

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİYELODİSPLASTİK SENDROM HASTALARINDA 5q DELESYONUNUN FLORESAN IN SITU
HİBRİDİZASYON (FISH) VE KONVANSİYONEL SİTOGENETİK YÖNTEMİYLE TESPİTİ VE
KLİNİK ÖNEMİNİN ARAŞTIRILMASI

SEDA REKA

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü BİLİM

UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

KOCAELİ

2018

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİYELODİSPLASTİK SENDROM HASTALARINDA 5q DELESYONUNUN FLORESAN IN SITU
HİBRİDİZASYON (FISH) VE KONVANSİYONEL SİTOGENETİK YÖNTEMİYLE TESPİTİ VE
KLİNİK ÖNEMİNİN ARAŞTIRILMASI

SEDA REKA

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü BİLİM

UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Dr.Öğr.Üyesi Seda EREN KESKİN

KOCAELİ

2018

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

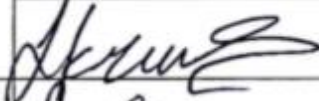
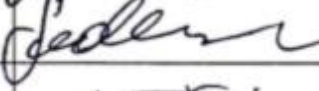
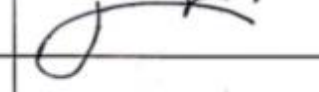
Tez Adı: Miyelodisplastik Sendrom Hastalarında 5q Delesyonunun Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) Ve Konvansiyonel Sitogenetik Yöntemiyle Tespiti Ve Klinik Öneminin Araştırılması

Tez yazarı: Seda REKA

Tez savunma tarihi: 28.06.2018

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Seda EREN KESKİN

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

SINAV KURULU ÜYELERİ		İMZA
ÜNVANI	ADI SOYADI	
BAŞKAN	Özden Hatirnaz Ng	
ÜYE(DANIŞMAN)	Seda Eren Keskin	
ÜYE	Naci Çine	
ÜYE		
ÜYE		

Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

..../..../2018

Prof.Dr. SEMA AŞKIN KEÇELİ

KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü Vekili

ÖZET

Miyelodisplastik Sendrom Hastalarında 5q Delesyonunun Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) Ve Konvansiyonel Sitogenetik Yöntemiyle Tespiti Ve Klinik Öneminin Araştırılması

Amaç: Yapılan araştırmalarda miyelodisplastik sendromda birçok kromozom anomalisi tanımlanmıştır. Bu anomaliler konvansiyonel sitogenetik ve FISH yöntemleriyle tespit edilebilmektedir. Miyelodisplastik sendromda; kromozom 8 trizomisi, 7q (7q22) delesyonu ve monozomisi, 5q (5q31.2) delesyonları, 20q (20q12) delesyonları ve kromozom Y kaybı gözlenmektedir. Amacımız; konvansiyonel sitogenetik ve FISH yöntemleri kullanarak, miyelodisplastik sendrom tanılı olgularda kromozomal anomalilerinin sıklığını belirlemek, prognoz ve tanıda bu iki yöntemin kullanımının avantaj ve dezavantajlarını karşılaştırarak tanıda en etkin stratejiyi belirlemektir.

Yöntem: Çalışmamızda, Temmuz 2013-Şubat 2017 tarihleri aralığında, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Anabilim Dalı'ndan yönlendirilen Miyelodisplastik Sendrom öntanımlı 143 olguda konvansiyonel sitogenetik ve FISH analizi sonuçları incelendi.

Bulgular: Çalışmamızda 143 olguya yapılan konvansiyonel sitogenetik analizden 74'ü (%51,7) gerçekleştirilebilmiştir. Sonucuna ulaştığımız olgulardan 61'inde (%82,4) normal karyotip verisine ulaşılmışken 13 olguda (%17,6) kromozom anomalileri saptanmıştır. Çalışmada 143 olguya yapılan FISH analizlerinin 27'sinde (%18,9) anomalilere rastlanmıştır. Bunların 11'inde (%7,7) kromozom 5'e ait anomaliler, 2'sinde (%1,4) kromozom 7'ye ait anomaliler, 5'inde (%3,5) kromozom 8'e ait anomaliler, 6'sında (%4,2) kromozom 20'ye ait anomaliler ve 3'ünde (%2,1) kromozom Y'ye ait anomaliler saptanmıştır.

