

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**MULTİPL MYELOMA'DA KROMOZOMAL DÜZENSİZLİKLERİN
SİTOGENETİK VE FISH YÖNTEMLERİYLE BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bahattin ARTAN

TRABZON-2009

T. C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

MULTİPL MYELOMA'DA KROMOZOMAL DÜZENSİZLİKLERİN
SİTOGENETİK VE FISH YÖNTEMLERİYLE BELİRLENMESİ

Bahattin ARTAN

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 01.06.2009

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 17.06.2009

Tezin Danışmanı : Doç. Dr. Figen CELEP

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ahmet KARAGÜZEL

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Figen CELEP

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Mehmet SÖNMEZ

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Orhan DEĞER

Haziran 2009

TRABZON

ÖNSÖZ

Multipl Myeloma'da Kromozomal Düzensizliklerin Sitogenetik ve FISH Yöntemleriyle Belirlenmesi adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır.

Yüksek Lisans tez danışmanlığını üstlenerek gerek konu seçimi gerekse çalışmanın yürütülmesi, değerlendirilmesi sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Figen Celep'e, Myelom hasta teminini sağlayan Hematoloji Bilim Dalı Öğretim üyeleri Doç. Dr. Mehmet Sönmez, Yrd. Doç. Dr. Mustafa Yılmaz ve Arş. Görevlileri Nergiz Erkut, Kürşat Korkmaz Çetin'e, Patoloji Ana Bilim Dalı Öğretim üyesi Ümit Çobanoğlu'na, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ahmet Karagüzel'e, bölüm öğretim üyeleri Doç. Dr. Fahri Uçar'a, Doç. Dr. Ersan Kalay'a, uzman Tülay Köseahmet, Okutman Fatmagül Yenisey'e yüksek lisans ve doktora ki arkadaşlarıma desteklerinden dolayı teşekkür ederim. Herzaman için beni destekleyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmanın yürütülmesine maddi destek sağlayan KTÜ Araştırma Fonuna teşekkür ederim (proje kod no 2008.114.0014).

Bahattin ARTAN

Trabzon 2009

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLolar LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. PLAZMA HÜCRE DİSKRAZİLERİ	2
2. 1. 1. MULTİPL MYELOM	3
2. 1. 1. 1. Normal B Hücre Gelişimi	4
2. 1. 1. 2. Malign Plazma Hücre Gelişimi	5
2. 1. 1. 3. Etiyoloji	7
2. 1. 1. 4. Klinik Bulgular	8
2. 1. 1. 5. Laboratuvar Bulguları	9
2. 1. 1. 6. Tanı	10
2. 1. 1. 7. Evreleme	11
2. 1. 1. 8. Tedavi	13
2. 1. 1. 9. Prognostik faktörler	13
2. 1. 1. 10. Myelomun Varyant Formları	14
2. 2. HEMATOLOJİK MALİGNANSİLERDE SİTOGENETİK VE MOLEKÜLER SİTOGENETİK	15
2. 2. 1. Hematolojik Malignansilerde Sitogenetik	15
2. 2. 2. Hematolojik Malignansilerde Moleküler Sitogenetik	16

2. 2. 3. Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH)	16
2. 2. 3. 1. FISH Tekniğinde Kullanılan Problar ve Özellikleri	19
2. 3. MULTİPL MYELOMDA SİTOGENETİK ANALİZLER	19
2. 3. 1. Kromozom 13 anomalileri (-13/13q delesyonu)	21
2. 3. 2. IGH (immünglobulin ağır zincir) Bölgesi Anomalileri	21
2. 3. 3. TP53 (17p13)	22
2. 3. 4. Ras Mutasyonu	22
2. 3. 5. Sayısal Anomaliler	23
2. 3. 6. Diğer Anomaliler	23
3. MATERYAL METOD	25
3. 1. Materyal	25
3. 1. 1. Çalışma Grubu	25
3. 1. 2. Kimyasallar:	25
3. 1. 3. Gereçler	26
3. 1. 4. Problar	27
3. 1. 5. Solüsyonlar	27
3. 1. 6. Kullanılan Lamların Temizlenmesi	28
3. 2. Metod	28
3. 2. 1. Kromozomların Elde Edilmesi	28
3. 2. 1. 2. Kemik iliğinden Kromozom Eldesi	28
3. 2. 1. 3. Preparatların boyanması (GTG bantlama)	29
3. 3. Parafinli Dokulardan Tek Hücre Süspansiyonunun Hazırlanması	29
3. 4. FISH Prosedürü	30
3. 4. 1. Hasta grubunun seçilmesi	30
3. 4. 2. Kullanılacak problemlerin seçilmesi	31
3. 4. 3. FISH Solüsyonlarının Hazırlanması	31
3. 4. 4. İşaretli problemlerle FISH Prosedürü	31
4. BULGULAR	34
4. 1. Multipl Myelom Tanısı Alan Olgularda Sitogenetik Analiz Sonuçları	36
4. 1. 1. Yapısal anomaliler	36
4. 1. 2. Sayısal anomaliler	36
4. 2. MM tanısı alan hastalardaki FISH analiz sonuçları	37
5. TARTIŞMA	46

6. SONUÇ VE ÖNERİLER	52
7. ÖZET	54
8. İNGİLİZCE ÖZET	55
9. KAYNAKLAR	56
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR

MM	:	Multipl myeloma
FISH	:	Fluoresan <i>in situ</i> Hibridizasyon
FGFR3	:	Fibroblast Growth Factor Reseptör-3
IL-6	:	İnterlökin-6
VEGF	:	Vasküler Edotelial Büyüme Faktörü
IFN-α-β	:	İnterferon alfa-beta
TNF-α-β	:	Tümör Nekroz Faktör-alfa-beta
HGF	:	Hepatocyte Growth Factor
MIP-1α	:	Makrofaj İnflamatory Protein-1 α
Ig	:	İmmünglobulin
CRP	:	C-reaktif protein
LDH	:	Laktat Dehidrogenaz
IPI	:	İnternasyonel Prognostik İndeks
TGF	:	Transforming Growth Factor
IGF	:	İnsulin-like Growth factor
HD, NHD	:	Hiper diploid ve non hiperdiploid
WBC	:	White blood cell, Beyaz kan hücresi
WCP	:	Whole chromosome painting, Tüm kromozom boyama
MGUS	:	(Önemi belirlenemeyen monoklonal gammopati=Monoclonal gammopathies of undetermined significance).

TABLULAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo-1: Multipl myeloma etiyolojisinde rol alan faktörler	7
Tablo-2. Multipl myelomlu hastalarda semptom ve bulguların sıklığı	8
Tablo-3. Majör ve minör tanı kriterleri	11
Tablo-4. Durie- Salmon Evreleme Sistemi	12
Tablo-5. MM için önerilen İnternasyonal Prognostik İndeks (IPI)	12
Tablo-6. Multipl myeloma'da rol alan proto-onkogen ve tümör süpressör genler	24
Tablo-7 Hastaların özellikleri	35
Tablo-8. Hastalara ait biyokimyasal parametreler	35
Tablo-9 Sitogenetik analiz sonuçları	37
Tablo-10 Multipl myelom olgularının FISH analiz sonuçları	38

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Plazma hücresi gelişimi	4
Şekil 2. Malign plazma hücrelerinin oluşumu	5
Şekil 3. Myeloma hücrelerinin gelişme ve yaşaması	6
Şekil-4. Multipl Myelom'da majör klinik ve laboratuvar özellikleri	9
Şekil-5 A: Serum proteinlerinin elektroforez görünümü	10
B: Multiple myelomada monoklonal (M protein) görünümü	10
Şekil-6. FISH tekniğinde uygulanan basamaklar	18
Şekil-7. Plazma hücreli neoplasiada iki geçiş yolu	20
Şekil-8 Araştırma grubu olgularımızdan 15 nolu olguya ait karyotip (normal) analiz görüntüsü.	39
Şekil-9 Araştırma grubu olgularımızdan 18 nolu olguya ait karyotip (normal) analiz görüntüsü	39
Şekil-10 Araştırma grubu hastalarımızdan 10 nolu hastaya ait karyotip analiz görüntüsü (Bu hastada %26'sında 46,XY gözlenirken, % 10'inde t(13;13) saptanmıştır.	40
Şekil-11 Araştırma grubu olgularımızdan 15 nolu olguya karyotip	

(monozomi 7) analiz görüntüsü.	40
Şekil-12 Araştırma grubu olgularımızdan 17 nolu olgunun metafaz (monozomi 13) görüntüsü.	41
Şekil-13 Araştırma grubu olgularımızdan 17 nolu olgunun karyotip (monozomi 13) görüntüsü.	41
Şekil-14 Araştırma grubu olgularımızdan 15 nolu olgunun karyotip (monozomi 18) görüntüsü.	42
Şekil-15 Araştırma grubu olgularımızdan 17 nolu olgunun karyotip (monozomi 21 ve -Y) görüntüsü.	42
Şekil-16 Araştırma grubu olgularımızdan 20 nolu olgunun karyotip (monozomi Y) görüntüsü.	43
Şekil-17 Araştırma grubu olgularımızdan 15 nolu olgunun karyotip (trizomi 3) görüntüsü.	43
Şekil 18. FISH analizinde; a). 15 nolu hastaya ait interfaz hücresinde 9 nolu kromozoma ait tek sinyal (monozomi), b) 17 nolu hastaya ait bir interfaz hücresinde 11 nolu kromozoma ait iki sinyal, c) 15 nolu hastaya ait metafaz plağında 21 nolu kromozoma ait tek sinyal (monozomi),	44
Şekil 19. 15 nolu hastaya ait metafaz plağında 13q14.3 lokus spesifik prob ile normal sinyaller elde edilmiştir.	45

1. GİRİŞ VE AMAÇ

MM kemik iliğinde monoklonal ağır ve/veya hafif zincir immunoglobülin (M-protein) protein üreten plazma hücrelerinin klonal olarak çoğalmasıyla karakterize bir hematolojik malignansidir.. Tümör hücreleri profilerasyonu ve apoptozise karşı direnç gelişimi sonucu hastalık oluşmakta osteolitik kemik lezyonları, böbrek fonksiyon bozukluğu, serum veya idrarda monoklonal protein ve anemi gibi klinik-laboratuvar bozuklukları ile ortaya çıkmaktadır. MM tüm malign hastalıkların % 1'ini, tüm hematolojik malignansilerin % 10'unu oluşturur. MM esas olarak ileri yaş hastalığıdır. En sık görüldüğü yaş grubu 65-70'dir (1-6).

Bu noktada hastalığın etiopatolojisinde önemli faktör olan genetik anomalliklerin değerlendirilmesi en önemli ihtiyaçlardan biri olmuştur. Konvansiyonel sitogenetik analizler kullanılarak MM'li hastaların % 20-60'ında karyotipik anomaliler tespit edilmiştir. MM'de kemik iliği biyopsilerinde plazma hücrelerinin yüzdesinin düşük olması, düşük mitotik indeks gibi teknik problemler nedeniyle konvansiyonel sitogenetik yöntem bazı sınırlamalara sahiptir. FISH analizi tümöre özgü karyotipik anomalilerin saptanmasında sitogenetik yöntemlere göre çok daha hızlı, hassas ve bazı durumlarda daha güvenilir bir tanı tekniğidir. FISH analizi interfaz nükleusunda da çalışabilme imkanı tanınması açısından kanser genetiğinde kullanılan en önemli tekniklerden biri olmuştur (7).

Bu çalışmada amacımız; hematolojik malignansi gruplarından biri olan özellikle yeni teşhis konulan MM'li Doğu Karadeniz hasta popülasyonunda prognostik öneme sahip olan kromozom anormalliklerini hem konvansiyonel sitogenetik hem de moleküler sitogenetik yöntem olan FISH ile belirlemektir. Çalışmamızın en önemli katkısının klinik uygulamalar kısmında hastaya en uygun tedavi şeklinin seçilmesinde ve yüksek doz kemoterapiyi takiben yaşam kalitesi ve sağ kalım süresinin etkilenmesinde yararlı olacağını düşünmekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. PLAZMA HÜCRE DİSKRAZİLERİ (PHD)

İmmünglobulin salgılayan hücrelerin anormal çoğalması, kan veya idrarda monoklonal gammopatinin bulunması ile karakterize bir grup hastalığa “plazma hücre diskrazisi” denir. Kanda artış gösteren bu immünglobuline M protein denir. İmmünglobulinlerdeki aşırı artış nedeniyle bu hastalık grubu için monoklonal gammopati, disproteinemi veya paraproteinemi terimleri de kullanılır. En çok orta ve ileri yaş grubunda ortaya çıkar. Bu hastalıkların başlıcaları şunlardır (1, 2, 3).

I. Malign Monoklonal Gammopatiler

A. Multipl Myelom (IgG, IgA, IgD, IgE ve hafif izncir) ve tipleri

Smoldering (sessiz) multiple myelom

Plazma hücre lösemisi

Nonsekretuar myelom

Osteosklerotik myelom (POEMS sendromu)

Soliter kemik plazmositoması

Ekstramedüller plazmositom

Myelom, neoplastik plazma hücreleri tarafından üretilen monoklonal immünglobulin, kappa veya lambda hafif zincir üretimiyle karakterizedir. İmmünglobülinlerin normal serum konsantrasyonu, myelomun çeşitli immünglobulin tiplerinin frekansı ile paraleldir. En yaygın myelom tipleri IgG ve IgA'dır. IgG tüm myelomlu vakaların % 60 ile % 70 ini, IgA ise vakaların %20 sini oluşturur. Az sayıda vakada ise IgD ve IgE myelom rapor edilmiştir. Myelom hastalığında kanda M proteini yüksek seviyede olmasına rağmen, MM'li hastaların yaklaşık %15-20'sinde immünglobülinler tam üretilemez ve yalnızca immünglobulinin hafif

zincir bölümünü oluşturur. Bu hastalara Bence Jones myelom denir. Bu hastaların idrarında M protein bulunur. Bence-Jones proteini (idrarda artmış hafif zincir) oluşumu ile böbrek tubüllerinde hasar oluşmakta ve bu durum böbrekte fonksiyon bozukluğuna sebep olmaktadır. Bence-Jones proteinler rutin idrar analizi ile belirlenemez. İmmünoelektroforez adlı test ile idrarda Bence Jones proteininin tam miktarı belirlenebilmektedir (4).

B. Waldenström Makroglobulinemisi

II. Anlamı Bilinmeyen Monoklonal Gammopati (MGUS)

III. Ağır Zincir Hastalıkları (α , γ , μ)

IV. Primer Amiloidoz

2. 1. 1. MULTİPL MYELOM (MM)

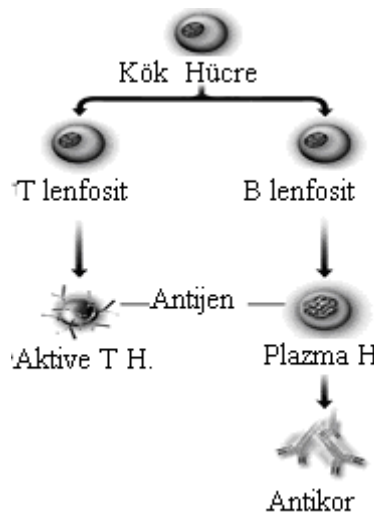
Multipl Myelom (plazma hücreli myelom, myelomatozis veya Kahler hastalığı) kemik iliğinde monoklonal immünglobulin (M protein) yapan plazma hücrelerinin kontrolsüz olarak klonal artışı ile karakterize kronik, progresif ve fütal bir hastalıktır. MM aşırı monoklonal immunoglobulin (IgG, IgA, IgD, IgE) veya Bence-Jones protein (serbest monoklonal κ veya λ hafif zinciri) yapımıyla kendini belli eden ve sıklıkla hiperkalsemi, anemi, böbrek hasarı, bakteriyal enfeksiyonlara karşı duyarlılığın artması ve yaygın olarak pelvis, omurga, kaburgalar ve kafatasında yaygın osteoporozla karakterizedir (4-6).

MM malign hastalıkların yaklaşık %1'ini, hematolojik malignansilerin %10'unu ve tüm kanser ölümlerinin %2'sini oluşturur. Son yıllarda kemik iliği incelemesi ve protein elektroforezi gibi yardımcı tekniklerin kullanılmasıyla görülme sıklığının arttığı bildirilmektedir (7). MM'un yıllık insidansı, beyaz ırkta yaklaşık 100.000'de 4'tür. MM erkeklerde kadınlardan daha sık görülür esas olarak ileri yaş hastalığıdır. En sık görüldüğü yaş grubu 65-70'dir. Hastaların sadece %3'ü 40 yaşın altındadır. Ancak son yıllarda yaş ortalaması 50-55'e doğru kayma eğilimindedir (8).

Hastalık ilk kez 19. yüzyılın ortalarında tanımlanmıştır. İlk myelom hastası 1844 yılında Solly tarafından bildirilmiştir. Henry Bence Jones hastaların idrarında anormal bir protein tanımlamıştır. Von Rustizky 1873 yılında multipl kemik tümörü olan bir hastada multipl myelom terimini ilk kez kullanmıştır. Plazma hücresi terimi ilk kez 1875 yılında Wladeyer tarafından kullanılmıştır. Dr. Otto Kahler tarafından 1889'da kemik ağrısı, anemi ve proteinürisi olan 46 yaşında bir hasta rapor edilmiştir (9, 10).

2. 1. 1. 1. Normal B Hücre Gelişimi

Kan hücrelerinin tümü kemik iliğinde bulunan hematopoietik kök hücreden yapılır. Plazma hücreleri de kök hücreden yapılan B lenfositlerinin birçok evrelerden geçerek farklılaşmasıyla oluşmaktadır (Şekil 1). B lenfositler; olgunlaştıkları organlarda, periferik kanda, lenf düğümü foliküllerinin germinal merkezlerinde ve dalakta bulunur. Periferik kan lenfositlerinin %15-20'si B lenfositleridir (11). Plazma hücrelerinin temel görevi antikor üretmek yabancı ajanlara karşı vücut savunmasını güçlendirmektir. İnsan vücudu doğumdan itibaren sürekli farklı antijenlerle karşılaşmaktadır. Bu antijenlerle karşılaşan B lenfositler antijenlere karşı uygun tipte ve gerekli miktarda antikor üretecek olan plazma hücrelerine dönüşürler. Her yeni zararlı antijene karşı uygun antikor üretecek yeni plazma hücrelerinin yapımı kontrollü şekilde devam eder (12-14).



Şekil 1. Plazma hücresi gelişimi (4).

(http://www.multiplemyeloma.org/about_myeloma sitesinden uyarlanarak alınmıştır.)

Antikorlar immünglobulin (Ig) yapısındadır. İmmünglobulinler 2 uzun (ağır zincir) ve 2 kısa zincirden (hafif zincir) oluşmaktadır. İmmünglobulinlerin 5 majör sınıfı vardır. Her bir sınıf ağır zincirin tek tipine sahiptir. Bunlar; Gamma (IgG), alfa (IgA), mü (IgM), epsilon (IgE) ve delta (IgD) (15, 16, 17).

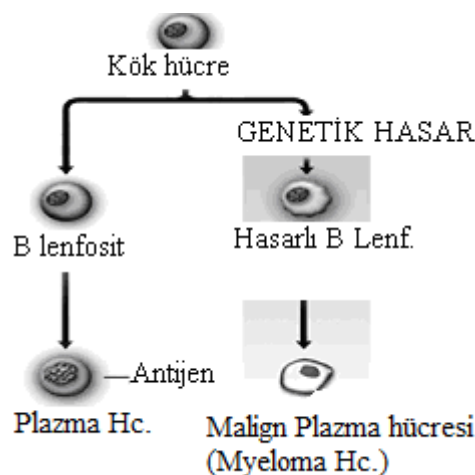
İmmünglobulin ağır (H) ve hafif (L) zincirlerin sentezi ayrı genler tarafından yönetilmektedir. İnsan antikor genleri üç gruptur; Bunlar kappa (κ) ve lamda (λ) olmak üzere iki hafif zincir (L) ve bir ağır zincir (H) gen bölgeleridir. Kappa hafif zincir geni 2 nolu, Lambda hafif zincir geni 22 nolu ve ağır zincir geni 14 nolu kromozom üzerinde yer almaktadır. İmmünglobulinleri ve T hücre reseptörlerini kodlayan tüm gen tipleri için yaklaşık 10^{18} olası kombinasyonlu farklı mekanizmalar bulunmaktadır. Sonuç olarak yüksek

oranda değişken bölgelerde düzenli olarak oluşan DNA dizi değişiklikleri (somatik mutasyonlar) olası kombinasyonların total sayısının daha fazla artmasına neden olur (14,18).

