

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MULTIPL MYELOM'DA GÖZLENEN KROMOZOM ANOMALİLERİNİN
BELİRLENMESİNDE KONVANSİYONEL SİTOGENETİK VE FLORESAN IN SİTU
HİBRİDİZASYON (FISH) TEKNİKLERİNİN BİRLİKTE KULLANIMININ TANISAL
DEĞERİNİN BELİRLENMESİ

Gülhan DEMİR

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü BİLİM
UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

KOCAELİ

2017

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MULTIPL MYELOM'DA GÖZLENEN KROMOZOM ANOMALİLERİNİN
BELİRLENMESİNDE KONVANSİYONEL SİTOGENETİK VE FLORESAN IN SİTU
HİBRİDİZASYON (FISH) TEKNİKLERİNİN BİRLİKTE KULLANIMININ TANISAL
DEĞERİNİN BELİRLENMESİ

Gülhan DEMİR

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü BİLİM
UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Seda EREN KESKİN

KOCAELİ

2017

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

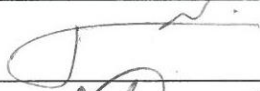
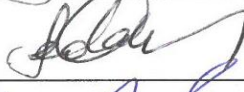

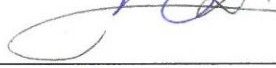
Tez Adı: Multipl Myelom'da Gözlenen Kromozom Anomalilerinin Belirlenmesinde Konvansiyonel Sitogenetik ve Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) Tekniklerinin Birlikte Kullanımının Tanısal Değerinin Belirlenmesi

Tez yazarı: Gülhan Demir

Tez savunma tarihi: 19/06/2017

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Seda EREN KESKİN

Bu çalışma, sınav kurumumuz tarafından Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) olarak kabul edilmiştir.

SINAV KURULU ÜYELERİ		İMZA
ÜNVANI	ADI SOYADI	
BAŞKAN	Doç. Dr. Naci UİNE	
ÜYE(DANIŞMAN)	Yrd. Doç. Dr. Seda Eren Keskin	
ÜYE	Prof. Dr. Seniha Hacchanefflu	
ÜYE	Doç. Dr. Naci UİNE	
ÜYE		

Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.../.../2017

Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

ÖZET

Multipl Myelom'da Gözlenen Kromozom Anomalilerinin Tespitinde Konvansiyonel Sitogenetik ve Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) Yönteminin Birlikte Kullanımının Tanısal Değerinin Belirlenmesi

Amaç: Multipl myelom, kemik iliğinde B hücrelerinden köken alan plazma hücrelerinin farklılaşması ve artışıyla seyreden kanser türüdür. Hücre siklusundaki bozukluklar ve bu sistemdeki yolakların genetik hasara uğramasıyla kontrol dışı çoğalan malign plazma hücreleri oluşur. Yapılan araştırmalarda multipl myelomada birçok kromozom anomalisini tanımlanmıştır. Bu anomaliler konvansiyonel sitogenetik ve FISH yöntemleriyle tespit edilebilmektedir. Multipl myelomda; 13q delesyonu-monozomi 13, p53 genlerinin delesyonu ve IgH geninin yeniden düzenlenmeleri gözlenmektedir. Amacımız; konvansiyonel sitogenetik ve FISH yöntemleri kullanarak, multipl myelom tanılı olgularda kromozomal anomalilerinin sıklığını belirlemek, prognoz ve tanıda bu iki yöntemin kullanımının avantaj ve dezavantajlarını karşılaştırarak tanıda en etkin stratejiyi belirlemektir.

Yöntem: Çalışmamızda, Temmuz 2011-Şubat 2017 tarihleri aralığında, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Anabilim Dalı'ndan yönlendirilen Multipl Miyelom tanısı almış 100 olguda konvansiyonel sitogenetik ve FISH analizi sonuçları incelendi.

Bulgular: Konvansiyonel sitogenetik analiz olguların 57'sinde (%78,1) gerçekleştirilebilmiş olup, 47 olguda (%82,5) normal karyotip izlenirken 10 olguda (%17,5) kromozom anomalileri gözlenmiştir. FISH analizinde; olguların %6,7'sinde kromozom 13'e ait anomaliler, %17,4'ünde kromozom 17'ye ait anomaliler ve %29,7'sinde kromozom 14'e ait anomaliler gözlenmiştir.

Sonuç: Çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre Multipl Myelom'lu olgularda konvansiyonel sitogenetik ve FISH yönteminin birlikte kullanımının hastalığın takip ve prognozunda önemli olduğunu, tanısal gücünün arttırdığını düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Multipl myelom, sitogenetik, FISH

ABSTRACT

Determination of the Diagnostic Value of Conventional Cytogenetic and Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Detection in Detection of Chromosomal Abnormalities in Multiple Myeloma

Objective: Multiple myeloma is a type of cancer characterized by differentiation and increase of plasma cells originating from B cells in bone marrow. Disturbances in the cell cycle and pathways in this system result in uncontrolled proliferation of malignant plasma cells by genetic damage. Several chromosome anomalies have been described in multiple myeloma studies. These anomalies can be detected by conventional cytogenetic and FISH methods. In multiple myeloma; 13q deletion-monosomy 13, deletion of p53 genes and rearrangement of the IgH gene are observed. Our aim is determining the most effective strategy in diagnosis by comparing the advantages and disadvantages of using these two methods to determine the frequency of chromosomal abnormalities in multiple myeloma diagnosed cases using conventional cytogenetic and FISH methods, prognosis and diagnosis.

Method: In our study, conventional cytogenetic and FISH analysis results were examined in 100 cases of Multiple Myeloma diagnosed in Kocaeli University Medical Faculty, Department of Medical Genetics, Kocaeli University Faculty of Medicine, Department of Hematology, between July 2011 and February 2017.

Results: Conventional cytogenetic analysis could be performed in 57 cases (78.1%) and chromosomal anomalies were observed in 10 cases (17.5%) while 47 cases (82.5%) were normal karyotypes. In FISH analysis; Anomalies of chromosome 13 were observed in 6.7% of the cases, anomalies of 17 chromosomes 17 and anomalies of chromosome 14 were observed in 29.7% and 17.4% of the cases, respectively.

Conclusion: According to our study, we believe that the combined use of conventional cytogenetics and FISH in multiple myeloma cases is important in the follow-up and prognosis of the disease and increases the diagnostic power.

Key words: Multiple myeloma, cytogenetic, FISH

TEŞEKKÜR

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı **Doç. Dr. Hakan SAVLI'ya,**

Genetik alanındaki çalışma ve eğitim hayatım boyunca çok şey öğrendiğim, her konudaki engin bilgisini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam **Doç. Dr. Naci ÇİNE' ye;**

Bu çalışmanın her aşamasına bilgi ve tecrübesiyle katkıda bulunan, yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca bana yol gösteren değerli danışman hocam **Yrd. Doç. Dr. Seda EREN KESKİN'e,**

Çalışmamızın analiz kısmında bana her konuda yardımcı olan ve her türlü bilgiyi benimle paylaşan değerli arkadaşlarım; **Biyolog Zeynep İLKAY'a ve Biyolog Buket DOĞRUOĞLU'na,**

Eğitim sürecim boyunca sevgi, hoşgörü ve destekleriyle her zaman yanımda olan değerli hocam **Yrd. Doç. Dr. Kudret Esen GÜMÜŞLÜ'ye** ve değerli arkadaşlarım; **Tuba ÜNAL, Biyolog Seda REKA, Biyolog Nimet SEYMEN** ve tüm laboratuvar ekibine;

Ayrıca, bu kıymetli ama bir o kadar zorlu ve yorucu dönemde, göstermiş oldukları sabır ve destekleri için sevgili babam **Prof. Dr. Arif DEMİR'e,** canım annem **Sevgi DEMİR'e** ve kardeşim **Gürkan DEMİR'e,**

Bana varlığı ile destek verip yüreklendiren tüm sevgili arkadaşlarıma,

Adını yazmayı unuttuğum ve hayatımın bu aşamasına gelmemde payı olan herkese, sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum...

Gülhan DEMİR

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ÇİZİMLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1-GİRİŞ	1
2-GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kanser	2
2.2. Kanserin Tanımı ve Sıklığı	2
2.3. Kanserin Oluşum Mekanizması ve Kanser Genetiği	3
2.4. Kansere Neden Olan Genler	4
2.4.1. Onkogenler	4
2.4.1.1. <i>Protonkogenler</i>	4
2.4.2. Tümör Süpresör Genler	5
2.5. Hematolojik Malignansiler	6
2.6. Hematopoez ve Hematopoetik Kök Hücreler	7
2.7. Normal Plazma Hücrelerinin Gelişimi ve Görevi	7
2.8. Plazma Hücre Diskrazilerinin Gelişimi (Monoklonal Gamopatiler)	9
2.9. Multipl Myelom Nedir?	10
2.9.1. Myelomanın Oluşum Mekanizması	10
2.9.2. Hastalığın Tipleri	11
2.10. Epidemiyoloji	12
2.11. Etyoloji	12
2.12. Tanı	12
2.13. Klinik Bulgular	13
2.14. Evreleme	16
2.15. Prognostik Faktörler	17
2.16. Tedavi	18
2.17. Endikasyonlar	19
2.18. Multipl Myelom'da Gözlenen Sitogenetik Değişiklikler	20
2.18.1. Yapı Anomalileri	21
2.18.2. Sayı Anomalileri	21
2.19. Multipl Myelom'da Sık Gözlenen Kromozomal Anomaliler	22
2.20. Multipl Myelom'da Genetik Analiz Yöntemleri	28
2.20.1. Sitogenetik Yöntemler	30
2.20.2. Moleküler Sitogenetik Yöntemler	30
3-GEREÇLER VE YÖNTEMLER	34
3.1. Yöntemler	34
3.1.1. Kemik İliği Aspirasyonu Kültürü	34
3.2. Kullanılan Malzemeler ve Solüsyonlar	36
4-BULGULAR	42
4.1.Sitogenetik Bulgular	43
4.2.Moleküler Sitogenetik Bulgular	54
5-TARTIŞMA	64
6-SONUÇ VE ÖNERİLER	68
KAYNAKLAR DİZİNİ	69

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BCL2: B-Cell Lymphoma

β2M: Beta-2 mikroglobulin

CCND1: B-Cell Leukemia-Lymphoma 1

CCND3: Cyclin D3

CGH: Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon

C-MAF: MAF Avian Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Homolog

CRP: C-reaktif protein

CUL4A: Regülatör ve Tümör Süpresör Geni

DAPI: 4',6'- Diamino-2-Fenilindol

DNA: Deoksi Ribonükleik Asit

DSS: Durie Salmon Evreleme Sistemi

FGFR3: Fibroblast Growth Factor Receptor 3

FISH: Floresan In Situ Hibridizasyon

FLC: Free Light Chain

HKH: Hematopoetik Kök Hücre

Ig: İmmüoglobülin

IgA: İmmüoglobülin Alfa

IgD: İmmüoglobülin Delta

IgE: İmmüoglobülin Epsilon

IgG: İmmüoglobülin Gama

IgH: İmmüoglobülin Ağır Zinciri

IgM: İmmüoglobülin Mu

IL 6: İnterlökin 6

ISH: In Situ Hibridizasyon

ISS: Uluslararası Evrelendirme Sistemi

KB: Kilobayt

KCl: Potasyum klorür

LAMP1: Lizozomal Membran Protein 1

LDH: Laktat dehidrogenaz

MAEA: Makrofaj Eritroblast Ataçlayıcı Gen

MAX: MYC associated factor X

MB: Megabayt

MGUS: Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance

MM: Multipl Myelom

MP: Melfalan-Prednizolon

MPT: Melfalan-Prednizolon-Talidomid

MR: Manyetik Rezonans

MXO4: Makrofaj Eritroblast Ataçlayıcı Gen

MYC: Myelocytomatosis viral oncogene homolog

P: Petit (Kromozomun kısa kolu)

PBS: Phosphate Buffer Salin

PCLI: Plazma Cell Labeling Index

PHA: Fitohemaglutinin

PHD: Plazma Hücre Diskrazileri

PROZ: K Vitaminine Bağımlı Kinaz Proteini

Q: Kromozomun uzun kolu

RB: Retinoblastom

SDF-1: Stromal Derived Growth Factor

SLBP: Stem-Loop Binding Protein

SMM: Smolderin Multiple Myeloma

SSC: NaCl 7 Trisodyum Sitrata

TP53: Tümör Protein 53

UV: Ultraviyole

VAD: Vinkristin-Adriamisin-Deksametazon

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

WHSC1-2: Wolf-Hirschhorn1-2

Z-DEX: Deksametazon

ÇİZİMLER DİZİNİ

Çizim 2.1. 2014 yılı Türkiye kanser istatistiği (Erkekler)	3
Çizim 2.2. 2014 yılı Türkiye kanser istatistiği (Kadınlar)	3
Çizim 2.3. Myc-Max genlerinin birlikte yer aldığı hücresel olaylar ve etkileştiği moleküller	5
Çizim 2.4. İmmüoglobulin temel yapısı	8
Çizim 2.5. İmmüoglobulin gelişimi	8
Çizim 2.6. Malign ve normal plazma hücrelerinin gelişimi	9
Çizim 2.7. Multipl Myelom'un klinik bulguları	14
Çizim 2.8. Kromozom 13'ün idiogramı	23
Çizim 2.9. Kromozom 17'nin idiogramı	24
Çizim 2.10. Kromozom 14'ün idiogramı	26
Çizim 2.11. MM'de sık gözlenen kromozom anomalileri	28
Çizim 2.12. FISH yönteminde kullanılan prob çeşitleri	32
Çizim 3.1. IgH Dual Color Break Apart Probe şematik çizimi	37
Çizim 3.2. TP53/CEN 17 Dual Color Probe şematik çizimi	38
Çizim 3.3. RB1/13q12 Dual Color Probe şematik çizimi	39
Çizim 4.1. 9 nolu olguya ait karyogram görüntüsü	46
Çizim 4.2. 11 nolu olguya ait karyogram	47
Çizim 4.3. 24 nolu olguya ait karyogram	48
Çizim 4.4. 42 nolu olguya ait karyogram	49
Çizim 4.5. 47 nolu olguya ait karyogram	50
Çizim 4.6. 57 nolu olguya ait karyogram	51

Çizim 4.7. 74 nolu olguya ait karyogram	52
Çizim 4.8. 100 nolu olguya ait karyogram	53
Çizim 4.9. IgH genine ait yeniden düzenlenmeleri için yapılan FISH analizinde metafaz kromozomlarında ve interfaz nukleusunda sinyal görünümleri ve değerlendirmeleri	57
Çizim 4.10. 14 nolu olguya ait RB1/13q12 Dual Color Probe FISH analiz görüntüsü	61
Çizim 4.11. 57 nolu olguya ait IgH Dual Color Break Apart Probe FISH analizi görüntüsü	61
Çizim 4.12. 74 nolu olguya ait TP53/CEN 17 Dual Color Probe FISH analizi görüntüsü	62



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Multipl Myelom'un Durie Salmon Evreleme Sistemine (DSS) göre evrelendirilmesi	16
Çizelge 2.2. Multipl Myelom'un Uluslararası Evrelendirme Sistemine (ISS) göre evrelendirilmesi	17
Çizelge 2.3. Multipl Myelom'da belirtilen kromozomal anomalilerin yer aldığı risk grupları	18
Çizelge 3.1. Laboratuvarında kullanılan malzemeler	39
Çizelge 3.2. Laboratuvarında kullanılan cihazlar	40
Çizelge 3.3. Laboratuvarında kullanılan cam malzemeler	41
Çizelge 4.1. Multipl Myelom olgularına ait yaş, cinsiyet ve bazı hematolojik parametrelerin dağılımı	42
Çizelge 4.2. Gözlenen sayısal/yapısal kromozom anomalilerinin oranları	43
Çizelge 4.3. Olgulara ait karyotip analizi bulguları	45
Çizelge 4.4. FISH yöntmiyle tespit edilen kromozom 13 e ait sayısal/yapısal anomalilerinin dağılımı	54
Çizelge 4.5. FISH yöntmiyle tespit edilen kromozom 17 ye ait sayısal/yapısal anomalilerinin dağılımı	55
Çizelge 4.6. FISH yöntmiyle tespit edilen kromozom 14 e ait sayısal/yapısal anomalilerinin dağılımı	56
Çizelge 4.7. Araştırma olgularına ait FISH analizleri sonucu saptanan sayısal/yapısal anomali bulguları	58
Çizelge 4.8. Anomali gözlenen olguların FISH ve karyotip sonuçları	60

1.GİRİŞ

Multipl Myelom (MM), tüm kanser türlerinin yaklaşık %1'ini ve ABD'deki hematolojik malignitelerin yaklaşık %10'dan fazlasını oluşturan, kemik iliğinde B hücrelerinden köken alan plazma hücrelerinin farklılaşması ve farklılaşan plazma hücrelerinin artışıyla birlikte seyreden kemik iliği kanseri türüdür. MM'un insidansı yılda 3-4/100000 kadardır (Özsan 2008). MM, genellikle ileri yaşta görülmekle birlikte daha genç yaşlarda da gözlenmektedir. Ayrıca hastalığın görülme sıklığı cinsiyete göre de değişmektedir. Erkeklerde kadınlara göre daha sıktır. Hastalığın teşhis edilen ortalama yaş; erkeklerde 69, kadınlarda ise 71 olarak bildirilmiştir.

Multipl myelom hastalarında monoklonal immunoglobulin (IgG, IgA, IgD, IgE) ve/veya Bence Jones protein (serbest monoklonal κ veya λ hafif zinciri) yapımı gözlenir. Miyelom oluşumuna; hücre siklusu, sinyal iletim sistemi, apoptoz ve kemik iliği mikroçevresi gibi birçok sistemdeki anomalilerinin rol oynadığı düşünülmektedir (Çiftçi 2009). Hücre siklusundaki bozukluklar ile birlikte bu sistemde görev alan yolakların genetik hasara uğramasıyla kontrol dışı çoğalan malign plazma hücreleri oluşmaktadır.

Son yıllarda MM'de yapılan konvansiyonel sitogenetik ve moleküler sitogenetik çalışmalarda pek çok tekrarlayan genetik anomali bildirilmiştir. Multipl myelomda sıklıkla, 13q14 delesyonu ve monozomi 13 gibi 13. kromozom anomalileri, 17. kromozomda yer alan p53 geninin delesyonu ve 14. kromozomda yer alan IgH geninin farklı partner genlerle yeniden düzenlenmeleri gözlenmektedir (Chang ve diğ. 2004). Konvansiyonel sitogenetik ve Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) çalışmaları ile sık görülen bazı anomalilerin hastalığın evresi ve prognozu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada, konvansiyonel sitogenetik ve FISH yöntemlerinin birlikte kullanılarak; multipl myelom tanılı olgularda kromozomal aberasyonların sıklığını belirlemek, gözlenen yeniden düzenlenmelerle hastalığın prognozu arasındaki ilişkiyi araştırmak ve kliniğe etkisini belirlemek amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

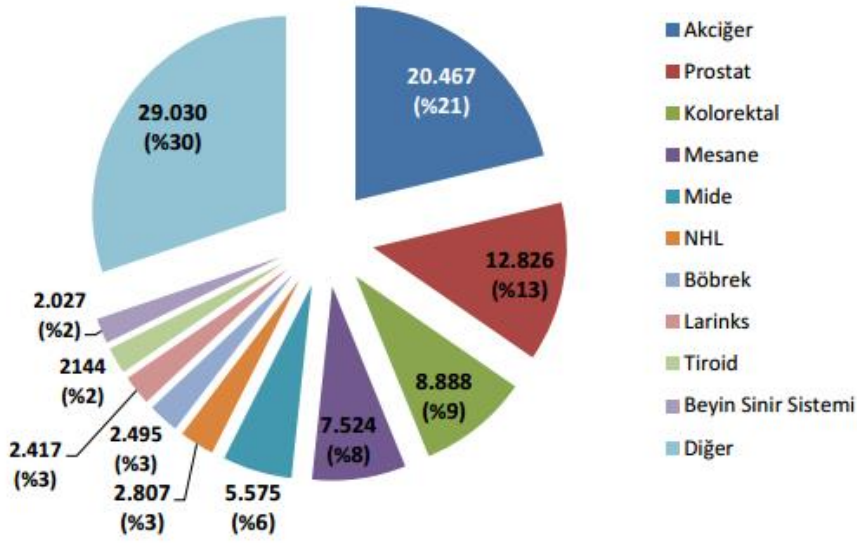
2.1. Kanser

2.2. Kanserin Tanımı ve Sıklığı

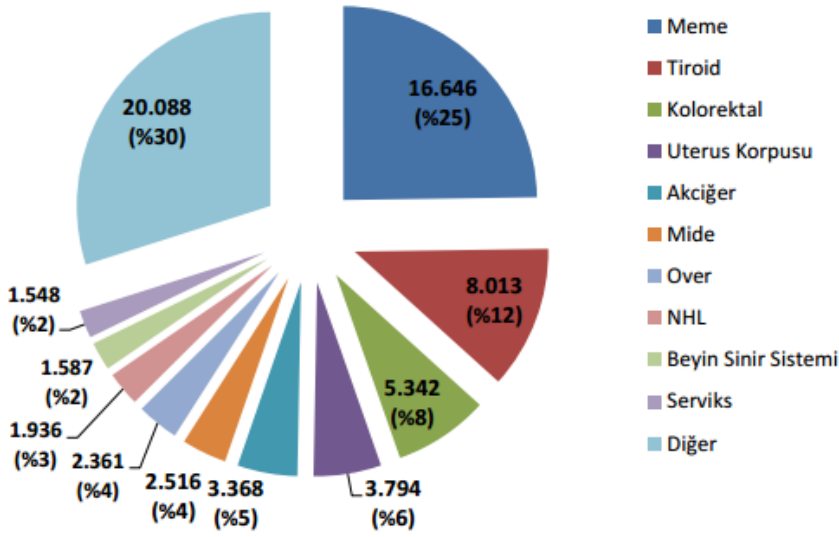
Genel anlamda hücrelerin kontrolsüz bölünerek çoğalması anlamına gelen kanser, dünya genelinde en ölümcül hastalıklardandır. Kanser beraberinde getirdiği sağlık sorunlarının yanı sıra, maddi ve manevi yönden uzun süreli mücadele gerektirmektedir (Ferlay ve diğ. 2013).

Genellikle yaşlılık hastalığı olarak bilinse de, kanser her yaşta ortaya çıkabilen bir hastalık haline gelmiştir. Kanser türleri ortalama olarak 67 yaşlarında ortaya çıkmaktadır. Dünya üzerinde kanser kayıtçılığı yapan 184 ülkenin ve 28 kanser tipinin güncel tahminlerini yürüten GLOBOCAN'ın araştırmalarına göre, 2015 yılında dünya genelinde tanımlanan 14,1 milyon kanser vakasından 8.8 milyonu kanser nedeniyle hayatını kaybetmiştir. Son 5 yıl içinde kanser teşhisi konulan ve hayatına devam eden toplam 32,6 milyon hasta bulunmaktadır (Ferlay ve diğ. 2013).

Ülkemizdeki kanser insidansı gelişmiş ülkelere göre daha düşük olduğu bildirilmektedir. 2013 yılı istatistiklerine göre ülkemizde her yıl 103.070 erkek ve 71.223 kadın kansere yakalanmaktadır. Erkeklerde en sık görülen kanser türü akciğer kanseri ve prostat kanseri iken kadınlarda meme kanseri ve tiroid kanserleridir. Erkeklerde sıklıkla görülen kanser türlerinin dağılımı Çizim 2.1.de, kadınlarda sıklıkla görülen kanser türlerinin dağılımı ise Çizim 2.2.de verilmiştir.



Çizim 2.1. 2014 yılı Türkiye kanser istatistiği (Erkekler)



Çizim 2.2. 2014 yılı Türkiye kanser istatistiği (Kadınlar)

2.3. Kanserın Oluşum Mekanizması ve Kanser Genetiği

Hücrenin oluşumundan itibaren her hücre; gelişir, çoğalır, farklılaşır, yaşlanır ve ölür. Canlı organizmalarda oluşmakta olan ve ölen hücreler arasında bir denge söz konusudur. Her hücrenin çekirdeğinde, organizmanın genetik bilgisinin taşındığı Deoksi Ribonükleik Asit (DNA) adı verilen molekül bulunmaktadır. DNA ile birlikte hücre normal fonksiyonlarını gerçekleştirirler. Bazı somatik ve/veya epigenetik mutasyonlar nedeniyle hücrelerin DNA'larında onarılamayacak düzeyde hasarlar meydana gelmekte ve

sonucunda anormal bir şekilde çoğalan hücreler oluşmaktadır. Karsinogenez, kanserin oluşum ve gelişim sürecidir. Sağlıklı hücrelerin kansere dönüşmesi karsinojenlere maruziyet sonucunda oluşmaktadır.

Kansere sebebiyet veren bu karsinojenler çevresel veya genetik kökenlidirler (Hodgson ve Maher 1993). Karsinojenler aynı zamanda, hücrenin genetik materyali içine yerleşerek kansere neden olan mutasyonları meydana getirebilen mutajenlerdir.

Kanser, genlerin mutasyona uğraması sonucu oluşan genetik bir rahatsızlıktır. Hücre, sağlıklı bölünme mekanizmalarının genetik hasara uğraması sonucu bu yeteneğini kaybederek kontrolsüz bölünmeye başlar ve kanseri oluşturur. Kanser, bir tek hücrede transforme olup daha sonra bölünerek gelişmesine yol açan neoplaziler, ardından hücresel proliferasyon ve hücresel yokoluş arasındaki dengesizlikle oluşur. Prolifere olan bu hücreler, hücre siklusuna girer ve mitozu uğrayarak hızla çoğalırlar (Nussbaum ve diğ. 2005).

2.4. Kansere Neden Olan Genler

Kansere neden olan mutasyonlar büyük çoğunlukla; sigara kullanımı, radyasyon maruziyeti, kimyasal maddeler gibi çevresel etkenlerden kaynaklanmaktadır.

