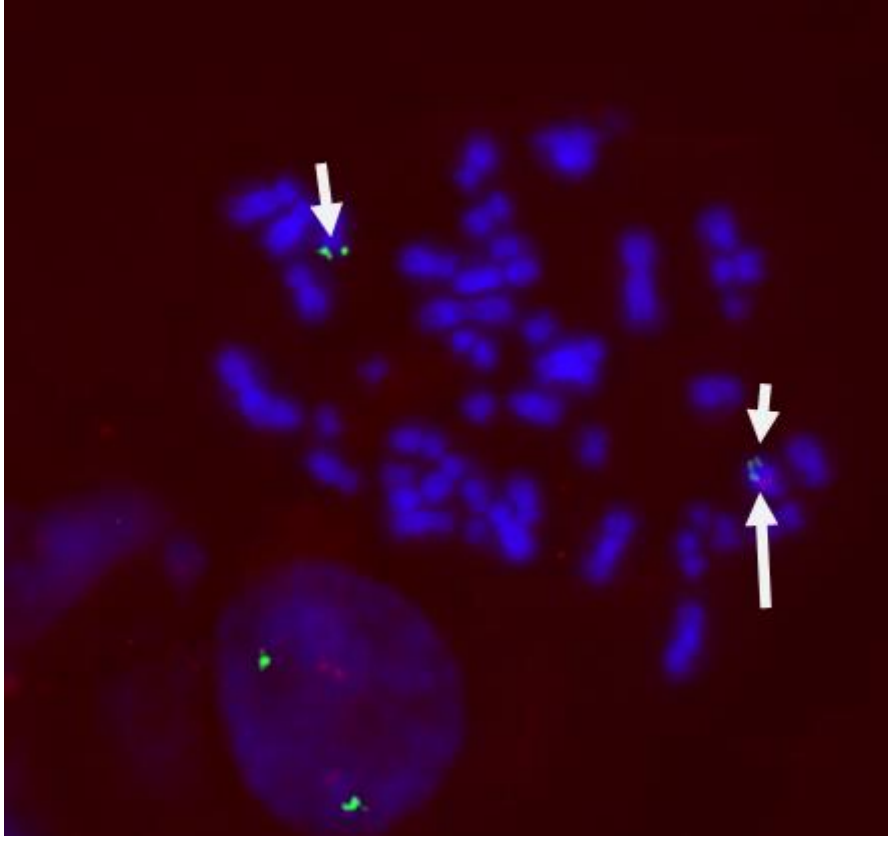
**Şekil 14:**H33 no'lu hastaya ait 17p13 probu ile çalışılan 17p13 delesyonu olarak değerlendirilen bir iFISH görüntüsü. (17p13 bölgesi kırmızı, 17q21 kontrol bölgesi ise yeşil sinyal ile gösterilmiştir.)



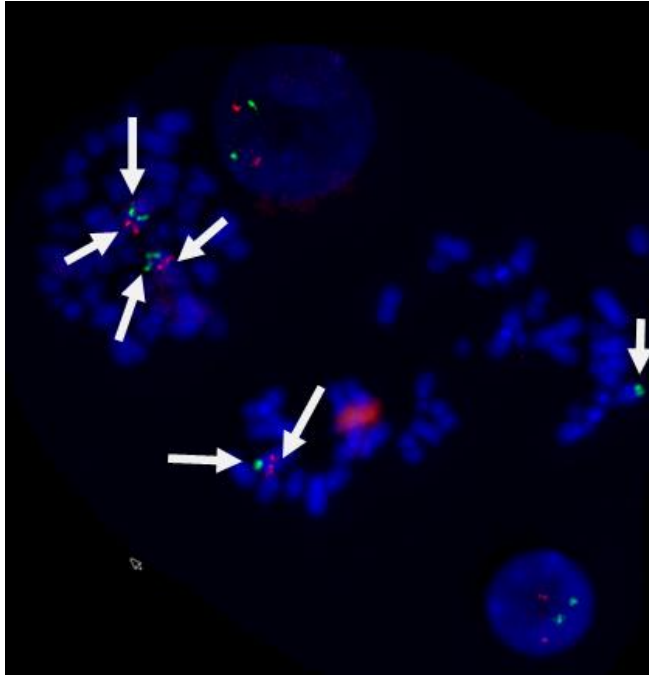
**Şekil 15:**H23 no'lu hastaya ait 11q22 probu ile çalışılan mozaik 11q22 delesyonu olarak değerlendirilen bir iFISH görüntüsü. (11q22 bölgesi kırmızı, 11p15 kontrol bölgesi ise yeşil sinyal ile gösterilmiştir.)



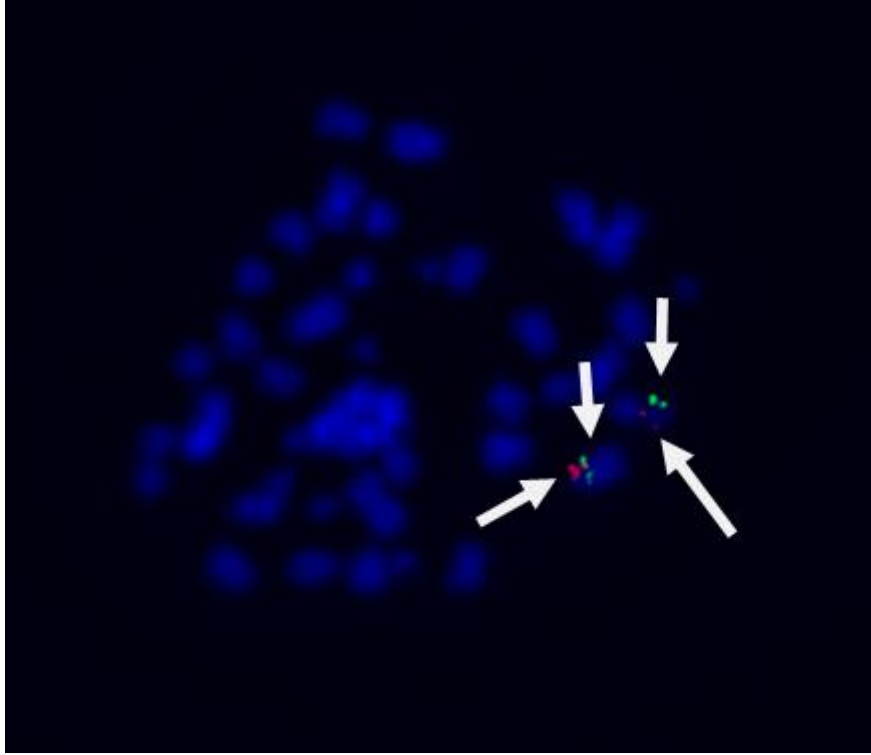
**Şekil 16:** H09 No'lu hastaya ait 13q14 probuyla yapılan çalışmada metafaz görüntüsü. Transloke 13. kromozomun 13q14 bölgesi normal olarak değerlendirildi. (13q14 bölgesi kırmızı, 13q34 kontrol bölgesi ise yeşil sinyal ile gösterilmiştir.)



**Şekil 17:**H19 No'lu hastaya ait 13q14 probuyla yapılan çalışmada metafaz görüntüsü. 13q14 delesyonu transloke 13'te tespit edildi. (13q14 bölgesi kırmızı, 13q34 kontrol bölgesi ise yeşil sinyal ile gösterilmiştir.)



**Şekil 18:** H26 no'lu hastaya ait 13q14 probu ile çalışılan metafaz ve interfaz nükleuslarında mozaik 13q14 delesyonu olarak değerlendirilen bir FISH görüntüsü. (13q14 bölgesi kırmızı, 13q34 kontrol bölgesi ise yeşil sinyal ile gösterilmiştir.)



**Şekil 19:** H41 no'lu hastaya ait 17p13 probu ile çalışılan bir metafaz FISH görüntüsü. Sitogenetikte kompleks karyotip saptanan olgunun 17p13 bölgesi normal olarak değerlendirildi. 3'lü ya da 4'lü translokasyona 17. kromozomun da dahil olduğu görüldü. (17p13 bölgesi kırmızı, 17q21 kontrol bölgesi ise yeşil sinyal ile gösterilmiştir.)

Her olgunun FISH sonucu Tablo 18'de görülmektedir. İnterfaz FISH ile tespit edilen sitogenetik anomalilerin frekansı, Tablo 19'da özetlendi. Buna göre, 41 olgunun 10 (%24.3)'unda iFISH ile sitogenetik anomali saptanmamıştır. Anomali saptanan 31 (%75.6) olgu, izole ve kombine anomaliler olmak üzere, 2 kategoriye alındı. İzole anomaliler grubunda en sık 13q14 delesyonu görüldü. On beş (%36.7) olgudan 13'ü monoallelilik, 2 olgu ise monoallelilik-biallelik 13q14 delesyonu olarak değerlendirildi. İzole anomaliler grubunda en sık saptanan 2. anomali ise trizomi 12'dir. Dokuz (%21.6) olgu trizomi 12 olarak değerlendirildi. Bir olgu 11q22 delesyonu olarak değerlendirilirken, 17p13 delesyonu hiçbir olguda izole olarak görülmedi.

Kombine anomaliler kategorisinde ise, 3 olguyla en sık trizomi 12-monoallelilik 13q14 delesyonu tespit edildi. Monoallelilik-biallelik 13q14 delesyonu-trizomi 12 kombinasyonu, 13q14-17p13 delesyon kombinasyonu, 17p13delesyonu-trizomi 12 kombinasyonu birer olguda tespit edildi.

**Tablo 18:**Olguların iFISH Sonuçları

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	Materyal Türü	RAİ Evre	FISH
H01	E	75	PK	0	nuc ish (D12Z1x3)[23/200] nuc ish (ATM, D11S1251)x2[200] nuc ish (D13S25,D13S1009)x2[200] nuc ish (TP53, RARA)x2[200]
H02	E	36	PK	0	nuc ish (D12Z1x3)[30/200] nuc ish (ATM, D11S1251)x2[200] nuc ish (D13S25,D13S1009)x2[200] nuc ish (TP53, RARA)x2[200]
H03	E	61	PK	1	nuc ish (D12Z1x3)[130/200] nuc ish (ATM, D11S1251)x2[200] nuc ish (D13S25,D13S1009)x2[200] nuc ish (TP53, RARA)x2[200]
H04	K	66	PK	2	nuc ish (D12Z1x2)[200] nuc ish (ATM, D11S1251)x2[200] nuc ish (D13S25)x1[112/200] nuc ish (TP53, RARA)x2[200]
H05	E	58	PK	3	nuc ish (D12Z1x2)[200] nuc ish (ATM, D11S1251)x2[200] nuc ish (D13S25x1)[154/200] nuc ish (TP53, RARA)x2[200]
H06	E	62	PK	2	nuc ish(ATM,D12Z3,D13S25,TP53)x2[200]
H07	E	60	PK	3	nuc ish(ATM,D12Z3,D13S25,TP53)x2[200]
H08	E	60	PK	1	nuc ish (D12Z1x2)[200] nuc ish (ATM, D11S1251)x2[200] nuc ish(D13S25x1)[118/200]/ (D13S25x0)[15/200] nuc ish (TP53, RARA)x2[200]
H09	E	76	PK	1	nuc ish (D12Z1x2)[200] nuc ish (ATM, D11S1251)x2[200] nuc ish (D13S25x1)[112/200] nuc ish (TP53, RARA)x2[200]
H10	E	66	PK	2	nuc ish (D12Z1x2)[200] nuc ish (ATM, D11S1251)x2[200] nuc ish (D13S25x1)[162/200] nuc ish (TP53, RARA)x2[200]
H11	K	62	PK	2	nuc ish (D12Z1x2)[200] nuc ish (ATM, D11S1251)x2[200] nuc ish (D13S25x1)[18/200] nuc ish (TP53, RARA)x2[200]
H12	K	77	PK	3	nuc ish(ATM,D12Z3,D13S25,TP53)x2[200]
H13	E	60	PK	2	nuc ish (D12Z1x2)[200] nuc ish (ATM, D11S1251)x2[200] nuc ish (D13S25x1)[180/200] nuc ish (TP53, RARA)x2[200]
H14	E	60	PK	2	nuc ish(ATM,D12Z3,D13S25,TP53)x2[200]
H15	K	81	PK	4	nuc ish (D12Z1x3)[16/200] nuc ish (ATM, D11S1251)x2[200] nuc ish (D13S25,D13S1009)x2[200] nuc ish (TP53x1)[98/200]