Sonuç: Üzerinde çalıştığımız olgulardan elde ettiğimiz verilere göre Miyelodisplastik Sendrom'lu olgularda FISH yöntemiyle birlikte konvansiyonel sitogenetik yönteminin birlikte kullanılması, hastalığın takip ve seyri hakkında yorum yapabilmek açısından oldukça önemli olduğunu, tanısal gücünün değerini arttırdığını düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Miyelodisplastik sendrom, sitogenetik, FISH

ABSTRACT

Detection of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) and Conventional Cytogenetic Detection of 5q Delays in Myelodysplastic Syndrome Patients and Investigation of Clinical Trials

Objective: Several chromosomal anomalies have been identified in myelodysplastic syndrome. These anomalies can be detected by conventional cytogenetic and FISH methods. In myelodysplastic syndrome; chromosome 8 trisomy, 7q (7q22) deletion and monosomy, 5q (5q31.2), 20q (20q12), deletions and loss of chromosome Y are observed. Our aim; determine the most effective strategy in diagnosis by comparing the advantages and disadvantages of using these two methods in determining the frequency of chromosomal abnormalities in myelodysplastic diagnoses using conventional cytogenetic and FISH methods, prognosis and diagnosis.

Method: In our study, conventional cytogenetic and FISH analysis results were examined in 143 cases of Myelodysplastic Syndrome diagnosed in Kocaeli University Medical Faculty, Department of Medical Genetics, Kocaeli University Faculty of Medicine, Department of Hematology, between July 2011 and February 2017.

Results: In our study, 74 (51.7%) of the conventional cytogenetic analysis of 143 cases could be performed. As a result, chromosome anomalies were detected in 13 cases (17.6%) while 61 cases (82.4%) had normal karyotype data. In the study, anomalies were found in 27 (18.9%) of the FISH analyzes performed on 143 cases. Anomalies of chromosome 5 in 11 (7.7%), anomalies in chromosome 7 in 2 (1.4%), anomalies in chromosome 8 in 5 (3.5%), (4.2%) chromosome 20 anomalies and 3 (2.1%) Y anomalies were detected.

Conclusion: We think that the use of conventional cytogenetic method together with FISH method in cases with Myelodysplastic Syndrome increases the value of diagnostic power as it is quite important to interpret the follow-up and course of the disease according to the results obtained from the cases that we are working on.

Key words: Myelodysplastic syndrome, cytogenetic, FISH

TEŞEKKÜR

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

Çalışma hayatımın başlangıcından itibaren desteğini ve yardımlarını esirgemeyen, eğitim hayatım boyunca da engin bilgilerini paylaşmaya devam eden değerli hocam **Doç. Dr. Naci ÇİNE' ye**;

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca bilgileri ve deneyimleriyle beni yönlendiren, çalışma hayatımda da desteğini eksik etmeyen ve yol gösteren değerli danışman hocam **Dr.Öğr.Üyesi Seda EREN KESKİN'e**,

Çalışmamızın analiz kısmında bilgilerini benimle paylaşan arkadaşlarım;
Biyolog Buket DOĞRUOĞLU'na ve Biyolog Zeynep İLKAY'a,

Çalışma hayatımın başlangıcından itibaren beni her konuda destekleyen, yanımda olan, sonsuz sevgi ve hoşgörü gösteren öncelikle değerli hocam **Dr.Öğr.Üyesi Kudret Esen GÜMÜŞLÜ'ye** ve değerli arkadaşlarım **Laborant Tuba ÜNAL, Biyolog Gülhan DEMİR, Biyolog Pelin YURDAKUL'a** ve tüm laboratuvar ekibine;

Sevgi ve desteklerini hiç eksik etmeyen sevgili babam **Hasan ÖRÜN'e**, ablam **Hilal DELEN'e**, kardeşim **Fatih ÖRÜN'e**, sonsuz sevgi, sabır ve anlayışla hep yanımda olan eşim **Melih REKA'ya**, varlığına her gün şükrettiğim can oğlum **Ali REKA'ya**,

Ve her anımda yanımda hissettiğim melek annem **Semiha ÖRÜN'e** sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum...