Hücrenin farklılaşmasıyla birlikte kanser oluşumuna neden olan genler genel olarak iki ana gruba ayrılmaktadır.

- Onkogenler
- Tümör Süpresör Genler

2.4.1. Onkogenler

Onkogenler, hücrenin kanserleşmesine yol açan proteinlerin üretiminden sorumlu genlerdir. Onkogenler hücre mekanizması içerisinde kanserleşmeyi gerçekleştirebilecek dominant etkiye sahiptir. Hücre büyümesi ve çoğalmasında görev alan proto-onkogenlerin aktif hallerini oluşturmaktadırlar.

2.4.1.1. Protoonkogenler

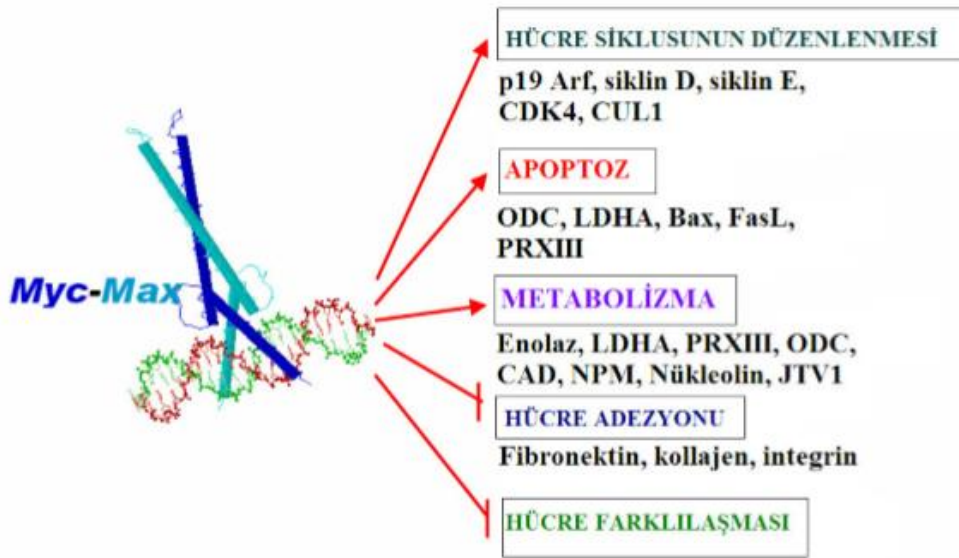
Protoonkogenler; hücre farklılaşması-proliferasyonu ve apoptozis için aldıkları sinyalleri hücre membranından çekirdeğe ilettikleri sinyal mekanizmasında görevlidirler.

Protoonkogenler; kromozom translokasyonları, yeniden düzenlenmeleri, nokta mutasyonları ve gen amplifikasyonları sonucu aktifleşerek onkogenleri oluştururlar.

Protoonkogenler;

- 1) Hücre içi sinyal iletiminden sorumlu proteinler
- 2) Apoptozisin baskılanmasından sorumlu proteinler
- 3) Transkripsiyon faktörleri, büyüme faktörleri ve reseptörleri
- 4) Kromotinin modifiye edilmesinden sorumlu proteinlerin kodlanmasındaki işlevsel mekanizmaları gerçekleştirir.

Myc geni önemli protoonkogenlerdendir. Myc protoonkogeni; transkripsiyonu aktive etme ve baskılamada, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptoz gibi pek çok hücreysel olayda görevlidir. Myc geninin yer aldığı hücreysel olaylar ve etkileşime girdiği moleküller Çizim 2.3.de verilmiştir.



Çizim 2.3. Myc-Max genlerinin birlikte yer aldığı hücreysel olaylar ve etkileştiği moleküller

2.4.2. Tümör Süpresör Genler

Anti-onkogen olarak da tanımlanan bu genler hücre büyümesi ve bölünmesini düzenleyen genlerdir. Bu genlerin şifreledikleri proteinler kontrolsüz hücre bölünmesini önlemeye yardım eder. Tümör baskılayıcı proteinin normal aktivitesini bozan herhangi bir

mutasyon kanserin başlamasına katkı sağlar. Tümör süpresör genler genel olarak; DNA onarımı için hücre döngüsünün durduracak ve/veya DNA onarılamaz durumda ise hücrenin apoptozisine yönlendirecek şekilde çalışır. Bilinen en önemli tümör süpresör gen 17. Kromozomun p13 bölgesine lokalize TP53 genidir (Nussbaum ve diğ. 2005).

2.5. Hematolojik Malignansiler

Kan hücrelerinin ve onu oluşturan mekanizmaların kontrolsüz bölünmesiyle meydana gelen hastalıklar hematolojik malignansiler olarak adlandırılır. Hematolojik kanserler genel olarak 5 grup içerisinde ele alınmaktadır.

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

2.6. Hematopoez ve Hematopoetik Kök Hücreler

Hematopoetik kök hücreler (HKH); kendisini yenileyebilen, çoğalabilen ve tüm kan hücrelerini üretebilme yeteneğine sahip hücrelerdir. HKH'ler kanın hücrel tüm elemanlarını ve immün hücreleri yapılandırılıp, şekillendirebilir (Özlemkaş 2008).

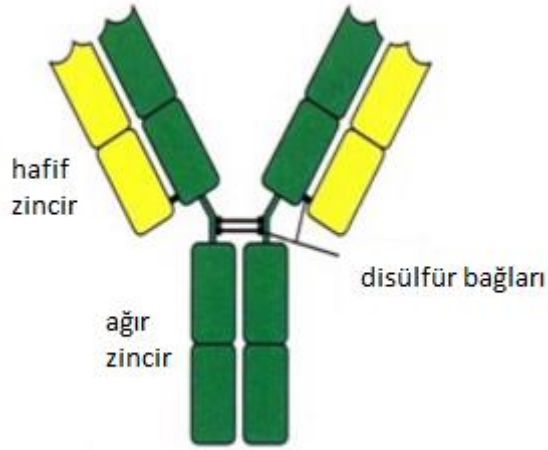
Tüm kan hücreleri kemik iliğinde yer alan hematopoetik kök hücrelerden köken alırlar (Özdilek 2013). Kemik iliği içerisinde pluripotent kök hücrelerden lenfoid ve myeloid hücreler oluşmaktadır (Levit ve Lin 1996). Lenfoid hücreler B ve T lenfositleri, myeloid hücreler ise eritrosit, granülosit, monosit ve megakaryosit gibi diğer kan hücrelerini oluştururlar. Bu olaya hematopoez adı verilmektedir. B hücreleri kemik iliği içerisinde gelişip, herhangi bir uyarı sonucunda plazma hücrelerine dönüşerek immün sistemin bir parçası olurlar.

2.7. Normal Plazma Hücrelerinin Gelişimi ve Görevi

Plazma hücreleri de hematopoetik kök hücreden gelişen B lenfositlerinin farklılaşmasıyla oluşmaktadırlar. (Özsan 2008).

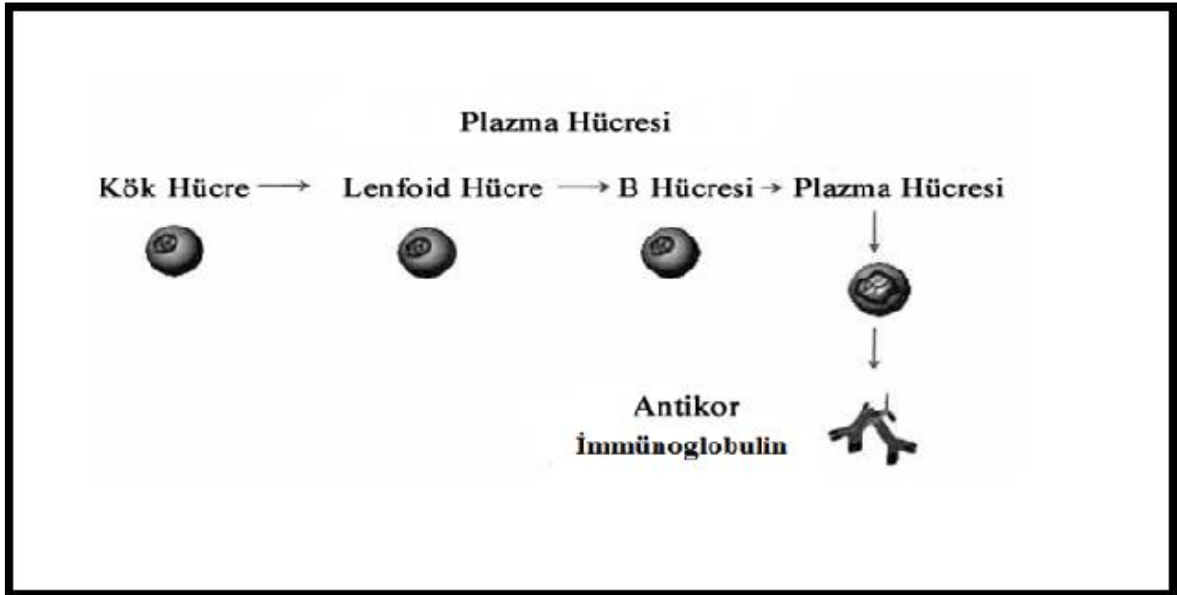
Plazma hücreleri immün sisteminde önemli rol oynamaktadır. Primer B hücreleri yaşamları boyunca kemik iliğinde hematopoetik kök hücrelerden, antijenle indüklenen B hücreleri ise sekonder lenfatik dokudan köken alırlar. B lenfositler yüzeylerindeki IgM/D molekülleri sayesinde, vücuda bir bakteri ve/veya virüs girdiğinde plazma hücrelerine dönüşerek, savunmada rol alan immünooglobulin (Ig) yapısındaki antikörleri oluştururlar.

Genel olarak immünooglobulinler; Gama (IgG), Alfa (IgA), Mu (IgM), epsilon (IgE) ve delta (IgD) olmak üzere beş ana sınıfa ayrılırlar ve iki uzun-ağır ve iki kısa-hafif zincirden oluşmaktadırlar. Her bir sınıf ağır zincirin tek tipine sahiptir. İmmünooglobulinin temel yapısı Çizim 2.4.de verilmiştir. İmmünooglobulinlerin her tipi vücutta farklı fonksiyonlara sahiptir. IgG, IgA ve IgM kanda çok miktarda bulunurken, IgD ve IgE çok az miktarda bulunur. (Özsan 2008).



Çizim 2.4. İmmüoglobulin temel yapısı

İnsan vücudu yaşamı boyunca çok farklı antijenlerle karşılaşmaktadır. Bu antijenlerle karşılaşan B lenfositler, antijenlere karşı uygun tipte ve gerekli miktarda antikor üretecek olan plazma hücrelerine dönüşür. Plazma hücrelerinin genel görevi antikor üreterek yabancı ajanlara karşı vücut savunmasını güçlendirmektir. Her bir virüs ve bakteriyi ayrı ayrı tanıyan bu savunma maddeleri için farklı antikorlar üreterek onlarla savaşır. Her yeni zararlı antijene karşı uygun antikor üretecek yeni plazma hücrelerinin yapımı kontrollü şekilde devam eder. İmmüoglobülin gelişimi Çizim 2.5.te verilmiştir.

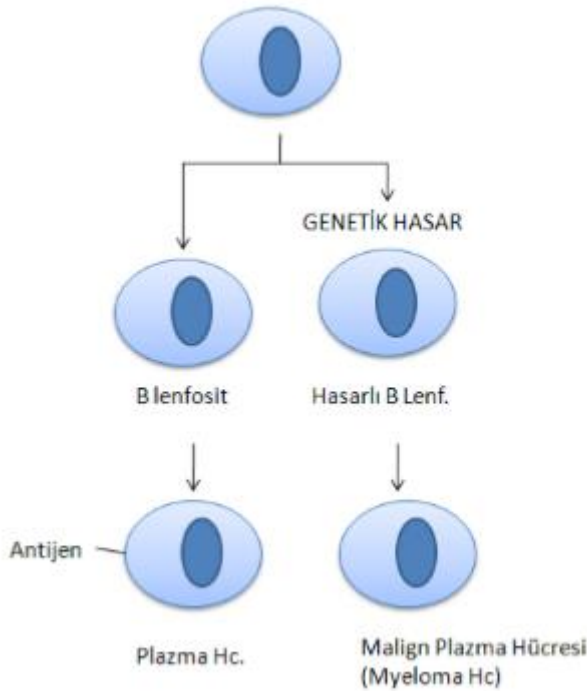


Çizim 2.5. İmmüoglobülin gelişim

2.8 Plazma Hücre Diskrazilerinin Gelişimi (Monoklonal Gamopatiler)

KontROLSÜZ çoğalan plazma hücreleri, anormal bir protein olan 'Paraprotein' veya 'M proteini- Monoklonal İmmünglobulin' üretirler. Miyelom plazma hücreleri de antikor üretir. Fakat bu hücrelerin ürettiği antikorlar, hasta hücrelerin tek tip ve aynı karakterde olması nedeniyle tek tiptedir. Oluşan bu proteinin yararlı bir işlevi olmamakla birlikte kan akışkanlığın bozulmasına ve böbrek hasarına neden olmaktadır. Yüksek miktarda hatalı antikor üretimi hastanın kanında serum protein artışına ve dolaşımın zayıflamasına neden olmaktadır. Bu hastalık ise Plazma Hücre Diskrazisi (PHD) olarak adlandırılır. PHD'ler için aynı zamanda monoklonal gamopati, disproteinemi ve paraproteinemi tanımları da kullanılabilir. Malign plazma hücrelerinin gelişimi Çizim 2.6.da verilmiştir.

Çoğu kanser türünden farklı olarak miyelom, kitle ve tümoral halde bulunmayıp, yetişkinlerde kemik iliğinin aktif olduğu; omurga, kafatası, leğen kemiği, göğüs kafesi, omuzlar ve kalçaların etrafındaki birden çok alanı tutabilmektedir.



Çizim 2.6. Malign ve normal plazma hücrelerinin gelişimi (Bükülmez 2011).

2.9. Multipl Myelom Nedir?

Multipl myelom, kemik iliğinde B hücrelerinden köken alan plazma hücrelerinin farklılaşması ve farklılaşan plazma hücrelerinin artışıyla birlikte seyreden kemik iliği kanseri türüdür. Bu hastalarda monoklonal immunoglobulin (IgG, IgA, IgD, IgE) ve/veya Bence Jones protein (serbest monoklonal κ veya λ hafif zinciri) yapımı gözlenir. Hastalarda gözlenen en yaygın miyelom tipleri %60 oranında IgG ve %20 oranında IgA'dır (Keklikoğlu 1995). Miyelom hastalığında kandaki M proteinin fazla olmasına rağmen üretilen immunoglobulinler eksiktir ve yalnızca hafif zincirden oluşur. Böyle hastalara Bence Jones Miyeloma denir (Atamer 2004). Kanda az bulunan Bence Jones proteini, immünoelektroforez yardımıyla idrarda kolayca gözlenip, miktarı belirlenebilir.

2.9.1. Myelomanın Oluşum Mekanizması

Miyelom oluşumuna; hücre siklusu, sinyal iletim sistemi, apoptoz ve kemik iliği mikroçevresi gibi farklı sistemlerin anomalilerinin rol oynadığı düşünülmektedir. (Çiftçi 2009). Hücre siklusundaki bozukluklar ile birlikte bu sistemde görev alan yolakların genetik hasara uğramasıyla kontrol dışı çoğalan malign plazma hücreleri oluşur. Oluşan bu hücreler dolaşım sistemine katılarak sağlıklı dokulara zarar verir. Miyelom hücrelerinin oluşumunda; mutasyonlar, kromozomal anomalileri gibi genetik bozuklukların etkilerinin olduğu düşünülmektedir.

Hastalığın patogenezinde kemik iliği mikroçevresi önemli bir role sahiptir. Burada miyelom hücreleri genetik değişiklikler kazanıp hastalığın gelişmesini sağlamaktadır. Miyelom hücreleri çoğabilmeleri için kemik iliği mikroçevresine bağımlıdır. Miyelom hücrelerinin ekstrasellüler matris proteinleri ve kemik iliğine ait stromal hücreler etkileşim kurarlar. Bu etkileşimle birlikte kemik iliği mikroçevresindeki sitokinler ve angiogenez gibi faktörlerle birlikte miyelom gelişir (Hayashi 2003). Hastalığın ilerlemesiyle birlikte tümör hücreleri stromadan bağımsız hale gelirler. Tümör hücreleri kemik iliği stromal hücreleri ve ekstrasellüler matris proteinleri ile ilişki kurabilecekleri gibi bir de indirekt olarak adezyon molekülleri büyüme faktörleri ve çözülebilen sitokinlerin salınımıyla da ilişki kurabilirler. Tümör hücrelerinin esas büyüme faktörü; büyüme ve çoğalmada rol alan plazma hücre apoptozunu önleyen interlökin (IL)-6'dır (Fassas ve diğ. 2002). IL 6 ile birlikte, vasküler endotelial büyüme faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor-VEGF) ve stromal hücre kökenli büyüme faktörü -1 (Stromal Derived Growth Factor-SDF-1) sayesinde miyelom hücreleri olgunlaşabilir, yaşam süreleri uzayabilir ve ilaca karşı

dirençli hale gelebilirler. Anjiogenez ile birlikte tümör hücrelerine oksijen ve besin sağlanır ve çoğalan miyelom hücreleri kemik iliğinde baskın hale gelir (Zhang ve diğ. 1992).

2.9.2. Hastalığın Tipleri

Sessiz (Smoldering) Myelom

Asemptomatik bir evredir. Bu evrede; anemi, böbrek yetmezliği, hiperkalsemi ve kemik lezyonları görülmemekle birlikte idrarda az miktarda M proteini gözlenebilir. Serum M proteini 3 mg/dl'den az, kemik iliğindeki plazma hücrelerinin yoğunluğu %10'dan fazladır. PCLI (Plazma Cell Labeling Index) düşük, Beta-2 mikroglobulin ve C reaktif protein (CRP) düzeyleri normaldir. Bu hastalara bulgular ilerlemediği sürece tedavi verilmemelidir (Kyle ve diğ. 2010).

Plazma Hücreli Lösemi

Plazma hücre lösemi primer tipte olabileceği gibi farklılaşarak sekonder yapıya geçebilir. Hastaların yaklaşık %60'ı primer tip grubunda ve daha genç yaşadılar. Yeni tanıli multipl myelom hastalarının %5'den azında sekonder tip görülmektedir. Periferik kanda plazma hücre sayısı %20'den fazladır. Sekonder tipte hastalar; yüksek tümör yüküne, yüksek LDH (Laktat dehidrogenaz) ve Beta-2 mikroglobulin düzeyine, hipodiplopiye ve monozomi 13'e sahiptir. Bu form kemoterapiye oldukça dirençli olduğundan tedavi şansı düşüktür. Hastaların sağkalımı iki aydan azdır (Garcia ve diğ 1999).

Ekstramedüller Plazmositom

Ekstramedüller plazmositom genellikle burun boşluğu-sinüsler, gastrointestinal sistem, larinks ve nazofarinksde olup kemik iliği dışında oluşur. Burun tıkanıklığı en sık belirtilerendir. Tanı; bulguların olmaması durumunda organ biyopsisinde gözlenen monoklonal plazma hücrelerinin varlığıyla konur. Lokal yerlere uygun radyoterapi tedavisiyle tedavi edilebilir. Hastaların %30'undan azında multipl miyeloma doğru evrilme görülür (Dimopoulos ve Hamilos 2002).

Soliter Plazmositom

Kemiklerde veya yumuşak dokularda plazma hücreleri tarafından oluşturulmuş kitlelerdir. En yaygın belirtisi ağrıdır. Tanı; plazma hücrelerinin kemik veya yumuşak doku

tutulmaları haricinde, kemik iliği, kan ve idrarda M proteini yokluğu ile konular. Anemi ve hiperkalsemi gözlenmez. Kitlenin alınması ve lokal radyoterapi ile tedavi edilebilir. Hastaların ortalama %50'sinde multipl miyelom gelişir. Ortalama sağkalım süresi %45-74 oranındadır (Kyle 1997).

Poems Sendromu

Monoklonal immunoglobulinin periferik sinirler üzerine toksik etki yapmasıyla hastaların üçte ikisinde; endokrin bozukluklar, deri hastalıkları tek ya da çok kemik lezyonları görülebilir. Tanı kemik lezyonlarından alınan biyopsilerle konabilir. Poems sendromlu hastalar genellikle dolaşım sistemi bozukluğu veya enfeksiyonlar sebebiyle hayatlarını kaybederler (Dispenzieri ve diğ. 2002).

2.10. Epidemiyoloji

MM, tüm kanser türlerinin yaklaşık %1'ini ve ABD'deki hematolojik malignitelerin yaklaşık %10'dan fazlasını oluşturur (Brenner 2002). MM'un insidansı yılda 3-4/100000 kadardır. MM, genellikle ileri yaşta görülmekle birlikte daha genç yaşlarda da gözlenmektedir. Ayrıca hastalığın görülme sıklığı cinsiyete göre de değişmektedir. Erkeklerde kadınlara göre daha sıktır. Hastalığın teşhis edilen ortalama yaş; erkeklerde 69, kadınlarda ise 71 olarak bildirilmiştir (Campagnaro ve diğ. 2011). Hastalık nadir de olsa 40 yaş altında gözlenmektedir. Hastalık siyah ırklarda beyaz ırklara göre daha sık görülür. Bu oran beyaz ırklarda 4.2, siyah ırklarda ise 9.3'e ulaşmaktadır (Bergsagel 1995).

2.11. Etyoloji

Multipl miyelomun etyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte; genetik ve çevresel bazı faktörlerin etkisinde olabileceği düşünülmektedir. Radyasyon maruziyeti, tarım işçiliği, tarım ilaçları ve benzen maruziyeti, metal endüstri çalışanı olma, sigara ve alkol tüketimi ve viral enfeksiyonların hastalığın etyolojisini oluşturabileceği düşünülmektedir (Dispenzieri ve diğ. 2009).

2.12. Tanı

Hastaların çoğu, Multipl Miyelom tanısı konmadan önce asemptomatik bir evre olan, önemi belirlenememiş monoklonal gamopati (Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance-MGUS) olduğu kabul edilmektedir. Multipl Myelom; tedavi gerektirmeyen sessiz miyelom (Smolderin Multiple Myeloma-SMM) ve tedavi gerektiren MM olarak

ikiye ayrılır. SMM hastalarının %80 kadarı 2 yıllık takip sonucunda tedavi gerektiren aktif multipl miyeloma evrildiği gözlemlenmiştir. Multipl Miyelomda başlıca klinik bulgular; hiperkalsemi, renal yetmezlik, anemi, kemik lezyonlarıdır. Bunlara ilave olarak kemik iliğindeki klonal plazma hücrelerinin %60'ın üzerinde olması, serbest hafif zincir (FLC) düzeyinin 100'ün üzerinde olması ve manyetik rezonansda (MR) birden çok 5 mm ve/veya daha büyük lezyon varlığı tedavi gerektiren multipl miyeloma işaret etmektedir.

2.13. Klinik Bulgular

MM, kemik anormallikleri, kemik ağrıları ve kırıkları, halsizlik, enfeksiyonlara yatkınlık, hiperkalsemi, anemi, böbrek yetmezliği, immün yetersizlik, bazı pıhtılaşma bozuklukları ve nörolojik semptomlar gibi metabolik bozuklukların etkisiyle kendini göstermektedir (Büyüköztürk 2007). MM'de gözlenen klinik bulgular Çizim 2.7.de gösterilmiştir.



Çizim 2.7. Multipl Myelom'un klinik bulguları

Kemik Rahatsızlıkları

Multipl miyelomda en sık gözlenen bulgu kemik rahatsızlıklarıdır (Bird ve Owen 2011). Bu durum hastaların yaklaşık %70'inde görülmektedir. Hastalarda karşılaşılan kemik ağrısı hareketle artar ve genellikle sırt, göğüs ve kaburgalarda, seyrek olarak ise ekstremitelerde gözlenir. Bu kemik ağrıları plazma hücrelerinin birikimi sonucunda kemiklerin zayıflaması ve kırılmasına kadar gidebilmektedir. Bu durum osteopeni olarak adlandırılır ve hastaların yaklaşık %60'ında bulunmaktadır. Özellikle aktif kemik iliği bulunan bölgelerde osteoklastik aktivite artışı olup bu bölgelerde kemik erimesi ve zımba ile delinmiş görünümlü tanımlanan osteolitik alanlar gözlenmektedir. İleri yaş hastalarında yeni ve ani başlayan sırt ağrısı multipl miyelom ön tanısını koymak için yeterli bir bulgudur. Aynı şekilde bir multipl miyelom hastasında aynı yerdeki sürekli ağrı ve patolojik kırık hastalık yönünde bir bulgudur.

Böbrek Yetmezliği ve Hiperkalsemi

Böbrek yetmezliği multipl miyelom hastalarının yaklaşık %25'inde görülen ve prognostik önemi olan bir bulgudur (Augustson ve diğ. 2005). Bu hastalarda serum kreatinin değeri 2 mg/dl'nin üzerindedir. Renal yetmezlik akut veya kronik şekilde kendini gösterebilir ve bulantı, kusma ve kabızlık ile birlikte miyelomun başlangıç görüntüsü olabilir. Renal yetmezliğin nedenleri; miyelom böbreği ve hiperkalsemidir. Hiperkalsemi kandaki kalsiyum miktarının normalin üstünde olması anlamına gelmektedir. Normalin üstünde olan bu kalsiyum seviyesi sonucu fazla kalsiyum böbreğe çökebilir ve böbrek yetersizliğini geliştirebilir (Dispenzieri ve diğ. 2009). Multipl miyelomlu hastaların yaklaşık olarak %30-40'ında bulunur. Bu hastaların %10'unda kandaki paraprotein seviyesine bağlı olarak hipervizkosite gelişebilir.

