

# ŞANLIURFA BÖLGESİNDEKİ AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİLİ ÇOCUK HASTALARIN SİTOGENETİK ANALİZ SONUÇLARI

## CYTOGENETIC STUDIES IN CHILDREN WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA AT SANLIURFA PROVINCE

Ali AYÇİÇEK, Ahmet KOÇ

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD, Çocuk Hematoloji BD, ŞANLIURFA

### ÖZET

**Amaç:** Lösemik hücrelerin sitogenetik özelliklerinin akut lenfoblastik lösemi (ALL) tanı, sınıflama ve prognozunda büyük önemi vardır. Bu çalışmada Şanlıurfa bölgesindeki ALL'li çocuk hastaların sitogenetik sonuçlarını araştırdık.

**Materyal Metod:** Şanlıurfa Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji kliniğinde Ekim 2010-Şubat 2012 tarihleri arasında yeni tanı alan ortalama 5.7 yaşında (aralık: 1.5-15.8 yıl) 27 ALL'li çocuk (17 erkek, 10 kız) hasta çalışmaya alındı. Kemik iliği örnekleri havayolu ile İstanbul'daki sitogenetik laboratuvarına ulaştırıldı.

Karyotip analizi uyarılmamış kemik iliği kültürü ile GTL/<400-bantlama seviyesi; translokasyon çalışmalarında ise t(12;21) RT-PCR, t(12;21) FISH, t(9;22) RT-PCR, t(9;22) FISH, t(1;19) FISH, t(4;11) FISH, t(9;11) FISH, t(11;19) FISH çalışıldı.

**Sonuçlar:** 27 hastanın karyotip çalışması neticesinde 3 (%14.3) vakada kompleks karyotip anomalisi, 1 (%11.1) vakada hiperdiploidi, 2 (%7.4) vakada yüksek hiperdiploidi, 1 (%3.7) vakada hipodiploidi, 14 (%51.8) vakada normal karyotip, 3 vakada 'metafaza rastlanmadı', 3 vakada ise 'örnek yetersizliği nedeniyle çalışma yapılamadı' şeklinde sonuçlar elde edildi. Moleküler sitogenetik çalışmalarda RT-PCR ile yapılan 61 testten 5'inde (%8,2) pozitiflik, 124 FISH çalışmasının ise 2'sinde (%1.6) pozitiflik saptandı. Pozitif RT-PCR testlerinden birinde t(12;21), ikisinde t(9;22), ikisinde ise t(1;19) saptandı. FISH pozitif olan vakalar ise t(12;21) olarak saptandı. t(9;22) FISH, t(4;11) FISH, t(9;11) FISH, t(11;19), t(1;19) FISH translokasyonları hiçbir vakada saptanmadı. 11 FISH çalışması incelemeye uygun hücre bulunamadığından analiz sonuçlandırılmadı, 16 moleküler test ise istem yapılmadığı için çalışılmadı.

**Sonuç:** Kemik iliği örneklerinin sitogenetik incelemelerinde en önemli problem çalışmalarda inceleme için uygun metafaz veya hücreye rastlanamaması ya da örnek yetersizliği olarak bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Karyotip, sitogenetik, akut lenfoblastik lösemi, çocuk

### Yazışma Adresi:

Doç. Dr. Ali AYÇİÇEK  
Harran Üniversitesi Çocuk Sağlığı  
ve Hastalıkları ABD,  
Çocuk Hematoloji BD,  
ŞANLIURFA  
e-posta: ayciceka@hotmail.com

## ABSTRACT

**Objective:** The analysis of cytogenetic features of the leukaemic cells has great importance for the diagnosis, classification, and prognosis of acute lymphoblastic leukemia (ALL). In this study, the results of cytogenetic studies for childhood ALL was investigated at Sanliurfa province.

**Materials and Methods:** Twenty-seven (17 male, 10 female) children with the mean age of 5.7 years (range 1.5-15.8 years) diagnosed as ALL at Harran University Medical Faculty Pediatric Hematology Clinic between September 2010 and February 2012 were included in this study. Bone marrow samples were transported by airway to cytogenetic laboratory in İstanbul. Karyotype analysis of non-stimulated bone marrow was performed at GTL/<400-band level and t(12;21) and t(9;22) were studied by RT-PCR; t(12;21), t(9;22), t(1;19), t(4;11), t(9;11), and t(11;19) were studied by FISH in bone marrow samples.