İmmünglobulin genlerini oluşturacak DNA düzenlenmesi B hücre gelişiminin çok erken dönemlerinde görülmektedir. Ağır zincir genlerin düzenlenmesi ilk erken pro-B evresinde D_H , J_H gen segmentlerinin bir araya gelmesiyle başlamaktadır. Geç pro-B hücrelerinde bir V_H segmeti DJ_H segmentine katılarak V_H-DJ_H şeklinde düzenlenmekte ve pre-B evresi oluşmaktadır. Pre-B hücrelerinde, V-DJ bağlanmasıyla membranda düşük, sitoplazmada yüksek oranda tam μ (mü) ağır zinciri oluşmaktadır. Ağır zincir oluştuktan sonra ağır zincir gen düzenlenmesi durmakta, hafif zincir V-J gen düzenlenmesi başlamaktadır. Hafif zincir genleri düzenlenmesi ile immatür B hücrelerine dönüşüm için hücre yüzeyinde ağır-hafif zincirli Ig molekülleri tamamlanmakta ve hücreler yüzey IgM reseptörlü immatür B hücre şeklini alarak farklılaşma sonlanmaktadır. Bazen RNA'nın işlemden geçmesi sırasında aradaki intron uzaklaştırılırken C_μ de uzaklaştırılır ve VDJ kompleksi $C\delta$ 'ya yaklaşır sonuçta IgD ekspresyonu olur (16, 19).

2. 1. 1. 2. Malign Plazma Hücre Gelişimi

MM gelişiminde birçok sistem bozukluğunun rol aldığı düşünülmektedir. Sinyal ileti sistemi, kemik iliği mikroçevresi ve hücre siklusu bunlar arasındadır. Genetik hasar/hasarlar sonucu malign plazma hücreleri oluşur ve kontrolsüzce çoğalırlar (Şekil 2). Bu hücreler kana karışır, kemik iliğinde birikir ve sağlıklı dokuya hasar vermeye başlar (4, 17, 20, 21).

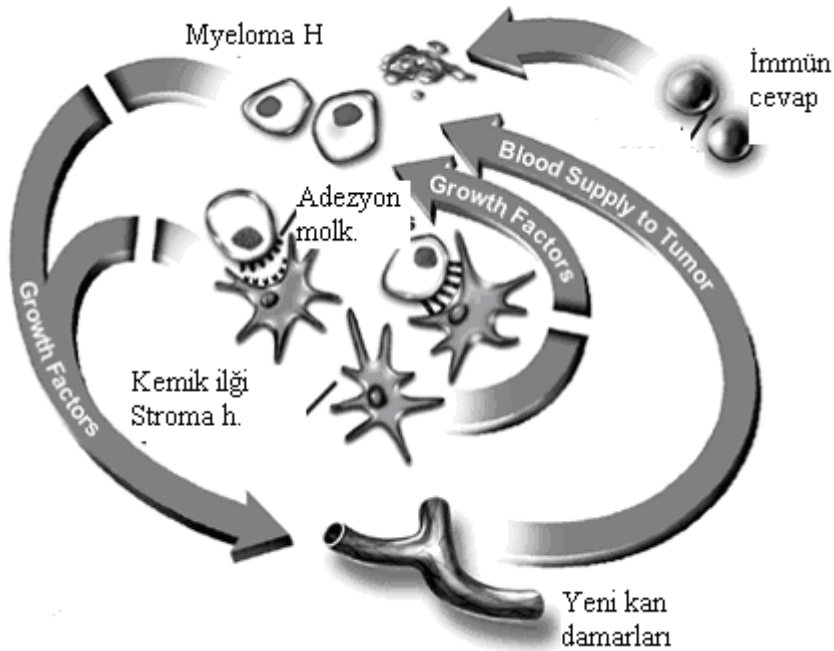


Şekil 2. Malign plazma hücrelerinin oluşumu (4).

(http://www.multiplemyeloma.org/about_myeloma sitesinden uyarlanarak alınmıştır.)

Multiple Myelom patogenezinde kemik iliği mikroçevresinin çok önemli rolü vardır. Multipl myelom hücrelerinin stroma hücrelerine bağlanması sitokinlerin transkripsiyonunu ve salgılanmasını başlatır. Kemik iliği mikroçevresi ekstrasellüler matriks proteinleri ve kemik iliği stroma hücrelerinden, osteoblast ve osteoklastlardan oluşmaktadır ve hücrelerin büyümesi ve sağ kalımı üzerine etkileri vardır. Malign transformasyona uğramış bu hücrelerin esas büyüme faktörü interlökin-6 (IL-6)'dır. İnterlökin-6 (IL-6), insüline benzer büyüme faktörü 1, tümör nekroz faktörü (TNF), vasküler endotelial büyüme faktörü, stroma kökenli faktör-1 MM hücrelerinin çoğalmasını, sağkalımını, göç etmelerini, ilaç direnci ve anjiogenezi sağlarlar (Şekil-3). Anjiogenez yeni kan damarlarının oluşumudur. Bu yeni kan damarları oksijen ve besin sağlayarak tümörün büyümesine katkıda bulunur. Sonuçta myelom hücrelerinin çoğalmasını sağlar ve kemik iliğinde baskın hale gelir. Hücrelerin % 10'undan fazlasını oluşturur (9, 20).

Myelom hücreleri monoklonal (M) protein ya da paraprotein denen aynı immunglobulin proteinini üretir. Spesifik M protein hastadan hastaya değişmekle beraber, bir hastada daima aynı kalır. Normal immunglobulinlere benzemeyen M protein vücuda yararlı değildir. Fonksiyonel immunglobulin düzeyini baskılar (9).



Şekil 3. Myeloma hücrelerinin gelişme ve yaşaması (4).

(http://www.multiplemyeloma.org/about_myeloma sitesinden uyarlanarak alınmıştır.)

2. 1. 1. 3. Etiyoloji

Hastalık değişik basamaklardaki B lenfositlerin monoklonal olarak çoęalmasý sonucu ortaya çıkar. B hücre klonunu çoğalmaya iten etkenler arasında genetik ve çevresel faktörler sorumlu tutulmaktadır. Bu faktörler arasında radyasyon, mesleki maruziyet, önceden alınan medikal tedaviler ve viral enfeksiyonlar sayılabilir (Tablo-1) (11).

Radyasyonla ilgili çalışmalarda; Hiroşima ve Nagasaki'deki atom bombası patlamasından sonra Japon halkında, İngiltere'de radyasyon işçilerinde ve ankilozan spondilit nedeniyle radyoterapi almış hastalarda Multipl Myelom oranı beklenilenden daha yüksek oranda saptanmıştır (12). Multipl Myelom ile meslekler arasındaki ilişki hala açık değildir. Epidemiyolojik çalışmalarda özellikle de çiftçilik yapanlarda hastalık gelişme riskinde anlamlı bir artış olduğu gösterilmiştir. Domuz, koyun ve sığır yetiştiricilerinde, mandıra çalışanlarında ve meyve ağacı yetiştirenlerde, tahıl tozu içeren ortamlar ve aflatoksinlere maruz kalanlarda Multipl Myelom görülme riski fazladır. Benzen, olası etiyolojik nedenlerinden biri olarak gösterilir, çünkü metabolitleri kemik iliği toksisitesine neden olmaktadır ve görülme insidansı, benzene maruz kalanlar arasında oldukça yüksektir (13).

Tablo-1. Multipl Myelom etiyolojisinde rol alan faktörler

<p>Radyasyon</p> <p>Tanısal ve tedavi amaçlı X-ışınına maruziyet</p> <p>Radyasyonla ilişkili bir işte çalışma</p> <p>Mesleki maruziyet</p> <p>Tarımsal işte çalışma (domuz, koyun ve sığır yetiştiricilerinde, mandıra çalışanlarında)</p> <p>Metal endüstrisi (maden firmı, metalurji sanayinde çalışanlar)</p> <p>Benzen</p> <p>Yaşam tarzı</p> <p>Sigara-alkol kullanımı</p> <p>Diyet alışkanlığı,</p> <p>Boya endüstrisi (saç boyaları)</p> <p>Sosyoekonomik durum</p> <p>Önceki medikal durumlar</p> <p>Viral enfeksiyonlar</p> <p>Kronik antijenik stimülasyon</p>
--

2. 1. 1. 4. Klinik Bulgular

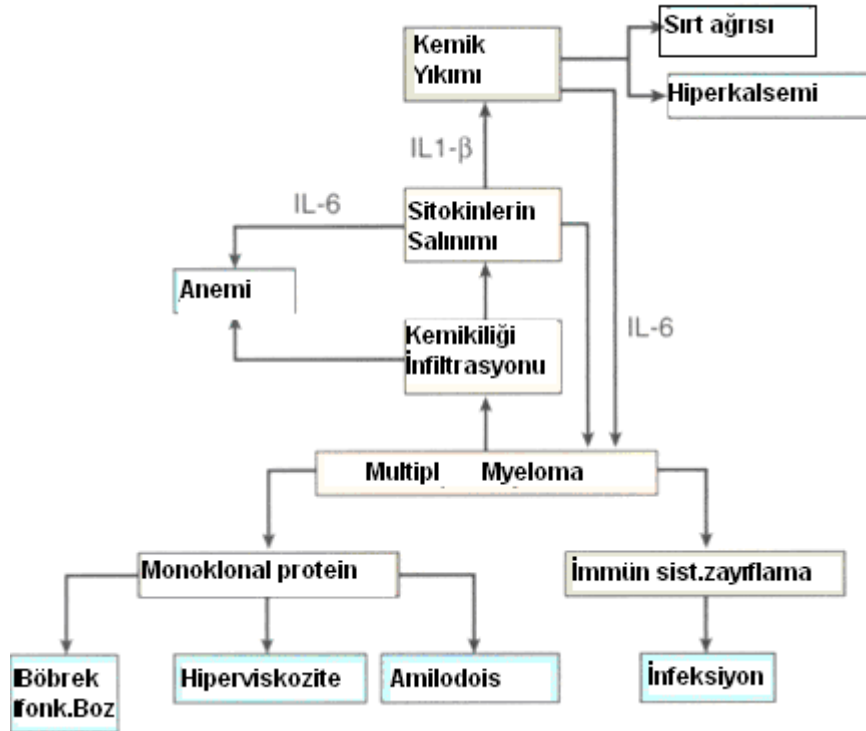
Plazma hücreli tümörlerin oluşumu kemik harabiyetine, kemik iliği yetersizliğine, monoklonal antikorların yapımına, normal antikor yapımının supresyonuna ve böbrek yetersizliğine yol açar. Kemik iliğinden köken almış olan tümör, tanı konulduğu zaman hastaların %80’inde tipik ‘zımba deliği gibi’ tanımlanan osteolitik lezyonlar görülebilir (21).

Myelomda genellikle halsizlik, anemi, kemik ağrısı, patolojik kırıklar, böbrek yetersizliği, kanamalar, enfeksiyon, hiperviskosite, trombositopeni, hiperkalsemi ve periferik nöropati gibi semptomlar görülmektedir (Tablo-2).

Tablo-2. Multipl Myelomlu hastalarda semptom ve bulguların sıklığı (20).

Semptom ve bulgular	Hasta (%)
Kemik ağrısı	66
Halsizlik	32
Kilo kaybı	12
Enfeksiyon ve kanama	<15
M protein idrar ve serumda	97
Litik lezyon, osteoporoz veya kırık	79
Hemoglobin <12g/dl	73
Kreatin >2mg/dl	19
Kalsiyum >11mg/dl	13

Myelomda klinik belirtiler süreci; asemptomatik dönemi takiben, neoplastik hücrelerin kemik iliğine infiltrasyonu, immün yetmezlik ve idrarda monoklonal proteinlerin bulunması ile gelişir. En sık rastlanan belirti kemik ağrısıdır. Ağrı sıklıkla bel kemiklerinde göğüste ve ekstremitelerde kemiklerinde lokalizedir. Hastaların yaklaşık %30-40’ında hiperkalsemi ve böbrek yetmezliği gelişebilir (Şekil-4).



Şekil-4. Multipl Myelom'da majör klinik ve laboratuvar özellikleri (22).

2. 1. 1. 5. Laboratuvar bulguları

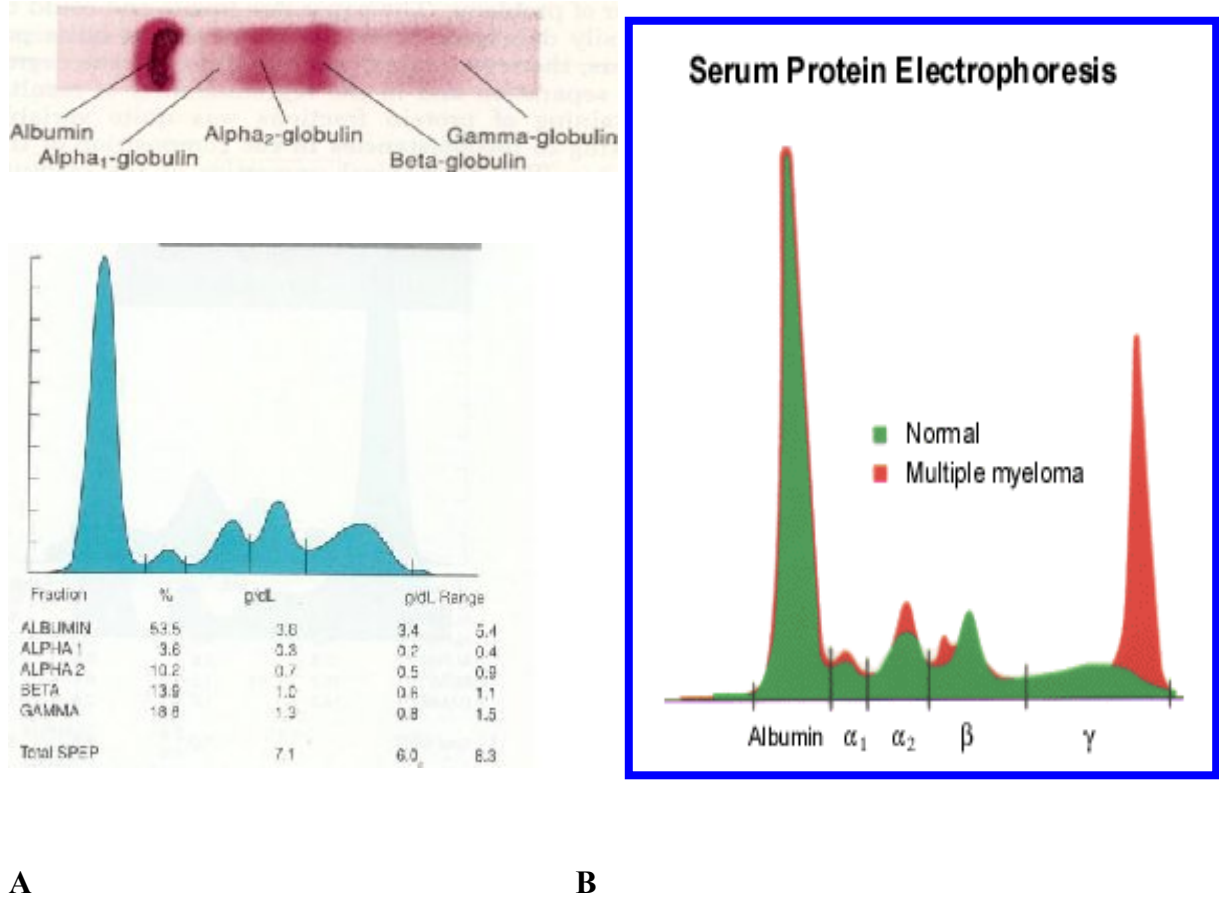
MM'lu hastalarda çoğunlukla globulin fraksiyonu oluşturmak üzere total serum proteini artmıştır (hiperproteinemi) ve protein elektroforezinde monoklonal protein (M protein) β veya γ globulin bölgesinde pik yada değişik mobilitede, homojen lokalize bant şeklinde görülür. M bantı IgG ise çoğunlukla gamma bandında, sivri ve simetrikdir. IgA ise β veya α -2 bandında olabilir (Şekil 5).

M protein varlığı immünoelektroforez ve immünofiksasyon yöntemleri ile serumda $>90\%$, idrarda ise 80% oranında gösterilebilir. Olguların 55% 'inde IgG izotipi, 25% 'inde IgA, 1% 'inde IgD, 1% IgM ve yaklaşık 20% 'inde kappa/lambda oranı κ/λ 2:1 şeklinde sadece hafif zincir sekresyonu vardır. Ağır zincir hastalıklarında serum elektroforezde sıklıkla lokalize bir bant izlenmez ve M komponenti için immünoelektroforez veya immünofiksasyona gerek duyulur.

Parçalanmış plazma hücrelerinden açığa çıkan laktat dehidrogenaz (LDH) enzimi MM'da artmıştır ve zayıf bir prognostik değeri vardır. Serum β -2 mikroglobulin değeri, plazma hücreli neoplazmaların aktivitesi ile orantılı olarak artar; böbrek yetersizliği ve tümör yüküyle ilgili bilgi verir. β -2 mikroglobulin tayininin MM tanısına katkısı azdır. Ancak

sağkalımla en fazla ilişkili olan parametre olduğu saptanmıştır. Serum C-reaktif protein (CRP) konsantrasyonu myelom hücreleri için önemli bir büyüme ve yaşam faktörü olan IL-6 aktivitesini yansıtır (22).

Serumda M proteininin bulunmadığı, idrar ve/veya serumda sadece Bence-Jones proteininin saptandığı olgulara 'hafif zincir hastalığı' adı verilir. Bu olgularda serum total proteini genellikle artmamıştır ve böbrek bozuklukları sıktır (16).



Şekil-5. A. Serum proteinlerinin elektroforez görünümü,

B. MM'da monoklonal (M protein) görünümü (22).

2. 1. 1. 6. Tanı

Hastalardan alınan öykü, fizik muayene ve laboratuvar değerlendirmeleri tanı için gereklidir. MM tanısında laboratuvar çalışmaları temeli oluşturmaktadır. Myelomda tanı kriterleri Tablo 3'te verilmektedir. Evreleme prognozu, uzun dönem sağ kalımı özellikle tedaviye yaklaşımı belirlemede temeli oluşturmaktadır.

Tanı için hastaya yaklaşım şöyledir;

1. Serumda M protein (genellikle 3 gr/dl'den yüksek)
2. İdrarda M protein (genellikle 1 gr/dl'den yüksek, amiloidoz yokluğunda)
3. Kemik iliği aspirasyonunda %10'dan fazla plazma hücresinin varlığı
4. Litik kemik lezyonları veya grafilerde kemik erimesi (osteoporoz)
5. Yumuşak dokuda plazmositomların varlığı.

Tablo-3. Majör ve minör tanı kriterleri (23).

<p>Majör Kriterler</p> <ul style="list-style-type: none"> • Doku biyopsisinde plazmositom tanısı • Kemik iliğinde plazma hücreleri \geq%30 (plazmasitoz) • Serum elektroforezinde Monoklonal M protein IgG>3.5 g/dL veya IgA>2 g/dL • İdrarda hafif zincir atımı; >1 g/24 saatlik idrarda kappa (κ) veya lambda (λ) zinciri
<p>Minör Kriterler</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kemik iliğinde %10-30 plazmasitoz • Majör kriterlerdeki düzeylerden daha düşük M protein varlığı • Litik kemik lezyonları <p>Normal immünglobulinlerde azalma (IgM<50 mg/dL, IgA<100 mg/dL, IgG<600 mg/dL)</p>

Tanı için herhangi bir iki majör kriter ya da bir majör ve bir minör kriter veya ilk iki minör kriteri içeriyorsa üç minör kriterin varlığı yeterlidir.

MM şüphesinde öykü ve fiziksel muayenenin yanısıra tam kan sayımı, elektrolitler, üre, kreatin, kalsiyum, fosfor, ürik asit, LDH, alkalen fosfataz, serum protein elektroforez, immünglobulin düzeyleri, serum immünoelektroforez, β -2 mikroglobulin, C-reaktif protein (CRP) düzeylerine bakılmalı ayrıca kemiklerin radyolojik incelenmesi, kemik iliği aspirasyonu ve biyopsisi, tercihen plazma hücre işaretleme indeksi, sitogenetik ve FISH analizleri yapılması gereken testlerdir (17, 22).

2. 1. 1. 7. Evreleme

MM evrelendirmesinde iki ayrı sistem kullanılır. Bunlardan biri 1975'den beri klinikte yaygın olarak kullanılan Durie-Salmon evreleme (Tablo-4) sistemi, diğeri ise 2003 yılında 11.174 hasta ile yapılan bir çalışma ile yapılan İnternasyonel Prognostik İndeks (IPI)

sistemidir (Tablo-5). Son sistem ise; β -2 mikroglobulin ve albumin düzeyleri esas alınarak yapılan ve uygulama kolaylığı olan bir evreleme sistemidir (24).

