

KLİNİK ARAŞTIRMA

Hematolojik Kanserlerde FISH Uygulamaları

FISH Analysis in Hematologic Cancers

Funda S. PALA

Amaç: Son yıllarda geliştirilen FISH (fluorescence in situ hybridization) tekniği hem hematolojik hem de solid tümörlerle ilişkili olan kromozomal aberasyonların belirlenmesinde oldukça yararlı olmaktadır. Bu çalışmada hematolojik maligniteli olgularda yapılan FISH analiz sonuçları değerlendirildi.

Hastalar ve Yöntemler: Hematolojik malignite öntanısı konmuş veya izlemde olan 36 olgudan elde edilen kemik iliği örneklerinde FISH analizleri gerçekleştirildi. Hematolojik malignitelerin tipine göre 4, 24, 48, veya 72 saatlik hücre kültürleri yapıldı. Her bir olguya ait hücre görüntüleri SPOT RT programı yardımıyla bilgisayara aktarıldı.

Bulgular: Otuz altı olgunun 24'ünde t(9;22), 12'sinde t(15;17), altısında t(8;21) ve inv 16 t(16;16) lokusa spesifik FISH problemleri kullanılarak araştırıldı. Kronik miyeloid lösemi öntanısı ile incelenen hastalarda t(9;22)'deki kromozomal translokasyon %60-90 oranında pozitif bulundu. Diğer hematolojik malignitelerde, ilişkili kromozomal aberasyonların varlığı %3-74 arasında değişen oranlarda gözlemlendi. Bu yöntemle takipteki hastalarda aberasyonlardaki düşüş başarıyla belirlenebildi.

Sonuç: Özellikle hematolojik kanserlerde hem öntanıda hem de izlemdeki olguların kromozomal aberasyonlarının belirlenmesinde FISH yöntemi oldukça önemli bir yardımcıdır.

Anahtar Sözcükler: Kromozom aberrasyonu; hematolojik neoplaziler/genetik; in situ hibridizasyon, floresans; lösemi, miyeloid/genetik; translokasyon, genetik.

Objectives: Fluorescence in situ hybridization (FISH) is a new technology which is helpful in the identification of chromosomal aberrations that are associated with hematologic malignancies or solid tumors. In this study, we evaluated the results of FISH analyses in patients with hematologic malignancies.

Patients and Methods: FISH analyses were performed in bone marrow samples of 36 patients with an initial or confirmed diagnosis of hematologic malignancy. The cells were cultured for 4, 24, 48, or 72 hours depending on the type of disease. The images obtained from each case were processed on a computer with the SPOT RT program.

Results: Using locus specific FISH probes, chromosomal translocation at t(9;22) was studied in 24 patients, t(15;17) was studied in 12 patients, t(8;21) and inv 16 t(16;16) were studied in six patients. In patients with an initial diagnosis of chronic myeloid leukemia, t(9;22) was positive in 60% to 90%. The detection of chromosomal aberrations associated with other hematologic malignancies ranged between 3% to 74%. The FISH analysis was also successful in showing decreases in chromosomal aberrations in patients under follow-up.

Conclusion: FISH analysis is of particular help in both the initial diagnosis of, and monitoring chromosomal aberrations in the follow-up of hematologic malignancies.

Key Words: Chromosome aberrations; hematologic neoplasms/genetics; in situ hybridization, fluorescence; leukemia, myeloid/diagnosis/genetics; translocation, genetic.