Enfeksiyonlara Eğilim

Multipl miyelomlu hastalarda sık gözlenen diğer bir bulgu enfeksiyonlara karşı eğilimdir. Hastaların yaklaşık dörtte birinde bu semptom görülmektedir ve ölümlerin en sık nedenidir (Dispenzieri ve Kyle 2005). Pnömoni ve piyelonefrit en sık karşılaşılan enfeksiyonlardır. Gözlenen bu enfeksiyon eğiliminin en önemli sebebi normal immunglobulin sentezindeki azalma ve Ig katabolizmasındaki artış ve bozuk antikor üretimidir. Enfeksiyon eğilimine diğer bir sebep ise hastaların antikor yanıtlarının özellikle polisakkaritlere karşı azalmış olmasıdır. Bu nedenle polisakkarit yapıda hücre duvarına sahip olan bakteriler enfeksiyona sıklıkla neden olurlar.

Anemi

Anemi multipl miyelomda sık görülen bir klinik bulgudur. Genellikle normokrom normositik bazen makrositik anemi görülmektedir. Anemi, tanı sırasında hastaların yaklaşık %80'inde görülmektedir. Sebebi genel olarak kemik iliğinde tümör hücrelerinin; istilası ve hematopoezi baskılamasıdır. Ayrıca miyelomun sebep olduğu böbrek yetmezliğine bağlı azalmış eritropoetin düzeyi de anemiye katkıda bulunur.

Amiloidoz

Bazı multipl miyelomlu hastalarda vücutlarında biriken anormal proteinlerin dokularında birikmesi sonucu amiloidoz oluştururlar. Amiloidoz birikimi yerleşimine göre

çeşitli belirtiler gösterebilir. Kalpteki birikim sonucu göğüs ağrısı ve ayaklarda şişkinlik gözlemlenebilir. Amiloidoz ilaçla tedavi edilebilmektedir.

Kriyoglobulinemi

Vücutta biriken anormal proteinler soğuk maruziyetiyle jelimsi kıvama gelerek ince kan damarlarını tıkayabilir. Soğuk havalarda parmaklarda ağrı ve uyuşmalarla kendini belli eder.

2.14. Evreleme

Multipl Miyelom hastalığının evrelendirilmesinde günümüzde iki evreleme sistemi kullanılmaktadır. Bu evreleme sistemleri; 1975 yılında Brian Durie ve Sydney Salmon'un birlikte oluşturdukları "Durie Salmon Evreleme Sistemi (DSS)" ve "Uluslararası Evrelendirme Sistemi (ISS)"dir (Greipp ve diğ. 2005).

DSS evreleme sistemi hastalığı; M protein miktarı, serum kalsiyum düzeyi, hemoglobin düzeyi, kemiklerdeki litik lezyonlar ve böbrek bozuklukları açısından değerlendirerek üç evrede evreler. MM'nin Durie Salmon Evreleme Sistemine göre evrelendirilmesi Çizelge 2.1.de verilmiştir.

Çizelge 2.1 Multipl Myelom'un Durie Salmon Evreleme Sistemine (DSS) göre evrelendirilmesi

Evre-I	Evre-II	Evre-III
<ul style="list-style-type: none">• Hemoglobin > 10 g/dl• Normal kalsiyum düzeyi (< 12 mg/dl)• Normal kemik grafileri veya soliter kemik plazmasitomu veya sadece osteoporoz varlığı• Düşük M komponent IgG < 5g/dl IgA < 3g/dl idrар hafif zincir M komponenti < 4 gr/dl	<p>Bulgular evre I'dekiler kadar düşük ve evre III'teki kadar yüksek değil</p>	<ul style="list-style-type: none">• Hemoglobin <8.5 g/dl• Serum kalsiyum > 12 mg/dl• 3 veya daha fazla ilerlemiş litik kemik lezyonu• Artmış M komponent varlığı IgG > 7 g/dl IgA > 5 g/dl idrар hafif zincir M komponenti >12gr/dl/24 h

DSS evreleme sistemine göre düşük tümör miktarı ve serum kreatinin düzeyi 2mg/dl'den az olan hastalarda beklenen ortalama sağkalım süresi 5,5 yıl iken, yüksek tümör miktarı ve renal yetmezliği olan hastalarda beklenen ortalama sağkalım süresi 15 olarak belirtilmektedir (Rajkumar ve Greipp 1999).

ISS evreleme sistemi, dünyada 17 merkezde hiç tedavi almamış 10750 miyelom hastası araştırılarak oluşturulmuştur. Bu evreleme sistemi ise hastalığı; Beta-2 mikroglobulin, serum albümin, trombosit miktarı, serum kreatinin, LDH miktarı analizleriyle üç evrede evreler (Child ve diğ. 1983). MM'nin Uluslararası Evrelendirme Sistemine göre evrelendirilmesi Çizelge 2.2.de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Multipl Myelom'un Uluslararası Evrelendirme Sistemine (ISS) göre evrelendirilmesi

Evre-I	Evre-II	Evre-III
<ul style="list-style-type: none">• beta-2 mikroglobulin < 3.5• albumin <3.5	<ul style="list-style-type: none">• beta-2 mikroglobulin 3.5 - 5.5 arasında• herhangi bir albumin değeri veya• albumin <3.5• beta-2 mikroglobulin < 3.5	<ul style="list-style-type: none">• beta-2 mikroglobulin > 5.5.

Güncellenmiş ISS'ye yapılan sitogenetik analizler de eklemiştir.

ISS'ye göre beklenen ortalama sağkalım süreleri Evre I'de 62 ay, Evre II'de 44 ay ve Evre III'de 29 ay olarak belirtilmiştir (Greipp ve diğ. 2005).

2.15. Prognostik Faktörler

Beta-2 mikroglobulin C-reaktif protein (CRP), Plazma Hücreleri İşaretlenme İndeksi (PCLI), Laktat dehidrogenaz (LDH) ve kromozomal değişimler multipl miyelom için belirtilmiş önemli prognostik faktörlerdir.

Multipl miyelomda sayısal ve/veya yapısal kromozomal anomalilerin varlığı önemli prognostik faktörlerdendir. Bu hastalarda bazı; delesyon, translokasyon ve/veya anöploid gibi kromozomal anomalilerin varlığı immonofenotip ve prognoz gibi klinik parametrelerle

yakından ilişkilidir. Örneğin; 13q ve P53 delesyonları, 1q duplikasyonu, hipodiploidi, t(4;14) gibi anomaliler kötü prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Avet Loiseau 2007).

Multipl miyelomda belirtilen kromozomal anomaliler; yüksek ve standart risk olmak üzere iki grupta değerlendirilmektedir (Fonseca ve San Miguel 2007). MM'de belirtilen kromozomal anomalilerin yer aldığı risk grupları Çizelge 2.3.te verilmiştir.

Çizelge 2.3. Multipl Myelom'da belirtilen kromozomal anomalilerin yer aldığı risk grupları

Yüksek risk	Standart risk
Del 17p-	t(6;14)
Del 13q-	t(11;14)
t(4;14)	Hiperdiploidi
t(14;16)	
t(14;20)	
Hipodiploidi	

Tüm bu prognostik faktörlerin belirlenmesine rağmen hastaya uygulanacak olan tedavinin hangisinin hastaya uygun olacağını net şekilde belirten bir yaklaşım hala yoktur. Fakat belirlenen bu prognostik faktörler hastaya uygulanacak tedavinin belirlenmesi aşamasında önemli yer tutmaktadır.

2.16. Tedavi

Multipl miyelom halen kür elde edilebilmiş bir hastalık değildir. Ancak uygun tedavi ile hastaların yaşam süresi ve kalitesi artmaktadır.

Sessiz miyelom hastalığı yıllar içerisinde yavaş progresyon göstermekte olup bu hastalık semptomsuzdur. Bu hastalarda erken tedavinin hastalık üzerinde bir etkisi olmayıp tedaviye ihtiyaç duyulmamaktadır. Sessiz miyelom hastaları üç ayda bir klinik ve biyokimya sonuçları yönünden izlem yeterlidir. Kemoterapi tedavisine ihtiyaç duyulmaz. Ancak semptomatik ve progresyon gösteren hastalar mutlak olarak tedavi edilmelidir. Bu tedaviler genel olarak miyelomun progresyonunu ve diğer komplikasyonları önlemek amacıyla yapılan sistematik ve destekleyici tedavilerdir. (Kyle ve diğ. 2010)

Tedaviye başlangıçta yapılacak değerlendirmeler kemoterapiye verilecek cevabın ve sonuçların değerlendirilmesine yardımcı olur. Plazma hücre artışı, β 2 mikroglobulin, LDH-CRP serum düzeylerinin artışı, düşük serum albümin, 13q ile P53 delesyonu, hipodiploidi ve t(4;14), t(14;16) gibi genetik anomaliler tedavi öncesinde mutlaka tetkik edilmelidir (Avet Loiseau ve diğ. 2007).

2.17. Endikasyonlar

Hastaların çoğu semptomatik olduğu için kemoterapi gerekmektedir. Smoldering multipl miyelom ve asemptomatik stage I miyelom hastalarında tedavi endikasyonu bulunmamaktadır (Kyle ve Rajkumar 2004).

Açıklanamayan anemi, hiperkalsemi, böbrek yetmezliği, kemik lezyonları veya ekstremiteler plazmasitomda tedavi kesinlikle yapılmalıdır. Progresif hastalık kanıt oluşana kadar hasta iki-üç ay içerisinde tekrar değerlendirilmeli ve kanıt olduğu takdirde kemoterapiye başlanmalıdır.

Destek Tedavisi

Kanser tedavilerinde hastalığın ortadan kaldırılması amacıyla uygulanan önemli bir tedavi yöntemi olan kemoterapi tedavisi multipl miyelom hastalığının tedavisinde de uygulanmaktadır. Ancak kemoterapi tedavisi boyunca hastalar, yaşam kalitesini kötü etkileyecek bazı yan etkilere maruz kalmaktadırlar. Hastalığın getirdiği belirtilerle birlikte kemoterapi tedavisi boyunca bulantı, kusma ve enfeksiyonlara eğilim gibi komplikasyonların iyileştirilmesi için hastalara destek tedavisi uygulanmaktadır. Destek tedavisindeki amaç hastalığın komplikasyonlarına bağlı morbiditeyi önlemektir.

Kemoterapi

Kanser tedavilerinde en etkili tedavi yöntemi ilaçlar kullanılarak yapılan kemoterapi tedavisidir. Bu tedavide ilaçlar ağız veya kan yoluyla vücuda dağılır ve tümörlü hücrelerin hücre döngüsüne etki ederek bölünüp çoğalmalarını engeller. Ancak bu aşamada sağlıklı hücreler de bu durumdan etkilenmektedir. Multipl miyelom hastalığının tedavisinde; Melfalan-Prednizolon (MP), Melfalan-Prednizolon-Talidomid (MPT), Vinkristin-Adriamisin-Deksametazon (VAD) ve Oral İdarubisin ve Deksametazon (Z-DEX) kombinasyonları en sık kullanılan kombinasyonlardır (Wieser ve diğ. 2003).

Otolog Hematopoetik Kök Hücre Nakli

Kanser hastalığının tedavisi boyunca alınan ilaçlar ve radyasyon hastalarda kök hücre hasarına yol açmaktadırlar. Böylece hastalarda hematopoez durmakta ve komplikasyonlar gelişmektedir. Tümörlü hücreleri ortadan kaldıracak tedaviler uygulandıktan sonra hematopoezin tekrar başlaması için hastaya hematopoez yapma yeteneğine sahip kök hücreler verilmelidir. Bu işlem tedavi öncesinde hastanın kendisinden alınmış sağlam hücrelerden yapılabilmektedir.

Otolog hematopoetik kök hücre nakli için kullanılacak kan hücreleri sonrasında nakil için kullanılmak üzere toplanıp dondurulur. Toplama işlemi için kandaki lökosit miktarının en az $1,0 \times 10^9/L$ olmasını gerekmektedir. Toplanan hücreler nakil yapılabilmesi için uygun şartlarda saklanmalıdır (Çağırın 2005).

Radyoterapi

Bu tedavi ile kanserli hücreler X ışınlarıyla yok edilmeye çalışılmaktadır. Soliter kemik plazmasitomalarında ve ekstremitelerde plazmasitomalarda 20-40 Gy dozunda radyoterapi önerilmektedir. Tedavi uygulanacak bölge doğru belirlenmeli ve lokal olarak uygulanmalıdır. Uygulanacak bölgenin doğru belirlenmesi, kemik iliği rezervini azaltabileceğinden ve olası otolog kök hücre prosedürünü engellememesi açısından önemlidir. Bu hastalarda uzun bir yaşam süresi beklenir.

2.18. Multipl Myelom'da Gözlenen Sitogenetik Değişiklikler

Kanser, hücrenin normal davranışlarını düzenleyen genetik mekanizmanın bozulması sonucu oluşan genetik bir hastalıktır. Yapılan araştırmalar kansere neden olan bu genetik değişimin özellikle oluşan kromozom anomalileri sayesinde oluştuğunu göstermektedir (Sandberg 1994). Genetik anomaliler diğer hematolojik malignansilerde olduğu gibi multipl myelomda da prognozu göstermesi açısından oldukça önemlidir. Bu nedenle yeni tanı multipl myelom vakalarında sitogenetik değerlendirme mutlaka yapılmalıdır (Turgut 2009).

Kromozom anomalileri genel olarak sayısal ve yapısal olarak iki şekilde gözlenmektedir.

2.18.1. Yapı Anomalileri

Translokasyon, delesyon, inversiyon, insersiyon, duplikasyon, izokromozom, marker/halka kromozom ve genlerdeki yeniden düzenlenmelerin tümü kromozomlarda meydana gelen yapısal anomalilerdir.

Translokasyon: Bir kromozomun kaybolan veya kopan bir parçasının başka bir kromozoma aktarılması durumudur.

Delesyon: Bir kromozomun kırılma sonucu herhangi bir parçasının kaybolması durumudur.

İnversiyon: Bir kromozomun iki kırık noktasının 180° ters dönerek tekrar aynı kromozoma bağlanması sonucu oluşur. Oluşan kırık sentromeri içeriyorsa perisentrik inversiyon, içermiyorsa parasentrik inversiyon adını alır.

İnsersiyon: Bir kromozoma herhangi bir kromozomal parçanın eklenmesi durumudur.

Duplikasyon: Bir kromozom bölgesinin kendini eşleyerek o kromozom üzerinde iki veya daha fazla sayıda tekrar etmesi anlamına gelmektedir.

İzokromozom: Mayoz bölünme sırasında sentromerin boyuna bölünmesi gerekirken enine bölünmesi sonucu oluşan yapısal bir bozukluktur. Metasentrik ve submetasentrik kromozomlar sentromerlerinden ayıran p ve q kollarına sahiptirler. Böyle kromozomlarda herhangi bir kolun kaybolması, diğerinin ise duplikasyona uğraması durumu izokromozom olarak adlandırılır.

Halka kromozom: Bir kromozomun her iki kolunda oluşan kırıkların uçlarından birbirleriyle kaynaşması sonucu oluşur. Böyle kromozomlarda terminal uçlar kaybolur.

Marker kromozom: Konvansiyonel sitogenetik yöntemlerle karakterize edilemeyen kromozomlara denir.

2.18.2. Sayı Anomalileri

Öploid: hücrelerin bölünme evresinde hataları bölünmeleri nedeniyle ortaya çıkar. Buradaki temel hata; hücrede çekirdek bölünmesi olduğu halde sitoplazma bölünmesini olmamasıdır. Bu hata sebebiyle hücrede kromozom sayısı normal olan haploid sayının tam katları kadar artar.

$n=23$ üreme hücrelerinde bulunan kromozomların toplam sayısıdır. Haploidi olarak isimlendirilir.

$2n=46$ fertilizasyon sonucunda somatik hücrelerde bulunan kromozomların toplam sayısıdır. Diploidi olarak isimlendirilir.

$3n=69$ haploid kromozom sayısının üç kat artması durumudur. Bu durum triploidi olarak isimlendirilir.

$4n=92$ ise haploid kromozom sayısının dört kat artması durumudur. Bu da tetraploidi olarak isimlendirilir.

Anöploidi: Hücre bölünmesi sırasındaki kusurlar nedeniyle ortaya çıkan bir durumdur. Buradaki kusurlar; bölünme evresinde hücrelerin anafazda geri kalması veya kromozomların doğru ayrılamamasıdır. Bu hatalar sonucunda kromozom sayısında, temel kromozom sayısının tam katları olmayan artma veya eksilme gibi değişiklikler olur. Buna anöploidi denir.

Kromozom sayısındaki artma yönündeki değişimler hiperploidi, azalma yönündeki değişimler ise hipoploidi olarak nitelendirilir.

Hiperploidi: Bir kromozom çiftine ek bir veya daha fazla kromozomun bulunma durumudur. Kromozom çiftine bir kromozomun eklenmesi trizomi, iki kromozom eklenmesine ise tetrazomi denir.

Hipoploidi: Diploid bir hücrede bir tek kromozomun veya bir kromozom çiftinin olmaması halidir. Bir kromozomun eksik olması monozomi olarak adlandırılırken, bir kromozom çiftinin olmaması durumu nullizomi olarak adlandırılır.

2.19. Multipl Myelom'da Sık Gözlenen Kromozomal Anomaliler

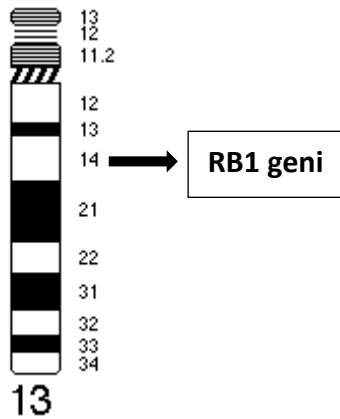
Son yıllarda multipl myelom'da yapılan konvensiyonel sitogenetik ve moleküler sitogenetik çalışmalarda pek çok tekrarlayan genetik anomali bildirilmiştir(21). Multipl myelomda sıklıkla, 13q14 delesyonu ve monozomi 13 gibi 13. kromozom anomalileri, 17. kromozomda yer alan p53 geninin delesyonu ve 14. kromozomda yer alan IgH geninin farklı partner genlerle yeniden düzenlenmeleri gözlenmektedir (Chang ve diğ. 2004).

Delesyon 13q

Kromozom 13'teki anomaliler, multipl myelom hastalarında sık görülen bir kromozomal anomali olup FISH yöntemi ve konvansiyonel sitogenetik yöntemlerle incelendiğinde olgularının yaklaşık %40-50'sinde gözleendiği ve tüm kromozom kayıplarının yaklaşık %10-12'sini oluşturduğu bildirilmiştir (Fonseca ve diğ. 2009). Gözlenen bu sitogenetik anomaliler; 13. Kromozomun; monozomisi, uzun kolunun q14 veya q34 bölgelesinin delesyonu şeklinde olabilir (Higgins ve Fonseca 2005).

Kromozom 13 ün 13q14 bölgesinde RB (Tümör supresör geni) geni, 13q34 bölgesinde ise LAMP1 (Lizozomal membran protein), CUL4A(Regülatör ve tümör supresör geni) ve PROZ (K vitaminine bağımlı kinaz proteini) bulunmaktadır.

RB1 geni; 180 kb'lik alan kaplamakta ve 27 ekzondan oluşmaktadır (Lohmann 1999). RB1 geni üç farklı domaine sahiptir. Bunlar; N terminal bölgesinde santral A ve B domainleri ve C terminal domainidir. Bu domainlerin ana fonksiyonları; büyümenin düzenlenmesi, hücre farklılaşması, viral ve sellüler proteinlerin etkileşimi ve transkripsiyonel regülasyondur (Lee ve Cho 2002). Kromozom 13'ün idiogramı Çizim 2.8.de gösterilmiştir.



Çizim 2.8. Kromozom 13'ün idiogramı

Yapılan çalışmalarda 13q delesyonlarının izole durumlarda dahi tek başına negatif prognostik değere sahip olduğu ve kısa yaşam süresiyle bağdaştığı bildirilmiştir (Durak ve Gülbaş 2008). Üstelik bu anomaliler karyotipleme ile belirlendiğinde prognoz daha da kötüdür (Drach ve diğ. 2006). 13q delesyonuna non-hiperplloid karyotip veya bir translokasyon eşlik ediyorsa hastalığın prognozu yine kötü olarak bildirilmektedir (Stewart

ve diğ. 2005). 13q delesyonu saptanan multipl miyelom olgularının yaklaşık %85-90'ında t(4;14)(p16.3;q32) ya da t(14;16)(q32;q23) gözlenmektedir (Köngsberg ve diğ. 2000).

P53 Delesyonu

İlk kez 1979 yılında tanımlanan TP53 geni, 17p13.1 lokusunda bulunan tümör süpresör bir gendir (Freed Pastor ve Prives 2012). Genin ürünü olan p53 proteini bir transkripsiyon faktörü olup hücre döngüsü duraksaması, yaşlanma, apoptoz ve DNA tamiri gibi hücre içi önemli yollarda rol alır. Bu gendeki mutasyonlar multipl myelomda ve genel olarak diğer kanser türlerinde de rapor edilmiş olup görülen en yaygın sitogenetik değişikliktir. Kromozom 17'nin idiogramı Çizim 2.9.da gösterilmiştir.



Çizim 2.9. Kromozom 17'nin idiogramı

P53 proteini normal şartlarda sürekli sentezlenen ve hızla parçalanan bir protein olduğu için hücrelerde çok az miktarda bulunur. P53; sağlıklı bir hücre döngüsünü bozacak, genomda mutasyona neden olabilecek herhangi bir hücre stres durumunda aktive olarak hücre döngüsünü durdurur (Bourdon 2007). Birçok olay çekirdek içerisindeki aktif p53 proteinini hızlı bir şekilde artışına sebep olmaktadır. Onkogenler, UV ışınları ve iyonize radyasyon, hipoksi, sitokininler ve büyüme faktörleri gibi uyaranlar sonucu TP53 geni aktif olmakta ve p53 proteininin artışına sebep olmaktadır (Nylander ve diğ. 2000). Bu hasarlara p53 iki farklı cevap verebilmektedir. Bunlar; DNA onarımı için hücre döngüsünü durdurmak ya da onarılamaz DNA hasarlarında hücreyi apoptosize götürmektir.

Aktif p53 proteini aynı zamanda DNA replikasyon sürecini geciktiren genlerin ifadesini düzenlemekten sorumlu bir gen olduğundan, S evresinde DNA hasar onarımı için zaman

kazanılmış olur. Eğer hasar S aşamasında olursa da, aktif p53 proteini diğer genlerin ifadesini düzenleyerek G2/M kontrol noktasında kalmasını sağlar.

Aktif p53 proteini, hasarlı bir hücreye apoptozis yoluyla intihar edebilmesi için yol gösterebilir. Bunu öncelikle Bcl-2 gen ailesinin ürünlerini regüle etmekle sağlar. Bcl-2; mitokondri dış membranda bulunup, iyon geçişinden sorumlu bir moleküldür. Bcl-2 mitokondriyle ilişkili olduğundan antioksidan bir etki göstererek apoptozisi önleyebilir (Tsujimoto 1998). Bu yüzden apoptozise giden yolda öncelikle Bcl-2 gen ailesinin transkripsiyonlarının baskılanması gerekmektedir. Bcl-2'nin ilişkide olduğu Bax, Bad, Bid ve Bcl-Xs genlerinin transkripsiyonu aktif edilir ve hücre kendini apoptozise götürür(Lowe ve Lin 2000).

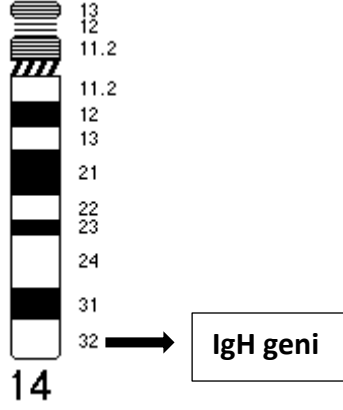
Diğer kanser türleri ve multipl miyelomda da rapor edilen p53 gen kaybı; ileri hastalık evresi, kısa sağkalım süresi ve kötü prognozla ilişkilendirilmektedir (Fonseca ve diğ. 2002).

Igh Geni Yeniden Düzenlenmeleri

İmmunoglobulin ağır zincir (IgH) bölgesini ilgilendiren translokasyonlar vakaların %40- 60'nda gözlenmektedir.

IgH geni, 14. Kromozomun q32 bölgesinde yerleşmiş olup, insan antikorlarının ağır zincirlerini kodlamaktadır. IgH geninin katıldığı yeniden düzenlenmeler, birçok hematolojik malignanside bildirilmiş olup prognostik belirteç olarak kullanılmaktadır. Kromozom 14'ün idiogramı Çizim 2.10.da gösterilmiştir.

IgH geninin katıldığı translokasyonlarda gözlenen partner gen sayısı 30'u aşmakla birlikte bu sayının her geçen yıl arttığı gözlenmektedir. IgH geni, translokasyon sonucunda yerleştiği bölgedeki partner genin ekspresyonunda artışa neden olmaktadır. Partner genlerin tespiti hastalığın diagnostik, prognostik özelliklerinin aydınlatılmasına yardımcı olup tedavi protokolünün belirlenmesine katkı sağlamaktadır.



Çizim 2.10. Kromozom 14'ün idiogramı

Multipl myelom'da IgH geninin katıldığı translokasyonlarda özellikle beş ayrı partner gen bildirilmiştir. Bu translokasyonlar; $t(4;14)(4p16,FGFR3/MMSET)$, $t(6;14)(6p21,CCND3)$, $t(11;14)(11q13,CCND1)$, $t(14;16)(16q23,c-maf)$ ve $t(14;20)(20q11,mafB)$ dir (Attal ve diğ. 2007). Bu translokasyonları taşıyan olgular ayrı prognostik özellikleri göstermektedir. Örneğin bunlardan; $t(4;14)(p16;q32)$ ve $t(14;16)(q32;q23)$ kötü prognozu gösterirken, $t(11;14)(q13;q32)$ ise iyi prognoza işaret etmektedir.

$t(11;14)(q13;q32)$

Multipl miyelom olgularında en sık görülen translokasyondur. 11. kromozomun q13 bölgesinde yer alan CCND1 geni ve 14. kromozomun q32 bölgesinde bulunan IgH geninin karşılıklı yer değişimidir. IgH geninin katıldığı diğer translokasyonların tersine konvansiyonel sitogenetikle de kolaylıkla analiz edilebilen bir translokasyondur.

