

**T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**MULTİPL MYELOMLU OLGULARDA KROMOZOM  
ABERASYONLARININ FLORESAN IN SİTU HİBRİDİZASYON  
(FISH) VE KONVANSİYONEL SİTOGENETİK YÖNTEMLERLE  
BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**GÜLÇİN SUNGAR**

**DANIŞMAN**

**YRD.DOÇ. DR. BEYHAN DURAK**

**MAYIS, 2008**



**T.C.**  
**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**MULTİPL MYELOMLU OLGULARDA KROMOZOM  
ABERASYONLARININ FLORESAN İN SİTU HİBRİDİZASYON  
(FISH) VE KONVANSİYONEL SİTOGENETİK YÖNTEMLERLE  
BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**GÜLÇİN SUNGAR**

**DANIŞMAN**

**YRD.DOÇ. DR. BEYHAN DURAK**

**MAYIS, 2008**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Gülçin SUNGAR'ın Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "Multipl Myelomlu Olgularda Kromozom Aberasyonlarının Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) ve Konvansiyonel Sitogenetik Yöntemlerle Belirlenmesi" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "KABUL" edilmiştir.

16.05.2008

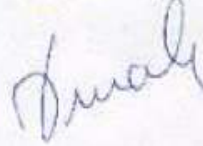
Üye: Prof.Dr. Sevilhan ARTAN



Üye: Yrd.Doç.Dr. Muhsin ÖZDEMİR



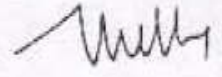
Üye: Yrd.Doç.Dr. Beyhan DURAK



Üye: Yrd.Doç.Dr. Oğuz ÇİLİNGİR



Üye: Yrd.Doç.Dr. Meltem Olga AKAY



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 29/05/2008, tarih ve 744/3440, sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof.Dr.Ferrah YÜCEL  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

**Giriş:** Multipl Myelom (MM) plazma hücrelerinin kemik iliğinde birikmesi, proliferasyonu ve monoklonal immunglobulin sekresyonu ile karakterize klonal bir hastalıktır.

**Amaç:** Konvansiyonel sitogenetik ve FISH yöntemleri kullanılarak multipl myelom tanılı olgularda kromozomal aberasyonların sıklığını belirlemek ve saptanan yeniden düzenlenmelerle hastalığın evresi ve prognozu arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.

**Gereç ve yöntem:** Multipl myelom tanısı alan toplam 50 olgu klasik sitogenetik ve moleküler sitogenetik (FISH) analizleri ile değerlendirilmiştir. FISH analizi ile; 13q14, 13q32, 17p13 bölgelerindeki delesyonlar, t(4;14)(p16;q32), t(11;14)(q13;q32), t(14;16)(q32;q23) bölgelerini içeren yeniden düzenlenmeler ve 5, 9, 15. kromozomların monozomi ve/ veya trizomileri incelenmiştir

**Bulgular:** Konvansiyonel sitogenetik analiz olguların 32 tanesinde gerçekleştirilebilmiş olup 27 olguda (%84.3) normal karyotip izlenirken 5 olguda (%15.6) kromozom aberasyonları gözlenmiştir.

FISH analizinde; olguların % 18 inde (9 /50) değerlendirilen tüm parametreler için normal sonuç bulunmuştur. Olguların %82 sinde ise (41/50 ) FISH analizi ile en az bir anomali gözlenmiştir. Olguların %54 ünde (27/50) kromozom 13 aberasyonları gözlenmiştir. İkinci en sık gözlenen aberasyon % 50 oranıyla kromozom 15 aberasyonlarıdır. Olguların % 24 (12/50) ünde FISH analizi ile hiperdiploid karyotip gözlenmiştir.

**Sonuç ve tartışma:** En sık saptadığımız anomali, kromozom 13 (%54) aberasyonlarıdır ve literatürle uyumlu bulunmuştur. 13. kromozom aberasyonları, IGH translokasyonları ve P53 delesyonlarından en az birini bulunduran olguların ortalama median sağ kalım sürelerinin diğerlerinden daha kısa olduğu görülmüştür. Kromozom 15 aberasyonları evre 3 ile ilişkili olduğu görülmüştür (P=0.02). Çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre MM lı olgularda konvansiyonel sitogenetik ve özellikle FISH yönteminin hastalığın takip ve prognozunda önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Multipl myelom, FISH, sitogenetik

## SUMMARY

**Background:** Multiple myeloma (MM) is characterized by the accumulation and proliferation of malignant plasma cells, secreting monoclonal immunoglobulins.

**Aim:** To determine the frequency and prognostic value of chromosomal aberrations by interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) and conventional cytogenetics in MM patients and to study relationship between rearrangements detected and grade and prognosis of disease.

**Methods:** We performed conventional cytogenetic and FISH studies in 50 patients to detect chromosome anomalies associated with MM. FISH probes were used to detect 13q14, 13q34, 17p13 deletions, t (4;14) (p16;q32), t 11;14) (q13;q32), t (14;16) (q32;q32) rearrangements, and monosomy and/or trisomy of chromosomes 5,9, and 15.

### **Results:**

Conventional cytogenetic studies could be performed in 32 of cases. Five patients (15.6%) showed chromosomal aberrations while 27 (84.3%) had normal karyotypes.

By FISH, Eighteen percent (9/50) of a cases were found to be normal for all parameters evaluated. Eighty-two percent (41/50) of the patients were positive for at least one abnormality. Chromosome 13 anomalies were detected in 54% (27/50) of cases. The second most common aberration observed is chromosome 15 aberrations (50%). Hyperdiploid karyotype was detected in twenty-two percent (24 %) of the patients.

### **Conclusion:**

Our data showed that FISH technique has an advantage over conventional cytogenetics in respect to its application to get better results. Chromosome 13 aberration was the most frequent abnormality among our patients in consistent with the previous literature. Median survival rate was shorter in patients with one of the abnormalities including chromosome 13 aberrations, IGH rearrangements or p53 deletions. Chromosome 15 aberrations were significantly higher in patients with stage III disease ( $p=0.02$ ). We conclude that FISH studies should be performed in conjunction with conventional cytogenetic analysis for prognosis in multiple myeloma patients.

**Keyword:** Multiple myeloma, FISH, Cytogenecis



2.2.1.1.9 Prognoz.....	13
2.2.1.1.10. Myelomun Varyant Şekilleri.....	13
2.3. Hematolojik Malignansilerde Sitogenetik Ve Moleküler Sitogenetik Analiz.....	15
2.3.1. Hematolojik Malignansilerde Sitogenetik Analizler.....	15
2.3.2 Hematolojik Malignansilerde Moleküler Sitogenetik Analizler.....	16
2.4. Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH).....	16
2.4.1. Floresan İn Situ Hibridizasyon Tekniğinde Kullanılan Problar ve Özellikleri.....	17
2.4.2. Floresan İn Situ Hibridizasyon Tekniğinin Temel Mekanizması... ..	18
2.5. Multipl Myelomda Sitogenetik Analizler.....	20
2.5.1. Multipl Myelomda Görülen Sitogenetik Anomaliler.....	21
2.5.1.1. Kromozom 13 aberasyonları (-13/13q delesyonu).....	21
2.5.1.2. IGH (14q32) aberasyonları.....	22
2.5.1.3. TP53 (17q13) delesyonu.....	25
2.5.1.4. Sayısal aberasyonlar.....	25
2.5.1.5. Diğer aberasyonlar.....	26
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER</b> .....	<b>27</b>
3.1. Gereç .....	27
3.1.1. Araştırma Grubu Bireyleri .....	27
3.1.2. Kullanılan Araçlar .....	27
3.1.2.1. Kullanılan Aygıtlar .....	27
3.1.2.2. Cam Malzeme .....	28
3.1.3. Kimyasal Maddeler .....	28
3.1.4. Kullanılan Problar.....	30



3.2. Yöntem.....	30
3.2.1. Materyal Alımı.....	30
3.2.2. Sitogenetik Analiz.....	30
3.2.2.1. Preparatların Boyanması.....	32
3.2.3. Moleküler Sitogenetik Analiz.....	32
3.2.3.1. FISH Tekniğinin Uygulanması.....	33
3.2.3.1.1. Preparatların Ön Yıkaması ve Denatürasyonu..	33
3.2.3.1.2. Prob Denatürasyonu.....	33
3.2.3.1.3. Hibridizasyon.....	34
3.2.3.1.4. Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar.....	34
3.2.3.1.5. Hibridize Olan Bölgelerin Görüntülenmesi.....	34
3.2.3.1.6. Preparatların Mikroskopta İncelenmesi.....	35
3.2.3.1.7. Değerlendirme.....	35
3.3. Kullanılan Stok Solüsyonlar.....	36
3.2.4. İstatistik Analiz.....	40
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>41</b>
4.1. Olgularımızın Demografik Bulguları.....	41
4.2. Multipl Myelom Tanısı Alan Olgularda Sitogenetik Analiz Verileri.....	43
4.3. Multipl Myelom Tanısı Alan Olgularda FISH Analiz Bulguları .....	47
4.3.1. Kromozom 13 aberasyonları (-13/13q delesyonu).....	47
4.3.2. IGH (14q32) aberasyonları.....	48
4.3.3. TP53 (17q13) delesyonu.....	48
4.3.4. Sayısal aberasyonlar.....	49
4.3.5. Hiperdiploidi.....	49

4.4. Çalışmaya İlişkin İstatistik Verileri .....	62
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>64</b>
5.1. Olgularımızın Demografik Sonuçlarının Tartışması.....	64
5.2. Konvansiyonel Sitogenetik Analiz Bulgularının Tartışması.....	64
5.3. Moleküler Sitogenetik (FISH) Analiz Bulgularının Tartışması.....	67
5.3.1. Kromozom 13 aberasyonları (-13/13q delesyonu).....	68
5.3.2. IGH (14q32) aberasyonları.....	71
5.3.3. TP53 (17q13) delesyonu.....	74
5.3.4. Hiperdiploidi.....	76
5.3.5. Kromozom 15 aberasyonları.....	77
<b>6. SONUÇ.....</b>	<b>79</b>
<b>7. KAYNAKLAR DİZİNİ.....</b>	<b>80</b>

## **ÖZGEÇMİŞ**

## **TABLolar DİZİNİ**

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 2.1.</b> Durie ve Salmon Klinik Evrelemesi.....	11
<b>Tablo 3.1.</b> Hipotonik Solüsyonu.....	36
<b>Tablo 3.2.</b> Carnoy' s Fiksatif Solüsyonu.....	36
<b>Tablo 3.3.</b> GTG Bantlama Solüsyonları.....	36
<b>Tablo 3.4.</b> Preparatların Ön Yıkama Solüsyonları.....	37
<b>Tablo 3.5.</b> Preparatların Denatürasyon Solüsyonları.....	38
<b>Tablo 3.6.</b> Hibridizasyon Sonrası Solüsyonlar.....	38
<b>Tablo 3.7.</b> Görüntüleme Sistemi Solüsyonları.....	39
<b>Tablo 4.1.</b> Multipl myelomlu olgularının yaş, cinsiyet, evre ve Ig tipleri.....	42
<b>Tablo 4.2.</b> Konvansiyonel Sitogenetik Analiz Sonuçları.....	44
<b>Tablo 4.3.</b> Multipl myelom olgularının FISH ve konvansiyonel sitogenetik analiz sonuçları.....	45
<b>Tablo 4.4.</b> FISH analiz bulguları.....	50

<b>Tablo 4.5.</b> Kromozom 15 aberasyonlarının olguların evrelerine göre dağılımları.....	62
<b>Tablo 5.1.</b> Multipl myelom tanısı alan olgularda sitogenetik ve moleküler sitogenetik analiz sonuçlarının karşılaştırılması.....	66

## **ŞEKİLLER DİZİNİ**

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 2.1. İmmünglobulin yapısı.....	5
Şekil 2.2. Malign plazma hücrelerinin oluşumu.....	6
Şekil 2.3. Myelom hücrelerinin büyüme ve yaşaması.....	7
Şekil 2.4. FISH tekniğinin uygulama aşamaları.....	19
Şekil 2.5. Kromozom 13.....	22
Şekil 2.6. Multipl myelom da IGH translokasyonlarının sıklığı.....	23
Şekil 4.1. Araştırma grubu olgularımızdan 25 nolu olguya ait karyotip analiz görüntüsü .....	51
Şekil 4.2. Araştırma grubu olgularımızdan 33 nolu olguya ait karyotip analiz görüntüsü.....	52
Şekil 4.3. Araştırma grubu olgularımızdan 35 nolu olguya ait karyotip analiz görüntüsü.....	53
Şekil 4.4. Araştırma grubu olgularımızdan 44 nolu olguya ait karyotip analiz görüntüsü .....	54
Şekil 4.5. Araştırma grubu olgularımızdan 45 nolu olguya ait karyotip analiz görüntüsü .....	55
Şekil 4.6. Araştırma grubu olgularımızdan 12 nolu olguya ait LSI D13S319 (13q14) / 13q34 probe FISH analiz görüntüsü.....	56
Şekil 4.7. Araştırma grubu olgularımızda 12 nolu olguya ait Cep 15 Probe FISH analiz görüntüsü.....	57
Şekil 4.8. Araştırma grubu olgularımızdan 16 nolu olguya ait LSI P53 (17p13) probe FISH analiz görüntüsü.....	57
Şekil 4.9. Araştırma grubu olgularımızdan 20 nolu olguya ait LSI FGFR3/ IGH t(14;16) q32;q23)Dual Color, Dual Fusion Translocation Prob Set FISH görüntüsü.....	58

<b>Şekil 4.10.</b> Araştırma grubu olgularımızdan 30 nolu olguya ait LSI FGFR3/ IGH t(11;14) q13;q32)Dual Color, Dual Fusion Translocation Prob Set FISH görüntüsü .....	58
<b>Şekil 4.11.</b> Araştırma grubu olgularımızdan 31 nolu olguya ait LSI D13S319 (13q14) / 13q34 probe FISH analiz görüntüsü.....	59
<b>Şekil 4.12.</b> Araştırma grubu olgularımızdan 42 nolu olguya ait LSI D13S319 (13q14) / 13q34 probe FISH analiz görüntüsü.....	59
<b>Şekil 4.13.</b> Araştırma grubu olgularımızdan 42 nolu olguya ait LSI FGFR3/ IGH t(4;14) (p16;q32)Dual Color, Dual Fusion Translocation Prob Set FISH görüntüsü.....	60
<b>Şekil 4.14.</b> Araştırma grubu olgularımızdan 44 nolu olguya ait LSI CSF1R / D5S23, D5S721, Dual color Probe FISH analiz görüntüsü.....	60
<b>Şekil 4.15.</b> Araştırma grubu olgularımızdan 44 nolu olguya ait LSI P16 (9p21) / Cep 9, Dual color Probe FISH analiz görüntüsü.....	61
<b>Şekil 4.16.</b> Araştırma grubu olgularımızda 44 nolu olguya ait Cep 15 Probe FISH analiz görüntüsü.....	61
<b>Şekil: 4.17.</b> -13/13qdelesyon ve/veya IGH aberasyonları ve/veya P53 delesyonu bulunduran olguların sağ kalım süreleri.....	63

## **SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
µl	Mikrolitre
CBC	Tam Kan Sayımı
CGH	Komperativ Genomik Hibridizasyon
CRP	Serum C Reaktif Protein
DAPI	4',6'-diamino-2-fenilindol
Del	Delesyon
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EP	Elektroforez
FISH	Floresan In Situ Hibridizasyon
FMS	Koloni Uyarıcı Faktör
gr	Gram
GFR	Büyüme Faktör Reseptörü
GTG	Giemsa- Tripsin –Giemsa Bantlama
GTP	Guanozin Trifosfat
IEP	Immünoelektroforez
Ig	Immünglobulin
IL-6	Interlökin 6
ISH	In Situ Hibridizasyon
KCl	Potasyom Klorid

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Potasyum Dihidrojen Fosfat
KML	Kronik Myeloid Lösemi
MGUS	Önemi Bilinmeyen Monoclonal Gammopathy
MI	Mililitre
MM	Multipl Myelom
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Di-sodyum Hidrojen Fosfat
NaCl	Sodyum Klorid
NaOH	Sodyum Hidroksid
PBS	Fosfat Buffer Saline
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PHD	Plazma Hücre Diskrazisi
RB	Retino blastoma
rpm	Round Per Minute
SPEP	Serum Protein Elektroforez
SSC	NaCl <sub>7</sub> Trisodyum Sitrat
TNF	Tümör Nekroz Faktör
TSG	Tumör supresör genler
UPEP	İdrar Protein Elektroforez
β <sub>2</sub> -m	Beta-2 Microglobulin



## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Yaklaşık olarak tüm kanserlerin %1 ini, tüm kanser ölümlerinin %2 sini oluşturan multipl myelom (MM) hematolojik kanser türüdür (29). Toplumda görülme sıklığı yılda 3-4/100.000 olgu kadardır (5,35). Ortalama teşhis edilme yaşı altmış yaşın üzerindedir ve yaş ilerledikçe insidansı artmaktadır (5,29). Kırk yaşın altındaki hastalar, olguların ortalama %3 ünü oluşturur (5). Multipl myelom bayanlara oranla erkeklerde çok daha sık görülür (2:3) (5,19,29,35).

Multipl myelom, aşırı monoklonal immünoglobulin (IgG, IgA,IgD) veya Bence Jones protein (k veya  $\lambda$  hafif zinciri) yapımı ile kendini belli eden bir hastalıktır. Oluşumunda çoklu genetik hasar sonucu malign plazma hücrelerinin meydana geldiği ve kontrol edilemeyen şekilde bölünerek çoğaldığı düşünülmektedir. Konvensiyonel sitogenetik ve FISH çalışmaları ile sık görülen bazı anomalilerin hastalığın evresi ve prognozu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (12,20,24,36).

Multipl myelomda birçok farklı genetik düzensizlik görülmekle birlikte, 13. kromozom anomalileri (13q14 delesyon, 13q34 delesyon, monozomi 13), 14. kromozomun IGH lokusunu içeren ve çeşitli partner genlerle translokasyonlar ( t(4;14), t(11;14), t(14;16)), bazı kromozomların trizomileri (3,5,7,9,11,15,19,21. kromozomlar) ve P53 delesyonu daha sık oranda bildirilmiştir (9,11,12,13,17,20,21,35,41,43).

Bu çalışmada, Konvensiyonel sitogenetik ve FISH yöntemleri kullanılarak multipl myelom tanılı olgularımızda kromozomal aberasyonların sıklığını belirleyerek ve saptanan yeniden düzenlenmeler ile hastalığın evresi ve prognozu arasında ilişki kurulmaya çalışılmıştır.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser nedir?

Kanser, hücrenin normal davranışlarını düzenleyen mekanizmanın bozulması sonucu oluşur. Ölüm nedeni olarak kalp ve damar hastalıklarından sonra gelir. Batı toplumunda her yıl yaklaşık ikiyüzelli kişiden biri kansere yakalanmaktadır. Altmış yaşın üstünde ise kanser sıklığı çok artmakta üçyüz kişide 4-5 civarına yükselmektedir. Ülkemizde kesin istatistikler bulunmamakla birlikte insidansının bunun yarısı kadar olduğu tahmin edilmektedir (22).

Orijin alan hücre tipine göre kanserler üç gruba ayrılır.

1. Karsinomlar: Bağırsak mukozası, bronşlar veya meme duktusları gibi epitel hücrelerinden kaynaklanırlar. İnsan kanserlerinin %90 ını oluştururlar. (22,40)
2. Sarkomlar: Kemik, kas yada konnektif doku gibi mezenşimal dokulardan kaynaklanırlar (22,40).
3. Hematopoetik: Kemik iliği, lenfatik sistem ve periferik kan boyunca yayılan lösemi ve lenfomalardır. İnsan kanserlerinin yaklaşık %7 sini oluştururlar (40).

### 2.2. Hematolojik Malignensiler

Hematolojik malignensiler kan hücrelerinin ve ilgili yapıların kontrolsüz bölünmesiyle gerçekleşen hastalıklardır. Hematolojik malign hastalıklar önceleri lösemi, lenfoma ve multipl myelom olmak üzere üç başlıkta altında incelenmekte ve hastalıklar morfolojik, histopatolojik ve klinik özelliklerine göre sınıflandırılmaktaydı. Daha sonraki yıllarda hematolojik malignensiler 5 ana grup içerisinde ele alınmıştır.

- 1) Lösemiler
  - Akut Lösemiler
  - Kronik Lösemiler
- 2) Myeloproliferatif Hastalıklar
- 3) Myelodisplastik Sendrom
- 4) Lenfomalar
  - Hodgkin Lenfoma
  - Nonhodgin Lenfoma
- 5) Plazma hücre Diskrazileri (PHD)
  - Multipl Myelom
  - MGUS
  - Waldenström Makroglobulinemisi
  - Ağır Zincir Hastlıkları
  - Amiloidoz

### **2.2.1. Plazma Hücre Diskrazileri (PHD)**

Çeşitli antijenik uyarımlar karşısında B-lenfositler antikor sentezleme yeteneğine sahip plazma hücrelerine dönüşürler. Dengeli çalışan bir immün sistem, bu işlevi farklı antijenik uyarılara kontrollü hücresel ve humoral yanıt vererek sürdürür. Bu yanıtın fizyolojik sınırlar dışında gelişmemesi, yani antikor sentezleme özelliğine sahip plazma klonlarından birinin denetim dışı anormal çoğalması, *plazma hücre hastalıkları* olarak adlandırılan bir grup klinik tablonun oluşmasına yol açar. Bu hastalık grubu içerisinde klinik ve laboratuvar bulguların oluşmasına iki temel mekanizma neden olur.

- a) İmmünglobulin sentezleme özelliğine sahip plazma hücrelerinin denetimsiz çoğalmaları.
- b) Bu hücreler tarafından sentezlenerek plazmaya salınan bir cins homojen immünglobulin veya immünglobulin alt parçasının bulunması. Bu proteine tek bir plazma hücre klonundan geldiği için monoklonal protein veya M protein

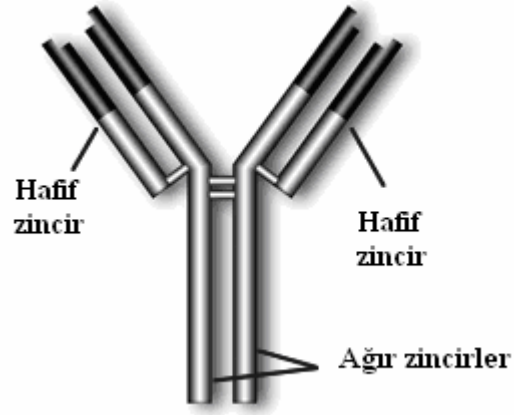
denir. M protein bir immünglobulinin tümü olabileceği gibi, ağır zincirlerden veya hafif zincirler (lambda veya kappa) gibi alt birimlerden bir tanesi de olabilmektedir (7,33,35).

### **2.2.1.1. MULTİPL MYELOM**

Multipl Myelom (MM), plazma hücre tümörüdür (1,5,9,11,29,33,41,47). Plazma hücreleri immün sistemin önemli bir kısmıdır, immünoglobulinler üreterek hastalıklara ve enfeksiyonlara karşı savunmada yardımcı olur (29). Multipl myelom, aşırı monoklonal immünoglobulin (IgG, IgA, IgD) veya Bence jones protein (serbest monoklonal  $\kappa$  veya  $\lambda$  hafif zinciri) yapımı ile kendini belli eden ve sıklıkla multiple osteolitik lezyonlar, hiperkalsemi, anemi, renal harabiyet veya bakteriyel enfeksiyonlara duyarlılık görülen ilerleyici bir neoplastik hastalıktır (5,29,33,41).

