

## BÖLÜM 4

# HEMATOGENETİKTE UYGULAMALAR VE YENİ TEKNOLOJİLER

Didem ÖZKAN<sup>1</sup>

### GİRİŞ

Hematolojik özellikler, klinik uygulamada yaygın olarak kullanılan temel biyo-medikal göstergelerdir. Anemiden talasemiye, otoimmün hastalıklarından, miyeloproliferatif ve metabolik hastalıklara kadar geniş bir grubu kapsayan hematolojik hastalıkların kalıtsal olduğu bilinmektedir ve genetik faktörlerle birlikte yaş, cinsiyet, obezite vb genetik faktörlerin yanı sıra, sigara içme davranışları gibi çevresel faktörler bireyler arası farklılığın temelini oluşturur.

Hücre şekil bozuklukları, trombositlerle ilişkili hastalıklar, çeşitli hemoglobin hastalıkları, anemi türleri vb kalıtsal hematolojik hastalıkların yanı sıra; lösemi, lenfoma, multipl miyelom gibi malignite orijinli geniş bir grubu oluşturan hematogenetik hastalıkların teşhis, tanı ve tedavisinde moleküler tekniklerin yeri oldukça önemlidir(1-2). Maligniteler genetik değişiklikler sonucu oluşmaktadır ve sonradan kazanılmış hematolojik hastalıklar kapsamında yer almaktadır. Normal bir hücrenin genetik yapısındaki değişiklikler sonradan kazanılan somatik mutasyonlarla oluşmaktadır ve bu durum hücrenin neoplaziye dönüşümüne neden olmaktadır. Bu dönüşüm ya DNA düzeyinde ya da kromozomal düzeyde olmaktadır ve çok basamaklı, birden çok etkenle ortaya çıkan bir süreçtir. Hematolojik malignitelerde sitogenetik analizler ile spesifik kromozom anomalileri tanımlanırken, primer ve sekonder değişiklikler belirlenerek ekspresyonu değişen/kaybedilen genler tanımlanmakta böylece tümörögeneziste yer alan biyolojik mekanizmaların aydınlatılmasına çalışılmaktadır (3).

### HEMATOLOJİK HASTALIKLARIN MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ

Kalıtsal hematolojik hastalıklarda genetik tanının rolü çok önemlidir. Belirli hematolojik hastalıkların tanısını doğrulamak ve optimal tedavilerini yönlendirmek için doğru genetik tanı gereklidir, bu da hızlı ve kapsamlı genetik seçenekleri-

<sup>1</sup> Dr. Öğr. Üyesi, İstanbul Okan Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, didemtorun@gmail.com

nin önemini ortaya koymuş bu kapsamda ilerlemeler kaydedilmiştir. Hematolojik hastalıkların genetik tanısına yönelik çok çeşitli moleküler yöntemlerin kullanımı özellikle polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'nin 1980'li yılların sonlarında devreye girmesinden sonra başladı sonrasında teknolojik olanakları yüksek laboratuvarlarda/merkezlerde hayata geçirilen diğer moleküler yöntemlerin basitleştirilerek rutin kullanıma geçilmesiyle hastalıkların tanı ve tedavisinde hızla yol alınmaya başlandı. Genetik analizlerin kullanılmasıyla trombosit hastalıkları, hemofililer, doğumsal/kazanılmış hemolitik anemiler, trombofili yaratan durumlarda tanı ve tedavi süreçlerinde hızlı yol alınmıştır (4). Aynı şekilde malign hastalıkların kesin tanısının konulması yanında prognozun belirlenmesi ve hatta tedavi yöntemlerinin belirlenmesinde klinisyenler için moleküler genetik analizler vazgeçilmez olmuştur. Hematolojik hastalıkların temelinde bulunan genetik bozukluklar çok çeşitli olduğundan, her bir hastalık için tercih edilecek genetik analiz yöntemi farklı olmaktadır.