Durie-Salmon evrelemede düşük ya da evre I'de sağ kalım 5 yıl iken, yüksek tümör grubunda yer alan evre III'deki hastalar için yaklaşık 15 aydır. Artmış IL-6 serum düzeyleri yüksek tümör kitlesi ve kötü prognozla bağlantılıdır. Karaciğerde yapılan ve ve muhtemelen IL-6'ya yanıt olarak artan akut faz reaktanlarından CRP düzeyleri de IL-6 gibi myelomda prognostik değere sahiptir. IL-6 tedavide kullanılan dekzametazonun oluşturduğu myelom hücre apoptozunu da inhibe edebilmektedir. CRP ve β 2m düzeyleri 6mg/ml den yüksek olduğunda ise prognoz çok kötüdür (ortalama yaşam 6 ay) (25).

Tablo-4 Durie- Salmon Evreleme Sistemi

EVRE I:	Tümör kitlesi
Hemoglobin>10 g/dL, Serum kalsiyum<12 mg/dL Kemik lezyonu yok veya sadece soliter kemik plazmositomu IgG<5 g/dL, IgA<3 gr/dL, İdrarda hafif zincir <4 g/24 saat	<0.6 x 10 ¹² hücre/m ²
EVRE II: EVRE I ve EVRE III dışında kalanlar	0.6-1.2 x 10 ¹² hücre/m ²
EVRE III: Aşağıdakilerden bir veya daha fazlası mevcut Hemoglobin<8.5 g/dL, serum kalsiyum>12 mg/dL Litik kemik lezyonları IgG>7 g/dL, IgA>5 g/dL İdrar hafif zincir >12 g/24 saat	>1.2 x 10 ¹² hücre/m ²
Alt grup	
• A: Serum Kreatin <2 mg/dL	
• B: Serum Kreatin >2 mg/dL	

Tablo-5. MM için önerilen İnternasyonal Prognostik İndeks (IPI)(26).

Evre	Parametre
Evre I	β -2 mikroglobulin<3.5 mg/dL Albumin>3.5 mg/dL
Evre II	β -2 mikroglobulin<3.5 mg/dL Albumin<3.5 mg/dL veya β -2 mikroglobulin 3.5 – 5.5 mg/dL
Evre III	β -2 mikroglobulin>5.5 mg/dL

2. 1. 1. 8. Tedavi

MM'da hastalığın evresine, klinik bulguların şiddetine bağlı olarak radyoterapi ve kemoterapi uygulanabilir. Ayrıca ağrı, anemi, hiperkalsemi gibi eşlik eden bulgular için semptomatik tedaviler uygulanır.

Hastalık tam olarak iyileştirilemez fakat tedavi edilebilir ve sağ kalım süreleri tümör yükü ile bağlantılıdır. Beş yıllık sağ kalım %30, 10 yıllık sağ kalım %3'tür. Myelomda tedavi komplekstir ve kemoterapi, radyasyon ve cerrahi içerir. Tedavinin hedefi; sağ kalım süresini uzatmak, ağrıları ve iskelet komplikasyonlarını azaltıp yaşam kalitesini arttırabilmektir. Bunun için, yeni ilaçlar, yeni kombine kemoterapiler, VAD (Vincristin-adriamisin-deksametazon), yüksek doz MP (Melfalan) ve kök hücre tedavisi uygulanmaktadır. Otolog veya allojenik kök hücre nakli yanı sıra Biphosphanate'lar, rekombinant α -interferon ve gerektiğinde antimikrobiyal etkenler kullanılmaktadır. Destekleyici tedavi genellikle hastalığın komplikasyonlarına bağlı ciddi morbiditeyi önlemeyi amaçlar (27).

2. 1. 1. 9. Prognostik Faktörler

Hastalar uygulanan tedavi yöntemlerinden hangisinin uygun olacağını belirten açık bir yaklaşım yoktur. Ancak prognostik faktörlerin varlığı ve bilinmesi hastalara uygulanacak tedavilerin belirlenmesinde önemli yer tutmaktadır. MM için belirlenmiş önemli prognostik faktörler şunlardır:

1. β 2 mikroglobulin: en önemli ve güvenilir prognostik faktördür; tümör yükü ve böbrek bozukluğuyla ilgili bilgi verir. Yüksek β 2 mikroglobulin düzeyleri erken ölümlle ilişkilidir.

2. C-reaktif protein (CRP): Serum CRP konsantrasyonu myelom hücreleri için önemli bir büyüme ve yaşam faktörü olan IL-6 aktivitesini yansıtır. CRP ve β 2 mikroglobulin düzeyleri 6mg/ml den yüksek olduğunda ise prognoz oldukça kötüdür (ortalama yaşam süresi 6 ay)(24).

3. Plazma Hücreleri İşaretlenme İndeksi (PCLI): Plazma hücrelerinin çoğalma aktivitesini yansıtır. Hastalığın erken dönemlerinde birçok miyeloma hastasında çoğalma düşüktür. Hastalık ilerledikçe indeks artış gösterir.

4. Laktik dehidrogenaz: Tedavi almamış olguların yaklaşık %10'unda LDH seviyesi yüksek bulunur. Bu daha sıklıkla yüksek tümör kitlesi, ekstramedüller hastalık ve hipodiploidi olan hastalarda görülür.

5. Myelomlu hastaların %18-30'unda; delesyon, anöploidi ve translokasyon şeklinde sitogenetik anomaliler görülmektedir. Özellikle 13q delesyonları, t(4;14) ve *p53* gen kaybı kötü prognoz ile ilişkilidir (28).

2. 1. 1. 10. MYELOMUN VARYANT FORMLARI

Sessiz (Smoldering) Myelom

Kemik iliği plazma hücresi %10'dan, serum M proteini 3 mg/dL'den fazladır. Anemi, böbrek yetmezliği, hiperkalsemi, litik kemik lezyonlarının olmadığı olgulara 'smoldering (sessiz) myelom' denir. Oldukça seyrek görülür. İdrarda az miktarlarda M proteini bulunabilir. Plazma hücreleri işaretlenme indeksi düşüktür. Bu hastalar asemptomatik olduğu için klinik olarak belirti ve bulguları ilerleme göstermediği sürece, bu hastalara tedavi uygulanmamalıdır (14, 17).

Plazma Hücreli Lösemi

Plazma hücreli lösemi periferik kanda %20'den fazla plazma hücresi bulunur. Yeni tanı konulan myelomlu olguların %5'inde plazma hücreli lösemi bulunur. Plazma hücre lösemili çoğu olguda serumda IgG ağır zincir veya hafif zincir tipi bir monoklonal protein vardır. MM'a benzer şekilde vakaların %50'sinde IgG, %15'inde IgA sınıfı ağır zincir bulunur. Bu hastalar çoğunlukla yüksek tümör kitlesine sahiptirler. Sıklıkla trombositopeni, yüksek LDH düzeyi gözlenir, tedaviye yanıt iyideğildir (14, 23).

Osteosklerotik Myelom

POEMS kısaltması (polinöropati, organomegali, endokrinopati, M protein, deri değişiklikleri) bu sendromu tanımlar. Bu olgularda genellikle kemik iliğinde <%5 plazma hücresi bulunur. Hiperkalsemi ve böbrek yetmezliği nadirdir. Tanı osteosklerotik lezyondan alınan biyopside monoklonal plazma hücrelerinin histolojik olarak belirlenmesi ile konulur (14).

Nonsekretuar Myelom

Myelomun nadir bir formunda olgularının %1'inde ne serumda ne de idrarda monoklonal protein saptanmaz ve bunlara salgısal olmayan (nonsekretuar myelom) adı verilir (4, 14).

Ekstramedüller Plazmasitom

Ekstramedüller plazmasitomlar çoğunlukla üst solunum yollarında (nazal kavite, sinüsler, nazofarinks ve larinks) oluşurlar. Ayrıca gastrointestinal sistem ve diğer organlarda da görülebilirler (14).

2. 2. HEMATOLOJİK MALİGNANSİLERDE SİTOGENETİK VE MOLEKÜLER SİTOGENETİK

2. 2. 1. Hematolojik malignansilerde sitogenetik

Son 30 yılda, bantlama tekniklerindeki gelişmeler, hücre kültürü ve moleküler sitogenetik metotların gelişmesi ile kanser genetiği alanında gözle görülür ilerlemeler sağlamıştır (29).

Kanser sitogenetiğinin iki ana hedefi vardır. Bunlardan birincisi temel kanser araştırmalarına yönelik olup, spesifik kromozom anomalilerinin tanımlanması, primer ve sekonder değişikliklerin ve özellikle kırık noktalarının belirlenmesi, bu noktada ekspresyonu değişen yada ekspresyonu kaybedilen genlerin tanımlanarak, tumörigenezisteki biyolojik mekanizmaların aydınlatılmasına olanak sağlamaktır. İkincisi ise klinik uygulamalardır. Belirli kanserlerde primer ve sekonder kromozom değişikliklerinin bilinmesi, tanının kesinleşmesinde, prognozda, tedavi protokolunun düzenlenmesinde, minimal rezidual hastalığın takibinde büyük önem kazanmaktadır (30).

Kanser Kromozom Data Bank'da bugüne kadar 27.000 sitogenetik anomali rapor edilmiştir 75 farklı neoplastik hastalıkta 215 balance(dengeli), 1588 unbalance (dengesiz) yapısal anomali tanımlanmıştır. Kanserde ilk kromozomal anomali 1960 lı yıllarda Nowell ve Hungerford tarafından KML (kronik myeloid lösemi) olgularında tanımlanmış 9 ve 22 nolu kromozomların translokasyonu sonucu ortaya çıkan bu kromozoma Philadelphia (Ph) kromozomu denilmiştir. Günümüzde KML tanısında Ph kromozomunun varlığı mutlaka gerekmektedir. Bu translokasyonun varlığında tedaviye yanıt çok iyi olup, KML progresyonunda %75-80 oranında bu bulguya ilave sitogenetik değişiklikler gözlenmektedir.

Hematolojik malignansilerde örnek olarak genellikle kemik iliği kullanılmaktadır. Eğer periferik kanda blast oranı yüksekse örnek olarak periferik kan kullanılabilir. Ayrıca plevral sıvı gibi vücut sıvıları, lenf nodları, dalak ve solid tümörler sitogenetik analiz için uygun örnek olabilir (30).

2. 2. 2. Hematolojik Malignensilerde Moleküler Sitogenetik

Moleküler Sitogenetik yöntemler (FISH, CGH=Comparative Genomic Hybridization) konvansiyonel sitogenetik yöntemlerle belirlenemeyen yapılanmaları veya orjini tam olarak belirlenemeyen yapılanmaları, mikrodelsyonlar ve subtelomerik yapılanmaları belirleme olanağı sağlamaktadır. Sitogenetik rutin GTG bantlama tekniğinde >4MB, HRB tekniğinde de >2MB ye kadar olan düzensizlikler belirlenebilmektedir. FISH tekniği ile çok daha küçük (1-3 Mb a kadar) olan yapısal düzensizlikler belirlenebilmektedir (17, 31).

2. 2. 3. Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH)

Moleküler biyoloji hastalıkların genetik etiolojisinin anlaşılmasına yardımcı birçok yeni tekniklerin gelişimine yol açmıştır. Bunlardan biri olan FISH sitogenetik ve gen haritalaması çalışmalarında yaygın deneysel tekniklerden biri haline gelmiştir. Bu yöntem genellikle moleküler sitogenetik olarak adlandırılmaktadır (29).

DNA molekülü gelişen teknolojiyle beraber incelenmesi en kolay moleküllerden biri haline gelmiştir. Belirli bir DNA parçası sınırsız şekilde çoğaltılabilmekte, nükleotid dizileri çok kısa sürede saptanabilmekte, aynı tekniklerdeki varyasyonlar ile izole bir gen değiştirilebilmekte ve tekrar kültürdeki hücrelere verilmektedir. Tüm bu gelişmeler rekombinant DNA teknolojisi adı altında toplanan ve 1970’li yıllardan itibaren takip edilmesi güç bir hız ile geliştirilen teknikler sayesinde olmuştur. Bu ilerlemelere ortam hazırlayan üç temel gelişme vardır:

1. DNA’nın spesifik bölgelerden restriksiyon enzimleri ile kesilmesi,
2. Saflaştırılmış DNA fragmentindeki tüm nukleusların sekanslanması,
3. Nükleik asitlerin kendilerine komplementer olan diğer bir nükleik asit fragmenti

ile karşılıklı gelebileceği ilkesi ile DNA-DNA, DNA-RNA yada RNA-RNA fragmentleri arasında hibridizasyonun yapılmasıdır (29).

Floresanlanmış nükleotid analoglarının direkt ve indirekt ISH (In Situ Hibridizasyon) yöntemlerinde kullanılmaya başlamasıyla (1991) bir alt dal oluşmuştur ki bu da FISH’dir. FISH ile komplementer DNA fragmentleriyle spesifik nükleik asit sekansları hibridize edilmekte, böylece kromozom kopya sayıları ve genlerin lokalizasyonları belirlenebilmektedir. Karyotip analizleri veya konvansiyonel metafaz sitogenetiğiyle karşılaştırıldığında, FISH büyük avantajlar sağlamaktadır. Kromozomların interfazda da bir alan oluşturdukları ve spesifik problemlerle bu alanların yapı ve kısmen miktarı konusunda bilgi alınabileceği görülmüş ve böylece ISH ile ‘‘interfaz sitogenetiği’’ analizi adı verilen alt bir

dal doğmuştur. İnterfaz nukleusunda kromatin metafaz kromozomlarından daha az kondensedir ve böylece high rezolüsyon FISH için doğal hedef olmuştur. Metafaz kromozomlarında rezolüsyon >1 Mb yüksek rezolüsyonla uzatılmış kromozomlarda rezolüsyon >200 kb iken, interfaz nukleusunda bu değer 1 kb'dır (17, 29).

FISH doku kültürüne ihtiyaç duyulmadan solid tümörlere hatta formolde fikse edilmiş, parafin bloklu dokulara dahi uygulanabilmektedir. Anöploidilerin değerlendirilmesinde FISH Flow Cytometry'den daha hassastır. Artık DNA anöploidisi ve prognoz arasındaki ilişkinin tayininde FISH uygulanmaktadır (29).

FISH tekniğinin tanı ve araştırma amaçlı kullanım alanlarını şöyle sıralayabiliriz:

A) Tanısal amaçlı kullanılan FISH

1. Klinik sitogenetik
 - a. Prenatal tanı
 - b. İnterfaz sitogenetiği
 - c. Mikrodelesyon sendromlarının tanısı
 - d. Kanser sitogenetiği
2. Dokuda enfeksiyon ajanlarının tanısı
3. Dokuda mRNA düzeyinde onkogenlerin değerlendirilmesi

B) Araştırma amaçlı FISH

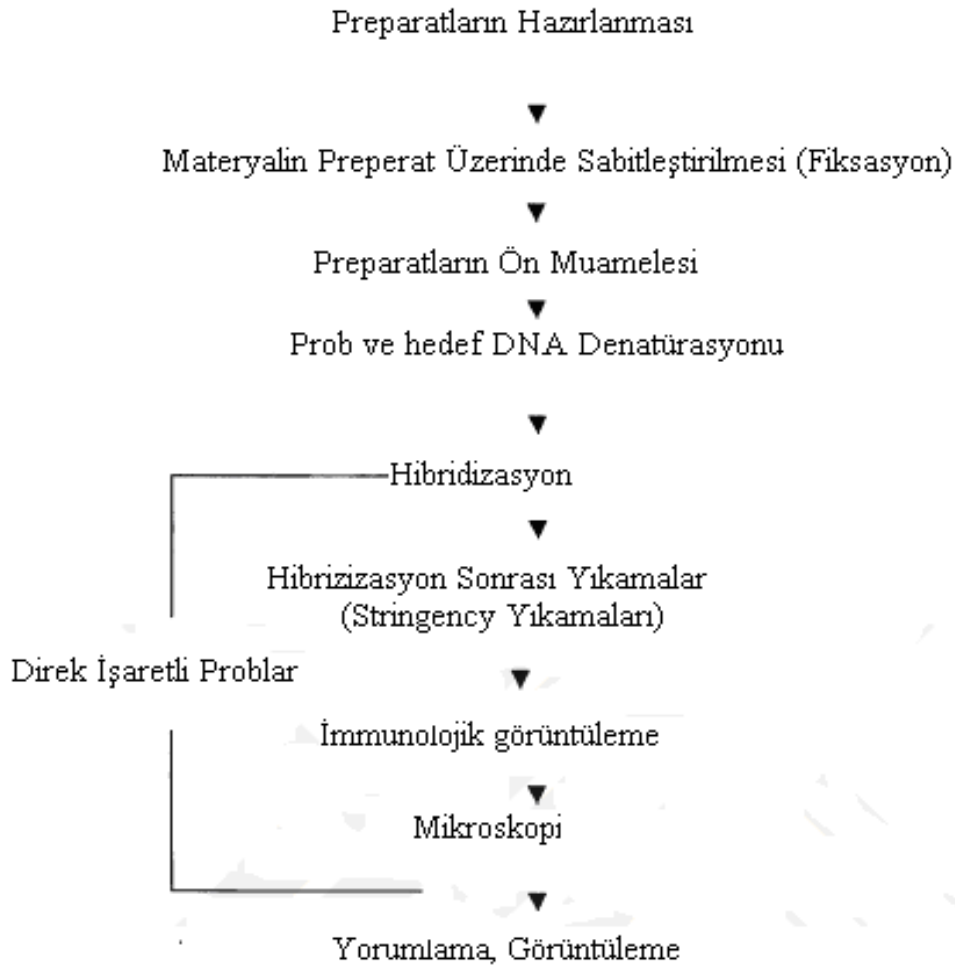
1. Gen haritalaması
2. Tümör biyolojisi
3. Mikrobiyoloji/viroloji
4. Gen ekspresyon analizi
5. Somatik hücre hibrit analizleri
6. Mayoz/mitoz analizleri
7. Hücre tanımlaması

Tüm ISH yöntemlerinde temel prensip aynıdır. Prob olarak kullanılan DNA molekülü işaretlenir, yani eksojen olarak reaksiyona sokulan işaretli nükleotid, prob DNA'sındaki uygun nükleotid ile yer değiştirir. Prob işaretlendikten sonra lam/lamel üzerine fikse edilen metafaz ve/veya interfazdaki proteinler uzaklaştırılır, çift sarmal halde bulunan gerek prob gerekse hedef DNA'lar denatürasyon ile tek zincir haline getirilir. Önceden işaretlenmiş prob ile spesifik eşleşmenin olacağı uygun koşullarda genomik DNA hibridize edilir.

Hibridizasyonda üç temel aşama önemlidir;

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

Bir hibridizasyon reaksiyonunda tolere edilebilen yanlış eşleşme derecesi 'stringency' olarak ifade edilir. Yüksek stringency koşullarında, sadece hedef sekansla tam homolog olan problemler stabil hibridler oluştururlar. Düşük stringency koşullarında ise prob sadece % 70–90 homoloji gösteren sekanslara bağlanabilir. Bu spesifik olmayan sinyallerin oluşumu, hibridizasyon sonrası yıkamalarda yüksek stringency koşullarının (yüksek ısı + düşük tuz konsantrasyonu) sağlanmasıyla engellenebilir. Daha sonra oluşan hibrit spesifik görüntüleme sistemleri ile belirgin hale getirilir (Şekil-6) (17).



Şekil-6. FISH tekniğinde uygulanan basamaklar (29).

(Teorik ve Pratik Floresans İn Situ Hibridizasyon, Ed.Basaran,N.,GENTAM,Eskisehir,s:34-39,1996 dan alınmıştır)

2. 2. 3. 1. FISH Tekniğinde Kullanılan Problar ve Özellikleri

Prob; örneklerde aranan genetik materyale (DNA veya RNA) komplementer, radyoaktif veya nonradyoaktif madde ile işaretli DNA veya RNA segmentidir (17, 30).

