

Hematolojik Hastalıklarda Sitogenetik

Dr. Şefik GÜRAN

Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Biyoloji Bilim Dalı, Ankara

Sitogenetik yöntemler genetik hastalıkların prenatal ve postnatal tanısı, kanser rutin çalışmalarında ve temel tıp araştırmalarında sık kullanılan önemli bir tanı yöntemidir. Geliştirilen yeni sitogenetik analiz yöntemlerinin hematolojik malignitelerde kullanımı bu hastalıkların etyopatolojisinin anlaşılmasında çok önemli bulgular vermiştir.

İlk kez 1890 yılında Alman patolog David von Hansmann kanser biyopsi materyallerinde nükleer ve mitotik yapı düzensizlikleri tanımlamış ve bu bulgunun kanser gelişiminde önemli olduğunu belirtmiştir. Theodor Boveri yaklaşık 25 yıl sonra kansere kromozomal anomalilerin neden olabileceğini belirtmiştir. Kanserde ilk kromozomal anomali 1960' lı yıllarda Nowell ve Hungerford tarafından kronik myeloid lösemi olgularında tanımlanmış ve tanımlanan kromozoma Philadelphia (Ph) kromozomu adı verilmiştir (1). İlerleyen yıllarda gelişen bantlama ve farklı sitogenetik analiz yöntemleri ile kanser genetiğine ait bilgilerimiz artmış, birçok türe özgün sitogenetik anomaliler tanımlanmış ve altta yatan moleküler mekanizmalar ortaya konmuştur (2).

Kromozom İnceleme Yöntemleri

- **Floresans bantlama yöntemi:** Çoğunlukla "Quinacrine" kullanılır. Özellikle 1, 9, 16 numaralı kromozomların sentromerik ve akrosentrik bölgeleri ve Y kromozomunun polimorfik varyasyonları gözlenir
- **Giemza bantlama:** En sık kullanılan yöntemdir. Kromozomların elde edilen bant özelliklerine göre kromozomların hem fonksiyonel hem de yapısal kompozisyonu yansıtılmaktadır.

- **Konstitütif heterokromatin bantlama:** C bantlama da denir. Çünkü satellit DNA' sı in situ hibridizasyon ile koyu boyanan C -bant bölgelerini göstermektedir.
- **Reverse bantlama:** G bantlama ile koyu boyanan bölgeler açık, açık boyanan bölgeler koyu boyanır.
- **NOR(Nucleator organizer region) boyama:** Gümüş ile özel boyama yöntemidir. Gümüş boyama ile akrosentrik kromozomların kısa kolları ortaya konur (3).
- **In situ hibridizasyon-FISH:** Bu yöntem denatüre haldeki kromozomlara floresan ile işaretlenmiş problemlerin bağlanmasına bağlı bir yöntemdir. Bu teknik ile birçok gen veya kromozom bölgesi ile ilgili bilgi elde edilebilmektedir (4).
- **"Flow cytometri":** İnsan kromozomlarını, kromozomların farklı rezolüsyon özelliklerinden yararlanılarak diğer yöntemler ile kıyaslanmayacak doğrulukta ayırıp analiz edebilen bir yöntemdir.
- **CGH-"Comperative genomic hybridisation":** Farklı floresan boya ile boyanmış hasta ve normal DNA örneklerinin normal kromozomlara bağlanması ile elde edilen floresan renk farklılıklarını gösteren bir yöntemdir. Yöntem ile hasta DNA' sında kromozomal kayıp (loss) veya belli bir bölgenin amplifikasyonu (gain) gösterilir. Özellikle kanser kromozomlarının incelenmesinde kullanılmaktadır (4).
- **SKY-"Spectral caryotyping":** Farklı floresan boyalar ile her kromozomun ayrı renge boyandığı bir yöntemdir. Kompleks yapıdaki

kromozomal anomalilerde yeniden yapılanmanın (rearrangement) kromozomun hangi parçalarından oluştuğunun bulunmasında kullanılır. Kanserde kompleks yapıdaki kromozomal anomalilerini bulmada önemlidir. Ancak kromozomun hangi bandında kırık olduğunu göstermez. Kırık bölgeleri eşzamanlı yapılan G bantlama yöntemi ile bulunur (5).