$t(11;14)$ 'ın multipl miyelom hastalarının yaklaşık %15'inde bulunur.

$t(4;14)(p16;q32)$

Multipl myelom olgularında ikinci en sık görülen translokasyondur(37). 4. Kromozomun p16 bölgesinde yer alan FGFR3 ve MMSET genleri ile 14. kromozomun q32 bölgesinde bulunan IgH geninin karşılıklı yer değişimidir. Oluşan bu translokasyon konvansiyonel sitogenetik ile analiz edilmesi güç bir translokasyondur.

$t(4;14)$, multipl myelom hastalarının yaklaşık olarak %15'inde görülmektedir.

4. kromozomun p16 bölgesinde; histon gen ekspresyonundan sorumlu SLBP(Stem-Loop (histon) Binding Protein), transkripsiyonda görevli WHSC1-2(Wolf-Hirschhorn1-2) ve eritroblastların olgunlaşmasında görevli olan MXO4-MAEA(Makrofaj Eritroblast Ataçlayıcı) genleri ve FGFR3 (Fibroblast Growth Factor Reseptor) geni yer almaktadır.

Kondrosit kıkırdak doku oluşumunda ve iskeletin normal gelişiminde rol alan destek doku elemanlarından biridir. FGFR3 geni kondrositlerin çoğalması ve farklılaşmasında görevli gendir. Bu gen, Fibroblast Growth Factor Reseptor 3 adlı protein sentezini kodlar. Bu protein kemiklerin uzamasından sorumlu olan mayör büyüme faktörün etkileştiği bölgedir.

Translokasyon sonucunda IGH-MMSET ve IGH-FGFR3 şeklinde iki füzyon gen oluşur. IGH-FGFR3 translokasyonunda FGFR3 geni over ekspresyona uğrar (Durak ve Gülbaş 2008).

Hastalığın patogeneğinde bu genlerin disregülasyonunun önemli olabileceği düşünülmektedir. t(4;14) kötü prognostik sonuçla ilişkilidir (Liebisch ve Döhner 2006).

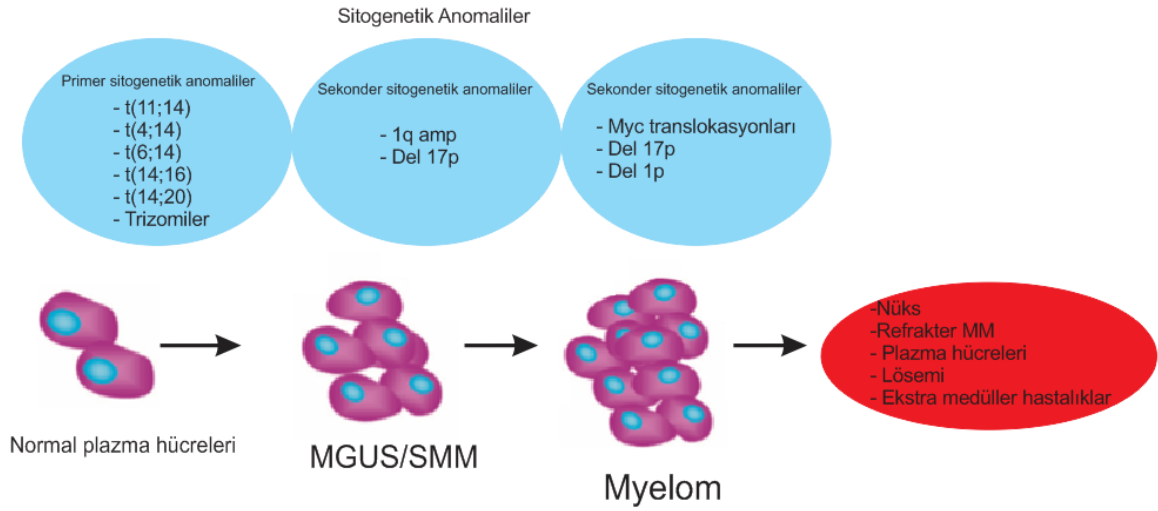
t(14;16)(q32;q23)

Multipl miyelom olgularında diğerlerine nazaran daha düşük oranlarda gözlenen bir translokasyondur. 16. kromozomun q23 bölgesinde yer alan C-MAF geni ve 14. Kromozomun q32 bölgesinde bulunan IgH geninin karşılıklı yer değişimidir. C-MAF, MAF gen ailesine ait bir protoonkogendir.

Oluşan bu translokasyonun konvansiyonel sitogenetik ile analiz edilmesi t(4;14) gibi güçtür.

t(14;16), multipl miyelom hastalarının yaklaşık olarak %5-7'sinde görülmektedir (Kallf ve Spencer 2012).

MM'de sık gözlenen kromozom anomalileri Çizim 2.11.de verilmiştir.



Çizim 2.11. MM’de sık gözlenen kromozom anomalileri (Rajan ve Rajkumar, 2015)

2.20. Multipl Myelom’da Genetik Analiz Yöntemleri

Ökaryot hücrelerde kalıtsal bilgiyi taşıyan DNA molekülü çekirdekte bulunur. Bu DNA molekülü, interfaz evresindeyken histon proteinlerinin sarılmasıyla yoğunlaşarak kromatin yapıyı oluşturur. Kromatin yapı da hücre bölünme aşamasında kısalıp kalınlaşarak kromozomları oluşturur. Sitogenetik bilim dalı, kromozomların yapısını ve fonksiyonlarını inceler. Çok geniş uygulama alanları olan sitogenetik bilim dalı içerisinde karyotipleme ve FISH teknikleri önemli yere sahip yöntemlerdir.

Sitogenetikte; tanı ve takibinde belirleyici kromozomal bozuklukların görüldüğü malign hastalıklar, özellikle hematolojik maligniteler, bilinen kromozom sendromlarının kesin tanısı veya dışlanması, seksüel değişim ve gelişim anomalileri, infertilite, tekrarlayan abortus ya da ölü doğum hikayesi, dismorfik özellikler ile birlikte olan ya da tek başına görülen psikomotor retardasyon ve mental retardasyon ve/veya dismorfik özellikler ile birlikte görülen monogenik hastalıklar başlıca endikasyonlardandır.

Karyotip analizi, bir hücredeki kromozomların çiftler halinde eşlenerek, sayısal ve yapısal olarak incelenerek belirli bir düzene göre sıralama işlemidir. Çekirdeğe sahip ve bölünebilen tüm hücre ve dokulardan kromozom elde edilebilir ancak kromozom analizinde en çok kullanılan dokular; kemik iliği, perifer kanı, amniyon sıvısı, kordon kanı, koryon villus ve deri dokulardır.

Kromozomlar hücre bölünme safhaları içerisinde metafaz evresi sırasında analiz edilmeye uygun hale gelirler. Metafaz kromozomlarının elde etmek için genel olarak iki yöntem kullanılır. Bunlar; direkt ve kültür yöntemleridir.

Direkt yöntem; spontan bir şekilde bölünen hücrelere uygulanan yöntemdir. Bu hücrelere; kemik iliği, lenf nodülleri, solid tümörler örnektir. Kültür yöntemi ise; spontan bir şekilde bölünme yetisine sahip olmayan hücrelere uygulanan yöntemdir. Seçilecek olan hücre türüne göre de kültür besiyeri ve süresi değişiklik göstermektedir. Spontan bölünemeyen hücrelerin bölünebilmeleri için; protein, mineral, hormon ve vitaminlerle zenginleştirilmiş ve hücrelerin bölünmelerini teşvik etmek amaçlı fitohemaglutinin (PHA) gibi mitotik ajan içeren besiyerleri gibi uygun bir ortama ihtiyaç vardır. Bu hücrelere de; perifer kanı lenfositleri, koryonik villuslar ve amniyon sıvısındaki bebeğe ait dökülen hücreler örnek verilebilir. Perifer kanı lökositleri gibi kısa sürede bölünebilecek hücreler için kültür süresi 72 saat iken, amniyon sıvısındaki hücreler için kültür süresi birkaç hafta olabilmektedir.

Ancak kendiliğinden bölünme yetisine sahip hücreler için kullanılan besiyerleri mitotik ajan içermemektedir. Bu hücrelere örnek olan kemik iliği lenfositleri için ise kültür süresi 24 saattir.

Perifer kanından yapılacak kromozom analizi için örneğin steril, heparinli enjektör veya vakumlu laboratuvar tüplerine alınması gerekmektedir. Örnek bekleme süresi boyunca kesinlikle dondurulmamalı, oda ısısında veya +4 °C'lik dolaplarda saklanmalıdır. Kültür ortamında mutlaka, herhangi bir kontaminasyon sonucu mikroorganizmaların ürememesi için Penisilin/Streptomisin gibi antibiyotikler bulunmalıdır. Her iki kültür yöntemi için de; hücreler 37 °C'lik etüvlerde çoğalmaya bırakılır. Çoğalan hücrelerden kromozom elde etmek için ilk aşamada hücrelerin kültür sırasında metafaz evresinde durdurulması gerekmektedir. Bu işlem kardeş kromatidlerin iğ iplikçiklerinden zıt kutuplara çekilmesini önleyen mitoz durdurucu kolsemidler kullanılarak yapılır. Böylece kardeş kromatidler ayrılamazlar ve kromozom yapısını muhafaza etmiş olur. Buradan sonraki ikinci aşamada kromozomların hücre içinde kolayca yayılabilmeleri için hücrelerin hacmini arttırmaktır. Bunun için de 0,075 M KCl hipotonik solüsyonu kullanılır. Hipotonik solüsyon hücre membranına karşı konsatrasyon gradiyenti oluşturur ve suyun hücre içine girmesini, şişmesini sağlar. Üçüncü aşama ise fiksasyondur. Fiksasyon işlemi hücrelerdeki hipotonik etkiyi durdurarak hücreleri sabitlemeye ve eritrositleri parçalamaya yardımcı olur. Bu

işlem için ise 1:3 oranındaki Asetik Asit-Metanol solüsyonu kullanılır. Daha sonra da boyama ve bantlama işlemleri yapılarak elde edilen kromozomlar uygun mikroskoplarla incelenir (Moorhead ve diğ. 1960).

Kromozomları incelemek için başlıca iki yöntem bulunmaktadır. Bunlar; sitogenetik ve moleküler sitogenetik yöntemlerdir.

2.20.1. Sitogenetik Yöntemler

Kromozom bantlama yöntemleri kromozomlardaki yapısal ve sayısal anomalileri tespit etmek ve kromozomları tanımlamak için yapılan önemli sitogenetik yöntemlerdir. Klasik bantlama yöntemlerinde genellikle 450-550 bant seviyesindeki metafazla kullanılmaktadır. Fakat bu bant düzeyleri küçük kromozom parçalarının kayıplarında veya artışlarında analiz için yeterli olmayabilir. Bu nedenle daha yüksek bant seviyelerinde (Örneğin; 550-850) inceleme yapmak gerekmektedir. Band seviyesi, X kromozomunu içeren bir haploid sette görülen açık ve koyu renklerle gözüken ökromatin ve heterokromatin bölgelerin toplam sayısını belirtmektedir.

Bugün klasik sitogenetikte en sık kullanılan bantlama tekniği G-Bantlamadır. Ancak amaca yönelik olarak değişebilen başka bantlama teknikleri de vardır. Bunlar; R, Q, C ve HRB yöntemleridir (Başaran 1999).

2.20.2. Moleküler Sitogenetik Yöntemler

Kanser olgularında sitogenetik analiz yapılabilmesi için tümörlü dokuya ihtiyaç vardır. Multipl Miyelom öntanı/ tanı olgulara kromozom analizi; perifer kanından ya da kemik iliğinden elde edilen lenfositlerden yapılabilmektedir. Klasik bantlama yöntemlerinde analiz mutlaka metafaz kromozomlarından yapılmaktadır. Ancak burada her zaman yeterli ve kaliteli metafaz elde edilememesi durumu olabilmektedir. Bu sebeple klasik sitogenetik yöntemlerle belirlenemeyen, çözümlenemeyen kompleks, submikroskopik düzenlemelerin analizleri için moleküler sitogenetik yöntemler geliştirilmiştir (Teixeira 2002).

Başlıca bilinen moleküler sitogenetik yöntemler; Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH), Metafaz FISH, Interfaz FISH, Reverse FISH, Multi Color FISH, PRINS, Fiber FISH, Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (CGH) ve DNA Arraydir.

Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH)

Kanser genetiğinde en çok kullanılan moleküler sitogenetik yöntemdir.

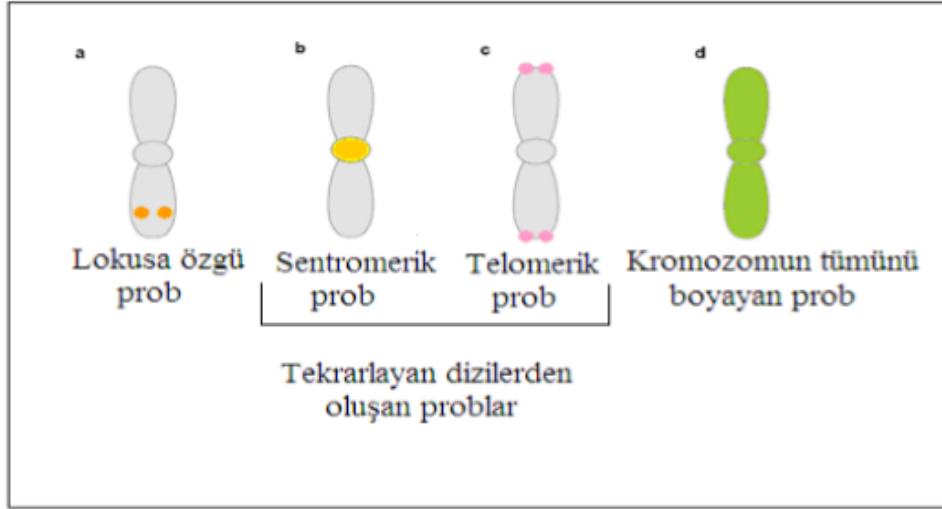
In situ hibridizasyon (ISH), hücresel incelemelerde tanı ve araştırma amaçlı, işlevsel protein kodlayan DNA dizilerinin morfolojik olarak korunmuş; hücreler, kromozomlar veya doku kesitlerinde yerinin belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir (Jain 2004). Bu yöntemin Southern ve Northern Blot gibi diğer melezleme yöntemlerden farkı nükleik asitlerin kendi buldukları hücresel ortamlarında gösterilmesidir (Pala 2005).

Klasik sitogenetik çalışmalarında yapılan kromozom analizi genellikle 400-550 bant seviyesinde yapılmaktadır. Bu analizlerde gözle görülemeyen, 5 megabayttan (Mb) küçük anomaliler veya 3 Mb'dan büyük fakat yeterince belirli olmayan bölgeler tespit edilememektedir. FISH yöntemiyle, klasik bantlama teknikleriyle görülemeyen anomalileri DNA probları kullanılarak tespit etmek mümkündür (Sreekantaiah 2007). FISH yönteminin çözünürlüğü ve hassasiyeti konvansiyonel sitogenetiğe göre daha yüksektir. Kültür her zaman gerekli değildir ve bölünen ya da bölünemeyen hücre tiplerine kolayca uygulanabilir. Ayrıca kromozom analizi için mutlak metafaz eldesi gerekmektedirken FISH yöntemi hem metafaz hem de interfaz hücrelerine uygulanabilirliği açısından çok tercih edilen bir yöntemdir. Bu yönlerine ilave olarak hızlı sonuç verilebilmesiyle de FISH yöntemi kanser sitogenetiğinde sıkça kullanılan bir yöntemdir.

Herhangi bir kromozomal bölgenin veya DNA parçasının FISH yöntemiyle tespit edilebilir hale gelmesi için analiz edilecek bölgelere özgü bir probun kullanılması gerekir. Prob, FISH yönteminde hedef nükleik asit dizilerine komplementer işaretli nükleik asit dizileridir. Bugün kullanılan proplar florokromlarla işaretlidirler (Bayani ve Squire 2004).

Analiz edilecek anomalinin doğru bir şekilde tespit edilebilmesi için uygun probun seçimi gerekmektedir. Proplar hedeflerine ve sinyal paternlerine göre sınıflandırılmışlardır.

Hedef bölgelerine göre proplar; lokusa özgü proplar, telomerik proplar, kromozomun tümünün veya belirli bir kısmını boyayan proplar ve tekrarlayan dizilerden oluşan proplar olmak üzere dört gruba ayrılmaktadırlar. Hedef bölgelerine göre proplar Çizim 2.12.de gösterilmiştir.



Çizim 2.12. FISH yönteminde kullanılan prob çeşitleri

Lokusa Özgü Problar

Analiz edilecek genin bulunduğu lokusa ait DNA dizilerini içeren 15-500 kilobayt (Kb) uzunluğundaki problardır. Mikrodelyasyon-duplikasyon sendromlarının tanısında ve translokasyon-inversiyon gibi kromozom anomalilerinde bulunan kırık noktaların tespitinde kullanılabilir.

Telomerik Problar

5'-TTAGGG-3' tekrarlarından oluşan, yaklaşık 2-15 Kb uzunluğunda telomer dizilerine özgü problardır.

Kromozomun Tümünün veya Belirli Bir Bölgesini Boyayan Problar

Herhangi bir kromozomda bulunan DNA dizilerine homolog olan problemlerin karışımından oluşturulan problardır. Kromozomların p ve q kollarını ayrı renklerde boyanmasını sağlayan prob çeşitleri de vardır (McNeil ve Ried 2000).

Tekrarlayan Dizilerden Oluşan Problar

Klasik satellit problemler, alfa satellit problemler ve beta satellit problemler olmak üzere üç gruba ayrılırlar.

Klasik satellit proplar; AATGG tekrarlayan dizilerine sahip, 1, 9, 15, 16. Kromozomların perisentrik heterokromatin bölgelerine ve Y kromozomunun uzun koluna özgü proplardır.

Alfa satellitler; kromozomun sentromerine spesifik tekrarlayan dizilerine sahip proplardır. Böylece bu proplar yardımıyla kromozomların sentromerinin tespitinde kullanılabilir.

Beta satellit proplar; akrosentrik kromozomlara, 9. kromozoma ve perisentrik heterokromatin bölgelere özgüdür.

Bu proplara ilave olarak sinyal paternlerine göre tasarlanmış proplar da mevcuttur. Bu proplar lokusa özgü, translokasyon ve kırık noktalarındaki yeniden düzenlenmelere özgü proplar örnek verilebilir. Özelliklerine göre bu proplar tek ve/veya çift renkli, prob setlerinde ise üç ve/veya beş renkle işaretlenmiş olabilirler (McNeil ve Ried 2000).

Çalışmalarımızda MM olgularında gözlenen kromozom anomalileri için üç farklı prob kullanılmıştır. 13q delesyonunu saptamak için RB1/13q12 çift renkli FISH probu kullanılmıştır. Bu prob; RB1 genini temsil eden kırmızı ve 13q12 bölgesini temsil yeşil renk işaretli iki probun karışımıyla oluşturulmuştur. Bu probun uygulandığı normal hücrelerdeki kromozomlarda iki kırmızı iki yeşil sinyal görülürken, anormal hücrelerdeki kromozomlarda bir kırmızı iki yeşil ya da sadece iki yeşil sinyal görülmektedir.

P53 delesyonunu incelemek için TP53/CEN 17 çift renkli FISH probu kullanılmıştır. Bu prob; TP53 genini temsil eden kırmızı ve CEN17 bölgesini temsil eden yeşil renk işaretli iki probun karışımıyla oluşturulmuştur. Bu probun uygulandığı normalde hücrelerdeki kromozomlarda iki kırmızı iki yeşil sinyalin görülmesi gerekmektedir. Ancak anormal hücrelerdeki kromozomlarda bu sinyal paternleri bir kırmızı iki yeşil ya da sadece iki yeşil şeklindedir.

IgH genindeki yeniden düzenlenmeleri saptamak için ise; IgH çift renkli yeniden düzenlenme FISH probu kullanılmıştır. Bu prop da kırmızı ve yeşil işaretli iki probun karışımıyla hazırlanmış bir probdur. IgH probu uygulanan normal bir hücrede 14. kromozomda kırmızı ve yeşil sinyal bir arada görülürken, anormal bir hücredeki 14. kromozomda bu sinyaller ayrı gözükmektedir.

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

Bu yüksek lisans tezi çalışmasında Temmuz 2011- Şubat 2017 tarihleri aralığında, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Anabilim Dalı'ndan yönlendirilen Multipl Miyelom tanılı olguların klinik ve laboratuvar sonuçları retrospektif olarak incelenmiştir. Hastalığın tanısında önemli hematolojik parametreler hastaların var olan dosyalarından elde edilip retrospektif olarak değerlendirilmiştir.

Hastaların takibinde Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Anabilim Dalı'ndan istenen tüm konvansiyonel sitogenetik ve FISH testleri Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Sitogenetik Laboratuvarında yapılmıştır.

Olguların kromozomlarını incelemek için G-Bantlama, IgH (14q32) gen bölgesindeki yeniden düzenlenmeleri, p53 (17p13.1) ve 13q (13q14) delesyonlarını gözlemlemek amacıyla Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) yöntemi uygulanmıştır.

Çalışmada kemik iliği aspirasyon materyaline 24 saatlik kemik iliği kültür yöntemi uygulanmıştır. Kromozom analizi için G-Bantlama yöntemi uygulanmıştır, IgH geni (14q32) yeniden düzenlenmeleri tespit etmek için; IgH Dual Color Break Apart Prob, p53 (17p13.1) delesyonunu tespit etmek için; TP53/CEN 17 Dual Color Prob, 13q (13q14) delesyonunun tespiti için ise RB1/13q12 Dual Color Prob kullanılarak Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) tekniği uygulanmıştır.

3.1. Yöntemler

3.1.1. Kemik İliği Aspirasyonu Kültürü

- Hazır besiyeri her bir hasta için 2 santrifüj tüpüne 5'er ml paylaştırıldı. Hazırlanan tüpler 37°C'lik etüvde ısınmaya bırakıldı.
- Her bir tüpe 0,4 ml heparinize kemik iliği ekimi yapıldı. Tüpler 37°C'lik etüve konuldu, hücreler çoğalmaya bırakıldı.
- Ekimden sonraki 22. Saatte iğ ipliklerini bloke edip, hücrelerin metafaz evresinde kalmasını sağlamak için 0,2 ml colsemid ilavesi yapıldı. Tüpler tekrar 37°C'lik etüve konuldu.
- Kolsemid ilavesinden 2 saat sonra yani 24. Saatte tüpler 1500 rpmda 8 dakika santrifüj edildi, hücrelerin dibe çökmesi sağlandı.

- Süpernatant atılarak hücrelerin hipotonik şoka girmesi için 0.75 M KCl çözeltisiyle muamele yapıldı. Tüpler 37°C'de etüvde 1 saat inkübe edildi.
- Hücreler 1 saat sonra tekrar 1500 rpm'da santrifüj edildi ve 1:3 oranında Cornoy fiksatif ile fikse edildi. Fiksatif ile yıkama işlemi parçalanmış hücreleri ve artıkları temizlemek için 4 kez tekrarlandı.

G-Bantlama ve Analiz

- Yayma işlemi 25°C -%55-60 nem oranındaki odada yapıldı. Hazırlanan tüplerin süpernatantı atılıp pelletinden 6-8 damla, 1:3 oranında Cornoy fiksatif damlatılmış slayta damlatıldı. Damlatma işleminden sonra tekrar 1:3 oranındaki Cornoy fiksatif slayta damlatıldı.
- Slaytlar hücre yoğunluğu açısından ışık mikroskopuyla değerlendirildi.
- Slaytlar kuruduktan sonra 60°C'lik etüvde 20 dakika yaşlanmaya bırakıldı.
- Yaşlanan slaytlar sırasıyla; tripsin ve fosfat buffer salin (PBS) solüsyonlarından geçirildi. Slaytlar Leishmann boyasıyla hazırlanan 1:4 oranındaki kullanım solüsyonuyla 1 dakika boyamaya bırakıldı.
- Slaytlardan, her hasta için metafaz kalitesi ve sayısına bağlı olarak 2-20 metafaz analiz edildi.
- Hazırlanan slaytlar ışık mikroskopuyla tarandı. Metafazlar Cytovision Version 7.2 Build 147 sisteminde görüntülendi ve analiz edildi. Analiz edilen metafazlar ISCN 2013'e göre değerlendirildi (Shaffer 2013).

FISH Tekniği ve Analiz

- Hazırlanan tüplerin süpernatantı atılıp pelletinden 6-8 damla slayta damlatıldı.
- Slaytlardaki hücre yoğunluğu ışık mikroskopuyla değerlendirildi.
- Slaytlar kuruduktan sonra sırasıyla; 2xSSC, %70'lik, %85'lik, %100'lük etanol serilerinden 2'şer dakika geçirildi.
- Çalışılacak problemler 10'ar µl olacak şekilde ependorflara bölündü, slaytlar ve problemler 37°C'lik etüvde ısınmaya bırakıldı.
- Karanlık bir odada problemler slaytlarda hücre yoğunluğunun olduğu bölgelere uygulandı ve üzeri lamelle kapatılıp çevresi yapıştırıcı ile yapıştırıldı.

- Slaytlar denatürasyon cihazında 10 dakika denatürasyona bırakıldı. 10 dakika sonunda slaytlar içinde nemli bez olan karanlık bir kutuya alınıp 16-17 saat 37 °C’lik etüvde hibridizasyona bırakıldı.
- Slaytların üzerinden lamel dikkatlice kaldırıldı. Slaytlar su banyosundan, önceden ısı 72 °C’ye ayarlanmış 0,4xSSC solüsyonunda 1 dakika yıkandı.
- Slaytlar 10 µl Tween-20 konulmuş 2xSSC solüsyonunda 30 saniye yıkandı.
- Slaytlar dik olacak şekilde kurumaya bırakıldı.
- Kuruyan slaytlarda prob muamelesi yapılan bölgelere 10µl DAPI Antifade uygulandı ve lamelle kapatıldı.
- Hazırlanan slaytlar ışık almayan bir kutu içinde +4 °C’de buzdolabına kaldırıldı.
- Hazırlanan slaytlar floresan mikroskopuyla tarandı, analiz edildi.
- Slaytlardan, her hasta için 100-200 hücre analiz edildi. Analizde, interfaz ve metafaz evresindeki hücreler sayıldı. Çekirdek sınırları belli olan, sinyalleri güçlü ve net görülen hücreler sayıldı.