#### ***2.2.1.1.1. İmmün sistemde normal plazma hücrelerinin görevi***

Kan hücrelerinin tümü kemik iliğinde bulunan hematopoetik kök hücreden yapılır. Plazma hücreleri de hematopoetik kök hücreden yapılan B lenfositlerinin farklılaşması ile oluşur (29,41). Plazma hücrelerinin temel görevi antikor üreterek yabancı ajanlara karşı vücut savunmasını güçlendirmektir. İnsan vücudu doğumdan itibaren sürekli farklı antijenlerle karşılaşmaktadır. Bu antijenlerle karşılaşan B lenfositler antijenlere karşı uygun tipte ve gerekli miktarda antikor üretecek olan plazma hücrelerine dönüşürler. Her yeni zararlı antijene karşı uygun antikor üretecek yeni plazma hücrelerinin yapımı kontrollü şekilde devam eder. Antikorlar immünglobulin (Ig) yapısındadır (29,34,41). İmmünglobulinler 2 uzun (ağır zincir) ve 2 kısa zincirden (hafif zincir) oluşmaktadır (Şekil 2.1). İmmünglobulinlerin 5 majör sınıfı vardır. Her bir sınıf ağır zincirin tek tipine sahiptir. Gama (IgG), Alfa (IgA), Mu (IgM), epsilon (IgE) ve delta (IgD).

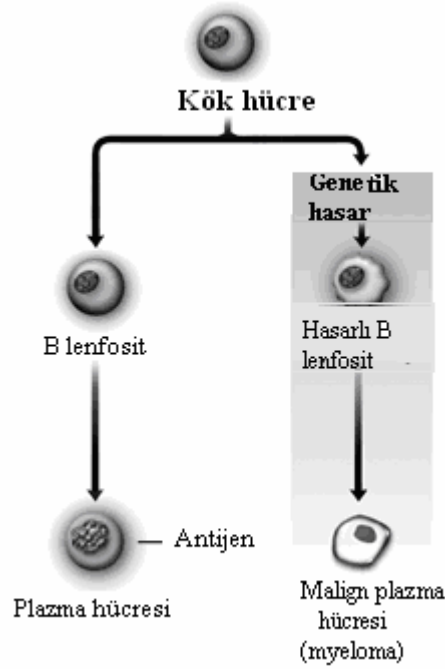


**Şekil 2.1.** İmmünglobulin yapısı ([http://www.multiplemyeloma.org/about\\_myeloma\\_sitesinden](http://www.multiplemyeloma.org/about_myeloma_sitesinden) modifiye edilerek alınmıştır.)

Her tipi vücutta farklı fonksiyonlara sahiptir. Kanda en fazla bulunanlar IgG, IgA, IgM dir. IgD ve IgE çok az miktarda bulunur (29, 34, 41).

#### **2.2.1.1.2. Malign plazma hücrelerinin gelişimi**

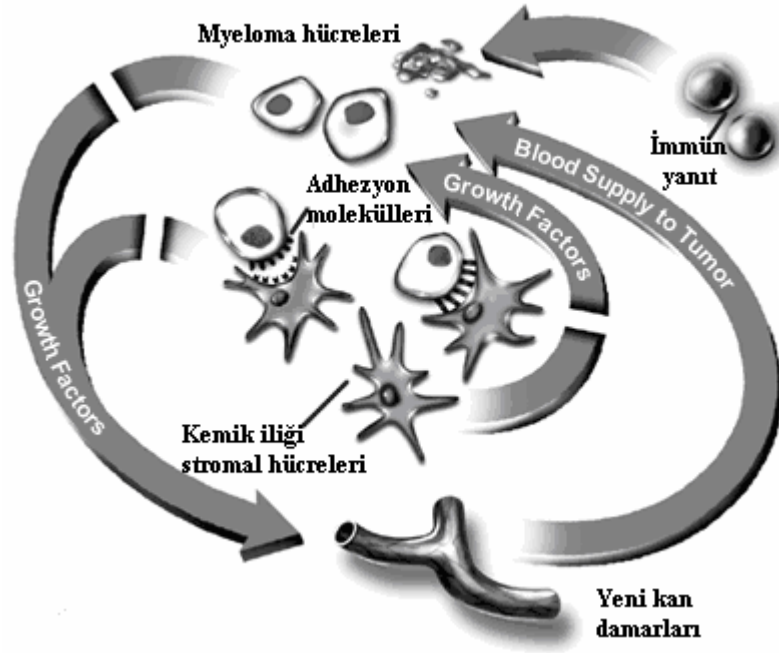
Normalde plazma hücreleri hastalık yada enfeksiyona immün yanıt olarak lenf nodüllerinde B hücrelerinden gelişir. Multiple genetik hasar sonucu malign plazma hücreleri meydana gelir ve kontrol edilemeyen şekilde bölünerek çoğalırlar (Şekil 2.2).



**Şekil 2.2.** Malign plazma hücrelerinin oluşumu

([http://www.multiplemyeloma.org/about\\_myeloma](http://www.multiplemyeloma.org/about_myeloma) sitesinden modifiye edilerek alınmıştır.)

Bu myeloma hücreleri kemik iliğinde birikir ve sağlıklı dokuda sürekli hasara sebep olurlar. Multipl myelom patogeneğinde kemik iliği mikroçevresinin çok önemli rolü vardır. Kemik iliği mikroçevresi ekstrasellüler matriks proteinleri ve kemik iliği stroma hücrelerinden, osteoblast ve osteoklastlardan oluşmaktadır ve hücrelerin büyümesi ve sağkalımı üzerine etkileri vardır. Multipl myelom hücrelerinin stroma hücrelerine bağlanması sitokinlerin transkripsiyonunu ve salgılanmasını başlatır (5,29). İnterlökin-6 (IL-6), insüline benzer büyüme faktörü 1, tümör nekroz faktörü (TNF), vasküler endotelial büyüme faktörü, stroma kökenli faktör -1 MM hücrelerinin çoğalmasını, sağkalımını, göç etmelerini, ilaç direnci ve anjiogenezi sağlar (Şekil 2.3) (5,29,41). Anjiogenez yeni kan damarlarının oluşumudur. Bu yeni kan damarları oksijen ve besin sağlayarak tümörün büyümesine katkıda bulunur. Sonuçta myeloma hücrelerinin çoğalmasını sağlar ve kemik iliğinde baskın hale gelir. Hücrelerin % 10 undan fazlasını oluşturur (29).



**Şekil 2.3.** Myeloma hücrelerinin büyüme ve yaşaması  
([http://www.multiplemyeloma.org/about\\_myeloma](http://www.multiplemyeloma.org/about_myeloma) sitesinden modifiye edilerek alınmıştır.)

Myelom hücreleri monoklonal protein yada paraprotein olarak adlandırılan aynı tip immünglobulin üretirler ve myelomalı bireylerde normal immünglobulin düzeyi baskılanır. Normal immünglobulinlerin aksine M proteini vücutta yararlı değildir. Proses tam olarak anlaşılmasına rağmen, var olan normal plazma hücreleri tarafından üretilen, fonksiyonel immünglobulinin myelomlu hastalarda sağlıklı bireylerden daha hızlı yıkıma uğradığı düşünülmektedir (29).

#### 2.2.1.1.3. Myelom tipleri

İmmünglobulinlerin normal serum konsantrasyonu, myelomun çeşitli immünglobulin tiplerinin frekansı ile paraleldir. En yaygın myeloma tipleri IgG ve IgA dır. IgG tüm myelomlu vakaların % 60 ile % 70 ini, IgA ise vakaların %20 sini oluşturur. (29,33, 41).

Myelom hastalığında kanda M proteini yüksek düzeyde olmasına rağmen, MM lu hastaların yaklaşık %15-20 sinde immünglobülinler eksik üretilir ve immünglobulinin

yalnızca hafif zincir bölümünü içerir. Bu hastalara hafif zincire sahip olan myeloma yada Bence Jones myeloma denir (5,29). Bu hastalarda kandan daha ziyade idrarda M protein bulunur. Bence Jones proteinler rutin idrar analizi ile belirlenemez. İmmünoelektroforez adlı test ile idrarda Bence Jones proteininin tam miktarı belirlenebilir (29).

#### **2.2.1.1.4. Sebep ve İnsidansı**

Yaklaşık olarak tüm kanserlerin %1 ini, tüm kanser ölümlerinin %2 sini oluşturur (29). Toplumda görülme sıklığı yılda 3-4/100.000 olgu kadardır (5,35). Ortalama teşhis edilme yaşı 60 ın üzerindedir ve yaş ilerledikçe insidansı artmaktadır (5,35). Kırk yaşın altındaki hastalar olguların ortalama %3 ünü oluşturur (5). Multipl myelom bayanlara oranla erkeklerde çok daha sık görülür (3:2) (5,19,29,35).

Multipl myelom in sebebi için pek çok araştırma yapılmasına rağmen henüz bir sebep bulunamamıştır (5,29). Bununla birlikte genetik faktörler, bazı virüsler ve meslekler, bazı kimyasallara ve radyasyona maruz kalma hastalığın oluşumunda etkili olabilmektedir (5,29,45).

#### **2.2.1.1.5. Multipl myelomun belirtileri**

Hastalığın belirtileri tutulan bölgeye ve hastalığın yaygınlığına göre değişir. Kemik ağrıları, hastaların yaklaşık % 70 inde vardır ve özellikle kemik iliğinden zengin olan bel ve sırt omurlarında, kaburgalarda ve kalçada ortaya çıkar. Patolojik kırıklar ortaya çıkar. Bağışıklık sisteminde meydana gelen zayıflama sonucu sık enfeksiyonlar görülmektedir. Halsizlik yorgunluk görülür. Böbreklerin zayıf çalışması veya hiperkalsemi sonucu bulantı, kusma, kabızlık görülmektedir. Kandaki paraprotein düzeyine bağlı olarak olguların %10 unda hiperviskosite gelişebilir. Myelom hücrelerinin oluşturduğu kitlenin omurilikte sinir köklerine bası yapması veya kandaki M proteinin sinirlerde harabiyet oluşturması sonucu felce kadar gidebilen güçsüzlük, yürüme, idrar ve gaita yapma sorunları ortaya çıkabilmektedir (5, 35, 45).



### 2.2.1.1.6. Tanı

Multipl myelom tanısı herhangi tek laboratuvar test sonuçlarına dayanarak yapılamaz. Tam teşhis genellikle fiziksel değerlendirme, hasta öyküsü, semptomlar ve laboratuvar testlerini içeren faktörler göz önüne alınarak yapılır (6,28,29).

Myelom semptomlarını gösteren hastalarda tanı için 1 majör ve 1 minör veya 3 minör kriter gereklidir (19,29,45).

#### Majör kriterler

- 1) Biyopside plazmasitoma bulunması
- 2) Atipik plazma hücre oranının gösterilmesi: tanı için olmazsa olmaz kuraldır. Kemik iliği örneklerinde %30 un üzerinde atipik plazma hücresi görülür.
- 3) Kanda veya idrarda M protein varlığının gösterilmesi: Myelom hastalarının %50-60 ında IgG, %20 sinde ise IgA yapısında M protein yapımı vardır. Hastada hangisi yapıyorsa kanda bu immünglobülin düzeyi artar. Tanı için IgG %3,5, IgA ise %2,0 gramın üzerinde olması gerekir. Hafif zincirler böbrekle atıldığından kanda birikmez. Böyle durumlarda ise 24 saatlik idrar toplanarak günlük atılan hafif zincir miktarı ölçülmelidir. 24 saatlik idrarda 1 gramın üzerinde kapa ve lamda hafif zincir varlığı myelom için tipiktir.

#### Minör Kriterler:

- 1) Atipik plazma hücre oranının kemik iliğinde %10-30 arasında olması
- 2) Kan veya idrarda M protein düzeyinin yukarıda belirtilen değerlerden daha düşük olması.
- 3) Myeloma bağlı litik kemik lezyonlarının gösterilmesi (19,29,45). Bunların dışında beta-2 microglobulin ( $\beta$ 2-M) in serum düzeyi tümör büyüklüğünün ölçütü olarak kullanılır. IL-6 seviyesi ise protein seviyesiyle paraleldir.(IL-6 myeloma için büyüme faktörüdür) (13,29,35).

Görülen değişiklikler ve çeşitli protein oranları, özellikle M protein, myeloma hastalığının gelişim yolunu anlamada ve tedaviye yanıtta yardımcı olabilir (6).

24 saatlik idrar proteini ve UPEP: Hastaların idrarında M protein varlığını gösterir. Bu değerlendirmeler hastalığın gelişimini belirleme, evre ve tedaviye yanıtta yardımcı olabilir.

Kan testi: CBC ile kandaki kırmızı ve beyaz kan hücreleri ve trombositlerin sayısı ölçülür. Aynı zamanda beyaz kan hücrelerinin değişik tiplerinin oranları belirlenerek normal aralıkta olup olmadığı kontrol edilir.

Kemik Testleri: Multipl myelom da en sık rastlanan semptom kemik ağrısıdır. Nedeni ise infiltrasyonu oluşturan malign klondan salınan çeşitli sitokinlerin meydana getirdiği yaygın osteoporozdur. Kemiklerde zımba deliği lezyonları oluşur. Fakat litik kemik lezyonları MM den başka meme ve akciğer kanserlerinde de görülebileceğine dikkat edilmelidir (5,7,28,33,35).

Ayrıca kemik iliği örnekleri de incelenebilir. Kemik iliği aspirasyonu ile plazma hücre yüzde oranı belirlenir ve kemik iliği örneklerine konvensiyonel sitogenetik ve FISH analizi yapılabilir.

#### **2.2.1.1.7. Evreleme**

Hastalığın ilerleme evresine göre 3 evresi vardır. Hastalığın evresine göre uygulanacak tedavi seçenekleri değişir. Tablo 2.1 de Durie ve Salmon un klinik evrelemesi verilmiştir (5,19,28,35).

**Tablo 2.1.** Durie ve Salmon Klinik Evrelemesi

(Yamaç, K., Akan, H.,2000, Hemotolojik Onkoloji Cep Kitabı, Mas matbaa, 1. baskı s:99)

<b>Evre</b>	<b>Kriterler</b>
<b>1</b>	Aşağıdakilerin tümü
	1) Hemoglobin >10 g/dL
	2) Serum kalsiyum <12 mg/dL
	3) Normal kemik grafisi veya soliter lezyon
	4) Düşük M ögesi üretimi <1 gr/ 24 saat
	a) IgG düzeyi < 5 g/dl
	b) IgA düzeyi < 3g/dl
	c) İdrar hafif zincir < 4g/24 saat
<b>2</b>	Ne 1 ne de 2 ye uyan olgular
<b>3</b>	Aşağıdakilerden en az biri
	1) Hemoglobin <8,5 gr
	2) Serum kalsiyum >12 mg/dL
	3) İlerlemiş litik kemik lezyonları
	4) Yüksek M ögesi üretimi
	a) IgG düzeyi >7 g/dl
	b) IgA düzeyi > 5g/dl
	c) İdrar hafif zincir > 12gr/24 saat

Durie ve Salmon evrelemesinde sağkalım süreleri:

Evre 1	>60 ay
Evre 2	36-48 ay
Evre 3	6-24 ay

Hastaların %10 u evre 1 dedir ve hastalığın seyri yavaştır. Bu hastaların acilen tedaviye gereksinimi yoktur fakat seri M protein ölçümleriyle hastalığın ilerlemesi takip edilmelidir. Semptomik, ileri evre (2 ve 3) deki hastaların sistemik kemoterapiye ve çok

özenli bir destekleyici bakıma gereksinimleri bulunmaktadır. Myelom iyileşmeyen malign hastalık olmasına rağmen, sistemik kemoterapi yaşamı uzatır ve yaşam kalitesini belirgin bir şekilde artırır (7).

#### **2.2.1.1.8. Tedavi**

Sessiz myelom olarak adlandırılan hastalarda hastalık semptomsuzdur ve zaman içerisinde çok yavaş ilerleme gösterir. Böyle hastalara kemoterapi yapılmamalıdır. Hastalar üç ay aralıklarla klinik ve biyokimya bulguları yönünden izlenmelidir. Tedaviye ancak progressif kemik lezyonları veya diğer semptomlar geliştiğinde yada serum M protein düzeyinin belirtilen değerlerin üstüne çıkması halinde başlanmalıdır (5,29,45).

Soliter kemik plazmasitoması ve ekstramedüller plazmasitoması olan hastalarda 40Gy dozunda radyoterapi yeterli olur. Bu hastalarda uzun bir yaşam süresi beklenir. Myelomlu hastaların geri kalan çoğunluğunda ise tedavi gereklidir. Tedavi genellikle iki grupta uygulanır.

- Sistemik kemoterapi; myelomanın ilerlemesini kontrol etmeyi amaçlar. Kemoterapide ağız yolu veya enjeksiyon şeklinde genellikle birden fazla ilaç kullanılır. En çok kullanılan ilaçlar MP (melfalan + prednizolon) veya VAD (vinkristin- adriamisin- deksametazon) kombinasyonlarıdır (5,46).
- Destekleyici tedavi; hastalığın komplikasyonlarına bağlı ciddi morbiditeyi önlemeyi amaçlar.
- Evre 2 ve 3 olan tüm hastalar ile progresyon gösteren evre 1 hastalara da sistemik kemoterapi yapılmalıdır.

Multipl myelom bugün hala şifa sağlanamayan ve ölümlle sonlanan bir hastalıktır (5). Fakat günümüzde MM tedavisinde önemli bir yol kat edilmiş olup, gelişmeler halen devam etmektedir.

### **2.2.1.1.9. Prognoz**

Durie ve Salmon evreleme sistemi, hastadaki myeloma kütlesinin boyutlarını ve böbrek işlevini belirlemeye dayanır. Bu evreleme sistemine göre düşük tümör yükü ve böbrek yetmezliği olan hastalarda ortalama yaşam süresi 5,5 yıl (3,5-10 yıl), yüksek tümör yükü ve böbrek yetmezliği olan hastalarda ortalama yaşam süresi 1 yıl (6ay-2 yıl) dır. Hastaların çoğunluğu 2. evrede bulunur ve ortalama yaşam 3-5 yıl olarak bilinmektedir (5). Daha önce tedavi görmemiş hastalarda serum laktat dehidrojenaz düzeyinde iki misli veya daha fazla yükselme kötü prognozu gösterir. Bu durum genellikle yüksek tümör yükü ile birlikte (5). Böyle bir durumda hastalık tedaviye çok dirençlidir ve yaşam süresi 9 ay kadardır.

Serumda C-reaktif protein (CRP) düzeyi IL-6 aktivitesini yansıtır. IL-6 ise daha önce de bahsedildiği gibi önemli bir büyüme ve yaşam faktörüdür. Yüksek CRP düzeyi kötü prognozu gösterir. CRP ve  $\beta$ 2m düzeyleri 6mg/ml den yüksek olduğunda ise prognoz çok kötüdür (ortalama yaşam 6 ay) (5).

### **2.2.1.1.10. Myelomun varyant şekilleri**

#### **Sessiz (Smoldering) Myelom**

Serum M proteini 3 mg/dl den, kemik iliği plazma hücresi de %10 dan fazladır. Anemi, renal yetmezlik, hiperkalsemi, litik kemik lezyonları bulunmaz. İdrarda az miktarda M protein bulunabilir. Serumda diğer immünglobulinlerde azalma vardır. Bu hastalar asemptomatiktir. Hastalık belirti ve bulguları ilerleme göstermediği sürece, bu hastalara tedavi verilmemelidir (5,29,35).

#### **Plazma Hücreli Lösemi**

Periferik kanda %20 den fazla plazma hücresi bulunur. Plazma hücreli lösemi, bir olguda primer olarak gelişebileceği gibi MM seyri sırasında sekonder olarak da ortaya çıkabilir. Primer tipi %60 oranında görülür ve hastalar daha genç yaşta dır.

Hepatosplenomegali ve lenfadenomegali daha sıktır. Kemiklerde litik kemik lezyonları az sayıdadır ve serum M protein miktarı düşük düzeydedir. Tedavisi genellikle başarısızdır. Yaşam süresi kısadır. Sekonder plazma hücreli lösemi ise hastaların %1-2 sinde görülür. Tedavi şansı çok düşüktür.

### **İmmünglobülin D Myelom**

Serumda M protein miktarı düşüktür. İdrarda lambda tipi hafif zincir sıktır. Tedavi MM de olduğu gibi yapılır.

### **Ekstramedüller Plazmasitom**

Kemik iliği dışında görülür. Burun boşluğu ve sinüsler, nazofarinks ve larinks en sık tutulan yerlerdir (5,35). Epistaksis, rinore ve burun tıkanıklığı en sık rastlanan semptomlardır. Erken evredeki hastalarda radyoterapi tedavi sağlar. MM ye doğru ilerleme nadirdir.

### **Osteosklerotik Myelom**

POEMS kısaltması (polinöropati, organomegali, endokrinopati, M protein, deri değişiklikleri) bu sendromun öğelerini tanımlar. Plazma hücrelerinin sekrete ettiği monoklonal immünglobulinin periferik sinirler üzerine toksik etkisi olduğu ve endokrin anomalilerinden sorumlu olduğu kabul edilir. Tek yada mutiple osteosklerotik kemik lezyonları bulunur. Tanı osteosklerotik lezyonlardan biyopsi yapılması ile konabilir.

### **Soliter Plazmasitom**

Sistemik MM bulguları olmadan, kemiklerde veya yumuşak dokularda plazma hücreleri tarafından oluşturulan kitlelere verilen isimdir. Tanı histopatolojik olarak konulur. Tedavi ise bu kitlenin çıkarılması ve radyoterapi verilmesi şeklinde yapılır. Soliter plazmasitoma belirlenen hastaların yaklaşık %55 inde 10 yıl içerisinde sistemik MM, zaman içinde gelişebilmektedir. Olguların %10 unda ise aynı yerde lokal nüks veya başka vücut bölgelerinde başka soliter plazmasitomalar ortaya çıkabilmektedir (35).

## 2.3. HEMATOLOJİK MALİGNANSİLERDE SİTOGENETİK VE MOLEKÜLER SİTOGENETİK ANALİZ

### 2.3.1. Hematolojik Malignansilerde Sitogenetik Analizler

İlk kez 1890 yılında Alman patolog David von Hansmann kanser biyopsi materyallerinde nükleer ve mitotik yapı düzensizliklerini tanımlamış ve bulguların kanser gelişiminde önemli olduğunu belirtmiştir. Theodor Boveri yaklaşık 25 yıl sonra kansere kromozomal anomalilerin sebep olabileceğini belirtmiştir. Kanserde ilk kromozomal anomali 1960 lı yıllarda Nowell ve Hungerford tarafından KML olgularında tanımlanmış ve bu kromozoma Philadelphia (Ph) kromozomu denilmiştir (26).

Philadelphia kromozomunun keşfiyle kromozomlar ve kanser arasındaki ilişki araştırılmaktadır. Bu sayede oluşan ve oluşmakta olan verilerin sonuçları tanı koyma, prognoz ve terapi planlanmasında sitogenetik tanının önemini ortaya koymuştur (16).

Hematolojik malignansilerde genetik yöntemlerin önemini özetlersek;

- Teşhis koyma yada teşhisin onayı
- Sınıflandırma: malignansinin alt tipinin belirlenmesidir.
- Evre ile ilgili bilgi
- Prognozun gösterilmesi
- Terapi seçimi ile ilgili bilgi
- Hastalığın gerilemesinin kanıtı
- Kemik iliği transplantasyonunun kanıtı

Hematolojik malignansilerde örnek olarak genellikle kemik iliği kullanılmaktadır. Eğer periferik kanda blast oranı yüksekse örnek olarak periferik kan kullanılabilir. Ayrıca plevral sıvı gibi vücut sıvıları, lenf nodları, dalak ve solid tümörler sitogenetik analiz için uygun örnek olabilir (49).

### 2.3.2. Hematolojik Malignansilerde Moleküler Sitogenetik Analizler

Moleküler sitogenetik metodlar ( ISH: In situ hibridizasyon, FISH: Floresan in situ hibridizasyon, CGH: Comperative genomic hybridization ) klasik sitogenetik yöntemlerle belirlenemeyen yeniden düzenlenmeleri ve kromozomal mikrodelesyonları belirleme olanağı sağlamaktadır. Sitogenetik rutin GTG bantlama tekniğinde >4Mb, HRB (2000 band düzeyinde) tekniğinde de >2Mb ye kadar olan düzensizlikler belirlenebilmektedir. FISH tekniği ile ise çok daha küçük (1-3 Mb a kadar) olan yapısal düzensizlikler belirlenebilmektedir (4,14,15,16).