Seda REKA

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ÇİZİMLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1-GİRİŞ	1
2-GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kanser ve Hematolojik Malignansiler	2
2.2. Miyelodisplastik Sendrom Nedir?	3
2.3. Hastalığın İnsidansı ve Oluşum Mekanizması	3
2.4. Hastalığın Sınıflandırılması	4
2.5. Hastalığın Tanısı	6
2.6. Klinik Bulgular	6
2.7. Prognostik Faktörler	7
2.8. Tedavi	9
2.9. Miyelodisplastik Sendrom'da Sık Gözlenen Kromozom Anomalileri	11
2.10. Miyelodisplastik Sendrom'da Genetik Analiz Yöntemleri	17
2.10.1. Sitogenetik Yöntemler	19
2.10.2. Moleküler Sitogenetik Yöntemler	20
3. AMAÇ	23
4.GEREÇ VE YÖNTEMLER	24
4.1. Kullanılan Solüsyonlar	24
4.2. Kullanılan Cihazlar	27
4.3. Kullanılan Malzemeler	28
4.4. Kullanılan Cam Malzemeler	28
4.5. Yöntemler	29
4.5.1. Kemik İliği Kültürü	29
4.5.2. Preparatların Hazırlığı, G-Bantlama ve Analiz	29
4.5.3. FISH Yöntemi ve Analizi	30
5. BULGULAR	32
5.1. Sitogenetik Bulgular	33
5.2. Moleküler Sitogenetik Bulgular	42
6. TARTIŞMA	49
7. SONUÇ VE ÖNERİLER	51
KAYNAKLAR DİZİNİ	52
ÖZGEÇMİŞ	55

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACHE: Asetil Kolinesteraz

AML: Akut Miyeloid Lösemi

ASNS: Aspargin Sentetaz

CGH: Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon

DNA: Deoksi Ribonükleik Asit

EGR1: Early Growth Response Protein 1

FAB: Fransız-Amerikan-İngiliz Sınıflaması

FISH: Floresan In Situ Hibridizasyon

IPSS: Uluslararası Prognostik Skorlama Sistemi

ISH: In Situ Hibridizasyon

KB: Kilobaz

KCl: Potasyum klorür

KMML: Kronik Miyelomonositik Lösemi

MB: Megabaz

MCV: Ortalama Eritrosit Büyüklüğü

MDS: Miyelodisplastik Sendrom

MGUS: Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance

MPS: Miyeloproliferatif Hastalıklar

P: Petit (Kromozomun kısa kolu)