**Tablo 18:Devamı**

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	Materyal Türü	RAİ Evre	FISH
H16	K	50	PK	1	nuc ish (D12Z1x2)[200] nuc ish (ATM, D11S1251)x2[200] nuc ish (D13S25x1)[16/200] nuc ish (TP53, RARA)x2[200]
H17	E	83	PK	0	nuc ish (D12Z1x3)[60/200] nuc ish (ATM, D11S1251)x2[200] nuc ish (D13S25x1)[50/200] nuc ish (TP53, RARA)x2[200]
H18	E	49	PK	0	nuc ish (D12Z1x2)[200] nuc ish (ATM, D11S1251)x2[200] nuc ish(D13S25x1)[40/200]/ (D13S25x0)[23/200] nuc ish (TP53, RARA)x2[200]
H19	K	56	PK	3	nuc ish (D12Z1x2)[200] nuc ish (ATM, D11S1251)x2[200] nuc ish (D13S25x1)[60/200] nuc ish (TP53, RARA)x2[200]
H20	E	52	PK	1	nuc ish (D12Z1x2)[200] nuc ish (ATM, D11S1251)x2[200] nuc ish (D13S25x1)[16/200] nuc ish (TP53, RARA)x2[200]
H21	E	74	PK	2	nuc ish (D12Z1x3)[171/200] nuc ish (ATM, D11S1251)x2[200] nuc ish (D13S25,D13S1009)x2[200] nuc ish (TP53, RARA)x2[200]
H22	E	50	PK	2	nuc ish (D12Z1x2)[200] nuc ish (ATM, D11S1251)x2[200] nuc ish (D13S25x1)[50/200] nuc ish (TP53, RARA)x2[200]
H23	E	68	PK	3	nuc ish (D12Z1x2)[200] nuc ish (ATMx1)[14/200] nuc ish (D13S25,D13S1009)x2[200] nuc ish (TP53, RARA)x2[200]
H24	E	71	PK	0	nuc ish(ATM,D12Z3,D13S25,TP53)x2[200]
H25	E	73	PK	2	nuc ish (D12Z1x3)[160/200] nuc ish (ATM, D11S1251)x2[200] nuc ish (D13S25,D13S1009)x2[200] nuc ish (TP53, RARA)x2[200]
H26	E	54	PK	1	nuc ish (D12Z1x2)[200] nuc ish (ATM,D11S1251)x2[200] nuc ish (D13S25x1)[52/200] nuc ish (TP53, RARA)x2[200]
H27	E	88	PK	0	nuc ish (D12Z1x3)[30/200] nuc ish (ATM,D11S1251)x2[200] nuc ish (D13S25x1)[90/200] nuc ish (TP53, RARA)x2[200]
H28	E	78	PK	2	nuc ish (D12Z1x3)[150/200] nuc ish (ATM, D11S1251)x2[200] nuc ish (D13S25,D13S1009)x2[200] nuc ish (TP53, RARA)x2[200]

**Tablo 18.** Devamı

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	Materyal Türü	RAİ Evre	FISH
H29	E	71	PK	3	nuc ish(ATM,D12Z3,D13S25,TP53)x2[200]
H30	K	58	PK	3	nuc ish (D12Z1x2)[200] nuc ish (ATM,D11S1251)x2[200] nuc ish (D13S25x1)[111/200] nuc ish (TP53, RARA)x2[200]
H31	E	75	PK	0	nuc ish(ATM,D12Z3,D13S25,TP53)x2[200]
H32	K	69	PK	3	nuc ish (D12Z1x3)[153/200] nuc ish (ATM, D11S1251)x2[200] nuc ish (D13S25,D13S1009)x2[200] nuc ish (TP53, RARA)x2[200]
H33	E	81	Kİ	4	nuc ish (D12Z1x2)[200] nuc ish (ATM,D11S1251)x2[200] nuc ish (D13S25x1)[106/200] nuc ish (TP53x1)[90/200]
H34	E	59	Kİ	0	nuc ish (D12Z1x3)[66/200] nuc ish (ATM, D11S1251)x2[200] nuc ish (D13S25,D13S1009)x2[200] nuc ish (TP53, RARA)x2[200]
H35	K	63	PK	2	nuc ish(ATM,D12Z3,D13S25,TP53)x2[200]
H36	E	78	PK	2	nuc ish (D12Z1x3)[20/200] nuc ish (ATM, D11S1251)x2[200] nuc ish(D13S25)x1[41/200]/ (D13S25)x0[69/200] nuc ish (TP53, RARA)x2[200]
H37	K	65	Kİ	0	nuc ish (D12Z1x3)[62/200] nuc ish (ATM, D11S1251)x2[200] nuc ish (D13S25x1)[55/200] nuc ish (TP53, RARA)x2[200]
H38	E	51	PK	1	nuc ish(ATM,D12Z3,D13S25,TP53)x2[200]
H39	K	79	Kİ	3	nuc ish (D12Z1x3)[12/200] nuc ish (ATM, D11S1251)x2[200] nuc ish (D13S25,D13S1009)x2[200] nuc ish (TP53, RARA)x2[200]
H40	K	54	PK	1	nuc ish (D12Z1x2)[200] nuc ish (ATM,D11S1251)x2[200] nuc ish (D13S25x1)[170/200] nuc ish (TP53,RARA)x2[200]
H41	K	58	Kİ	1	nuc ish(ATM,D12Z3,D13S25,TP53)x2[200]

İzole ve kombine anomaliler birlikte değerlendirilecek olursa, iFISH ile olguların 20 (%48.7)'sinde 13q14 delesyonu tanımlandı. 13 (%31.7) olguda ise, trizomi 12 tespit edildi. 2 (%4.8) olgu 17p13 delesyonu, 1 (%2.4) olgu ise, 11q22 delesyonu olarak değerlendirildi.

**Tablo 19: iFISH ile Saptanan Anomalilerin Yüzdesi**

	Olgu Sayısı	Yüzde %
ANOMALİLER	31	75.6
İzole Anomaliler		
13q14 delesyonu	15	36.5
Monoallelik	13	31.7
Monoallelik-Biallelik	2	4.8
Trizomi 12	9	21.9
11q22 delesyonu	1	2.4
Kombine Anomaliler		
Monoallelik 13q14 del.-Trizomi 12	3	7.3
13q14 ve 17p13 del.	1	2.4
17p13 del.-Trizomi 12	1	2.4
Mono-biallelik 13q14 del.-Trizomi 12	1	2.4
NORMAL	10	24.3

Konvensiyonel sitogenetikte trizomi 12 saptanan bütün olgular iFISH yöntemiyle de tespit edildi. Karyotipi normal saptanan bir olgu da iFISH ile düşük düzey mozaik trizomi 12 olarak değerlendirildi. Ayrıca konvensiyonel sitogenetikte kültürde başarısız 1 kemik iliği kültürü, iFISH ile mozaik trizomi 12 olarak değerlendirildi. iFISH ile 13q14 delesyonu saptanan 20 olgudan 3'ü konvensiyonel sitogenetikle 13. kromozom yeniden düzenlenmeleri saptanan olgulardır. iFISH ile 11q22 ve 17p13 delesyonu tespit edilen olgular, sitogenetik yöntemle normal karyotip olarak değerlendirildi. Mozaik trizomi 3 karyotipli olgu, iFISH ile bölgeye spesifik herhangi bir probun bulunmaması nedeniyle normal olarak değerlendirildi. Sitogenetik yöntemle kompleks karyotip saptanan olgu da iFISH ile normal olarak değerlendirildi.

#### **MLPA BULGULARI**

##### **DNA Konsantrasyonu**

Otuz altı kan örneği ve 5 kemik iliği örneğinden DNA saflaştırılması, Fujifilm Quick Gen-Mini 80 DNA Ekstraksiyon Cihazı kullanılarak yapıldı. İzole edilen DNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık tayini ThermoScientific Nanodrop 2000c spektrofotometre cihazı ile yapıldı. DNA örneklerinin spektrofotometri ölçümleri Tablo 20'de görülmektedir. DNA konsantrasyonları 22.4 ng/µl ile 99.3 ng/µl arasında değişmektedir. DNA örneklerinin 260/280 oranları 1.55 ile 2.0; 260/230 oranı ise, 1.81 ile 2.28 arasında farklılık göstermektedir.

**Tablo 20 : DNA örnekleri spektrofotometri ölçümleri**

Hasta No	Konsantrasyon ng/µl	A <sup>0</sup> <sub>260/280</sub>	A <sup>0</sup> <sub>260/230</sub>	Hasta No	Konsantrasyon ng/µl	A <sup>0</sup> <sub>260/280</sub>	A <sup>0</sup> <sub>260/230</sub>
H1	86,6	1,79	2,12	H21	90,3	1,9	1,97
H2	66,9	1,77	1,89	H22	86,8	1,81	1,93
H3	64,7	1,79	1,86	H23	68,6	1,87	1,81
H4	67,4	1,75	2,02	H24	97,6	1,87	1,98
H5	36,2	1,74	1,94	H25	73,6	1,79	2,08
H6	25,7	2	1,93	H26	95,2	1,83	2,12
H7	25,9	1,78	1,86	H27	98,8	1,88	1,93
H8	90,1	1,86	1,94	H28	92,1	1,86	1,94
H9	92,9	1,86	1,94	H29	69,9	1,89	1,98
H10	88,3	1,83	2,28	H30	63,1	1,89	2,18
H11	85,4	1,68	2,04	H31	38,7	1,82	1,91
H12	96,2	1,81	1,89	H32	43,4	1,59	1,97
H13	99,3	1,85	2,07	H33	38,2	1,58	2,02
H14	38,1	1,74	1,85	H34	62,1	1,55	2,04
H15	92,6	1,82	1,99	H35	47,9	1,82	2,09
H16	87,9	1,88	2,13	H36	90,8	1,9	2,08
H17	85,3	1,88	1,98	H37	82,8	1,83	2,01
H18	83,5	1,89	1,98	H38	80,6	1,75	1,96
H19	22,4	1,79	1,91	H39	85	1,81	1,91
H20	76,4	1,88	1,98	H41	98,6	1,89	1,98

### MLPA Analizi

KLL'li olguların DNA örneklerinden SALSA MLPA P037-A2 ve SALSA MLPA P038-A2 KLL kiti kullanılarak, MLPA yöntemi çalışıldı. Çalışmada Beckman CEQ 8000 cihazına yüklenen örnekler, MAP ezersoftware programı kullanılarak analiz edildi.

Her reaksiyonda sağlıklı olduğu bilinen, aile ağacında kanser öyküsü bulunmayan 4 birey internal kontrol olarak kullanıldı. P037-A2 probmiksi 11'i referans olmak üzere toplam 44 prob içermektedir. P038-A2 probu ise, 13'ü referans olmak üzere toplam 44 prob içermektedir. Bu problemler, 13q14, 12. kromozom, 11q23, 17p13, 6q25-6, 8q24, 9p21, 2p24, 19p13, 18q21, 10q23'e spesifik dizayn edilmiş problemlerdir.

**Tablo 7 :SALSA MLPA P037-A2 KLL Probmiks-1**

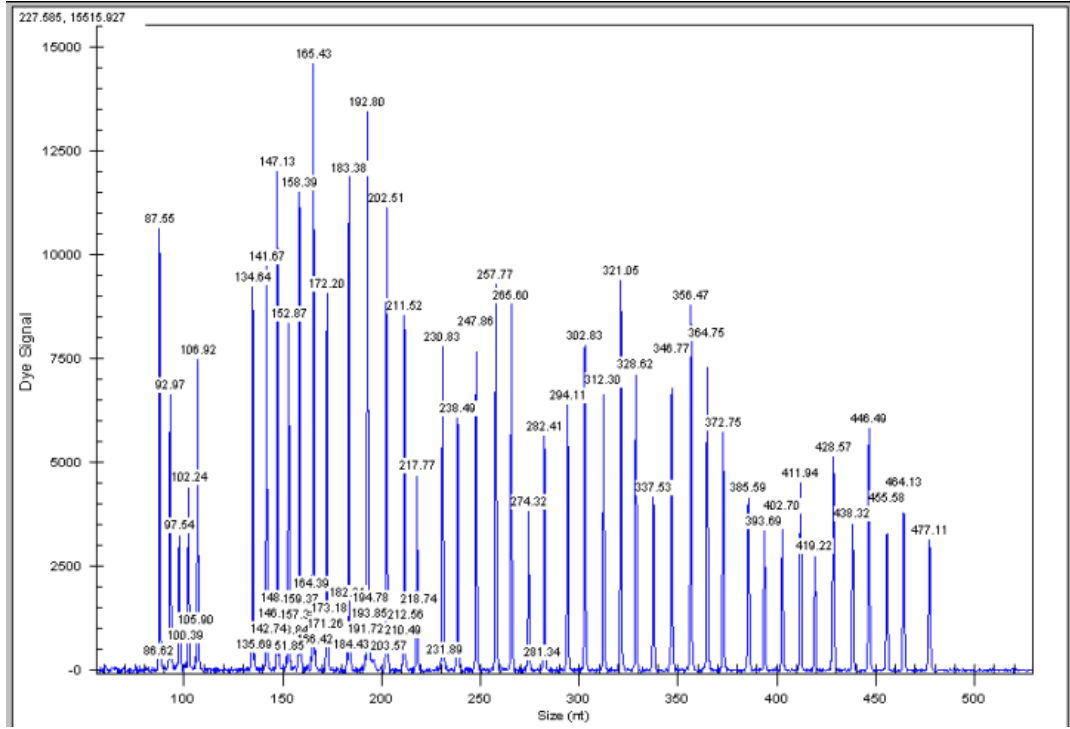
Uzunluk(nt)	SALSA MLPA Probu	Kromozom Pozisyonu	
		Referans	Gen
64-70-76-82	Q Fragmanları		
88-92-96	D Fragmanları		
100	X Fragmanı		
105	Y Fragmanı		
136	<i>Referans Probu</i>	4q12	
142	IGF2R Probu		6q26
148	KCNRG Probu		13q14
154	MYC Probu		8q24
159	<i>Referans Probu</i>	5q35	
166	MIRN15A Probu		13q14
172	MYCN Probu		2p24
184	<i>Referans Probu</i>	4q35	
193	DLEU2Probu		13q14
202	CDKN2A Probu		9p21
211	IFNG Probu		12q24
217	MYCN Probu		2p24
229	<i>Referans Probu</i>	7q11	
238	MYC Probu		8q24
247	TP53 Probu		17p13
256	<i>Referans Probu</i>	2q13	
265	LDLR Probu		19p13
274	CDK4 Probu		12q14
282	TP53 Probu		17p13
292	TP53 Probu		17p13
301	ESR1 Probu		6q25
310	<i>Referans Probu</i>	3p25	
319	LRMP Probu		12p12
328	ATM Probu		11q23
337	<i>Referans Probu</i>	1p32	
346	PARK2 Probu		6q26
355	CCND2 Probu		12p13
364	MYCN Probu		2p24
371	ATM Probu		11q23
382	RB1 Probu		13q14
391	<i>Referans Probu</i>	16q24	
400	CHFR Probu		12q24
409	TP53 Probu		17p13
418	<i>Referans Probu</i>	20q11	
427	EIF3S3 Probu		8q24
436	MYCN Probu		2p24
445	<i>Referans Probu</i>	16p13	
454	CDKN2B Probu		9p21
463	DLEU7 Probu		13q14
475	<i>Referans Probu</i>	22q13	

Kaynak 59'dan Türkçeleştirilerek alınmıştır (59).