Hematopoetik hastalıkların moleküler analizinde temel olarak kullanılan yöntemleri özetleyecek olursak;

Spesifik Anomaliler için;

- PCR ( DNA için)
- RT-PCR (RNA analizi için)
- Tekli Nükleotid Polimorfizm Genotiplenmesi (PCR-SSP)
- Dijital Droplet PCR (ddPCR)
- Dizileme ( Sanger Dizileme, Yeni Nesil Dizileme (NGS))

Kromozom Anomali Tespiti (Sitogenetik Testler) için;

- Floresan In Situ Hibridizasyon
- Spektral Karyotipleme ( SKY)
- Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (CGH)

Gen İfadesinin Profillenmesi için;

- Mikroarray

## **HEMATOLOJİK HASTALIKLARDA PCR/ RT-PCR/ PCR-SSP/ DD PCR**

1985 yılında Karry Mullis ve arkadaşları PCR yöntemini keşfedene kadar hematoloji dahil tüm genetik hastalıkların mutasyonlarının belirlenmesinde mikroskop temelli yöntemler kullanılıyordu. Bir tüp içerisinde DNA'nın milyonlarca kopyasının oluşturulması olarak açıklanan PCR yöntemi; denatürasyon, bağlanma (annealing) ve uzama (extension) aşamalarından meydana gelmektedir ve temel bu üç aşamanın termal döngü cihazında yaklaşık 20-30 kez tekrarlanmasıyla gerçekleşir. Günümüzde PCR yöntemleri gelişerek/modifiye olarak Real Time PCR, Nested PCR, Insitu PCR, Multipleks PCR gibi yaklaşık onbeş PCR çeşidine ulaş-

mıştır. Hematolojide PCR kullanımı ya ana yöntem ya da hedefe giden yolda ara yöntem olarak yer almaktadır. Floresan ışımaya tekniklerinin kullanılmasıyla ortaya çıkan Es zamanlı Real Time PCR tekniği ile, gen kopya ürünlerinin değerlerini sayısal olarak reaksiyon devam ederken ölçmek, reaksiyonun gidişatına müdahale etmek mümkün olmuştur. Real Time PCR; hematolojide gen ekspresyonlarının kantitasyonunda, genotipleme analizlerinde, hemoglobinopatilerin prenatal tanısında, kemik iliği transplantasyonu (KİT) sonrası kimerizmin izlenmesi vb analizlerinde kullanılmaktadır. Real Time PCR'in hızlı olması, işlem sonrası elektroforez gerektirmemesi, floresan sinyal gücünün doğrudan çoğaltılan miktarla orantılı olması, iki kat artmış değişimi bile belirleyebilme hassasiyetinde olması konvansiyonel PCR dan üstünlükleri olarak belirlenmiştir (5-6).

Hematolojik hastalıklardan hemoglobinopatilerde gözlenen yaygın beta globin mutasyonları (HbS, HbG, Hb E) tespiti eskiden laboratuvarlarda rutin kullanılan HPLC-izoelektrik fokus yöntem ile yapılmaktaydı günümüzde RT-PCR ile hızlı şekilde sonuç alınmaktadır. Aynı zamanda hemokromatoz mutasyonları (C282Y, H63D) analizinde ise restriksiyon endonükleaz enzim kesimi ve PCR kullanılırken günümüzde RT-PCR kullanılmaktadır (7). Venöz tromboza yakınlıkta en sık karşılaşılan koagülasyon anomalisi olan Aktive Protein C (APC) direnci ile ilişkili Faktör V Leiden mutasyon taraması, Faktör II (G20210A) gen taraması, ailesel tromboemboli, hiperhomosisteinemiye yakınlık geni olan MTHFR C677T mutasyon taramaları RTPCR - Melting Curve analizi ile rutin hematoloji laboratuvarlarında yapılan testlerdir. Yine Akut Miyeloid Lösemi (AML) ve Akut Lenfoid Lösemi (ALL) ve tedavilerinde kullanılan ilaçları metabolize eden enzimlerin (örneğin TPMT/CYP2D6 enzimleri) aktivitelerini ölçmek, bu polimorfizmlerin araştırılmasında RTPCR tekniği kullanılmaktadır (8). AML de lösemik belirteç olarak bilinen WT1 gen ekspresyonu KML de terapiye yanıt ölçümünde kantifiye edilmektedir. AML1/ATG8, TEL/AML1, BCR/ABL, MLL/AF9 gibi küçük rezidüel hastalıklarla bağlantılı özgün gen ekspresyonlarının kantitatif RT-PCR ile saptanması kliniklere büyük katkı sağlamaktadır. Özellikle KML minimal rezidüel hastalık takibinde mRNA Bcr-Abl düzeylerinin ölçümü klinik için önemlidir; p210 ve p190 proteinlerini kodlayan bu genin düzeylerinin RT-PCR ile kantitasyonu %100 spesiflik ve %0,0001 düzeylerine varan duyarlılık alanı içinde mümkün olabilmektedir. Bunun dışında rutin uygulamalar içinde özellikle KLL takibinde Ig- CDRII- CDRIII bölgelerinin kantifikasyonunun yapılabilmesi, bu ölçümler ile  $5 \times 10^5$  normal hücre arasından tek bir tümör hücresini saptayabilecek nitelikte olması erken tanı için önem teşkil etmektedir (9).