FISH tekniğinde sitogenetik alanında kullanılan başlıca problar şunlardır;

1. Lokusa özgü problar
2. Tekrarlayan dizi probları (satellit probları)
3. Translokasyon veya kırık noktası yeniden düzenlenme probları
4. Tüm kromozomu boyayan problar (library probları)
5. Telomer bölgesine özgü problar
6. Banda özgü problar

2. 3. Multipl Myelomda Sitogenetik Analizler

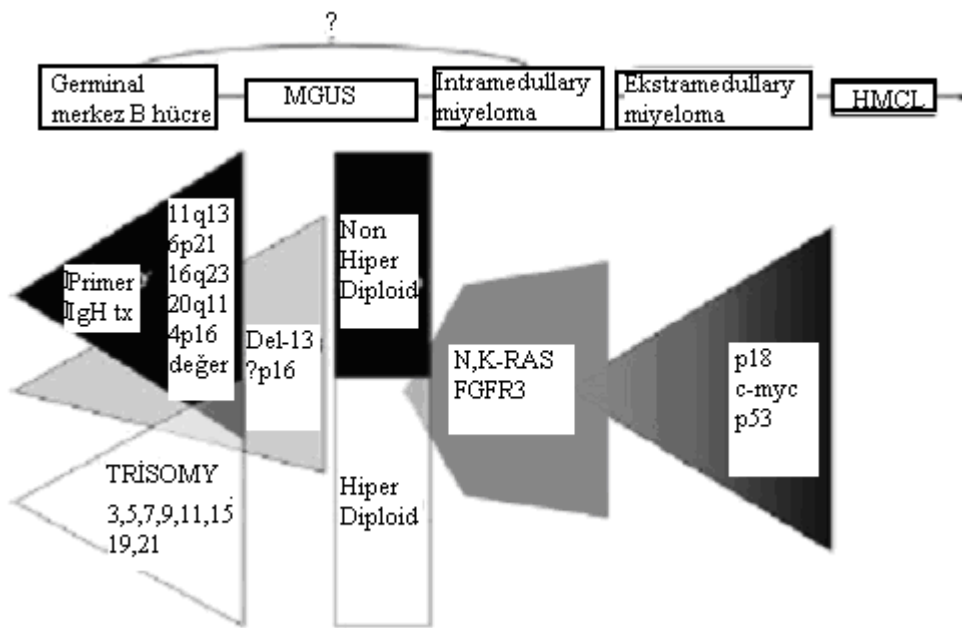
Multipl Myelomda sitogenetik, en önemli prognostik faktörlerden biridir. Konvansiyonel sitogenetik ve moleküler sitogenetik çalışmalarda pek çok tekrarlayan genetik anomali bildirilmiştir. Malign plazma diskrazilerinde hastaların %18-92'sinde kromozomal anomaliler gözlenmiştir. Karyotipler genelde komplekstir ve anöploidiler de görülür (26, 28).

Multipl myelomda karyotipler aneuploidi bakımından 2 majör gruba ayrılabilir;

Hyperdiploid MM: 48 ila 74 kromozom ve nonhiperdiploid MM: 48 veya 74 den daha az kromozom bulunabilir. Bu ploidi gruplarının da prognozla ilişkili olduğu ve ploidi gruplarına göre bazı anomalilerin daha sık olduğu düşünülmektedir. Örneğin hyperdiploid tipinde trizomili kromozom oranı fazla (özellikle 3,5,7,9,11,15,19,21 nolu kromozomlar) fakat IGH translokasyonlarının oranı düşüktür. Hiperdiploid karyotipe sahip olgular iyi prognostik gruba dahil edilmekle birlikte genetik olarak oldukça heterojendirler. İyi prognostik sınıfta bulunan hiperdiploid olgularda anomaliler arasında 13q delesyonu ve/veya 1q amplifikasyonu ve IGH translokasyonları görülüyorsa kötü prognostik sınıfta dahil olmaktadır. Kromozom 1 anomalilerinde kırılma noktaları genellikle p(11-21) ve q(25) bölgelerini kapsar. Tüm MM olgularının %9-20 sinde psödohipodiploid ve %10-30 unda hipodiploid karyotip saptanabilmektedir. Görülme sıklıklarına göre kısmi ya da total monozomiler; 13q, 14, 6q, 8, 16, X (kadınlarda), Y kromozom kayıpları olarak bildirilmiştir (17, 32-38).

Tümörlerin yarısında, primer kromozom translokasyonu bir onkogenin ekspresyonunun bozulmasına neden olur. Multiple myeloma'da rol alan proto-onkogen ve

tümör süpressör genler Tablo-6’da verilmektedir. Bu direk olarak (11q13-cyclin D1 ve 6p21-cyclin D3) ya da indirek olarak (4p16-fibroblast growth factor receptor 3-[FGFR3], 16q23-c-maf) siklin D’nin regülasyonunda bozulmaya neden olur. Alternatif olarak, tümörlerin geri kalanı çoğunlukla hiperdiploiddir ve siklin D1’in (daha az sıklıkla siklin D2) regülasyonu bilinmeyen bir mekanizmayla bozulur. Plazma hücrelerinin malign özellik kazanımında 2 yol vardır. MM oluşum sürecinde ilk onkogenik değişim MGUS’de (anlamı bilinmeyen monoklonal gammopati) başlar ve buna primer IgH (immünglobulin ağır zincir bölgesi) translokasyonları, trizomiler ve takiben 13. kromozomdaki delesyonlar (sıklıkla nonhiperdiploid tümörlerde) ve p16 metilasyonu eşlik eder. Diğer karyotipik anomaliler; ikincil IgH translokasyonları ve epigenetik değişimler bütün aşamalarda gelişir. C-myc disregülasyonu, *p18* delesyonu, Rb inaktivasyonu *p53* gen kaybıyla son onkogenik olaylar gelişir ve tümör daha agressif olur (Şekil 7) (33).



Şekil-7. Plazma hücreli neoplazide iki geçiş yolu (33).

Multipl Myelomda kemik iliği biyopsilerinde plazma hücrelerinin yüzdesinin düşük olması, düşük mitotik indeks gibi teknik problemler nedeniyle konvansiyonel sitogenetik yöntem bazı sınırlamalara sahiptir. Tümör hücrelerinde metafaz kromozomu eldesi zorluğu bilinen bir gerçektir. FISH analizi tümöre özgü karyotipik anomalilerin saptanmasında sitogenetik yöntemlere göre çok daha hızlı, hassas ve bazı durumlarda daha güvenilir bir tanı

teknikidir. FISH analizi interfaz nükleusunda da çalışabilme imkanı tanınması açısından kanser genetiğinde kullanılan en önemli tekniklerden biri olmuştur (34).

2. 3. 1. Kromozom 13 anomalileri (-13/13q delesyonu):

Multipl myelom olgularında 13q14 delesyon oranının FISH analizi ile %40-50 olduğu gösterilmiştir. Multipl myelomda en sık görülen anomalilerden biridir. 13. kromozom monozomisi görülebileceği gibi, 13. kromozomun uzun kolunun q14 veya q34 bölgesinin kaybı da görülebilir. Aynı zamanda q14 lokusunda RB (tümör supresör gen) geni bulunmaktadır. 13q14 delesyonu gözlenen olguların %85-90 ında t(4;14) yada t(14;16) gözlenmektedir. Delesyona non-hiperploid karyotipin veya bir translokasyon eşlik ediyorsa hastanın prognozu oldukça kötü olarak bildirilmektedir (34-36).

2. 3. 2. IGH (immünglobulin ağır zincir) Bölgesi Anomalileri:

IGH geni 14. kromozomun q32. bölgesinde lokalizedir. Bu gen, bağışıklık sisteminde antijen bağlama ve immün yanıtta görevlidir. Yapılan araştırmalarda IGH bölgesinin çeşitli partner genler ile yeniden düzenlenmesi belirlenmiştir. Plazma hücreli neoplazilerin kromozom 14'te translokasyonlar sıktır ve genellikle t(11;14)(q13;q32), t(8;14)(q24;q32) veya t(14;18)(q32;q21) şeklinde gözlenir. t(14;18)(q32;q21) ilk defa non-Hodking's lenfomalı hastalarda t(8;14)(q24;q32), t(8;22), t(8;2) Burkitt's lenfomalı vakalarda tespit edilmiştir (37-40).

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

Multipl Myelomda görülen IGH translokasyonlarının önemli bir kısmını oluşturur. Konvansiyonel sitogenetik ile de belirlenebilmektedir. t(11;14), anormal karyotipli Multipl Myelom vakalarının %10-20 sinde belirlenmiştir. Sitogenetik olarak Mantle-cell lenfomada görülen translokasyonla aynı olmakla birlikte 14q moleküler kırık noktası farklılık gösterir. 11. kromozomun q32 bölgesinde cyclin D1 geni bulunur. Cyclin ailesinin bir üyesi olan cyclin D1 geni hücre döngüsü sırasında G1 fazı boyunca gelişimi kontrol etmek gibi çok önemli görevi vardır (41-44).

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

14. kromozomun q32 bölgesi ile 4. kromozomun p16 bölgesi arasındaki parça değişimidir. 4. kromozomdaki kırık telomerik bölgede meydana geldiği için karyotipik olarak belirlenmesi güç bir translokasyondur. Multipl myelomlu vakaların ortalama %15 de

belirlenmiştir. 4.kromozomun p16 bölgesinde FGFR3 (fibroblast growt faktör reseptörü 3) WHSC1(wolf-hirschhorn 1) WHSC2 (wolf-hirschhorn 2) genleri bulunur. FGFR3 geni, iskeletin normal gelişimi için gerekli olan kondrositlerin çoğalma ve farklılaşmasında önemli rolü vardır. WHSC1 ve WHSC2 genleri transkripsiyonda görevlidir. Multipl myelom patogenezinde bu genlerin disregülasyonunun önemli olabileceği düşünülmektedir. t(4;14) kötü prognostik sonuca sahiptir (45-49).

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

14. kromozom ile 16. kromozom arasındaki translokasyondur. Multipl myelomlu vakaların % 5 inde tespit edilmiştir. t(4;14) gibi t(14;16) da karyotipik olarak belirlenmesi güç bir translokasyondur. 16. kromozomun q23 bölgesinde C-MAF geni bulunur. Bu gen MAF ailesinin bir üyesidir ve proto onkogendir. CCND2, integrin-S7ve CCR1 genlerine bağlı ekspresyonu kontrol eder. Bu genin deregülasyonu hücre siklusunun kontrolü, apoptozisde ve hücreler arası haberleşmede düzensizliğe yol açar. Birçok olguda kötü prognostik sonuca sahip olduğu bildirilmiştir (45-49).

2. 3. 3. TP53 (17p13):

P53 geni 17. kromozomun kısa kolunun p13 bölgesinde lokalizedir. DNA ya bağlı transkripsiyon faktörü ve tümör supresör gendir. P53 genindeki mutasyonlar genel olarak kanserlerde görülen en yaygın genetik değişikliktir. Multipl myelomlu hastalarda da P53 delesyonu rapor edilmiştir. Diğer lenfoid tümörlerde olduğu gibi P53 delesyonu ile ileri hastalık evresi, kısa yaşam süresi, kötü prognoz arasında yüksek korelasyon vardır (45-49).

2. 3. 4. Ras Mutasyonu

Multipl Myelomda Ras mutasyonu vakaların %35-50'sinde belirlenmiştir. MGUS'de ise nadir olarak gözükmemektedir. Mutasyonların sıklığı hastalığın ilerlemesiyle artmaktadır. K-ras mutasyonu kısa yaşam süresiyle ilişkilidir. Tipik olmayan H-ras mutasyonu HMCL (human multipl myeloma cell line=insan multipl myeloma hücre hatları)'da belirlenmiştir (48-49).

2. 3. 5. Sayısal Anomaliler

Trizomiler

YAPISAL ABNORMALİTY	LEZYONUN MEKANİZMASI	TÜMÖR TİPİ
---------------------	----------------------	------------

En sık görülen trizomilerden 5, 9 ve 15. kromozoma ait değişimlerde, 5. kromozom %40, 9. kromozom %42, 15. kromozom % 33 oranında FISH yöntemiyle trizomi saptanmıştır. CGH (Comparative genomic hybridization) yöntemi ile yapılan bir çalışmada, 5q ve 9q bölgesinde %24, 15q bölgesinde ise % 22 oranında artış tespit edilmiştir (17).

2. 3. 6. Diğer Anomaliler

Kromozom 1 in yapısal anomalileri karyotip değişimi myelom olgularının %30-%40'ında gözlenmektedir. Bu olguların yarısında translokasyon partneri ve kırık noktaları çeşitlilik göstermiştir. Yapılan çalışmalar 1q12 bölgesinin MM patogenezinde rol oynayabileceğini varsaymaktadır. Kromozom 1'in kısa ve uzun kolundaki anomaliler kısa yaşam süresi ile ilişkilidir (49).

PROTO-ONKOGENLER			
<i>Trankripsiyon Faktörleri</i>			
<i>c-myc</i>	t(8;14)(q24;q32)	Transkripsiyonal regülasyonun bozulması	Burkitt lymphoma
	t(2;8)(p11;q24)		
	t(8;22)(q24;q11)		
<i>pax-5</i>	t(9;14)(p13;q32)	Transkripsiyonal regülasyonun bozulması	Lymphoplasmacytoid lymphoma
<i>bcl-6</i>	t(3;?)(q27)(?)	Transkripsiyonal deregulation	B-hücreli difüz büyük hücre lenfoması
<i>Rel</i>	Amplifikasyon	expression regülasyonun bozulması	B-hücreli difüz büyük hücre lenfoması
<i>Mmset</i>	t(4;14)(p16;q32)	Fuzyon transkript	Multiple myeloma
<i>c-maf</i>	t(14;16)(q32;q23)	Transkripsiyonal regülasyonun bozulması	Multiple myeloma
<i>mum-1</i>	t(6,14)(p25;q32)	Transkripsiyonal regülasyonun bozulması	Multiple myeloma
<i>Tyrosine kinase</i>			
<i>fgfr-3</i>	t(4;14)(q32)	Transkripsiyonal regülasyonun bozulması	Multiple myeloma
<i>bcl-1/cyclin D1</i>	t(11;14)(q13;q32)	Transkripsiyonal regülasyonun bozulması	Mantle cell lymphoma
<i>bcl-2</i>	t(14;18)(q32;q21)	Transkripsiyonal regülasyonun bozulması	Follicular lymphoma
<i>bcl-10</i>	t(1;14)(p22;q32)	Transkripsiyonal regülasyonun bozulması	MALT lymphoma
<i>Ras</i>	Point mutation	Constitutive activation	Multiple myeloma
TÜMÖR SÜPPRESÖR GENLER			
P53	Nokta mut. veya delesyon	Fonk kaybı	B-cell chronic lymphocytic leukemia; Mantle cell lymphoma; Burkitt's lymphoma; adult T-cell leukemia-lymphoma
P16	Delesyon veya metilasyon	Fonk kaybı	Mantle cell lymphoma; l; Burkitt's lymphoma; Multiple myeloma
ATM	Nokta mut. veya delesyon	Fonk kaybı	T-cell prolymphocytic leukemia
VİRÜSLER			
EBV		Transforme edici genlerin ekspresyonu	Burkitt's lymphoma; AIDS-related lymphomas; primary effusion lymphoma
HHV-8		Transforme edici genlerin ekspresyonu	Primary effusion lymphoma
HTLV-1		Hücrel genlerin regülasyonunun bozulması	Adult T-cell leukemia-lymphoma
Kısaltmalar: AIDS: Acquired immunodeficiency syndrome, EBV: Epstein-Barr virus, HHV-8: Human herpesvirus type-8, HTLV-1: Human T-cell leukemia virus type-1, MALT: Mucosa-associated lymphoid tissue.			

Tablo-6. Multiple myeloma'da rol alan proto-onkogen ve tümör süpressör genler (22).

3. MATERYAL METOD

3. 1. Materyal ve Metod

3. 1. 1. Çalışma Grubu

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında yürütülen bu çalışmada Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalına Multipl Myelom ön tanısı ile gelen ve tanı alan 28 hastadan kromozom analizi, FISH ve moleküler genetik analiz yapılmak üzere kemik iliği alındı. Kemik iliği yetersiz ya da periferinde yeterli hücre olduğu düşünülen hastalardan periferik kan örnekleri alındı. Ayrıca Patoloji Anabilim Dalından hastalara ait arşiv materyalleri olan parafin bloklardan kesitler alınarak tek hücre süspansiyonu elde edildi, bu fikse edilmiş materyaller FISH işlemi yapılana kadar -20 °C’de bekletildi.

Bu çalışma, 2008.114.0014 nolu proje kapsamında KTÜ BAP tarafından desteklenmiş ve Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından (2008/18) onaylanmıştır.

3. 1. 2. Kimyasallar:

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve sarf malzemeler çeşitli firmalardan elde edildi.

1. PB Max Karyotyping Medium	Gibco12557-039
2. Bone Marrow Karyotyping medium	B10 Ind 01-199-1B
3. L-Glutamine	B10 Ind 03-020-1B
4. Trypsin-EDTA solution A 0.25% (Trypsin&EDTA 1/5000)	B101 Ind 03-050-1B
5. Colcemid solution	B101 Ind 12-004-1D
6. Giemsa lösing	Merck 9204

7. Acetic Acid (p.a)	Merck 1.00056
8. Methanol (p.a)	Merck 1.0600
9. Immersion oil	Merck 4699
10. Entellan	Merck 7961
11. Sodium chloride (NaCl)	Merck 6404
12. Formaldehyde solution min.37%	Merck
13. Sodium dihydrogen phosphate(NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O)	Merck 6345
14. Citric acid monohydrate (C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O)	Merck 242
15. Ammonium chloride extra pure(NH ₄ Cl)	Merck 1142
16. Sodiumhydrogenphosphate dihydrate (Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O)	Merck 6576
17. Potassium bicarbonate (KHCO ₃)	Sigma P-9144
18. Potassium dihydrogen phosphate(KH ₂ PO ₄)	Merck 4873
19. Steril disposable tüp	Grenier bio-one
20. Potasyum Klorür(KCl)	Merck 4936
21. Pastör pipeti (cam-2ml'lik, ucu kısa)	
22. Tri Sodyum Sitrat	Merck
23. Tween 20	Sigma P1379-25 ML
24. Formamide	Sigma F9037-100ML
25. DAPI (4,6 Diamidino-2-Phenylindole) / Antifade solüsyonu	D9564-10MG

3. 1. 3. Gereçler

1. Etüv (37°C)
2. Buzdolabı (+4°C)
3. Derin dondurucu (-4°C)
4. Vorteks (Labinco L-46)
5. Santrifüj (Heraus)
6. Hassas terazi (Mettler Toledo AB-204-S)
7. pH metre (Hanna)
8. Lamin air flow (Herause)
9. Floresan ataçmanlı mikroskop (Nikon E800)
10. Mikroskop Image analiz sistemi (Olympus BX 50)
11. Su banyosu (Memmert)

3.1. 4. Problar

Whole Painting Chromosome 9 (Cytocell)	LPP09G
Whole Painting Chromosome 11 (Cytocell)	LPP11G
Whole Painting Chromosome 21 (Cytocell)	LPP21G
Whole Painting Chromosome 22 (Cytocell)	LPP22G
13q14.3 Deletion Probe with 13qter subtelomeric probe (Cytocell)	LPH006

3. 1. 5. Solüsyonlar

L-Glutamin (Biol Ind)

Colcemid (Biol Ind)

10 µg/ml olarak hazırlanmış liyofilize Colcemid solüsyonu 4°C de saklandı.

Hipotonik Solüsyonu (0.075 M KCl)

KCl	1.4 g
Distile su	250 ml

Fiksatif (Carnoy) Solüsyonu

3 hacim Methanol (Merck)/ 1 hacim glacial asetik asit (Merck) ilave edilerek kullanımdan önce taze olarak hazırlandı.

Giemsa (GTG Bantlama) Boya Solüsyonu

Giemsa lösing	4 ml
Tampon çözelti	96 ml

Tampon solüsyonu

A solüsyonu

KH ₂ PO ₄	4.539g
Distile su	500 ml

B solüsyonu

Na ₂ H PO ₄	4.686 g
Distile su	500 ml

Tripsin Hazırlama

Tripsin	8cc
---------	-----

Serum fizyolojik 92 cc (%0.9)

3. 1. 6. Kullanılan Lamların Temizlenmesi

- Kutudan çıkarılan lamlar ışığa tutularak pürüzsüz olanlar seçilir.
- Lamlar gazlı bezle iyice yıkanır ve akan musluk suyundan geçirilir. 250 ml'lik beher içine dizilerek üzeri bidistile su ile doldurulur ve 10 dakika bekletilir.
- Metanol içinde 30 dakika bekletilir.
- Sonra bidistile su bulunan beher içine dizilerek buzdolabına kaldırılır 1 gün saklanabilir yayma aşamasında çıkarılır

3. 2. Metod

Multiple myelom tanısı almış hastaların kemik iliği materyallerinden konvansiyonel sitogenetik ve moleküler sitogenetik analizler yapılmıştır. Kemik iliği elde edilemeyen hastalardan periferik kan alınarak sitogenetik analizler yapıldı.

3. 2. 1. Kromozomların Elde Edilmesi

Multiple Myelom tanısı konan her hastadan 1-2 ml kemik iliği alınmış ve Anabilim Dalımız Sitogenetik laboratuvarına ulaştırılmıştır.

3. 2. 1. 2. Kemik iliğinden Kromozom Eldesi

Araştırmada standart kemik iliği yöntemi modifikasyonlar yapılarak uygulandı. Kemik iliğinden kromozom elde edilmesinde 72 ve 120 saatlik kültürler kurulmaktadır.