Hematolojik maligniteler, kemik iliğinden türeyen hücrelerde meydana gelen bir grup neoplazmadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, hematolojik tümörlerin büyük bir çoğunluğunun yapısal ve/veya sayısal kromozom anomalileri ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu kromozom anomalileri gen ekspresyonunun bozulmasına ya da yeni bir füzyon proteinin oluşmasına yol açarlar.^[1] Philadelphia kromozomu insanda neoplazma ile ilişkili bulunan ilk kromozom aberasyonudur. Novel ve Hungerford^[2] bu kromozomu Kronik Miyeloid Lösemi (KML) olgularında G grubu kromozom anormalliği olarak tanımlamışlardır.^[3] Sonraki yıllarda gelişen bantlama teknikleri ve rekombinant DNA teknolojisi ile bu kromozomun 22. kromozomun sis onkogeni yakınındaki bcr parçasının, abl geninin bulunduğu dokuzuncu kromozomun bir parçası ile yer değiştirmesiyle meydana geldiği anlaşılmıştır.^[3] Kronik miyeloid lösemnin parmak izi olarak kabul edilen Philadelphia kromozomunun tespit edilmesinden sonra, zaman içinde hematolojik kanserlerin farklı tiplerinde, farklı kromozomlara ait translokasyon, delesyon ve/veya inversiyonun hastalığın tanısı ve prognozunda önemli rol aldığı bildirilmiştir (Tablo 1).

Maligniteli olgularda sitogenetik çalışma yapabilmek için tümör hücresi gerekmektedir. Lösemilerde örnek, genellikle kemik iliği aspirasyon materyalinden elde edilir. Eğer kemik iliği aspirasyon materyali elde edilemezse kemik iliği biyopsi materyali de kullanılabilir. Beyaz hücre sayısı >10.000/ml, immatür miyeloid ve lenfoid hücre oranı %10'dan fazla olan olgularda periferik kan hücresinden de sitogenetik çalışma yapılabilir.^[7]

Klasik bantlama yöntemlerinde analizi yapılan materyalin metafaz hücresi olması, bu olgularda yeterli ve kaliteli metafaz elde edilememesi araştırmacıları yeni teknikler geliştirmeye itmiştir. Hem interfaz hem de metafaz hücrelerinde analize olanak sağlayan FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) yöntemi, son yıllarda kromozomal aberasyonların analizinde uygulanan konvansiyonel sitogenetik yöntemlere alternatif olarak gösterilmeye başlanmıştır. FISH yöntemi,

radyoaktif olmayan molekül ile kimyasal olarak değiştirilen DNA problemlerinin immünolojik ya da afinite reaksiyonlarını kullanarak kromozom veya kromozom parçalarının floresans olarak görüntülenmesine olanak sağlayan bir tekniktir. Bu yöntemle sayısal ve yapısal anomalileri hem interfaz hem de metafaz hücrelerinde saptamak mümkündür.^[15]

Bu makalede 2004 yılında kurmuş olduğumuz moleküler sitogenetik laboratuvarında hematolojik maligniteli 36 olguda yapılan FISH analiz sonuçları özetlendi.

HASTALAR VE YÖNTEMLER

Hematolojik malignite ön tanısı konulmuş veya izlemde olan 36 olgudan elde edilen kemik iliği örneklerinde FISH analizleri gerçekleştirildi. Hematolojik malignitelerin tipine göre 4, 24, 48, veya 72 saatlik hücre kültürleri yapıldı. Kısa süreli kültürlerde; kan örneğinin türüne göre, 0.2 ml kemik iliği hücreleri veya 0.3 ml periferik kan hücreleri 10 ml RPMI-1640 medyum (Sigma) içinde bekletilirken, 24 saatten uzun süreli kültürlerde medyuma %10 Fetal Calf Serum (Sigma) ve %1 penisilin/streptomisin (Sigma) ilave edildi. Kültürlere kültür süresinin son 1-2 saatinde 10 µg/ml colchemid (Sigma) eklendi. Fiksasyon işleminden sonra lamalara ekilen hücreler bir gece oda sıcaklığında bekletildi.

Fluorescence In Situ Hybridization analizleri için, incelenecek translokasyonlarda özel hazırlanmış füzyon problemleri (Cancer Genetics) kullanıldı (Tablo 2). Metafaz elde edilen olguların bazılarında analizler tüm kromozom problemleri (Cambio) kullanılarak tekrarlandı. Fluorescence In Situ Hybridization problemleri önerilen protokollerde küçük değişiklikler yapılarak uygulandı.