PCR-SSP (Sequence Specific Priming) tekniği ise ilk olarak 1990'ların başında ortaya çıktı ve refrakter mutasyon sistemlerinin (ARMS) amplifikasyonuna dayanıyordu. Bu yöntemin ilkesi, bir PCR reaksiyonunda mükemmel şekilde eşleşen

bir primerin, bir veya daha fazla uyumsuz primerden daha verimli olmasıdır. Özgüllük, 3' tek baz uyumsuzluğunun, spesifik olmayan bir reaksiyonun başlamasını engellediği, diziyeye özgü primerlerin kullanılmasıyla belirlenir. Taq polimerazın 3' - 5' eksonükleaz aktivitesinin olmaması nedeniyle, primer çiftleri bile spesifik olarak belirli annealing derecesinde verimli bir şekilde amplifiye edilmez. Bu nedenle, sadece gerekli alel amplifiye edilecek ve daha sonra amplifiye edilen ürün agaroz jel elektroforezi ile tespit edilebilecektir. PCR-SSP tekniği ile hematolojide HLA Doku tiplendirmesi yapılmaktadır. HLA tiplemesi; HLA bölgesinde genetik varyasyonlarının saptanmasıdır, doku/organ nakillerinin başarısını etkilemektedir, otoimmün hastalıklar gibi bazı hastalıklara genetik yatkınlığın incelenmesinde kullanılmaktadır. SSP tekniği kullanılarak moleküler tiplendirme yapılamayan nadir HLA tiplendime durumlarında veya akraba dışı alıcı verici farklılıklarını saptamada ise SBT (Sequence Based Typing) tekniği kullanılmaktadır (10-11).

2011'den beri ticari olarak kullanılabilir hale gelen su-yağ emülsiyon damlacık sistemi kullanan yeni bir dijital PCR yöntemi olan ve en son geliştirilmiş teknolojilerden biri olarak kabul edilen dijital droplet-PCR (dd-PCR)), geleneksel (konvansiyonel) PCR'dan oldukça farklı bir metoda sahiptir. Bu yöntem ile standart bir eğriye ihtiyaç duymadan; kullanılan az miktardaki DNA, sıvı fazdaki damlacıklara bölünerek ve kopyalarının amplifikasyonu sağlanarak tespit edilmekte, nükleik asitlerin mutlak kantitatif ölçümüne olanak sağlamaktadır. ddPCR ile ALL (p190 BCR-ABL); AML (IDH1 R132H), CML (p210, p190 BCR-ABL), MPN (miyoproliferatif neoplazma) JAK2 v617F gibi mutasyonlar belirlenmektedir. ddPCR sistemleri hematoloji-onkoloji çalışmalarında sıklıkla kullanılmakta olup araştırılan hematolojik maligniteler için hedef DNA/RNA sekanslarının kantifikasyonunu öğrenmemizi sağlarlar. Bunun dışında ddPCR ile hızlı protokol uygulanmasıyla kimerizm vakalarında erken nüksün tespiti ile AHKHT (allojenik hematopoetik kök hücre transplantasyonu) hastalarının sağ kalım oranının olumlu etkilendiğine dair literatürde çalışmalar mevcuttur (12-13).

Hematolojik hastalıklarda varyasyonların/mutasyonların tanımlaması için günümüze kadar en çok kullanılan yöntemlerden biri Sanger Dizi analizi kullanılmaktadır. Sanger yönteminde çok sayıda örnek dideoksi nükleotid trifosfatlar (ddNTP) ın floresan boyayla işaretlenerek kullanılmasıyla aynı anda dizilenebilmekte, her bir reaksiyonda 350-800 bazlık bir uzunluğa sahip olan DNA dizileri yüksek doğrulukla okunabilmektedir. 2003 yılına kadar yüksek verimle kullanılan bu teknoloji 2005 yılında yeni nesil dizileme olarak adlandırılan Next Generation Sequencing (NGS) cihazı kullanımıyla moleküler genetik alanında ilerlemenin önünü açmıştır (14). NGS sistemleri ile aynı anda milyonlarca kısa DNA parçasının dizilenebilmekte ve sonrasında bu diziler elektroforeze ihtiyaç duyulmaksızın direkt olarak okunabilmektedir.