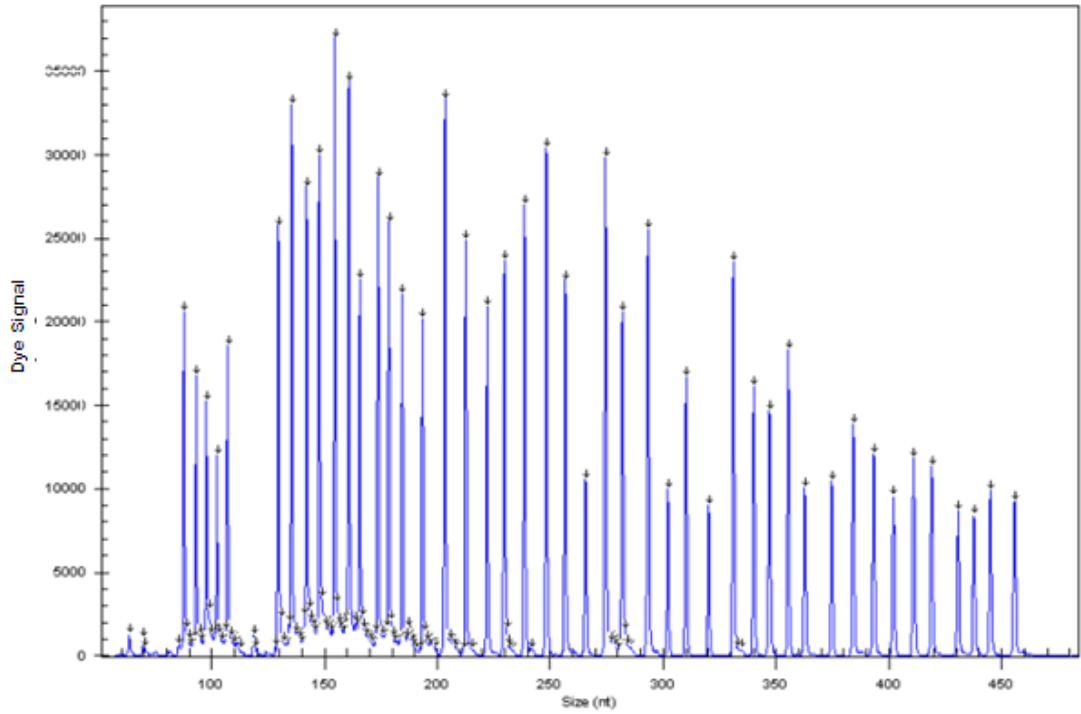
**Tablo8: SALSA MLPA P038-A2 KLL Probmiks-2**

Uzunluk(nt)	SALSA MLPA Probu	Kromozom Pozisyonu	
		Referans	Gen
64-70-76-82	Q Fragmanları		
88-92-96	D Fragmanları		
100	X Fragmanı		
105	Y Fragmanı		
130	<i>Referans Probu</i>	<i>5q31</i>	
136	ATM Probu		11q22
142	SMAD4Probu		18q21
148	PTEN Probu		10q23
154	<i>Referans Probu</i>	<i>15q21</i>	
160	RB1 Probu		13q14
166	CCNE1 Probu		19q12
173	ATM Probu		11q23
178	PAH Probu		12q23
184	<i>Referans Probu</i>	<i>9q34</i>	
193	TP53 Probu		17p13
202	ATM Probu		11q23
211	<i>Referans Probu</i>	<i>9q21</i>	
221	KCNRG Probu		13q14
229	PAH Probu		12q23
238	ATP7B Probu		13q14
247	<i>Referans Probu</i>	<i>21q11</i>	
256	TP53 Probu		17p13
265	CDKN2D Probu		19p13
274	<i>Referans Probu</i>	<i>22q12</i>	
281	RDX Probu		11q23
292	PTEN Probu		10q23
301	<i>Referans Probu</i>	<i>1q21</i>	
310	IGF1 Probu		12q23
319	LDLR Probu		19p13
329	<i>Referans Probu</i>	<i>2p21</i>	
337	DLEU1 Probu		13q14
346	TP53Probu		17p13
355	<i>Referans Probu</i>	<i>2p13</i>	
361	ATM Probu		11q23
373	DLEU1 Probu		13q14
382	<i>Referans Probu</i>	<i>2p16</i>	
391	TP53 Probu		17p13
400	DLEU1 Probu		13q14
409	<i>Referans Probu</i>	<i>2p16</i>	
418	CHMP2A Probu		19q13
427	APAF1 Probu		12q13
436	<i>Referans Probu</i>	<i>1p36</i>	
444	CD27 Probu		12p13
454	<i>Referans Probu</i>	<i>15q26</i>	

Kaynak 59'dan Türkçeleştirilerek alınmıştır (59).












































Şekil 20 : H38 no'lu hastaya ait normal olarak değerlendirilen P037-A2 probmiks ile çalışılan MLPA pik görüntüsü.



Şekil 21 : H20 no'lu hastaya ait normal olarak değerlendirilen P038-A2 probmiks ile çalışılan MLPA pik görüntüsü.










































**Tablo 21:** H38 no'lu hastaya ait P037-A2 probmiksi ile çalışılan normal doz oranı analiz görüntüsü




Length	SALSA MLPA probe	Reference	Gene	SONUÇ
92	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation	-		 0,8526
136	Reference probe 02573-L03981	4q12		 0,9310
142	IGF2R probe 02799-L02184		6q26	 0,9438
148	KCNRG probe 04018-L04000		13q14	 0,9483
154	MYC probe 00580-L00145		8q24	 0,9208
159	Reference probe 02597-L02068	5q35		 0,9841
166	MIRN15A probe 04019-L03416		13q14	 0,9535
172	MYCN probe 03028-L03597		2p24	 1,0358
184	Reference probe 01217-L00694	4q35		 0,9591
193	DLEU2 probe 04020-L03417		13q14	 1,0143
202	CDKN2A probe 00602-L09528		9p21	 1,0939
211	IFNG probe 00472-L00088		12q14	 0,9746
217	DLEU7 probe 03775-L02416		13q14	 1,1209
229	Reference probe 01561-L01133	7q11		 1,0225
238	MYC probe 00672-L00169		8q24	 0,9456
247	TP53 probe 02376-L01498		17p13	 1,0347
256	Reference probe 00518-L00098	2q13		 0,9791
265	LDLR probe 02318-L01809		19p13	 0,9707
274	CDK4 probe 03174-L02513		12q14	 0,9176
282	TP53 probe 02384-L01158		17p13	 0,9977
292	TP53 probe 00709-L00302		17p13	 0,9081
301	ESR1 probe 02746-L02173		6q25	 1,0095
310	Reference probe 02140-L01633	3p25		 0,9987
319	LRMP probe 00495-L03128		12p12	 1,0390
328	ATM probe 02663-L02130		11q23	 1,0317
337	Reference probe 02875-L02342	1p32		 1,0092
346	PARK2 probe 02182-L03127		6q26	 1,0062
355	CCND2 probe 00498-L00084		12p13	 1,1097
364	MYCN probe 02572-L02036		2p24	 1,1105
371	ATM probe 02667-L02134		11q23	 1,1074
382	RB1 probe 01794-L01357		13q14	 1,0490
391	Reference probe 01087-L00734	16q24		 1,0812
400	CHFR probe 02684-L03126		12q24	 1,0433
409	TP53 probe 02263-L01749		17p13	 1,0531
418	Reference probe 02216-L01482	20q11		 1,0989
427	EIF353 probe 01108-L00679		8q24	 1,0448
436	MYCN probe 03327-L02466		2p24	 0,9845
445	Reference probe 02445-L01409 454 CDKN2B probe 01531-L00954	16p13		 1,0697
454	CDKN2B probe 01531-L00954		9p21	 1,0346
463	DLEU7 probe 03042-L02417		13q14	 1,0114
475	Reference probe 01762-L08761	22q13		 1,1170

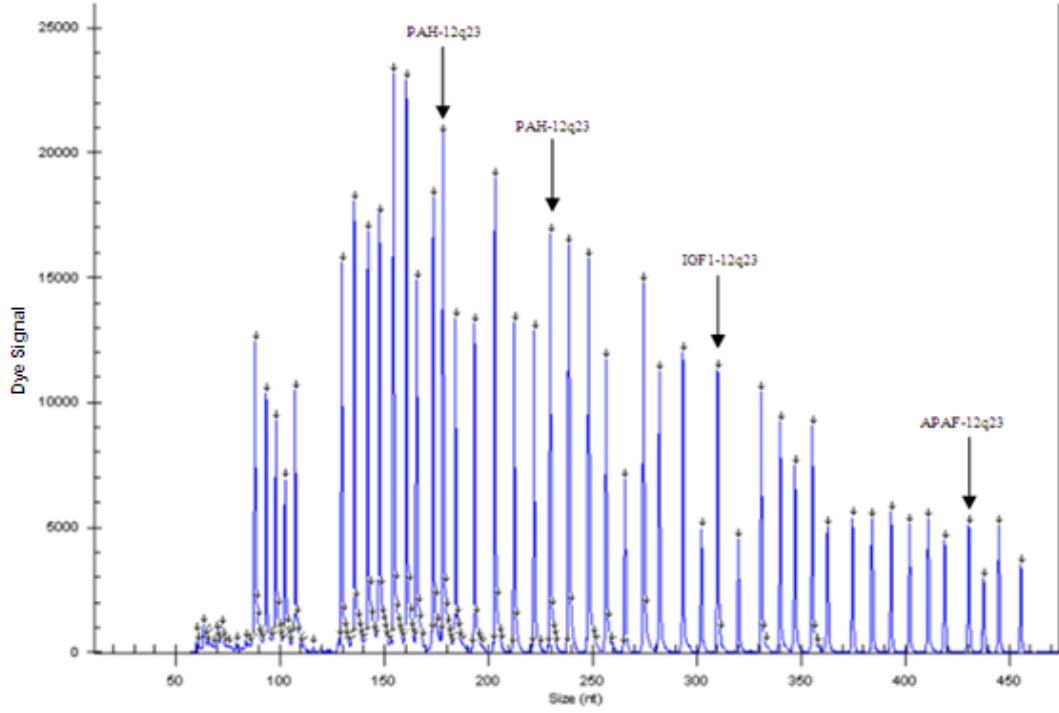
 : Normal  : Deletion  : Duplication  : Grey Zone (Doğrulamaya giren problemler koyu renkte gösterilmiştir)



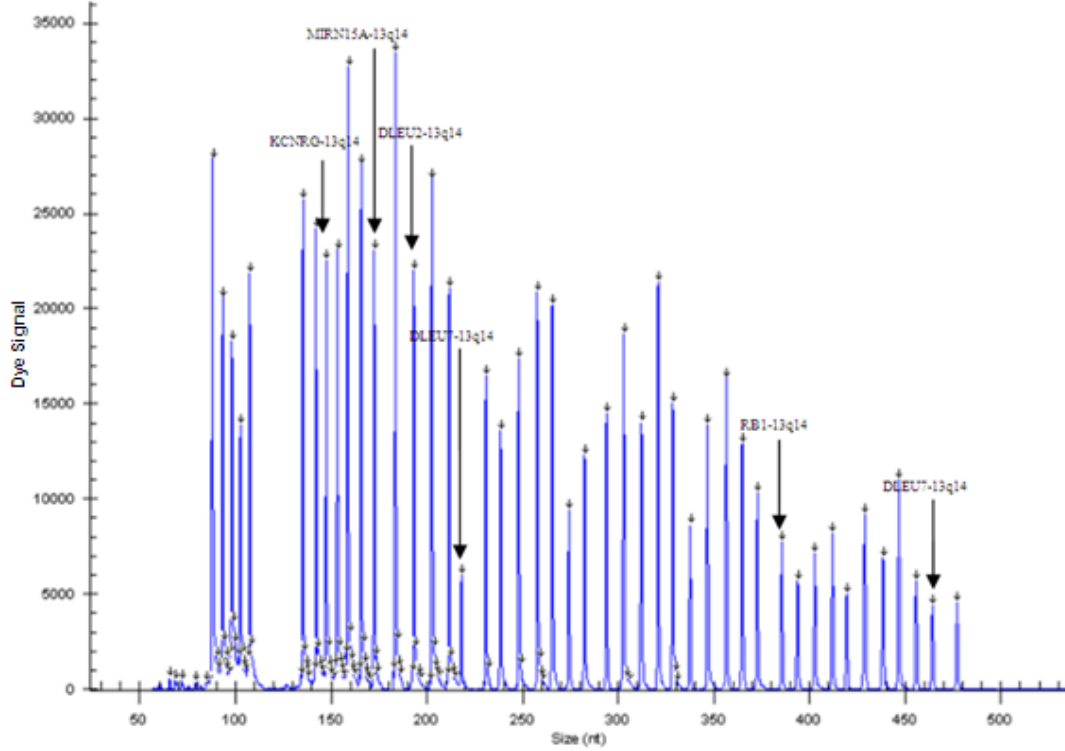
**Tablo 22** : H20 no'lu hastaya ait P038-A2 probmiksi ile çalışılan normal doz oranı analiz görüntüsü