- Steril disposable 5 ml'lik heparinli tüplere veya heparinize enjektörlere kemik iliği alındı, 5 ml besiyerine beyaz kan hücre (WBC) sayısına göre damlatıldı, çalkalandı ve 37° C'de etüvde bekletildi.
- 72 saatlik kültür kurulmuşsa; kültürün 48. saatinde, 120 saatlik kültür kurulmuşsa; kültürün yaklaşık 115. saatinde 0,1 ml (10µg/ml) Colcemid ilave edildi ve 37°C etüvde bekletildi.
- Süre sonunda 1100 rpm'de 8 dakika santrifüj edildi, süpernatant atıldı, üzerine hipotonik solüsyonu (0.075 M KCl) ilave edilerek 1 saat etüvde bekletildi.
- Süre sonunda 1300 rpm'de santrifüj edildi. Carnoy fiksatif (3:1 Methanol/Glacial acetic acid) ile 4 kez yıkanan hücreler lama damlatıldı ve oda ısısında kurumaya bırakıldı.

d) FISH işlemi için 1-1.5 cc fiske edilmiş materyal -20°C’de bekletildi.

3. 2. 1. 3 Preparatların boyanması (GTG bantlama)

Oda ısısında yaşlandırılmış preparatlar;

- a) Tripsin solusyonunda 1 dakika tutuldu,
- b) Distile suda çalkalandı,
- c) Giemsa boyasında 7 dakika tutuldu,
- d) Süre sonunda preparatlar distile suda çalkalandı, oda ısısında kurutuldu,
- e) Entellan ile kapatılarak daimi preparatlar haline getirildi,
- f) Hazır hale gelen preparatlar mikroskopta incelendi.

Sitogenetik değerlendirme ISCN (2005) (50) kriterlerine göre yapılmıştır. Karyotip analizinde her hastadan en az 20 metafaz değerlendirmeye alınmıştır.

3. 2. 2. Parafinli Dokulardan Tek Hücre Süspansiyonunun Hazırlanması:

Hastalara ait arşiv materyalleri olan parafin bloklardan hücre süspansiyonu aşağıdaki işlemlerle elde edildi.

a. Her bir parafilmdeki doku örneğinden mikrotomla 40 µm kalınlığında 4 veya 5 kesit alındı.

b. Alınan kesitler 11 ml’lik steril cam tüplere konulup üzerine 10 ml ksilol ilave edilerek 10 dk. bekletildi On dakika sonunda ksilol pastör pipeti ile boşaltıldı ve tüp tekrar 10 ml ksilol ile doldurularak 10 dakika bekletildi. Ksilol pipetle boşaltılarak deparafinizasyon sağlandı.

c. %100, %100, %95, %75, % 50’ lik alkol serilerinden her birinde 10 dakika bekletilmek üzere geçirilerek dokuların rehidratasyonu sağlandı.

d. % 50 ‘lik alkolü pipetle uzaklaştırılan tüpe 10 ml distile su ilave edilir ve 10 dakika bekletildikten sonra distile su boşaltıldı. Ardından tekrar 10 ml distile su ilave edilir ve en az 6 saat olmak üzere kesitler ortalama 12 saat distile su içinde oda sıcaklığında bekletildi.

e. Onikinci saatin sonunda numuneler iki kez distile suda yıkandıktan sonra saat camına aktarıldı.

f. Saat camı üzerine alınan numune eğri uçlu makasla mümkün olduğu kadar ince parçalara ayrıldı. Numune bulanık sıvı haline gelene kadar ezildi. Bu işlemleri yürütürken numunenin cam üzerinde kurumamasına dikkat edildi.

g. Saat camı üzerinde iyice parçalanmış doku distile su ile sulandırıldı ve pastör pipeti yardımıyla santrifüj tüpüne alındı. Numune 1500 rpm 'de 10 dakika santrifüjlendi ve süpernatanı atıldı. Geride kalan pellet distile sudan mümkün olduğunca arındırıldı.

h. Tüplerdeki numune üzerine daha önceden hazırlanmış pH'sı 1.5 olan % 0.5 'lik pepsin solüsyonundan 1.5 ml ilave edip vortekslendikten sonra her beş dakikada bir vortekslenmek kaydıyla 37 derecede su banyosunda 30 dakika bekletildi.

ı. Otuzuncu dakikanın sonunda pepsini inaktive etmek amacıyla her bir tüpe 2-3 ml Fosfat buffer saline (PBS) ilave edildi. İnaktivasyondan sonra vortekslenen numune 1500 rpm 'de 10 dakika santrifüjlendi ve süpernatanı atıldı.

i. Doku pelletine 3 ml PBS eklenerek vortekslendi. Vortekslenen süspansiyon enjektöre çekilerek 47 µm'lik naylon mesh den süzülerek steril bir tüp içerside tek hücre süspansiyonu elde edildi.

j. Tek hücre süspansiyonu 1000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatanı atıldı ve geride kalan hücre pelleti iyice vortekslendi.

l. Eldeki tek hücre süspansiyonundan lama damlatılarak havada kurutuldu. Elde edilen hücre süspansiyonları endorf tüplere aktarılarak FISH çalışmalarında kullanılmak üzere -20 derecede saklandı.

Pepsin solusyonunun hazırlanması:

%0.5'lik pepsin solusyonu hazırlamak için 50 ml %0.9'luk serum fizyolojik üzerine 250 mg pepsin ilave edildi. İki normal (2N) HCl kullanılarak solüsyonun pH'sı 1.5 olarak ayarlandı. Hazırlanan pepsin solusyonu, her bir olguya bir tane kullanılmak üzere 1.5 ml'lik endorf tüplerine konuldu ve -20°C'de saklandı.

3. 3. FISH Prosedürü:

3. 3. 1. Hasta grubunun seçilmesi:

Konvansiyonel sitogenetik analiz yapılan ya da sadece arşiv materyallerine ulaşılabilen 10 hasta FISH analizi için seçildi.

3. 3. 2. Kullanılacak problemlerin seçilmesi:

Kromozom analizi sonucunda monozomi saptanan kromozom 9 (Cytocell LPP09G), 11 (Cytocell LPP11G), 21 (Cytocell LPP21G), 22 (Cytocell LPP22G) boyama probu ve

interfaz hücrelerinden elde edilecek sinyallerin kontrol edilebilmesi için sentromerik problemler ve 13q14.3 bölgesindeki delesyonlarını gözlemek amacıyla kromozom 13q14.3 delesyon probu (Cytocell LPH006) kullanılarak hastaların fikse edilmiş materyalleri ve/veya arşiv materyallerinden elde edilen preparatlara FISH uygulandı.

3. 3. 3. FISH Solüsyonlarının Hazırlanması:

20X SSC Solüsyonu

Sodyum Klorür	175.3 g
Tri Sodyum Sitrat	88.2g
Distile su	1000 ml

2XSSC Solüsyonu:

Stok (20XSSC) solüsyon	1 kısım
Distile su	10 kısım

4XSSC Solüsyonu:

Stok (20XSSC) solüsyon	1 kısım
Distile su	5 kısım

0.4XSSC Solüsyonu:

Stok (20XSSC) solüsyon	2ml
Distile su	98 ml

2XSSC, 0.05 % Tween 20 Solüsyonu:

Stok (20XSSC solüsyonu)	10 ml
Distile su	90 ml
Tween 20	50µl

Etanol serileri % 70, 85, absolü alkol

3. 3. 4. İşaretli problemlerle FISH Prosedürü:

Kemik iliğinden kromozom analizi ve arşiv materyallerinden hazırlanan tek hücre süspansiyonu hücreleri lama yayılarak preparatlar elde edildi.

Uygulama sırası şöyledir:

a) Preparat ve Lamellerin FISH için Hazırlanması:

FISH analizinde preparatların hazırlanması çok önemli bir aşamadır. Kaliteli sinyal alabilmek için probun uygulanacağı bölgelerde yeterli sayıda metafaz (sitoplazmik artefaktan arındırılmış) veya interfazın bulunması FISH kalitesini ve güvenilirliğini artırır.

Preparatlar 2XSSC solüsyonunda yıkandı. Etanol serilerinde (%70, 85 ve absolu) serilerinden geçirildi ve oda sıcaklığında kurutuldu. Probların sıcaklığı 37 dereceye getirildi ve 10 µl hibridizasyon tamponu eklenerek lamel kapatıldı. Yapıştırıcı ile içine su girmemesi için etrafı kapatıldı ve 37 derecede en az 5 dakika bekletildi.

b) Denatürasyon: Preparat ve Prob denatürasyonu: Preparatlar 75 derecedeki su banyosunda 2 dakika tutuldu.

c) Hibridizasyon: 37 derecede bir gece nemli ortamlarda tutularak hibridizasyona bırakıldı.

b) Hibridizasyon sonrası yıkamalar:

Su banyosu 72 dereceye getirilerek 0.4XSSC ısıtıldı. Ayrıca 2XSSC ve Tween 20 içeren şale oda sıcaklığında bekletildi. Preparatın lameli çıkarılarak 72 derecedeki 0.4XSSC içine kondu ve iki dakika bekletildi, süre sonunda oda sıcaklığında bulunana 2XSSC ve Tween 20 içinde 30 saniye tutuldu. Gerektiğinde solüsyonun fazlası kurutma kağıdı ile çekildi, 10µl DAPI veya PI-antifade damlatıldı ve floresan mikroskopta incelendi.

Görüntüleme:

Bu aşamada prob ve nuklear DNA'nın hibridize olduğu bölgelerin görünür hale getirilmesi hedeflenmektedir.

Preparatların mikroskopta incelenmesi:

Preparatlar Epi Floresan (Nikon E-800) mikroskobunda uygun filtrelerle incelenmiştir. Değerlendirmede her olgunun kemik iliği ya da arşiv materyallerinden hazırlanmış

preparatlara yapılan FISH analizlerinde her olgudan her prob için en az 200 interfaz nukleusu değerlendirilmiştir. Sinyallerin değerlendirilmesi sırasında üst üste gelmiş, birbirine çok yakın ve sinyal büyüklüğü birbirinden farklı sinyaller değerlendirilmeye alınmamıştır.

Kullanılan problemlerin analizi sırasında daha önceden laboratuvarımız için belirlenen cut-off değeri kullanılmıştır.

Fotoğraf çekimi:

Epi floresan (Nikon-E 800) mikroskobunda analiz edilen ve fotoğraflamaya uygun görülen hücrelerin fotoğrafları mikroskoba bağlı fotoğraf makinesiyle (Nikon Coolpix 5400) uygun filtreler (UV-2A, B2A ve G-2A) kullanılarak çekildi.

	Özellikler	Hasta Sayısı
Cinsiyet	Kadın	11
	Erkek	17

4. BULGULAR

Bu çalışma 2008-Haziran 2009 tarihleri arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Kanser sitogenetiği ve FISH laboratuvarında Multipl Myelom tanısı alan 28 yeni hastanın kemik iliği kültürlerinden kromozom sayı ve yapı anomalilerini belirlemek amacıyla konvansiyonel sitogenetik ve FISH analizleri yapıldı.

Araştırma grubunu oluşturan 28 MM hastasının 10'undan kan 18'sinden kemik iliği alındı. Hastaların yaşları 35 ile 87 arasında olup, yaş ortalaması 61 di. Hastaların erkek/kadın oranı 17/11 di. Hastaların 14'ü IgG; bu hastaların 1'i lambda ve 13'ü kappa, hastaların 8'i IgA; bu hastaların 3'ü lambda ve 5'i kappa, hastaların 2'si IgM-kappa ve bir tanesi hafif zincir lambda olarak sınıflandırılmıştır (Tablo 7). Hastaların dosya bilgilerinden total protein, albümin, kan sayımı, sedimentasyon, CRP ve β_2 mikroglobulin düzeyleri hakkında bilgi edinilmiştir (Tablo 8). Hasta dosyası incelemeleri sırasında 23 hastanın β_2 mikroglobulin seviyelerine ulaşamamıştır.

Hastaların geldikleri yöreler dikkate alındığında; Trabzon'dan 9, Giresun'dan 7, Rize-Artvin'den 8, Gümüşhane'den 3 ve Samsun'dan 1 hasta olarak belirlenmiştir.

Hastaların mesleki durumları incelendiğinde: 16'sı çiftçi, 1 emekli öğretmen, 1 hizmetli, 1 balıkçı, 1 inşaat ustası oldukları öğrenilmiş ve 5 hastanın ise meslek bilgilerine ulaşamamıştır.

Tablo 7. Hastaların özellikleri

T Yaş (yıl)		35-87 (ortalama 61)
Evre (Durie ve Salmon)	I II III Bilinmeyen	1 1 12 14
Paraprotein Tipi	IgG IgA IgM	14 8 2

TTablo-8. Hastalara ait biyokimyasal parametreler

Hasta No	T.protein (6.6-8.7 g/dL)	Albümin (3.4-5 g/dL)	Hb (12-17)	β2M (0.07-0.19 mg/dL)	CRP (<0.3mg/d L)	Sed
1	6.1	2.9	7.7		8.37	
2	6.7	3.7	10.8		4.04	96
3	8.0	4.3	13.0		<0.32	37
4	11.9	3.6	9.4		0.7	38
5	6.6	4.1	10.9		5.46	34
6	9.5	3.7	8.3			42
7	6.7	3.0	9.0		11.80	115
8	8.5	3.2	7.6		0.29	32
9	8.9	4.7	12.2	0.35	<0.29	59
10	8.6	3.8	13.4		0.42	28
11	7.9	4.1	14.4		2.25	27
12	7.1	4.1	12.2		0.12	66
13	7.9	3.6	12.2		0.60	43
14	6.3	3.5	10.1		0.89	55
15	8.3	4.1	9.6	0.22	<0.32	29
16	7.0	4.2	11.8		<0.32	17
17	7.6	4.3	9.8		6.01	95
18	8.2	4.4	15.2	0.24	0.80	75
19	6.5	2.8	7.8			
20	9.0	3.6	10.6		14.30	85
21	7.4	3.3	12.0		2.48	58
22	9.0	4.2	12.2		1.05	79
23	9.8	3	9.1		<0.32	120
24	8.0	4.3	8.7			29
25	8.0	4.2	11.6		1.08	43
26	7.0	4.4	12.4	0.81	1.42	19
27	7.4	4.0	13.9	<0.09	0.46	13
28	6.4	4.1	7.8			14

4. 1. Multipl Myelom Tanısı Alan Olgularda Sitogenetik Analiz Sonuçları

Sitogenetik analiz olguların 17'sinde gerçekleştirilebilmiş olup başarı oranı % 60.71 olarak saptanmış olup geri kalan 11 olguda (%39.28) metafaz elde edilememiştir. Kromozom analizi yapılan 17 hastanın; 8 hastada (%47) normal karyotip izlenirken (Şekil 8 ve 9), 9 hastada (%52.94) kromozom anomalileri gözlenmiştir. Kromozom anomalisi saptanan 9 hastanın birinde -t(13;13)- kromozom 13 translokasyonu saptanmıştır. Sayısal anomaliler değerlendirildiğinde, 9 hastanın 8'i hipodiploidi (%47) ve 1'i pseudodiploidi (%5.88) olarak değerlendirilmiştir.

Olgularımızın hastaneye gelme sebepleri arasında çoğunlukla bel ağrısı, kemik kırıkları ve bir kısmında boyun ağrısı şikayetleri yer almış hematolojik ve patolojik incelemelerden sonra MM tanısı alan hastalara şikayetlerini azaltıcı ve yaşam kalitesini artırıcı tedaviler uygulanmıştır.

Kemik iliğinden hazırlanan kromozom analizi sonucunda;

4. 1. 1. Yapısal anomaliler;

Analizi yapılan 17 hastanın 1'inde hücrelerinin %26'sında 46,XY gözlenirken, % 10'unda t(13;13) saptanmıştır (Şekil 10). Ayrıca hücrelerin %74'ünde 7,9,13 ve 20. kromozomlarda monozomiler saptanmıştır.

4. 1. 2. Sayısal anomaliler;

Analizi yapılan 17 hastanın 9'unda (%52.94) sayısal anomaliler saptanmıştır.

Monozomi saptanan kromozomlar; 3. kromozom (2 hastada), 4. kromozom (2 hastada), 6. kromozom (1 hastada), 7. kromozom (Şekil 11) (5 hastada), 9. kromozom (3 hastada), 10. kromozom (3 hastada), 11. kromozom (1 hastada), 12. kromozom (1 hastada), 13. kromozom (4 hastada) (Şekil 12 ve 13), 15 ve 16. kromozom (1 hastada), 17. kromozom (2 hastada), 18. kromozom (3 hastada) (Şekil 14), 19. kromozom (2 hastada), 20. kromozom (4 hastada), 21. kromozom (Şekil 15)(4 hastada), 22. kromozom (2 hastada) ve X ve/veya Y kromozomudur (1 hastada)(Şekil 16).

Trizomi saptanan kromozomlar; 3. kromozom (2 hastada) (Şekil 17), 8. kromozom (1 hastada) ve 9. kromozomlardır (1 hastada).

Ayrıca 1 hastada 1. ve 16. kromozomların heterokromatik bölgesinde artış saptanmıştır.

Tablo-9 Sitogenetik analiz sonuçları

No	Karyotipler
----	-------------

1	35~45,XX, 1qh+, 16q+, -7[7], -13[4], -18[4],-21[3],-22[3] [cp12]
2	Ü.O
3	46,XX
4	46,XY
5	46,XY
6	Ü.O
7	Ü.O
8	Ü.O
9	46,XY
10	40~45,XY, -7, -9, -13, -20, t(13;13)(q10;q10)[cp14]/46,XY[5]
11	Ü.O
12	42~48,XX,+8,-13,-18, -20,-21[cp6] /46,XX[5]
13	Ü.O
14	Ü.O
15	33~45,XY,+3,-7-9,-10,-11,-12, -15,-16,-17,-19,-20,-21,-22[cp15] /46,XY[23]
16	46,XX
17	37~45,XY,+3,-4,-9,-13,-17,-18,-21[cp12]/46,XY[5]
18	38~45,XY,-10,-21[cp5]/46,XY[7]
19	Ü.O
20	37~45,-X[3],-Y[4],-4[3],-6[3],-10[4],-19[4],-20[3],-21[5],-22[4] [cp13] /46,XY[15]
21	46,XY
22	46,XX
23	Ü.O
24	Ü.O
25	46,XX
26	44~47,-7,+9,-13 [6]/46,XY[12]
27	45,XX,-7[3]/46,XX[10]
28	Ü.O

(Ü.O: Üreme olmadı)

4. 2. MM tanısı alan hastalardaki FISH analiz sonuçları:

Kromozom analizi yapılan hastalar içinde; sayısal anomali saptanan 6, normal karyotip gözlenen 1 ve metafaz elde edilemeyen 3 olmak üzere toplam 10 hastanın FISH analizleri yapıldı. FISH analizleri hem sitogenetik verilerin doğrulanması hem de hasta sayısının artırılması amacıyla uygulandı. FISH analizlerinde monozomi saptanan 9,11,21 ve 22 nolu kromozomlara tüm kromozom boyama problemleri ve MM'da sıklıkla delesyon saptanan 13q14.3 bölgesine spesifik prob uygulandı. Hastaların FISH analiz sonuçları da Tablo 10'da verilmektedir.

Tablo-10 Multipl myelom olgularının FISH analiz sonuçları (N:normal, M:monozomi)

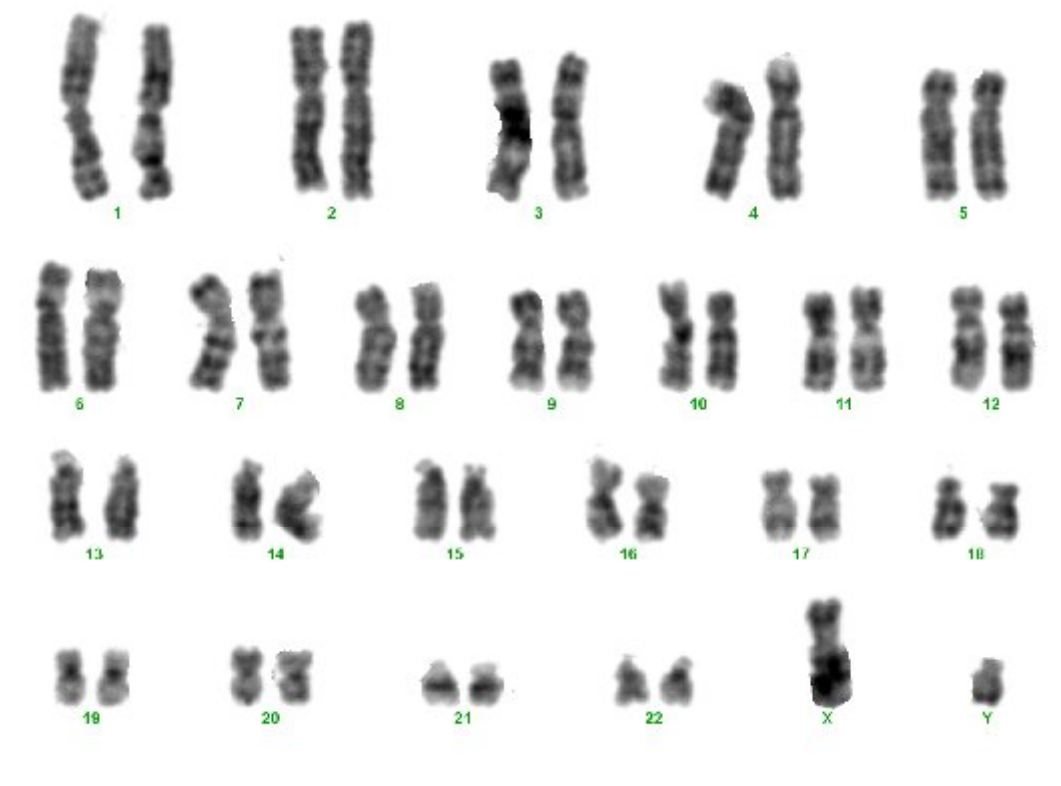
No	A.S	WCP9	WCP11	13q14.3	WCP21	WCP22
1	AŞ	N		N	M	N
2	CY	N			N	
3	AK			N	N	
4	HŞ	N				
5	MU	M	N	N	M	M
6	FA	N	N	N	N	N
7	HM				N	N
8	HK	N	N	N	N	N
9	CT	N	N	N	N	N
10	ŞA	N	N	N	N	N

FISH analizi yapılan 10 hastanın 3'ünden kemik iliği kültüründen metafaz elde edilememiş olup, kromozom spesifik boyama problemleri ile değerlendirilmeye alınmış ve analiz sonucunda sayısal anomali belirlenmemiştir.