### 2.4. Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH)

FISH, denatüre haldeki kromozomlara floresan ile işaretli problemlerin bağlanması temeline dayanan bir tekniktir. Moleküler tekniklerin sitolojik preparatlara uygulanabileceği gerçeği ilk olarak 1969 yılında Gall ve Pardue tarafından ortaya atılmıştır (14,16,26).

Bugün FISH tekniği tıbbın pek çok alanında değişik amaçlarla rutin olarak uygulanabilmektedir:

- Klinik sitogenetik
- Prenetal tanı
- Kanser sitogenetiği
- Mikrodelesyon sendromlarının tanısı
- Tek gen hastalıklarında taşıyıcı ve hasta tanısı
- Onkogen aktivasyon tayini (mRNA düzeyinde)
- Enfeksiyon ajanlarının tanısı olarak gruplandırılabilir (4).

Tümör hücrelerinde kromozom elde edilmesi zordur, elde edilse dahi genellikle kromozom morfolojileri kötü olduğu için güvenilir bir şekilde analiz edilememektedir. Fakat FISH, interfaz nükleusunda analize imkan vermesi nedeniyle kanser genetiğinde kullanılan en önemli tekniktir. FISH analizi tümöre özgü karyotipik anomalilerin



saptanmasında sitogenetik yöntemlere kıyasla çok daha hızlı, hassas ve güvenilirdir (14,16).

Hemotolojik malignensilerde FISH tekniğinin kullanım amaçları şunlardır;

- Hastalık tipine ait spesifik karyotipik anomaliyi belirlemek ( diagnostik amaçlar)
- Tedaviye paralel olarak karyotipik değişikliği belirlemek, izlemek.
- Klinik remisyon ile karyotipik remisyonun paralelliğini belirlemek.
- Kemik iliği nakli sonrası, hastanın kemik iliğinde oluşan hücre popülasyonunun orijininin belirlenmesi (16).

#### **2.4.1. FISH Tekniğinde Kullanılan Problar ve Özellikleri**

Prob; örneklerde aranan genetik materyale (DNA veya RNA) komplementer, radyoaktif veya nonradyoaktif madde ile işaretli DNA veya RNA segmentidir. FISH tekniğinin uygulamasında prob seçimi çok önemlidir. Kullanılacak probun incelenecek materyale, değerlendirilecek anomali tipine ve bölgesine uygun olması gerekir. Ayrıca probun hangi yöntemle işaretlendiği, uzunluğu, RNA veya DNA kaynaklı olması, tek veya çift sarmallı olması sinyal kalitesini etkileyebilir (3).

FISH tekniğinde sitogenetik alanında kullanılan başlıca problar şunlardır;

- Lokusa özgü problar
- Tekrarlayan dizi probları (satellit probları)
- Translokasyon veya kırık noktası yeniden düzenlenme probları
- Tüm kromozomu boyayan problar (library probları)
- Telomer bölgesine özgü problar
- Banda özgü problar ( 3 )

## 2.4.2. FISH Tekniğinin Temel Mekanizması

Moleküler hibridizasyona dayanan bütün yöntemlerin (Southern blotting, Northern blotting, PCR, ISH) altında yatan mekanizma iki komplementer daldan çift sarmal yapının oluşmasıdır. DNA-DNA hibridizasyonunda prob ve hedef DNA ların denatürasyonunu takiben oluşan DNA fragment karışımı, tek dal halindeki fragmentlerin tekrar birleşmesini sağlayacak koşullarda gerçekleştirilir (Şekil 2.4) (2).

FISH prosedürü 6 aşamada gerçekleştirilir;

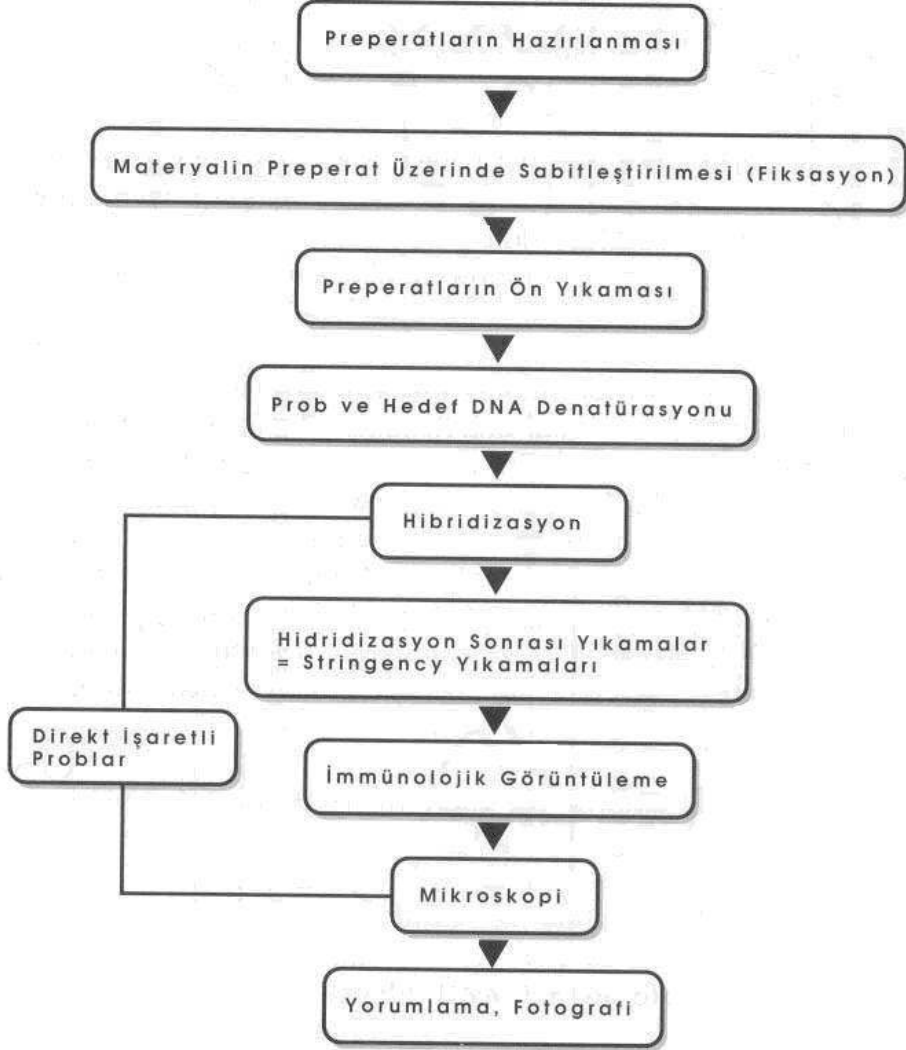
- 1.Preparatların Hazırlanması
- 2.Preparatların Ön Yıkaması
- 3.Prob ve Hedef DNA Denatürasyonu
- 4.Prob ve Hedef DNA Hibridizasyonu
- 5.Hibridizasyon sonrası Yıkamalar
- 6.Görüntüleme ve İnceleme

Hibridizasyonda üç temel aşama önemlidir;

- 1-Hedef dizilerin hibridizasyon sırasında geçirgenliklerini korumaları,
- 2-Probla hedefin yüksek etkinlikle birbirlerine bağlanması,
- 3-Hibridizasyonun spesifik aktivitesi yüksek bir reporter ile en az zemin sinyali olacak biçimde en parlak şekilde görüntülenmesidir.

Bir hibridizasyon reaksiyonunda tolere edilebilen yanlış eşleşme derecesi ‘stringency’ olarak ifade edilir. Yüksek stringency koşullarında, sadece hedef sekansla tam homolog olan problemler stabil hibridler oluştururlar. Düşük stringency koşullarında ise prob sadece % 70–90 homoloji gösteren sekanslara bağlanabilir. Bu spesifik olmayan sinyallerin oluşumu, hibridizasyon sonrası yıkamalarda yüksek stringency koşullarının (yüksek ısı + düşük tuz konsantrasyonu) sağlanmasıyla engellenebilir (2). FISH sonrası problemlerden elde edilen sinyallerin incelenmesinde epifloresan mikroskop

yaygın olarak kullanılmaktadır. Kullanılan florokromların gözlenebilmesi için doğru prob setleri ve uygun filtrelerin seçilmesi gerekmektedir. Birden fazla hedef dizinin görüntülenmesi için doğru filtrelerin kullanılması gerekmektedir (2).



**Şekil 2.4.** FISH tekniğinin uygulama aşamaları (Teorik ve Pratik Floresans İn Situ Hibridizasyon, Ed.Başaran,N.,ETAM,Eskişehir,s:34-39,1996 dan alınmıştır)

## 2.5. Multipl Myelomda Sitogenetik Analizler

Multipl myelomda sitogenetik bulgular lösemi ve lenfoma kadar karakteristik değildir, bildirilen kromozom aberasyonları, karyotipin kompleks olması, hastalığın fazı, süresi ve tedavi cevabı ile yakından ilişkilidir (17).

Multipl myelomlu pek çok hastada düşük proliferasyon oranı sitogenetik çalışmalara engel olmaktadır (1,19,20,21,25,43). Olguların %30-50 si anormal karyotipe sahiptir. Karyotipler genellikle komplekstir ve aneuploidi de görülür. Multipl myelomda karyotipler aneuploidi bakımından 2 majör gruba ayrılabilir (27).

1. Hyperdiploid MM: 48 ila 74 kromozom bulunabilir.
2. Nonhiperdiploid MM : 48 veya 74 den daha az kromozom bulunabilir (13,21).

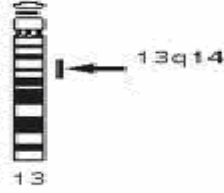
Bu ploidi gruplarının da prognozla ilişkili olduğu ve ploidi gruplarına göre bazı anomalilerin daha sık olduğu düşünülmektedir (13,21,27). Örneğin hiperdiploid tipinde trizomili kromozom oranı fazla (özellikle 3,5,7,9,11,15,19,21. kromozomlar) fakat IGH translokasyonlarının oranı düşüktür. Hiperdiploid karyotipe sahip olgular iyi prognostik gruba dahil edilmekle birlikte genetik olarak oldukça heterojendirler. İyi prognostik sınıfta bulunan hiperdiploid olgularda anomaliler arasında 13q delesyonu ve/veya 1q amplifikasyonu daha az sıklıkla IGH translokasyonları görülüyorsa kötü prognostik sınıfa dahil olmaktadır (17). Tüm MM olgularının %9-20 sinde psödohipodiploid ve %10-30 unda hipodiploid karyotip saptanabilmektedir. Görülme sıklıklarına göre kısmi yada total monozomiler; 13q, 14, 6q, 8, 16, X (kadınlarda), Y kromozom kayıpları olarak bildirilmiştir. Yapılan çalışmalar non-hiperdiploid karyotiplerde %85 in üzerinde olguda IGH translokasyonları ve sıklıkla 13q delesyonları gözlemlendiğini bildirmiştir (13,17,21,25,27). Bu olgular yüksek oranda gözlenen IGH translokasyonları nedeniyle kötü prognostik sınıfa dahil edilmektedirler.

### **2.5.1. Multipl Myelomda Görülen Sitogenetik Anomaliler**

Multipl myelomda, 13. kromozom anomalileri (13q14 delesyonu, 13q34 delesyonu, monozomi 13) 14. kromozomun IGH lokusunu içeren ve çeşitli partner genlerle translokasyonlar ( t(4;14), t(11;14), t(14;16) ), bazı kromozomların trizomileri (3,5,7,9,11,15,19,21. kromozomlar) ve P53 delesyonu daha sık oranda gözlenmiştir (9,11,12,18,20,21,36,43).

#### **2.5.1.1. Kromozom 13 aberasyonları (-13/13q delesyonu):**

Multipl myelom olgularında 13q14 delesyon oranının FISH analizi ile %40-50 olduğu gösterilmiştir (17). Multipl myelomda en sık görülen anomalilerden biridir. 13. kromozom monozomisi görülebileceği gibi, 13. kromozomun uzun kolunun q14 veya q34 bölgesinin kaybı da görülebilir (Şekil 2.5.). 13q34 bölgesinde LAMP1( lizozomal membran protein), PROZ (K vitaminine bağlı kinaz proteini) ve CUL4A(regülatör ve tümör supresör gen) önemli genleri bulunmaktadır. Aynı zamanda q14 lokusunda RB (tümör supresör gen) geni bulunmaktadır (27). Yapılan son çalışmalarda izole 13q14 delesyonlarının tek başına ortalama prognostik bir değere sahip olduğu bildirilmektedir (17). 13q14 delesyonu gözlenen olguların %85-90 ında t(4;14) yada t(14;16) gözlenmektedir. Delesyona non-hiperploid karyotipin veya bir translokasyon eşlik ediyorsa hastanın prognozu oldukça kötü olarak bildirilmektedir (12,13,17,24,27,32,36,43). Hatta 13. kromozom anomalileri karyotip analiziyle belirlendiğinde prognoz daha kötüdür (9,13,30,37).

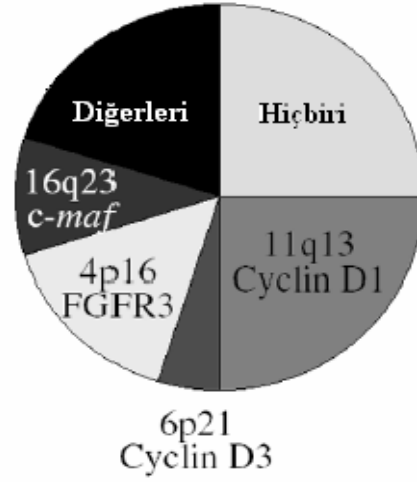


Şekil 2.5. Kromozom 13 (<http://www.vysis.com>. Sitesinden alınmıştır.)

#### **2.5.1.2. IGH (immünglobulin ağır zincir) Bölgesi Aberasyonları:**

MGUS olgularının %50 sinde, intramedüler MM olgularının %60-65 inde, ekstramedüler olguların %70-80 inde, MM hücre dizilerinin %90 ında immünglobulin ağır zincir lokusu (IGH) nun yer aldığı 14q32 yeniden düzenlenmeleri saptanmıştır. PHL olgularının %50 sinde kromozom 14 ün uzun kol yeniden düzenlenmeleri gözlenir (17).

IGH geni 14. kromozomun q32. bölgesinde lokalizedir. Bu gen, bağışıklık sisteminde antijen bağlama ve immün yanıtta görevlidir. Yapılan araştırmalarda IGH bölgesinin çeşitli partner genler ile yeniden düzenlenmesi belirlenmiştir (9,12,13,20,21,25,36,43). Bunlar aşağıda Şekil 2.6 da gösterilmiştir. t(11;14) ve t(14;16) nın erken primer olay olduğu düşünülmektedir (27).



**Şekil 2.6.** MM da IGH translokasyonlarının sıklığı (William S. Dalton, P. Leif Bergsagel, W. Michael Kuehl, Kenneth C. Anderson, and J. L. Harousseau, *Multiple Myeloma*, Hematology 2001, New York NY 10021)

#### ***t(11;14) (q13;q32) Translokasyonu:***

11. Kromozmun q13 bölgesiyle, 14. kromozumun q32 bölgesinin karşılıklı yer değişimidir. Diğer IGH translokasyonlarının aksine konvensiyonel sitogenetikle de belirlenebilecek bir translokasyondur ve MM da görülen IGH translokasyonlarının önemli bir kısmını oluşturur.

$t(11;14)$ , anormal karyotipli MM vakalarının %10-20 sinde belirlenmiştir (37). Özellikle bu translokasyonun cinsiyet ve yaş gruplarıyla ilişkili olmadığı genellikle evre 4 de sık bulunduğu tespit edilmiştir (27). Aberant bir karyotipe sahip olguların %25 inden fazlasında derivatif kromozom 14q saptanmış ve bu olguların 1/3 ünde kronik lenfositik lösemi ve mantle-cell lenfoma ile ilişkilendirilen  $t(11;14)(q13;q32)$  görülmüştür. Sitogenetik olarak Mantle-cell lenfomada görülen translokasyonla aynı olmakla birlikte 14q moleküler kırık noktası farklılık gösterir (17).

11. kromozomun q32 bölgesinde cyclin D1, MTC ve FGF4 (fibroblast growth faktör 4) genleri bulunur. Cyclin ailesinin bir üyesi olan cyclin D1 geni, hücre döngüsü sırasında G1 fazı boyunca gelişimi kontrol etmek gibi çok önemli görevi vardır. FGF4 geni ise bir protoonkogendir (30,37). Cyclin D1 ekspresyonunda IGH-Switch-

bölgesindeki translokasyon nedeniyle bir deregulasyon görülmektedir (43). Bu varyant translokasyonun tam anlamı bilinmemekle birlikte immunohistokimyasal tekniklerle Cyclin D1 over ekspresyonu görülmektedir. Olguların çoğunluğunda translokasyon dengeli olmakla birlikte bazı olgularda kromozom 14 ün kısmi veya total ile birlikte gözlenebilir. Kimi zaman kompleks bir karyotipin parçası olarak, delesyon 13 (%40 olgu) veya 1. kromozomun yapısal yeniden düzenlenmeleri ile birlikte (%30 olguda) görülebilir. Birçok olguda iyi prognostik olarak bildirilmiştir (9,12,13,17,20,21,37).

***t(4;14) (p16;q32) Translokasyonu:***

14. kromozomun q32 bölgesi ile 4. kromozomun p16 bölgesi arasındaki parça değişimidir. 4. kromozomdaki kırık telomerik bölgede meydana geldiği için karyotipik olarak belirlenmesi güç bir translokasyondur.

Multipl myelomlu vakaların ortalama %15 de belirlenmiştir (17,27,37). 4. kromozomun p16 bölgesinde FGFR3 (fibroblast growth faktör reseptörü 3) WHSC1 (wolf-hirschhorn 1) WHSC2 (wolf-hirschhorn 2) SLBP (stem-loop (histon) binding protein) MXO4 ve MAEA (makrofaj eritroblast ataçlayıcı) genleri bulunur. FGFR3 geni, iskeletin normal gelişimi için gerekli olan kondrositlerin çoğalma ve farklılaşmasında önemli rolü vardır. WHSC1 ve WHSC2 genleri transkripsiyonda görevlidir. SLBP, replikasyona bağlı, histon gen ekspresyonunda görevlidir. MAEA geni ise apoptozu baskılayarak eritroblastların son olgunlaşmasında görev almaktadır. Translokasyon sonucunda IGH-MMSET ve FGFR3-IGH şeklinde iki füzyon gen oluşur. IGH enhancer etkisi nedeniyle FGFR3 geni over ekspresyona uğrar. Olguların bir kısmında FGFR3 geninin overekspresyonu gözlenmemektedir (17,30). 4p16 translokasyon kırık noktasıda bulunan MMSET genindeki durum ve mekanizma henüz tam aydınlatılamamıştır. Multipl myelom patogenezinde bu genlerin disregülasyonunun önemli olabileceği düşünülmektedir. t(4;14) kötü prognostik sonuca sahiptir (9,12,13,17,18,20,21,37).



### ***t(14;16) (q32;q23) Translokasyonu:***

14. kromozom ile 16. kromozom arasındaki translokasyondur. Multipl myelomlu vakaların % 5 inde tespit edilmiştir (16, 24, 43). t(4;14) gibi t(14;16) da karyotipik olarak belirlenmesi güç bir translokasyondur.

16. kromozomun q23 bölgesinde C-MAF geni bulunur. Bu gen MAF ailesinin bir üyesidir ve protoonkogendir. CCND2, integrin-β7 ve CCR1 genlerine bağlı ekspresyonu kontrol eder. Bu genin deregülasyonu hücre siklusunun kontrolü, apoptozisde ve hücreler arası haberleşmede karışıklığa yol açar. C-MAF yabancı tip in vitro fibroblast transformasyonunu sağlar. C-MAF in myelomgenezdeki rolü henüz tam olarak açıklanamamıştır. Birçok olguda kötü prognostik sonuca sahip olduğu bildirilmiştir (12, 13,17,18).

### ***2.5.1.3. TP53 (17p13):***

P53 geni 17. kromozomun kısa kolunun p13 bölgesinde lokalizedir. DNA ya bağlı transkripsiyon faktörü ve tümör supresör genidir. P53 genindeki mutasyonlar genel olarak kanserlerde görülen en yaygın genetik değişikliktir (30). Multipl myelomlu hastalarda da P53 delesyonu rapor edilmiştir. Diğer lenfoid tümörlerde olduğu gibi P53 delesyonu ile ileri hastalık evresi, kısa yaşam süresi, kötü prognoz arasında yüksek korelasyon vardır (9,12,13,17,20,36).

### ***2.5.1.4. Sayısal Aberasyonlar***

#### ***Trizomiler***

En sık görülen trizomilerden 5, 9 ve 15. kromozoma ait değişimlerde, 5. kromozomun %40, 9. kromozom %42, 15. kromozom % 33 oranında FISH yöntemiyle trizomi saptanmıştır (1). CGH yöntemi ile yapılan bir çalışmada, 5q ve 9q bölgesinde %24, 15q bölgesinde ise % 22 oranında artış tespit edilmiştir (25).

Ayrıca hiperdiploid karyotiplerde 5, 9 ve 15. kromozomun trizomisi en sık görülen trizomilerdendir (10,13,21,37,39). 5. kromozomun trizomisi AML ve ALL de, 15. kromozomun trizomisi ise özellikle MDS nin erken evrelerinde sık görülmektedir (27).

#### **2.5.1.5. Diğer Aberasyonlar**

Kromozom 1 in yapısal anomalileri karyotip değişimi belirlenen myelom olgularının %40 ında gözlenmektedir. Bu olguların yarısında translokasyon partneri ve kırık noktaları çeşitlilik göstermiştir. Yapılan çalışmalar 1q12 bölgesinin MM patogenezinde rol oynayabileceğini var saymaktadır. PHL olgularında tüm sitogenetik aberasyonların 2/3 ü kromozom 1 in yeniden düzenlenmeleri olup kısa yada uzun kolda translokasyondan delesyona kadar farklı kırık noktaları ile karşımıza çıkmaktadır. Kromozom 6 nın uzun kol delesyonları özellikle 6q21 ve farklı kırık noktalarında bildirilmektedir. Olguların %2-5 inde gözlenmektedir (17).

Multipl myelomda P16 geninin hipermetilasyon nedeniyle inaktivasyonu sonucu hastalarda yüksek sıklıkta geç evre ya da PHL bildirilmiştir (17).

### **3. GEREÇ ve YÖNTEMLER**

#### **3.1. Gereç**

##### **3.1.1. Araştırma Grubu Bireyleri**

Multipl myelom tanısı alan olguların kemik iliğinden konvansiyonel sitogenetik ve FISH analizleri Eylül 2005 - Ocak 2008 tarihleri arasında Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Kanser Sitogenetiği Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Araştırma grubunu, MM tanısı almış 50 olgu oluşturmuştur. Bu olgulardan 44 tanesi Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalından, 3 tanesi Eskişehir Yunus Emre Devlet Hastanesi Hematoloji Bölümünden, 3 tanesi ise İstanbul Genetiks laboratuvarından bölümümüze yönlendirilmiştir.