**Results:** Of these karyotype analysis of 27 patients, 3 (11.1%) had complex karyotype anomalies, 1 (3.7%) had hyperdiploidy, 2 (7.5%) had high hyperdiploidy, 1 (3.7%) had hypodiploidy, 14 (51.8%) had normal karyotype, 3 (11.1%) had no metaphase, and 3 (11.1%) samples were not studied because of insufficient samples. Molecular analysis of translocations revealed that 5 (8.2%) of 61 samples studied by RT-PCR and 2 (1.6%) of 124 samples studied by FISH were positive. Among 5 RT-PCR positive cases, 1 was positive for t(12;21); 2, positive for t(9;22); and 2, positive for t(1;19). Two FISH positive cases showed t(12;21). The other translocations including t(9;22), t(4;11), t(9;11), t(11;19), and t(1;19) studied by FISH were all negative. Eleven samples were inconvenient for FISH study and 16 samples were not studied for other reasons.

**Conclusion:** In conclusion, the major challenge in this study is the lack of sufficient metaphase or cells on bone marrow samples and/or insufficient samples.

**Keywords:** Karyotype, cytogenetics, acute lymphoblastic leukemia, childhood.

## GİRİŞ-AMAÇ

Lösemi vakalarının tanı, tedavisi ve prognozunun belirlenmesinde sitogenetik çalışmalar büyük önem arz etmektedir (1-3). Geniş bir yelpazeyi içeren sitogenetik analizleri kendi merkezlerinde yapabilen klinikler için sürdürülebilir bir hizmet üretememeleri önemli bir sorun teşkil ederken, kendi merkezinde bu tetkikleri yapamayan klinikler için hastanın veya örneklerin dış merkezlere gönderilip istenen tetkik sonuçlarının zamanında, eksiksiz ve güvenilir bir şekilde elde edilmesinde önemli sınırlar yaşanabilmektedir.

## GEREÇ ve YÖNTEMLER

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Kliniğinde yeni tanı alan 27 akut lenfoblastik lösemi

(ALL), (%63 erkek, %37 kız; ortalama 5.3±4.3 yaşında (1.5 ay-15.8 yaş) ilk tanıda sabah erken saatlerde yapılan kemik iliği aspirasyonu örneğinden 1 cc heparinize tüp karyotip analizi için, 1 cc heparinize tüp FISH analizleri için ve 1 cc EDTA'lı tüp RT-PCR tetkikleri için toplam 3 adet örnek dış laboratuvar iletişim birimine iletildi. Bu örnekler ilgili birim tarafından aksam saatlerinde uçak kargo ile herhangi bir soğuk zincir koşulu sağlanmadan İstanbul'daki sitogenetik laboratuvarına ulaştırıldı.

Karyotip çalışmalarında kısa süreli (24 saat), PHA – uyarılmamış hücre kültürü yapılarak metafazlar elde edildi. GTL/<400 bantlama düzeyi ile klonal, sayısal ve belirgin yapısal bozukluklar araştırıldı.

Translokasyon analizlerinde akut lenfoblastik lösemi (ALL) vakaları için St Jude Total XV risk sınıflamasında

esas olan FISH ve RT-PCR t(12;21) FISH, t(12;21) PCR, t(9;22) FISH, t(9;22) PCR, t(4;11) FISH, t(9;11) FISH, t(11;19) FISH, t(1;19) FISH çalışmaları yapıldı (2).

## BULGULAR

Karyotip çalışmalarında, 27 hastanın 9'unda (%33) 20 adet metafaz, 5'inde (%18.5) 10-19 metafaz, 3'ünde (%11.1) 6-10 metafaz, 4'ünde (%14.8) 1-5 metafaz incelendi, 3 örnekte (%11.1) metafaza rastlanmadı, 3 örnekte (%11.1) ise numune yetersizliği nedeniyle karyotip tayini yapılamadı. Yirmiyedi hastanın karyotip çalışması neticesinde 3 (%14.3) kompleks karyotip anomalisi, 1 (%11.1) hiperdiploidi, 2 (%7.4) yüksek hiperdiploidi, 1 (%3.7) hipodiploidi, 14 (%51.8) normal karyotip, 3 vakada 'metafaza rastlanmadı', 3 vakada ise 'örnek yetersizliği nedeniyle çalışma yapılamadı' şeklinde sonuçlar elde edildi. Vakaların 3'ünde (%11.1) FISH analizinde değerlendirmeye uygun sayı ve kalitede hücreye rastlanmadığı için sonuç elde edilememiştir. 24 ALL vakasından 2'sinde (%8.1) t(12;21) FISH pozitifliği saptanmıştır. Bu hastaların her ikisinde 200 hücre incelenmiş, birinde %5 hücrede, diğer hastada ise %78 hücrede t(12;21) pozitifliği belirlenmiştir. %78 hücrede pozitiflik olan hastada PCR ile bakılan t(12;21) de TEL-AML1 gen oranı 41.169811 bulunmuştur. Diğer hastada RT-PCR ile inceleme istenmediği için çalışma yapılmamıştır.