Whole Genome Sequencing (Tüm genom), Whole Exom Sequencing (tüm ekzom dizileme) yöntemleri özellikle yeni genlerin keşfinde, nadir hastalıklara neden olan mutasyonların tanısında, fenotipik ve genotipik olarak heterojenite gösteren hastalıkların tanısında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. NGS teknolojileri ile ticari kit olarak hedefe yönelik olarak oluşturulan yeni nesil dizileme panelleri ile etyolojisi genetik heterojenite gösteren hastalıklar için çok sayıda gen aynı anda dizilenebilmektedir. İmmun yetmezlikler, kemik iliği yetmezliği ile ilişkili sendromlar dışında hematolojik malignitelerde neoplastik hücrelerin genetik özellikleri belirlenerek ulaşılması güç olan solid doku kanserlerinin erken tanısı ve bireysel tedavi yaklaşımlarının belirlenmesinde NGS sistemlerinden yararlanılmaktadır (15). Yeni nesil dizi analizlerinin daha da gelişmesi ile birlikte fenotipik ve genotipik heterojenite gösteren hastalıkların genetik temelini ortaya konması mümkün olacaktır.

## **HEMATOLOJİDE SİTOGENETİK TESTLER**

Hematolojik kanserlerle ilgili ilk genetik çalışma 1960'lı yıllarda kromozomda yeni düzenlemenin tümöre neden olduğu KML hastasında Philadelphia kromozomu çalışmalarıyla başlamış olup; teknolojinin gelişmesiyle ortaya çıkan farklı sitogenetik analiz yöntemlerinin kullanımıyla kanser genetiğine ait bilgiler ortaya çıkmıştır. Philadelphia kromozomu keşfiyle başlayan süreçle oluşan ve oluşmakta olan veriler lösemi, lenfoma gibi hematolojik malignitelerde sitogenetik tanının önemini ortaya koymuştur (16).

1969 yılında moleküler tekniklerin sitolojik preparatlara uygulanmasına başlanılmış bu süreçte radyoaktif maddelerin kullanılması, uygulama için uzun süreye ihtiyaç duyulması sitogenetik yöntemlerin dezavantajı olsa da moleküler klonlama yöntemlerinin gelişmesi ile ISH tekniklerinin uygulanabilirliği ivme kazanmıştır.

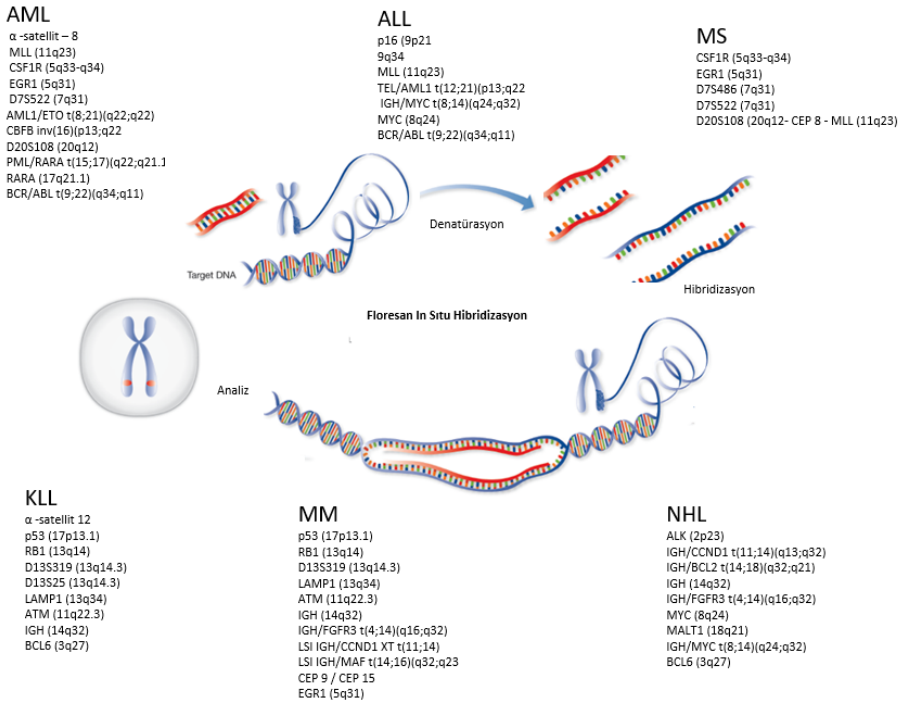
Kromozomal düzeyde mutasyonun ortaya çıkabilmesi için neoplastik hücrelerde iki majör mitotik olay yani kromozomların anormal segregasyonu ve kromozom kırıkları kromozom yapısını etkilemektedir. Meydana gelen bu değişimleri incelemek için;