##### **3.1.2. Kullanılan Araçlar**

###### **3.1.2.1. Kullanılan Aygıtlar**

Bek

Ben Mari (Heto-DT Hetoterm)

Binoküler araştırma mikroskobu (Olympus CH-2)

Buzdolabı (Arçelik 415)

Cam Kalem

Sensys Kamera (Sensys)

Deep-Freeze (Heraeus)

Elektronik Terazı (Seuter, Ainworth-AA-250, Setra-M2000L)

Enjektör

Etüv (Friocell MMM Med Center)

Floresan mikroskop (Olympus BX-61)

Image Analyser (Applied Imaging)

Kronometre

Lamin Air Flow (Heraeus ELB2448)  
Mikropipet (Eppendorf)  
Mikrosantrifüj (Eppendorf Centrifuge 5415)  
pH Metre (Jenco)  
Pipet Uçları  
Termometre  
Vortex (Janke and Kunkel, UF-2)  
Zaman Ayarlı Santrifüj (Heraeus)

#### **3.1.2.2. Cam Malzeme**

Beher (500 ml, 1000 ml)  
Erlenmayer (500 ml, 1000 ml)  
Lam  
Lamel  
Mezür  
Santrifüj Tüpü  
Yatay ve dikey Şale

#### **3.1.3. Kimyasal Maddeler**

Absolü Ethanol (Merck)  
Antifade (Vector)  
RPMI 1640 ( Biological industries)  
PAN (Biotect)  
DAPI (Sigma)  
Colcemid Solution (Biological industries)

Antibiyotik (Biological industries)

Distile Su

Entellan (Merck)

Giemsa (Merck)

Glacial acetic acid (Merck)

HCl (Merck)

İmmersiyon yağı (Merck)

KCl (Merck)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck)

Ksilol (Merck)

Methanol (Merck)

MgCl<sub>2</sub> (Merck)

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Merck)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck)

NaCl (Merck)

NaOH (Merck)

Parafilm (Pechiney)

Rubber Cement (Sanford 00491)

Serum Fizyolojik

Trypsin (Sigma)

Tween 20 (Sigma)

### **3.1.4.Kullanılan Problar**

LSI D13S319 (13q14.3) Probe (Vysis)

LSI 13q34 (Vysis)

LSI P53 (17p13.1) (Vysis)

LSI CSF1R/D5S23, D5S721 (Vysis)

LSI P16 (9P21) / CEP 9 (Vysis)

CEP 15 Probe (Vysis)

LSI FGFR3/ IGH t(4;14) (p16;q32)Dual Color, Dual Fusion Translocation Prob Set (Vysis)

LSI IGH/ MAF t(14;16) (q32;q23) Dual Color, Dual Fusion Translocation Prob Set (Vysis)

LSI CCND1/ IGH t(11;14) (q13;q32) Dual Color, Dual Fusion Translocation Prob Set (Vysis)

## **3.2. Yöntem**

Multipl myelom tanısı alan olgulara ilişkin kemik iliği örneklerinde, konvansiyonel sitogenetik ve moleküler sitogenetik analizler gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.1. Materyal Alımı**

Multipl myelom tanısı konan her olgudan heparinize enjektörlere 2–3 ml kemik iliği alınmış ve Anabilim Dalımız Sitogenetik Laboratuvarına ulaştırılmıştır.

### **3.2.2 Sitogenetik Analiz**

Araştırma serisinde sitogenetik analizler standart kemik iliği yöntemine göre yapılmıştır.

Çalışmada 72 ve 120 saatlik kemik iliği kültür tekniği kullanılmıştır.

- Aseptik koşullarda 5–6 damla heparinize kemik iliği 4,5 ml'lik RPMI 1640 ve PAN besi ortamına eklenmiştir.
- Tüpler, 72 ve 120 saatlik kültür yapmak üzere 37°C deki etüve kaldırılmıştır.
- 0,1 ml (10µg/ml) lik colcemid ilavesi, 72 saatlik kültürlerde 48.saatte, 120 saatlik kültürlerde ise 115.saatte (yaklaşık olarak harvest aşamasından 5 saat önce) gerçekleştirilmiştir.
- Tüpler birkaç kez ters çevrilerek karıştırılmış ve 37°C lik etüve konulmuştur.
- Kültür sonrası tüpler 1300 rpm de 8 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır.
- Her tüpe önceden 37°C ye getirilmiş hipotonik (0,075 M lık KC1) solüsyon vorteksle karıştırılarak eklenmiştir.
- Tüpler 37°C lik etüvde 25 dakika bekletilmiştir.
- Etüvden çıkan tüplerin üstüne 3–5 damla Carnoy's fiksatif (3:1 methanol/glacial acetic acid) ilave edilerek prefiksasyon işlemi yapılmıştır.
- 1300 rpm de 8 dakikalık santrifüj sonrasında supernatant atılmıştır.
- Tüplere, vorteks üstünde 5 ml Carnoy's fiksatif eklenmiş ve santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası süpernatant atılmış ve bu işlem iki kez daha tekrarlanmıştır.

- Supernatant atıldıktan sonra pelet süspansiyon haline getirilerek önceden temizlenmiş lamlara 20-25 cm yükseklikten 45° açı ile yayılmıştır. Peletin bir kısmı FISH analizleri için -20 °C ye kaldırılmıştır.
- Preparatlara GTG bantlama uygulanmıştır.

### **3.2.2.1. Preparatların Boyanması (GTG Bantlama)**

Bu boyama yöntemi uygulanmadan önce preparatlar 1 gece 65°C lik hot- plate de bekletilerek yaşlandırılmıştır.

- Yaşlandırılmış preparatlar 27 °C deki tripsin solüsyonunda 9-30 saniye arasında bekletilmiş ve süre bitiminde çeşme suyu ile muamele edilmiştir.
- Preparatların üzerine boya solüsyonundan( PBS 2 ml, Giemsa 0,5 ml) 2 ml eklenmiş ve 2-3 dk arasında bekletilmiştir.
- Süre bitiminde çeşme suyu ile muamele edilmiştir.
- Boyanmış olan preparatlar oda ısısında kurutularak entellan ile kalıcı preparat haline getirilmiştir.
- Hazırlanan preparatlar mikroskopta incelenmiştir.

Sitogenetik değerlendirme International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) (2005 ) kriterlerine göre yapılmıştır. Karyotip analizinde her olgu için en az 20 metafaz plağı değerlendirilmiştir.

### **3.2.3. Moleküler Sitogenetik Analiz**

Moleküler sitogenetik analizlerde preparasyon aşaması çok önemlidir. Kaliteli sinyal almak ve ideal şartlarda analizi gerçekleştirmek için lamın belirli bölgelerine



yayılmış yeterli sayıda ve kalitede (protoplazmadan arındırılmış) metafaz plaklarının ya da interfaz hücrelerinin bulunması gerekir.

### **3.2.3.1. FISH tekniğinin uygulaması**

FISH tekniğinde Rieder ve arkadaşları tarafından geliştirilen protokol laboratuvar şartlarımıza uygun hale getirilerek uygulanmıştır (46).

#### **3.2.3.1.1. Preparatların ön yıkaması ve denatürasyonu**

- Preparatlar her biri 1 dakika olmak üzere sırasıyla % 100–70–50–30 luk alkol serisinden ve 1 dakika 0.1XSSC solüsyonundan geçirilerek dehidre edilmiştir.
- Preparatlar hemen 70 °C deki 2XSSC solüsyonuna alınmış ve bu ısıda 30 dakika bekletilmiştir.
- 30 dakika sonunda 2XSSC solüsyon ısısının 37 °C ye gelmesi beklenmiştir.
- Daha sonra preparatlar 0.07 M lık NaOH solüsyonunda denatüre edilmiştir.
- Denatürasyonu takiben her biri 1 dakika olmak üzere sırasıyla +4 °C de 1XSSC – +4 °C de 2XSSC de bekletilmiştir. Preparatlar % 30 – 50 – 70 – 100 lük alkol serisinde dehidrate edilip, kurumaya bırakılmıştır.

#### **3.2.3.1.2. Prob denatürasyonu**

- Problar benmaride 5 dakika 74 °C de bekletilerek denatüre edilmişlerdir.

### **3.2.3.1.3. Hibridizasyon**

-Lokus spesifik, translokasyon ve sentromer spesifik problemlerin bulunduğu ependorf tüpleri santrifüj edilerek tüm probun dibe çökmesi sağlanmıştır.

-Denatüre edilen preparatlarda belirlenen alanlara prob (5 µl) eklenmiş ve üzerlerine 24mm lik lamel kapatılmıştır.

- Lamel çevresi su girmemesi için rubber cement ile yalıtılmıştır.

- Preparatlar 37 °C de bir gece nemli ortamda hibridizasyona bırakılmıştır.

### **3.2.3.1.4. Hibridizasyon sonrası yıkamalar**

Bu yıkamalarda spesifik olarak bağlanmayan prob DNA sının ortamdan uzaklaştırılması ve olgu DNA sına tam komplementer olan (% 80–100) dizilerin hedef bölgede sabit hale getirilmesi amaçlanmaktadır. Aşamaları:

-Hibridizasyonu tamamlanan preparatlar etüvden çıkartılarak lamellerin çevresindeki yalıtım maddesi dikkatlice temizlenmiştir.

- Preparatlar, oda ısısındaki 2XSSC solüsyonunda hafifçe karıştırılarak lameller preparatlardan uzaklaştırılmıştır.

- Preparatlar 1XSSC solüsyonu ile 74 °C de 5 dakika yıkanmışlardır.

- Sonrasında 2XSSC/T–20 solüsyonunda 5 dakika yıkanmışlardır.

### **3.2.3.1.5. Hibridize olan bölgelerin görüntülenmesi**

Bu aşamada prob ve nukleus DNA sının hibridize olduğu bölgelerin görünür hale getirilmesi amaçlanmaktadır.

Hibridizasyon sonrası yıkamaları yapılan preparatlar 4XSSC/DAPI solüsyonunda 2 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda 15 µl antifade eklenmiş ve lamel ile kapatılmıştır. İnceleme aşamasına kadar – 20 °C de ve karanlıkta bekletilmişlerdir.

### **3.2.3.1.6. Preparatların mikroskopta incelenmesi**

Preparatlar Olympus BX-61 Floresan mikroskobunda uygun filtrelerde incelenmiştir. Floresan mikroskoba bağlı soğutmalı kamera ve görüntü analiz sistemi (Applied Imaging) aracılığıyla her olguya ilişkin FISH analiz verileri fotoğraflanmış ve arşivlenmiştir.

### **3.2.3.1.7. Değerlendirme**

Multipl myelom tanısı alan her olgunun kemik iliği örneklerinden hazırlanan preparatlarda gerçekleştirilen FISH analizlerinde her olguda her prob için en az 200 interfaz nükleusu değerlendirilmiştir. Sinyaller değerlendirilirken birbirine çok yakın olan sinyaller ve sinyal çap büyüklüğü birbirinden farklı olan sinyaller değerlendirmeye alınmamıştır.

Kullanılan her prob için laboratuvarında daha önceden belirlenen cut off değerleri kullanılmıştır. Buna göre LSI D13S319 (13q14.3) (Vysis), LSI 13q34 (Vysis), LSI P53 (17p13.1) (Vysis) problemleri için cut off değeri % 8-10, LSI CSF1R / D5S23, D5S721 Probe set (Vysis), LSI P16 (9P21) / CEP9 Probe set (Vysis), CEP 15 (Vysis) problemleri için %3-5, LSI FGFR3/ IGH t(4;14) (p16;q32) Dual Color, Dual Fusion Translocation Prob Set (Vysis), LSI IGH/ MAF t(14;16) (q32;q23) Dual Color, Dual Fusion Translocation Prob Set (Vysis), LSI CCND1/ IGH t(11;14) (q13;q32) Dual Color, Dual Fusion Translocation Prob Set (Vysis) için ise %1 cut off değeri belirlenmiştir (23).

### 3.3. Kullanılan Stok Solüsyonlar

**Tablo 3.1:** Hipotonik Solüsyonu (0.075 M)

KCl	1.398 gr
Distile su	250 ml

**Tablo 3.2:** Carnoy's Fiksatif Solüsyonu

Methanol	3 kısım
Glacial Acetic Acid	1 kısım

**Tablo 3.3:** GTG Bantlama Solüsyonları

<b><u>Fosfat Buffer Salin (PBS)</u></b>	
Sodyum klorid (NaCl)	4 gr
Potasyum klorid(KCl)	0,1 gr
Potasyum dihidrojen fosfat(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,1 gr
Disodyum hidrojen fosfat dihidrat (Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O)	0,57 gr
Distile su	500 ml

**Trypsin Solüsyonu**

Trypsin toz (Sigma)

PBS

**Giemsa Solüsyonu**

Giemsa

PBS

(1 preparat için)

**Tablo 3.4:** Preparatların Ön Yıkama Sölüsyonları

<b><u>20XSSC Solüsyonu</u></b>	
NaCl (3 M)	175,3 gr
Tri Sodyum Sitrat (0,3 M)	88,24 gr
Distile su	1000 ml
HCl ile pH 7.0 a ayarlanır.	
<b><u>2XSSC Solüsyonu</u></b>	
20XSSC	40 ml
Distile su	360 ml
HCl ile pH 7.0 a ayarlanır.	

<b><u>0,1XSSC Solüsyonu</u></b>		
20XSSC		3 ml
Distile su		597 ml

**Tablo 3.5:** Preparatların Denatürasyon Solüsyonu

0,07 M NaOH		14 ml
Distile su		200 ml

**Tablo 3.6:** Hibridizasyon Sonrası Solüsyonlar

<b><u>0,1XSSC Solüsyonu</u></b>		
20XSSC		10 ml
Distile su		190 ml

**2XSSC Solüsyonu**

20XSSC	20 ml
Distile su	180 ml

**2XSSC/Tween-20 Solüsyonu**

20XSSC	20 ml
Tween 20	100 µl
Distile su	180 ml

Tüm solüsyonlar HCl ile pH 7.0 a ayarlanır.

**Tablo 3.7:** Görüntüleme Sistemleri Solüsyonları

**DAPI/Antifade Solüsyonu**

2XSSC	20 ml
DAPI	100 µl
Distile su	80 ml

#### **3.2.4. İstatistik Analiz**

SPSS 13.0 İstatistik programında  $\chi^2$  istatistik testi kullanılarak saptanan anomalilerle olguların evre, yaş, Ig tipi, hemoglobin,  $\beta$ 2m ve CRP düzeyleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Ayrıca olguların yaşam süreleri de SPSS 13.0 istatistik programında Kaplan Meier testi kullanılarak hesaplanmıştır.



## **4. BULGULAR**

Çalışmamız Eylül 2005 - Ocak 2008 tarihleri arasında Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Kanseri sitogenetiği seksiyonuna yönlendirilen 50 MM tanılı olgunun kemik iliği örneklerinde gerçekleştirilen sitogenetik ve moleküler sitogenetik analizleri içermektedir.

### **4.1. Olgularımızın Demografik Bulguları**

Olgularımızın yaş ortalaması 61.68/yıl (44-78), erkek/kadın oranı 28/22 olarak saptanmıştır. Olguların hastalık evresine göre dağılımları; 37 olgu evre 3, 11 olgu evre 2 ve 2 olgu evre 1 olarak değerlendirilmiştir. Olgularımızın 27 tanesi IgG, 13 tanesi IgA, 9 tanesi hafif zincir ve bir tanesi ise nonsekretuar tip olarak sınıflandırılmıştır. Olgularımızın hemoglobin, hematokrit, beyaz küre, platelet, sedim, CRP,  $\beta_2m$  ve immünoglobulin tiplerine ait bilgiler olgu dosyalarından temin edilmiştir. Olguların yaş, cinsiyet, evre, Ig tiplerine ait bilgiler Tablo 4.1. de verilmiştir.

**Tablo 4.1.** Multipl myelom olgularının yaş, cinsiyet, evre ve Ig tipleri

(K:Kadın, E: erkek, G: IgG izotipi , A: IgA izotipi, HZ: hafif zincir)

HastaNo	Yaş	Cinsiyet	Evre/Ig tipi
01	55	K	3/HZ
02	49	K	3/G
03	48	E	3/G
04	67	E	3/G
05	57	K	3/G
06	52	E	3/G
07	64	E	3/G
08	78	E	3/A
09	50	K	3/HZ
10	60	E	3/A
11	63	E	3/HZ
12	61	E	2/G
13	67	E	3/A
14	52	K	3/HZ
15	71	K	nonsekretuar
16	65	E	3/G
17	46	K	3/G
18	76	E	3/G
19	65	K	2/A
20	67	E	3/G
21	57	E	2/G
22	62	K	3/HZ
23	67	E	2/G
24	58	K	3/HZ
25	66	E	3/A
26	56	E	3/G
27	52	K	2/G
28	59	E	1/A
29	44	K	3/G
30	52	E	3/A
31	53	K	2/A

HastaNo	Yaş	Cinsiyet	Evre/Ig tipi
32	66	E	3/G
33	73	E	3/G
34	79	E	3/A
35	54	E	1/HZ
36	59	K	27G
37	61	K	3/G
38	74	E	3/A
39	67	K	3/G
40	63	E	3/G
41	70	K	2/A
42	75	K	3/G
43	49	K	3/HZ
44	58	K	3/G
45	68	E	3/A
46	69	E	3/HZ
47	76	K	3/G
48	64	E	2/G
49	61	K	2/G
50	59	E	2/A

#### 4.2. Multipl Myelom Tanısı Alan Olgularda Sitogenetik Analiz Verileri

Sitogenetik analiz olguların 32 tanesinde gerçekleştirilebilmiş olup başarı oranı %64 olarak saptanmıştır. Geri kalan 18 olguda kromozom analizi gerçekleştirilememiştir.

Yapılan sitogenetik analiz sonucu kromozom elde edilebilen 32 MM lı olgunun 27 sinde (%84.3) normal karyotip izlenirken beş olguda (%15.6) kromozom anomalileri gözlenmiştir (Tablo 4.2).

Olguların sitogenetik ve FISH analiz sonuçları detaylı olarak Tablo 4.3. de verilmiştir.

**Tablo 4.2.** Konvansiyonel Sitogenetik Analiz Sonuçları

<b>Normal Olgu sayısı (%)</b>	<b>Tek kromozomal değişiklik Olgu sayısı (%)</b>	<b>Hiperdiploidi  Olgu sayısı (%)</b>	<b>Kompleks karyotip Olgu sayısı (%)</b>
27 (%84.3)	2 (%6.25)	2 (%6.25)	1 (%3.12)
	<b>Toplam klasik sitogenetik aberasyon: 5 (%15.6)</b>		

**Tablo 4.3.** Multipl myelom olgularının FISH ve konvansiyonel sitogenetik analizi sonuçları (N: normal, del: delesyon, + : pozitif)

SAY I	FISH						SİTO
	D13S319/13q34	IGH YENİDEN DÜZ.	Kromozom 5	Kromozom 9	Kromozom 15	P53	
1	MONOZOMİ 13 D13S319 DEL	N	N	N	N	N	46,XX
2	N	N	N	N	N	N	46,XX
3	N	N	N	N	N	N	46,XY
4	N	N	N	N	TRİZOMİ	N	46,XY
5	N	t(4;14) +	N	N	TRİZOMİ	N	PLAK YOK
6	N	N	TRİZOMİ	N	TRİZOMİ	N	PLAK YOK
7	D13S319 DEL	N	N	N	MONOZOMİ	N	46,XY
8	N	FGFR3 DEL	N	N	N	N	46,XY
9	13q34 DEL D13S319 DEL	N	N	MONOZOMİ	N	N	PLAK YOK
10	N	N	MONOZOMİ	N	N	N	46,XY
11	N	N	N	N	TRİZOMİ	N	46,XY
12	13q34 DEL	CCND1 TRİZOMİ	N	N	MONOZOMİ	DEL	PLAK YOK
13	N	N	N	N	N	N	46,XY
14	N	N	N	N	MONOZOMİ	N	46,XX
15	MONOZOMİ 13	MAF DEL FGFR3 TRİZOMİ CCND1 TRİZOMİ	N	N	N	DEL	PLAK YOK
16	D13S319 DEL	N	TRİZOMİ	TRİZOMİ	TRİZOMİ	DEL	PLAK YOK
17	D13S319 DEL	N	N	N	N	DEL	46,XX
18	D13S319 DEL MONOZOMİ 13	N	TRİZOMİ	TRİZOMİ	TRİZOMİ TETRAZOMİ	N	46,XY
19	MONOZOMİ 13	N	N	N	TRİZOMİ	N	PLAK YOK
20	N	N	N	N	N	N	46,XY

FISH							
SAY I	D13S319/13q34	IGH YENİDEN DÜZ.	Kromozom 5	Kromozom 9	Kromozom 15	P53	SİTO
21	13q34 DEL	N	N	N	N	DEL	45,XY,-14[2]/46,XY[8]
22	N	N	N	N	MONOZOMİ	N	46,XX
23	N	N	N	N	N	DEL	46,XY
24	13q34 DEL	CCND1 TRİZOMİ	TRİZOMİ	TETRAZOMİ	TRİZOMİ	N	46,XX
25	N	N	N	N	N	N	46,XY
26	D13S319 DEL	N	N	N	MONOZOMİ	N	46,XY
27	D13S319 DEL	N	TRİZOMİ	TRİZOMİ	TRİZOMİ	N	46,XX
28	13q34 DEL	N	N	N	N	N	PLAK YOK
29	MONOZOMİ 13	N	N	N	N	DEL	PLAK YOK
30	N	CCND1 TRİZOMİ	TRİZOMİ	TRİZOMİ	TRİZOMİ	DEL	PLAK YOK
31	D13S319 DEL	N	TRİZOMİ	TRİZOMİ	TRİZOMİ	N	PLAK YOK
32	N	N	N	N	N	N	PLAK YOK
33	13q34 DEL	N	N	N	N	N	45,X-Y[2]/46,XY[7]
34	13q34 DEL MONOZOMİ 13	IGH DEL	N	N	N	DEL	PLAK YOK
35	MONOZOMİ 13	CCND1 TRİZOMİ	TRİZOMİ	TETRAZOMİ	TRİZOMİ MONOZOMİ	DEL	49,X,-Y,+5,-8,+9,+9,-13,+15,+19,+21[4]/49,X,-Y,+5,+9,+9,-13,+15,+19,+21,-22[4]/46,XY[6]
36	MONOZOMİ 13	N	N	N	N	N	PLAK YOK
37	N	N	N	N	MONOZOMİ	N	PLAK YOK
38	D13S319 DEL	N	TRİZOMİ	TRİZOMİ	MONOZOMİ	N	PLAK YOK
39	MONOZOMİ 13	N	N	N	MONOZOMİ	N	46,XX
40	N	N	N	N	N	N	46,XY
41	N	CCND1 TRİZOMİ	MONOZOMİ	N	N	N	46,XX
42	MONOZOMİ 13	t(4;14) +	N	N	N	N	46,XX

FISH							
SAY I	D13S319/13q34	IGH YENİDEN DÜZ.	Kromozom 5	Kromozom 9	Kromozom 15	P53	SİTO
43	N	TRİZOMİ 11	TRİZOMİ	TETRAZOMİ TRİZOMİ	TRİZOMİ	N	46,XX
44	N	N	TRİZOMİ	TRİZOMİ	TRİZOMİ	N	51,XX,+5,+7,+9,+15,+19 [3]/50,XX,+5,+7,+15,+19 [7]/46,XX [10]
45	MONOZOMİ 13	MAF TRİZOMİ	TRİZOMİ	TRİZOMİ	TRİZOMİ	N	Komplex karyotip [2]/45,X,-Y [10] /46,XY[2]
46	MONOZOMİ 13	N	N	N	TRİZOMİ	N	46,XY
47	MONOZOMİ 13	CCND1 TRİZOMİ	TRİZOMİ	TRİZOMİ	TRİZOMİ	N	46,XX
48	N	N	N	N	N	N	PLAK YOK
49	D13S319 DEL	N	N	N	N	N	46,XX
50	N	N	N	N	N	N	PLAK YOK

### 4.3. Multipl Myelom Tanısı Alan Olgularda FISH Analiz Bulguları

Araştırma grubunu oluşturan 50 olguda lokus spesifik, sentromerik ve translokasyon problemleri uygulanarak FISH analizleri gerçekleştirilmiştir.

Yapılan FISH analizinde; olguların % 18 inde (9 /50) değerlendirilen tüm problemler için normal sonuç bulunurken %82 sinde (41/50 ) FISH analizi ile saptanan en az bir anomali gözlenmiştir. Tablo 4.4. de FISH analiz sonuçları verilmiştir.