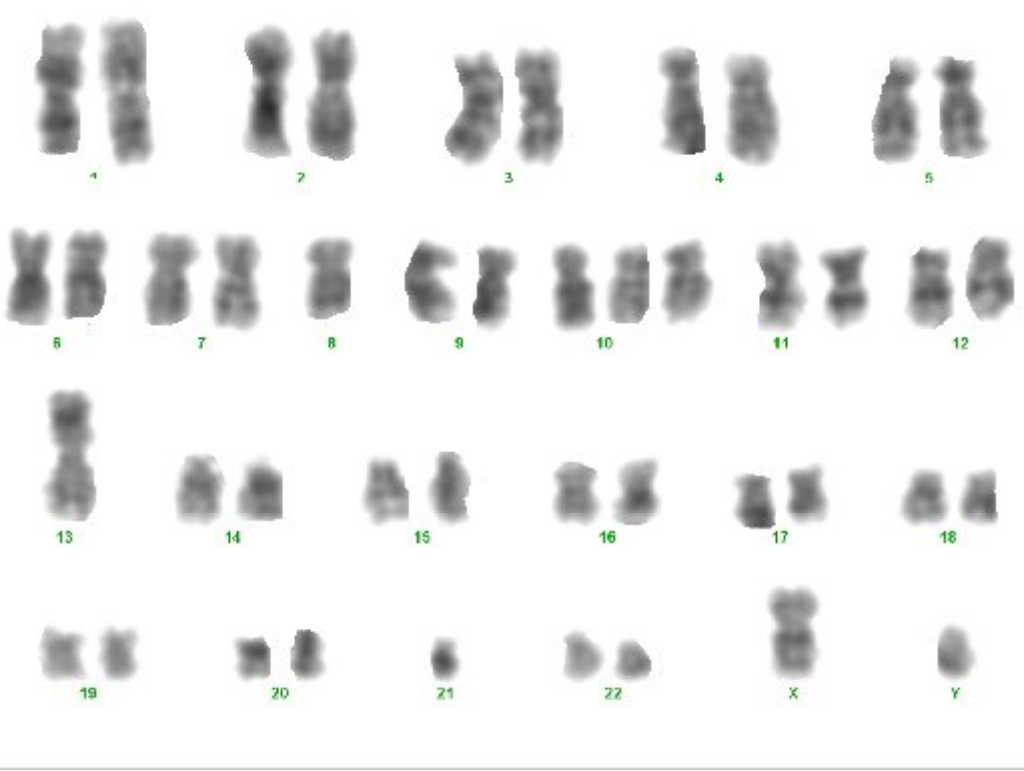
Kromozom 9; 8 hastaya uygulanmış olup sadece birinde monozomi (%12.5) tespit edilmiş (Şekil 18.a), kromozom 11; 5 hastaya uygulanmış olup sayısal anomali tespit edilememiş (Şekil 18.b), kromozom 21; 9 hastaya uygulanmış olup 2 hastada monozomi (% 22.2) (Şekil 18.c), kromozom 22; 7 hastaya uygulanmış olup 1 hastada monozomi (%14.28) ve 13q14.3 bölgesi; 7 hastada incelenmiş olup hastalarda delesyon saptanmamıştır (Şekil 19).



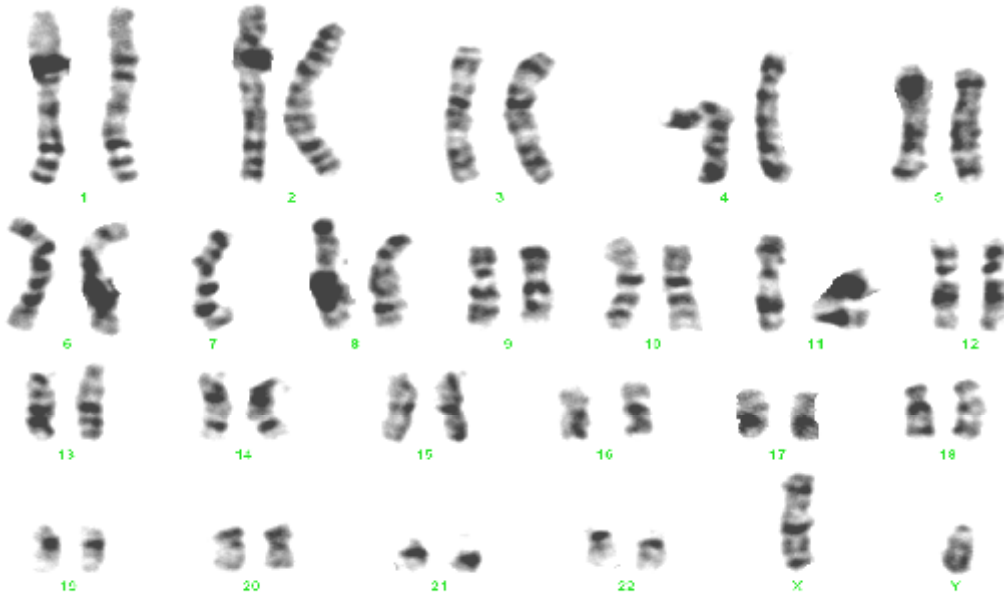
Şekil 8. Araştırma grubu olgularımızdan 15 nolu olguya ait karyotip (normal) analiz görüntüsü.



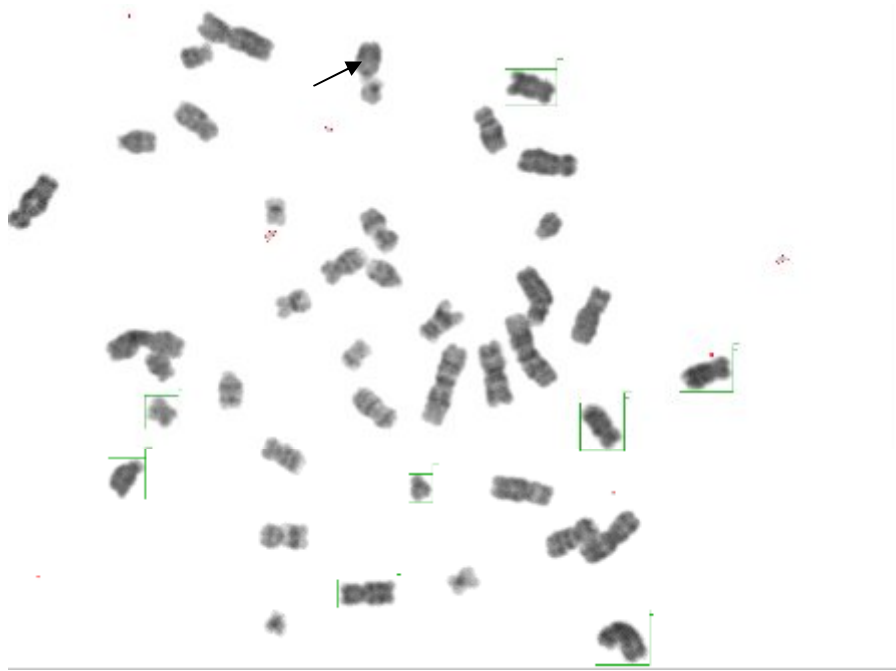
Şekil-9 Araştırma grubu olgularımızdan 18 nolu olguya ait karyotip (normal) analiz görüntüsü



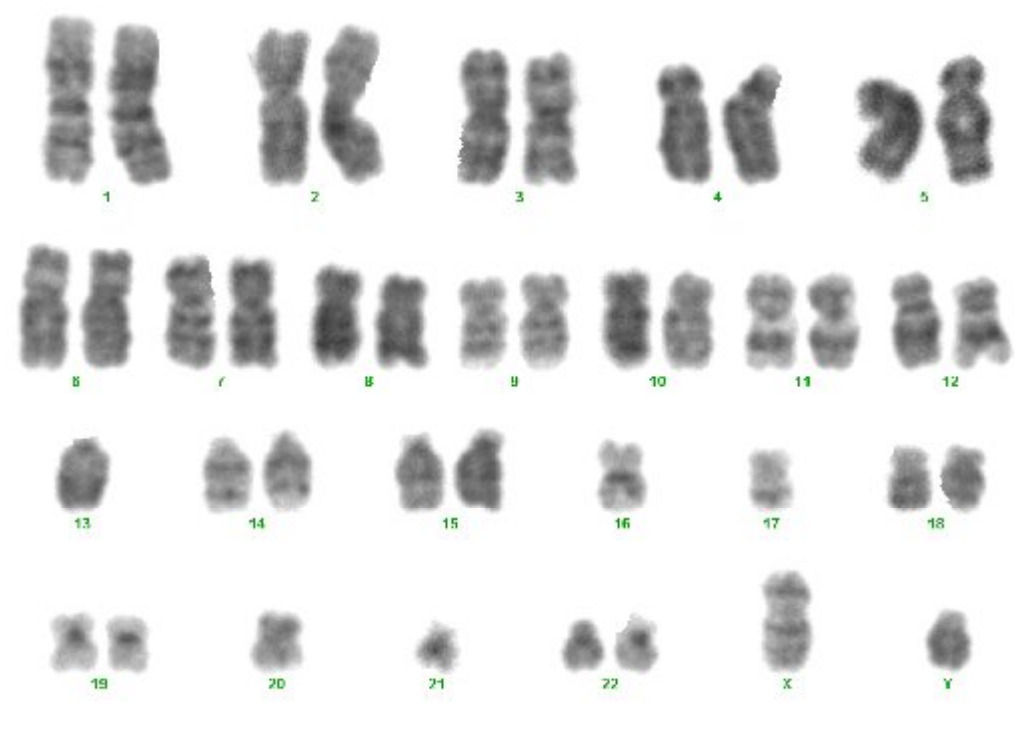
Şekil-10. Araştırma grubu hastalarımızdan 10 nolu hastaya ait karyotip analiz görüntüsü (Bu hastada %26'sında 46,XY gözlenirken, % 10'unda t(13;13) saptanmıştır.



Şekil-11. Araştırma grubu olgularımızdan 15 nolu olguya karyotip (monozomi 7) analiz görüntüsü.



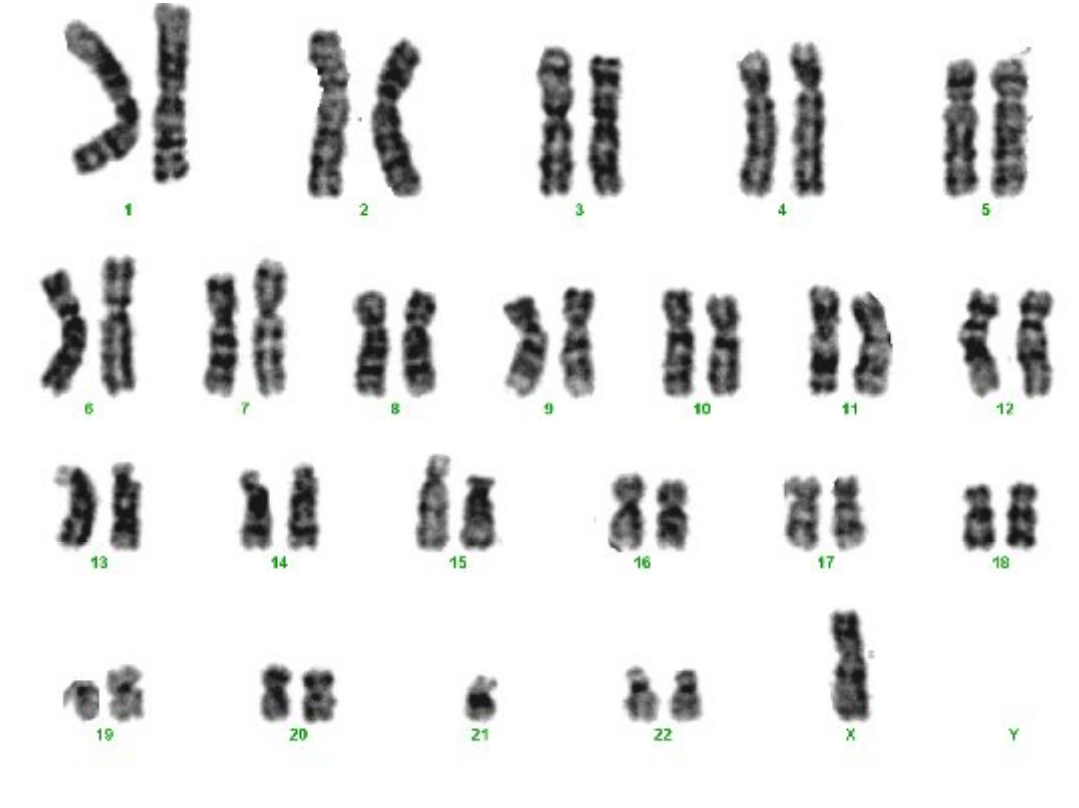
Şekil-12. Araştırma grubu olgularımızdan 17 nolu olgunun metafaz (monozomi 13) görüntüsü.



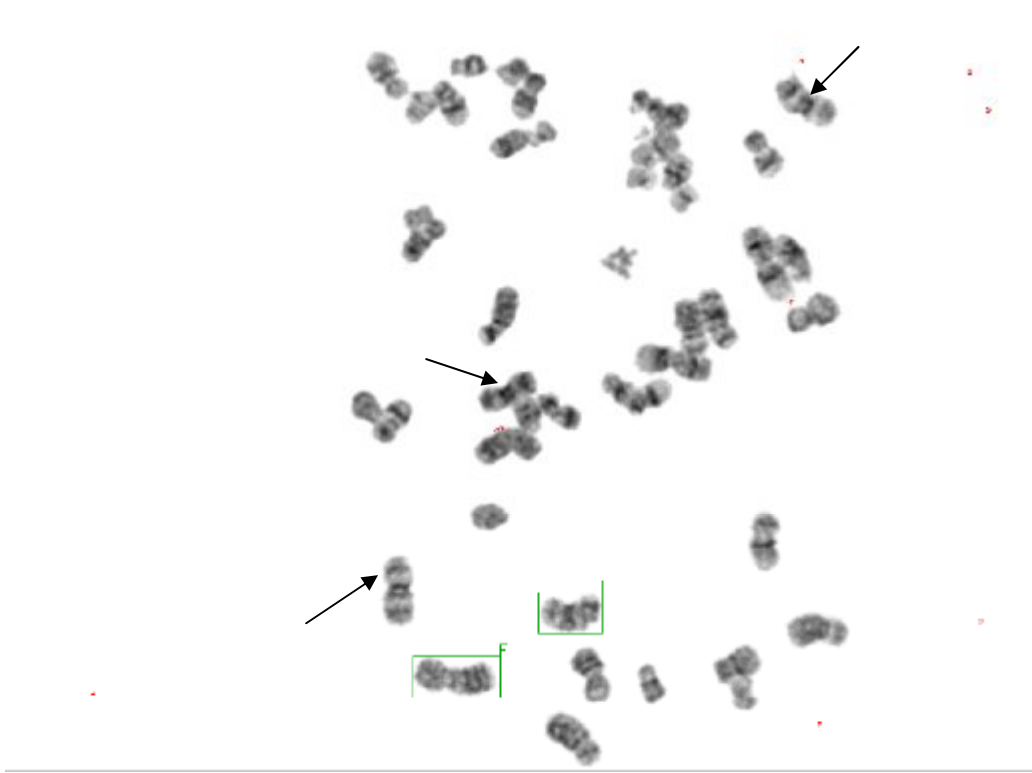
Şekil-13. Araştırma grubu olgularımızdan 17 nolu olgunun karyotip (monozomi 13) görüntüsü.



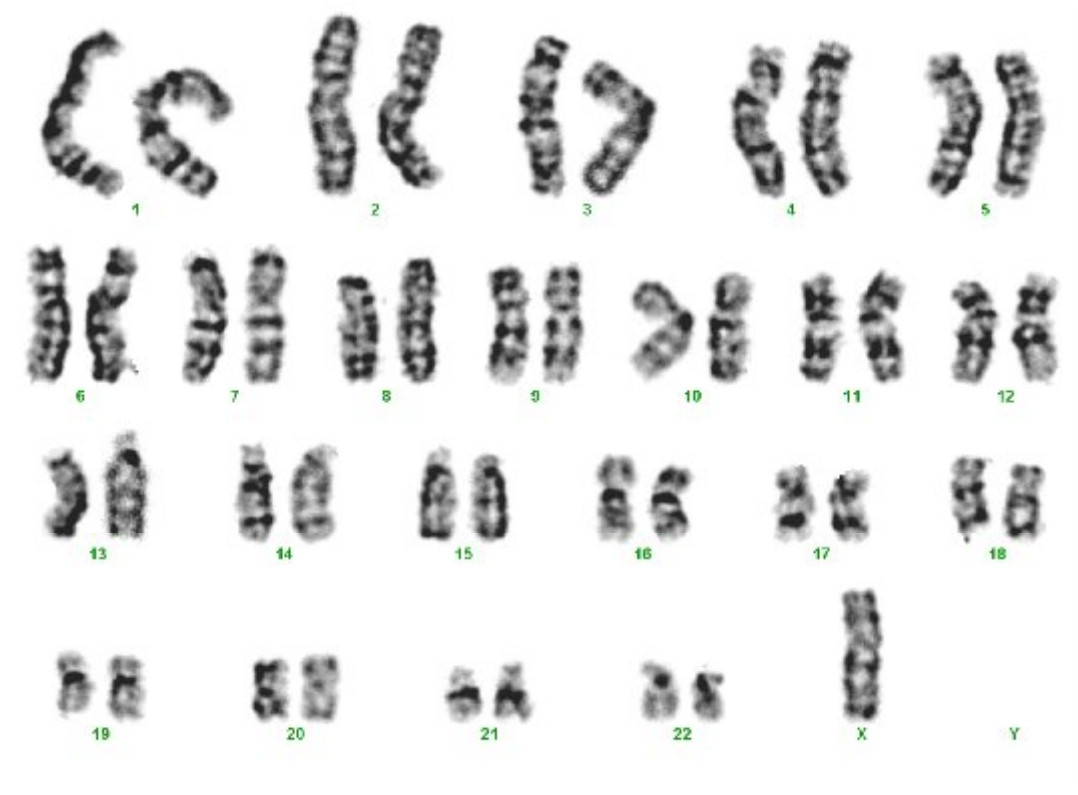
Şekil-14. Araştırma grubu olgularımızdan 15 nolu olgunun karyotip (monozomi 18) görüntüsü.