- Floresan bantlama yöntemi
- Giemsa bantlama
- Reverse bantlama
- In Situ Hibridizasyon
- Flow sitometri
- CGH
- SKY

kullanılmaktadır. Bu teknikler ile kromozom yapısındaki kayıplar (delesyonlar), kazançlar (duplikasyon, trizomi); kromozomal polimorfizmler, kromozomal

yeniden yapılanmalar (inversiyon, insersiyon, translokasyonlar) tespit edilmektedir. Bu tekniklerden tümöre özgü karyotipik anomalilerin tespitinde kullanılan FISH analizi hızlı, hassas ve güvenli olması sebebiyle en çok tercih edilen yöntemdir. Özellikle lösemi tanısında oldukça güvenli kullanıma sahip bu teknik ile lösemi tipine özgü spesifik karyotipik yeniden düzenlenmenin varlığı/ yokluğu belirlenerek hasta tanısı konulmakta, tedaviye paralel olarak karyotipik değişiklikler belirlenebilmekte, kemik iliği transplantasyonu sonrası hastanın kemik iliği hücrelerinin orjini belirlenebilmekte veya tetkik edilen anomaliye ilişkin çok sayıda nükleus incelenebilmektedir.

Tümör hücrelerinde metafaz kromozomu eldesi oldukça önemlidir ve eldesi zorlu bir süreçtir. Elde edildiğinde klasik sitogenetik yöntemleri yapısal anomalileri ortaya çıkarmada yetersiz kaldığından FISH hematolojik kanserlerin tanısında sıklıkla kullanılmaktadır. FISH yönteminde probler kullanılmaktadır. Hedef DNA veya RNA molekülüne komplementer işaretli nükleik asit dizisi prob olarak adlandırılmaktadır ve florokromlar, haptenler, enzimler veya kolloidal altın ile işaretli olabilen prob sistemleri sinyal özelliklerine/kullanım alanlarına göre değişmekte hematolojik malignite tanısında kullanılmaktadırlar (17). Hematolojik malignite tanısında kullanılan FISH prob sistemleri Şekil.1'de özetlenmiştir.



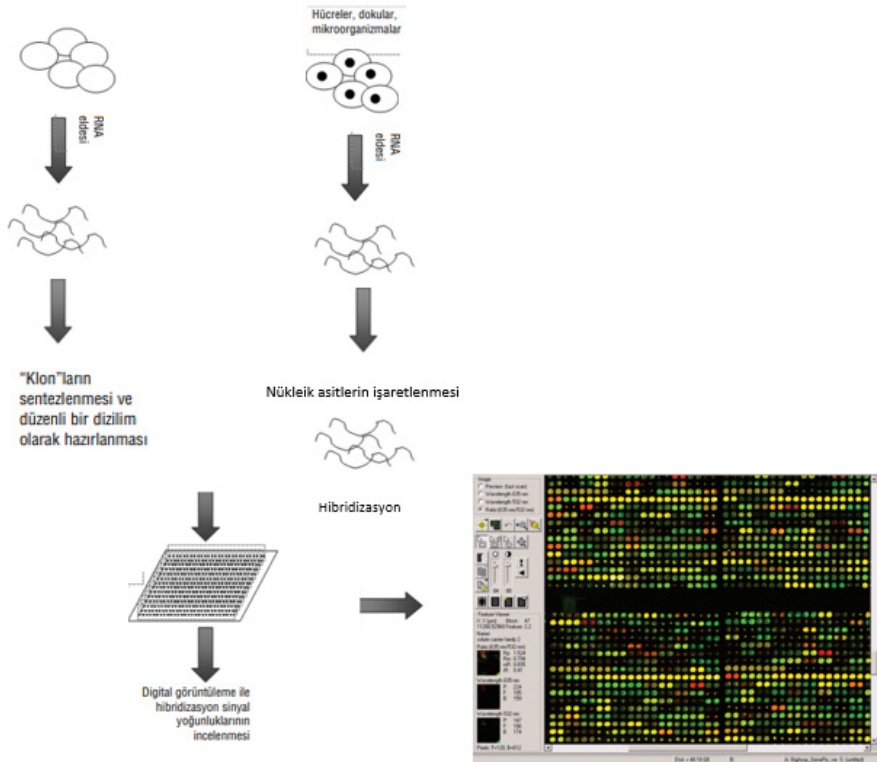
Şekil.1 FISH tekniği ve Hematolojik malignite tanısında kullanılan FISH prob sistemleri