Length	SALSA MLPA probe	Reference	F4	SONUÇ
92	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation			 0,8671
130	Reference probe 00797-L00463	5q31		 0,9413
136	ATM probe 02675-L01168	11q23		 0,9658
142	SMAD4 probe 02127-L01638	18q21		 0,9169
148	PTEN probe 00522-L00387	10q23		 0,9507
154	Reference probe 02448-L01892	15q21		 0,9562
160	RB1 probe 00845-L00378	13q14		 0,8974
166	CCNE1 probe 02881-L02348	19q12		 0,8592
173	ATM probe 02644-L02111	11q23		 0,8971
178	PAH probe 02330-L01818	12q23		 1,0043
184	Reference probe 03006-L02446	9q34		 0,9266
193	TP53 probe 01996-L01536	17p13		 0,8614
202	ATM probe 02654-L02121	11q23		 0,9620
211	Reference probe 01344-L00555	9q21		 1,0445
221	KCNRG probe 04017-L03414	13q14		 0,9266
229	PAH probe 02334-L01820	12q23		 1,0435
238	ATP7B probe 03240-L02677	13q14		 0,9850
247	Reference probe 00816-L00334	21q11		 1,1227
256	TP53 probe 01990-L03129	17p13		 0,9965
265	CDKN2D probe 00344-L00170	19p13		 0,9054
274	Reference probe 02485-L01984	22q12		 1,0906
281	RDX probe 01633-L01171	11q23		 1,0641
292	PTEN probe 02203-L08261	10q23		 1,1360
301	Reference probe 01916-L01460	1q21		 1,0472
310	IGF1 probe 02340-L01834	12q23		 1,1271
319	LDLR probe 02322-L09533	19p13		 1,0136
329	Reference probe 00915-L00503	2p21		 1,1158
337	DLEU1 probe 01590-L01162	13q14		 1,0255
346	TP53 probe 00345-L00171	17p13		 1,0281
355	Reference probe 00965-L00552	2p13		 1,0913
361	ATM probe 03776-L02132	11q23		 1,0566
373	DLEU1 probe 01589-L01161	13q14		 1,0192
382	Reference probe 01550-L00993	5q22		 1,2460
391	TP53 probe 01587-L01159	17p13		 1,0847
400	DLEU1 probe 00801-L00639	13q14		 0,9569
409	Reference probe 00963-L09340	2p16		 1,1370
418	CHMP2A probe 01195-L00752	19q13		 1,1327
427	APAF1 probe 00933-L01374	12q23		 1,1155
436	Reference probe 02188-L01686	1p36		 1,1864
444	CD27 probe 00678-L00124	12p13		 1,1938
454	Reference probe 00605-L00018	15q26		 1,1985

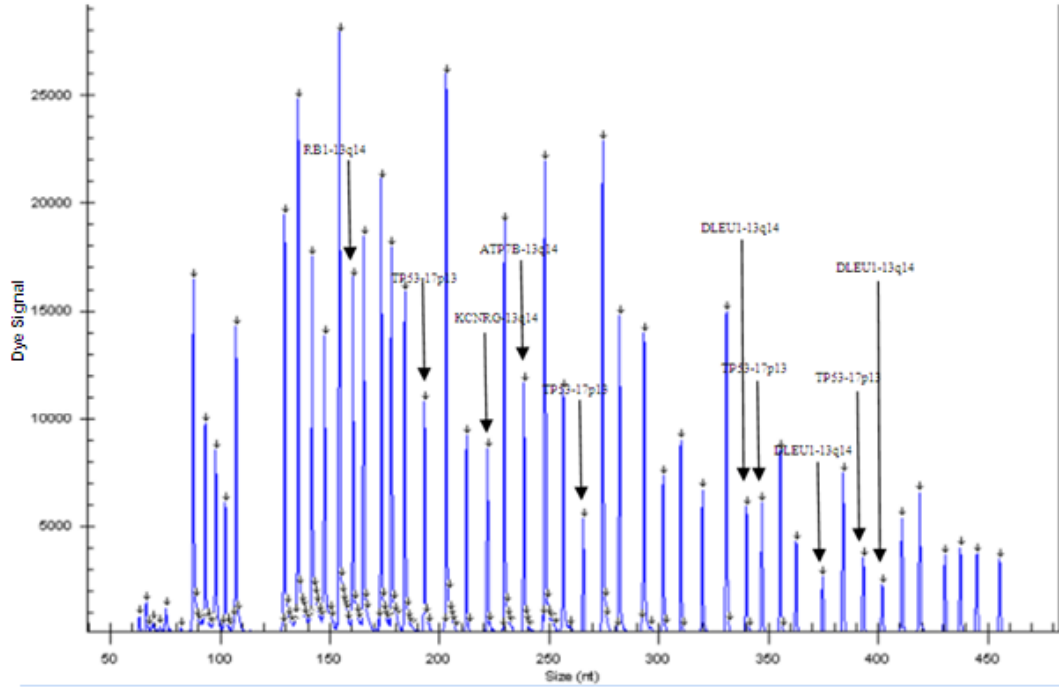
 : Normal  : Deletion  : Duplication  : Grev Zone (Doğrulamaya airen probklar kovu renkte ağsterilmiştir)



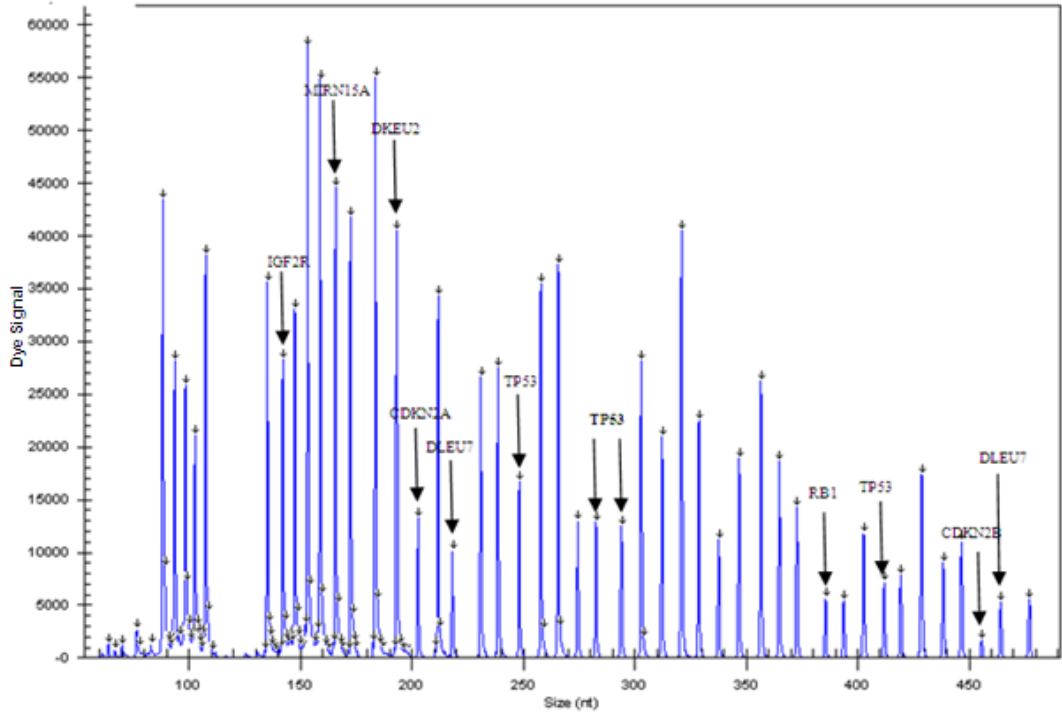
**Şekil 22:** H28 no'lu hastaya ait 12. kromozoma spesifik problarda amplifikasyon tespit edilen P038-A2 probmiksi ile çalışılan hastanın MLPA pik görüntüsü.



**Şekil 23:** H10 no'lu hastaya ait 13q14 bölgesine spesifik problarda delesyon tespit edilen P037-A2 probmiksi ile çalışılan hastanın MLPA pik görüntüsü. Rb1 probe normal olarak değerlendirildi.





































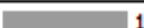
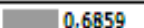









Şekil 24 : P038-A2 probmiks ile çalışılan, 13q14, 17p13 delesyonu olarak değerlendirilen H33 no'lu hastaya ait MLPA pik görüntüleri






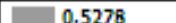





































Şekil 25 : H33 no'lu hastaya ait 13q14 ve 17p13 delesyonuna ek olarak 9p21 delesyonunun P037-A2 probmiksi ile görüldüğü MLPA pik görüntüleri.





**Tablo 23:**H28 no'lu hastaya ait 12. kromozoma spesifik problarda amplifikasyon tespit edilen P038-A2 probmiksi ile çalışılan hastanın doz oranı sonuçları

Length	SALSA MLPA probe	Reference	F4	SONUÇ
92	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation			 1,0054
130	Reference probe 00797-L00463	5q31		 0,9988
136	ATM probe 02675-L01168	11q23		 0,9474
142	SMAD4 probe 02127-L01638	18q21		 0,9534
148	PTEN probe 00522-L00387	10q23		 0,9505
154	Reference probe 02448-L01892	15q21		 1,0025
160	RB1 probe 00845-L00378	13q14		 1,0193
166	CCNE1 probe 02881-L02348	19q12		 0,9435
173	ATM probe 02644-L02111	11q23		 0,9845
178	PAH probe 02330-L01818	12q23		 1,8523
184	Reference probe 03006-L02446	9q34		 0,9527
193	TP53 probe 01996-L01536	17p13		 0,9519
202	ATM probe 02654-L02121	11q23		 0,9006
211	Reference probe 01344-L00555	9q21		 0,9445
221	KCNKG probe 04017-L03414	13q14		 0,9568
229	PAH probe 02334-L01820	12q23		 1,8073
238	ATP7B probe 03240-L02677	13q14		 1,0132
247	Reference probe 00816-L00334	21q11		 0,9619
256	TP53 probe 01990-L03129	17p13		 0,8669
265	CDKN2D probe 00344-L00170	19p13		 1,0010
274	Reference probe 02485-L01984	22q12		 0,8806
281	RDX probe 01633-L01171	11q23		 0,9602
292	PTEN probe 02203-L08261	10q23		 0,8837
301	Reference probe 01916-L01460	1q21		 0,8724
310	IGF1 probe 02340-L01834	12q23		 1,4889
319	LDLR probe 02322-L09533	19p13		 0,8486
329	Reference probe 00915-L00503	2p21		 0,8148
337	DLEU1 probe 01590-L01162	13q14		 0,9623
346	TP53 probe 00345-L00171	17p13		 0,8555
355	Reference probe 00965-L00552	2p13		 0,8938
361	ATM probe 03776-L02132	11q23		 0,8630
373	DLEU1 probe 01589-L01161	13q14		 0,8671
382	Reference probe 01550-L00993	5q22		 0,7807
391	TP53 probe 01587-L01159	17p13		 0,7923
400	DLEU1 probe 00801-L00639	13q14		 0,8675
409	Reference probe 00963-L09340	2p16		 0,8740
418	CHMP2A probe 01195-L00752	19q13		 0,7271
427	APAF1 probe 00933-L01374	12q23		 1,5449
436	Reference probe 02188-L01686	1p36		 0,6859
444	CD27 probe 00678-L00124	12p13		 1,0364
454	Reference probe 00605-L00018	15q26		 0,7404




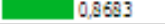






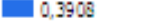

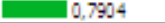


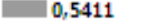



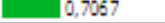
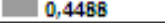







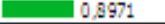
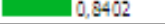

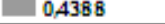




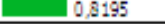
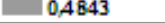

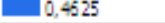

 : Normal  : Deletion  : Duplication  : Grey Zone (Doğrulamaya giren problemler koyu renkte gösterilmiştir)





**Tablo 24** : H10 no'lu hastaya ait Rb1 probu haricinde 13q14 bölgesine spesifik problarda delesyon tespit edilen P037-A2 probmiksi ile çalışılan hastanın doz oranı sonuçları