Sayımlar Olympus Bx52 marka floresan mikroskopta, Floresan isothiocyanat (FITC), Tetramethyl rhodamine isothiocyanate (TRITC) ve dihydrochloride (DAPI) filtreler yardımıyla yapıldı. Her bir olguya ait hücre görüntüleri SPOT RT programı yardımıyla bilgisayara aktarıldı.

BULGULAR

Hematolojik maligniteli olguların FISH analizleri, Üniversitemizin Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nın FISH laboratuvarında yapıldı. Otuz al-

Tablo 1. Hematolojik malignitelerle ilişkilendirilen yapısal ve/veya sayısal kromozomal aberasyonların bazıları^[1,3-14]

Hematolojik malignite	Prognozu etkileyen kromozom anomalileri
Akut lenfoblastik lösemi	t (12.21) (p12; q22), t (9; 22) (q34;q11); t (4, 11) (q21, q23), t (1; 19) (q23; p13), t (1.14), del 1p32
Kronik lenfositik lösemi	+12, del 11q, del 17p13, del 13q14
Diffüz büyük B hücreli lenfoma	t (3, var) (q27, var), t (14.18), t (8.14), mutasyon ve/veya del17p13
Mantle hücreli lenfoma	t (11.14), +3q ve del 11q
Miyelom	-13, del 13q, del 11q, t (11.14), t (4.14), t (6.14), t (14.16)
Akut miyeloid lösemi	t (8.21) (q22; q22), t (15.17) (q22; q12), inv (16) (p13q22) t (16; 16) (p13; q22), del 11q23, del 5q, del 7q, +8
Miyelodisplastik sendrom	-5, -7, del 7q, del 5q
Kronik miyeloid lösemi	t (9.22) (q34, q11)
Diffüz büyük B hücreli lenfoma	t (14.18) del p53, t (3, var) (q27, var)
Folikül merkez hücreli lenfoma	t (14.18) del 9p21-22 +p53

tı olgunun 24'ünde t(9;22), 12'sinde t(15;17), altısında t(8;21) ve inv 16 t(16;16) lokusa spesifik FISH problemleri kullanılarak araştırıldı. Olguların dağılımı ve kullanılan problemler Tablo 2'de verilmektedir.

Kronik miyeloid lösemi ön tanısı konulmuş dokuz olguda t(9;22) %60-%90 oranında pozitif bulundu, izlemdeki olguların ikisinde bu translokasyon gözlemlenmezken birinde %7 oranında bcr/abl füzyonu saptandı. Kronik miyeloid lösemili bir olguda t(9;22) %20 oranında pozitiflik gösterirken, MP ve miyelodiplastik sendromlu (MDS) olgularda bu translokasyon gözlemlenmedi.

Akut lenfoblastik lösemili (ALL) üç olguda kötü prognoza işaret eden t(9;22) araştırıldı. Füzyon probu kullanılarak yapılan FISH analizinde olgulardan birinde t(9;22) %75 oranında pozitif olarak saptandı. Tüm kromozom 9 ve 22 problemleri kullanılarak metafaz hücrelerinde yapılan ikinci bir analizde ise t(9;22) oranı %74 olarak bulundu. Diğer iki ALL olgusunda ise t(9;22) gözlemlenmedi.

Akut miyeloid lösemi (AML) M3 ön tanısı konulan bir olguda yapılan FISH analizinde t(15;17) %56 oranında pozitif bulundu, iki ay sonra yapılan ikinci analizde bu oranın %3'e düştüğü saptandı, bir ay sonra yapılan analizde

Tablo 2. FISH analizi yapılan hematolojik maligniteli olguların dağılımı ve kullanılan problemler

Tanı	Araştırılan kromozomal aberasyonlar			
	t (9;22)	t (15.17)	t (8.21)	inv 16 t (16.16)
ALL	3	-	-	-
AML	-	6	6	6
AML M3	-	6	-	-
KML	12	-	-	-
KMML	1	-	-	-
MDS	2	-	-	-
MP	6	-	-	-
<i>Toplam</i>	24	12	6	6