PBS: Phosphate Buffer Salin

PHA: Fitohemaglutinin

PHD: Plazma Hücre Diskrazileri

PLANH1: Plasminogen Aktivatör İnhibitor 1

Q: Kromozomun uzun kolu

RA: Refrakter Anemi

RAEB: Blast Artışlı Refrakter Anemi

RAEB-T: Transformasyonda Blast Artışlı Refrakter Anemi

RARS: Ring Sideroblastlı Refrakter Anemi

RDW: Lökosit Hacmi

SSC: NaCl 7 Trisodyum Sitrata

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

WPSS: Dünya Sağlık Örgütü Prognostik Puanlama Sistemi



ÇİZİMLER DİZİNİ

Çizim 2.1. Kromozom 5'in idiogramı	13
Çizim 2.2. Çeşitli sinyaller tarafından EGR1 ekspresyonun uyarılması durumunda, farklı hücre tiplerinde farklı yanıtlar ortaya çıkmaktadır	14
Çizim 2.3. Kromozom 7'nin idiogramı	15
Çizim 2.4. Kromozom 8'nin idiogramı	16
Çizim 2.5. Kromozom 20'nin idiogramı	16
Çizim 2.6. Kromozom Y'nin idiogramı	17
Çizim 4.1. Cytocell - Del(7q) DeletionProbe şematik çizimi	26
Çizim 4.2. Zytovision – Zytolight EGR1/5p15 Dual Color Probe şematik çizimi	26
Çizim 4.3. Cytocell - Del (20q) Deletion Probe şematik çizimi	27
Çizim 5.1. 83 nolu olguya ait karyogram görüntüsü	36
Çizim 5.2. 8 nolu olguya ait karyogram görüntüsü	37
Çizim 5.3. 36 nolu olguya ait karyogram görüntüsü	38
Çizim 5.4. 65 nolu olguya ait karyogram görüntüsü	39
Çizim 5.5. 94 nolu olguya ait karyogram görüntüsü	40
Çizim 5.6. 112 nolu olguya ait karyogram görüntüsü	41
Çizim 5.7. FISH analizinde metafaz kromozomlarında ve interfaz nukleusunda sinyal görünümleri ve değerlendirmeleri	44
Çizim 5.8. 9 nolu olguya ait Cytocell - Del (7q) Deletion Probe FISH analizi görüntüsü	46
Çizim 5.9. 23 nolu olguya ait Cytocell - Del 20q (20q12) Deletion Probe FISH analizi görüntüsü	46

Çizim 5.10. 6 nolu olguya ait 5q (5q31.2) Zytovision – Zytolight EGR1/5p15 Dual Color Probe FISH analizi görüntüsü	47
Çizim 5.11. 83 nolu olguya ait 5q (5q31.2) Zytovision – Zytolight EGR1/5p15 Dual Color Probe FISH analizi görüntüsü	47
Çizim 5.12. 73 nolu olguya ait kromozom 8 trizomisi Zytovision – Zytolight CEN 8 Probe FISH analizi görüntüsü	48
Çizim 5.13. 11 nolu olguya ait kromozom Y kaybı Zytovision – Zytolight CEN X/Y Probe FISH analizi görüntüsü	48



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Hematolojik malignensiler	2
Çizelge 2.2. FAB çalışma grubu MDS sınıflaması	4
Çizelge 2.3. WHO MDS sınıflaması	5
Çizelge 2.4. IPSS ‘‘Uuslararası Prognostik Risk Puanlama Sistemi’’	8
Çizelge 2.5. IPSS’e Göre Genel Sağkalım ve Lösemiye Dönüşüm Olasılığı	8
Çizelge 2.6. Dünya Sağlık Örgütü Prognostik Puanlama Sistemi (WPSS)	8
Çizelge 2.7. R-IPSS prognostik puanlama sistemi	9
Çizelge 5.1. Miyelodisplastik Sendrom öntanlı olgulara ait yaş, cinsiyet ve ilgili hematolojik parametrelerin dağılımı	32
Çizelge 5.2. Karyotip analizi ile gözlenen anomalilerin oranları	33
Çizelge 5.3. Karyotip analizi ile gözlenen anomalilerin oranları	35
Çizelge 5.4. FISH yöntemiyle tespit edilen kromozom anomalilerinin dağılımı	43
Çizelge 5.5. Anomali gözlenen olguların FISH ve karyotip sonuçları	45

1.GİRİŞ

Myelodisplastik sendrom (MDS), kemik iliğinde normal olmayan hücresel çoğalmalar veya çevresel kanda görülen sitopenilerle ayırıcı özelliği bulunan bir yada birden çok seride displazi ile seyreden homojen olmayan klonal kök hücre hastalığı olarak tanımlanmaktadır. Hücresellik seviyesi kemik iliğinde yükselmiş olarak saptansa da aktif olmayan alyuvar yapımından dolayı kandaki hücre seviyesi azalmaktadır. MDS uzun süre herhangi bir bulgu veya belirti göstermeksizin kalabilir yada akut myeloid lösemi gelişimi izlenebilmektedir.