3.2. Kullanılan Malzemeler ve Solüsyonlar

Kemik İliği Aspirasyonu Kültüründe Kullanılan Solüsyonlar

- Kültür besiyeri: Kemik iliği karyotip medyum (Biological Industries – Bone Marrow Karyotyping Medium)
- Kolsemid: Kolsemid Solüsyonu (Capricorn Colsemid Solution (10µl/ml))
- Hipotonik solüsyon: 0,75 M KCl çözeltisi
- Carnoy fiksatif:1:3-Asetik asit:Metanol

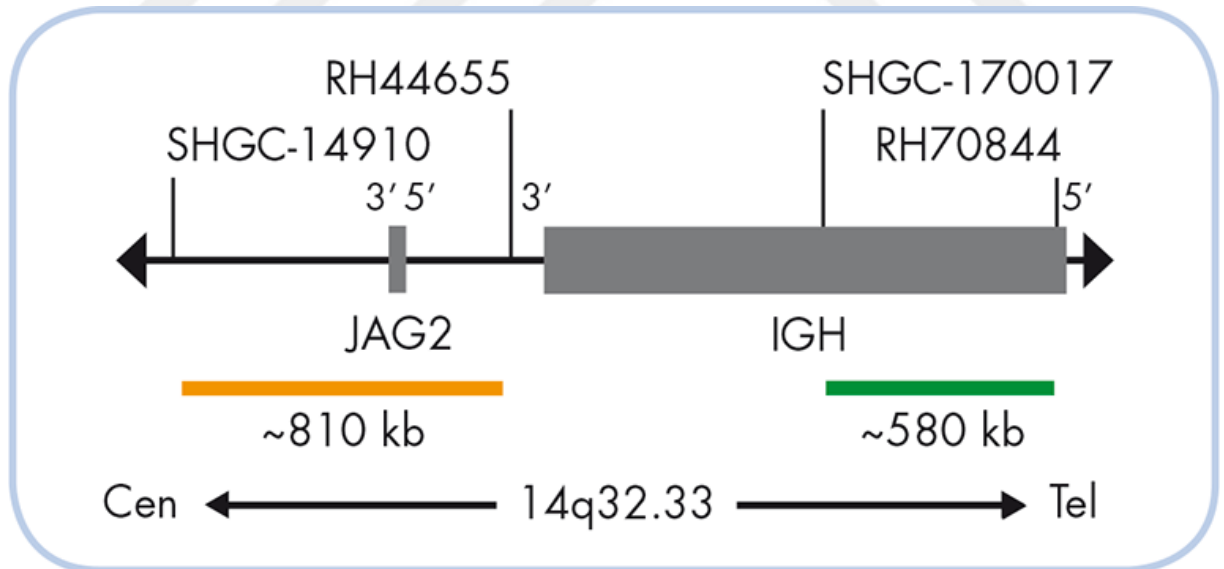
G-Bantlama Yönteminde Kullanılan Solüsyonlar

- PBS Solüsyonu: 4 g NaCl + 0,1 g KCl + 0,57 g Na₂HPO₄ + 0,1 g KH₂PO₄ + 500 ml distile su
- Tripsin: 0,0050 g tripsin + 50 ml PBS Solüsyonu (Multicell, Tripsin Powder)
- Gurr Buffer:1 adet Gurr Buffer tablet + 1000 ml distile su (GIBCO-Buffer Tablet “GURR”)
- Leishmann Boya Stok Solüsyonu (Merck):1:4-Stok Solüsyon:Gurr Buffer

FISH Yönteminde Kullanılan Solüsyonlar

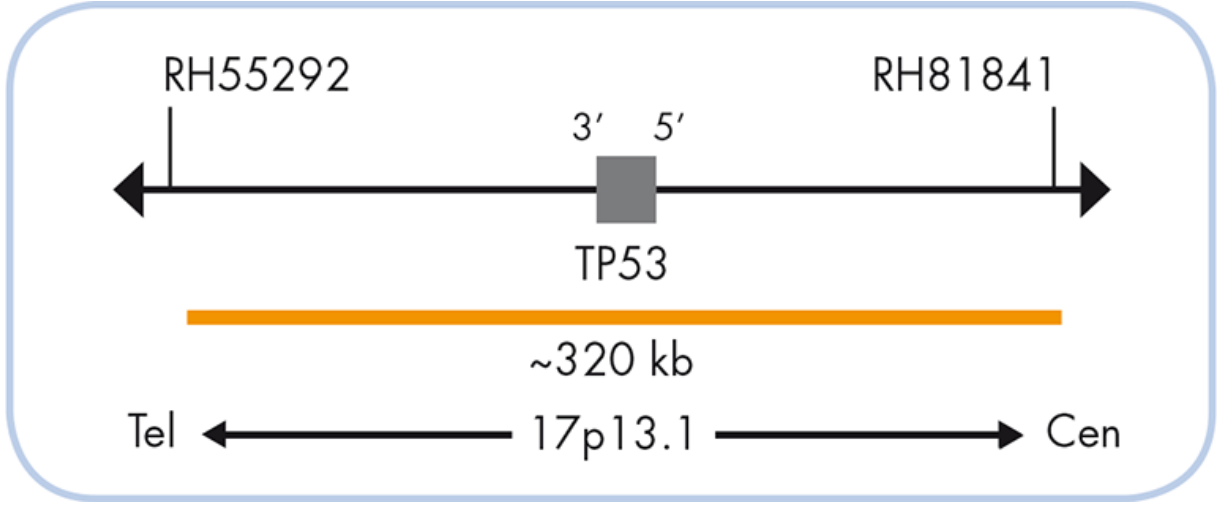
- 20xSSC: 48,5 g NaCl + 22,05 g tri-Sodyum sitrat Dihidrat + 250 ml distile su
- 2xSSC: 50 ml stok 20xSSC + 450 ml distile su
- Etanol Serileri:
 - %70'lik etanol: 700 ml etanol + 300 ml distile su
 - %85'lik etanol: 850 ml etanol + 150 ml distile su
 - %100'lük etanol: 1000 ml etanol
- 0,4xSSC: 10 ml stok 20xSSC + 490 ml distile su
- FISH Probu

Kromozom 14 üzerinde 14q32.33 lokusunda bulunan IgH genindeki yeniden düzenlenmeleri saptamak için gene özgü kırık noktası yeniden düzenlenme FISH probu (Zytovision-IgH Dual Color Break Apart Probe) kullanıldı. Kullanılan probun şematik çizimi Çizim 3.1.de verilmiştir.



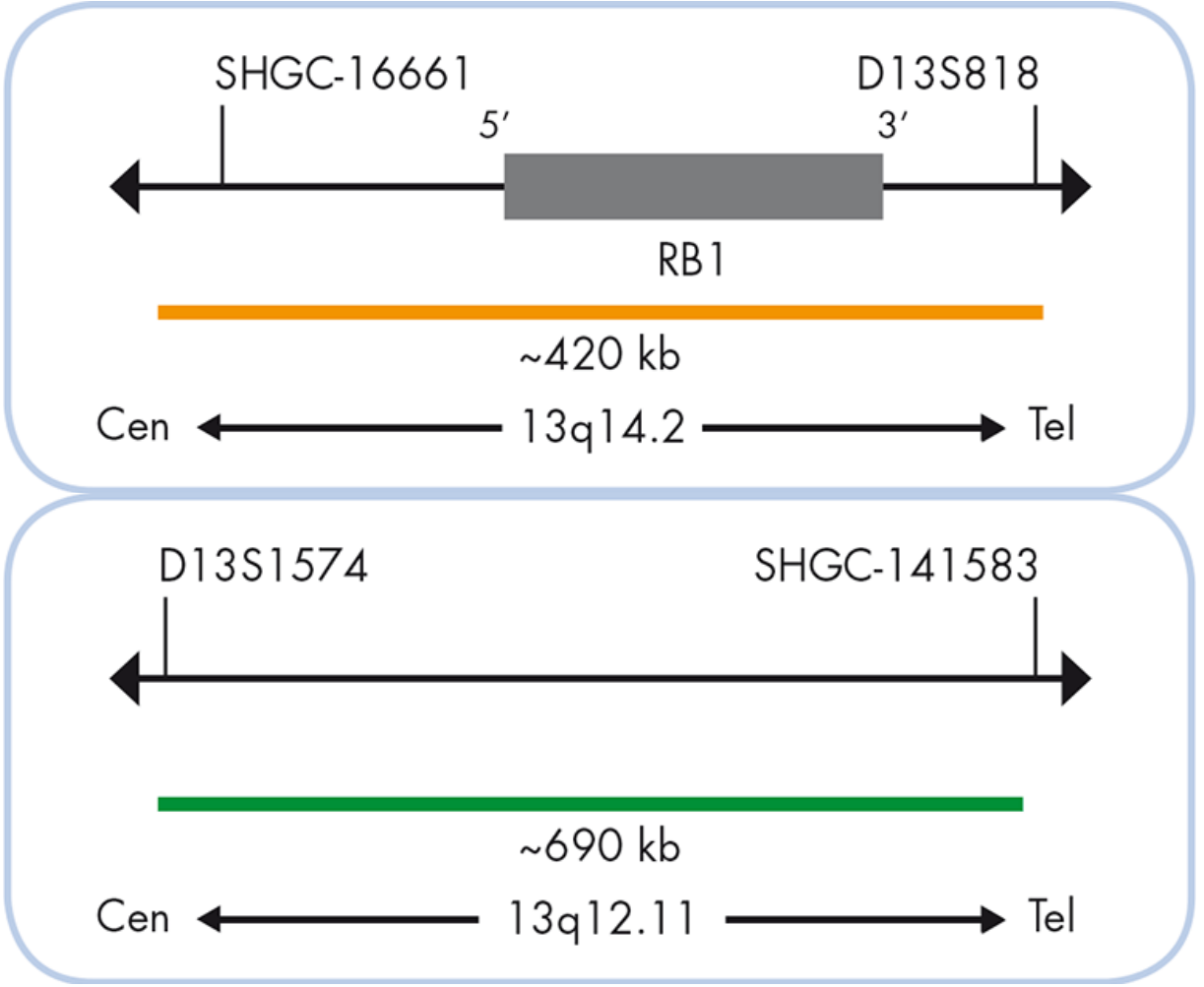
Çizim 3.1. IgH Dual Color Break Apart Probe şematik çizimi

P53 (17p13.1) delesyonunu saptamak için gene özgü delesyon FISH probu kullanıldı. (Zytovision-TP53/CEN 17 Dual Color Probe) Kullanılan probun şematik çizimi Çizim 3.2.de verilmiştir.



Çizim 3.2. TP53/CEN 17 Dual Color Probe şematik çizimi

Kromozom 13 üzerinde bulunan 13q14 lokusuna ait delesyonu saptamak için ise gene özgü delesyon FISH probu kullanıldı. (Zytovision- RB1/13q12 Dual Color Probe) Kullanılan probun şematik çizimi Çizim 3.3.de verilmiştir.



Çizim 3.3. RB1/13q12 Dual Color Probe şematik çizimi

Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri

Çalışmamız süresince kullanılan laboratuvar malzemeleri Çizelge 3.1.de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Laboratuvarda kullanılan malzemeler

Kullanılan Malzemeler
Mikropipet (Eppendorf)
Pipet uçları
Pastör pipeti
Enjektör (Setecoject)
pH metre
Yüzey termometresi
Sıvı termometre

Çizelge 3.1. Laboratuvarda kullanılan malzemeler
Elma uçlu kalem
Kronometre
Pens
Mape
Santrifüj tüpü (Corning – 15 ml)
Otoklav bandı
Tüp standı
Yapıştırıcı (Fixo-Gum)

Çalışmamız süresince kullanılan cihazlar Çizelge 3.2.de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Laboratuvarda kullanılan cihazlar

Kullanılan Cihazlar
Etüv (Heraeus)
Çeker ocak
Su banyosu (Hy-Bex)
Hibridizasyon cihazı (Hy-Chrome)
Bozdolabı (Vestel)
Floresan mikroskobu (Olympus Bx51)
Işık mikroskobu (Olympus Cx31)
Hassas terazi (AND)
Santrifüj (Universal 320R)
Vorteks (Heidolph)
Su ısıtıcısı (CVS)
Nem-sıcaklık ölçer (Hygro Termometre)
Hot plate
Dijital saat
Derin dondurucu (Arçelik)

Çalışmamız laboratuvarında kullanılan cam malzemeler Çizelge 3.3.de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Laboratuvarında kullanılan cam malzemeler

Kullanılan Cam Malzemeler
Mezür
Lam-lamel (Thermo Scientific – Superfrost)
Beher



4. BULGULAR

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Laboratuvarında yürütülen bu tezde Multipl Miyelom tanısı almış 100 yetişkin hastadan alınan kemik iliği aspirasyon materyaline; kemik iliği kültürü, G-Bantlama, 13q, p53 gen delesyonları ve IgH geni yeniden düzenlenmelerini tespit etmek amacıyla Floresan In Situ Hibridizasyon tekniği uygulanmış çıkan sonuçlar retrospektif olarak değerlendirilmiştir.

Olguların yaş ortalaması 63,8 (43-83) ve kadın/erkek oranı 41/59 olarak bulunmuştur. Olguların hastalık evrelerine göre dağılımları; 28 olgu evre 1, 63 olgu evre 2 ve 7 olgu evre 3 olarak değerlendirilmiş, 2 olguya ait tanı verilerine ulaşılamamıştır. Olgularımızın; cinsiyet, yaş, hastalık evreleri, β 2m (Beta-2 mikroglobulin), albümin, kreatinin, CRP, LDH, kalsiyum miktarları ve immünoglobulin tiplerine ait veriler olgu dosyalarından elde edilmiştir. Olgulara ait yaş, cinsiyet ve bazı hematolojik parametrelerin dağılımı Çizelge 4.1.de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Multipl Myelom olgularına ait yaş, cinsiyet ve bazı hematolojik parametrelerin dağılımı

Bulgu	Olgu sayısı
Cinsiyet K/E	41/59
Yaş	63,8 (43-83)
ISS Evre I/II/III	28/63/7
IgA <100mg/dL/≥400mg/dL	26/30
IgM <37mg/dL/≥247mg/dL	32/25
IgG <630mg/dL/≥1580mg/dL	18/22
Beta-2 m <3,5mg/dL/≥3,5mg/dL	21/28
Albümin <3,5g/dL/≥3,5g/dL	29/68
Kreatinin <0,3mg/dL/≥1	57/41
CRP <5g/dL/≥5g/dL	81/10
LDH <135u/dL/≥750u/dL	9/81
Kalsiyum <7,6mg/dL/≥10,4	4/89

Çalışma grubumuz; konvansiyonel sitogenetik-FISH ve sadece FISH çalışılan olgular olmak üzere iki ana grupta değerlendirilmiştir.

Konvansiyonel sitogenetik-FISH çalışılan grup 73 olgudan, sadece FISH çalışılan grup ise 27 olgudan oluşmaktadır.

Konvansiyonel sitogenetik-FISH çalışılan grupta anomali görülme oranı %45,2 olarak belirlenmiştir. Sadece FISH çalışılan grupta ise anomali görülme oranı %48 dir.

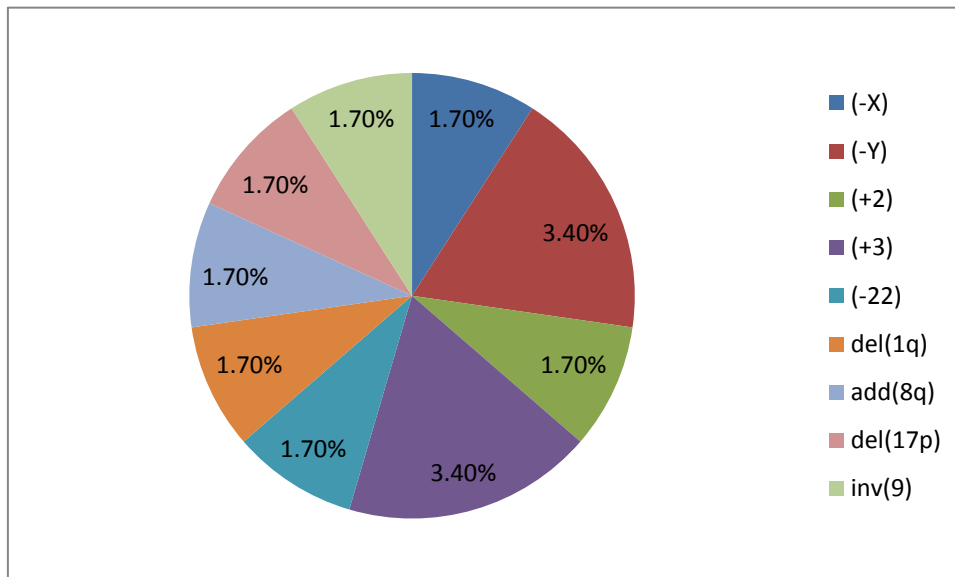
Çalışılan FISH olgularının tümünde anomali görülen olguların oranı %42 dir. Bu olguların %14,2 sinde birden fazla anomali saptanmıştır.

4.1. Sitogenetik Bulgular

Sitogenetik analiz çalışması olguların 73 üne (%73) yapılmış ancak bunların 57 sinde (%78,1) kromozom elde edilebilmiş ve analiz yapılabilmıştır. Analiz sırasında değerlendirilecek metafaz gözlenememesinden dolayı 16 (%22) olguya ait kromozom analizi verisi elde edilememiştir. Geriye kalan 27 (%27) olguya ise kromozom analizi çalışması yapılmamıştır.

Yapılan sitogenetik analiz sonucunda kromozom elde edilebilen 57 olgunun 47 tanesi (%82,5) normal karyotipe sahipken, 10 olguda sayısal/yapısal kromozom anomalileri saptanmıştır. Karyotip analizi ile gözlenen sayısal/yapısal kromozom anomalilerinin oranları Çizelge 4.2.de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Gözlenen sayısal/yapısal kromozom anomalilerinin oranları



Kromozom anomalisi saptanan 10 (%17,5) olgunun 3 ü (%30) kadın iken 7 si (%70) erkek cinsiyetli olarak saptanmıştır. Çalışma sırasında değerlendirecek metafaz gözlenemeyen 16 olgunun 6 sı (%37,5) kadın, 10 u (%62,5) ise erkek olarak bulunmuştur. Kromozom analizi çalışması yapılmayan 27 olgunun ise 12 si (%44,5) kadın, 15 i (%55,5) erkektir.

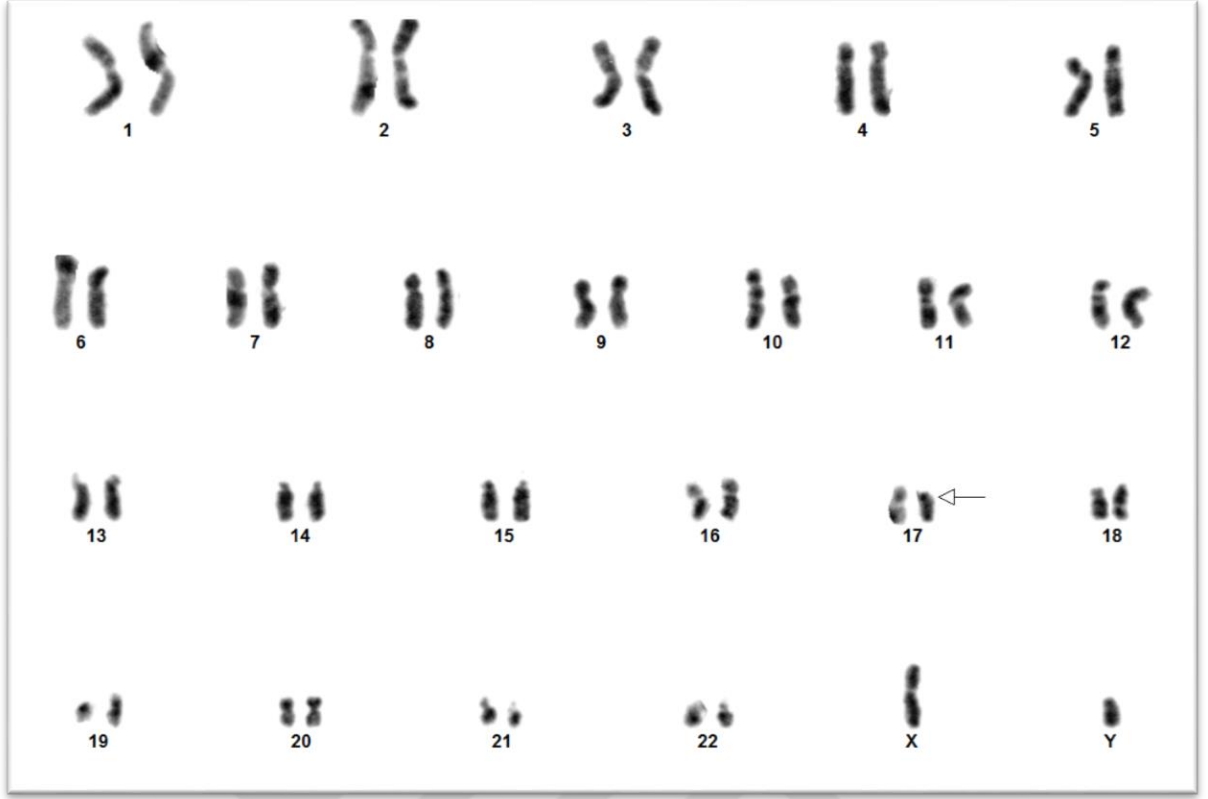
Olgulara ait karyotip analizi bulgular Çizelge 4.3.de verilmiştir.



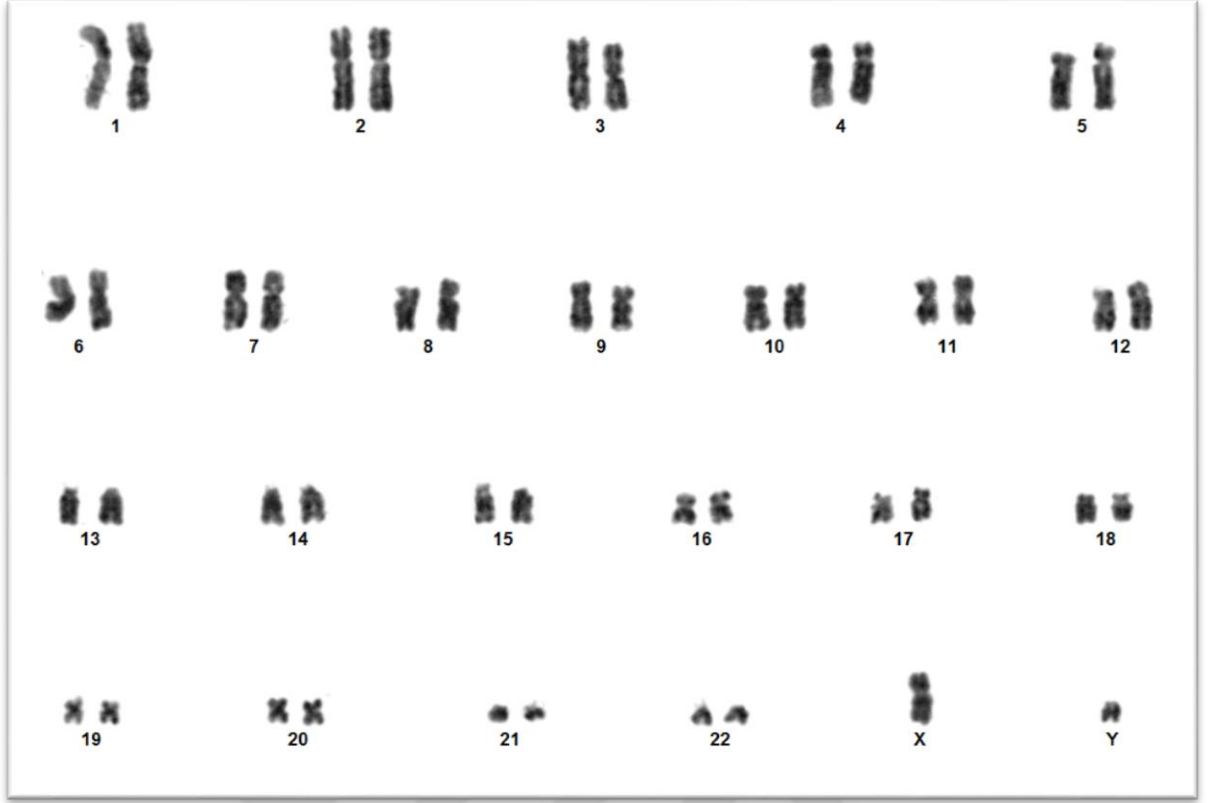
Çizelge 4.3. Olgulara ait karyotip analizi bulguları