#### 4.3. 1. Kromozom 13 aberasyonları (-13/13q delesyonu):

Kromozom 13 e özgü anomaliler araştırma serimizde en sık gözlenen anomalilerdir. Olguların %54 ünde (27/50) total ve/veya parsiyel kromozom 13 delesyonları saptanmıştır. Monozomi 13 on olguda, D13S319 ve 13q34 parsiyel

delesyonları ise sırasıyla sekiz ve beş olguda gözlenmiştir. Bir ve 18 nolu olgularda monozomi 13 ve D13S319 lokus delesyonu, 9 ve 34 nolu olgularda ise monozomi 13 ve 13q34 lokus delesyonu birlikte saptanmıştır. Olgular; kromozom 13 ile birlikte farklı anomalileri içerip içermemelerine göre de gruplandırılmış olup toplam %10 (5 olgu) unda kromozom 13 aberasyonları izole anomali olarak gözlenirken, %44 ünde (22 olgu) kromozom 13 aberasyonlarına, incelenen diğer kromozom anomalileri eşlik etmiştir (Tablo 4.3).

#### 4.3. 2. IGH (14q32) aberasyonları:

t(4;14)(p16;q32): Olguların %4 (2/50) kadarında t(4;14) gözlenirken, incelenen translokasyon probundaki gen bölgeleri için iki olguda farklı aberasyonlar saptanmıştır. Bunlar; bir olguda FGFR3 (4p16) gen bölgesinde delesyon ve bir olguda da FGFR3 (4p16) gen bölgesinde trizomidir.

t(11;14)(q13;q32): Çalışma grubunda t(11;14) gözlenmemiş, ancak sekiz olguda translokasyon probuna ilişkin CCND1 (11q13) gen bölgesi için trizomi gözlenmiştir.

t(14;16)(q32;q23): Olgu örneklerinde t(14;16) anomalisi gözlenmemiş, ancak bir olguda MAF (16q23) gen bölgesinde delesyon olduğu belirlenmiştir.

Bir olguda her üç translokasyon probu ile IGH (14q32) gen bölgesinde delesyon saptanmıştır. IGH aberasyonlarına, incelenen diğer kromozom anomalileri eşlik etmiştir (Tablo 4.4).

#### 4.3.3. TP53 (17p13) delesyonu:

Olguların %20 sinde (10/50) P53 delesyonu gözlenmiştir (Tablo 4.4). Sadece bir olguda izole P53 delesyonu gözlenirken diğer tüm olgularda P53 delesyonuna ek aberasyonlar eşlik etmiştir. P53 delesyonu ile birlikte en sık kromozom 13 aberasyonları gözlenmiştir.



#### 4.3.4. Sayısal Aberasyonlar

Kromozom 5: Olguların % 30 unda (15/50) 5. kromozomun sayısal anomalisi gözlenmiştir ( 13 olguda trizomi, 2 olguda monozomi ). On üç olguda trizomi 15, hiperdiploidi ile birlikte izlenmiştir. Monozomi gözlenen 2 olgudan birinde izole monozomi 5 diğerinde ise monozomi 5 ve CCND1 lokus trizomisi birlikte gözlenmiştir.

Kromozom 9: Olguların %26 sında (13/50) 9. kromozomun sayısal aberasyonu (9 olguda trizomi, iki olguda tetrazomi, bir olguda tetrazomi ve trizomi, bir olguda da monozomi) gözlenmiştir. Monozomi gözlenen bir olgu haricinde diğer kromozom 9 aberasyonları, hiperdiploidinin bir parçası olarak karşımıza çıkmıştır.

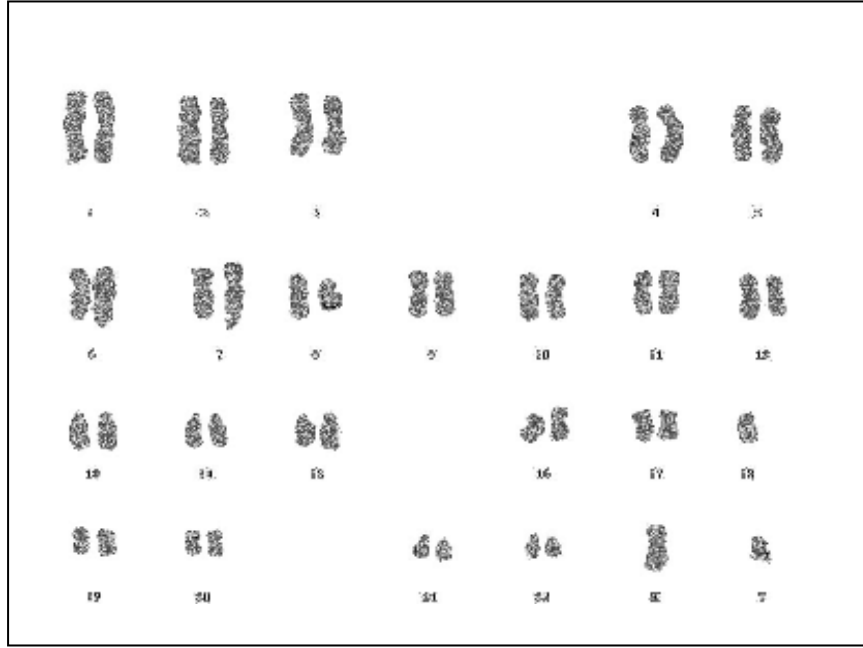
Kromozom 15: Olguların % 50 sinde (25 /50) ise 15. kromozomun sayısal aberasyonu (15 olguda trizomi, 8 olguda monozomi, bir olguda trizomi ve monozomi, bir olguda da trizomi ve tetrazomi ) gözlenmiştir (Tablo 4.4). On bir olguda trizomi 15, hiperdiploidinin bir parçası olarak gözlenirken, kromozom 15 anomalileri beş olguda izole, dokuz olguda ise incelenen diğer kromozom aberasyonları ile birlikte gözlenmiştir.

#### 4.3. 5. Hiperdiploidi:

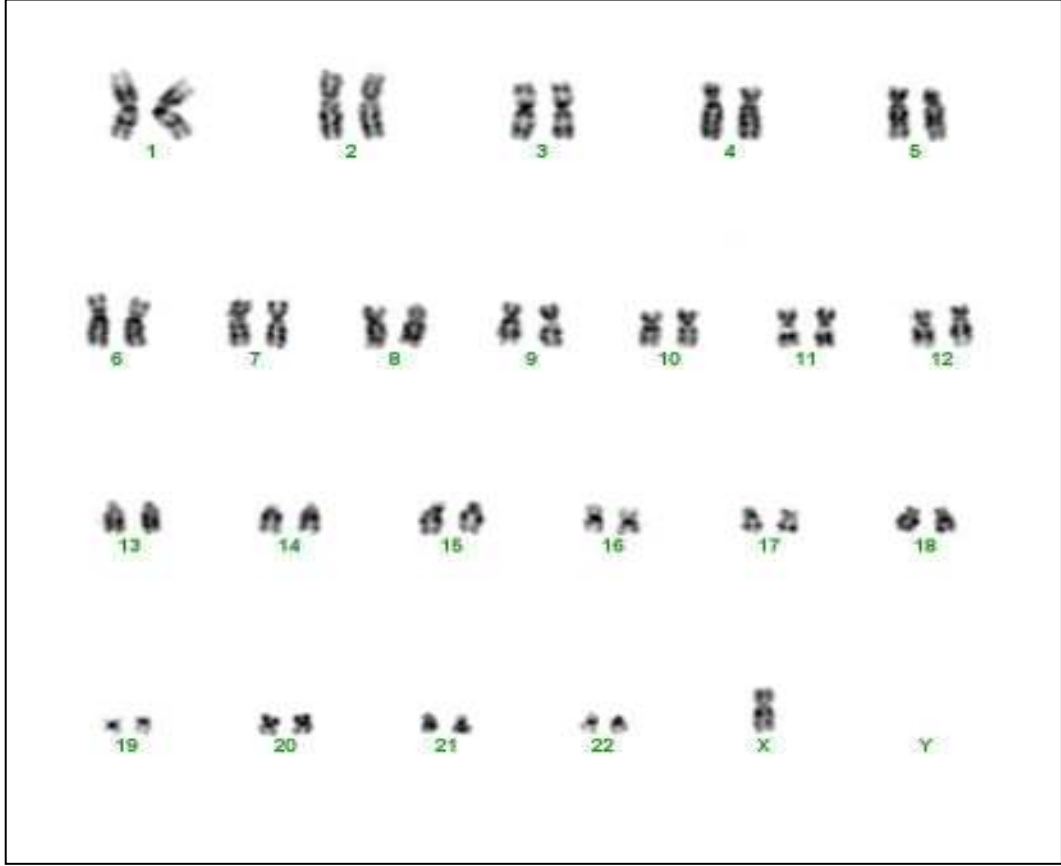
Olguların % 26 (13/50) kadarında FISH analizi ile hiperdiploidi gözlenirken konvansiyonel sitogenetik analizi ile bu olguların sadece 2 tanesinde hiperdiploid karyotip saptanmıştır. On olguda hiperdiploidi ile birlikte 13. kromozom aberasyonları, iki olguda da hiperdiploidi ile birlikte hem 13. kromozom aberasyonları hem de P53 delesyonu birlikte gözlenmiştir. Bir olguda ise hiperdiploidi ile birlikte P53 delesyonu gözlenmiştir.

**Tablo 4.4.** FISH analiz bulguları (Krm: kromozom)

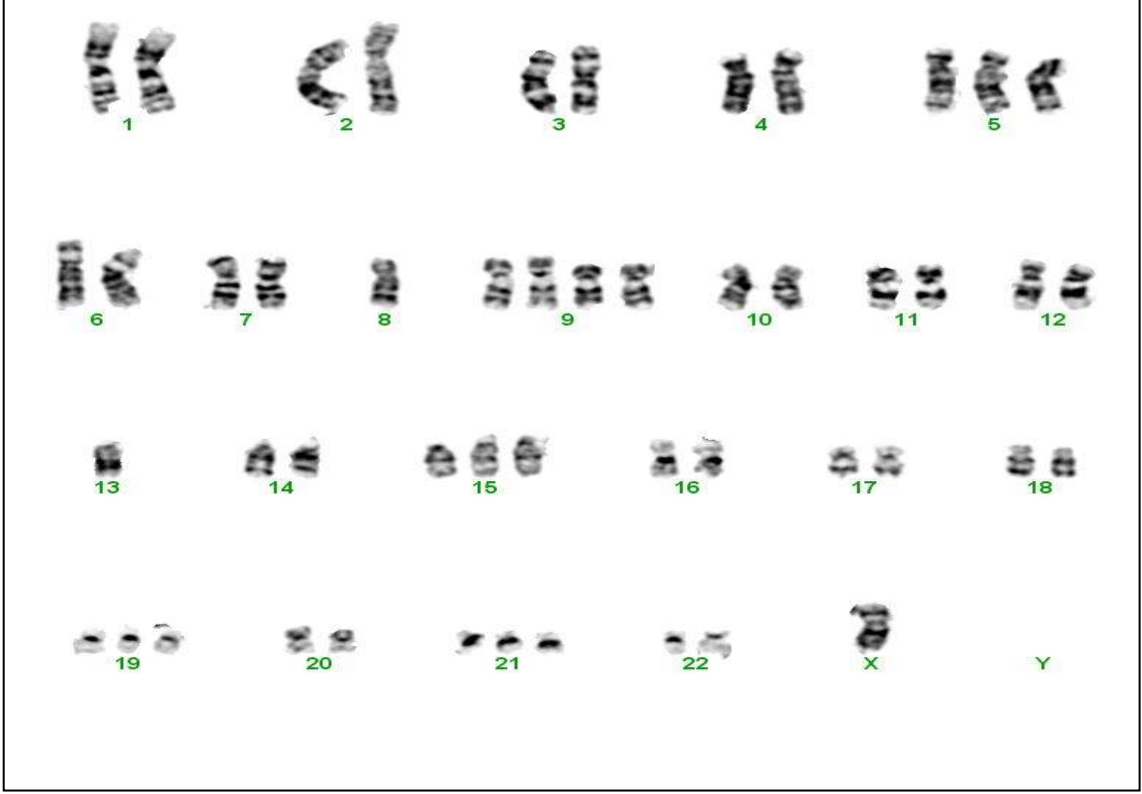
<b><i>Kromozom 13 aberasyonları</i></b>		<b><i>P53 (17p13) delesyonu</i></b>	
<b>Yüzde/oran</b>		<b>Yüzde/oran</b>	
Krm 13 aberasyonları	%54 (27/50)	P53 delesyonu	%20 (10/50)
<b><i>IGH bölgesini içeren translokasyonlar</i></b>		<b><i>Sayısal aberasyonlar</i></b>	
<b>Yüzde/oran</b>		<b>Yüzde/oran</b>	
t(4;14)	%4 (2/50)	Krm 5	%30 (15/50)
t(11;14)	-	Krm 9	%26 (13/50)
t(14;16)	-	Krm 15	%50 (25/50)



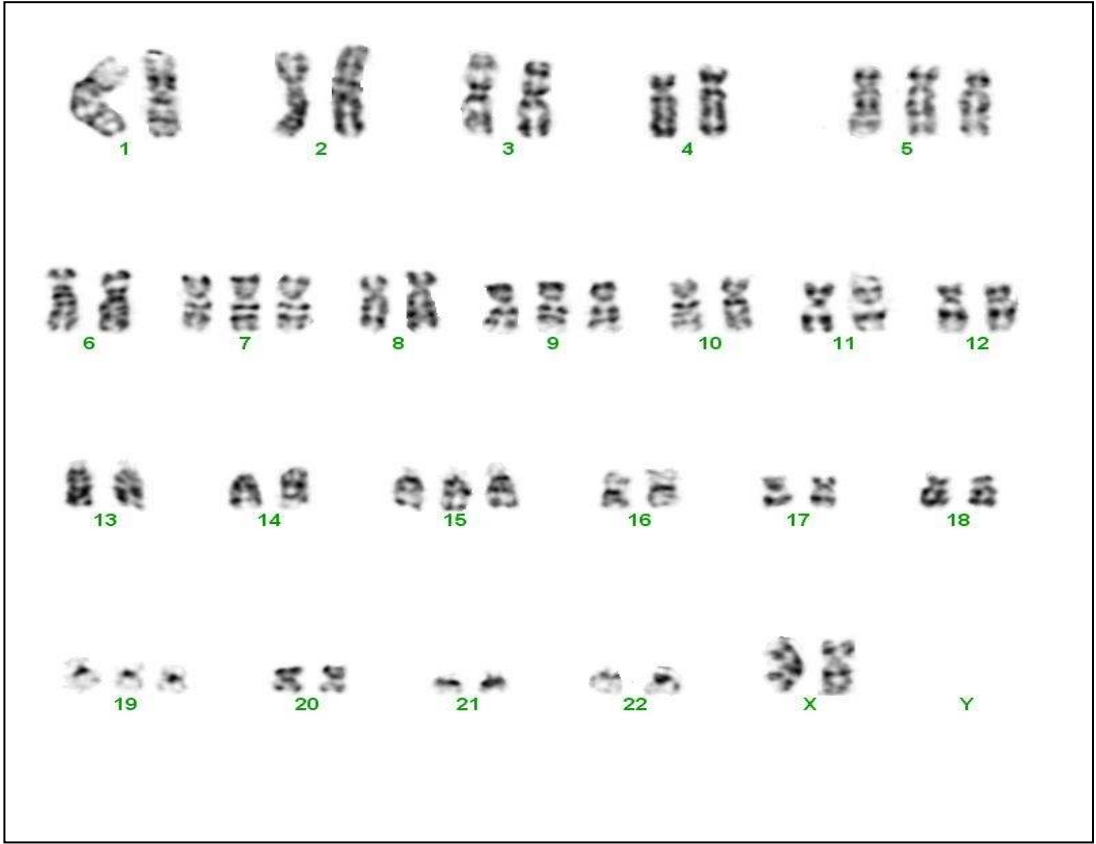
**Şekil 4.1.** Araştırma grubu olgularımızdan 25 nolu olguya ait karyotip analiz görüntüsü (Bu olguda hücrelerinin tamamında 46, XY karyotipi belirlenmiştir).



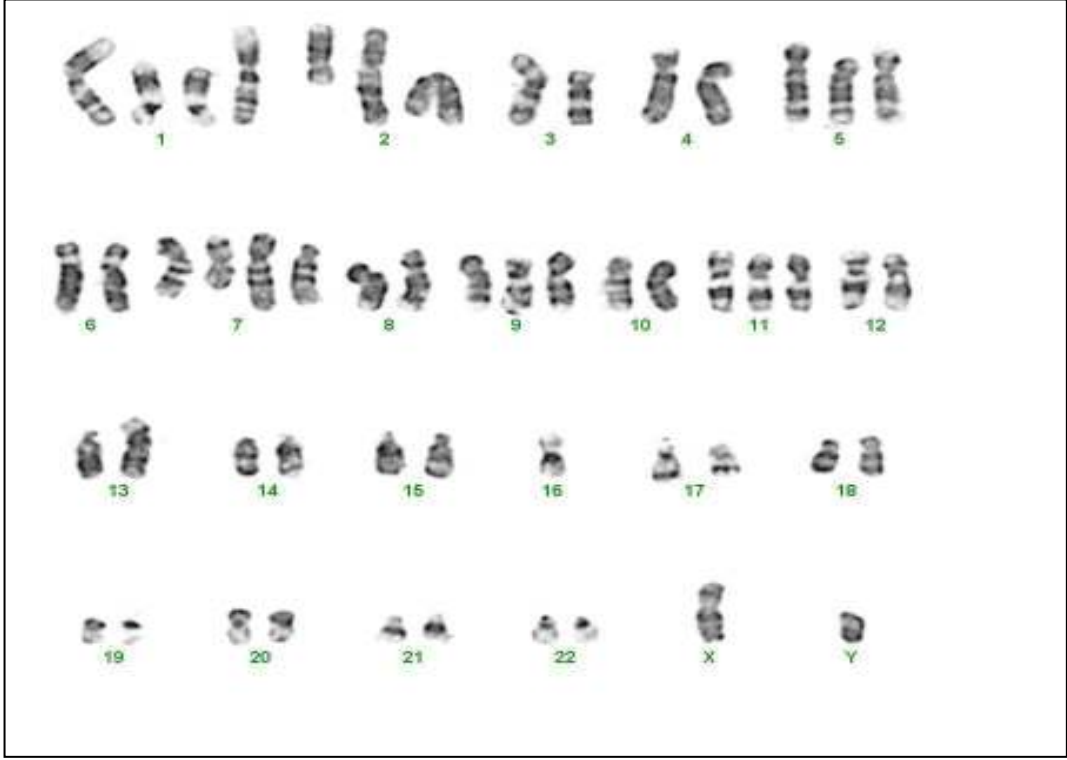
**Şekil 4.2.** Araştırma grubu olgularımızdan 33 nolu olguya ait karyotip analiz görüntüsü (Bu olguda hücrelerinin %60 ında 46,XY, hücrelerinin % 40 ında 45, X,-Y karyotipi belirlenmiştir).



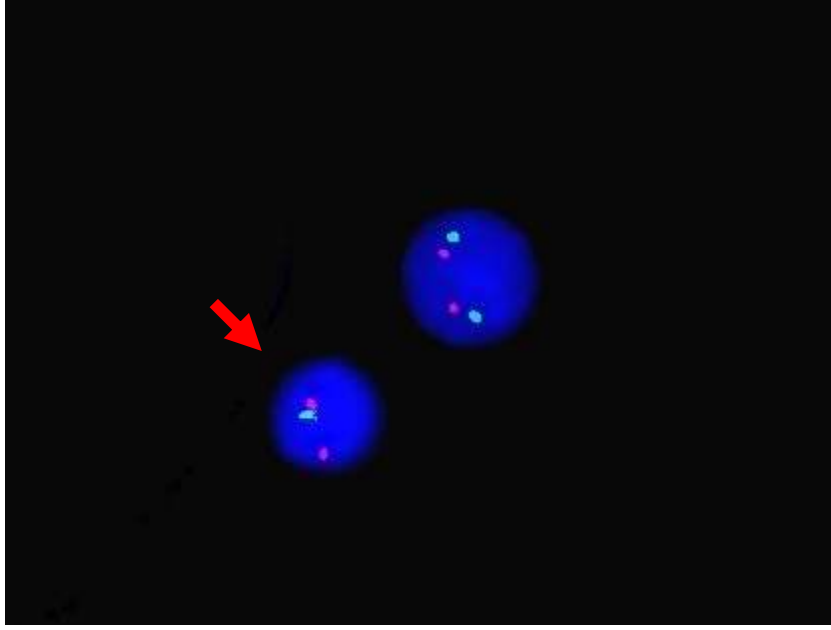
**Şekil 4.3.** Araştırma grubu olgularımızdan 35 nolu olguya ait karyotip analiz görüntüsü (Bu olguda hücrelerinin %42.8 inde 46,XY, hücrelerinin % 28.5 inde 49,X,-Y,+5,+9,+9,-13,+15,+19,+21,-22, hücrelerinin %28.5 inde 49,X,-Y,+5,-8,+9,+9,-13,+15,+19,+21 karyotipi belirlenmiştir).



**Şekil 4.4.** Araştırma grubu olgularımızdan 44 nolu olguya ait karyotip analiz görüntüsü (Bu olguda hücrelerinin %50 sinde 46,XX, hücrelerinin %15 inde 51,XX,+5,+7,+9,+15,+19 ve %35 inde 50,XX,+5,+7,+15,+19 karyotipi belirlenmiştir).

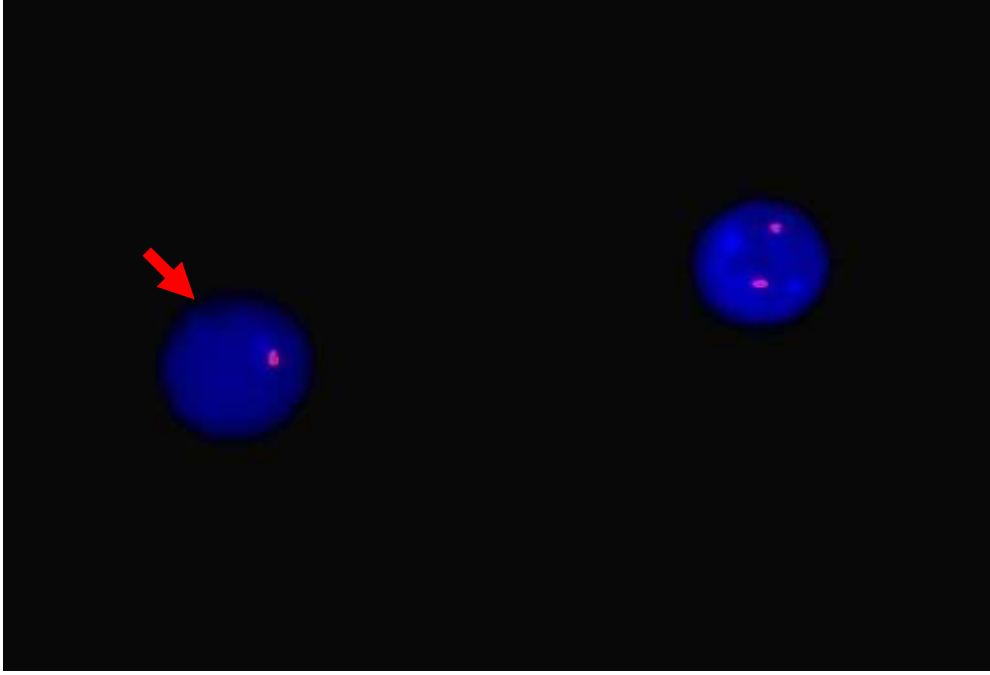


**Şekil 4.5.** Araştırma grubu olgularımızdan 45 nolu olguya ait karyotip analiz görüntüsü (Bu olguda hücrelerinin % 14.25 inde 46,XY, hücrelerinin % %71.5 inde 45,X,-Y, hücrelerinin % 14.25 inde kompleks karyotip belirlenmiştir).