Length	SALSA MLPA probe	Reference	Gene	SONUÇ
92	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation	-		 1,2018
136	Reference probe 02573-L03981	4q12		 1,2347
142	IGF2R probe 02799-L02184		6q26	 1,1487
148	KCNRG probe 04018-L04000		13q14	 <b>0,5278</b>
154	MYC probe 00580-L00145		8q24	 1,1314
159	Reference probe 02597-L02068	5q35		 1,0908
166	MIRN15A probe 04019-L03416		13q14	 <b>0,5091</b>
172	MYCN probe 03028-L03597		2p24	 1,2159
184	Reference probe 01217-L00694	4q35		 1,2928
193	DLEU2 probe 04020-L03417		13q14	 <b>0,5044</b>
202	CDKN2A probe 00602-L09528		9p21	 1,2231
211	IFNG probe 00472-L00088		12q14	 1,1593
217	DLEU7 probe 03775-L02416		13q14	 0,4865
229	Reference probe 01561-L01133	7q11		 1,0041
238	MYC probe 00672-L00169		8q24	 1,0705
247	TP53 probe 02376-L01498		17p13	 1,0980
256	Reference probe 00518-L00098	2q13		 1,0592
265	LDLR probe 02318-L01809		19p13	 1,0652
274	CDK4 probe 03174-L02513		12q14	 1,1150
282	TP53 probe 02384-L01158		17p13	 1,0271
292	TP53 probe 00709-L00302		17p13	 0,9908
301	ESR1 probe 02746-L02173		6q25	 1,1241
310	Reference probe 02140-L01633	3p25		 1,0388
319	LRMP probe 00495-L03128		12p12	 1,0892
328	ATM probe 02663-L02130		11q23	 1,0312
337	Reference probe 02875-L02342	1p32		 1,0122
346	PARK2 probe 02182-L03127		6q26	 0,9994
355	CCND2 probe 00498-L00084		12p13	 0,9499
364	MYCN probe 02572-L02036		2p24	 0,9429
371	ATM probe 02667-L02134		11q23	 0,9527
382	RB1 probe 01794-L01357		13q14	 0,9170
391	Reference probe 01087-L00734	16q24		 0,8770
400	CHFR probe 02684-L03126		12q24	 0,9822
409	TP53 probe 02263-L01749		17p13	 0,9146
418	Reference probe 02216-L01482	20q11		 0,9110
427	EIF3S3 probe 01108-L00679		8q24	 0,8610
436	MYCN probe 03327-L02466		2p24	 0,9163
445	Reference probe 02445-L01409454 CDKN2B probe 01531-L00954	16p13		 0,9063
454	CDKN2B probe 01531-L00954		9p21	 0,8693
463	DLEU7 probe 03042-L02417		13q14	 <b>0,4693</b>
475	Reference probe 01762-L08761	22q13		 0,7407

 : Normal  : Deletion  : Duplication  : Grey Zone (Doğrulamaya giren problemler koyu renkte gösterilmiştir)

**Tablo 25 :**P037-A2 probmiks ile çalışılan, 13q14, 17p13, ve 9p21 delesyonu olarak değerlendirilen H33 no'lu hastaya ait doz oranı sonuçları

Length	SALSA MLPA probe	Referans	Gené	SONUÇ
92	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation	-		 1,2813
136	Reference probe 02573-L03981	4q12		 1,1840
142	IGF2R probe 02799-L02184		6q26	 0,9427
148	KCNKG probe 04018-L04000		13q14	 0,8683
154	MYC probe 00580-L00145		8q24	 1,0280
159	Reference probe 02597-L02068	5q35		 1,1477
166	MIRN15A probe 04019-L03416		13q14	 0,9412
172	MYCN probe 03028-L03597		2p24	 1,1583
184	Reference probe 01217-L00694	4q35		 1,0960
193	DLEU2 probe 04020-L03417		13q14	 0,9346
202	CDKN2A probe 00602-L09528		9p21	 0,3908
211	IFNG probe 00472-L00088		12q14	 1,2339
217	DLEU7 probe 03775-L02416		13q14	 0,7904
229	Reference probe 01561-L01133	7q11		 1,0567
238	MYC probe 00672-L00169		8q24	 1,0926
247	TP53 probe 02376-L01498		17p13	 <b>0,5411</b>
256	Reference probe 00518-L00098	2q13		 1,1741
265	LDLR probe 02318-L01809		19p13	 1,2156
274	CDK4 probe 03174-L02513		12q14	 0,9981
282	TP53 probe 02384-L01158		17p13	 0,7067
292	TP53 probe 00709-L00302		17p13	 <b>0,4488</b>
301	ESR1 probe 02746-L02173		6q25	 1,0658
310	Reference probe 02140-L01633	3p25		 0,9673
319	LRMP probe 00495-L03128		12p12	 1,0410
328	ATM probe 02663-L02130		11q23	 0,9967
337	Reference probe 02875-L02342	1p32		 0,8704
346	PARK2 probe 02182-L03127		6q26	 0,9064
355	CCND2 probe 00498-L00084		12p13	 0,9662
364	MYCN probe 02572-L02036		2p24	 0,8971
371	ATM probe 02667-L02134		11q23	 0,8402
382	RB1 probe 01794-L01357		13q14	 0,4563
391	Reference probe 01087-L00734	16q24		 <b>0,4388</b>
400	CHFR probe 02684-L03126		12q24	 1,0400
409	TP53 probe 02263-L01749		17p13	 <b>0,4126</b>
418	Reference probe 02216-L01482	20q11		 0,9916
427	EIF3S3 probe 01108-L00679		8q24	 1,1075
436	MYCN probe 03327-L02466		2p24	 0,8195
445	Reference probe 02445-L01409 454 CDKN2B probe 01531-L00954	16p13		 <b>0,4843</b>
454	CDKN2B probe 01531-L00954		9p21	 0,1652
463	DLEU7 probe 03042-L02417		13q14	 0,4625
475	Reference probe 01762-L08761	22q13		 <b>0,4750</b>

 : Normal  : Deletion  : Duplication  : Grey Zone (Doğrulamaya giren problemler koyu renkte gösterilmiştir)

Çalışmaya dahil edilen bütün olguların SALSA MLPA P037-A2 ve SALSA MLPA P038-A2 probmiksleri ile yapılan MLPA çalışmasında, 19 (%46.3) olgu normal olarak değerlendirildi. 22 (%53.7) KLL olgusu ise, anormal olarak değerlendirildi. Her iki probmikslere ile yapılan çalışmanın sonucunda, kitler arasında uyumsuz sonuç gözlenmedi. MLPA ile tespit edilen anomalilerin yüzdesi Tablo 26’da görülmektedir.

**Tablo 26** : MLPA Bulgularının Yüzdesi

	Olgu Sayısı	Yüzde %
<b>SİTOGENETİK ANOMALİLER</b>	22	<b>53.7</b>
<b>İzole Anomaliler</b>		
13q14 delesyonu	11	<b>26.8</b>
Trizomi 12	7	<b>17.0</b>
17p13 delesyonu	1	<b>2.4</b>
<b>Kombine Anomaliler</b>		
13q14 del.-Trizomi 12	1	<b>2.4</b>
13q14-17p13 ve 9p21 del.	1	<b>2.4</b>
17p13 ve 13q14 del.	1	<b>2.4</b>
<b>NORMAL</b>	19	<b>46.3</b>

Anomaliler izole ve kombine olmak üzere 2 kategoriye ayrıldı. İzole anomaliler içinde en sık 13q14 delesyonu gözlemlendi (%26.8). 7 olgu trizomi 12, 1 olgu da 17p13 delesyonu olarak değerlendirildi. Kombine anomaliler kategorisinde ise, 13q14 delesyonu-trizomi 12; 13q14-17p13 ve 9p21 delesyonu; 17p13-13q14 delesyonu birer olguda gözlemlendi.

İzole ve kombine anomaliler ayrımı yapılmadığında ise, 14 olguda 13q14 delesyonu, 8 olguda trizomi 12, 3 olguda 17p13 delesyonu, 1 olguda da 9p21 delesyonu görüldü.

### **SİTOGENETİK, İFISH VE MLPA SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI**

Sitogenetik olarak normal değerlendirilen 14 olgunun, sadece 4’ü FISH ile normal olarak değerlendirildi. İFISH ile anormal değerlendirilen 10 olgunun 9’unda 13q14 delesyonu, 1’inde de kombine 13q14-17p13 delesyonu görüldü. MLPA tekniği ile, sitogenetik yöntemle normal değerlendirilen 14 olgudan 8’i normal değerlendirildi. MLPA ile anormal değerlendirilen 6 olgunun 5’inde 13q14 delesyonu, 1’inde ise kombine 13q14-17p13-9p21 delesyonu görüldü. FISH ile

anormal MLPA ile normal değerlendirilen 4 hasta incelendiğinde, en yüksek %26 mozaisizm tespit edilen 13q14 delesyonlu olgular olarak dikkat çekmektedir. Bu olguların MLPA doz oranı ayrıntılı incelendiğinde ise, 13q14'e lokalize prob doz oranları delesyon sınırına yakın düzeylerde olduğu izlendi. Ayrıca, FISH ile kombine 13q14-17p13 delesyonu tespit edilen olguda MLPA ile ilave olarak 9p21 delesyonu görüldü.

Her olgunun konvensiyonel sitogenetik, moleküler sitogenetik ve MLPA sonuçları, karşılaştırmalı olarak Tablo 27'de görülmektedir.

Konvensiyonel sitogenetik yöntemle trizomi 12 olarak değerlendirilen 12 olgu, iFISH yöntemi ile de tespit edildi. Kültürü başarısız sonuçlanan 1 olgu da FISH ile düşük düzey mozaik trizomi 12 saptandı. Sitogenetik ve iFISH ile trizomi 12'li 13 olgunun 8'i MLPA ile tespit edildi. MLPA ile normal değerlendirilen 5 olgu düşük düzey mozaisizimli olguları. Bu olguların MLPA doz oranı ayrıntılı incelendiğinde ise, 12. kromozoma lokalize prob doz oranları amplifikasyon sınırına yakın düzeylerde olduğu izlendi.

Bu çalışmada konvensiyonel sitogenetik yöntemle tespit edilen 5 translokasyon olgusu, iFISH ve MLPA tekniği ile tespit edilemedi. Bunların 4'ü 13. kromozom yeniden düzenlenmeleri iken, 1'i de kompleks karyotip olarak değerlendirildi. 13'ü kromozom translokasyonlu 3 olguda FISH ve MLPA ile 13q14 delesyonu gözlenirken, 1 olgu ise normal değerlendirildi. Kompleks karyotipli olgu FISH ve MLPA tekniği ile normal değerlendirildi. FISH analizinde bazı olgularda elde edilen metafaz incelemesinde, 13. ve 17. kromozom translokasyonları ile uyumlu sinyaller gözlemlendi.

Sitogenetikte kültürde başarısız 8 olgunun 3'ü FISH ve MLPA ile normal değerlendirildi. İki olguda FISH ve MLPA tekniği ile 13q14 delesyonu gözlemlendi. Bir olgu FISH ile 13q14 delesyonu olarak değerlendirilirken, MLPA ile kombine 13q14-17p13 delesyonu olarak değerlendirildi. FISH ile düşük düzey mozaisizm saptanan 11q23 delesyonu ve trizomi 12'li olgular, MLPA ile normal değerlendirildi.

Konvensiyonel sitogenetik, FISH ve MLPA yöntemi ile 41 KLL hastasının değerlendirildiği bu çalışmada, 34 (%82.9) hasta anormal olarak değerlendirildi.



**Tablo 27 : Olguların Sitogenetik, FISH ve MLPA Sonuçları**

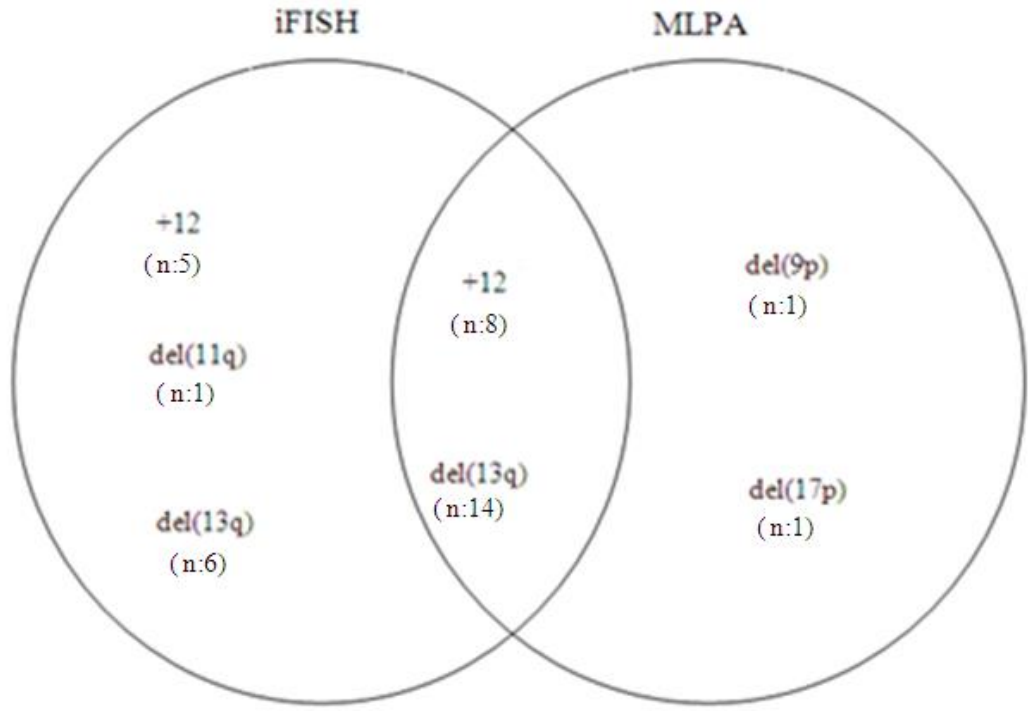
Hasta No	Sitogenetik	FISH	MLPA
H01	Trizomi12(%15)	Trizomi12(%11.5)	Normal
H02	Trizomi12(%25)	Trizomi12(%15)	Normal
H03	Trizomi12(%70)	Trizomi12(%65)	Trizomi 12
H04	Normal	13q14 del.(%56)	13q14 del
H05	Normal	13q14 del.(%77)	13q14 del
H06	Normal	Normal	Normal
H07	Normal	Normal	Normal
H08	der(12;13)(p10;q10)	13q14 del. Bial(%7.5)monoal(%59)	13q14 del
H09	der(9;13)(p10;q10)	13q14 del.(%56)	13q14 del
H10	-	13q14 del.(%81)	13q14 del
H11	Normal	13q14 del.(%9)	Normal
H12	-	Normal	Normal
H13	-	13q14 del.(%90)	13q14 del 17p13 del
H14	Normal	Normal	Normal
H15	Trizomi12(%5)	17p13 del (%49) Trizomi 12 (%8)	17p13 del
H16	Marker kromozom (%10)	13q14 del.(%8)	Normal
H17	Trizomi12(%10)	13q14 del.(%25) Trizomi 12(%30)	Trizomi 12
H18	Normal	13q14 del. Bial(%7.5)monoal(%59)	13q14 del
H19	t(7;13)(q22;q34),del(13)(q14)	13q14 del.(%30)	13q14 del
H20	Normal	13q14 del.(%8)	Normal
H21	Trizomi 12 (%80)	Trizomi 12(%85)	Trizomi 12
H22	Normal	13q14 del.(%25)	Normal
H23	-	11q23 del(%7)	Normal
H24	Normal	Normal	Normal
H25	Trizomi 12 (%75)	Trizomi 12(%80)	Trizomi 12
H26	Normal	13q14 del.(%26)	Normal
H27	Trizomi 12(%10)	13q14 del.(%45) Trizomi 12(%15)	13q14 del
H28	Trizomi 12(%80)	Trizomi 12(%75)	Trizomi 12
H29	-	Normal	Normal
H30	Normal	13q14 del.(%55)	13q14 del