Vaka No	Yaş	Cinsiyet	Karyotip Analizi	Vaka No	Yaş	Cinsiyet	Karyotip Analizi
1	61	K	46,XX[19]	51	67	E	X
2	68	E	46,XY[10]	52	65	E	46,XY[11]
3	60	E	46,XY[7]	53	68	K	46,XX[6]
4	68	E	X	54	73	E	46,XY[16]
5	75	E	35~45,XY,-20[3]/46,XY[7]	55	60	K	46,XX[12]
6	71	E	46,XY[8]	56	63	K	46,XX[10]
7	83	E	46,XY[12]	57	64	K	46,XX,del(1)(q32)[2],46,XX[17]
8	55	E	X	58	67	K	X
9	61	E	46,XY,del(17)(p13)[2]/46,XY[6]	59	60	E	X
10	72	E	DMB	60	62	E	46,XY[15]
11	61	E	46,XY[18]	61	70	E	46,XY[7]
12	61	E	DMB	62	66	E	46,XY[16]
13	46	K	DMB	63	63	K	DMB
14	61	K	46,XX[16]	64	58	E	46,XY[11]
15	62	E	45,X,-Y[3]/46,XY[15]	65	63	K	46,XX[13]
16	71	K	46,XX[10]	66	58	K	X
17	60	E	46,XY[2]	67	66	E	46,XY[3]
18	61	E	46,XY[4]	68	71	E	46,XY[12]
19	54	K	X	69	55	K	DMB
20	49	E	DMB	70	67	E	X
21	53	E	46,XY[3]	71	76	K	46,XX[18]
22	67	K	46,XX[18]	72	62	K	46,XX[8]
23	69	K	46,XX[20]	73	68	E	46,XY[17]
24	63	K	46,XX,inv(9)(p11q12)[15]	74	59	E	46~47,XY,+3[3]/46,XY[15]
25	67	E	X	75	58	E	DMB
26	57	E	X	76	39	K	X
27	63	K	DMB	77	68	E	DMB
28	57	K	X	78	81	E	DMB
29	43	K	X	79	57	K	X
30	69	K	46,XX[6]	80	61	K	36~44,X,-X[4].+2[2].+3[6][cp8]/46,XX[12]
31	80	E	DMB	81	65	K	46,XX[17]
32	61	K	46,XX[8]	82	75	E	46,XY[12]
33	56	E	46,XY[12]	83	65	E	46,XY[19]
34	72	E	X	84	70	K	DMB
35	62	E	X	85	78	K	46,XX[11]
36	70	K	X	86	59	K	X
37	73	K	DMB	87	65	K	46,XX[20]
38	61	K	46,XX[19]	88	80	E	46,XY[16]
39	63	E	X	89	53	E	46,XY[2]
40	52	K	X	90	54	E	46,XY[7]
41	57	K	46,XX[15]	91	60	E	46,XY[2]
42	66	E	46,XY,add(8)(q24.3)[2]/46,XY[9]	92	61	K	X
43	67	E	DMB	93	54	E	X
44	62	E	46,XY[2]	94	72	E	46,XX[14]
45	63	K	46,XX[6]	95	57	E	DMB
46	61	E	X	96	75	E	46,XY[11]
47	77	E	43~45,XY,-22[3]/46,XY[15]	97	62	K	46,XX[8]
48	49	E	DMB	98	65	K	X
49	77	E	X	99	71	E	X
50	71	E	X	100	56	E	43~45,X,-Y[3],46,XY[11]

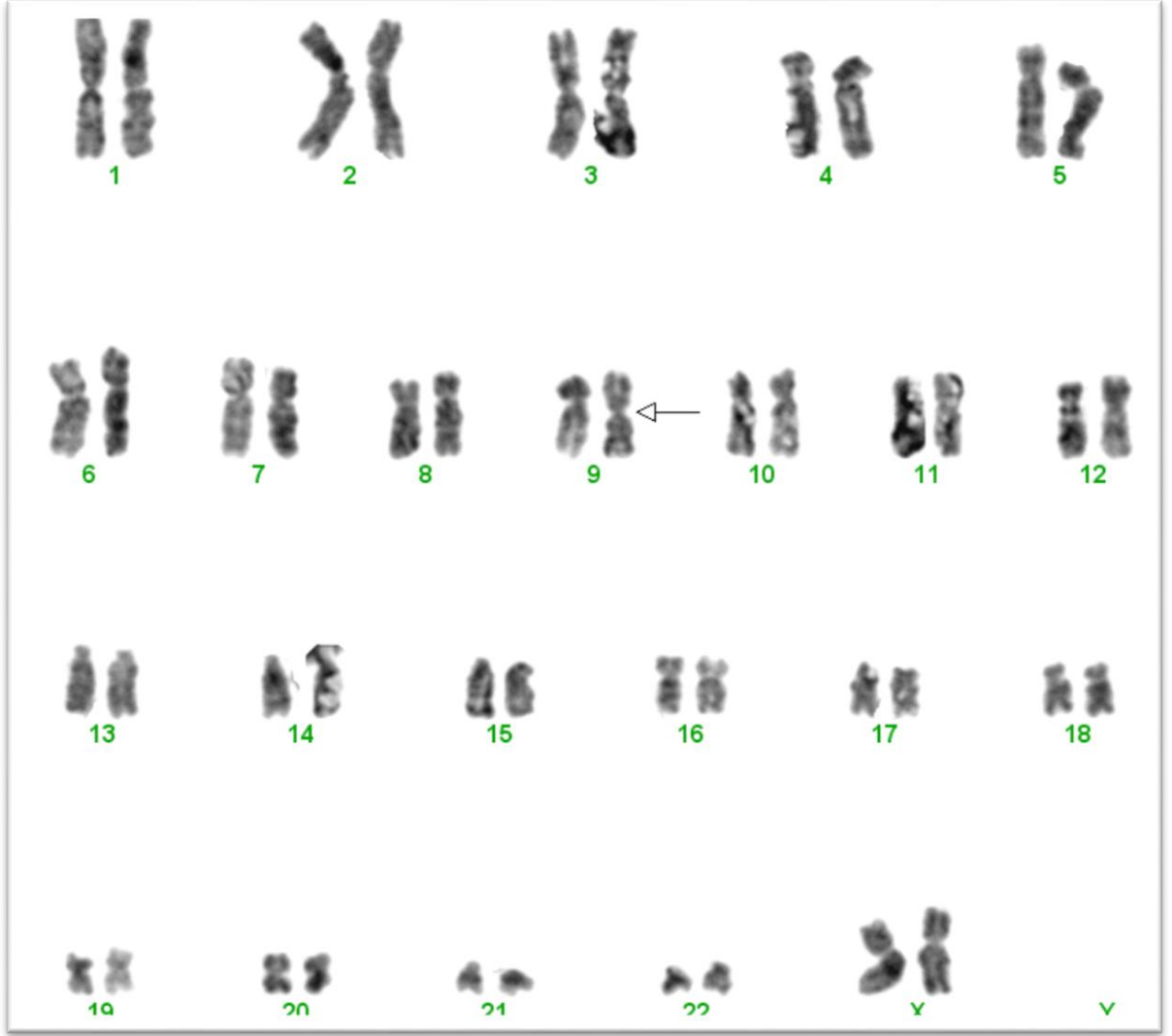
Analiz yorumlarında; X(Çalışma yapılmadı), DMB(Değerlendirilecek metafaz bulunamadı) , [](Analiz edilen hücre sayısı), Y(Yaş) kısaltmaları ile ifade edildi.



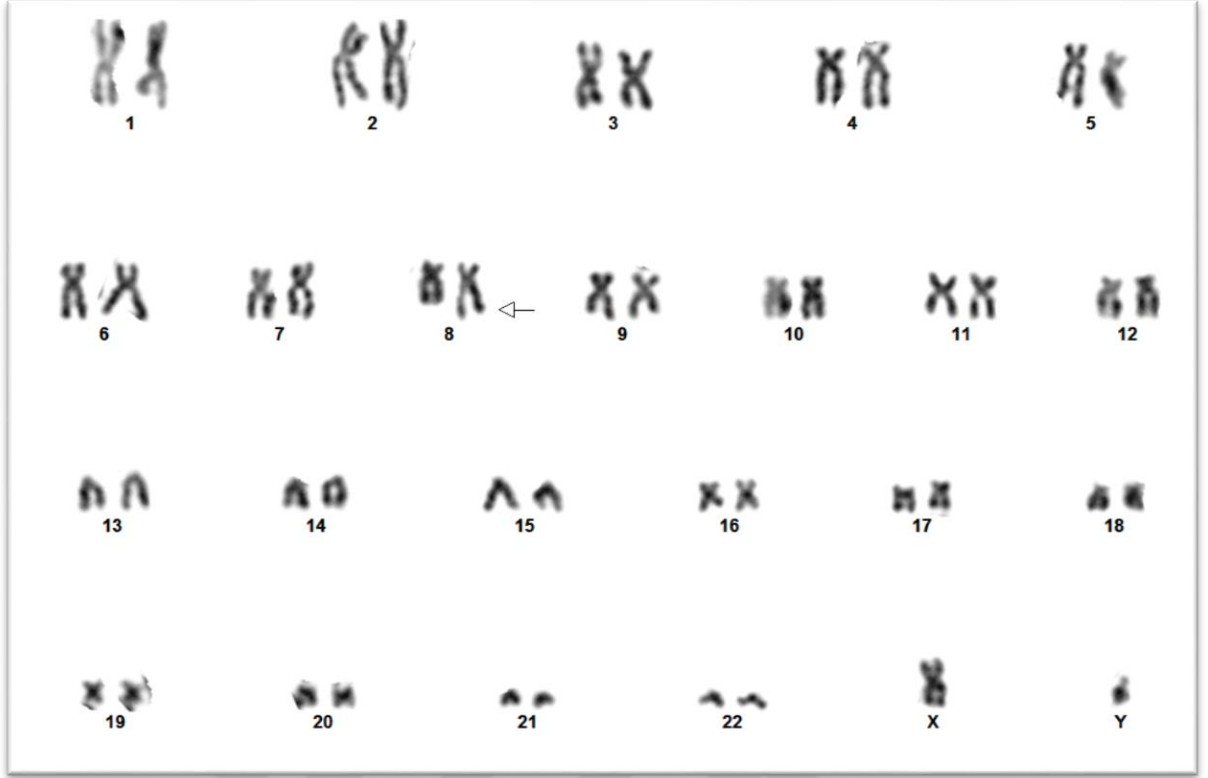
Çizim 4.1. 9 nolu olguya ait karyogram. Olguda 46,XY,del(17)(p13)[2]/46,XY[6] karyotipi saptanmıştır.



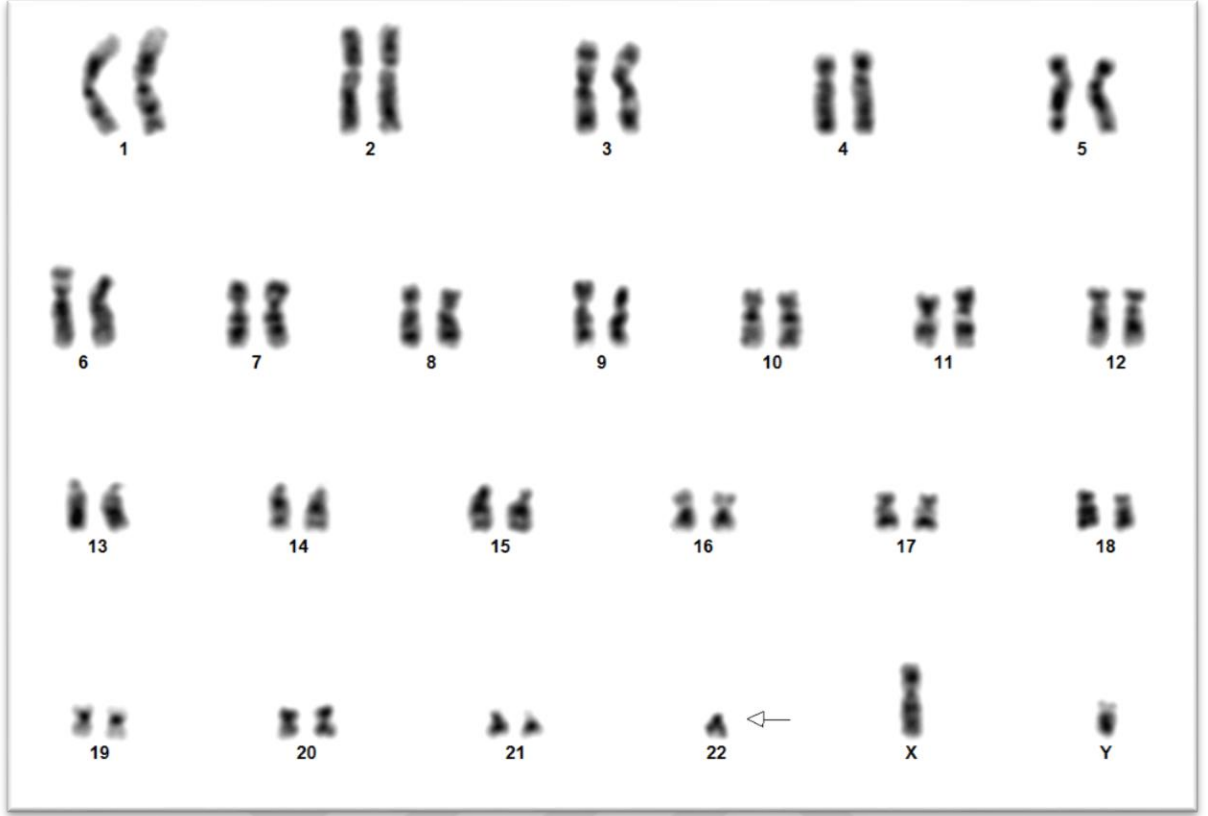
Çizim 4.2. 11 nolu olguya ait karyogram Olguda 46,XY[18] karyotipi saptanmıştır.



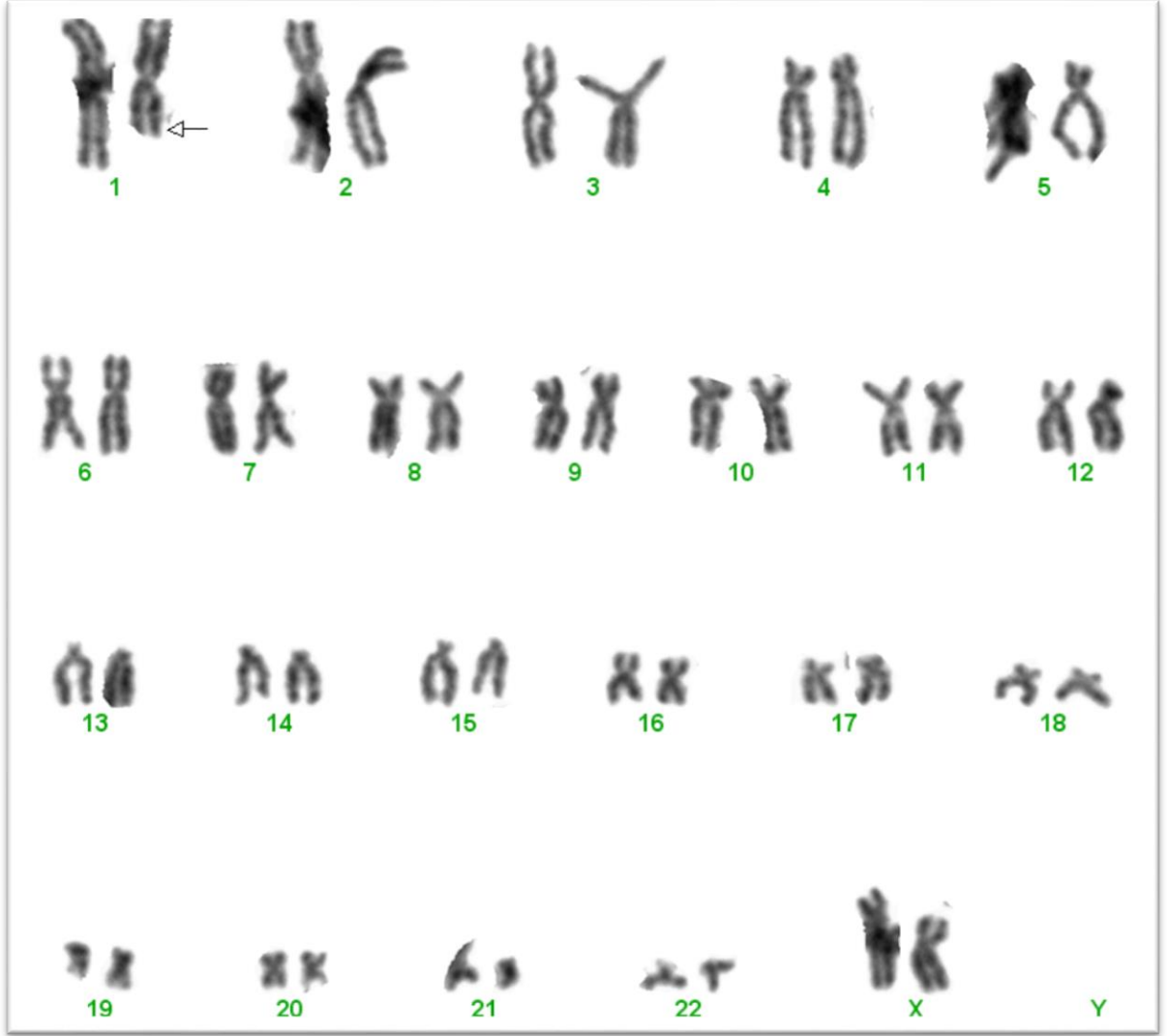
Çizim 4.3. 24 nolu olguya ait karyogram. Olguda 46,XX,inv(9)(p11q12)[15] karyotipi saptanmıştır.



Çizim 4.4. 42 nolu olguya ait karyogram. Olguda 46,XY,add(8)(q24.3)[2]/46,XY[9] karyotipi saptanmıştır.



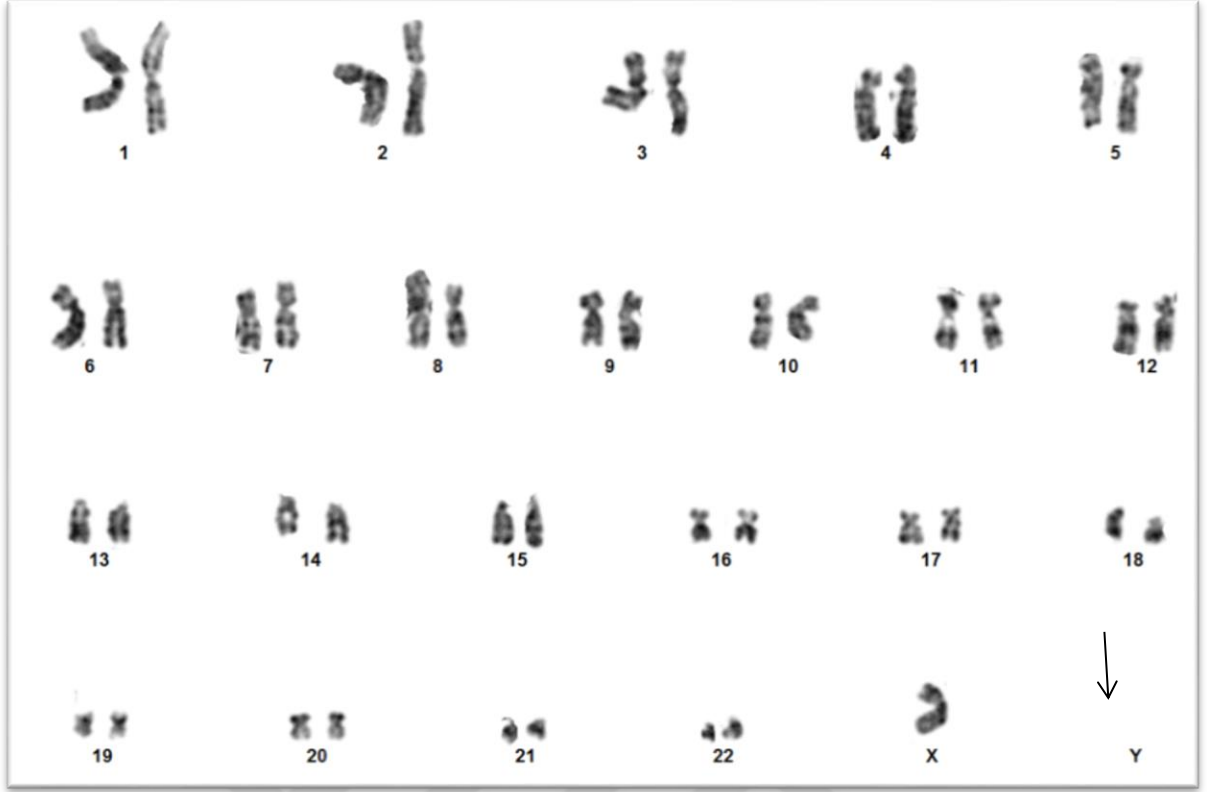
Çizim 4.5. 47 nolu olguya ait karyogram. Olguda 43~45,XY,-22[3]/46,XY[15] karyotipi saptanmıştır.



Çizim 4.6. 57 nolu olguya ait karyogram. Olguda 46,XX,del(1)(q32)[2],46,XX[17] karyotipi saptanmıştır.



Çizim 4.7. 74 nolu olguya ait karyogram. Olguda 46~47,XY,+3[3]/46,XY[15] karyotipi saptanmıştır.



Çizim 4.8. 100 nolu olguya ait karyogram. Olguda 43~45,X,-Y[3],46,XY[11] karyotipi saptanmıştır.

4.2. Moleküler Sitogenetik Bulgular

Araştırmamızda bulunan 100 olguya delesyon ve breakapart problemleri uygulanarak FISH analizleri gerçekleştirilmiştir.

Yapılan FISH analizleri sonucunda;

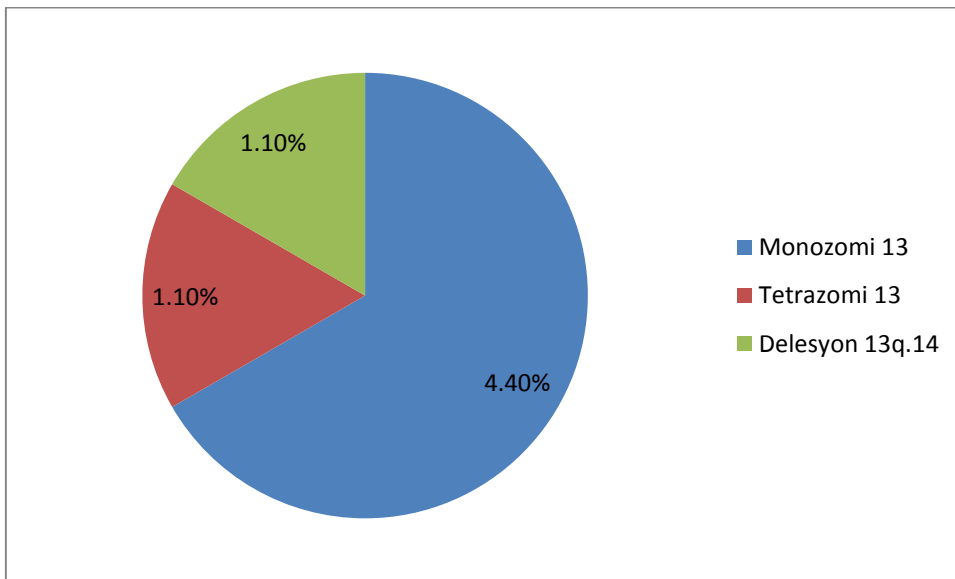
Kromozom 13 anomalileri

Çalışma grubumuz içerisinde 90 olguya ait kromozom 13 anomalileri verisi bulunmaktadır.

Kromozom 13 e özgü anomaliler çalışmamızda en az sıklıkla gözlenen anomalilerdir.

Kromozom 13 anomalileri olguların 5 inde sayısal, 1 inde ise yapısal anomali olarak gözlenmiş olup toplam anomali oranı %6,7 dir. Olguların yalnızca 1 inde (%1,1) 13q delesyonu saptanmıştır. Olguların 4 ünde (%4,4) total ve/veya parsiyel monozomi, 1 inde ise (%1,1) tetrazomi/parsiyel tetrazomi saptanmıştır. Hastaların 2 si (%2) hücre yetersizliğinden, 1 i (%1) analiz sırasında sinyal yetersizliğinden olmak üzere toplam 10 (%10) hastaya ait kromozom 13 anomalisi verisi elde edilememiştir. Geri kalan 84 (%93,3) olguda kromozom 13 le ilgili herhangi bir anomali gözlenmemiştir. FISH yöntemiyle tespit edilen kromozom 13 e ait sayısal/yapısal anomaliler Çizelge 4.4.te verilmiştir.

Çizelge 4.4. FISH yöntemiyle tespit edilen kromozom 13 e ait sayısal/yapısal anomalilerinin dağılımı

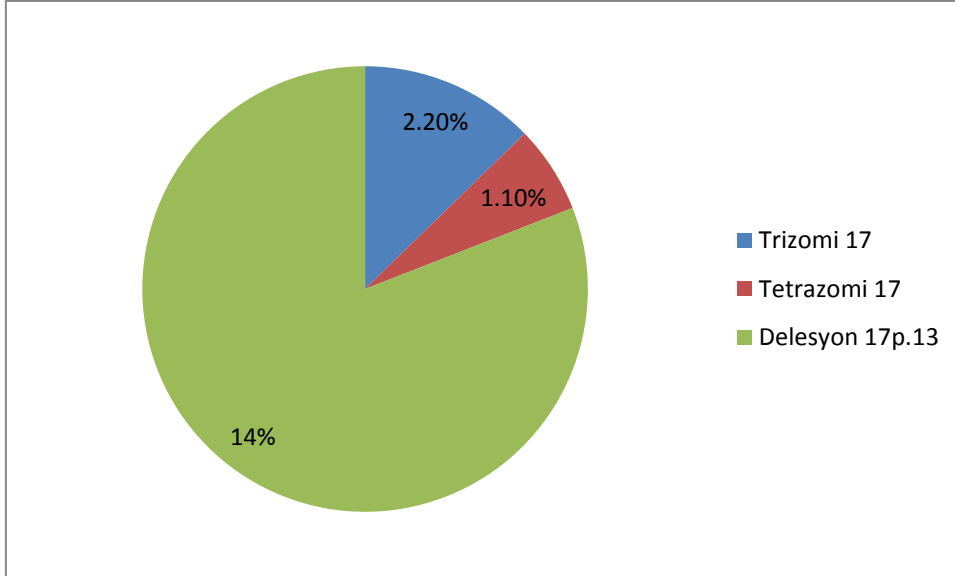


P53

Çalışma grubumuz içerisinde 92 olguya ait kromozom 17 anomalileri verisi bulunmaktadır.