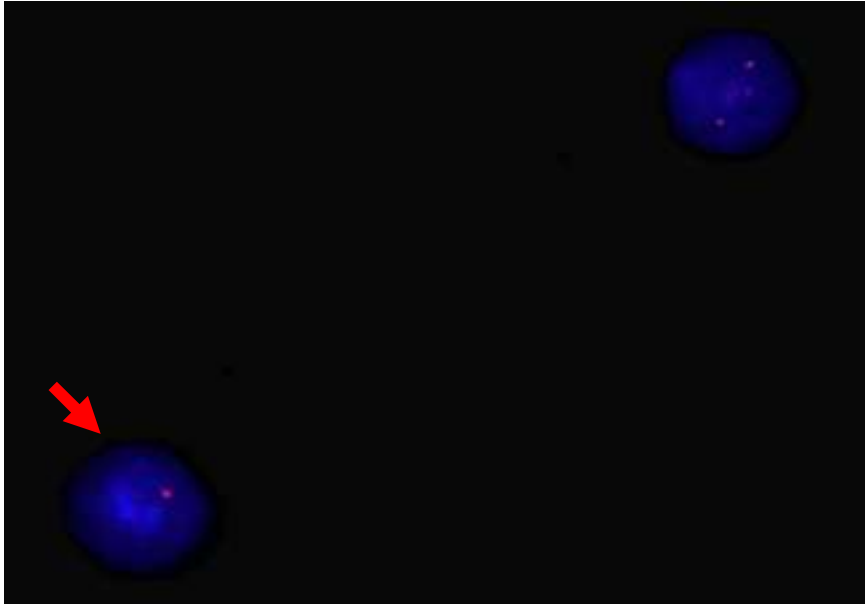


**Şekil 4.6.** Araştırma grubu olgularımızdan 12 nolu olguya ait LSI D13S319 (13q14) / 13q34 probe FISH analiz görüntüsü (Okla gösterilen interfaz nükleusunda 13q34 delesyonu gözlenmiştir). (13q34:Spectrum Green, D13S319 (13q14): Spectrum orange)

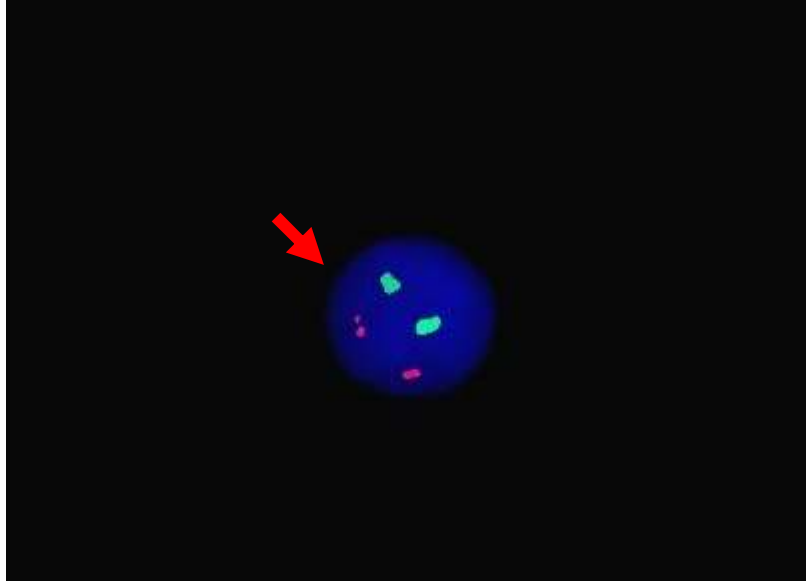




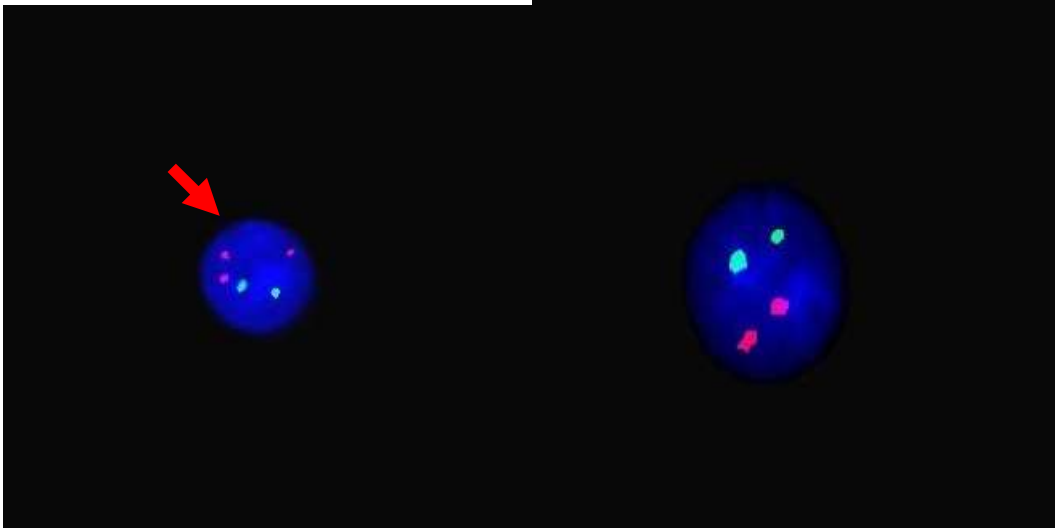
**Şekil 4.7.** Araştırma grubu olgularımızda 12 nolu olguya ait Cep 15 Probe FISH analiz görüntüsü (Okla gösterilen interfaz nükleusunda monozomi 15 gözlenmiştir). (Cep 15 : Spectrum orange)



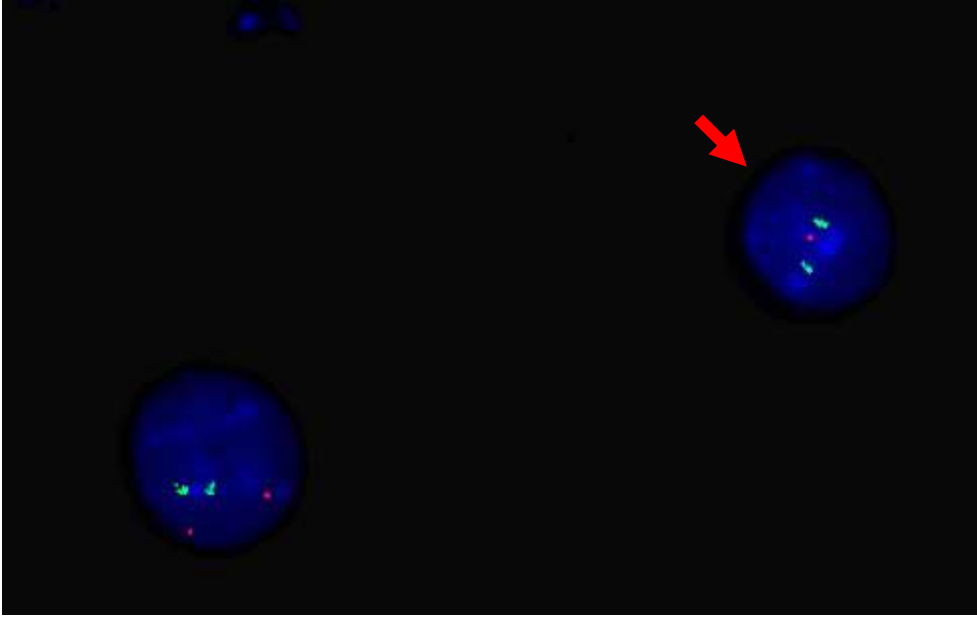
**Şekil 4.8.** Araştırma grubu olgularımızdan 16 nolu olguya ait LSI P53 (17p13) probe FISH analiz görüntüsü (Okla gösterilen interfaz nükleusunda P53 delesyonu gözlenmiştir). (17p13 Spectrum orange)



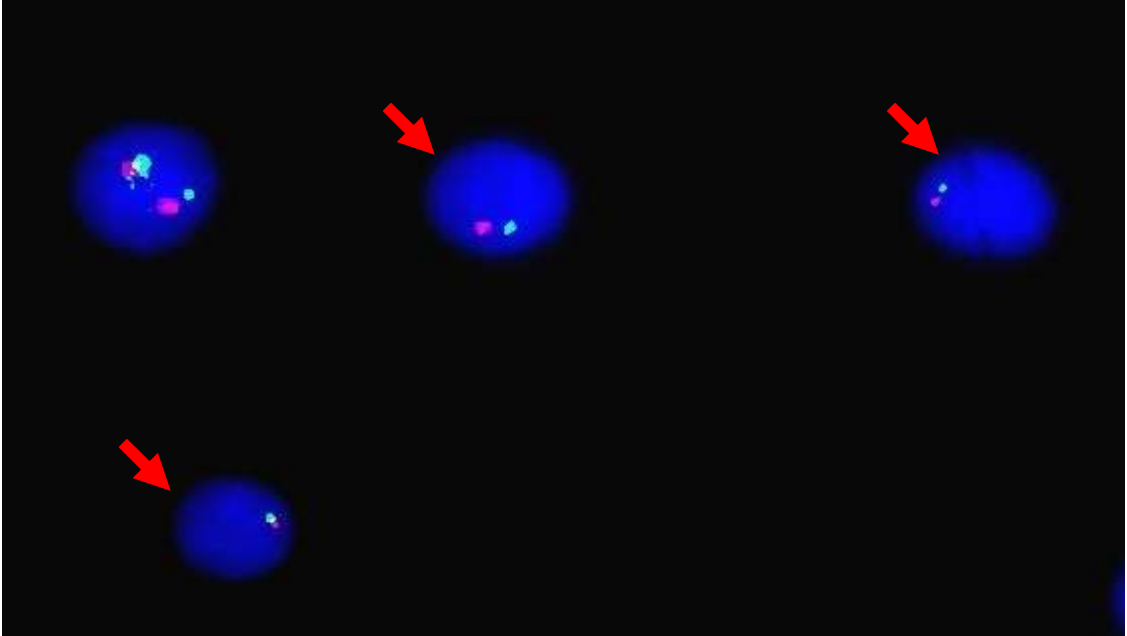
**Şekil 4.9.** Araştırma grubu olgularımızdan 20 nolu olguya ait LSI FGFR3/ IGH t(14;16) q32;q23)Dual Color, Dual Fusion Translocation Prob Set FISH görüntüsü (Normal interfaz nükleusu). (14q32:Spectrum Green, 16q23: Spectrum orange)



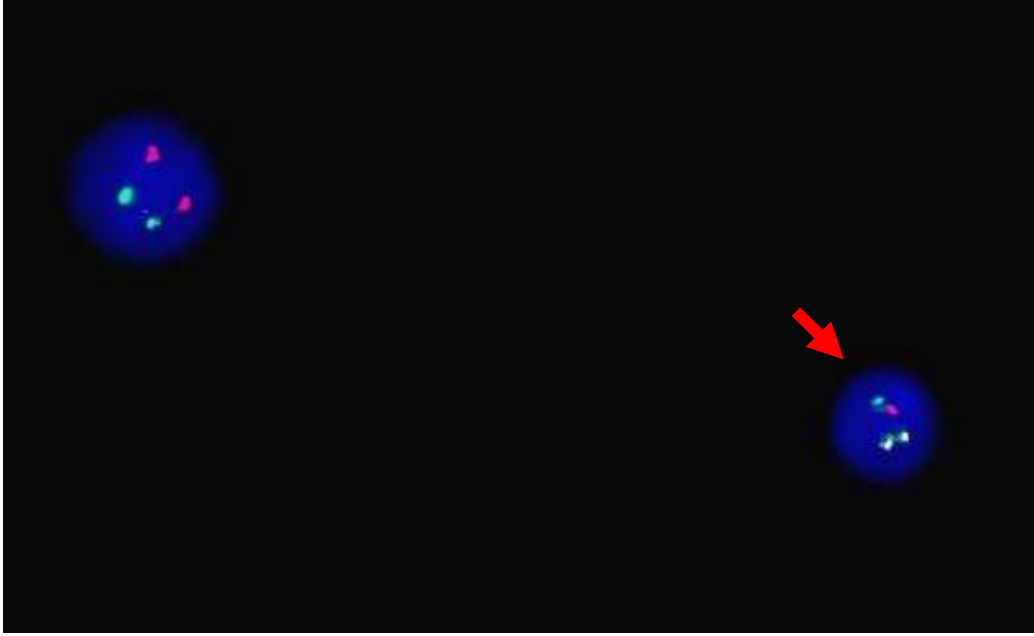
**Şekil 4.10.** Araştırma grubu olgularımızdan 30 nolu olguya ait LSI FGFR3/ IGH t(11;14) q13;q32)Dual Color, Dual Fusion Translocation Prob Set FISH görüntüsü (Okla gösterilen interfaz nükleusunda 11q13 trizomisi gözlenmiştir). (14q32:Spectrum Green, 11q13: Spectrum orange)



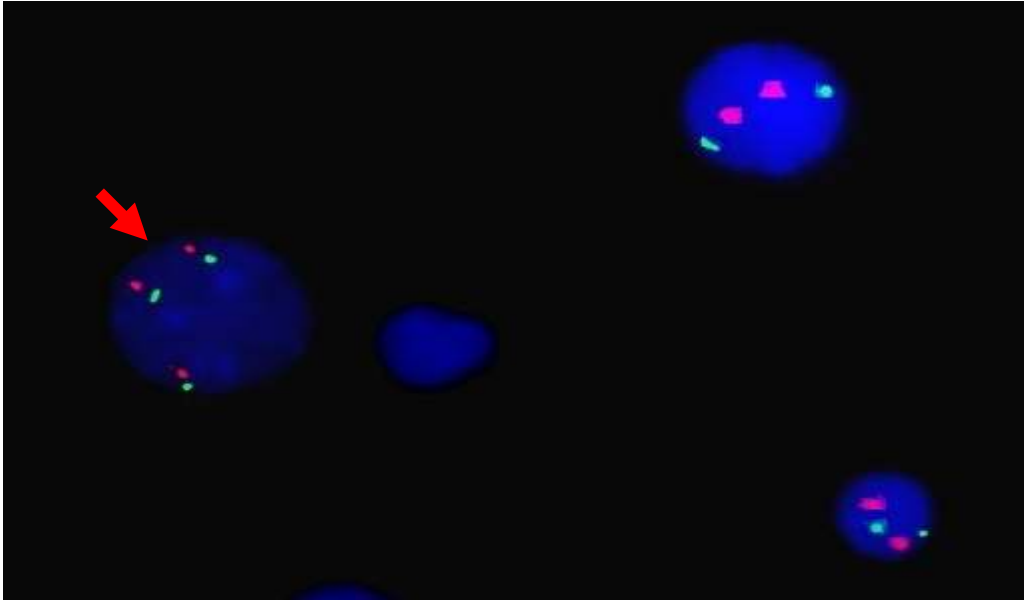
**Şekil 4.11.** Araştırma grubu olgularımızdan 31 nolu olguya ait LSI D13S319 (13q14) / 13q34 probe FISH analiz görüntüsü (Okla gösterilen interfaz nükleusunda D13S319 delesyonu gözlenmiştir). (13q34-Spectrum Green, D13S319 (13q14) Spectrum orange)



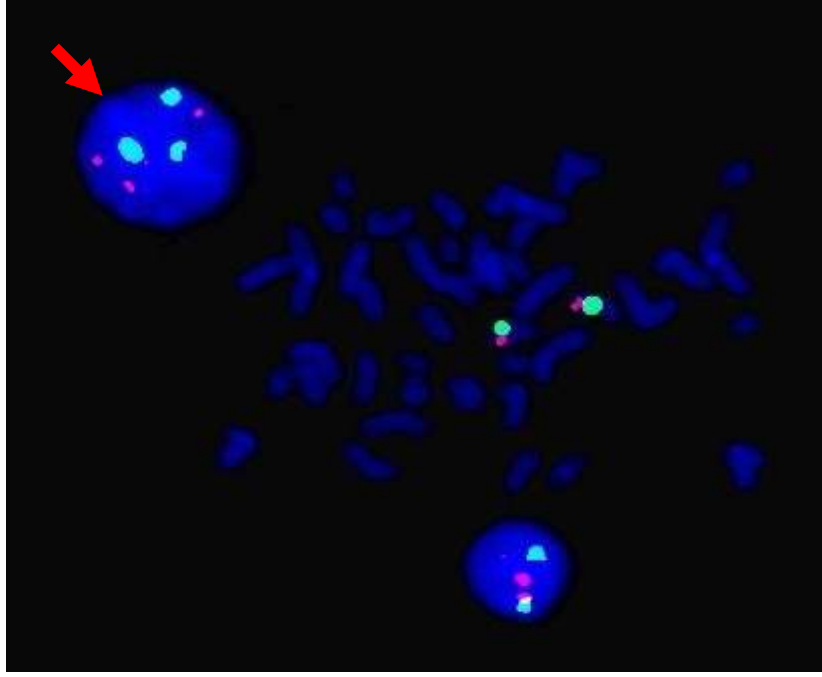
**Şekil 4.12.** Araştırma grubu olgularımızdan 42 nolu olguya ait LSI D13S319 (13q14) / 13q34 probe FISH analiz görüntüsü (Okla gösterilen interfaz nükleuslarında monzomi 13 gözlenmiştir). (13q34-Spectrum Green, D13S319 (13q14) Spectrum orange)



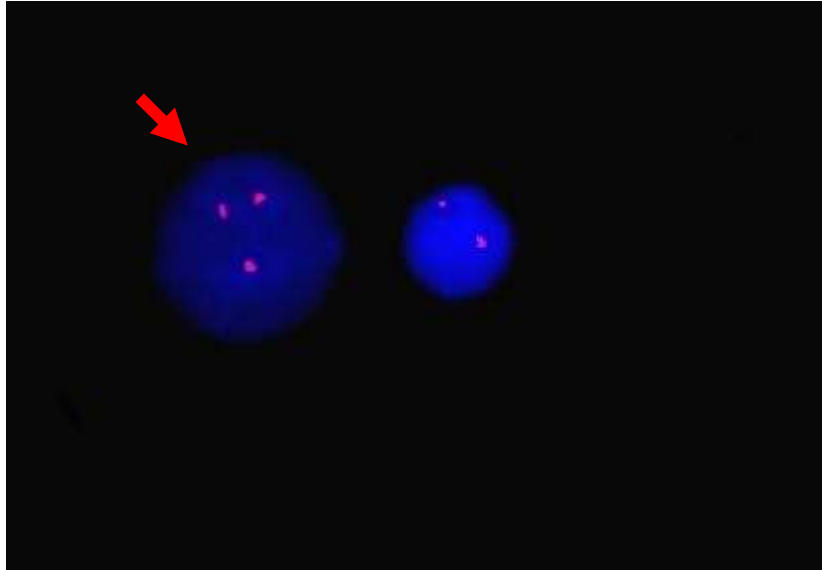
**Şekil 4.13.** Araştırma grubu olgularımızdan 42 nolu olguya ait LSI FGFR3/ IGH t(4;14) (p16;q32) Dual Color, Dual Fusion Translocation Prob Set FISH görüntüsü (t(4;14) interfaz nükleusu) (14q32: Spectrum Green, 4p16: Spectrum orange)



**Şekil 4.14.** Araştırma grubu olgularımızdan 44 nolu olguya ait LSI CSF1R / D5S23, D5S721, Dual color Probe FISH analiz görüntüsü (Okla gösterilen interfaz nükleusunda 5. kromozom trizomisi gözlenmiştir). (5p15.2 D5S23, D5S721: Spectrum Green, 5q31 CSF1R: Spectrum orange)



**Şekil 4.15.** Araştırma grubu olgularımızdan 44 nolu olguya ait LSI P16 (9p21) / Cep 9, Dual color Probe FISH analiz görüntüsü (Okla gösterilen interfaz nükleusunda trizomi 9 gözlenmiştir). (Cep 9: Spectrum Green, P16 (9p21): Spectrum orange)



**Şekil 4.16.** Araştırma grubu olgularımızda 44 nolu olguya ait Cep 15 Probe FISH analiz görüntüsü (Okla gösterilen interfaz nükleusunda trizomi 15 gözlenmiştir). (Cep 15 : Spectrum orange)

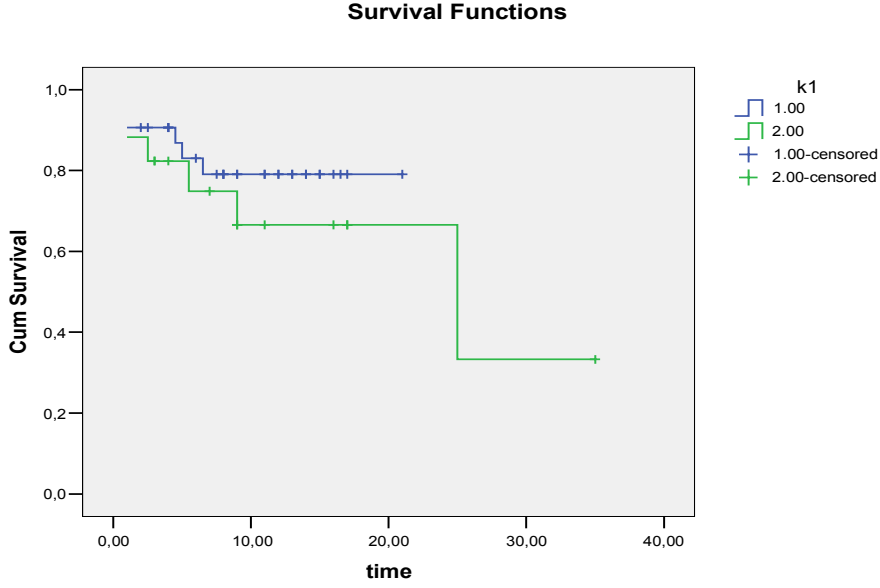
#### 4.4. Çalışmaya İlişkin İstatistik Verileri

Yaptığımız çalışmada saptadığımız kromozom anomalileri ile olguların evre, yaş, Ig tipi, hemoglobin,  $\beta$ 2m ve CRP düzeylerini karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilememiştir ( $P>0,05$ ). Kromozom anomalileri ile hastalık evresi arasındaki ilişkiye bakıldığında ise kromozom 15 aberasyonlarının geç evre yani evre 3 ile ilişkili olduğu görülmüştür ( $P=0.02$ ). Tablo 4.5 de kromozom 15 aberasyonlarının evrelere göre dağılımları verilmiştir.

**Tablo 4.5.** Kromozom 15 aberasyonlarının olguların evrelerine göre dağılımları

		Kromozom 15 aberasyonu		Toplam
		Var	yok	
Evre	Evrel	2	0	2
	Evre2	1	10	11
	Evre3	22	15	37
Toplam		25	25	50

Kötü prognoz ile ilişkili olduğu düşünülen üç aberasyondan (13. kromozom aberasyonları, IGH translokasyonları ve P53 delesyonu) en az birini bulunduran olgularla, bu üç aberasyonu bulundurmeyen olguların ortalama median sağ kalım süresi Kaplan Meier analizi ile araştırılmıştır. Sonuçta bu üç aberasyondan en az birini taşıyan olguların ortalama median sağ kalım sürelerinin bu üç anomaliden herhangi birini içermeyen olgulardan daha kısa olduğu görülmüştür (Şekil 4.17. ). Ortalama median sağ kalım süresi  $17.3\pm 1.3$  ay olarak belirlenmiştir.



**Şekil: 4.17.** -13/13q delesyon ve/veya IGH aberasyonları ve/veya P53 delesyonu bulunduran olguların sağ kalım süreleri (1.00=-13/13qdelesyon ve/veya IGH aberasyonları ve/veya P53 delesyonu bulunan olgular, 2.00= bu üç aberasyonu bulunmayan olgular)

Olgularımız hiperdiploidi ve kromozom trizomileri açısından değerlendirildiğinde, olguların % 26 (13 olgu) sında FISH analizi ile hiperdiploid karyotip gözlenmiştir. Hiperdiploidi gözlenen 13 olgunun tümünde kromozom 5, 9 ve 15 trizomisi saptanmıştır. Bu üç kromozom anomalisini bulunduran olguların tümü yaşadığı için ortalama yaşam süresi Kaplan Meier analizi ile değerlendirilememiştir.

## **5.TARTIŞMA**

Multipl myelom tanısı alan olguların kemik iliği örneklerinde klasik sitogenetik ve FISH analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızın sonuçları bulgulardaki sıra ile tartışılmıştır.