ALL: Akut lenfoblastik lösemili; AML: Akut miyeloid lösemi; KML: Kronik miyeloid lösemi; MDS: Miyelodiplastik sendromlu; MP: Miyeloproliferatif hastalık.

ise translokasyon gözlemlenmedi. Tedavisi süren AML M3 tanısı konulmuş bir olguda t(15;17) oranı %20 olarak saptandı, ikişer ay ara ile yapılan iki analizde ise translokasyon gözlemlenmedi. İzlemedeki diğer dört olguda ise t(15;17) saptanmadı.

Akut miyeloid lösemili altı olguda t(8;21), t(15;17) ve inv (16), t(16;16) birlikte araştırıldı. Olgularda t(15;17) %1-4 arasında değişim gösterirken, inv 16 %16-19 arasında gözlemlendi, t(8;21) ise %4-60 arasında değişen oranlarda pozitif bulundu.

TARTIŞMA

Hematolojik malignitelerde kromozomal aberasyonların belirlenmesi, tanı ve prognozunu değerlendirilmesi açısından önemlidir. Fluorescence In Situ Hybridization tekniği bu tip değişimlerin belirlenmesinde hızlı, kolay ve güvenilir bir yöntem olarak son yıllarda önem kazanmaktadır. Klasik sitogenetik yöntemlerle 2000, 3000 kbaz'lık kromozom anomalileri tespit edilebilirken, FISH yöntemi ile 0.5 kb'lik bölgeleri belirleyebilmek mümkündür.^[15]

Bunun yanı sıra FISH analizi ile elde edilen sonuçların, klasik bantlama yöntemleri ile elde edilen sonuçlara göre daha duyarlı olduğunu ortaya koyan çalışmalar son yıllarda artış göstermektedir.

Tanaka ve ark.^[16] yaptıkları bir çalışmada 288 lösemi/lenfomalı olguda t(9;22), t(8;21), del 11q23, t(11;n) (q23;n), t(15;17), del (5q)/-5, del (13q)/-13, +8, -7, ve +12'yi hem G bantlama hem de FISH yöntemi ile araştırmış ve sonuçları karşılaştırmışlardır. Çalışmalarında t(8;21), t(9;22), 11q23, ve trizomi 8 için her iki yöntemle de benzer sonuçlar bulurken, t(15;17)'nin pozitiflik oranını G bantlama ile beklenenin altında gözlemişlerdir. Tanaka ve ark.^[16] bu sonucu, t(15;17)'ye sahip hücrelerin kültür ortamında daha yavaş çoğaldığı veya çoğalmadığı, dolayısıyla da analiz için metafaz hücrelerini kullanan G bantlama yönteminin bu translokasyon için uygun olmadığı şeklinde açıklamışlardır. Yine aynı çalışmada monozomi 7, trizomi 12 ve del 13q14'ün pozitiflik oranı GTG bantlamayla %10-20 oranında düşük gözlemlenmiştir.

Lee ve ark.^[17] ise hematolojik maligniteli 919 olguda 18 ayrı FISH probu ile yaptıkları çalışmada; tanıda t(9;22) ve t(8;21)'in hem G bantlama hem de FISH yöntemi ile yapılan analizlerdeki farklılığın kabul edilebilir sınırlar içinde (%4.8) olduğunu ancak, del (7q), t(15;17) ve trizomi 21 için G bantlamanın hata payının %12.5 ile %20 arasında değiştiğini, izlemedeki olgular için ise t(9;22) ve t(8;21)'in pozitiflik oranındaki hatanın %25'in üzerine çıktığını saptadıklarını bildirmişlerdir.