**Tablo 27** (Devamı)

Hasta No	Sitogenetik	FISH	MLPA
H31	der(7;13)(q36;q10),+13	Normal	Normal
H32	Trizomi 12(%85)	Trizomi 12(%76)	Trizomi 12
H33	Normal	17p13 del.(%45) 13q14 del.(%53)	17p13 del 13q14 del 9p21 del
H34	Trizomi 12(%60)	Trizomi 12 (%33)	Trizomi 12
H35	Trizomi 3 (%24)	Normal	Normal
H36	Normal	13q14 del. Bial(%34)monoal(%21)	13q14 del
H37	Trizomi 12 (%10)	13q14 del.(%27.5) Trizomi 12(%31)	Trizomi 12 13q14 del
H38	-	Normal	Normal
H39	-	Trizomi 12(%6)	Normal
H40	-	13q14 del.(%85)	13q14 del
H41	Kompleks karyotip	Normal	Normal

**Tablo 28:** Kullanılan yöntemlere göre tespit edilen sitogenetik anormallikler

Yöntemler	Sitogenetik	FISH	MLPA
Sitogenetik anomaliler			
13q14 delesyonu	-	20	14
Trizomi 12	12	13	8
17p13 delesyonu	-	2	3
11q22 delesyonu	-	1	-
9p21 delesyonu	-	-	1
Translokasyonlar	5	-	-



Şekil 26:iFISH ve MLPA bulgularının karşılaştırılması.

## TARTIŞMA

Kronik lenfositik lösemi (KLL), olgun görünümlü küçük lenfositlerin kan, kemik iliği, lenf bezi ve dalağı infiltre etmesi ve lenfositlerin fonksiyon bozukluğu göstermesi ile karakterize kemik iliğinin malign bir hastalığıdır (1). KLL olgularının %95'i B lenfosit kökenlidir (2). Batı dünyasında erişkinlerde görülen en sık lösemi formudur (7). E/K oranı 2.0'dır (3). Çalışmamıza dahil edilen hastalarda E/K oranı ise, 2.15 olarak hesaplandı. KLL ileri yaş hastalığıdır. Hastaların ancak %20-30 kadarı 55 yaşın altındadır. Çalışmamıza dahil edilen hastaların ortalama yaşı 65'tir. 55 yaşın altında tanı alan hastaların oranı ise, %29.2 olarak hesaplandı. Hastaların 15(%36.5)'inde kemoterapi öyküsü mevcuttur. Hastaların 9 (%21.9)'u Rai Evre 0; 9 (%21.9)'u Rai Evre 1; 12 (%29.2)'si Rai Evre 2; 9 (%21.9)'u Rai Evre 3; 2 (%4.8)'si Rai Evre 4'tür.

KLL'nin etiyolojisi henüz aydınlatılamamıştır. Ancak genetik faktörlerin KLL oluşumunda etkili olabileceği bilinmektedir. Ayrıca kromozomal anormalliklerin KLL prognozunu etkilediği ve tedavi sürecinde klinisyeni yönlendirdiği bilinmektedir (13). Bugüne kadar yapılan çalışmalara rağmen KLL'nin moleküler patogenezinin tam olarak aydınlatılamamasının nedenlerinden biri de, KLL hücrelerinin in vitro proliferasyon yeteneğinin düşük olması nedeniyle metafaz eldesinde ve analizindeki zorluklardır. FISH tekniği interfaz evresindeki bir hücrenin değerlendirilmesine olanak sağlaması açısından önemlidir ve rutinde sıklıkla kullanılmaktadır. KLL'de ilgili kromozomal ve gen bölgelerindeki değişikliklerin tespitinde kullanılacak bir diğer yöntem "Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA)" ise, güncel bir yöntemdir ve tek reaksiyonla 50'ye yakın ilişkili gen bölgesinin değerlendirilmesine imkan vermektedir. Bu çalışmaya dahil edilen 41 KLL hastasında SALSA Probmixs P037-A2/P038-A2 MLPA kitleri kullanılarak elde edilen sonuçlar, konvansiyonel sitogenetik ve FISH sonuçları ile karşılaştırıldı. Ayrıca DSP30+IL-2 kombinasyonu ile elde edilen kültür başarıları literatürde yer alan çalışmalar ile karşılaştırıldı.

## **KLL' DE KONVANSİYONEL SİTOGENETİK YÖNTEMLERDE MİTOTİK AKTİVATÖRLER**

Literatürde KLL'de periferik kan kültüründe birçok mitotik stimulanla yapılmış çalışmalar mevcuttur. Bunlar arasında en kapsamlı çalışmalardan biri Haferlach C., Dicker F. ve ark.nın 2007 yılında yaptıkları, CpG-oligonükleotid DSP30 ve IL-2 ile stimüle edilmiş periferik kan ve kemik iliği kültüründe %98.8 gibi yüksek bir oranda başarı elde ettikleri çalışmadır (23). Diğer önemli bir çalışma ise, Dicker F. ve ark.nın 2006 yılında bu mitotik stimulanlar ile %95 kültür başarıları yakaladıkları çalışmadır (30). Bu verilerin aksine yine literatürde yer alan diğer bir çalışma da Wren ve ark.nın (2009) çalışmasıdır. Wren ve ark. 24 KLL hastasında yaptıkları çalışmada herhangi bir ajanla stimüle edilmemiş kültürlerde hiç başarılı olamazken, DSP30+IL-2 kombinasyonu ile stimüle edilmiş kültürlerde %75, TPA (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate) ile stimüle edilmiş kültürlerde ise %96 başarı yakaladıklarını bildirmişlerdir (61). Çalışmamızda bu literatür bilgisi desteği ile CpG-oligonükleotid DSP30 ve IL-2 kombinasyonunu tercih ettik. Buna göre stimüle edilen 72 saatlik 36'sı periferik kan, 5'i kemik iliği toplam 41 kültürün 33 (%80.4)'ünde yeterli sayıda ve kalitede metafaz elde edildi. Referans aldığımız Haferlach C., Dicker F. (2007) ve ark. ile Dicker F. ve ark.nın (2006) çalışmalarına oranla daha düşük kültür başarıları çıkmasına rağmen literatürdeki benzer çalışmalardaki oranlara baktığımızda elde ettiğimiz kültür başarıları oranı yüksek olarak değerlendirilebilir. Wren ve ark.nın herhangi bir ajanla stimüle edilmemiş kültürlerde başarısız olmaları ve DSP30+IL-2 kombinasyonu ile bizim çalışmamızda yakaladığımız kültür başarı oranına yakın bir sonuç elde etmeleri bizim açımızdan önemlidir. Fakat Wren ve ark.nın bu çalışmasında az sayıda hastanın dahil edilmesi ve TPA maliyetinin yüksek olması nedeniyle, biz çalışmamızda DSP30+IL-2 kombinasyonunu tercih ettik. Elde ettiğimiz bu veriler, rutinde KLL hastalarında uyguladığımız protokolün başarı ile uygulanabileceğini göstermektedir .

## **KLL' DE SIK GÖRÜLEN KROMOZOMAL ANOMALİLER VE YÖNTEMLERE GÖRE SAPTANABİLİRLİLİKLERİ**

### **13q14 Delesyonu**

13q14 delesyonu tek allelde ve eşlik eden başka kromozomal anormallik yoksa, iyi prognoz belirteçidir (51). Literatürde olduğu gibi çalışmamızda da en sık

saptanan anomali, 13q14 delesyonudur. FISH ile 15'i izole, 5'i kombine olmak üzere toplam 20 (%48.7) olgu 13q14 delesyonu olarak değerlendirildi. Bu olguların konvansiyonel sitogenetik analizinin 3'ünde 13. kromozom translokasyonu görüldü. MLPA ile bu olguların 14'ünde 13q14 delesyonu tespit edildi. FISH ile 13q14 delesyonu, MLPA ile normal değerlendirilen 6 olgu, düşük düzey mozaikizmi hastalardı. MLPA ile %27.5 ve üzeri mozaikizmi olgularda delesyon tespit edilirken, %26 ve altı olgu yanlış negatif olarak değerlendirildi. Hiçbir olgu MLPA ile yanlış pozitif olarak değerlendirilmedi. MLPA ile bu düşük mozaiklik oranlarının doğru bir şekilde saptanmasına yönelik literatürde yayınlanan çalışmalarda bu oranlar konusunda farklı yaklaşımlar görülmüştür. Al Zaabi ve ark. %10-23 oranında mutant hücre varlığında MLPA ile yanlış negatif sonuçların alınabileceğini bildirmişlerdir (50). Coll-Mulet ve ark. bu sınırı %25, Abdool ve ark. da bu sınırı %20 olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda biz bu oran %25-30 olarak tespit ettik. MLPA ile elde ettiğimiz sonuçları FISH yöntemi ile elde ettiğimiz sonuçlar ile kıyasladığımızda, FISH ile 13q14 delesyonu görülen 1'i izole diğeri kombine 2 olgu, MLPA ile de tespit edilirken, MLPA analizinde ek olarak 17p13 delesyonu ve 9p21 delesyonu tespit edildi. MLPA'nın bu çalışmadaki avantajlarından biri, sitogenetik ve FISH ile tespit edilemeyen MLPA ile 17p13 ile 9p21 delesyonu tespit edilen bu iki olgu olmuştur. 17p13 delesyonlu olgularda kemoterapi direnci bildirilmiştir ve prognoz kötüdür (54). KLL'li olgularda 17p13 sonucu, klinisyenin tedaviyi yönlendirmesi açısından önemlidir. Ayrıca MLPA ile 13q14 delesyonu tespit edilen 5 (%35.7) olgunun Rb1 prob doz oranları normal olarak değerlendirilirken, %64.3 olguda delesyon olarak değerlendirildi. Fabris S. ve ark. bu oranı %54.2 olarak bildirmişlerdir. *Rb geni*, genomik instabilitenin sağlanması ve hücre siklusunun ilerlemesinde kritik öneme sahiptir. RB1 geninin mono ya da biallelik delesyonu, lösemi gelişimine katkıda bulunmaktadır (72). Bu çalışmada FISH tekniğinin düşük düzey mozaikizmi olguları tespit edebilmesi ve ayrıca monoallelik/biallelik 13q14 delesyonu ayırımını yapabilmesi, FISH tekniğinin MLPA yöntemine göre önemli avantajlarıdır. MLPA analizinde, %26 ve altı mozaikizmi olguların doz oranı incelendiğinde, 13q14'e spesifik problemlerde delesyon sınırı düzeylerinde doz oranları dikkat çekmektedir. Ayrıca MLPA ile biallelik 13q14

delesyonlu olgularda 13q14'e spesifik problarda çok düşük doz oranı tespit edilse de, monoallel/biallelik ayırımı yapılamamaktadır.

Çalışmamızda her 3 yöntemle olguların sonuçları değerlendirildiğinde, %48.7'sinde 13q14 delesyonu görüldü. Literatürde ise, çalışmalarında Wren ve ark. %69.2 (61), Haferlach C. ve ark. %57.4 (23), Dicker ve ark. %64.3 (30), Stevens-Kroef M. ve ark. %56 (65), Al Zaabi ve ark. %44 (50), Fabris S. ve ark. %39 (6) olguda 13q14 delesyonu bildirmişlerdir. Türk populasyonunda ise, Durak B. ve ark. 79 B-KLL hastasında FISH ile olguların %32.9'unda 13q14 delesyonu bildirmişlerdir (66). Çalışmamızda elde ettiğimiz %48.7 oranı, literatüre oranla biraz düşük yorumlanabilir fakat yakın veya daha düşük oranlarda da çalışmalar mevcuttur. Çalışmaya dahil olma kriterleri ve çalışmanın yapıldığı toplum ya da ırk bu oranları etkileyebilmektedir. Çalışmamızın en önemli amacı MLPA'nın kullanılabilirliğini değerlendirmek olduğundan, biz hasta grubumuzu KLL tanısı almış heterojen bir grup olarak belirledik. Hasta grubumuzda yeni tanı almış hastalar, uzun süre takipli hastalar ve kemoterapi öyküsü mevcut hastalar bulunmaktadır. Literatürle uyumlu olarak bizim çalışmamızda da KLL'li hastalarda en sık saptanan anomali 13q14 delesyonudur.