### **5.1. Olgularımızın Demografik Sonuçlarının Tartışması**

Olgularımızın erkek, kadın oranı sırası ile %56 ve %44 tür. İncelenen literatürlerde erkek olguların görülme oranı %37-%64 arasında, kadın olguların görülme oranı ise %36-%62.9 arasında bildirilmektedir. Olgularımızın erkek/kadın oranı literatür ile uyumlu bulunmuştur (9,11,12,20,24,32,36,38).

Olgularımızın ortalama yaşı 61.68 dir. Literatürde ortalama yaş 57-65.6 arasında değişkenlik göstermektedir. Olgularımızın ortalama yaşı da literatür ile uyumlu bulunmuştur (9,11,12,20,32).

### **5.2. Konvansiyonel Sitogenetik Analiz Bulgularının Tartışması**

Çalışmamızda 50 MM olgusunun 32 (%64) sinde sitogenetik çalışma için kromozom elde edilmiştir. İncelenen literatürlerde MM olgularında kromozom elde edilebilen olgu oranı %29,5-%92 arasında değişmektedir. Multipl myelomda konvansiyonel sitogenetik analiz, malign plazma hücrelerinin proliferasyon oranlarının düşük olması ve kemik iliğinde plazma hücre oranının çeşitliliği nedeniyle zordur. Bizim çalışmamızda kromozom elde edilen olgu oranımız (%64) literatürle uyumluluk göstermektedir (8,9,11,12,32,36,38 ).

Yapılan konvansiyonel sitogenetik analiz sonucu, kromozom elde edilebilen 32 MM lu olgunun 27 sinde (%84.3) normal karyotip izlenirken, 5 olguda (%15.6) kromozom aberasyonu gözlenmiştir. İncelenen literatürde konvansiyonel sitogenetik



analiz ile saptanan anomali oranı %13.6 ile %55.5 arasında bildirilmiştir. Bizim oranımız bildirilen oran aralığı içerisinde bulunmaktadır. Çalışma bulgularımızın literatür ile karşılaştırılması Tablo 5.1 de verilmiştir.

*Könisberg ve arkadaşlarının* çalışmasında anomali oranı %55.5, *Lloveras ve arkadaşlarının* çalışmasında %41, *Chang ve Dewald* in çalışmasında ise anomali oranı %28 olarak belirtilmiştir (9,12,36,38).

Anomali oranımız *Könisberg, Lloveras, Chang ve Dewald*ın oranından düşük olmasına rağmen incelenen literatür oranları içerisinde bulunmuştur.

*Kaufmann ve arkadaşları* tarafından anomali oranı % 13.6, *Cremer ve arkadaşları* tarafından %14, *Chang ve arkadaşları* tarafından ise % 16.6 olarak bildirilmiştir (8,11,32).

Anomali oranımız *Kaufmann, Cremer ve Chang* in oranına yakın oranda bulunmuştur. MM da düşük in vitro mitoz aktivitesi ve malign plazma hücrelerinin farklı infiltrasyon dereceleri nedeniyle kemik iliğinin genetik değişimine ilişkin oranlar çok geniş yelpaze içerisinde dağılmaktadır.

*Chang (1999) ve Könisberg* çalışmalarında konvensiyonel sitogenetik analiz ile en sık -13/13q delesyonunu, *Kaufmann ve Chang (2004)* ise kromozom 1 aberasyonlarını ve -13/13q delesyonunu saptamışlardır. *Cremer ve Dewald* ise çalışmalarında en sık gözlenen anomali olarak cinsiyet kromozom kaybını bildirmişlerdir (8,9,11,12,32).

Çalışmamızda ise sayısal gonozomal kromozom anomalisi 3/5, kromozom 13 aberasyonları 2/5, kromozom 1 anomalisi ise 1/5 olguda saptanmıştır. Çalışmamızda da en sık gözlenen anomali gonozomal kromozom kaybıdır ve *Cremer ve Dewald* in sonuçları ile uyumludur.

**Tablo 5.1.** Multipl myelom tanısı alan olgularda sitogenetik ve moleküler sitogenetik analiz sonuçlarının karşılaştırılması. (-: analiz yapılmamış, amp: amplifikasyon, abr: aberasyon)

Araştırma Grubu (Yıl)	Hasta Sayısı	Klasik Sitogenetik Anomali (%)	FISH				
			13q-/-13 (%)	IGH (%)	11q13+ (%)	P53- (%)	Hiperdiploidi (%)
Chang (1999)	24	16.6	41.6	-		-	-
Königsberg (2000)	89	55.5	44.9	7.9 t(11;14)	2.2	24.7	-
Lloveras (2003)	53	41	23		18	-	-
Fonseca (2003)	351	-	54.1	31.3		10.7	-
Kaufmann (2003)	118	13.6	36.4	-		-	-
Fonseca (2003)	80	-	54	55		-	34
Chang (2004)	25	28	44	64		20	-
Cremer (2005)	100	14	51	14 t(11;14)	46	-	-
Dewald (2005)	154	28	54	29.8		14	-
Gutierrez (2006)	260	-	42	36		8.5	-
Loiseau (2007)	983	-	48	25.8		11	39
<b>Bizim çalışmamız (2008)</b>	<b>50</b>	<b>15,62</b>	<b>54</b>	<b>6</b>	<b>16</b>	<b>20</b>	<b>26</b>

### 5.3. Moleküler Sitogenetik (FISH) Bulgularının Tartışması

Olgularımızın %82 sinde (41/50 ) FISH analizi ile en az bir anomali gözlenmiştir.

İncelenen literatürlerde FISH analizi ile saptanan anomali oranı %36.4 ile %86 arasında değişmektedir ve bizim oranımızda literatür oranı içerisinde bulunmuştur. Araştırmalar arasındaki farklılığın incelenen parametreler arasındaki farklılıktan veya olgu grupları arasındaki heterojeniteden kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

*Kaufmann ve arkadaşları (2003)* yaptıkları çalışmada FISH analizi ile saptanan anomali oranı %36.4, *Chang ve arkadaşları(1999)* ise anomali oranını %41.6 olarak bildirmişlerdir (8,32) (Tablo 5.1).

Çalışmamızda FISH analizi ile saptanan anomali oranı, *Kaufmann ve Chang* ın bildirdikleri oranın üstündedir. *Kaufmann ve Chang* FISH analizini sadece kromozom 13 aberasyonları için yapmışlardır. Çalışmamızda ise FISH analizi ile -13/13q delesyonu, IGH yeniden düzenlenmeleri, P53 (17p13.1) delesyonu, 5, 9 ve 15. kromozom anöploidileri değerlendirildiği için anomali oranımızın yüksek olabileceği düşünülmüştür.

*Chang ve arkadaşları(2004)* nın çalışmasında FISH analizi ile saptanan anomali oranı %76, *Cremer ve arkadaşlarının* çalışmasında %66, *Gutierrez ve arkadaşlarının* çalışmasında % 58, *Dewald ve arkadaşlarının* çalışmasında ise %86 olarak bildirilmiştir (Tablo 5.1) (9,11,12,24).

Çalışmamızda FISH analizi ile saptanan anomali oranımız *Chang, Cremer ve Gutierrez* in oranından yüksek bulunurken, *Dewald ve arkadaşlarının* oranına yakın bulunmuştur. Anomali oranları arasındaki bu farklılığın olgu grupları arasındaki heterojeniteden kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

### 5.3.1. Kromozom 13 aberasyonları (-13/13q delesyonu)

Çalışmamızda -13/13q delesyonu en sık (%54) gözlenen anomali olarak belirlenmiştir.

#### **Anomali insidansı**

*Chang ve arkadaşlarının(1999)* çalışmasında 24 olguda %41.6 oranında, diğer bir çalışmada (2004) ise 25 olgunun %44 ünde, *Kaufmann ve arkadaşları* 118 olgu ile yaptıkları çalışmada, olguların % 36.4 ünde, *Königsberg ve arkadaşları* 89 olgunun %44.9 unda, *Gutierrez ve arkadaşları* ise 260 olguda % 42, *Loiseau ve arkadaşlar* 983 olgunun %48 oranında 13q14 lokus delesyonunu bildirmişlerdir (Tablo 5.1) (8,9,24,32,36,39).

Anomali oranımız *Chang, Kaufmann, Königsberg, Gutierrez ve Loiseau* in bildirdikleri oranlardan biraz yüksek olmakla birlikte literatür oranları içerisinde bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda *Chang, Kaufmann, Königsberg, Gutierrez ve Loiseau* 13q14 lokusunu değerlendirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise 13. kromozom üzerinde farklı iki lokusa ilişkin (13q14 ve 13q34) iki farklı prob kullanılarak kromozom 13 ün sayısal anomalileri ile kromozom 13 üzerindeki farklı iki lokusun delesyon ve/veya amplifikasyonları da değerlendirilmiştir. Oranımızın yüksek olmasının, araştırmacıların incelemediği 13q34 lokusu için bulunan ve değerlendirilmiş olan delesyonlardan kaynaklandığı düşüncesindeyiz.

*Lloveras, Fonseca ve Dewald* in kromozom 13 için araştırdıkları parametreler çalışmamızdaki parametreler ile aynıdır.

*Lloveras ve arkadaşları* 53 olgunun %23 ünde kromozom 13 aberasyonları bildirmişlerdir (38).

Çalışmamızda kromozom 13 anomali oranımız *Lloveras ve arkadaşlarının* saptadıkları oranların üstündedir ancak literatür oranı içerisinde bulunmuştur.

*Fonseca ve arkadaşları* yaptıkları çalışmada 80 olgunun % 54 sinde, *Dewald ve arkadaşları* ise 154 olgunun %54 ünde kromozom 13 aberasyonlarını bildirmişlerdir (12,21).

Çalışmamızda kromozom 13 anomali oranımız *Fonseca ve Dewald* ın oranları ile birebir örtüşmüştür (Tablo 5.1).

### **Diğer markerlarla karşılaştırılması**

*Chang ve arkadaşları (1999)* yaptıkları çalışmada D13S319 delesyonu olan olgular ile evre, immüoglobulin izotipi, yaş, hemoglobin, CRP,  $\beta$ 2m serum düzeyi arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığını bildirilmişlerdir (8).

Bizde çalışmamızda -13/13q delesyonu bulunan olgular ile evre, yaş, Ig tipi, hemoglobin,  $\beta$ 2m ve CRP düzeylerini karşılaştırdığımızda fark bulamadığımızdan *Chang ve arkadaşlarının* sonuçları ile uyumlu bulunmuştur.

*Königsberg ve arkadaşları* çalışmalarında 13. kromozom aberasyonları ve  $\beta$ 2m serum düzeyinin MM da güçlü prognostik bilgi sağladığını saptamışlardır. Kromozom 13 aberasyonu ve/veya  $\beta$ 2m serum düzeyinin yüksek olmasında prognozun kötü olduğunu bildirmişlerdir (36).

Çalışmamızda -13/13q delesyonu ve  $\beta$ 2m serum düzeyi arasında anlamlı istatistiksel bir fark bulunamamıştır. Çalışmamızda olgu sayımızın az olması nedeniyle fark bulunamadığı düşünülmüştür.

*Fonseca ve arkadaşlarının* çalışmaları sonucu IGH aberasyonları ve P53 delesyonu ile evre ve yaş arasında 13. kromozom aberasyonları hariç önemli bir fark bulunmamıştır. 13. kromozom aberasyonlarının ise evre 3 de daha sık görüldüğü saptanmıştır. Ayrıca *Fonseca ve arkadaşlarının* yaptıkları bir başka çalışmada ise hiperdiploid olmayanda IGH lokusunu içeren translokasyonların ve 13. kromozom aberasyonlarının daha sık görüldüğü saptanmıştır (20,21).

Çalışmamızda *Fonseca ve arkadaşlarının* sonuçlarından farklı olarak -13/13q delesyonu ve evre arasında bir ilişki bulunamamıştır. Çalışmamızda olgu sayımız,

*Fonseca ve arkadaşlarının* olgu sayısından az olduğundan -13/13q delesyonu ve evre arasında bir ilişki bulunamamış olabilir. Ayrıca çalışmamızda *Fonseca ve arkadaşlarının* sonuçlarından farklı olarak 13. kromozom aberasyonları, hiperdiploidi bulunan olguların %93 ünde gözlenmiştir. Bu farklılığın nedeninin Türk toplumundaki anomali insadansının olabileceği düşünülmüştür.

### **Kromozom 13 aberasyonları ve prognozla ilişkisi**

Literatürde kromozom 13 aberasyonlarının prognostik etkisi tartışmalıdır.

*Kaufman ve arkadaşları* kromozom 13 aberasyonlu olguların normal kromozom 13 e sahip olgulara oranla ortalama median sağ kalım sürelerinin çok daha kısa olduğunu bildirmişlerdir (32).

Çalışmamızda *Kaufman ve arkadaşlarının* sonuçlarından farklı olarak Kaplan Meier metodu ile hastaların ortalama median yaşam süreleri ile -13/13q delesyonu arasındaki ilişki araştırıldığında anlamlı sonuç elde edilememiştir. Bu farklılık olgu sayımızın *Kaufman ve arkadaşlarının* olgu sayısından az olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

*Königsberg ve arkadaşları* 2 ila 3 kötü prognostik kromozomal aberasyonu bulunan olguları yüksek riskli olgular olarak sınıflandırmış ve bu olguların ortalama sağ kalım sürelerinin 13.9 ay olduğunu bildirmişlerdir (36).

Çalışmamızda da -13/13q delesyonuna ilave kötü prognostik sınıfa sokulan IGH aberasyonları ve/veya P53 delesyonu bulunan olguların ortalama median sağ kalım sürelerinin daha kısa olduğu belirlenmiştir(17.3±1.3 ay).

*Dewald ve arkadaşları* 13. kromozom aberasyonlarının intermediate prognostik sonuca sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca metafaz hücrelerinde 13. kromozom aberasyonlarının bulunmasının interfaz hücrelerinde bulunmasından çok daha kötü prognostik sonuca sahip olduğunu öne sürmüşlerdir (12).

Çalışmamızda -13/13q delesyonlu olguların ortalama median sağ kalım süreleri Kaplan Meier analizi ile araştırılmış fakat anlamlı sonuç bulunamamıştır. Çalışmamızda

izole kromozom 13 anomalisi bulunan olgu sayımız çok azdır. Bu nedenle metafaz veya interfaz hücresinde anomali bulunmasına göre prognostik yansıması değerlendirilememiştir.

*Loiseau ve arkadaşları* genetik parametrelerin yaşam süresinde önemli olduğu fakat kromozom 13 aberasyonlarının tek başına prognostik değeri olmadığını bildirmişlerdir (39).

Çalışmamızda Kaplan Meier metodu ile hastaların ortalama median yaşam süreleri ile -13/13q delesyonu arasındaki ilişki araştırıldığında fark bulunamamıştır. Bununla birlikte -13/13q delesyonuna ilave kötü prognostik sınıfa sokulan IGH aberasyonları ve/veya P53 delesyonunu bulunduran olguların ortalama median sağ kalım sürelerinin daha kısa olduğu belirlenmiştir.

*Loiseau ve arkadaşlarının* sonuçları ile uyumlu olarak kromozom 13 aberasyonlarının tek başına prognoza etkisinin olmadığını t(4;14) ve/veya P53 delesyonu ile birlikte olunca yaşam süresinin kısalacağını düşünmekteyiz.

### 5.3.2. IGH Aberasyonları

#### **t(4;14)(p16;q32):**

Çalışmamızda t(4;14) olguların %4 ünde (2/50) gözlenmiştir. Ayrıca t(4;14) probu ile 1 olguda FGFR3 (4p16) lokusunda delesyon ve 1 olguda da FGFR3 (4p16) lokusunda trizomi gözlenmiştir (Tablo 5.1).

1 olguda IGH (14q32) bölgesinde delesyon saptanmıştır.

*Chang ve arkadaşlarının* (2004) çalışmasında 25 olguda % 36 oranında, *Gutierrez ve arkadaşlarının* çalışmasında ise 260 olguda % 11 oranında t(4;14) bildirilmiştir (9,24).

Çalışmamızda anomali oranımız *Chang ve Gutierrez* in oranının altında kalmıştır. Bu farklılığın nedeninin Türk toplumundaki farklı anomali insidansının olabileceği düşünülmüştür.

*Dewald ve arkadaşlarının* çalışmasında FISH analizi ile 154 olguda % 6.5, *Fonseca ve arkadaşlarının* yaptıkları bir çalışmada 351 olgunun %12.7 sinde t(4;14), diğer bir çalışmalarında ise 109 olgunun % 16 sında t(4;14) bildirmişlerdir (Tablo 5.1) (12,20,21).

Anomali oranımız *Fonseca ve arkadaşlarının* oranlarından düşük, *Dewald ve arkadaşlarının* oranına yakın olmakla birlikte biraz altındadır. Olgu sayımızın araştırmacıların olgu sayısından daha az olması oranlar arasındaki farklılığın nedeni olabilir.

### **t(11;14)(q13;q32):**

Çalışma olgularımızda t(11;14) gözlenmemiştir.

*Chang ve arkadaşlarının(2004)* çalışmasında 25 olguda % 32, *Dewald ve arkadaşları* 154 olguda % 7.8, *Gutierrez ve arkadaşları* 260 olguda % 13, *Fonseca ve arkadaşlarının* yaptıkları bir çalışmada 351 olguda %15.8, diğer bir çalışmalarında ise 109 olguda % 21, *Königsberg ve arkadaşları* 89 olguda % 7.9, *Cremer ve arkadaşları* 100 olguda %14, *Lloveras ve arkadaşları* ise 53 olgunun 1 inde t(11;14) bildirilmiştir (Tablo 5.1) (9,11,12,20,21,24,36).

t(11;14) anomali oranımızın sıfır olması, olgu sayımızın az olması yada olgu grupları arasındaki heterojeniteden kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Çalışma t(11;14) probu ile incelenen olguların %16 (8/50) sında CCND1 (11q13) gen bölgesinde trizomi gözlenmiştir.

*Königsberg ve arkadaşlarının* çalışmasında 89 MM olgusunda %2.2 oranında (2 olgu) CCND1 gen bölgesinin artışı bildirilmiştir (36).

*Cremer ve arkadaşlarının* çalışmasında 100 MM olgusunda %46 oranında 11q23 bölgesinde artış bildirilmiştir (11).

*Lloveras ve arkadaşlarının* çalışmasında 53 MM olgusunda % 18 oranında CCND1 geninin amplifikasyonu bildirilmiştir (38).

Literatürde CCND1 bölgesinin amplifikasyonuna ilişkin oran bildiren *Königsberg, Cremer, Lloveras* in çalışmaları bulunmaktadır. Bu çalışmalardaki anomali oranı %2.2 ile %46 arasında değişmektedir (Tablo 5.1) (11,36,38). Görüldüğü gibi farklı



çalışmalarda CCND1 bölge anomali oranı çok geniş yelpaze içerisinde gözlenmektedir. Çalışmamızda saptanan oran (%16) bildirilen oranlar içerisinde yer almaktadır. Bu da olgular arasındaki heterojeniteyi ifade etmektedir. Bu arada çalışmalarda kullanılan cut-off değerleride çeşitlilikte etkili olabilir.

### **t(14;16)(q32;q23):**

Çalışmamızdaki olgularımızda t(14;16) gözlenmemiştir. Fakat t(14;16) probu ile olguların %4 (2/50) sında MAF (16q23) gen bölgesinde aberasyon gözlenmiştir (1 olguda MAF geninde delesyon, 1 olguda da MAF geninde trizomi).

Literatürde t(14;16) ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır ve anomali insidansı %0-%4.6 arasında değişmektedir (9,12,20,21,24,38). t(14;16) ile ilgili daha fazla çalışma yapılması ve anomali insidansının geniş olgu serilerinde incelenerek ortaya konması gerekmektedir.

*Fonseca ve arkadaşlarının* yaptıkları bir çalışmada 351 olguda %4.6 oranında t(14;16) bildirilirken, diğer bir çalışmada ise 109 olguda % 5, *Dewald ve arkadaşları* 154 olguda % 1.9, *Gutierrez ve arkadaşları* 260 olguda % 3, *Lloveras ve arkadaşları* 51 olguda %3.9 oranında t(14;16) bildirilmiştir (Tablo 5.1) (12,20,21,24,38).

Olgularımızda t(14;16) oranımızın sıfır olması olgu sayısındaki farklılık veya Türk popülasyonundaki anomali görülme insidansının farklılığı ile açıklanabilir.

IGH aberasyonları görüldüğü gibi literatürde çok değişken insidanslarda (%25-%64 ) karşımıza çıkmaktadır (Tablo 5.1)(9,11,12,20,21,24,35,38,39). IGH anomali insidansının, geniş olgu serilerinde incelenerek ortaya konması gerekmektedir.

### **IGH aberasyonlarının prognozla ilişkisi**

*Fonseca ve arkadaşlarının* çalışmasında olguların ortalama median sağ kalım sürelerine göre t(4;14)(p16;q32), t(14;16)(q32;q23) ve P53 delesyonunun kromozom 13

aberasyonları ile karşılaştırıldığında çok daha kötü prognostik grubu dahil olduğu bildirilmiştir (20).

*Fonseca ve arkadaşları* 80 MM olgusunda hiperdiploid olmayanda IGH lokusunu içeren translokasyonların ve 13. kromozom aberasyonlarının daha yaygın olduğunu ve prognozun kötü olduğu bildirmişlerdir (21).

*Dewald ve arkadaşları* tarafından t(4;14), t(14;16) ve P53 delesyonunun kötü prognostik sonuca sahip olduğu bildirilmiştir (12).

*Loiseau ve arkadaşlarının* çalışmasında t(4;14) ve P53 delesyonu,  $\beta$ 2m serum düzeyinin yüksek olması ile birlikte görüldüğünde yaşam süresinin kısaldığı bildirilmiştir (39).

Literatürde t(4;14) ve t(14;16) nin kötü prognostik sonuca sahip olduğu t(11;14) ün ise iyi prognostik sonuca sahip olduğu bildirilmiştir (12,20,21). Çalışmamızda ise 2 olguda t(4;14) gözlenmiştir. Bu yüzden prognoz açısından değerlendirmek güçtür. Bununla birlikte -13/13q delesyonuna ilave IGH aberasyonları ve/veya P53 delesyonunu bulduran olguların ortalama median sağ kalım sürelerinin daha kısa olduğu belirlenmiş ve literatür ile uyumlu bulunmuştur (12,20).

### 5.3.3. P53 (17p13) Delesyonu

#### Anomali insidansı

Çalışmamızda P53 delesyonu olguların %20 sinde (10/50) gözlenmiştir (Tablo 5.1).

*Fonseca ve arkadaşlarının* çalışmasında FISH analizi ile 351 olguda %10.7 oranında, *Dewald ve arkadaşlarının* çalışmasında 154 olguda %14 oranında, *Gutierrez ve arkadaşlarının* çalışmasında 260 olguda % 8.5 oranında, *Loiseau ve arkadaşlarının* çalışmasında ise 983 olguda % 11 oranında P53 delesyonu bildirmişlerdir (12,20,24,39).

Çalışmamızda anomali oranımız *Fonseca, Dewald, Gutierrez ve Loiseau* in oranından yüksektir fakat literatürde bildirilen oranlar içerisinde bulunmaktadır.

*Königsberg ve arkadaşlarının* çalışmasında FISH analizi ile 89 olguda %24,7 oranında, *Chang ve arkadaşlarının (2004)* çalışmasında ise 25 olguda % 20 oranında P53 delesyonu bildirmişlerdir (Tablo 5.1)(9,36).

Anomali oranımız *Königsberg ve arkadaşlarının* oranına yakın bulunmuş, *Chang ve arkadaşlarının* oranı ile ise birebir örtüşmüştür.

### **Diğer markerlar ile karşılaştırılması**

*Fonseca ve arkadaşlarının* çalışmasında P53 delesyonlu olgularda  $\beta$ 2m serum düzeyi çok daha yüksek olduğu bildirilmiştir (P=0.03) (20).

Çalışmamızda P53 delesyonlu olgularda  $\beta$ 2m serum düzeyi arasındaki ilişki araştırıldığında, istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunamamıştır.