MDS tanımı yaklaşık 100 yıldır kullanılsa da kısa süredir bilimsel sınıflandırma uygulanmaya başlandığı görülmektedir. İlk olarak 1976'da FransızAmerikan-İngiliz İşbirliği Grubu (FAB), belirli bir grup hastalığı MDS şeklinde tanımlamış ve AML'den farklı olduğunu göstermek için ilk sınıflandırma ve tanı kılavuzunu oluşturmuştur. 6 yıl sonra alt gruplar belirlenerek bu sınıflandırmaya eklenmiş ve şu anda kullanılan haline gelmiştir(Bennett JM,1982). 2008'de Dünya Sağlık Örgütü (WHO), FAB kullanımını arttırmak için 2001 yılından itibaren kullanılan sınıflandırmayı revize etmiştir(Vardiman JW,2009). Günümüzde WHO sınıflama sistemi kullanılır.

MDS'de prognostik sınıflama yapılır. Bu sınıflamada sitogenetik bulgular oldukça önemlidir. Hücrede gelişen bazı değişiklikler MDS'nin alt tiplerini belirlemede hemen hemen patognomiktir ve tedavinin belirlenmesi açısından önemlidir.

Bu çalışmada; FISH ve konvansiyonel sitogenetik analiz yöntemleriyle myelodisplastik sendrom öntanısı ile gelen olgularda kromozomal anomalileri saptamak, karşılaşma sıklığını elde etmek, çeşitli düzenlemelerle sendromun prognozu ve kliniğe etkisini belirlemek amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser ve Hematolojik Malignansiler

Kanser, genlerin mutasyona uğraması sonucu oluşan genetik bir rahatsızlıktır. Hücre, sağlıklı bölünme mekanizmalarının genetik hasara uğraması sonucu bu yeteneğini kaybederek kontrolsüz bölünmeye başlar ve kanseri oluşturur (Ferlay ve diğ. 2013)

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

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

Çizelge 2.1 Hematolojik malignansiler

Lösemiler	Akut Lösemiler
	Kronik Lösemiler
Myeloproliferatif Hastalıkları	
Miyelodisplastik Sendrom	
Lenfomalar	Hodgin Lenfoma
	Nonhodgin Lenfoma
Plazma Hücre Diskrazileri (PHD)	Multipl Miyelom
	MGUS
	Waldenström Makroglobülinemisi
	Ağır Zincir Hastalıkları
	Amiloidoz

2.2. Miyelodisplastik Sendrom Nedir?

Miyelo ve displazi kelimelerinin birleşmesinden oluşan Miyelodisplastik Sendrom (MDS), kemik iliğinde yapılan kan hücrelerinin anormal olup normalden farklı bir gelişim gösterdiği ve kan hücrelerinin olgunlaşmadığı, primer veya sekonder gelişebilen multipotent bir kök hastalığıdır (Bennet ve diğ. 1982). Bu hastalarda kan yapımındaki belirgin azalmanın sonucu olarak; kan hücrelerinin fonksiyonlarında ve anemiye sebep olan kırmızı kan hücrelerinin sayılarında azalma meydana gelmektedir. MDS içinde değerlendirilen bazı alt gruplarda diğer hematolojik kanserlere dönüşüm gözlenebilmektedir. Daha öncelerde bu hastalık; refrakter anemi, prelösemik anemi, prelösemi, refrakter normoblastik anemi, smoldering akut lösemi, subakut lösemi, hipoplastik akut lösemi ve hematopoetik displazi gibi değişik isimlerle de anılmıştır.

2.3. Hastalığın İnsidansı ve Oluşum Mekanizması

Çoğunlukla ileri yaş hastalığı olarak bilinen MDS’de tanı sırasında hastaların yaş ortalamaları 65-70 olarak belirtilmektedir. Hastaların yalnızca %10’dan daha azı 50 yaş ve altındadır. Genellikle erkeklerde daha sık görülen bu kanser türünün yıllık insidansı her 100.000 kişide 4 olarak belirlenmiştir. Fakat yaş ilerledikçe bu oran değişebilmektedir (Neukirchen ve diğ. 2011). Hastalığa sebep olarak gösterilen etnik bir yatkınlık yoktur ancak Asya popülasyonunda diğer popülasyonlara göre hastalık daha erken yaşlarda ortaya çıkabilmektedir.