Bu teknikler ile; kromozomal polimorfizm (özellikle kromozom 1, 9, 16 ve Y de), frajil bölgeler, kromozomal kayıplar-“loss” (delesyonlar ve monozomiler), kromozomal kazançlar-“gain” (duplikasyon ve trizomiler), kromozomal “rearrangement”-yeniden yapılanma (inversiyon, insersiyon ve translokasyonlar- yer değiştirme) bulunur (1).

Lösemiler kan hücrelerinin aşırı çoğalması ve neoplastik değişim ile karakterize bir hastalık tablosudur. Sitogenetik analizler olgularda kromozom yapılanmasını gösterir. Etkilenen kromozomal yapılar ortaya konur, olguların tanı, tedavi, prognoz takipleri ile ilgili önemli bulgulara ulaşılır (2).

Lösemide tanımlanan sitogenetik anomaliler çok fazladır. Sadece tek bir tipe veya subtipi özgün sitogenetik anomali bulunmamaktadır. Bu nedenle ayırıcı tanıda sitogenetik anomalinin diğer klinik ve laboratuvar sonuçları ile birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir. Ancak bazı anomaliler belli bir hastalık grubunda veya subgrupta fazla gözleendiği için ayırıcı tanıda önemlidir [t(9; 22) kronik melositer lösemi, t (15; 17) Akut Myeloblastik Lösemi-M3 subtipinde fazla gözlenir]. Her olguda rutin sitogenetik analiz yapılmalı, elde edilen bulgulara göre moleküler analizler sürdürülmelidir (1).

Hematolojik Malignitelerde Sitogenetik Analiz Sonuçları

- **Kronik myeloid lösemili (KML):** Olgularda olayı tetikleyen mekanizma bcr-abl gen yeniden yapılanmasıdır. Bu da sitogenetik olarak Ph kromozomu olarak gözlenir. KML olgularında %90-%95 oranında Ph kromozomu pozitif olarak gösterilmektedir [t(9; 22)(q34; q11)]. Ph kromozomu gösterilmeyen KML düşünülen olgularda ek moleküler yöntemler ile (FISH, southern blot ve RT PCR) bcr-abl yeniden yapılanması saptanabilir. Bu bulgunun normal sitogenetik analizle bulunması genellikle küçük bir bölgenin yer değiştirmesi (translokasyonu) yönünden değerlendirilebilir (1, 6, 7). Hastalık takibin-

de Ph kromozomunun varlığı tedavi takibinde önemlidir. Olgularda takip evresinde trizomi 8, monozomi 7, i(17q), 3. kromozoma ait yapısal anomaliler, trizomi 19 sık gözlenir (1, 8). Olgu takibinde saptanan sekonder kromozomal anomaliler blastik faza dönüşümün habercisi olarak yorumlanabilir. t (9; 22) akut lenfoblastik lösemi olgularında da (özellikle ALL-L1 formunda) gözlenir ve kötü prognoz belirteci olarak yorumlanır (1). Çok nadir de olsa klinikte KML benzeri tablo gösterdiği halde Ph kromozomu gösterilemeyen olgular vardır (**CML-like syndrome**). Bu olgularda farklı kromozomları ilgilendiren sitogenetik anomaliler tanımlanmaktadır. Hastalıkların oluş mekanizması ile ilgili bilgilerimiz çok azdır. Elde edilen farklı sitogenetik anomalilerin hastalığın prognozu ile ilgisi bilinmemektedir. Trizomi 18, trizomi 21, 5q33 ve 8p11 de kromozomal kırıklar en sık tanımlanan sitogenetik anomalilerdir. Olgularda klinik normal KML olgularına göre daha kötüdür (1, 9).