Bir hastada t(9;22) PCR BCR/ABL gen oranı 56.1837 (%5618.37) ile pozitif saptanırken, aynı hastada 200 hücrenin incelendiği t(9;22) FISH de translokasyon saptanmamıştır. Bir hastada ise t(9;22) PCR BCR/ABL gen oranı %0,00605 bulunmuş, bu hastanın da FISH ile bakılan t(9;22) mutasyonu negatif olarak bulunmuştur. FISH ile inceleme yapılan 22 vakanın hiç birinde t(9;22) saptanmamıştır.

11 FISH çalışması incelemeye uygun hücre bulunmadığından sonuçlandırılmamış, 16 moleküler test ise istem yapılmadığı için çalışılmamıştır.

İnceleme yapılan 16 vakadan birinde (%6.3) t(1;19) PCR pozitif sonuç verilmiş, ancak oran belirtilmemiştir.

Bir hastada ise t(9;22) RT-PCR tetkikinde kontrol gen (G6PD) çoğaltımı sağlanamamıştır.

Diğer sitogenetik analizler negatif bulunmuştur.

## TARTIŞMA

Lösemilerde görülen klonal kromozomal anomaliklerini tespit etmede en sık kullanılan metodlar kemik iliği veya periferik kan örneklerinden konvansiyonel sitogenetik ile kromozomların karyotip analizi, moleküler sitogenetik yöntemlerden FISH (Floresan In Situ Hibridizasyon) ve kantitatif PCR metodlarıdır (3). Karyotip, FISH ve PCR sonuçları lösemi hastalarının tedavi protokollerinde risk sınıflarını belirledikleri ve hastaların prognozu hakkında önemli bilgiler verdikleri için en doğru ve etkili yöntemin kullanılarak genetik sonuca ulaşılması hastalar açısından çok önemlidir (4).

Kemik iliğindeki hücrelerin hassasiyetinden dolayı kemik iliği karyotip çalışmalarında büyük güçlüklerle karşılaşmaktadır. Vakaların %30 kadarında örnekte incelemeye uygun metafaz bulunamamaktadır (5). İncelemeler rutin olarak 20 metafaz örneği üzerinden yapılmakta ancak bu sayıya ulaşamadığında elde edilen 1-20 metafaz örneği değerlendirilmektedir (6). Ancak en az 5 hücrenin detaylı incelenmesi tavsiye edilmektedir (7). Bizim çalışmamızda ilk 3 vakada karyotip ve FISH analizleri için tek heparinize örnek gönderildiği için numune yetersizliği ile karşılaşmıştır. Bu vakalar çıkarıldığında %12.5 (3/24) oranında hiç metafaza rastlanmamıştır. Bu oran literatür ile uyumlu olmakla birlikte Gülhane Askeri Tıp Akademisinde 2003-2005 yılları arasında Sosyal ve ark'nın yaptığı çalışmada lösemi vakalarının % 44.1'ine konvansiyonel sitogenetik analiz ile sonuç vermede başarısız olunmuş ve hastaların % 63.6'sında 20 metafazdan daha az metafaz analiz edilebildiği görülmüştür (5,8,9). Ancak literatürdeki sitogenetik çalışmalarda örneğin alındığı ilde mi yoksa dış merkezlerde mi çalışıldığı veya dış merkezlerden örnek alınıp alınmadığı o yüzden bu yönde yorum yapmak en azından şimdilik mümkün olmamaktadır.

Bizim çalışmamızda t(12;21) oranı literatürden düşük oranda saptanmış, t(9;22) ve diğer translokasyonlar ise benzer oranlarda bulunmuştur (10,11).