## **HEMATOLOJİDE MİKROARRAY TEKNOLOJİSİ**

Tümör gelişiminde hangi genlerin ve biyolojik yolların sorumlu olduğunu bilebilir miyiz? Gen ifade profilleri ile hematolojik maligniteleri sınıflandırabilir miyiz? sorularının cevabı için sıklıkla kullanılan yöntem olan kromozomal mikroarray bir moleküler karyotipleme metodudur. Tüm genomda delesyon ve duplikasyonların saptanması için altın standart kabul edilen bu yöntem genom boyunca klinik olarak önemli majör kromozom dengesizliklerini (aneuploidi) ve submikroskopik kopya sayısı varyasyonlarını tespit etmektedir. Bu varyasyonları tespit edebilmek için karşılaştırmalı genomik temelli hibridizasyon arrayler (aCGH) ve tek nükleotid polimorfizm temelli mikroarrayler (SNParray) kullanılmaktadır. aCGH ile delesyonlar / duplikasyonlar belirlenir ve lokalizasyonları büyüklükleri ardışık problemlerin sayısı ile belirlenir (18). İnsan genomunda tanımlanan yaklaşık on milyon SNP ve en az 1 kb DNA uzunluğunda 1400 CNV (Copy number variants) bölgeleri içeren çeşitli genetik varyasyonlara sahip yaklaşık üç milyar ikiyüzbin DNA baz çifti bulunmaktadır. Bugün SNP arrayler ile 1 milyondan fazla farklı SNP tespit edebilmektedir. Prob tabanlı üretilen SNP arraylerde %99 üzerinde doğrulukta SNP genotiplendirilmektedir. Yüksek ölçekli array sistemlerinde SNP ler genetik markerlar olarak kullanılmaktadır. Çünkü SNP ler hastalık tanısını ve yatkınlığını etkileyebilmekte, varyasyonların varlığı verilen herhangi bir ilacın etkinliğini ve /veya ilaca bağlı yan etkilerini, ilaç yanıtını güçlü bir şekilde etkilemektedir (19). Affymetrix firması genom boyunca SNP taraması yapmak için SNP array üreten ilk ticari firmadır ve ve bunu Illumina firması takip etmiştir. SNP çipleri; genetik çeşitlilikten ve genetik hastalıklara yatkınlıktan sorumlu olduğudüşünülen tek nükleotid polimorfizmlerini belirlemede, adli tıp çalışmalarında, ya da DNA temelli ilaç adaylarının tanımlanmasında kullanılabilir. SNP mikroarrayleri ayrıca kansere neden olan somatik mutasyonların, özellikle de heterozigote kaybının ya da DNA bölgelerinin artan ya da kaybedilen profillerinin belirlenmesinde de kullanılmaktadır. Mikroarray teknolojisi ile gen ifade profili şematik olarak Şekil.2'de gösterilmiştir.

Mikroarray teknolojisi hematolojide kronik ve akut lösemiler, multipl miyelom, lenfomalar gibi farklı malign hastalıkların moleküler sınıflandırılmasında, alt grupların belirlenmesinde, tedavi seçeneklerinin değerlendirilmesi yanında mutasyon taramaları, genotipleme, kromozom delesyonlarının tanımlanmasında kullanılmaktadır.





Şekil.2 CDNA Mikroarray Teknolojisi ile gen ifade profilinin şematik gösterimi.