Miyelodisplastik Sendrom’un oluşum sebebi tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Hastalığın oluşumunda, boya sanayi ve ayakkabıcılıkta kullanılan benzenin ilişkisi öngörülmektedir (Nisse ve diğ. 2001). Bazı hastalıkların tedavisinde kullanılan; siklofosamid, klorambusil, melfalan, etoposide gibi ilaçlar, radyoterapi ve kemoterapi sonrasında MDS ortaya çıkabilmektedir (Cardis ve diğ. 2005). Alkol bağımlılığı, kurşun zehirlenmesi, tüberküloz ilaçlarının kullanımı sırasında veya sonrasında MDS gelişebilmektedir.

2.4. Hastalığın Sınıflandırılması

Miyelodisplaziler, çeşitli derecelerde anemi, trombositopeni ve lökopeni ile seyreden kemik iliği yetmezliği durumudur. MDS'deki klinik bulgular tek tip sitopeni ve bununla birlikte gelişen komplikasyonlarla oluşmaktadır. MDS'li bir grup hastada Akut Miyeloid Lösemiye (AML) dönüşüm gözlenebilmektedir. MDS ilk olarak 1976'da Fransız-Amerikan-İngiliz (FAB) bilim adamları "Dismoyelopoietik Sendrom" olarak tanımlanmıştır (Bennet ve diğ. 1976). Yine FAB bilim adamları 1982'de MDS'yi beş farklı tipe ayırarak yeni bir sınıflandırma geliştirmiştir. Bu sınıflandırmada yer alan MDS tipleri; Refrakter Anemi (RA), Ring Sideroplastlı Refrakter Anemi (RARS), Blast Artışlı Refrakter Anemi (RAEB), Transformasyonda Blast Artışlı Refrakter Anemi (RAEB-T), Kronik Miyelomonositik Lösemi (KMML) olarak tanımlanmıştır (Bennet ve diğ. 1982).

AML tanısı için perifer kanı ve/veya kemik iliği materyalinin %30'undan fazlasında miyeloblast olması gerekmektedir. RA ve RARS gibi %30'dan çok daha az miktarda miyeloblasta sahip hastalar miyelodisplazili olarak adlandırılmaktadır. Bu hastaların ortalama sağkalımları diğer hastalara göre daha uzun ve AML'ye dönüşümleri daha düşük olasılıkla gerçekleşmektedir. RAEB ve RAEB-T'li hastaların kemik iliği materyallerinde %5-20 ile %21-30 oranları aralığında miyeloblast bulunmaktadır. Bu hastalarda daha ağır sitopeni vardır ve AML'ye dönüşümleri daha yüksek olasılıkla gerçekleşmektedir.

Çizelge 2.2. FAB çalışma grubu MDS sınıflaması

Tip	Görülme Sıklığı	Kemik İliğinde Blast	Ring Sideroplast	Monositoz (>1000/mm ³)	AML'ye dönüşüm
RA	% 15-30	<%5	<% 15	nadir	10%
RARS	% 10-15	<%5	>% 15	nadir	5%
RAEB	% 25-30	%5-20	değişik	nadir	45%
RAEBT	% 20-29	% 20-30	değişik	değişik	60%
KMML	% 10-20	<% 20	değişik	artmış	15%

MDS'de sitogenetik değişimlerin prognostik önemi araştırıldıkça FAB sınıflandırılmasının yetersiz olduğu düşüncesine varılmıştır. Sitogenetik analiz ile tespit edilebilen; iyi prognoz olarak nitelendirilen 5q delesyonu ve kötü prognoz olarak değerlendirilen monozomi 7 gibi genetik değişimlerin de sınıflandırmada yer