İki vakada RT-PCR ile t(9;22) pozitif bulunurken, aynı hastalarda FISH ile translokasyonun saptanmaması özellikle kontrol gen çoğaltımına göre oranı çok düşük olan vaka için RT-PCR'ın mutasyonları saptamada

daha hassas olmasına bağlanabilir (2). Ancak oranı yüksek olan vakada doğrulama yapılamamış olması ihtiyatla karşılanacak bir durum olarak gözükmektedir.

Lösemide sitogenetik çalışmalar için numuneler laboratuvara gönderildikten sonra ortalama 15-20 güne neticelendiği için sonuçlar beklenmeden tedaviye hemen başlanmakta, herhangi bir olumsuzluk durumunda tekrar numune göndermek çoğu zaman mümkün olamamaktadır. Bu durumda tedaviyi olumlu ya da olumsuz yönde etkileyebilecek sonuçlardan mahrum kalınmaktadır. Bizim sonuçlarımızda da görüldüğü gibi tekrarlama imkanı olmayan bu test sonuçlarının daha tatminkar olması için kemik iliği örneğinin yeterli miktarda ve uygun tüplere alınması, laboratuvarın da bu durumdan haberdar olması önemlidir.

Sonuç olarak; bu çalışmada il dışı sitogenetik çalışmalardan elde edilen sonuçlar literatürdeki sonuçlardan daha kötü değildir.

Kemik iliği örneklerinin sitogenetik incelemelerinde en önemli problem, çalışmalarda inceleme için uygun metafaz veya hücreye rastlanamaması ya da örnek yetersizliği olarak bulunmuştur. Yeterli sayı ve miktarda numune alınması durumunda daha iyi sonuçlar alınabileceği düşünülmektedir.

#### KAYNAKLAR

1. Mrózek K, Harper DP, Aplan PD. Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009;23(5):991-1010.
2. Wells SJ, Phillips CN, Farhi DC. Detection of BCRabl in Acute Leukemia by Molecular and Cytogenetic Methods. *Mol Diagn* 1996;1(4):305-13.
3. Schwab C, Harrison CJ. Acute lymphoblastic leukaemia. *Methods Mol Biol* 2011;730:99-117.
4. Pui CH, Relling MV, Sandlund JT, Downing JR, Campana D, Evans WE. Rationale and design of Total Therapy Study XV for newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol* 2004;83 Suppl 1:S124-6.
5. Jiang H, Xue Y, Wang Q, Pan J, Wu Y, Zhang J, et al. The utility of fluorescence in situ hybridization analysis in diagnosing myelodysplastic syndromes is limited to cases with karyotype failure. *Leuk Res* 2012;36(4):448-52.
6. Testa JR, Mintz U, Rowley JD, Vardiman JW, Golomb HM. Evolution of karyotypes in acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer Res* 1979;39(9):3619-27.
7. Bricarelli FD, Hastings RJ, Kristofferson U, Cavani S (Coordinators). Cytogenetic Guidelines and Quality Assurance <http://www.biologia.uniba.it/eca/NEWSLETTER/NS-17/Guidelines.pdf>.
8. Kowalczyk JR, Babicz M, Gaworczyk A, Lejman M, Winnicka D, Styka B, et al. Structural and numerical abnormalities resolved in one-step analysis: the most common chromosomal rearrangements detected by comparative genomic hybridization in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2010;200(2):161-6.
9. Soysal Y, Bahçe M, Yakıcı MC, İrfan A, Kürekçi AE. Lösemilerin Genetik Tanısında Sitogenetik ve Floresan In Situ Hibridizasyon Yöntemlerinin Etkinliğinin Değerlendirilmesi. *Kocatepe Tıp Dergisi* 2009;10(1-2-3):41-7.
10. Najfeld V. Conventional and Molecular Cytogenetic Basis of Hematologic Malignancies In: Hoffman R, Hoffbrand AV, Furie B (Eds). *Hoffman: Hematology: Basic Principles and Practice*, 5th ed. Saunders, Chapter 55, pp 823.
11. Al-Bahar S, Zámecnikova A, Pandita R. Frequency and type of chromosomal abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia patients in Kuwait: a six-year retrospective study. *Med Princ Pract* 2010;19(3):176-81.