- **Akut myeloid lösemi (AML):** Akut myeloid lösemi kemik iliği ve kanda olgunlaşmamış nonlenfositik hücrelerin birikimi ve lösemik transformasyonu ile karakterize bir hastalık tablosudur. Olguların %70-80' inde sitogenetik anomaliler tanımlanmaktadır. AML de en sık t(1; 3)(p36; q21), t(1; 7)(q10; p10), t(1; 11)(q21, q23), inv(3)(q21 q26), t(3; 5)(q21-25; q31-35), trizomi 4, -5/del (5q), t(6; 9)(p23; q24), -7/del(7q), trizomi 8, t(8; 16)(p11; p13), t(8; 21)(q22; q22), trizomi 9, del(9q), t(9; 22)(Q34; q11), trizomi 11, t/del(12p), trizomi 13, t(15; 17)(q22; q11-21), inv(16)(p13 q22), i(17)(q10), del (20q), trizomi 21, trizomi 22, -Y kromozomal anomalileri gözlenir. Bu anomaliler içinde t (8; 21) (q22; q22) AML-M2 de, t(15; 17)(q22; q11-21) AML-M3 de, inv (16) (p13q22) AML-M4 eozinofilik tipte, t(9; 11)(p21; q23) AML M5' te sık gözlenir. Trizomi 8 ve monozomi 7 en sık gözlenen kromozomal sayı anomalileridir. Olguların takip evrelerinde kromozom 5, 7, 8, 9, 21, 22, X ve Y' ye ait anomaliler tanımlanmaktadır. Kemoterapi sonrası veya çevresel bir mutasyon yapıcı madde varlığında monozomi 7, del 5(q), der (3q), der (11q), der (12p), del (7q) ve t(1; 7) sık gözlenir. Kromozom 5 ve 7' ye ait anomalileri özellikle MDS' den geçişli bir AML olgusu olarak yorumlanabilir. Her

iki kromozoma ait sayı ve yapı anomalileri AML olgularında kötü prognosis belirteçidir (1, 10).

- **Miyelodisplastik sendrom (MDS):** Miyelodisplastik sendrom kemik iliğinin disfonksiyonuna bağlı yapılan hücre sayısının azlığı veya hatalı yapımı ile karakterize bir hastalıktır. Olguların yaklaşık üçte biri AML tablosuna döndüğü için bu olguların takibinde sitogenetik analiz en önemli prognostik parametrelerden biridir. MDS olgularında gözlenen sitogenetik anomalilerin hemen tümü AML' de tanımlanan anomalilerdir. Sadece AML veya MDS' ye özgün sitogenetik anomali yoktur. MDS olgularında sıklıkla del 5(q), monozomi 7, trizomi 8, del 8, 20q-, -Y ve del (7q) anomalileri gözlenir. Bu nedenle kromozom 5 ve 7 ye ait anomaliler AML olgularında MDS' den geçişli AML olarak yorumlanabilir. Olguların subtipine özgün sitogenetik anomali bulunmamaktadır. En sık t(1; 3)(p36; q21), t(1; 7)(q10; p10), inv (3) (q21 q26), monozomi 5, del (5q), trizomi 6, t(6; 9)(p23; q24), monozomi 7, del (7q), trizomi 8, rizomi 9, t(9; 22), trizomi 11, inv (16) (p13q22), i(17q), trizomi 19, del (20q) sitogenetik anomalileri tanımlanmaktadır (11, 12).

MDS olgularının içinde farklı bir klinik tablo gösterdiği için **5q- sendromu** farklı olarak ele alınabilir. Bu tabloda genellikle 5q- sitogenetik anomalisi saptanan tek sitogenetik anomalidir. Genellikle refrakter anemi tanımlanmış yaşlı bayan olgularda gözlenir. Olgular tedaviye dirençlidir (1).

Sekonder MDS de kromozom anomalileri *de novo* MDS olgularından daha siktir. Monozomi 7, del (5q), monozomi 5, der (21q), 7q-, trizomi 8, der (12p), t(1; 7), monozomi 12, der (17p), der (3p) der (6p) gözlenir. Monozomi 7 ve kompleks karyotip anomalileri kötü prognosis belirteci olarak yorumlanmalı, olgularda akut lösemi gelişebileceği göz ardı edilmemelidir (1).