### **Trizomi 12**

Bu çalışmada konvansiyonel sitogenetik yöntemle en sık tespit edilen anomali trizomi 12'dir. Kültürde başarı sağlanan 33 kültürün 12 (%36.3)'si trizomi 12 olarak değerlendirildi. Kültürü başarısız sonuçlanan 8 olgudan 1'i iFISH tekniği ile %6 oranında mozaik trizomi 12 olarak değerlendirildi. Bu çalışmada uygulanan 3 yöntem ile elde edilen sonuçlar incelendi ve 41 olgunun 13 (%31.7)'ünde trizomi 12 saptandı. Yue-yun L. ve Xiao-jun H. Çinli B-KLL hastalarında konvansiyonel sitogenetik yöntemle yaptıkları çalışmada, %34.5 olguyu trizomi 12 olarak değerlendirmişlerdir (62). Durak B. ve ark.nın Türk populasyonunda yaptıkları çalışmada ise, trizomi 12 sıklığı %15.2 olarak bildirmişlerdir (66). Bir diğer çalışmada ise, Haferlach C., Dicker F ve ark. KLL'li hastaların %13.6'sında trizomi 12 tespit etmişlerdir (23). Dicker F. ve ark.nın yaptığı çalışmada ise, trizomi 12 sıklığı %12.8 olarak belirlenmiştir (30). Al Zaabi ve ark. da FISH yöntemi ile KLL'li olgularda trizomi 12 sıklığını %7 olarak saptamışlardır (50). Çalışmamızda elde

ettiğimiz trizomi 12 yüzdesi, birçok çalışmadan yüksek olmasına rağmen literatürde benzer veya daha yüksek oranlara da rastlanmaktadır.

Çalışmamızda konvansiyonel sitogenetik ve iFISH ile trizomi 12 olarak değerlendirilen 13 olgudan 9'u MLPA yöntemi ile trizomi 12 olarak değerlendirilirken, 4 olgu normal değerlendirildi. MLPA ile normal değerlendirilen bu olgular, konvansiyonel sitogenetik ve iFISH ile düşük düzey mozaizim tespit edilen olgulardır. Bu çalışmada MLPA ile %25-30 üzeri mozaik trizomi 12'li olgular yakalanabilirken, daha düşük yüzdeli mozaiklikler MLPA ile saptanamadı. iFISH ile %30 ve altı mozaik trizomi 12 tespit edilen bu 4 olgu, MLPA ile yanlış negatif olarak yorumlandı. Hiçbir olgu MLPA ile yanlış pozitif olarak değerlendirilmedi. Bizim çalışmamızda MLPA tekniğinin trizomi 12'li olguları tespit edebilme aralığı %25-30 olarak belirlendi. %30 ve altındaki mozaizim tespit edilen bu 4 olgunun MLPA sonuçları ayrıntılı incelendiğinde, sınır düzey amplifikasyon doz oranları dikkat çekmektedir. Coll-Mulet ve ark. yaptıkları çalışmada, MLPA ile %25'ten daha düşük mozaizimli olguların yanlış negatif olarak yorumlanacağını bildirmişlerdir (63). Abdool ve ark. ise, bu sınırı %20 olarak bildirmişlerdir (64). Çalışmamızda tespit ettiğimiz bu aralık, bu iki çalışmayla benzerlik göstermektedir.

### **Saptanan Diğer Kromozomal Yeniden Düzenlenmeler**

Konvansiyonel sitogenetik yöntemle çalışmamızda 5 (%15.1) olguda translokasyon tespit edildi. Bu translokasyonların 1'i kompleks karyotip olarak değerlendirilirken, diğer 4 (%12.1) olguda 13. kromozom yeniden düzenlenmeleri tespit edildi. Bu olguların birçoğunda metafaz evresinde FISH tekniği ile translokasyonla uyumlu sinyaller gözlemlendi. Literatürde KLL'li olgularda birçok farklı translokasyon saptanmıştır. Bunların önemli bir kısmı 13. kromozom yeniden düzenlenmeleridir.. Wren ve ark. 24 KLL olgusunun 4 (%16.6)'ü 13. kromozom yeniden düzenlenmeleri olmak üzere, toplam 5 (%20.8) olguda translokasyon tespit etmişlerdir. Çalışmamızda elde ettiğimiz bu sonuç ile Wren ve ark. nın sonuçları benzerlik göstermektedir. Haferlach C., Dicker F ve ark. ise, %3.3 oranında 13. kromozom yeniden düzenlenmeleri tespit etmişlerdir. Özellikle MLPA yöntemi ile kromozomal translokasyonlar saptanamaz. iFISH tekniği ile de translokasyonlara yönelik problemler kullanılmadıkça translokasyon tespiti mümkün olmamaktadır. Çalışmamızda translokasyonlu olguların 2'sinde MLPA ve iFISH sonuçları normal,



diğer 3 olguda ise, 13q14 delesyonu tespit edildi. FISH ile bu olguların 1 tanesinde monoallelık-biallelik 13q14 delesyonu görüldü.

Bu çalışmada FISH ile 1 olguda (%2.4) %7 oranında mozaik 11q22 delesyonu görüldü. Bu olgu konvansiyonel sitogenetik ve MLPA ile normal değerlendirildi. 2 (%4.8) olguda kombine 17p13 delesyonu gözlemlendi. Bu 2 olgu da MLPA ile tespit edilirken, 1'i FISH yöntemi ile tespit edilebildi. Literatürde çeşitli çalışmalarda KLL'li hasta gruplarında 11q22 ve 17p13 delesyonu sırasıyla %5-20, %7-20 olarak bildirilmiştir (66-71).

Çalışmamızda konvansiyonel sitogenetikle tespit edilen trizomi 3'lü 1 (%2.4) olgu, MLPA ve FISH ile normal değerlendirildi. KLL'li olgularda nadiren saptanan trizomi 3, iyi prognoz göstergesidir (4, 49). Haferlach C. ve ark. 506 KLL'li olgudan yaptıkları geniş kapsamlı çalışmada sadece 3 (0.59) olguda trizomi 3 karyotipi bildirmişlerdir. Diğer yöntemler ile Trizomi 3' ün saptanamamasının nedeni bu kromozoma özgü problemlerin kullanılmamasıdır. Konvansiyonel sitogenetik yöntemlerin altın standart olmasının en önemli nedeni bu noktadadır. Çünkü kullandığımız diğer yöntemlerde sadece hastalıkla ilişkilendirilmiş bölgelere yönelik prob dizaynları yapılmaktadır. Ancak şunu çok net biliyoruz ki özellikle hematolojik malignansilerde çok farklı kromozomal yeniden düzenlenmelerle karşılaşabiliriz. Bu nedenle MLPA ve FISH gibi yöntemlerin, KLL veya herhangi bir hematolojik malignanside tek başlarına kullanılması yeterli olmamaktadır.

### **SAPTANAN BULGULARIN YÖNTEMLER AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Bu çalışma, tespit edilen sitogenetik anormallikler açısından değerlendirildiğinde, MLPA ile FISH arasındaki konkordans %74.4 olarak hesaplandı. Bu oran literatür ile karşılaştırıldığında düşük bir oran olarak nitelendirilebilir. Fabris S. ve ark. MLPA ile FISH arasındaki konkordansı %95 gibi yüksek bir oranda tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda bu oranın literatüre oranla düşük saptanmasının nedeni düşük düzey mozaisizimli olgularımızın fazlalığıdır. Literatürde birçok çalışmada görülen cinsiyet kromozom kayıpları çalışmamızda tespit edilmedi.

MLPA, multipleks gen dozaj analizi yapabilen, PCR temelli, tek reaksiyonda 50'ye yakın gen bölgesi inceleyebilen kolay bir yöntemdir. MLPA yönteminin

hassasiyeti konusunda üretici firma tarafından tek nükleotid farklılıklarını bile ayırabilir düzeyde olduğu savunulsa da, probun bağlanma bölgesine göre bu 2-3 baz değişebilmektedir.

41 KLL hastasının SALSA Probmiks P037-A2/P038-A2 kitleri ile çalışıldığı bu proje, teknik ve analiz sürelerinin toplamı günlük 3-4 saat çalışma süresi ile 4-5 günde tamamlandı. MLPA çalışması her döngüde 20 hasta+4 internal kontrol ile yapıldı. FISH yöntemi ile her döngüde 24 prob (6 hasta) çalışıldı. FISH tekniği ve analizi günlük 5-6 saat çalışma süresi ile 14-15 günde tamamlanabildi. MLPA tekniği, FISH tekniğine göre, kolay uygulanabilen, çalışma süresi oldukça kısa süren ve analizi kolay bir tekniktir. Ayrıca MLPA, PCR ve sekans cihazı bulunan laboratuarlarda kolayca uygulanabilecek bir yöntemdir.

Bu çalışma ile 41 KLL hastasında en sık tanımlanmış sitogenetik anomalileri tespit etmek için 4 FISH probu kullanıldı. 41 KLL hastası için, 11q22.3 (ATM), 13q14.3 ve 17p13 (p53) lokus spesifik problemleri ve sentromerik 12 problemlerinin maliyeti yaklaşık 10.300 euro'dur. SALSA Probmiks P037-A2/P038-A2 MLPA kitlerinin 41 KLL hastasındaki maliyeti ise, yaklaşık 2.000 euro'dur. Maliyet açısından MLPA tekniği, FISH tekniğine göre, oldukça düşük maliyetli bir yöntemdir.

Bu proje, ülkemizde, KLL'de MLPA tekniğinin rutindeki tekniklerle karşılaştırıldığı ilk çalışma özelliğini göstermektedir. Elde ettiğimiz MLPA sonuçlarını, ülkemizde benzer çalışma olmaması nedeniyle yurt dışı çalışmalarını ile karşılaştırdık.

## SONUÇLAR

1. KLL'de periferik kan ve kemik iliği kültüründe mitotik stimulan ajanlardan DSP30+IL-2 kombinasyonu kullanımı ile %80.4 oranında kültür başarısı yakalandı.
2. Konvansiyonel sitogenetik ile 12 (36.3) olguda trizomi 12, 4'ü 13. kromozom yeniden düzenlenmeleri olmak üzere 5 (%12.1) olguda translokasyon saptandı.
3. FISH tekniğinin MLPA tekniğine göre, düşük düzey mozaisizmleri tespit edebilme üstünlüğü bu çalışma ile de görüldü. MLPA tekniği ile, trizomi 12'ye spesifik %30 ve altında mozaisizimli 4 olgu, 13q14'e spesifik %26 ve altı gibi düşük mozaisizimli 6 olgu yanlış negatif olarak sonuçlandı. Kanser sitogenetiğinde mozaisizimlerinin önemi büyüktür. Bu durum MLPA için önemli bir dezavantajdır.
4. 17p13 ve 9p21 delesyonlu 2 olgu sadece MLPA tekniği ile tespit edildi. FISH tekniği ile KLL'li olgularda en sık görülen sitogenetik anormallikler değerlendirilirken, MLPA ile nadir görülen sitogenetik anormallikler de değerlendirilebilmektedir. 17p13 delesyonlu bir olgu, bölgeye özgü FISH probu ile çalışılmasına rağmen tespit edilemedi.
5. MLPA ile 13q14 delesyonu tespit edilen olgular bu bölgeye özgü dizayn edilmiş prob bölgeleri açısından incelendiğinde, delesyon görülen vakaların %35.7 sinde bu bölge problemlerinden olan *Rb geni* prob bölgesinde delesyon gözlenmedi. FISH veya konvansiyonel sitogenetik yöntemlerde bu ayırım yapılamamaktadır. Bu durum MLPA tekniğinin FISH'e olan üstünlüğü açısından önemlidir.
6. Monoallel/biallelik delesyon ayırımı FISH ile yapılabilmektedir. Bu çalışma ile 3 olguda kombine monoallel-biallelik 13q14 delesyonu FISH ile tespit edildi. MLPA analizinde ilgili bölgedeki problemlerde çok düşük doz oranı tespit edilse de ayırım yapılamamaktadır.
7. Her 3 yöntem ile elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde %48.7 ile en sık görülen anomali 13q14 delesyonu, %31.7 ile 2. sıklıkta trizomi 12,

%4.8 oranında 17p13 delesyonu, %2.4 oranında 11q22 delesyonu, %2.4 oranında ise, 9p21 delesyonu tespit edildi.

- 8.** Konvansiyonel sitogenetik, FISH ve MLPA yöntemi ile 41 KLL hastasının değerlendirildiği bu çalışmada, 34 (%82.9) hasta anormal olarak değerlendirildi.
- 9.** MLPA yöntemi kolay uygulanabilir, düşük maliyetli, KLL'de sık ve nadir görülen sitogenetik anormallikleri tek reaksiyonla tespit edebilme avantajlarına rağmen, kanser hücrelerindeki düşük düzey mosaisizmleri tespit edebilme sorunu nedeni ile FISH ile komplementer bir seçenek olabilir.
- 10.** Bu çalışma ülkemizde, KLL'de MLPA yönteminin rutin tekniklerle birlikte değerlendirildiği ilk çalışma özelliğini göstermektedir. Literatürde KLL'de sitogenetik-FISH ya da FISH-MLPA karşılaştırması açısından birçok çalışma mevcut iken, konvansiyonel sitogenetik-FISH-MLPA yöntemlerinin birlikte değerlendirildiği çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca ülkemizde KLL'de DSP30+IL-2 kombinasyonun bir mitotik stimulan olarak kültürde kullanıldığı çalışmaya rastlanmamış olup, sonuçlarımız kombine stimulan kullanmamızın kültür başarı oranını arttırdığını açıkça vurgulamaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Cheson B, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O'Brien S, et al. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood*. 1996; 87(12): 4990-4997.
2. Rozman C, Montserrat E. Current concepts: chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 1995; 333(16): 1052-1057.
3. Johnson LE. Chronic lymphocytic leukemia. *Practical Therapeutics* 1988;38(suppl 6):167-76
4. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000 343: 1910-1916.
5. Put N, Konings P, Rack K, Jamar M, Van Roy N, Libouton JM, et al. Improved detection of chromosomal abnormalities in chronic lymphocytic leukemia by conventional cytogenetics using CpG oligonucleotide and interleukin-2 stimulation: A Belgian multicentric study. *Genes, Chromosomes & Cancer* 2009 48:843-853.
6. Fabris S, Scarciolla O, Morabito F, Cifarelli RA, Dininno C, Cutrona G, et al. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification and Fluorescence In Situ Hybridization to Detect Chromosomal Abnormalities in Chronic Lymphocytic Leukemia: A Comparative Study. *G Chromosomes & Cancer* 50:726–734 (2011).
7. Kay NE, O'Brien SM, Pettitt AR, Stilgenbauer S. The role of prognostics factors in assessing “high-risk” subgroups of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2007;21:1885-91.
8. Van Den Neste E, Robin V, Francart J, Hagemeijer A, Stul M, Vandenberghe P, et al. Chromosomal translocations independent lypredict treatment failure, treatment-

free survival and overall survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients treated with cladribine. *Leukemia* 2007;21:1715-22.