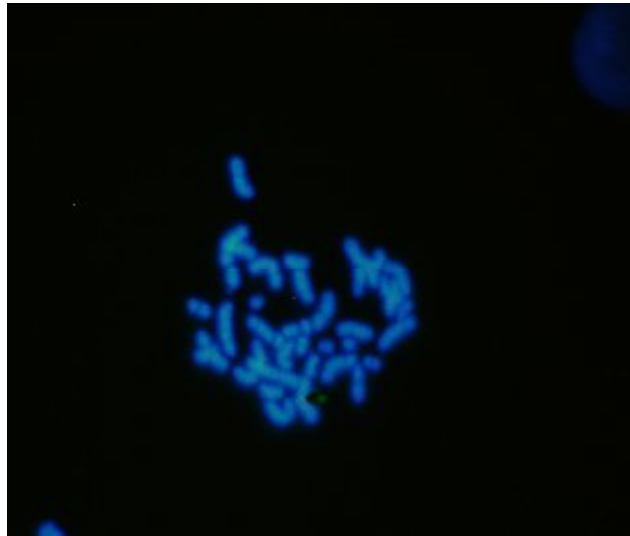
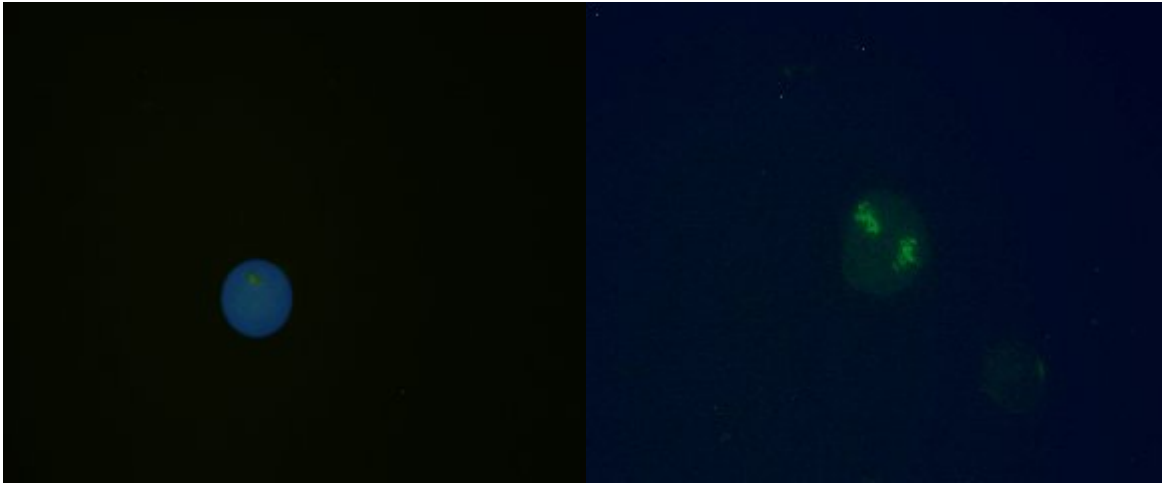
Şekil-15. Araştırma grubu olgularımızdan 17 nolu olgunun karyotip (monozomi 21 ve -Y) görüntüsü.



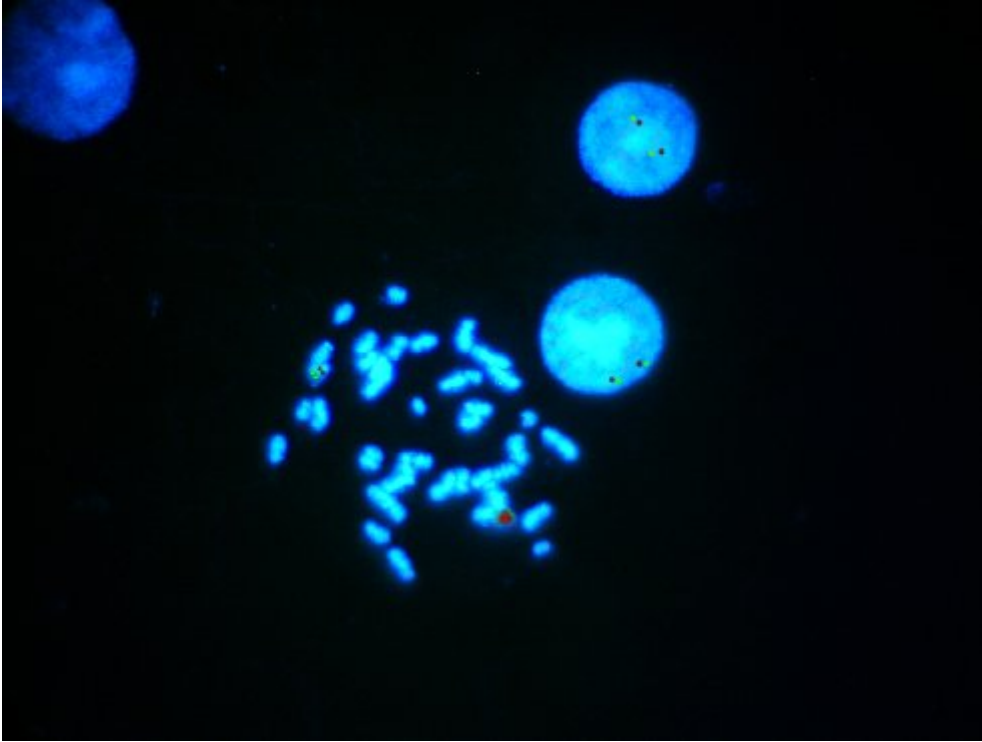
Şekil-16. Araştırma grubu olgularımızdan 15 nolu olgunun karyotip (trizomi 3) görüntüsü.



Şekil-17. Araştırma grubu olgularımızdan 20 nolu olgunun karyotip (monozomi Y) görüntüsü.



Şekil 18. FISH analizinde; a). 15 nolu hastaya ait interfaz hücresinde 9 nolu kromozoma ait tek sinyal (monozomi), b) 17 nolu hastaya ait bir interfaz hücresinde 11 nolu kromozoma ait iki sinyal, c) 15 nolu hastaya ait metafaz plağında 21 nolu kromozoma ait tek sinyal (monozomi),



Şekil 19. 15 nolu hastaya ait metafaz plağında 13q14.3 lokus spesifik prob ile normal sinyaller elde edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Multipl Myelom en sık görülen primer kemik tümörüdür (51). Tümoral plazma hücreleri, anormal şekilde monoklonal protein (IgG, IgA, IgD ve lambda veya kappa şeklinde hafif zincirler salgırlar. MM'da tek bir immunoglobulin tipinin ya da bir kısmının gereğinden fazla yapımıyla birlikte anormal immunoglobulinlerin supresyonu söz konusudur. Anormal protein kimyasal ve immunolojik bakımdan homojendir ve tek bir myelom hücresinden kaynaklanan klon tarafından üretilmektedir. Tümör hücrelerinin çoğalması ve apoptozise karşı direnç gelişimi sonucu hastalık oluşmakta, osteolitik kemik lezyonları, böbrek fonksiyon bozukluğu, serum veya idrarda monoklonal protein ve anemi gibi klinik-laboratuvar bulguları ile ortaya çıkmaktadır. MM malign hastalıkların % 1'ini, tüm hematolojik malignansilerin % 10'unu oluşturur. MM' li hastaların %10'unda yalnızca hafif zincir sekrete edilir (4-6,44).

MM'un prognozu oldukça değişkendir, birkaç aydan birkaç yıla kadar uzayabilir. Konvansiyonel terapi ile ortalama yaşam süresi 3 yıldır ve hastaların ancak %10'u 10 yıldan fazla yaşayabilir. Son 30 yıldaki klinik iyileştirmelere rağmen MM tamamen tedavi edilemeyen bir gruptur (44,48,52,53).

MM etiyolojisinde çeşitli faktörler ileri sürülmüştür. Bunlar: Yaş, cinsiyet ırk, alışkanlıklar (sigara, alkol), kronik antijenik stimülasyonlar, alerjik ve otoimmün hastalıklar, mesleki ve bazı kimyasal maddelere maruziyet, kromozomal bozukluklar ve sitokinler sayılmaktadır. Myelom erkeklerde kadınlardan daha sık görülür. Hastalık esas olarak ileri yaşlarda görülür, hastaların %99'u 40 aşından daha yaşlıdır. Yıllık görülme oranı 100000' de 3-4 tür ve etnik varyasyonlara bağlı olarak bu oran değişmektedir (54).

Araştırma grubumuzu MM tanısı almış 28 olgu oluşturmuştur. Bu hastaların 17'si erkek 11'i kadın olup erkek/kadın oranı 1.54'tür. Hastaların yaşları 35 ile 87 arasında değişmekte olup ortalama yaş 61 olarak hesaplanmış ve hastaların ortalama yaşı ile erkek

kadın oranı literatür ile uyumlu bulunmuştur (8, 10, 13, 15, 33). Son yıllarda hastalığın giderek daha genç kişilerde görülmesinin yanı sıra, giderek daha sık gözlendiği de bir gerçektir. Bu noktada hastalığın etiopatolojisinde önemli faktör olan genetik anomalliklerin değerlendirilmesi ve bulunan bu anomalilerin etiolojik faktörlerle tartışılması en önemli ihtiyaçlardan biri olmuştur.

MM ile meslekler arasındaki ilişki hala açık değildir. Epidemiyolojik çalışmaların önemli bir kısmı, tarım sektöründe çalışanlarda özellikle de çiftçilik, ziraatçılık, hayvancılık, kereste ve odun işleriyle uğraşanlarda MM gelişme riskinde anlamlı bir artış olduğunu göstermektedir. Yine nükleer endüstride çalışanlarda düşük seviyedeki radyasyonun uzun süreli maruziyeti ile MM riskinin arttığı gözlenmiştir. Lastik ve kauçuk imalatı, madencilik petrol ve petrol ürünleri endüstrisinde ve kozmetik sanayinde çalışanlarda da yapılan çalışmalar MM ve diğer hematolojik malignansiler görülmüştür. Çalışmamızda yer alan hastaların mesleki durumları incelendiğinde; hastaların büyük bir kısmını (16 hasta) Doğu karadeniz bölgesinde fındık, çay üretimiyle uğraşan çiftçiler oluşturmaktaydı. Literatürde çiftçilik hastalığın etiolojik faktörleri arasında sayılmaktadır (54, 55).

MM sıklıkla birden fazla basamaktaki kompleks genetik anormallikler sonucu gelişmektedir. Klonal plazma hücre hastalığının erken gelişim dönemlerinde iki veya daha fazla onkojenik yolağın etkili olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır; bunlar arasında sinyal ileti sistemi, apoptoz, kemik iliği mikroçevresi ve hücre siklusu sayılabilmektedir. Malign plazma hücreleri oluşumunda hücre siklusunda yer alan gen ekspresyon bozuklukları da rol oynamaktadır (6,19,20). Hastalığın ilerlemesiyle kompleks genetik anomalilerin arttığı gözlenmiştir (52). Genetik değişimlerin saptanması sadece klinik prognoz açısından değil aynı zamanda tedaviye alınacak cevabı belirleyip tedavi alternatiflerini seçmede de yardımcıdır (17, 48).

Myelomda konvansiyonel sitogenetik analiz, malign plazma hücrelerinin düşük proliferasyona sahip olması ve kemik iliğinde plazma hücre oranının çeşitliliği sebebiyle zordur. Myeloma hücrelerinde metafazın yeterli sayıda olmaması kromozom anomalilerinin oranını etkilemektedir (52). Literatürlerde MM hastalarında kromozom elde edilebilme oranı %40-%80 arasında değişmektedir. Bizim çalışmamızda kromozom elde edilen hasta oranı (%60.71) literatürle uyumluluk göstermektedir (16,44,53,54-57).

Karyotipik anomalilerin sıklığı; hastalığın evresi, seyri ve tedaviye cevabı ile ilişkilidir. Evre I hastalarında oran; %20, evre III hastalarında; %60 ve ekstramedüller tümörlerde %80'den fazladır (17, 52). Çalışmamızda hastaların 12'si (%43) evre III'deydi ve

bu hastaların %41.6'sında anomali saptanmıştır ve bu oran literatür oranlarına benzer olarak bulunmuştur.

Araştırmamızda 17 hastanın 8'inde (%47) normal karyotip elde edilmiştir. Literatürlerde diploid karyotipli metafazların normal hemapoietik hücrelerden türedikleri, diploid metafazlarda anöploidik hücrelerin belirlenmesinin kromozom anomalisinin giderek artmış oranda görülebileceğini açıkladığı vurgulanmaktadır (59).

MM da düşük in vitro mitoz aktivitesi ve malign plazma hücrelerinin farklı infiltrasyon dereceleri nedeniyle kemik iliğinin genetik değişimine ilişkin oranlar çok geniş yelpaze içerisinde dağılmaktadır (17).

Bantlı kromozomlar esas alındığında yeni tanı alan hastalardan daha çok ileri evre hastalarının %13.6-55.5'inde anormal karyotipler bulunmuştur. Kaufmann ve ark. anomali oranını %13.6, Königsberg ve ark. ise %55.5 olarak belirlemişlerdir(17,42,52,53,56,58,59). Çalışmamızda konvansiyonel sitogenetik analiz sonucu, kromozom elde edilebilen 17 MM li hastanın 8 inde (%47) normal karyotip izlenirken, 9 hastada (%52.94) kromozom anomalileri gözlenmiştir. Sonuçlarımız literatürle uyumlu bulunmuştur. Çalışmamızda toplam 28 hasta ile sitogenetik analiz yapılmış fakat bu hastalarda hücre proliferasyonunun yavaş olması, elde edilen metafazların kalitesinin analiz için yeterli olamaması sonucunda hastaların %39.28'inde metafaz elde edilememiştir. Sonuçta anomali oranımız 17 hastadan oluşan küçük bir hasta grubu üzerinden değerlendirilmiştir. Bu nedenle çalışmamızı ilerleyen dönemlerde devam ettirip daha geniş hasta popülasyonu ile bu anomali oranlarının tekrar değerlendirilmesi gerekmektedir. Kromozom anomalisi saptanan 9 hastanın birinde kromozom 13-t(13;13)- translokasyonu saptanmıştır. Literatürlerde bu anomali daha önce bildirilmemişti. Kromozom 13 translokasyonu saptanan olgu; Ig G kappa tanısı almış, 85 yaşında erkek hasta idi. Dosya bilgisinden evresi öğrenilememişti ve daha önce tedavi almamıştı. Hastalığın ilerleyen dönemlerinde translokasyonun takibi yapılması planlanmaktadır.

Hematolojik malignansilerde FISH tekniği;

- Hastalık tipine ait spesifik karyotipik anomaliyi belirlemek (diagnostik amaçlar),
- Tedaviye paralel olarak karyotipik değişikliği belirlemek, takibini yapmak,
- Klinik remisyon ile karyotipik remisyonun paralellliğini belirlemek,
- Kemik iliği nakli sonrası, hastanın kemik iliğinde oluşan hücre popülasyonunun orijininin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır (17).

Flow stometri ile yapılan DNA miktar analizlerinde myeloma hastalarının %80'inden fazlasında anöploidi gösterilmiştir. Floresan in situ hibridizasyon analizlerinde ise bu oran;

%44-68'inde hiperdiploidi, %9-20 pseudodiploidi ve %10-30 hipodiploidi şeklinde gösterilmiştir (5,44,52,60). Sayısal anomaliler değerlendirildiğinde, 9 hastanın 8'i hipodiploidi (%47.05) ve 1'i pseudodiploidi (%5.88) olarak değerlendirilmiştir ve bu sonuçlar literatürle uyumlu olarak bulunmuştur. Anöploidilerin prognoz üzerine etkileri araştırıldığında; hipodiploidi gösteren hastaların tedaviye dirençli oldukları ve daha kısa süre yaşayabildikleri, hiperdiploidiye sahip hastaların ise daha iyi prognoz gösterdikleri saptanmıştır (25,53,60).

Çalışmamıza dahil edilen 1 nolu hastamız; 68 yaşında, çiftçilikle uğraşan bir bayan hastaydı. Hasta daha önceki dönemlerde düşük doz kemoterapi, ardından yüksek doz kemoterapi almış ve ardından hastaya kök hücre nakli yapılmıştı, fakat hasta kaybedildi. Karyotipik analizinde hipodiploidi görülmüştü. 7,13 ve 18. kromozomlarda monozomi vardı. Ayrıca 1 ve 16 kromozomların heterokromatik bölgelerinde artış vardı. Bu bölgelerdeki artışlar genelde heteromorfik varyant olarak değerlendirilmekte olup, literatürlerde MM ile ilişkisi gösterilememiştir.

Sayısal anomalilere bakıldığında; çalışmamızda kromozom 3 trizomisi 2 hastada, kromozom 8 trizomisi 1 hastada ve kromozom 9 trizomisi 1 hastada saptanmıştır. Literatürlerde MM'da gözlenen trizomiler arasında kromozom 3 ve 8 trizomleri saptanmıştır, bu bulgular literatürlerle uyumludur (5,44,52,53,60,61).

Çalışmamızda saptanan monozomiler; 4,7,6,9,10,13,17,18,21,22, X (kadınlarda) ve Y kromozomlarında gözlenmiştir ve bu bulgular literatürlerle uyumludur (5,44,48,61). Kromozom 7 monozomisi 5 hastada (%29.4), kromozom 9 monozomisi 3 hastada (% 17.6), kromozom 13 monozomisi 5 hastada (%29.4), kromozom 18 monozomisi 3 hastada (%17.6), kromozom 21 monozomisi 6 hastada (%35.29), kromozom 22 monozomisi 3 hastada (%17.6) gözlenmiştir.

Kromozom 13'de delesyon, hipodiploidi ve moleküler sitogenetik analiz sonuçları hastalık için bağımsız prognostik faktörlerdir (48). MM'daki spesifik kromozom anomalilerinden özellikle monozomi 13 (%85) ve 13q delesyonları (%15) prognozla ilişkilendirilmiştir. 13. kromozomdaki monozomi ve delesyonların prognoza etkileri araştırılmış ve önemli farklar elde edilememiştir. Kromozom 13 anomalilerinin klonal yayılımdan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda kromozom 13 monozomisi gösteren 5 hasta da evre III'teydi. MM'da düşük proliferatif aktivite gözlendiğinden genellikle konvensiyonel sitogenetik ile bu anomalilerin insidansı tam ve doğru olarak belirlenememektedir (25, 58, 59).

FISH tekniğindeki ilerlemelerle myelom hücrelerindeki sitogenetik anomaliler belirlenmeye başlamıştır. Karyotipik FISH analiziyle vakaların %89-96'sında anöploidiler belirlenebilmektedir. FISH hem metafaz hem de interfaz hücrelerinde sayısal ve yapısal anomalilerinin belirlenmesine imkan sağladığından standart sitogenetiğin sınırlarını aşmaktadır. Bu açıdan FISH analizleri MM'da çok önemlidir. MM'de sıklıkla gözlenen önemli yapısal kromozom anomalileri arasında; kromozom 13 anomalileri ve kromozom 14q32 deki immünglobulin zincir lokusu yeniden düzenlenmeleri sayılabilir. Kromozom 13 ve IGH (14q32) yeniden düzenlenmelerinin belirlenmesinde farklı prob seçenekleri mevcut olup FISH ile tanı konabilmektedir. Bunun dışında kromozomlardaki (3, 7, 8, 9, 11, 15, 16, 18) için de sayısal anomalilerin belirlenmesinde FISH analizi yapılabilmektedir (33, 34, 37). (48,52). Çalışmamızda metafaz elde edilemeyen 3 hastaya, normal karyotip görülen 1 hastaya ve monozomiler saptanan 6 hastaya interfaz ve metafaz üzerinden FISH uygulandı. FISH analizinde kullanılan proplar MM'da monozomisi ya da trizomisi çok görülen kromozom ya da kromozom bölgelerinden seçildi. Ayrıca 13q14.3 bölgesindeki delesyonları gözleyebilmek için 7 hastanın fiske edilmiş materyallerine FISH uygulandı fakat hastalarda delesyon saptanamadı.

Yapılan FISH analizi sonucunda kromozom 9 boyama probu 8 hastaya uygulanmış olup 1 hastada (%12.5) monozomi, kromozom 11 boyama probu 5 hastaya uygulanmış olup sayısal anomali saptanmamış, kromozom 21 boyama probu 9 hastaya uygulanmış olup 2 hastada (%22.2) monozomi ve kromozom 22 boyama probu 7 hastaya uygulanmış olup 1 hastada (%14.28) monozomi saptanmıştır.

Konvansiyonel sitogenetik ile FISH analiz sonuçları değerlendirildiğinde; her iki analiz sonuçlarının birbirini doğruladığı gözlemlendi. 15, 18 ve 20 nolu hastalarda sırasıyla 11, 21 ve 22 nolu kromozomlarda sitogenetik olarak 5, 5 ve 4 metafaz plağında monozomi gözlenmiş olup FISH analizlerinde bu değerler cut-off değerleri olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda hastaların sahip olduğu anomalilerle sağ kalım arasındaki ilişki çalışmanın süreci bu değerlendirme için yeterli olmadığından yapılamamıştır. Gözlenen anomalilerin sitogenetik ve moleküler sitogenetik analizlerle takip edilmesi süreci sonunda daha geniş hasta spektrumunda bu ilişki değerlendirilecektir.