## SONUÇ

Hematolojik hastalıkların klinik tanısında gelişen moleküler tekniklerin kullanımı gün geçtikçe daha etkili şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle bazı hastalıklar için kullanılan ticari kitlerle hızlı ve ucuz şekilde fayda sağlanmakta bu durum tedavi sürecine olumlu katkı yapmaktadır. Örneğin JAK2 mutasyon kiti ile kanser dokularındaki düşük kopya sayılarındaki (1%) mutant DNA ve aJAK2 V617F mutasyonunu hedefleyen spesifik problemlerle RTPCR yöntemi ile tanımlama yapılmakta; ddPCR ile hematolojik malignansilerde minimal rezidüel hastalığın belirlenmesinde tümöre özgü standart eğri kullanımına gerek olmadan, düşük varyant fraksiyonuna sahip BCR/ABL, FLT3 D835Y, IDH1 R132C/H, IDH2 R140Q / R172K gibi spesifik mutasyonlar tanımlanabilmektedir. Moleküler genetik alanında her geçen gün gelişen yeni teknolojilerin hematolojide yaygın uygulama alanı bulması hastalıklarda tedavi seçeneklerinin değerlendirilmesinde kliniğe oldukça yardımcı olacaktır.



## KAYNAKLAR

1. Dacie JV, Lewis SM. Practical hematology. 8th ed. London: Churchill Livingstone; 1999.
2. Provan D, Gibben J. Molecular Hematology, 3rd ed, 2010, p.318.
3. 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
4. Koutsis A, Vervessou EC. Diagnostic molecular techniques in haematology: recent advances. *Ann Transl Med.* 2018;6(12):242. doi:10.21037/atm.2018.05.30
5. Sayitoğlu MA. Hematolojide Real Time PCR, Temel Moleküler Hematoloji Kursu, 2002, s.20-22
6. van der Velden, VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: Principles, approaches and laboratory aspects. *Leukemia*, 2003;17: 1013-1034
7. Özknay F. Molecular Diagnosis in Thalassemia and Hemoglobinopathies. *Türkiye Klinikleri J Hem Onc-Special Topics.* 2010;3(1):35-9
8. Geiger K, Leisherer A, Brandtner EM, Drexel H, Muendlein A. Direct blood PCR: TaqMan-probe based detection of the venous thromboembolism associated mutations factor V Leiden and prothrombin c.20210G>A without DNA extraction. *Clinica Chimica Acta*, 2019, Vo.488, p.221-225
9. Deininger MWN, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* ,2000;96 p.3343-3356.
10. Johansson T, Yohannes DA, Koskela S, Saavalien P. HLA RNA Sequencing With Unique Molecular Identifiers Reveals High Allele Specific Variability in Mrna Expression. *Front.Immunol*, 2021
11. Beksaç M. HLA ve Doku Tiplendirilmesi. 1999 Kan ve Kemik İliği Transplantasyonu Kursu, s.42-49
12. Huggett JF, Cowen S, Foy CA. Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool. *Clin Chem* 2015; 61(1):79-88
13. Valero-Garcia J, Gonzalez-Espinosa MdC, Barrios M, Carmona-Antonanzas G, Garcia-Planells J, Ruiz-Lafora C, Fuentes-Galvez A, Jimenez-Velasco A. Earlier relapse detection after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation by chimerism assays: Digital PCR versus quantitative real-time PCR of insertion/deletion polymorphisms. *PLoS One* 2019; 14(2): e021270
14. Chen M, Zhao H. Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection. *Hum Genomics* 2019; 13(1):34.
15. van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next generation sequencing technology. *Trends in Genetics.* 2014;30(9):418-26
16. Rooney DE.: Human Cytogenetics malignancy and acquired abnormalities (Third Edition). Oxford University Press, New York, 2001.
17. Le Beau MM. Fluorescence in situ hybridization in cancer diagnosis. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. Important Advances in Oncology. Philadelphia, PA: Lippincott; 1993:29-45.
18. van Hal NL, Vorst, van Houwelingen AM. et al. The application of DNA microarrays in gene expression analysis. *J.Biotechnol.* 2000; 78: 271-280.
19. Akyerli CB. Hematolojide Mikroarray Kullanımı. Temel Moleküler Hematoloji Kursu, 2008, s.23-24.