9. Sgambati, M.T., Linet, M.S. & Devesa, S.S. (2001) Chronic Lymphocytic Leukemia: Epidemiological, Familial, and Genetic Aspects. In: *Chronic Lymphoid Leukemias* (ed. by B.D. Cheson), pp. 33-62. Marcel Dekker, New York.

10. Call TG, Phylly RL, Noel P, Habermann TM, Beard CM, O'Fallon WM, et al. Incidence of chronic lymphocytic leukemia in Olmsted County, Minnesota, 1935 through 1989, with emphasis on changes in initial stage at diagnosis. *Mayo Clin Proc.* 1994;69(4):323-8.

11. Yuille MR, Matutes E, Marossy A, Hilditch B, Catovsky D, Houlston RS: Familial chronic lymphocytic leukaemia: A survey and review of published studies. *Br J Haematol* 2000; 109:794.

12. Goldgar DE, Easton DF, Cannon-Albright LA, Skolnick MH: Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86:1600.

13. Grever MR, Lucas DM, Dewald GW, Neuberg DS, Reed JC, Kitada S, et al. Comprehensive assessment of genetic and molecular features predicting outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the US Intergroup Phase III Trial E2997. *J Clin Oncol* 2007; 25: 799–804.

14. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. (2008) International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 111: 5446–5456.

15. Montserrat E. Classical and new prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia: where to now? *Hematol J.* 2002; 3: 7-9.
16. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1975; 46(2): 219-234.
17. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer.* 1981; 48(1):198-206
18. Hamblin T. Chronic lymphocytic leukemia: one disease or two. *Ann Hematol.* 2002; 81:299-303.
19. Byrd JC, Stilgenbauer S, Flinn IW. Chronic Lymphocytic Leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2004; 163-83.
20. Montserrat E, Vinolas N, Reverter JC, Rozman C. Natural history of chronic lymphocytic leukemia: on the progression and prognosis of early stages. *Nouv Rev Fr Hematol.* 1988; 30(5-6): 359-361.
21. Dighiero G. CLL biology and prognosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2005; 278-84.
22. Düring J, Nüchel H, Cremer M, Führer A, Halfmeyer K, Fandrey J, et al. ZAP70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2003;17: 2426-2434.
23. Haferlach C, Dicker F, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV(H) status and immunophenotyping. *Leukemia* 2007;21:2442-2451.

24. Chapiro E, Leporrier N, Radford-Weiss I, Bastard C, Mossafa H, Leroux D, et al. Gain of the short arm of chromosome 2 (2p) is a frequent recurring chromosome aberration in untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL) at advanced stages. *Leuk Res* 2010;34:63-68.
25. Novak U, Oppliger Leibundgut E, Hager J, Mühlematter D, Jotterand M, Besse C et al. A high-resolution allelotype of B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood* 2002;100:1787-1794.
26. Schwaenen C, Nessling M, Wessendorf S, Salvi T, Wrobel G, Radlwimmer B, et al. Automated array-based genomic profiling in chronic lymphocytic leukemia: development of a clinical tool and discovery of recurrent genomic alterations. *Proc Natl Acad USA* 2004;101:1039-1044.
27. Nguyen-Khac F, Chapiro E, Lesty C, Grelier A, Luquet I, Radford-Weiss I, et al. Specific chromosomal IG translocations have different prognoses in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Blood Res* 2011;1:13-21.
28. Put N, Van Roosbroeck K, Konings P, Meeus P, Brusselmans C, Rack K, et al. Chronic lymphocytic leukemia and prolymphocytic leukemia with MYC translocations: a subgroup with an aggressive disease course. *Ann Hematol* 2012;91:863-873.
29. Sellmann L, Gesk S, Walter C, Ritgen M, Harder L, Martín-Subero JI, et al. Trisomy 19 is associated with trisomy 12 and mutated IGHV genes in B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2007;138:217-220.
30. Dicker F, Schnittger S, Haferlach T, Kern W, Schoch C. Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in %80 of CLL patients: a study of 132 CLL cases with correlation to FISH, Ig V<sub>H</sub> status, and CD38 expression. *Blood* 2006;108:3152-3160.



31. Decker T, Scheneller F, Kronschnabl M, Dechow T, Lipford GB, Wagner H, et al. Immunostimulatory CpG-oligonucleotides induce functional high affinity IL-2 receptors on B-CLL cells: Costimulation with IL-2 results in a highly immunogenic phenotype. *Experimental Hematology* 2000;28:558-568.
32. Decker T, Scheneller F, Hipp S, Miething C, Jahn T, Duyster J et al. Cell cycle progression of chronic lymphocytic leukemia cells is controlled by cyclin D2, cyclin D3, cyclin-dependent kinase (cdk) 4 and the cdk inhibitor p27. *Leukemia* (2002) 16, 327-334.
33. Naylor M, Capra D. Mutational status of IgVh genes provides clinically valuable information on B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*.1999; 94: 1937-1939.
34. Hamblin TJ, Davis Z, Garnier A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated IgV(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94: 1840-1847.
35. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, et al. Zap-70 expression as a surrogate for Immunoglobulin-Variable-Region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Eng J Med*. 2003; 348(18): 1764-1775.
36. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrickson SE et al. Zap-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated Immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*. 2003; 101(12): 4944-4951.
37. Deaglio S, Aydin S, Vaisitti T, Bergui L, Malavasi F. CD38 at the junction between prognostic marker and therapeutic target. *Trends MolMed* 2008; 14 (5): 210-18.
38. Hayat A, O'Brien D, O'Rourke P, McGuckin S, Fitzgerald T, Conneally E, et al. CD38 expression level and pattern of expression remains a reliable and robust

marker of progressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *LeukLymphoma* 2006; 47 (11): 2371-2379.

39. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, et al: Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94:1840.

40. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, et al: CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood* 2002; 99:1023.

41. Hillmen PSA, Robak T, Jaksic B, Sirard C, Mayer J: Alemtuzumab (CAMPATH®, MABCAMPATH®) has superior progression free survival (PFS) vs chlorambucil as front-line therapy for patients with progressive B-cell chronic lymphocytic leukemia (BCLL). *Blood* 2006; 108:301.

42. Shanafelt TD, Geyer SM, Kay NE. Prognosis at diagnosis: integrating molecular biologicinsights into clinical practice for patient with CLL. *Blood* ; 103 (4), 1202-1210, 2004

43. Rozman C, Hernandez-Nieto L, Montserrat E, Bruges R. Prognostic significance of bonemarrowpatterns in chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol*; 47(4); 529-537, 1981

44. Rozman C, Montserrat E, Rodriguez-Fernandez JM, Ayats R, Vallespi T, Parody R, et al. Bone Marrow Histologic Pattern- The Best Single Prognostic Parameter in Chronic Lymphocytic Leukemia: A MultivariateSurvival Analysis of 329 Cases. *Blood*; 64 (3):642-648, 1984.

45. Ghia P, Ferreri AM, Galigaris-Cappio F. Chronic Lymphocytic Leukemia. *Crit Rev OncolHematol*, 2007.

46. Montillo M, Hamblin T, Hallek M, Montserrat E, Morra E. Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. *Haematologica*; 90 (3); 391-399, 2005.
47. Rambotti P, Davis S. Lactic Dehydrogenase in Normal and Leukemia Lymphocyte Subpopulations: Evidence for the Presence of Abnormal T Cells and B cells in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*; 57 (2), 324-327, 1981.
48. Sarfati M, Chevret S, Chastang C, Biron G, Stryckmans P, Delespesse G, et al. Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*; 88 (11): 4259-4264, 1996.
49. Finn WG, Kay NE, Kroft SH, Church S, Peterson LC. Secondary abnormalities of chromosome 6q in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a sequential study of karyotypic instability in 51 patients. *Am J Hematol*; 59 (3): 223-9, 1998.
50. Al Zaabi EA, Fernandez LA, Sadek IA, Riddell DC, Greer WL. Multiplex ligation-dependent probe amplification versus multiprobe fluorescence in situ hybridization to detect genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia: A tertiary center experience. *Journal of Molecular Diagnostics*; 12:197-303, 2010.
51. Mehes G. Chromosome Abnormalities with Prognostic Impact in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Pathol Oncol Res*; 11 (4):205-210, 2005.
52. Seiler T, Dohner H, Stilgenbauer S. 2006. Risk stratification in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 33:186–194.
53. Stankovic T, Hubank M, Cronin D, Stewart GS, Fletcher D, Bignell CR, et al. Microarray analysis reveals that TP53-and ATM-mutant B-CLLs share a defect in activating proapoptotic responses after DNA damage but are distinguished by major differences in activating prosurvival responses. *Blood*; 103 (1): 291-300, 2004.

54. Kröber A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Bruckle E, Lichter P, et al. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*; 100 (4); 1410-1416, 2002.
55. Ripolles L, Ortega M, Ortuno F, Gonzalez A, Losada J, Ojanguren J, et al. Genetic abnormalities and clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*; 171 (1): 57-64. 2006.
56. Glassman A, Hayes KJ. The value of fluorescence in situ hybridization in the diagnosis and prognosis of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*; 158 (1), 88-91, 2005.
57. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 57.
58. Kozłowski P, Jasinska AJ, Kwiatkowski DJ. New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. *Electrophoresis* 2008; 29: 4627-4636.
59. <http://www.mlpa.com> Erişim Tarihi: 3 Mart 2013
60. Hematology Basic Principles And Practice. Ronald Hoffman, Edward J. Benz, Jr., Sanford J. Shattil, Bruce Furie, Leslie E. Silberstein, Philip McGlave, Helen Heslop. 5. Edition. Chapter:83-1334.
61. Wren C., Moriarty H., Marsden K. ve Tegg E. Cytogenetic investigations of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 198:155-161, 2010.

62. LAI Yue-yun and HUANG Xiao-jun. Cytogenetic characteristics of B cell chronic lymphocytic leukemia in 275 Chinese patients by fluorescence *in situ* hybridization: a multicenter study. Chinese Medical Journal 124(16):2417-2422;2011.
63. Coll-Mulet L, Santidrian AF, Cosialls AM, Iglesias-Serret D, de Frias M, Grau J, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification for detection of genomic alterations in chronic lymphocytic leukaemia. Br J Haematol 2008;142: 793-801.
64. Abdool A, Donahue AC, Wohlgenuth JG, Yeh CH. Detection, analysis and clinical validation of chromosomal aberrations by multiplex ligation-dependent probe amplification in chronic leukemia. PLoS One 2010;5:e15407.
65. Stevens-Kroef M, Simons A, Gorissen H, Feuth T, Weghuis DO, Buijs A, et al. Identification of chromosomal abnormalities relevant to prognosis in chronic lymphocytic leukemia using multiplex ligation-dependent probe amplification. Cancer Genetics and Cytogenetics 195 (2009) 97-104.
66. Durak B, Akay OM, Aslan V, Ozdemir M, Sahin F, Artan S, et al. Prognostic impact of chromosome alterations detected by FISH in Turkish patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. Cancer Genetics and Cytogenetics (188) 65-69;2009.
67. Mayr C, Speicher MR, Kofler DM, Buhmann R, Strehl J, Busch R, et al. Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. Blood (107): 742-751;2006.
68. Dewald GW, Brockman SR, Paternoster SF, Bone ND, O'Fallon JR, Allmer C, et al. Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence *in situ* hybridization: correlation with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukaemia. Br J Haematol (121):287-295;2003.

69. Nelson BP, Gupta R, Dewald GW, Paternoster SF, Rosen ST, Peterson LC. Chronic lymphocytic leukemia FISH panel: impact on diagnosis. *Am J Clin Pathol*(128): 323-332;2007.
70. Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, Glide S, Davis ZA, Ibbotson RE, et al. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood* 2002; 100: 1177-1184.
71. Nowakowski GS, Dewald GW, Hoyer JD, Paternoster SF, Stockero KJ, Fink SR, et al. Interphase fluorescence *in situ* hybridization with an IGH probe is important in the evaluation of patients with a clinical diagnosis of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 130: 36-42; 2005.
72. Hernando E, Nahle Z, Juan G, az-Rodriguez E, Alaminos M, Hemann M, et al. Rb inactivation promotes genomic instability by uncoupling cell cycle progression from mitotic control. *Nature* 430:797–802;2004.