Olguların 16 sında (%17,4) kromozom 17 ye ait anomaliler saptanmıştır. Bunların 3 ünde (%3,3) sayısal, 13 ünde (%14,1) ise yapısal anomaliler gözlenmiştir. Olguların 13 ünde (%14,1) p53 delesyonu gözlenmiştir. Sayısal anomaliye sahip olan hastaların 2 sinde (%2,2) trizomi/parsiyel trizomi, 1 inde ise (%1,2) tetrazomi/parsiyel tetrazomi saptanmıştır. Hastaların 3 ü (%3) hücre yetersizliğinden, 3 ü (%3) analiz sırasında sinyal yetersizliğinden olmak üzere toplam 8 (%8) hastaya ait kromozom 17 anomalisi verisi elde edilememiştir. Geri kalan 76 (%82,6) olguda kromozom 17 le ilgili herhangi bir anomali gözlenmemiştir. FISH yöntemiyle tespit edilen kromozom 17 ye ait sayısal/yapısal anomaliler Çizelge 4.5.te verilmiştir.

Çizelge 4.5. FISH yöntemiyle tespit edilen kromozom 17 ye ait sayısal/yapısal anomalilerinin dağılımı



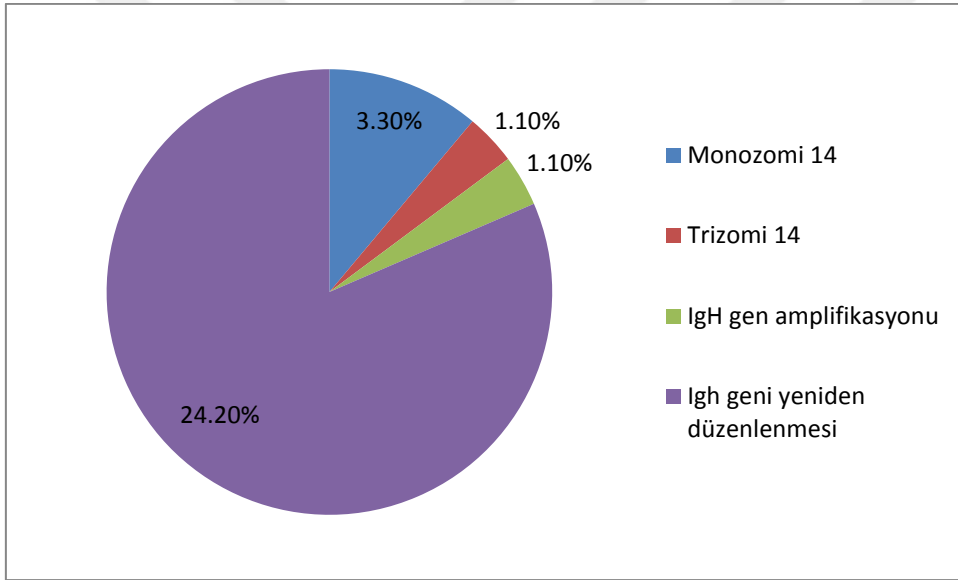
IgH geni yeniden düzenlenmeleri

Çalışma grubumuz içerisinde 91 olguya ait kromozom 14 anomalileri verisi bulunmaktadır.

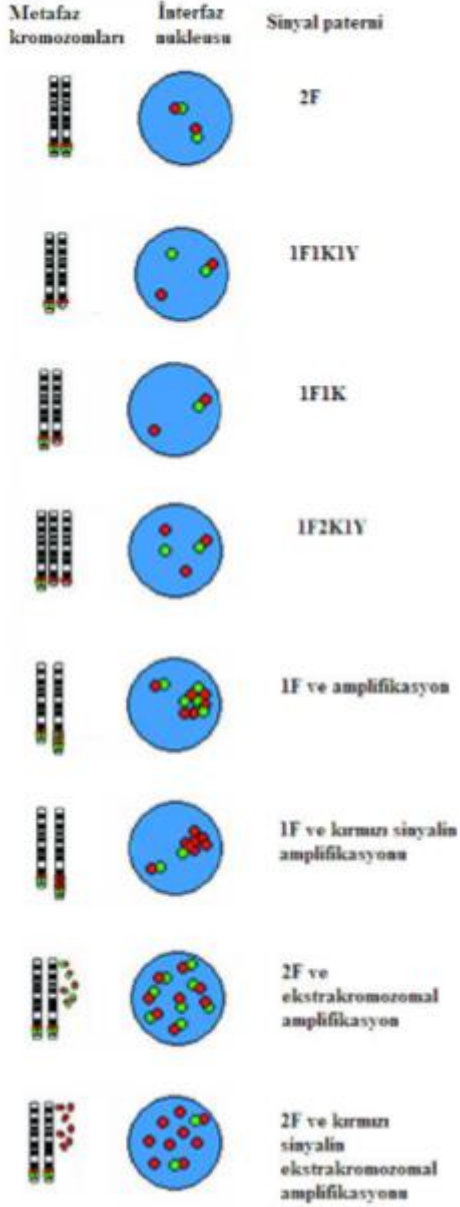
Kromozom 14 e ait anomaliler çalışmamız sırasında en sık gözlenen anomaliler olmuştur.

Kromozom 14 anomalileri olguların 5 (%5) inde sayısal, 22 sinde (%22) ise yapısal anomali olarak gözlenmiştir. Anomali görülme sıklığı %29,7 dir. Olguların 3 (%3,3) ünde monozomi/parsiyel monozomi, 1 (%1,1) inde trizomi/parsiyel trizomi ve 1 (%1,1) inde de IgH gen amplifikasyonu gözlenmiştir. Olguların 22 (%24,2) sinde gözlenen yapısal anomaliler IgH geni yeniden düzenlenmesini desteklemektedir. Hastaların 1 (%1) inde analiz sırasında sinyal yetersizliği sebebiyle, toplamda 9 (%9) hastaya ait kromozom 14 verisi elde edilememiştir. Geriye kalan 64 (%71,2) hastada kromozom 14 ile ilgili herhangi bir anomali bulgusuna rastlanmamıştır. FISH yöntemiyle tespit edilen kromozom 14 e ait sayısal/yapısal anomaliler Çizelge 4.6.da verilmiştir.

Çizelge 4.6. FISH yöntemiyle tespit edilen kromozom 14 e ait sayısal/yapısal anomalilerinin dağılımı



IgH genine ait yeniden düzenlenmeleri için yapılan FISH analizinde metafaz kromozomlarında ve interfaz nukleusunda sinyal görünümleri ve değerlendirmeleri Çizim 4.9.da verilmiştir.



Çizim 4.9. IgH genine ait yeniden düzenlenmeleri için yapılan FISH analizinde metafaz kromozomlarında ve interfaz nukleusunda sinyal görünümleri ve değerlendirmeleri

Olgulara ait FISH analizleri sonucu saptanan sayısal/yapısal anomali bulguları Çizelge 4.7.de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Araştırma olgularına ait FISH analizleri sonucu saptanan sayısal/yapısal anomali bulguları

Vaka No	13q del.	p53 del.	IgH yeniden düzenlenme	Vaka No	13q del.	p53 del.	IgH yeniden düzenlenme
1	(-)	(-)	(-)	51	X	(-)	(-)
2	X	(-)	(-)	52	(-)	(-)	%20 (+)
3	(-)	(-)	(-)	53	(-)	%10 (+)	(-)
4	(-)	(-)	%10 (+)	54	(-)	(-)	(-)
5	SY	SY	%10 (+)	55	(-)	(-)	(-)
6	(-)	(-)	%30 monozomi/parsiyel monozomi	56	(-)	(-)	(-)
7	(-)	(-)	(-)	57	(-)	%8 (+)	%8 (+)
8	(-)	(-)	(-)	58	(-)	(-)	(-)
9	(-)	%6,5 (+)	(-)	59	(-)	(-)	(-)
10	HY	(-)	(-)	60	(-)	(-)	(-)
11	%16 monozomi/p arsiyel monozomi	(-)	(-)	61	(-)	HY	(-)
12	(-)	SY	(-)	62	(-)	(-)	%7 (+)
13	(-)	SY	%10 (+), %7 monozomi/parsiyel monozomi	63	(-)	(-)	%16 (+)
14	%5,5 (+)	(-)	(-)	64	(-)	(-)	(-)
15	(-)	(-)	(-)	65	(-)	(-)	(-)
16	(-)	(-)	(-)	66	(-)	(-)	(-)
17	(-)	(-)	%35 monozomi/parsiyel monozomi	67	X	(-)	(-)
18	(-)	(-)	(-)	68	X	X	%7,5 (+)
19	(-)	(-)	X	69	(-)	(-)	%21 (+)
20	(-)	(-)	(-)	70	(-)	(-)	X
21	(-)	(-)	(-)	71	(-)	(-)	IgH amp +
22	x	(-)	X	72	(-)	(-)	(-)
23	(-)	(-)	(-)	73	(-)	(-)	%15 (+)
24	(-)	(-)	(-)	74	%14 monozomi/par siyel monozomi	%9 (+)	X
25	(-)	(-)	(-)	75	(-)	(-)	(-)
26	(-)	(-)	%8 (+)	76	(-)	%5 (+)	(-)
27	(-)	(-)	X	77	(-)	(-)	(-)
28	(-)	(-)	(-)	78	(-)	(-)	%12 (+)
29	(-)	(-)	(-)	79	(-)	%6 (+)	(-)
30	(-)	(-)	(-)	80	(-)	(-)	SY
31	(-)	(-)	%7 (+)	81	HY	HY	(-)
32	(-)	(-)	(-)	82	(-)	%13 (+)	(-)

Vaka No	13q del.	p53 del.	IgH yeniden düzenlenme	Vaka No	13q del.	p53 del.	IgH yeniden düzenlenme
33	(-)	(-)	%16 (+)	83	(-)	(-)	(-)
34	(-)	%8 (+)	(-)	84	%10 monozomi/parsiyel monozomi	(-)	X
35	(-)	X	%8 (+)	85	(-)	(-)	(-)
36	(-)	%13 trizomi/parsiyel trizomi	X	86	(-)	(-)	(-)
37	(-)	(-)	(-)	87	(-)	(-)	(-)
38	(-)	(-)	(-)	88	(-)	(-)	%30 (+)
39	(-)	%10 trizomi/parsiyel trizomi	X	89	(-)	(-)	%13 trizomi/parsiyel trizomi
40	(-)	%13 (+)	(-)	90	(-)	(-)	(-)
41	(-)	(-)	%8 (+)	91	(-)	(-)	(-)
42	(-)	(-)	(-)	92	(-)	(-)	(-)
43	(-)	(-)	(-)	93	(-)	(-)	(-)
44	(-)	(-)	(-)	94	%10 monozomi/parsiyel monozomi	(-)	%37 (+)
45	(-)	%9 (+)	(-)	95	(-)	(-)	(-)
46	(-)	(-)	(-)	96	(-)	(-)	%10,5 (+)
47	(-)	(-)	(-)	97	(-)	HY	(-)
48	(-)	(-)	X	98	%10 tetrazomi/parsiyel tetrazomi	%8 tetrazomi/parsiyel tetrazomi	%18 (+)
49	(-)	%8,5 (+)	(-)	99	X	%44 (+)	%96 (+)
50	X	%8 (+)	(-)	100	(-)	%16 tetrazomi/parsiyel tetrazomi	%20 (+)

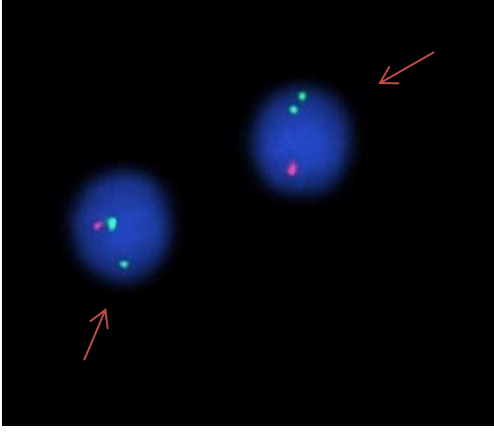
Analiz yorumlarında; (-) (Normal), X(Çalışma yapılmadı), HY(Hücre yetersiz), SY (Sinyal yetersiz), + (Pozitif olgu) kısaltmaları ile ifade edildi.

Yapılan analizler sonucunda en az bir anomaliye sahip olan olguların genel görünümü Çizelge 4.8.de verilmiştir.

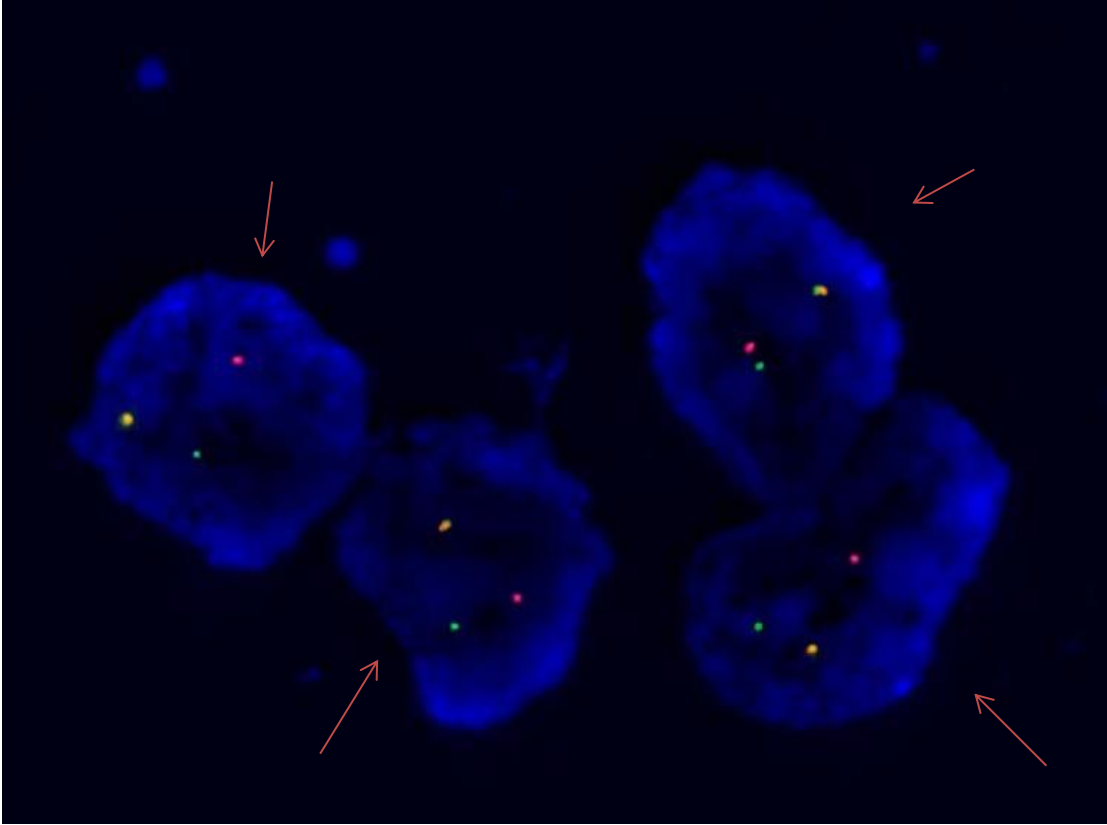
Çizelge 4.8. Anomali gözlenen olguların FISH ve karyotip sonuçları

Vaka No	Karyotip	13q del.	p53 del.	IgH yeniden düzenlenme
4	X	(-)	(-)	%10 (+)
5	35~45,XY,-20[3]/46,XY[7]	SY	SY	%10 (+)
6	46,XY[8]	(-)	(-)	%30 monozomi/parsiyel monozomi
9	46,XY,del(17)(p13)[2]/46,XY[6]	(-)	%6,5 (+)	(-)
11	46,XY[18]	%16 monozomi/parsiyel monozomi	(-)	(-)
13	DMB	(-)	SY	%10 (+), %7 monozomi/parsiyel monozomi
14	46,XX[16]	%5,5 (+)	(-)	(-)
15	45,X,-Y[3]/46,XY[15]	(-)	(-)	(-)
17	46,XY[2]	(-)	(-)	%35 monozomi/parsiyel monozomi
24	46,XX,i(-)v(9)(p11q12)[15]	(-)	(-)	(-)
26	X	(-)	(-)	%8 (+)
31	DMB	(-)	(-)	%7 (+)
33	46,XY[12]	(-)	(-)	%16 (+)
34	X	(-)	%8 (+)	(-)
35	X	(-)	X	%8 (+)
36	X	(-)	%13 trizomi/parsiyel trizomi	X
39	X	(-)	%10 trizomi/parsiyel trizomi	X
40	X	(-)	%13 (+)	(-)
41	46,XX[15]	(-)	(-)	%8 (+)
42	46,XY,add(8)(q24.3)[2]/46,XY[9]	(-)	(-)	(-)
45	46,XX[6]	(-)	%9 (+)	(-)
47	43~45,XY,-22[3]/46,XY[15]	(-)	(-)	(-)
49	X	(-)	%8,5 (+)	(-)
50	X	x	%8 (+)	(-)
52	46,XY[11]	(-)	(-)	%20 (+)
53	46,XX[6]	(-)	%10 (+)	(-)
57	46,XX,del(1)(q32)[2],46,XX[17]	(-)	%8 (+)	%8 (+)
62	46,XY[16]	(-)	(-)	%7 (+)
63	DMB	(-)	(-)	%16 (+)
68	46,XY[12]	X	X	%7,5 (+)
69	DMB	(-)	(-)	%21 (+)
71	46,XX[18]	(-)	(-)	IgH amp +
73	46,XY[17]	(-)	(-)	%15 (+)
74	46~47,XY,+3[3]/46,XY[15]	%14 monozomi/parsiyel monozomi	%9 (+)	X
76	X	(-)	%5 (+)	(-)
78	DMB	(-)	(-)	%12 (+)
79	X	(-)	%6 (+)	(-)
80	36~44,X,-X[4],+2[2],+3[6][cp8]/46,XX[12]	(-)	(-)	SY

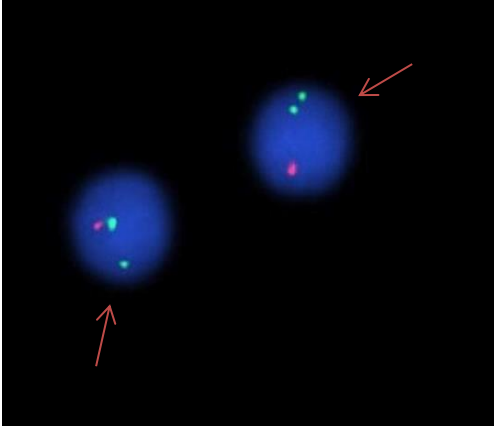
Analiz yorumlarında; (-) (Normal), X(Çalışma yapılmadı), DMB(Değerlendirilecek metafaz bulunamadı) , [](Analiz edilen hücre sayısı), HY(Hücre yetersiz), SY (Sinyal yetersiz) kısaltmaları ile ifade edildi.



Çizim 4.10. 14 nolu olguya ait RB1/13q12 Dual Color Probe FISH analiz görüntüsü. 2 yeşil, 1 kırmızı sinyal paterni RB1 geninin delesyonunu temsil etmektedir.



Çizim 4.11. 57 nolu olguya ait IgH Dual Color Break Apart Probe FISH analizi görüntüsü. 1 füzyon, 1 yeşil, 1 kırmızı sinyal paterni IgH geninin yeniden düzenlenmesini temsil etmektedir.



Çizim 4.12. 74 nolu olguya ait TP53/CEN 17 Dual Color Probe FISH analizi görüntüsü. 2 yeşil, 1 kırmızı sinyal paterni TP53 geninin delesyonunu temsil etmektedir.



5. TARTIŞMA

Multipl myelom'da genetik karakterizasyonu belirlemede kullanılan geleneksel yaklaşımlar; sitogenetik analiz, FISH ve moleküler genetik çalışmaları kapsamaktadır. Bu teknikler birbirlerine tamamlayıcı olup, tanıda ve prognozda önemli bilgiler sağlamaktadır.

Araştırmamız boyunca multipl myelom tanısı alan 100 olgunun kemik iliği örneklerine konvansiyonel sitogenetik ve FISH çalışmaları yapılmış, sonuçları analiz edilmiştir. Çalışmamızın sonucunda ulaştığımız bulgular sırayla tartışılmıştır.

Araştırmamızda 100 olgunun 73 üne sitogenetik çalışma yapılmış ve 57 sinde kromozom elde edilebilmiştir. Malign ve sağlıklı plazma hücrelerinin kemik iliği içerisindeki oranlarının çeşitliliği ve kanserli plazma hücrelerinin proliferasyon yeteneklerinin yeterli olmamasından dolayı multipl myelom hastalarında kromozom elde edilme oranı düşük olabilmektedir. İncelenen literatürlerde MM olgularında sitogenetik analiz için kromozom elde edilebilme oranı %30-92 dir. Araştırmamızda kromozom elde edebilme oranımız %78,1 dir ve literatürlerde bildirilen oran aralığı içindedir.

Sitogenetik çalışmamız sonucunda kromozom analizi yapılabilen 57 olgunun 47 sinde (%82,5) normal karyotip izlenirken, 10 farklı (%17,5) olguda çeşitli anomaliler saptanmıştır. Yapılan benzer çalışmalar arasında; Könisberg ve arkadaşlarının buldukları anomali oranı %55,5, Wang ve arkadaşlarının çalışmasında %51,7, Lloveras ve arkadaşlarının %41, Chang ve Dewald ın çalışmasında %28, Greslikova ve arkadaşlarının çalışmasında %25, Sukjoong ve arkadaşlarının %18, Cremer ve arkadaşlarının %14,7 olarak bulunmuştur. Anomali oranımız; Könisberg, Wang, Lloveras, Chang-Dewald, Greslikova ve Sukjoong'un oranlarından düşük olsa da taranan literatür oranları içerisinde yer almaktadır. Bulunan anomali oranımız Cremer 'in oranına yakın bulunmuştur. Ancak yapılan literatür taramasında anomali oranının %13-55 gibi geniş bir aralıkta görüldüğü dikkat çekmektedir. Tespit edilen anomali oranlarının bu denli farklı olmasının; tümör heterojenitesi, çalışılan hastaların hastalık evrelerinin dağılımı, metafaz eldesindeki hücre kültür teknik farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Myelomaların moleküler seviyedeki heterojenitesinin aydınlatılması için daha fazla moleküler genetik bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır. Malign plazma hücre öncülleri düşük mitotik aktiviteye sahip olduklarından sitogenetik bilgi sınırlıdır. t(4;14) gibi translokasyonlar klasik bantlama teknikleriyle gözden kaçabilmektedir.

Konvansiyonel sitogenetikle tespit edilemeyen olası anomalilerin tespiti için ileri moleküler sitogenetik yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yöntemlerin başında FISH gelmektedir. Anomali gözlenme oranlarımızı üç kategoride incelersek daha önce de belirttiğimiz gibi sadece konvansiyonel sitogenetik verileri değerlendirildiğinde bu oran %17,5, konvansiyonel sitogenetik-FISH birlikte çalışılan olgu grubumuzda %45,2, sadece FISH çalışılan olgu grubunda ise bu oran %48 dir. Bu oranlar değerlendirildiğinde FISH'in anomali yakalama oranına oldukça büyük bir katkı sağladığını gözlemekteyiz. Bunun altında yatan en önemli etken, FISH yöntemi için interfaz hücresi eldesinin yeterli olması dolayısıyla da daha fazla olguda daha fazla hücrede analiz yapma olanağını sağlamasıdır. Ancak bununla beraber FISH ile tespit edemediğimiz fakat prognostik öneme sahip olabilecek monozomiler ve trizomiler bildirilmiştir. Biz de bu çalışmada FISH'le tespit edemediğimiz ancak sadece sitogenetikle tespit edebildiğimiz monozomiler, trizomiler ve delesyon ve inversiyon gibi yapısal anomaliler gözlemledik. Gözlenen yapısal anomalilerden biri inv(9)(p11q12) bulgusudur. Bu perisentrik inversiyon, polimorfizm olarak kabul edilmektedir ve fenotipe etkisi beklenmemektedir (Mozdarani ve diğ. 2007). Bu bulgular gösterdi ki, FISH yöntemi tek başına kullanıldığında anomali tespit oranı yüksek olmasına rağmen, anomali çeşitliliğini saptamak açısından yetersiz kalabilmektedir. Bu sebeple konvansiyonel sitogenetikle birlikte analiz yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Araştırılan literatürlerde FISH analizi ile belirlenen anomali oranı %42-86 aralığında değişmektedir ve bizim ulaştığımız sonuç literatür oranları içerisinde yer almaktadır. Dewald ve arkadaşlarının %86, Cremer ve arkadaşlarının çalışmaları sonucunda anomali oranı %66, Gutierrez ve arkadaşlarının %58, Jian ve arkadaşlarının %42 olarak bildirilmiştir. Çalışmalarımız sonucunda elde edilen anomali oranı Jian ve arkadaşlarının buldukları oranın üstündedir. Ulaştığımız anomali oranı genel olarak diğer literatür taramalarına kıyasla düşük olsa da literatürlerde belirlenen oran aralığındadır. Anomali oranları arasındaki değişkenliğin sebebi olgu grupları içerisindeki heterojenlikten ve incelenen parametrelerin farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Yapılan FISH çalışmaları sonucunda en sık gözlenen yapısal anomali %24,2 oranıyla IgH geni yeniden düzenlenmesidir. İkinci sırada %14,1 oranıyla p53 gen delesyonu gelmektedir. 13q delesyonu ise %6,7 oranıyla en az sıklıkla gözlenen anomalidir.