### **P53 (17p13) Delesyonu ve Prognozla İlişkisi**

*Dewald ve arkadaşlarının* çalışmasında P53 delesyonunun kötü prognostik değere sahip olduğu, *Loiseau ve arkadaşlarının* çalışmasında t(4;14) ve P53 delesyonu  $\beta$ 2m serum düzeyi ile birlikte değerlendirildiğinde tedaviye yanıt ve yaşam süresinde oldukça önemli olduğu ve prognostik sonucunun kötü olduğu bildirilmiştir (12,39).

Çalışmamızda P53 delesyonu ve  $\beta$ 2m serum düzeyi arasında ilişki bulunamamakla beraber -13/13q delesyonuna ilave IGH aberasyonları ve/veya P53 delesyonundan en az birini içeren olguların ortalama median sağ kalım sürelerinin daha kısa olduğu Kaplan Meier analizi ile saptanmış ve kötü prognostik sonuca sahip olduğu belirlenmiştir.

#### 5.3.4. Hiperdiploidi:

Olgularımızın % 26 (13/50) sında FISH analizi ile hiperdiploidi gözlenmiş olup konvansiyonel sitogenetik analiz ile 2 olguda hiperdiploidi saptanmıştır.

*Fonseca ve arkadaşlarının* çalışmasında 80 olguda % 34 oranında hiperdiploidi bildirmişlerdir. Ayrıca hiperdiploid olmayanda IGH lokusunu içeren translokasyonların ve 13. kromozom aberasyonları daha yaygın olduğu ve prognozun kötü olduğu, hiperdiploidide ise sayısal anomalilerin (genellikle 3, 5, 7, 9, 15, ve 19. kromozomların trizomileri) görüldüğü ve prognozun iyi olduğu bildirilmiştir (21). *Loiseau ve arkadaşlarının* çalışmasında ise 983 olguda FISH analizi ile % 39 oranında hiperdiploidi bildirmişlerdir (Tablo 5.1)(39).

Çalışmamızda hiperdiploidi oranımız *Fonseca ve Loiseau* in oranından düşüktür. Oranımızın düşük olmasının nedeninin olgu sayımızın *Fonseca ve Loiseau* in olgu sayısından az olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

*Loiseau* ve arkadaşları tarafından hiperdiploidili olguların %36 sının kromozom 13 aberasyonlarına sahip olduğu bildirilmiştir (39). Çalışmamızda ise hiperdiploidili olguların % 92.3 ünde kromozom 13 aberasyonları gözlenmiştir. Bizim oranımız bu oranın üstünde kalmıştır. Oranımızın yüksek olması çalışma gruplarını oluşturan olgular arasındaki heterojeniteden kaynaklanabileceği gibi Türk popülasyonundaki anomali görülme insidansının farklılığı ile de açıklanabilir.

Literatürde hiperdiploidi ile ilgili az sayıda çalışma olduğundan, iki literatür de oran bildirilmiştir. Hiperdiploidi insidansının, geniş olgu serilerinde daha fazla çalışma yapılarak ortaya konması gerektiği düşünülmektedir.

Çalışma bulgularımızın literatür ile karşılaştırılması Tablo 5.1 verilmiştir.

#### **Hiperdiploidi ve Prognozla İlişkisi**

*Fonseca ve Loiseau* tarafından hiperdiploidinin iyi prognostik sonuca sahip olduğu bildirilmiştir (21,39).

Çalışmamızda da Hiperdiploidi gözlenen 13 olgunun ortalama median sağ kalım süresi Kaplan Meier analizi ile araştırıldığında, olguların hepsi yaşadıkları için ortalama yaşam süreleri değerlendirilememiştir. Ancak hiperdiploidili olgular yaşadıkları için prognozun iyi olduğu söylenebilir.

*Fonseca ve arkadaşlarının* 2006 yılında yaptıkları çalışmada hiperdiploid myelomada kromozom 13 delesyonu ve IgH translokasyonlarının prognostik etkisini araştırmışlardır. Hiperdiploidi ile kromozom 13 aberasyonlarının birlikte bulunup bulunmamasına göre yaşam süresinin etkilenmediği bildirilmiştir (10).

Çalışmamızda da hiperdiploidili olguların %92.3 ünün kromozom 13 aberasyonlarına sahip olduğu görülmüş ve prognoza etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Literatürde çalışmamızla birlikte az sayıda çalışmada bu durumun değerlendirildiği görülmüştür. Hiperdiploidide kromozom 13 aberasyonlarının yaşam süresi üzerine etkisinin araştırılması için geniş olgu serilerindeki çalışmaların yapılması ve kromozom 13 ün prognostik etkisi ve patogenezdaki rolünün ortaya konması gerektiği düşünülmektedir.

### **5.3.5. Kromozom 15 aberasyonları**

#### **Anomali insidansı**

Çalışmamızda FISH analizi sonucu ikinci en sık gözlenen kromozom anomalisi % 50 ile (25/50) kromozom 15 in sayısal anomalisidir. Onaltı olguda trizomi, 8 olguda monozomi ve 1 olguda hem trizomi hemde monozomi gözlenmiştir. Onüç olguda trizomi hiperdiploidinin bir parçasıdır. Beş olguda izole kromozom 15 aberasyonları, 7 olguda ise kromozom 15 aberasyonlarına incelenen diğer kromozom anomalileri eşlik etmiştir.

1996 yılında *Taberner ve arkadaşları* kromozom sayısındaki değişiklikleri araştırılmıştır. En sık kromozom 9 ve 15 in trizomileri bildirilmiştir (44).

### **Diğer markerlar ile karşılaştırılması**

Çalışmamızda kromozom 15 aberasyonları 25 olguda gözlenmiştir. Bu olguların 22 si evre 3 olarak değerlendirilmiştir ve kromozom 15 aberasyonlarının evre 3 ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Literatürde kromozom 15 aberasyonları ve evre arasında herhangi bir bilgi bulunamamıştır.

### **Prognozla İlişkisi**

Literatürde MM da kromozom 15 anomalilerinin prognoza etkisi ile ilgili çalışma bulunamamıştır. Literatürde kromozom 15 anomalileri genelde hiperdiploidinin bir parçası olarak değerlendirilmiştir (10,21). Çalışmamızda değerlendirilen olgularımızda kromozom 15 trizomisi hiperdiploidinin bir parçası ise iyi prognostik olarak saptanmıştır. Ancak izole kromozom 15 aberasyonu bulunan olgu sayımız az olduğu için bu anomalinin tek başına prognostik önemi belirlenememiştir.

Kromozom 15 in anomali insidansı ve prognostik etkisi ile ilgili geniş olgu serilerinde daha fazla çalışma yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Çalışma bulgularımızın literatür ile karşılaştırılması Tablo 5.1 verilmiştir.

Sonuç olarak hematolojik malignansilerde kromozom anomalilerinin önemi çalışmamız ile de ortaya konmuştur. Multipl myelomda kromozom anomalisi görülme sıklıklarına göre en sık gözlenenden en aza doğru sıralanacak olursa; kromozom 13 anomalileri, 15, 5 ve 9. kromozomun sayısal anomalileri, hiperdiploidi, P53 delesyonu, CCND1 trizomisi ve IGH bölge aberasyonlarıdır.

Araştırmamızda 50 olgu ile çalışılmıştır fakat sitogenetik analiz olguların 32 tanesinde gerçekleştirilebilmiş olup, beş olguda (%15.6) kromozom anomalileri gözlenmiştir. FISH analizi ile ise 50 olgunun %82 sinde en az bir anomali gözlenmiştir. Çalışmamızda MM da kromozom anomalilerini saptamada FISH analizinin daha üstün olduğu görülmüştür.

## 6.SONUÇ

Araştırma grubunu oluşturan MM tanısı almış 50 olgunun kemik iliği örneklerine konvansiyonel sitogenetik ve FISH analizi yapılmıştır. FISH analizi ile -13/13q delesyonu, IGH yeniden düzenlenmeleri, P53 (17p13.1) delesyonu, 5, 9 ve 15. kromozom anöploidileri değerlendirilmiştir.

Sıklıkları belirlenen kromozom anomalileri ile hastalık evresi ve prognoz arasındaki ilişki araştırılmıştır.

- 1) Konvansiyonel sitogenetik anomali oranımız %15.6, FISH analizi anomali oranımız %82 olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda MM lu olgularda FISH analizinin konvansiyonel sitogenetik analize göre uygulama ve sonuç alma açısından daha başarılı olduğu saptanmıştır.
- 2) Olgularımızda -13/13q delesyonu en sık (%54) gözlenen anomali olarak saptanmıştır.
- 3) Çalışmamızda -13/13q delesyonuna ilave IGH aberasyonları ve/veya P53 delesyonunu içeren olguların ortalama median sağ kalım sürelerinin, bu üç anomaliyi içermeyen olgulardan daha kısa olduğu belirlenmiştir.
- 4) Kromozom 15 aberasyonlarının erken evrelere oranla geç evrede yani evre 3 ile ilişkili olduğu görülmüştür.
- 5) Kromozom 15 dışındaki diğer kromozom aberasyonları ile evre, yaş, Ig tipi, hemoglobin,  $\beta_2m$  ve CRP düzeyleri arasında fark bulunamamıştır.
- 6) Hiperdiploidiye sahip olguların yaşam sürelerinin daha uzun olduğu görülmüştür.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Anwar, N., Mohamed, G., Bentley, Michelle, L., Bonnett, J., Zonder, A., Al-Katib, 2007, Chromosome aberrations in a series of 120 multiple myeloma cases with abnormal karyotypes, J. Hematoloji, 82:1080-1087
2. Artan,S., 1996, FISH tekniğinde hibridizasyon koşulları, Teorik ve Pratik Floresan İn Situ Hibridizasyon, Ed.BAŞARAN,N.; ETAM, Eskişehir, s:34-39.
3. Artan,S., 1996, FISH tekniğinde kullanılan proplar ve özellikleri, Teorik ve Pratik Floresan İn Situ Hibridizasyon, Ed.BAŞARAN,N.; ETAM, Eskişehir, s:14-25.
4. Artan,S., 1996, Rutin FISH uygulamaları, Teorik ve Pratik Floresan İn Situ Hibridizasyon, Ed.BAŞARAN,N.; ETAM, Eskişehir, s:51-59.
5. Atamer, T., 2004, Türkiye Klinikleri Hematoloji Dergisi, Vol:2, No:1, P: 60-69
6. Bolaman, AZ., 2008, Multipl myelom tanısı ve tedaviye yanıt kriterleri, Türkiye Klinikleri J Hem Onc-Special Topics,1, s:1-4
7. Carpenter, C.C.J., Andreoli T.E., Loscalzo, J.,Griggs, R.C., 2002, Lenfositlerin bozuklukları, Lacy, J., Cecil Essentials of medicine (Çev.: Çavuşoğlu, H.), W.B. Saunders company, 5. baskı
8. Chang, H., Bouman, D., Boerkoel, C.F., Stewart, AK. and Squire, J.A., 1999, Frequent monoallelic loss of D13S319 in multiple myeloma patients shown by interphase fluorescence in situ hybridization, Leukemia, 13, 105-109
9. Chang, H., Li, D., Zhuang, L., Nie, E., Bouman, D., Stewart, A. K., Chun, K., 2004, Detection of chromosome 13q deletions and IgH translocations in patients with multiple myeloma by FISH: comparison with karyotype analysis, Leukemia & Lymphoma, Vol. 45 (5), pp.965-969



## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

10. Chng, W., J., Santana-Dávila, R., Van Wier, S., Ahmann, G.J., Jalal, S. M., Bergsagel, P.L., Ches, M.I., Trendle, M., C., Jacobus, S., Blood, E., Oken, M.M., Henderson, K., Kyle, R.A., Gertz, M.A., Lacy, M.Q., Dispenzieri, A., Greipp, P.R. and Fonseca, R., 2006, Prognostic factors for hyperdiploid-myeloma: effects of chromosome 13 deletions and IgH translocations, *Leukemia*, 20, 807–813
11. Cremer, F.W., Kartal, M., Hose, D., Bila, J., Buck, I., Bellos, F., Raab, M.S., Brough, M., Moebus, A., Hager, H.D., Goldshmidt, H., Moos, M., Batram, C.R., Jauch, A., 2005, High incidence and intraclonal heterogeneity of chromosome 11 aberration in patients with newly diagnosed multiple myeloma detected by multiprobe interphase FISH, Germany, *Cancer Genetics and Cytogenetics* 161-116-124.
12. Dewald, G.W., Therneau, T., Larson, D., Lee, Y.K., Fink, S., Smoley, S., Paternoster, S., Adeyinka, A., Ketterling, R., Van Dake, D.L., Fonseca, R., Kyle, R., 2005, Relationship of patient survival and chromosome anomalies detected in metaphase and/ or interphase at diagnosis of myeloma, *Blood*, V:106, Number:10
13. Drach, J., Sagaster, V., Ackermann, J., Kaufmann, H., 2006, Prognostic factors for multiple myeloma, *Hematology (EHA Educ Program)*, 2:196-200
14. Durak, B., 2005, Hematolojide FISH, Temel moleküler hematoloji ve sitogenetik alt komitesi temel moleküler hamatoloji kursu, Taksim Intenational Otel, Mersin
15. Durak, B., 2006, Hematolojide FISH, Moleküler hematoloji klinik hematoloji için pratik genetik yaklaşım kursu, Kervansaray otel, Antalya, s:13-17
16. Durak, B., 2006, Hematolojik malign hastalıklarda moleküler sitogenetik algoritmeler, VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik kongresi, Kayseri

## **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

17. Durak, B., Gülbaş, Z., 2008, Multiple Myelom Genetiği, Türkiye Klinikleri J Hem Onc-Special Topics,1:9-13
18. Fabris, S., Agnelli, L., Mattioli, M, Baldini, L., Ronchetti, D., Morabito, F., Verdelli, D., Nobili, L., Intini, D., Callea, V., Stel,tano, C., 2005, Characterization of oncogene dysregulation in multiple myeloma by combined FISH and DNA microarray analyses, Genes, Chromosomes& Canser 42:117-127
19. Foerster, J. and Paraskevas, F.,1999, Multiple Myeloma, Wintrobe's clinical hemotology, V: 2, C:99, P:2631-2663
20. Fonseca, R., Blood, E., Rue, M., Harrington, D., Oken, M.M., Kyle, R.A., Dewald, G.W., Ness, B.V., Wier, A., Henderson, K.J., Bailey, R.J., Greipp, P.R., 2003, Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma, Blood, V: 101, Number:11
21. Fonseca, R., Debes-Marun, C.S., Picken, E.B., Dewald, G.W., Bryant, S.C., Winkler, J.M., Blood, E., Oken, M.M., Santana-Davila, R., Gonzalez-Paz, N., Kyle, R.A., Gertz, M.A., ela, Dispenzieri, A., Lacy, M.Q. and Greipp, P.R., 2003, The current IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma, The American Society of Hemotology, Blood, Volume 102, Number 7.
22. Geoffey, M. Coope, Robert E. Hausman, 2006, Hücre Moleküler yaklaşım, 3. baskı, Tıp Kitapevi, İzmir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

23. Gordon, W., Dewald, R.P., Ketterling, W.A., Wyatt, P.J., Cytogenetic studies in neoplastik hematolojik disorders, Clinical Laboratory Medicine, second edition, c:32, p:3-30
24. Gutierrez, N.C., Castellanos, M.V., Martin, M.L., Mateos, M.V., Hernandez, J.M, Fernandez, M., Carrera, D., Rosinol, L., Ribera, J.M., Ojanguren, J.M., Palomera, L., Gardella, S., Escoda, L., Hernandez-Boluda, J.C., Bello, J.L., Rubia, J., Lahuerta, J.J. and Miguel, J.F., 2007, Prognostik and biological implications og genetic abnormalities in multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplation: t(4;14) is the most relevant adverse prognostic factor, whereas RB deletion as a unique abnormality is not associated with adverse prognosis, Leukemia, 21, p:143-150
25. Gutierrez, N.C., Garcia, J.L., Hernanez, J.M., Lumbreas E., Castellanos, M., Raillo, A., Mateo, G., Hernandez, J.M., Perez, S., Orfao, A., and Miguel, J.F., 2004, Prognostic and biyologic significance of chromosomal imbalances assessed by comparative genomic hybridization in multiple myeloma, The Amarican Society of Hematology, Blood, volume 104, number 9.
26. Güran, Ş., Hemotolojik hastalıklarda sitogenetik, Temel moleküler hematoloji kursu, Ankara
27. <http://www.atlasgeneticsoncology.org>
28. <http://www.thd.org.tr>
29. [http://www.multiplemyeloma.org/about\\_myeloma](http://www.multiplemyeloma.org/about_myeloma)

## **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>
31. <http://www.vysis.com>
32. Kaufmann, H., Krömer, E., Nösslinger, T., Weltermann, A., Ackermann, J., Reisner, R., Bernhart, M., Drach, J., 2003, Both chromosome 13 abnormalities by metaphase cytogenetics and deletion of 13q by interphase FISH only are prognostically relevant in multiple myeloma, *Eur. J. Haematology*, 71: 179-183
33. Keklikoğlu, M., Tuzcu, M., 1995, *The merc manual*, Nobel Kitap, 16. baskı, İstanbul s: 1253-1256
34. Keskin, A., 2006, Myelom tanı ve takibinde immünolojik laboratuvar incelemeler, *Türk Hematoloji Derneği Myelom Günleri 4*, s:18-22, İzmir
35. Koç.H.,1997, *Plazma Hücre Hastalıkları*, Klinik Hematoloji, Antip A.Ş, s:165-187
36. Königsberg, R., Zojer N., Ackemann, J., Krömer E., Kitler H., Fritz E., Kaufmann H., Nösslinger, T., Riedl L., Gisslinger, H., Jöger; U., Simonitsch, I., Heinz, R., Ludwig, H., Huber, H., and Drach, J., 2000, Predictive role of interphase cytogenetics for survival of patients with multiple myeloma, *Journal of Clinical Oncology*, Vol 18, No 4, February, pp 804-812
37. Liebisch, P., Döhner, H., 2006, Cytogenetics and molekuler cytogenetics in multiple myeloma, *European Journal of Cancer* 42, p: 1520-1529
38. Lloveras, E., Granada, I., Zamora, L., Espinet, B., Florensa, L., Besses, C., Xandri, M., Encarnacion, M., Milla, F., Woessner, S., Sole, F., 2004, Cytogenetic and fluorescence in situ hybridization studies in 69 patients with multiple myeloma and plazma cell leukemia, *Cancer Genetics and Cytogenetics* 148, 71-76

## **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

39. Loiseau, H., Attal, M., Moreau, P., Charbonnel, C., Garban, F., Hulin, C., Leyvraz, S., Michallet, M., Agha, I., Garderet, L, Marit, G., Michaux, L., Voillet, L., Renaud, M., Grosbois, B., Guillermin, C., Benboubker, L., Monconduit, M., Thieblemont, C., Casassus, P., Dumontet, DC., Fuzibet, JG., Azais, I., Dorvaux, V., Zandeckı, M., Bataille, R., Minvielle, S., Harousseau, JL., Facon, T. and Mathiot, C., 2007, Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma, Blood, 08-040410
40. Nussbaum,R.L., Mcinnes,R.R.,Willard,H.F., 2005, Thompson&Thompson Tıbbi Genetik, Güneş Kitabevi, s:311-332
41. Özsan, GH., 2008, Multiple myelom biyolojisi, Türkiye Klinikleri J Hem Onc-Special Topics,1, S:5-8
42. Pantou, D., Rizou, H., Tsarrouha, H., Pouli, A., Papanastasiou, K., Stamatellou, M., Trangas, T., Pandis, N. and Bardi, G., 2005, Cytogenetic manifestations of multiple myeloma heterogeneity, Genes, Chromosomes& Canser 42:44-57.
43. Schmidt-Wolf, I.G.H. , Glasmacher, A. , Hahn-Ast, C. , Jüttner, A. , Schnurr T., Cremer, F., Moehler T., Goldschmid, H., Busert, B., Schubert, R., Schwanitz, G., 2006, Chromosomal aberrations in 130 patients with multiple myeloma studied by interphase FISH: diagnostic and prognostic relevance, Cancer genetics and cytogenetics, 167,20-25
44. Taberbero, D., Miguel, Jf., Garcfa,R., Najera,L., Isidoro, Mg., Simon, Ja., Gonzdlez, M., Wiegant, J., Raap, Sa. And Orfao, A., 2006, Incidence of chromosome numerical changes in multiple myeloma, American Journal of Pathology, Vol. 149, No. 1

## **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

45. Tombulođlu, M., 2006, Myelomun tanı ve tedavisi: klasik yaklaşım, Türk Hematoloji Derneği Myelom Günleri, Ege Üniversitesi İzmir 4, s: 9-13
46. Wieser,R., Schreiner,U., Rieder,H., Pirc-Danoewinata,H., Gruner,H., Loncarevic, I.F., Fonatsch,C., 2003, Interphase fluorescence in situ hybridization assay for the detection of rearrangements of the EVI-1 locus in chromosome band 3q26 in myeloid malignancies, Haematologica, 88 (1) : 25-30.
47. William S. Dalton, P. Leif Bergsagel, W. Michael Kuehl,Kenneth C. Anderson, and J. L. Harousseau, 2001, Multiple Myeloma, American Society of Hematology
48. YAMAÇ,K., AKAN,H., 2001, Hematoloji-Onkoloji Cep Kitabı.
49. Yenerel, N.M., 2006, Tanısal hematoloji, Türk hematoloji derneği 5. ilk basamak kursu, s: 17-19

GÜLÇİN SUNGAR

**Kişisel Bilgiler :**

Doğum Tarihi : 10.01.1981  
Doğum Yeri : Eskişehir  
Uyruğu : T.C.  
Medeni Hali : Bekar  
Adres : Ertuğrulgazi Mah. Raykent. Sit. A30 Blok 3/6 ESKİŞEHİR

**Eğitim Durumu :**

<i>Yıl</i>	<i>Üniversite</i>	<i>Ortalama</i>
Yüksek Lisans 02.2006-05.2008	Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD	
Üniversite 09.2001-06.2005	Osmangazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji bölümü	3,76/4
Lise 09.1995- 02.1998	Barboros Hayrettin Lisesi	4,02/5

**Yabancı Diller :**

**İngilizce**  
(İyi Seviyede)

### **Ulusal Toplantılarda Sunulan Yazılı Bildiriler**

1. SUNGAR G., DURAK B., AKAY M.O., BADEMCİ G., ÖZDEMİR M., ÇİLİNGİR O., GÜLBAŞ Z., ARTAN S.: Multipl Myelomlu Olgularda Kromozom Aberasyonlarının Floresan In Situ Hibridizasyon (Fish) Ve Konvansiyonel Sitogenetik Yöntemlerle Belirlenmesi, VIII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, Kolin Otel,Çanakkale, 6-9 Mayıs 2008, Bildiri Kitabı, Sayfa 215
2. ÖZDEMİR, M., DURAK,B., BURUL, İ., AKAY, M.O., ASLAN, V., BADEMCİ, G., SUNGAR, G., ALKAN, A., GÜLBAŞ, Z., ARTAN, S.: Miyelodisplastik Sendromda Klasik Sitogenetik ve FISH Sonuçlarının Karşılaştırılması. VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi. Hilton Kongre Merkezi 17-20 Mayıs 2006, Kayseri. Bildiri Kitabı, Sayfa 184.
3. Beyhan Durak, Meltem O Akay, Muhsin Özdemir, Behiye Kaytaz, Gülçin Sungar, Sevilhan Artan, Zafer Gülbaş: Multipl Myelomalı Hastalarda Kromozomal Değişikliklerin FISH ile Tanısı ve Klinik Bulgularla İlişkisi.XXXII. Ulusal Hematoloji Kongresi , bildiri özetleri kitabı, Sayfa 133

### **Katıldığı Ulusal- Uluslararası Bilimsel Toplantılar**

1. VIII. Ulusal Tıbbi genetik kongresi, 2008, Çanakkale
2. Uluslararası Sitogenetik Kongresi 2007, İstanbul
3. VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi, 2006, Kayseri
4. Ulusal Ege Sempozyumu, 2006, Afyon
5. Biyoteknoloji Kongresi, 2005