Sonuç olarak; hematolojik malignansilerde özellikle MM hasta grubunda kromozom anomalilerinin önemi çalışmamızla belirlenmiştir. Çalışmamızın sonunda bu grup hastalarda en sık olarak 7, 13 ve 21 nolu kromozomlarında hipodiploidi gözlemlendiğini, bunu takiben kromozom 3 ve 8 trizomilerinin önemli olduğunu gözlemledik. Araştırma için gelen hastaların birçoğu Fakültemiz Hematoloji Polikliniğine tanı almak için başvuran dış merkezli

hastalar olduğundan hastalara ait bir çok veriye detaylı ulaşmada problemlerle karşılaştığımızdan hastalığın evresi, tedavi protokolleri ve beta-2-mikroglobulin seviyelerindeki değişimlerle sitogenetik verilerin tartışılmasında eksiklikler gözlenmektedir.

Yapılan araştırma kapsamında; sitogenetik analizlerinin MM hastalarının tanı almalarında önemli faktörlerden olduğunu ve metafaz ve interfaz hcrelerine uygulanabilen FISH analizinin sitogenetiğe karşı üstünlüğü görülmüştür.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında yapılan araştırma sonucunda şu sonuçlara varılmıştır:

1. Multipl myelomda karyotipik anomaliler hastalığın erken aşamalarında ve ilerleyen dönemlerde sıklıkla görülür.. Bu nedenle hastaların tanı aşamasında; konvansiyonel sitogenetik analizler ve/veya moleküler sitogenetik analizler mutlaka yapılması gereken testler arasında olmalıdır. Özellikle yeni tanı konan hastalarda sitogenetik analiz verileri güçlü prognostik faktörler olarak düşünülmelidir.

2. Multipl myelomlu hastaların tedavi süreçlerinde; başlangıçta gözlenen bu anomaliler mutlaka kontrol edilmelidir. Böylelikle tedaviye yanıt ile sitogenetik anomaliler arasındaki ilişkiler daha ayrıntılı olarak gösterilmelidir.

3. Özellikle yeni tanı aldıkları dönemden itibaren kemoterapiye dirençli özellikle hipodiploidik ve/veya kromozom 13q yapılanmasına sahip hastalarda uygun tedavi protokolleri hem klinik hem de sitogenetik özellikler dikkate alınarak yeniden değerlendirilmeli ve bu şekilde uygun tedavi seçeneklerine karar verilmelidir.

4. Araştırmamız sırasında hastaların bir çoğunun bazı dosya bilgileri, evreleri, beta-2 mikroglobulin seviyeleri gibi klinik prognostik faktörlerine ulaşamamıştır. Bu sorunların çözülebilmesi için klinik branşlarla laboratuvar bölümlerinin ortak bir çerçevede buluşması gerektiği sonucuna ulaşılrken, klinik ve laboratuvar araştırmalarının ayrılmaz bir bütün oluşturduğu bir kez daha vurgulanmalıdır.

5. Çalışmamızda konvansiyonel sitogenetik analiz sonucunda %52.94 (9/17) oranında kromozom anomalisi elde edilmiştir. Bu oran yaptığımız kültür prosedürünün uygun olduğunu ve analiz yöntemlerinin başarılı olduğunu göstermektedir.

6. Çalışmamızda %47 oranında hipodiploidi ve %5.88 oranında pseudodiploidi tespit edilmiş ve bu sonuçlar literatürle uyumlu bulunmuştur. Ancak hasta grubunun artırılarak bu oranların tekrar değerlendirilmesi gerekmektedir.

7. Sitogenetik analizler sonucunda bulunan monozomiler FISH analizleri ile doğrulanmıştır. Ayrıca FISH'in metafazda olduğu gibi interfazda da analiz imkanı vermesi FISH'in üstünlüğü ve güvenilirliğini ortaya koymaktadır.

8. Çalışmamızda; FISH analizleriyle MM hastalarında önemli prognostik faktörlerden olan IgH yapılanmaları, P53 (17p13.1) delesyonları ve 13/13q delesyonlarının daha geniş hasta serilerinde analiz edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

9. Konvansiyonel sitogenetik analizler sonucunda yeni anomaliler bulunduğu takdirde bu hastalara uygulanacak moleküler genetik analizlerle hastalığın gelişimine neden olabilecek yeni genler araştırılmalıdır. Kanser genetiği alanında bir çok yeni moleküler teknikler kullanım alanına girmeye başlamıştır. Bu araştırmanın bir sonucu olarak; özellikle hematolojik malignansilerde sitogenetik ve moleküler sitogenetik analizlerin ardından daha büyük hasta serileriyle daha kapsamlı moleküler araştırmaların yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

10. Çalışmamız KTÜ BAP kapsamında desteklenen bir araştırma olup, hasta sayıları artırılarak, hem konvansiyonel hem de FISH analizleriyle yeni yapılanmalar tespit etmek amacıyla devam edecektir. Bu araştırma Doğu Karadeniz Bölgesinde yaşayan MM hastaları ile yapılan ilk sitogenetik çalışmadır ve bu çalışmadan elde edilecek verilerin daha sonra yapılacak çalışmalar için referans olacağını düşünmekteyiz.

7. ÖZET

Multipl Myeloma (plazma hücreli myelom, myelomatozis veya Kahler hastalığı) kemik iliğinde monoklonal immünglobulin (M protein) yapan plazma hücrelerinin tek bir klonunun kontrolsüz ve malign olarak çoğalmasıdır. MM'nin en önemli klinik belirtileri; kansızlık (anemi), litik kemik lezyonları, kemik ağrıları, kalsiyum yüksekliği (hiperkalsemi), böbrek fonksiyon bozukluğu serum ve idrarda görülen monoklonal protein biçimindedir. Multipl miyeloma, tüm malign hastalıkların yaklaşık %1'ini, tüm hematolojik malignansilerin ise %10'unu oluşturur. MM yıllık insidansı, yaklaşık 100.000'de 3-4'tür. En sık görüldüğü yaş grubu 65-70'dir. Hastaların sadece %5'inden azı 40 yaşın altındadır.

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji, Hematoloji Bilim Dalı ve Patoloji Anabilim Dalı işbirliği ile yürütülen bu çalışmada Multipl miyelomda kromozomal düzensizliklerin sitogenetik ve FISH yöntemleriyle belirlenmesi amaçlandı. FISH analizi ile; 13q14, bölgesindeki yapılmalar, 9, 11, 21 ve 22. kromozomlardaki sayısal anomaliler incelendi. Çalışma grubumuzu MM tanısı almış 28 olgu oluşturmuştur. Sitogenetik analiz olguların 17 tanesinde gerçekleştirilebilmiş olup; 8 hasta (%57) normal karyotip izlenirken 9 olguda (%52.93) kromozom anomalileri gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Multipl miyeloma, FISH (Floresan In Situ Hibridizasyon), Sitogenetik

8. SUMMARY

Detection of Chromosomal Aberrations in Multiple Myeloma by Cytogenetic and Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH)

Multiple myeloma (also described as plasma cell myeloma, myelomatosis, or Kahler's disease) is characterized by the neoplastic proliferation of a single clone of plasma cells producing a monoclonal immunoglobulin. MM is associated, particularly in the most advanced forms, with increasingly severe clinical manifestations, including lytic bone lesions, bone pains, hypercalcemia, anemia, immunodeficiency, and renal impairment. MM accounts for approximately 1% of all the malignant diseases and 10% of hematologic malignancies. The annual incidence of myeloma is 3 to 4 per 100,000. The median age at diagnosis for myeloma patients is approximately 65-70 years and less than 5% of patients are younger than 40 years of age.

In this study which was cooperated by Medical Biology, Hematology and Pathology Departments of Karadeniz Technical University Faculty of Medicine, it was aimed to Detection of Chromosomal Aberrations in Multiple Myeloma by Cytogenetic and Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH). FISH probes were used to detect 13q14 deletions and monosomy of chromosomes 9, 11, 21 and 22. Our study group included 28 myeloma patients. Conventional cytogenetic studies could be performed in 17 of cases. eight patients (57%) had normal karyotypes while nine patients (52.93%) showed chromosomal aberrations.

Key words: Multiple myeloma, FISH (fluoresan In situ Hybridisation), cytogenetics

9. KAYNAKLAR

1. Kyle, RA.: Classification and diagnosis of monoclonal gammopathies. Rose, NR., Friedman, H., Fahey, JL.,(eds): Manual of Clinical Laboratory Immunology. 3rd ed. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1986, p 152.
2. Offbrand, A. V., Moss, P. A. H., Pettit, J. E.: Essential Haematology. Fifth Edition. Blackwell Publishing 2006, pp 216-22
3. International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies Multiple Myeloma and related disorders. A report of the International Myeloma Working Group. Brj. Haematolo., (121), pp 749-757
4. http://www.multiplemyeloma.org/about_myeloma. Last Update 21 May 2009.
5. Wu, KL. Beverloo, B., Lokhorst, HM., Segeren, CM., Van der Holt, B., Steijaert, MM., Westveer, PH., Poddighe, PJ., Verhoef, GE., Sonneveld, P.: Dutch-Belgian Haemato-Oncology Cooperative Study Group (HOVON). Dutch Working Party on Cancer Genetics and Cytogenetics (NWCGC), Abnormalities of chromosome 1p/q are highly associated with chromosome 13/13q deletions and are an adverse prognostic factor for the outcome of high-dose chemotherapy in patients with multiple myeloma. Br J Haematol. 2007; 136(4): 615-23.
6. Kyle, R. A., Rajkumar, S. V.: Multiple myeloma. New England Journal of Medicine. 2004, (351), 1860-1873.
7. Williams , J.W., Beutler, E., Erslev, A.J., Lichtman, M. A.: Hematology. 4. Edition. McGraw-Hill Publishing Company. New York 1991 pp.1101-1108.
8. Riedel, DA., Pottern, LM.: The epidemiology of multiple myeloma. Hematol Oncol Clin North Am 1992; (6): 225-47.
9. Kyle, R. A.: Multiple myeloma. How did it begin? Mayo Clin Proc. 1994, (69): 680-683

10. Kyle, R. A. Subject Review Multiple Myeloma. Review of 869 Cases Mayo.Clin.Proc. 50, 1975, 29-40.
11. Kılıçturgay, Kaya.: İmmünoloji. Güneş ve Nobel Tıp Kitabevleri, 1997, s. 119-146.
12. Matanoski, GM., Seltser, R., Sartwell, PE., Daimond, EL., Eliot, EA.: The current mortality rates of radiologists and other physician specialists: specific causes of death. Am J Epidemiol 1975; (101) : 199–210.
13. Riedel, DA., Pottern, LM.: The Epidemiology of Multiple Myeloma. Hematol Onc. Clin. North Am 1992; 6(2): 225-47.
14. Tricot, G.: Multiple myeloma and other plasma cell disorders. Hoffman, R. (ed): Hematology-Basic and Principles and Practice 3 rd ed. Churchill-Livingstone, New York, 2000, p. 1398.
15. Özsan, GH.: Multiple Myelom Biyolojisi, Türkiye Klinikleri J Hem Onc-Special Topics,1, S:5-8, 9, 15. 2008.
16. Özbal, Yusuf.: Temel İmmünoloji. Nobel tıp Kitabevleri, 2. Baskı, 2000, s. 98-133.
17. Gülçin, Sungar.: Multipl Myelomlu Olgularda Kromozom Aberasyonların Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) ve Konvansiyonel Sitogenetik yöntemlerle belirlenmesi (Y. Lisans tezi). Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi. Eskişehir 2008.
18. Abbas, AK.,Lichtman, AH., Pober, JS. Celullular and Molecular Immunology. 2'nd ed. Philadelphia:W. B. Saunders;1994:80.
19. Gülmezoğlu, E. Ergüven, S.: İmmünoloji. Hacettepe Taş Kitapçılık Ltd. Şti. Ankara, 1994.
20. Zhang, XG., Bataille, R., Widjenes, J.: Interleukin-6 dependence of advanced malignant plasma cell dyscrasisas. Cancer, 1992, (69): 1373-1376.
21. Kyle, RA., Gertz, MA., Witzig, TE., Lust, JA., Lacy. MQ., Dispenzieri, A., et al.:Review of 1,027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. Mayo Clin Proc 2003;78:21–33.

- 22.** Richardson, Paul., Hideshima, T., Kenneth, C. Anderson.: Multiple Myeloma And Related Disorders. Abeloff: Clinical Oncology, Churchill Livingstone, An Imprint of Elsevier 3rd Ed. 2004.
- 23.** Kyle, RA., Rajkumar, SV.: Cecil Textbook of Medicine. 22nd. Edition. 2004.
- 24.** Durie, BG., Salmon, SE. 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.
- 25.** Ülkü, Birsen: Multipl myelom. Cerrahpaşa İç Hastalıkları. Yazıcı, Hasan, Hamuryudan, Vedat., Abdullah, Sonsuz. (Ed) İstanbul Medikal Yayıncılık, 1. Baskı, 2005 s. 217-222
- 26.** Fonseca, Rafael., San Miguel, Jesus.: Prognostic Factors and Staging in Multiple Myeloma. Hematol Oncol Clin N Am 21 (2007) 1115–1140
- 27.** Sezer, Orhan.: Multipl Myelom.Güncel tedavi. XXXI. Ulusal Hematoloji Kongresi, VIII. Mezuniyet sonrası eğitim kursu. s. 40-50.
- 28.** Bataille, R., Boccadoro, M., Klein, B., Durie, B., Pileri, A.: C-reactive protein and beta-2 microglobulin produce a simple and powerful myeloma staging system. Blood 1992;80:733–7.
- 29.** Celep, Figen.: Prostat Kanserli Hastalardan Alınan Biyopsi Materyallerinde Kromozomal Düzensizliklerin Doku Kültürü ve FISH Yöntemleriyle Belirlenmesi (Doktora tezi). Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi s.27-30 Trabzon 1999.
- 30.** Karaüzüm, S. Berker.: Hematolojik Malignansilerde Sitogenetik Türk Hematoloji Derneği Moleküler Hematoloji Kursu
- 31.** Celep, F., Karagüzel, A. Moleküler Sitogenetik Analiz-FISH (FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION) ve Uygulama Alanları. İbni Sina Tıp Dergisi 9:12-20, 2004.
- 32.** Başaran, Ayşe.: Tıbbi Biyoloji. Güneş ve Nobel Tıp Kitabevleri,7. Baskı, 2004. s. 238.
- 33.** Hideshima, Teru., P. Bergsagel, Leif., Kuehl, W. Michael., and Anderson, Kenneth C.: Advances in Biology of Multiple Myeloma: Clinical Applications, Blood. 2004, (104), 607-618.
- 34.** Loiseau, Herve Avet.: Role of Genetics in Prognostication in Myeloma. Best Practice & Research Clinical Haematology Vol. 20, No. 4, pp. 625–635, 2007.

35. <http://www.atlasgeneticsoncology.org>.
36. Kuehl, WM.: Multiple myeloma: Evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer* 2002, (3): 175.
37. Cherng, NC., Asal, NR., Kuebler, JB., Lee, ET., Solanki, D.: Prognostic factors in multiple myeloma. *Cancer*, 1991, (67): 3150-6
38. Sawyer, JR., Waldron, JA., Jagannath, S., et al: Cytogenetic findings in 200 patients with multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet* 1995, (82): 41.
39. Gonzalez, MB., Hernandez, JM., Garcia, JL., Lumbreras, E., Castellanos, M., Hernandez, JM., Fernandez-Calvo, J., Gutierrez, NC., San Miguel, JF.: The value of fluorescence in situ hybridization for the detection of 11q in multiple myeloma. *Haematologica*. 2004, 89(10): 1213-8.
40. Kowalczyk, JR., et al.: Cytogenetic Studies in Patient with Multiple Myeloma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1991, 155-73.
41. Nishida, K., Tamura, A., Nakazawa, N., Ueda, Y., Abe, T., Matsuda, F., Kashima, K., and Taniwaki, M.: The Ig Heavy Chain Gene Is Frequently Involved in Chromosomal Translocations in Multiple Myeloma and Plasma Cell Leukemia as Detected by In Situ Hybridization, *Blood J Org*, 1997: 526-533
42. Calasanz, MJ., Cigudosa, JC., Odero, MD., Ferreira, C., Ardanaz, MT., Fraile, A., Carrasco, JL., Sole, F., Cuesta, B., Gullon, A.: Cytogenetic analysis of 280 patients with multiple myeloma and related disorders: primary breakpoints and clinical correlations. *Genes Chrom Cancer*. 1997, 18(2): 84-93.
43. Liebisch, P., Döhner, H.: Cytogenetics and molecular cytogenetics in multiple myeloma. *Eur J Cancer*. 2006, 42(11): 1520-9.
44. Pratt, G.: Molecular aspects of multiple myeloma. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2002;55:273–283.
45. Cook, JR., Hartke, M., Pettay, J., Tubbs, RR.: Fluorescence in situ hybridization analysis of immunoglobulin heavy chain translocations in plasma cell myeloma using intact paraffin sections and simultaneous CD138 immunofluorescence. *Mol Diagn.* 2006, 8(4): 459-65.
46. Giovanni, Tonon.:Molecular Pathogenesis of Multiple Myeloma. *Hematol Onc. Clin. N Am.* 2007, (21). 985-1006

47. Fonseca, Rafael., Barlogie, Bart., Bataille, Regis, Bastard, Christian., P., Leif Bergsagel., Marta Chesi., Faith E., et al.: Genetics and Cytogenetics of Multiple Myeloma: A Workshop Report Cancer Research 64, 1546–1558, 2004.
48. Chen, L., Li, J., Xu, W., Qiu, H., Zhu, Y., Zhang, Y., Duan, L., Qian, S., Lu, H.: Molecular cytogenetic aberrations in patients with multiple myeloma studied by interphase fluorescence in situ hybridization. *Exp Oncol*, 2007, 29(2): 116-20.
49. Feinman R, Sawyer J., Hardin, j., Tricot, G., Cytogenetics and molecular genetics in multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin Nort Am*.1997, (11), 1-25.
- 50 Shaffer, L.G., Tommerup, N.: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN). S. Karger, Basel, 2005.
51. Richard Cook, PharmaD.: Introduction: Multiple Myeloma. *J Manag Care Pharm*, 2008;14(7)(suppl S):S4-S6.
52. Mohamed, Anwar N., Bentley Gail., L. Bonett, Michelle., Zonder, Jeff., Al-Katip, Ayad.: Chromosome aberrations in a series of 120 multiple myeloma cases with abnormal karyotips. *Am. J. Hematol.* 82:1080-1087, 2007.
53. Fonseca, R., Debes-Marun, C.S., Picken, E., Dewald, G. W., et al.: The recurrent IgH translocation are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma. *Neoplasia*. 102(7): 2562-2566, 2003.
54. Pearce, N. E., Et al. Case-Control study of Multipl myeloma and Farming, *Br. J. Cancer*, 54: 493, 1986.
55. Friedman, GD., Multiple Myeloma: Relation to propoxyphene and Other Drugs, Radiation and Occupation, *Int. J. Epidemiol.* Vol.15, No: 3 424,1986.
56. Dewald, G.W., Therneau, T., Larson, D., Lee, Y.K., Fink, S., Smoley, S., Paternoster, S., Adeyinka, A., Ketterling, R., Van Dake, D.L., Fonseca, R., Kyle, R., Relationship of patient survival and chromosome anomalies detected in metaphase and/ or interphase at diagnosis of myeloma, *Blood*, 2005, 106(10).
57. Cremer, F.W., Kartal, M., Hose, D., Bila, J., Buck, I., Bellos, F., Raab, M.S., Brough, M., Moebus, A., Hager, H.D., Goldshmidt, H., Moos, M., Batram, C.R., Jauch, A., High incidence and intraclonal heterogeneity of chromosome 11 aberration in patients with newly diagnosed multiple myeloma detected multiprobe interphase FISH, Germany, *Cancer Genetics and Cytogenetics* 161 2005,116-124.

- 58.** Kaufmann, H., Krömer, E., Nösslinger, T., Weltermann, A., Ackermann, J., Reisner, R., Bernhart, M., Drach, J., 2003, Both chromosome 13 abnormalities by metaphase cytogenetics and deletion of 13q by interphase FISH only are prognostically relevant in multiple myeloma, *Eur. J. Haematology*, 71: 179-183
- 59.** Königsberg, R., Zojer N., Ackemann, J., Krömer E., Kitler H., Fritz E., Kaufmann H., Nösslinger, T., Riedl L., Gisslinger, H., Jöger; U., Simonitsch, I., Heinz, R., Ludwig, H., Huber, H., and Drach, J., 2000, Predictive role of interphase cytogenetics for survival of patients with multiple myeloma, *Journal of Clinical Oncology*, Vol 18, No 4, February, pp 804-812.
- 60.** Smadja N.V., Bastard C., Brigadudeau C., Leroux D., Fruchart C. Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma, *Neoplasia*, 98(7) 2001, 2229-2237.
- 61.** Huang S.Y., Yao M., Tang J.L., et al. Clinical significance of cytogenetics and interphase fluorescence *in situ* hybridization analysis in newly diagnosed multiple myeloma in Taiwan, 16 2005, 1530-1538.