- **Kronik myeloproliferatif hastalıklar:** KML haricinde bu grup içinde polistemi vera, idiopatik myelofibrozis, esansiyel trombositemi bulunur. Olgularda az da olsa maligniteye geçiş söz konusu olduğu için prognosis takibinde rutin sitogenetik araştırma en önemli prognostik kriterlerden birisidir. Sadece bu olgulara özgün sitogenetik anomali yoktur. Kromozom 1, 5q-, -7, +8, +9, t(9; 22) (q34;

q11), 13q-, i(17q) ve 20q- siktir. t(6; 9), t(8; 21), t(15; 17) ve inv (16) sitogenetik anomalileri nadir olarak gözlenir. AML' de gözlenen bu anomaliler AML' ye geçişin belirteci olabilir. Kronik myeloproliferatif hastalıklarda kromozomal anomalilerin bulunması kötü prognosis belirteci olarak yorumlanmalıdır (1).

- **Akut lenfoblastik lösemi (ALL):** ALL kanda ve kemik iliğinde olgunlaşmamış lenfoid seri hücrelerinin birikimi ve lösemik transformasyonu ile karakterize hastalık tablosudur. Olguların en az %70' inde farklı kromozomları içeren klonal anomali tanımlanmaktadır. En sık tanımlanan sitogenetik anomaliler t(1; 7)(p32-34; q34), t(1; 11)(p32; q23), t(1; 19)(q23; p13), dup (1), t(2; 8)(p12; q24), t(4; 11)(q21; q23), del (6q), i(6p), i(7q), t(7; 9)(q34; q32), trizomi 8, t(8; 14)(q24; q11), t(8, 22)(q24; q11), del(9q), t(9; 22)(q34; q11), t(11; 19)(q23; p13), t(12; 17)(p13; q21), i(17q), t(17; 19)(q22; p13), monozomi 20, trizomi 21 dir. t (1; 19)(q23; p13) pre B ALL' de, t(4; 11) (q21; q23) erken dönem B hücreleri ile karakterize ALL de del 6q ve del 12 p tüm ALL tiplerinde, t(9; 22) (q34; q11) olgunlaşmamış B hücrelerinden köken alan ALL olgularında sık gözlenir (1, 13).

T hücrelerinden köken alan ALL' ler için 9. kromozomun kısa kolunu ilgilendiren yapısal değişiklikler T hücre reseptör alfa, beta, ve gama zincirlerini etkileyen kromozomal anomaliler t(1, 14)(p32-34; q11), t(7; 9)(q34-36; q34), t(7; 19)(p34; p13) sık gözlenir. Elde edilen kromozomal anomalilere göre prognosis değişmektedir (1, 14).

- **Kronik lenfoproliferatif hastalıklar:** Bu grup içinde B hücresinden köken alan kronik lenfositik lösemi (KLL), promiyelositik lösemi, "Hairy cell leukemia", Waldenström's makroglobülinemisi, multipl myeloma (MM), plazma hücreli lösemi yer alır. T hücresinden köken alan olguların içinde KLL, promiyelositik lösemi, erişkin T hücre lösemi/lenfoması, "Cutaneous" T hücre lenfoması, "mucozis fungoides" ve Sezary sendrom yer alır. Olgular nispeten olgun hücrelerin lösemik formasyonu ile karakterizedir. Olgularda diğer lenfoid malignitelere göre daha az kromozomal anomali tanımlanmaktadır. Olgular B hücresinden ve T hücresinden köken almasına göre farklı sitogenetik anomaliler gösterirler. Genellikle B hücresi ile ilgili neoplazmlar Ig

loküslerini etkilemektedir. Özellikle 14q32 de yer alan ağır zincir loküsü olaya katılmaktadır. T hücresinden köken alan kanserler T hücre reseptörlerini özellikle 14q11 de yer alan alfa bölgelerini etkilemektedir. Trizomi 12 ve del(13q) B hücresinden köken alan KLL' de, del 6q "hairy cell leukemia" ve erişkin T hücre lösemi/lenfomasında, 2. kromozomun kısa koluna ait yeniden yapılanmalar Sezary sendromunda sık gözlenir. t(1; 20) MM' da sık gözlenen bir sitogenetik anomalidir. Bu bulguların klinik önemleri ile ilgili halen yoğun çalışmalar vardır. Genellikle MM ve B-CLL' de gözlenen kromozomal anomaliler kötü prognoz kriteri olarak yorumlanmaktadır (1, 15).