alması gerektiği kanısına varılmıştır. Bu nedenle 2001 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yeni bir sınıflandırma geliştirilmiştir (Giagounidis ve Haase, 2013). WHO sınıflamasıyla birlikte RAEB-T ve KMML çıkarılmış, KMML miyelodisplastik/miyeloproliferatif (MPS) hastalıklar grubuna dahil edilmiştir. Kemik iliği blastının %20'den fazla olması durumu AML olarak nitelendirilmiştir. Lökosit oranı $13000/\text{mm}^3$ 'den küçükler miyelodisplazi, büyükler de MPS grubuna dahil edilmiştir. Blast oranının %1-5 ve %11-19 olmasına göre RAEB, kemik iliği granulositik ve/veya megakaryositik dizilerinde displazi varlığına göre RARS ve RA iki gruba ayrılmıştır. Ek olarak, dizplazinin bir veya birden fazla hücre dizisinde varlığına göre de RA ve RARS kendi içlerinde tek ve çok dize displaziye ayrılmıştır. Bu displazilerin AML riski taşıdığı belirlenmiştir.

Çizelge 2.3. WHO MDS sınıflaması

Tip	Çevresel Kan	Kemik İliği
1A- Displazisiz RA	Blast < %1, Monosit < $1000/\text{mm}^3$	Blast < %5, Ring Sideroblast < %15
1B-Displazili RA	Disgranülosit, Dev Trombositler	Disgranülosit, Dismegakaryosit
2A-Displazisiz RARS	Blast < %1, Monosit < $1000/\text{mm}^3$	Blast < %5, Ring Sideroblast \geq %15
2B-Displazili RARS	Disgranülosit, Dev Trombositler	Disgranülosit, Dismegakaryosit
3A-RAEB-1	Blast < %1-4, Monosit < $1000/\text{mm}^3$	Blast %5-9
3B-RAEB-2	Blast < %5-19, Monosit < $1000/\text{mm}^3$	Blast %10-19
KMML	Blast < %1-19, Monosit > $1000/\text{mm}^3$	Blast %0-19

MDS'de önemli sitogenetik değişimlerden olan 5q sendromu iyi prognoz olarak nitelendirilmesi sebebiyle ayrı bir grup olarak tanımlanmıştır. 5q sendromu olarak nitelendirilen bu grupta; yaşı bayanlar, tedaviye direnç gösteren makrositik anemi, normal ve/veya artmış trombosit sayısı, morfolojik değişkenlik gösteren artmış megakaryosit varlığı ve daha düşük olasılıkla AML'ye dönüşüm vardır.

WHO sınıflamasının MDS'ye getirileri henüz tam olarak net olmasa da kabul gören FAB sınıflamasının standartını arttırdığı düşünülmektedir.

2.5. Hastalığın Tanısı

Miyelodisplazi tanısı için; çevresel kanda sitopeni ve kemik iliği materyalinde karakteristik dismorfik tablonun tespiti gerekmektedir (Pisani ve Rainaldi, 2001). FAB işbirliği grubunun sınıflamasındaki kriterler temelinde tanı ve sınıflamalar yapılmaktadır ve bunların tümü hastalığın sınıflandırılması bölümünde detaylı şekilde bahsedilmiştir.

Displazilerin değerlendirilmesinde MayGrünwald Giemsa ile boyanmış periferik ve kemik iliği aspirasyonu materyali yaymaların değerlendirilmesi gerekmektedir. Ayrıca kemik iliği aspirasyonu materyali; miyeloblastların ve diğer hücrelerin morfolojik-sayısal değerlendirilmeleri için; aspirasyon biyopsi materyali de hücreliliğin değerlendirilmesi için gerekmektedir. Periferik yaymada; MDS'li hastalarda sitopeni bir veya birden fazla seride görülebilmektedir. Eritrosit hacmi >100 fl olabilmekte ve eritrositlerde Howell Jolly cisimleri, Cobbott halkaları ve bazofilik noktalanmalar görülebilir. Nükleuslu olan eritrositler displastik değişiklikleri gösterebilir. İmmatür granülositler periferik kanda görülebilir. MDS'de monosit sayısında artış gözlenebilir. Monositoz; kronik miyelomonositik lösemiye karakterize bir oluşumdur.

Kemik iliğinde önemli üç özellik aranmaktadır. Bunlar; selülarite, blast ve ringed sideroblast sayısı, displastik değişikliklerin varlığıdır. Kemik iliği normal veya hiperselülerdir. Blast sayısı ve ringed sideroblast sayısı MDS subtipini belirlemede önemli belirteçlerdendir.