Bunun yanı sıra interfaz hücrelerinde yapılan FISH analizi, maskelenmiş/varyant translokasyonların belirlenmesinde klasik bantlama yöntemlerinden daha başarılıdır.^[18]

Sonuç olarak, konvansiyonel bantlama yöntemlerine oranla daha hızlı ve kolay analiz olanağı sağlayan FISH yöntemi özellikle hematolojik kanserlerde hem ön tanıda hem de izlemedeki olguların kromozomal aberasyonlarının belirlenmesinde oldukça önemli bir yardımcıdır. Bu yöntemle sadece işaretlenen bölgenin analizinin yapılabilmesi ve diğer aberasyonların aynı anda tespit edilememesi, tekniğin dezavantajlarından biri olmakla birlikte, metafaz elde edilemeyen durumlarda tek alternatif olarak görülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Paietta E. Comments on the 2001 WHO proposal for the classification of haematopoietic neoplasms. *Best Pract Res Clin Haematol* 2003;16:547-59.
2. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960;132:1497-501.
3. Kurzrock R, Kantarjian HM, Druker BJ, Talpaz M. Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Ann Intern Med* 2003;138:819-30.
4. Bentley G, Palutke M, Mohamed AN. Variant t(14;18) in malignant lymphoma: a report of seven cases. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;157:12-7.
5. Sawinska M, Ladon D. Mechanism, detection and clinical significance of the reciprocal translocation t(12;21)(p12;q22) in the children suffering from acute lymphoblastic leukaemia. *Leuk Res* 2004; 28:35-42.
6. Chang H, Wechalekar A, Li L, Reece D. Molecular cytogenetic abnormalities in patients with concurrent chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma shown by interphase fluorescence in situ hybridization: evidence of distinct clonal origin. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;148:44-8.

7. Firatlı T. Akut lösemi etyopatogenezi: Demek sitogenetik önemli! XXX. Ulusal Hematoloji Kongresi III. Hematoloji ilk Basamak Kursu. 10-14 Ekim 2003. İstanbul: Bilimsel Tıp Evi; 2003. s. 119-26.
8. Curry DJ, Smith TM. Measurement of SIL-TAL1 fusion gene transcripts associated with human T-cell lymphocytic leukemia by real-time reverse transcriptase-PCR. *Leukemia Research* 2003;27:575-82.
9. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002;100:2292-302.
10. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Ann Oncol* 1999;10:1419-32.
11. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 1998;92:2322-33.
12. Siebert R, Weber-Matthiesen K. Fluorescence in situ hybridization as a diagnostic tool in malignant lymphomas. *Histochem Cell Biol* 1997;108:391-402.
13. Shurtleff SA, Buijs A, Behm FG, Rubnitz JE, Raimondi SC, Hancock ML, et al. TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia* 1995;9:1985-9.
14. Breit TM, Mol EJ, Wolvers-Tettero IL, Ludwig WD, van Wering ER, van Dongen JJ. Site-specific deletions involving the tal-1 and sil genes are restricted to cells of the T cell receptor alpha/beta lineage: T cell receptor delta gene deletion mechanism affects multiple genes. *J Exp Med* 1993;177:965-77.
15. McNeil N, Ried T. Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: technology and applications in molecular medicine. *Expert Rev Mol Med* 2000; 2000:1-14.
16. Tanaka K, Arif M, Eguchi M, Shintani T, Kumaravel TS, Asaoku H, et al. Interphase fluorescence in situ hybridization overcomes pitfalls of G-banding analysis with special reference to underestimation of chromosomal aberration rates. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;115:32-8.
17. Lee DY, Cho HI, Kang YH, Yun SS, Park SY, Lee YS, et al. The role of fluorescence in situ hybridization (FISH) for monitoring hematologic malignancies with BCR/ABL or ETO/AML1 rearrangement: a comparative study with FISH and G-banding on 919 consecutive specimens of hematologic malignancies. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;152:1-7.
18. Amare PS, Baisane C, Saikia T, Nair R, Gawade H, Advani S. Fluorescence in situ hybridization: a highly efficient technique of molecular diagnosis and predication for disease course in patients with myeloid leukemias. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;131:125-34.