Sonuç olarak; lösemi düşünülen her olguda veya lösemiye dönüşme şansızlığı bulunan olgularda ilk tanı, tedavi takibi ve prognoz belirlenmesinde rutin sitogenetik analiz mutlaka yapılmalıdır. Karmaşık yapıdaki kromozomal anomalilerin belirlenmesinde diğer bantlama yöntemleri veya ileri sitogenetik ve moleküler analiz yöntemleri uygulanmalıdır. Gözlenen kromozomal yerdeğiş-tirmelerde kromozom kırık bölgesindeki gende bir genetik anomalinin bulunduğu veya gözlenen bir delesyonda bu bölgede yer alan genetik yapının kaybolabileceği hatırlanmalı, etkilenmesi muhtemel genlere yönelik moleküler çalışmalar planlanmalıdır. Elde edilen bulgular olguların tedavi takibinde ve prognoz belirlenmesinde en önemli belirteçlerden birdir (16).

Kaynaklar

1. Heim S, Mitelman F: Cancer cytogenetics. 2nd Ed. Willey Liss. Inc. New York 1995.
2. Rowley DJ, Mitelman F: Principles of molecular cell biology of cancer: Chromosome abnormalities in human cancer and leukemia. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA (Eds) Cancer Principles and practice of oncology. 4th Ed. JB Lippincott Co. Philadelphia, 1993, pp67-91
3. Başaran N; Tıbbi Genetik Ders Kitabı. Güneş ve Nobel Tıp Kitabevi. 1999.
4. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: Molecular biology of the cell. 4th Ed. New York. Garland Publishing 2002.
5. Anthony JFG, William MG, Jeffrey HM, Richard CL: Modern genetic analysis. New York. WH Freeman and Co. 1999.
6. Silver RT. Chronic myeloid leukemia. Hematol Oncol Clin North Am. 2003 Oct;17(5):1159-73,
7. Güran Ş, Bahçe M, Beyan C, Korkmaz K, Yalçın A: During the progression of chronic myeloid leukemia p53, p15^{INK4B}, p16^{INK4B} and p57^{KIP2} mutations. Haematologia 29 (3), 181-193, 1988.
8. Tunca Y, Güran Ş: Trisomy 8 finding treatment of imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia cases. Experimental Hematology (in press)
9. McDonald D, Aguiar RC, Mason PJ, Goldman JM, Cross NC. (1995) A new myeloproliferative disorder associated with chromosomal translocations involving 8p11: a review. Leukemia 9(10), 1628-30.
10. Mrozek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. Blood Rev. 2004 Jun;18(2): 115-36.
11. Maciejewski JP, Salleri C. Evolution of clonal cytogenetic abnormalities in aplastic anemia. Leuk Lymphoma. 2004 Mar;45(3):433-40.
12. Komrokji R, Bennett JM. The myelodysplastic syndromes: classification and prognosis. Curr Hematol Rep. 2003 May;2(3):179-85.
13. Thomas X, Le QH. Prognostic factors in adult acute lymphoblastic leukemia. Hematology. 2003 Aug;8(4):233-42.
14. Douet-Guilbert N, Morel F, Le Bris MJ, Herry A, Le Calvez G, Marion V, Abgrall JF, Berthou C, De Braekeleer M. Cytogenetic studies in T-cell acute lymphoblastic leukemia (1981-2002). Leuk Lymphoma. 2004 Feb;45(2):287-90.
15. Adeyinka A, Dewald GW. Cytogenetics of chronic myeloproliferative disorders and related myelodysplastic syndromes. Hematol Oncol Clin North Am. 2003 Oct;17(5):1129-49.
16. Kyfe DW, Raphael EP, Weichselbaum RR, Bast RC, Gansier TS, Holland JF, Freii E: Cancer Medicine. 6th Ed. BC Deckler Inc. 2003.