RB1 geni 13. Kromozom üzerinde q14 lokusunda bulunan bir tümör süppressör genidir. Bu genin kodladığı nükleer fosfoprotein hücre siklusu sırasında G1 fazından S fazına geçişi durdurmakta rol oynamakta, hücre döngüsünün ilerlemesinin ve genetik stabilitesinin kritik düzenleyicisidir (Shuhua ve diğ. 2017). Bu nedenle bu gene özgü farklı anomaliler birçok kanserde hücresel transformasyona sebep olabilmektedir. Çalışmamız sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda 13q delesyonu, %6,7 oranıyla en az sıklıkla gözlenen anomali olmuştur. Yang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada kromozom 13 e ait anomali oranı %69,7, Dowd ve arkadaşları %54,4, Loiseau ve arkadaşları %48, Königsberg ve arkadaşları %44,9, Gutierrez ve arkadaşları %42, Chang ve arkadaşlarının %41,6, Kaufmann ve arkadaşları % 36,4, Gimidène ve arkadaşları %18,6 oranında 13q14 bölge delesyonlarını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda 13q delesyonunun benzer çalışmalarla kıyaslandığında görülme sıklığının az olduğu dikkat çekmektedir. Bunun sebebinin; olguların hastalık evrelerinin dağılımının farklı ve hücre kültür tekniği farklılıklarından olabileceğini düşünmekteyiz. Literatürlerde kromozom 13 anomalilerinin tek başına bir prognostik değerinin olmadığı, t(4;14) ve/veya p53 delesyonu ile birlikte gözlemlendiğinde daha kötü bir prognostik değere sahip olduğu bildirilmiştir (Loiseau 2007).

TP53 geni 17. Kromozom üzerinde p13 lokusunda bulunan bir tümör süpresör genidir. TP53 geni, p53 adındaki transkripsiyon faktörü olan proteinini; hücre siklusunun duraksaması, yaşlanma, apoptoz ve DNA tamiri gibi önemli yollarda rol alması için kodlar. TP53 genine ait anomaliler genel olarak kanser türlerinde bildirilmiş olan yaygın sitogenetik değişikliklerdendir. Çalışmalarımız sonucunda p53 delesyonu ikinci en çok sıklıkta gözlenerek olguların %14,1 inde saptanmıştır. Araştırılan literatürlerde; Königsberg ve arkadaşlarının çalışmaları sonucu ulaştıkları anomali oranı %24,7, Chang ve arkadaşlarının %20, Dewald ve arkadaşlarının %14, Loiseau ve arkadaşlarının %11, Fonseca ve arkadaşlarının %10,7, Greslikova ve arkadaşlarının %9,8, Gutierrez ve arkadaşlarının ise %8,5 olarak bildirilmiştir. Çalışmamız sonucunda ulaştığımız anomali oranımız; Fonseca, Dewald, Gutierrez, Loiseau ve Greslikova'nın oranlarından yüksek, Königsberg ve Chang ın ulaştıkları oranlardan ise düşük bulunmuştur. Ancak ulaştığımız sonuç genel itibariyle literatürlerde bildirilen ortalama oranlar içerisinde yer almaktadır. p53 delesyonunu kötü prognostik değere sahip olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (Dewald 2005). Güncel tedavi protokollerinin belirlenmesinde ve risk sınıflandırılmasında p53 delesyonu önemli bir parametre olarak kullanılmaktadır.

IgH geni, 14. Kromozom üzerinde q32 lokusunda bulunan ve insan antikorlarının ağır zincirlerini kodlayan bir gendir. IgH geninin 30'u aşkın partner genle yeniden düzenlemeler yaptığı ve IgH geninin katıldığı bu yeniden düzenlenmeler sonucu yerleştiği partner genin ekspresyonunda artış gözlemlendiği bildirilmektedir. Bu yeniden düzenlenmeler pek çok hematolojik malignenside bildirilmiş olup prognostik değere sahiptir. IgH geni yeniden düzenlenmeleri, çalışmamız içerisinde %24,2 oranıyla en fazla sıklıkta gözlenen anomaliler olmuştur. Ancak bizim çalışmamız olgularda IgH geninin yeniden düzenlenmesinin var olup olmadığına dair sonuç vermektedir ancak partner gen bilinmemektedir. Bu sebeple, MM'de prognostik değeri olan IgH geninin hangi partner genle translokasyona katıldığına [t(4;14), t(11;14), t(14;16), t(14;20)] tespiti için mutlak ileri analiz gerekmektedir. Araştırılan literatürlerde t(11;14) anomali oranları; Chang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada %32, Fonseca ve arkadaşlarında %15,8, Gutierrez ve arkadaşlarında ise %13 olarak bildirilmiştir. t(4;14) anomali insidansı; Fonseca ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise %12,7, Gutierrez ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada %11, Dewald ve arkadaşlarının çalışmasında %6,5, olarak bildirilmiştir. t(14;16) anomali insidansı ise Fonseca ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada %0-4,7 oranında bulunmuştur. Dewald ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada olguların t(4;14), t(14;16) ve p53 delesyonunun kromozom 13 e ait anomaliler ile birlikte incelendiğinde daha kötü prognostik değeri olduğunu ve t(11;14) ün ise iyi prognostik değeri olduğunu bildirilmiştir (Dewald ve diğ. 2005).

Hematolojik malignensilerde gerek klasik sitogenetik gerekse moleküler sitogenetik çalışmaların önemi literatürlerde bildirilen bir gerçektir. Klasik sitogenetik çalışmaları sınırlı sayıda hücrenin analizine imkan verdiği gibi tüm genomun kromozom düzeyinde taranmasına olanak sağlamaktadır. Moleküler sitogenetik yöntem olan FISH te ise klasik sitogenetiğe göre çok daha fazla sayıda hücrede, istenilen bölgenin analizi mümkünken geniş çaplı bir panel uygulanmak istendiğinde maliyeti yüksek bir yöntemdir. Bu iki yöntem birlikte kullanıldığında hem birbirini doğrulayabilen hem de tamamlayabilen sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu iki sitogenetik yöntem, ayrı ayrı veya birlikte kullanıldığında elde edilen sonuçlar, hastalığın tanısı ve prognozu açısından yönlendirici niteliktedir. Bu bağlamda tanısal ve prognostik öneme sahip anomalilerin tespiti için konvansiyonel sitogenetik ve FISH yönteminin birlikte kullanımının en doğru yaklaşım olduğunu düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Araştırma grubunu oluşturan MM tanılı 100 olgunun kemik iliği örneklerine konvansiyonel sitogenetik ve FISH çalışmaları yapılmış, sonuçlar analiz edilmiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlar bize gösterdi ki; klasik sitogenetik ve FISH yöntemleri birbirlerini doğrulayıcı ve tamamlayıcı çalışmalar olup genetik karakterizasyonu belirlemede önemli bilgiler sağlamaktadır. MM'de tanıya ve tedaviye yönlendirici, doğru genomik bilgiyi elde etmenin en etkin yolunun klasik sitogenetik yöntem ve FISH yönteminin eş zamanlı kullanımını olduğu sonucuna vardık.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abroun S, Ishikawa H, Tsuyama N. ve diğ. Receptor synergy of interleukin-6(IL-6) and insulinlike growth factor-I that highly express IL-6 receptor α myeloma cells. *Blood*. 2004; 103(6): 2291-98.
- Atamer T. Multipl Miyeloma. *Türkiye Klinikleri Hematoloji Dergisi*. 2004; 2(1): 60-69.
- Atlas Genetic Oncology, 2016. Erişim: 03 Mart 2017, <http://atlasgeneticsoncology.org/>
- Attal M, Moreau P, Charbonnel C ve diğ. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: The experience of the Intergroupe Francophone du Myelome. *Blood*. 2007; 109: 3489-95.
- Augustson B, Begum G, Dunn J. ve diğ. Early mortality after diagnosis of multiple myeloma: Analysis of patients entered onto the United Kingdom Medical Research Council trials between 1980 and 2002. *Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. Journal of Clinical Oncology*. 2005; 23: 9219-26.
- Avet Loiseau H, Attal M, Moreau P. ve diğ. Genetic abnormalities and survival in multipl myeloma: The experience of the Intergroupe Francophone du Myeloma. *Blood*. 2007; 109: 3489-95.
- Avet Loiseau H, Daviet A, Brigaudeau C. ve diğ. Cytogenetic, interphase, and multicolor fluorescence in situ hybridization analyses in primary plasma cell leukemia: A study of 40 patients at diagnosis, on behalf of the Intergroupe Francophone du Myeloma and the Groupe Francais de Cytogenetique hematologique. *Blood*. 2001; 97: 822-25.
- Avet Loiseau H. Role of genetics in prognostication in myeloma. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2007; 20(4): 625-35.
- Başaran N. Tıbbi Genetik Ders Kitabı. Güneş ve Nobel Tıp Kitabevi, Ankara, 1999.
- Bataille R, Boccadoro M, Klein, B. ve diğ. C-reactive protein and beta-2 microglobulin produce a simple and powerful myeloma staging system. *Blood*. 1992; 80: 733-37.
- Bayani J, Squire J. Fluorescence in situ hybridization (FISH). *Curr Protoc Cell Biol*. 2004; 22(22.4): 1-51.
- Bergsagel D. The incidence and epidemiology of plasma cell neoplasms. *Stem Cells*. 1995; 13(2): 1-9.
- Bird J, Owen R. Guidelines for the diagnosis and management of multipl myeloma. *British Journal of Hematology*. 2011; 154: 32-75.
- Bourdon J. p53 Family isoforms. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2007; 8(6): 332
- Brenner H. Long-term survival rates of cancer patients achieved by the end of the 20th century: A period analysis. *Lancet*. 2002; 360: 1131.
- Bükülmez Ö. Multipl Myelom Hastalarında Hiperdiploidi ve Hipodiploidi Taraması İçin Hedef Kromozomların Belirlenmesi. Yüksek lisans tezi. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, 2011.
- Büyükoztürk K. İç Hastalıkları. Nobel Tıp Kitap Evi, 2007.
- Calderwood S. Tumor heterogeneity, clonal evolution, and therapy resistance: An opportunity for multitargeting therapy. *Discov Med*. 2013; 15(82): 188-94.
- Campagnaro E, Jacobus S, Uno H. Survival outcomes in elderly patients with plasma cell myeloma: the three-decade Eastern Cooperative Oncology Group experience. *J Clin Oncol*. (2011); 29: 8021.

Chang H, Li D, Zhuang L ve diğ. Detectian of chromosome 13q deletions and IgH translocations in patients with multiple myeloma by FISH: Comparison with karyotipe analysis. *Leukemia & Lymhoma*, 2004; 45(5): 965-69

Child J, Crawford S, Norfolk D. ve diğ. Evaluation of serum beta 2-microglobulin as a prognostic indicator in myelomatosis. *Br J Cancer*. 1983; 47(1): 111-14.

Chng W, Glebov O, Bergsagel P. ve diğ. Genetic events in the pathogenesis of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol*.2007; 20(4): 571-96.

Cook G, Sharp R, Tansey P. ve diğ. B phase trial I/II of Z/Dex (Oral idarubicin and dexamethasone) an oral equivalent in multipl myeloma. *Br Hematol*. 1996; 93: 931-34.

Çağırğan S. Hematopoetik Kök Hücre Mobilizasyonu. *Türkiye Klinikleri Journal of Internal Medical Sciences*. 2005; 19(1): 64-70.

Çifçi S. Multiple Myelomalı Hastalarda XPD, XRCC1 ve XRCC4 Gen Polimorfizmlerinin Klinik Parametrelerle İlişkisi ve Prognoz Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması. İç Hastalıkları Uzmanlık Tezi. Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2009.

Dewald, G, Therneau T, Larson D. ve diğ. Relationship of patient survival and chromosome anomalies detected in metaphase and/or interphase at diagnosis of myeloma, *Blood*. 2005; 106(10): 3553-58

Dimopoulos M, Hamilos G. Solitary bone plasmacytoma and extramedullary plasmacytoma. *Curr Treat Options Oncol*. 2002; 3: 255-59.

Dimopoulos M, Palumbo A, Delasalle K. ve diğ. Primary plasma cell leukemia. *Br J Haematol*. 1994; 88: 754-59.

Dispenzieri A, Lacy M, Greipp P. Multiple myeloma. *In Wintrobe's Clinical Hematology* 2009; 2372-438.

Dispenzieri A, Kyle R, Lacy M. ve diğ. POEMS syndrome: Definitions and long-term outcome. *Blood*. 2002; 101: 2496-506.

Dispenzieri A, Kyle R. Multiple myeloma: Clinical features and indications for therapy. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2005; 18(4): 553-68.

Dowd A, Homeida S, Elkarem H. Detection of chromosome 13 (13q14) deletion among Sudanese patients with multiple myeloma using a molecular genetics fluorescent in situ hybridization technique (FISH). *Malays J Pathol*. 2015; 37(2): 95-100.

Drach J, Sagaster V, Ackermann J ve diğ. Prognostic factors for multiple myeloma. *Hematology (EHA Educ Program)*,2006; 2: 196-200.

Durak B, Gülbaş Z. Multiple Myelom Genetiği. *Türkiye Klinikleri J Hem Onc-Special Topics*. 2008; 1: 9-13.

Durie B, Salmon S. A clinical staging system for multiple myeloma: Corelation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* 1975; 36: 842-54.

Fassas A, Spencer T, Sawyer J. ve diğ. Both hypodiploidy and deletion of chromosome 13 independently confer poor prognosis in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2002; 118: 1041-47.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M. ve diğ. GLOBOCAN Cancer Incidence and Mortality Worldwide. 2013, Erişim:16.01.2017, <http://globocan.iarc.fr>

- Fonseca R, Blood E, Oken M. ve diğ. Myeloma and the t(11;14)(q13;q32): Evidence for a biologically defined unique subset of patients. *Blood*. 2002; 99: 3735-41.
- Fonseca R, Drach J, Morgan G. ve diğ. Myeloma molecular pathways and cytogenetics. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2009; 9(2): 6-11.
- Fonseca R, San Miguel J. Prognostic Factors and Staging in Multiple Myeloma. *Hematol Oncol Clin N Am*. 2007; 21: 1115-40.
- Freed Pastor W, Prives C. Mutant p53: One name, many proteins. *Genes & development*. 2012; 26: 1268-86.
- Garcia Sanz R, Orfao A, Gonzalez M. ve diğ. Primary plasma cell leukemia: Clinical, immunophenotypic, DNA ploidy, and cytogenetic characteristics. *Blood*. 1999; 93: 1032-1037.
- Gmidène A, Avet Loiseau H, Sennana H. ve diğ. Molecular cytogenetic aberrations in Tunisian patients with multiple myeloma identified by cIg-FISH in fixed bone marrow cells. *Cytogenet Genome Res*. 2012; 136(1): 44-49.
- Greipp P, San Miguel J, Durie B. ve diğ. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2005; 23(15): 3412-20.
- Greslikova H, Zaoralova R, Filkova H. ve diğ. Negative prognostic significance of two or more cytogenetic abnormalities in multiple myeloma patients treated with autologous stem cell transplantation. *Neoplazma*. 2010; 57(2): 111-17.
- Gutierrez N, Garcia J, Hernandez J. ve diğ. Prognostic and biologic significance of chromosomal imbalances assessed by comparative genomic hybridization in multiple myeloma. *Blood*. 2004; 104(9): 2661-65
- Hayashi T, Hideshima T, Anderson K. Novel therapies for multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2003; 120: 10-17.
- Higgins M, Fonseca R. Genetics of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2005; 18: 525-36.
- Hodgson S, Maher E. A practical guide to human cancer genetics. Cambridge University Press, Cambridge, 1993.
- Horowitz JM, Park SH, Bogenmann E. Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci*. 1990; 87: 2775-79.
- Jain KK. Current status of fluorescence in-situ hybridization. *Med Device Technol*. 2004; 15: 14-17.
- Jian Y, Chen X, Zhou H. ve diğ. Prognostic impact of cytogenetic abnormalities in multiple myeloma: A retrospective analysis of 229 patients. *Medicine*. 2016; 5(19):e3521. (doi:10.1097/MD.0000000000003521).
- Kalf A, Spencer A. The t(4;14) translocation and FGFR3 overexpression in multiple myeloma: Prognostic implications and current clinical strategies. *Blood Cancer J*. 2012; 9(2): e:89, doi: 10.1038/bcj.2012.37
- Keklikoğlu M, Tuzcu M. The merc manual (16.Baskı). Nobel Kitap, İstanbul, 1995.
- Königsberg R, Zojer N, Ackemann J ve diğ. Predictive role of interphase cytogenetics for survival of patients with multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology*. 2000; 18(4): 804-12.
- Kyle R, Durie B, Rajkumar S. ve diğ. International myeloma working group. monoclonal gammopathy of undetermined significance (mgus) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives, risk factors for progression, and guidelines for monitoring and management. *Leukemia*. 2010; 24: 1121-27.

- Kyle R, Gertz M, Witzig T. ve diğ. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc.* 2003; 78(1): 21-33.
- Kyle R, Rajkumar S. Multipl myeloma. *N Engl J Med.* 2004; 351: 1860-73.
- Kyle R. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and solitary plasmacytoma: Implications for progression to over multipl myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1997; 11: 71-87.
- Kyle R. Multipl myeloma and other plasma cell disorders. *Oncologist.* 1996; 1: 315-23.
- Latreille J, Barlogie B, Jonston D. ve diğ. Ploidy and proliferative characteristics in monoclonal gammopathies. *Blood.* 1982; 59: 43-51.
- Lee C, Cho Y. Interactions of SV40 large T antigen and other viral proteins with retinoblastoma tumour suppressor. *Rev Med Virol.* 2002; 12: 81-92.
- Levitt L, Lin R. Biology and treatment of adult acute lymphoblastic leukemia. *West J Med.* 1996; 164: 143-55.
- Liebisch P, Döhner H. Cytogenetics and molekuler cytogenetics in multiple myeloma. *Europen Journal of Cancer.* 2006; 42: 1520-29.
- Lohmann D. RB1 gene mutations in retinoblastoma. *Hum Mutat.* 1999; 14: 283- 88.
- Loiseau H, Attal M, Moreau P. ve diğ. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma. *Blood.* 2007; 8: :3489-95
- Lowe S, Lin A. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis.* 2000; 21(3): 485-95
- Maltzman W, Czyzyk L. UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Molecular and Cellular Biology.* 1984; 4(9): 1689-94.
- Marilyn L, Daniel P. Clinical cytogenetics and molecular cytogenetics. *J Zhejiang Univ SCIENCE B* 2006; 7: 162-63.
- McNeil N, Ried T. Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: Technology and applications in molecular medicine. *Expert Rev Mol Med.* 2000; 2000: 1-14.
- Miranda R, Mark H, Medeiros L. Fluorescent in situ hybridization in routinely processed bone marrow aspirate clot and core biopsy sections. *Am J Pathol.* 1994; 154: 1309-14.
- Moorhead P, Nowell P, Mellman W. ve diğ. Chromosome preparations of leukocytes cultured from peripheral blood. *Exp Cell Res.* 1960; 20: 613-16.
- Mozdarani H, Meybodi AM, Karimi H. Impact of pericentrix inversion of Chromosome 9 [inv (9)(p11q12)] on infertility. *Indian J Hum Genet.* 2007; 13(1): 26-29.
- Nussbaum R, Mcinnes R, Willard H. Thompson & Thompson. Güneş Kitabevi, Ankara, 2005.
- Nylander K, Dabelsteen E, Hall P. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Journal of oral pathology & medicine.* 2000; 29(9): 413-25.
- Özdilek A. Multipl miyelom hastalarında DEK proteinin analizi. Yüksek lisans tezi. Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, 2013.

- Özlemkaş F, Nedir Bu Hematopoetik Kök Hücre. s.77-83. XXX. Ulusal Hematoloji Kongresi, Bursa, 2008.
- Özsan G. Multiple myelom biyolojisi. *Türkiye Klinikleri J Hem OncSpecial Topics*. 2008; 1: 5-8.
- Pala F. Hematolojik kanserlerde FISH uygulamaları. *Trakya Üniv Tıp Fakültesi Dergisi*. 2005; 22: 132-36.
- Rajan A, Rajkumar S. Interpretation of cytogenetic results in multiple myeloma for clinical practice. *Blood Cancer Journal*. 2015; 5: e365, doi:10.1038/bcj.2015.92
- Rajkumar S, Greipp P. Prognostic factors in multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1999; 13(6): 1295-14.
- Riccardi A, Gobbi P, Ucci G. ve diğ. Changing clinical presentation of multiple myeloma. *Eur J Cancer*. 1991; 27(11): 1401-05.
- Riedel D, Pottern L. The epidemiology of multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1992; 6: 225-47.
- Sandberg A. Cancer cytogenetics for clinicians. *CA Cancer J Clin* 1994; 44: 136-59.
- Shaffer L, Slovak M, Campell L. (Ed) ISCN(2009): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Karger, Basel, 2009.
- Shaffer L, McGowan-Jordan J, Schmid M. (Ed) ISCN(2013): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Karger, Basel, 2013.
- Shuhua L, Hyeon-Ho L, Jin-Yeong H. A retrospective analysis of cytogenetic alterations in patients with newly diagnosed multiple myeloma: A single center study in Korea. *Blood*. 2016; 51(2): 122-26.
- Shuhua L, Heng L, Zengjun L. ve diğ. The prognostic significance of 13q deletions of different sizes in patients with B-cell chronic lymphoproliferative disorders: A retrospective study. *Int J Hematol*. 2017; doi:10.1007/s12185-017-2240-2
- Sreekantaiah C. FISH panels for hematologic malignancies. *Cytogenet Genome Res*. 2007; 118: 284-96.
- Stewart A, Fonseca R. Prognostic and therapeutic significance of myeloma genetics and gene expression profiling. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 6339-44.
- Sukjoong O, Dong Hoe K, Min Jung K. ve diğ. Chromosome 13 deletion and hypodiploidy on conventional cytogenetics are robust prognostic factors in Korean multiple myeloma patients. *Ann Hematol*. 2014; 93(8): 1353-61.
- Teixeira M. Combined classical and molecular cytogenetic analysis of cancer. *Eur J Cancer*. 2002; 38: 1580-84.
- Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria. *Genes Cells*. 1998; 3(11): 697-707.
- Turgut M. Multiple myelomda prognostik faktörler. 35. Ulusal Hematoloji Kongresi, Antalya, 2009.
- Ventura R, Martin-Subero J, Jones M. ve diğ. FISH analysis for the detection of lymphoma associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2006; 8(2): 141-51.
- Veronese M, Ohta M, Finan J ve diğ. Detection of myc translocations in lymphoma cells by fluorescence in situ hybridization with yeast artificial chromosomes. *Blood*. 1995; 85: 2132-38.

Wang Y, Wang H, Xi L. ve diğ. Detection of molecular cytogenetic aberrations by fluorescence in situ hybridization in different bone marrow samples of multiple myeloma. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2015; 23(5): 1352-56.

Weng A, Millholland J, Wai C ve diğ. cMyc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev*. 2006; 20: 2096-109.

Wieser R, Schreiner U, Rieder H. Interphase fluorescence in situ hybridization assay for the detection of rearrangements of the EVI-1 locus in chromosome band 3q26 in myeloid malignancies. *Haematologica*. 2003; 88(1): 25-30.

Yang R, Li C, Chen L. ve diğ. Investigation of the molecular changes in patients with multiple myeloma by fluorescence in situ hybridization. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2010; 27(5): 567-70.

Zeng X, Lee H, Zhang Q. p300 does not require its acetylase activity to stimulate p73 function. *J Biol Chem*. 2001; 276: 48-52.

Zenz T, Eichhorst B, Busch R ve diğ. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Journal of clinical oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010; 28: 4473-79.

Zhang X, Bataille R, Widjenes J. Interleukin-6 dependence of advanced malignant plasma cell dyscrasias. *Cancer*. 1992; 69: 1373-76.

Zytovision, Molecular Diagnostics Simplified, 2017. Erişim: 01.05.2017, <https://www.zytovision.com/>

ÖZGEÇMİŞ

1. BİREYSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Gülhan DEMİR

Doğum Yeri ve Tarihi: 16.10.1993-Altındağ

Uyruğu: TC

Medeni Durumu: Bekar

İletişim Adresi ve Telefonu: Kaboğlu Mah., Nikomedya Deniz Sitesi, A7-1,

Tüysüzler/İzmit/Kocaeli

Tel: 0531 275 50 78

2. EĞİTİM DURUMU

2011-2015: Kocaeli Üniversitesi Biyoloji Bölümü

2007-2011: Özel Atafen Lisesi

STAJLAR

2015: Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

2013: Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Kök Hücre Anabilim Dalı

2013: Kocaeli Üniversitesi Biyoloji Bölümü Hayvan Fizyolojisi Laboratuvarı

YABANCI DİL

İngilizce

3. ÜNVANLARI

2015- : Biyolog

4. MESLEKİ DENEYİMİ

-Periferik lenfosit hücre kültürü

-Kemik iliği kültürü

-Amniyon sıvısı kültürü

-Kordon kanı kültürü

-Koryon villus sitolojisi kültürü

-Postnatal ve prenatal kromozom analizi

-FISH (Floresan in situ hibridizasyon) (Doku ve periferik kan)

-FISH analizi

5. BİLİMSEL ETKİNLİKLER

- Ulusal Kongrelerde Kabul Edilen Poster Bildirileri

Seda Eren Keskin, Buket Doğruoğlu, Zeynep İlkay, Nimet Seymen, Seda Reka, **Gülhan Demir**, Deniz Sünnetçi Akkoyunlu, Naci Çine, Hakan Savlı, Abdullah Hacıhanefioğlu, Elif Birtaş Ateşoğlu, Esra Terzi Demirsoy, Ayfer Gedük, Özgür Mehtap, Pınar Tarkun. *MDS olgularında konvansiyonel sitogenetik ve FISH yöntemlerinin birlikte kullanımının prognostic önemi*. 42. Ulusal Hematoloji Kongresi,2016-Antalya

Seda Eren Keskin, Hakan Savlı, Naci Çine, Buket Doğruoğlu, Zeynep İlkay, **Gülhan Demir**, Seda Reka, Nimet Seymen, Deniz Sünnetçi Akkoyunlu, Elif Birtaş Ateşoğlu, Esra Terzi Demirsoy, Ayfer Gedük, Pınar Tarkun, Özgür Mehtap, Abdullah Hacıhanefioğlu. *Multipl myelom olgularında p53 delesyonunun FISH yöntemi ile tespitinin prognostik değeri*. 42. Ulusal Hematoloji kongresi,2016-Antalya