2.6. Klinik Bulgular

MDS'li hastalarda, hematopoez yani vücuttaki kan yapımı organizasyonunun bozukluğunun derecesi ile MDS sınıflanmasına bağlı olarak değişik klinik bulgular karşımıza çıkabilmektedirler. Bu hastalarda ilk klinik belirtiler; anemi ile birlikte gelen iştahsızlık ve halsizliktir. Trombosit ve beyaz kürenin fonksiyonel ve sayısal anormallikleri derecelerine bağlı kalarak kanama ve enfeksiyonun sebebiyet verdiği ateş görülebilmektedir. Bu hastalarda sadece MDS'ye özgü olmayan; anoreksi, kilo kaybı, karın şişkinliği gibi bulgular da görülebilmektedir (Beers ve Berkow, 1999).

MDS'li hastaların laboratuvar kan sayımı sonuçlarında; MCV ve RDW yüksek oranda gözlenmektedir. Kan yayma sonuçlarında ise çeşitli oranlarda; trombositopeni

ve trombosit gözlenmektedir. Nötrofil sitoplazmik granülaritesi ve eozinofil granülasyonu bozulmuştur.

Yapılan sitogenetik ve moleküler sitogenetik çalışmalarda MDS’de birçok genetik anomali bildirilmiştir. MDS’de en sık görülen kromozom anomalileri; kromozomun delesyona uğraması veya bütün kromozomun kaybıdır. MDS’li olgularda sıklıkla; trizomi 8, 5q, 7q, 20q delesyonları ve Y kromozom kaybı gözlenmektedir (Steensma, 2008).

2.7. Prognostik Faktörler

FAB ve WHO sınıflama sistemleri tek başına hastalığı prognostik olarak sınıflamak açısından yeterli değildir (Greenberg ve diğ. 1997). Uluslararası Prognostik Skorum Sistemi (IPSS) ile MDS hastaları için uygun prognostik sınıflandırma daha iyi yapılabilmektedir. Bu noktada tanı için FAB sınıflaması kullanılmış, sitogenetik ve klinik bulgular da skorum sisteminde yer almıştır. MDS’de; klinik, laboratuvar, genetik değişimler ve immunfenotipik olarak çok sayıda prognostik faktör tanımlanmıştır ancak sağkalım ve lösemiye dönüşüm yönünden istatistiksel veriler anlamlıdır. Bu ölçüde aralarında istatistik olarak anlamlı fark olan üç prognostik risk grubu belirlenmiştir.

Kompleks karyotip (3 ve daha fazla anomali) ve kromozom 7 anormalilerinin birarada tanımlandığı kötü risk, trizomi 8 orta risk ve normal karyotip, izole kromozom Y kaybı, 5q ve 20q delesyonları iyi risk olarak gruplandırılmıştır. Ortalama sağkalım süreleri iyi, orta ve kötü prognoz gruplarındaki hastalar için sırayla; 160, 30 ve 15’er olarak tahmin edilmektedir. AML’ye dönüşüm sonucunu belirlemede önemli değişkenler; kemik iliğindeki blast oranı, sitopeni varlığı ve sitogenetik değişiklikler olarak belirlenmiştir. Bu veriler doğrultusunda IPSS’de 0 ile 2,5 arasındaki puanlara göre düşük, orta-1, orta-2 ve yüksek olarak dört farklı risk grubu belirlenmiştir.

Çizelge 2.4. IPSS ‘‘Uuslararası Prognostik Risk Puanlama Sistemi’’

Prognostik Değişkenler/Skor	0	0,5	1	1,5	2
Kemik İliğindeki Blast Oranı	<5		% 11-20	% 21-30	
Karyotip*	İyi	Kötü			
Sitopeni**	0/1				

*İyi: Normal ya da izole -5q, -Y, -20q, Orta: Diğer anormallikler, Kötü: 7, kompleks (≥3) anormallik

**Nötrofil:< 1500/mm³, Hb: <10g/dl, Trombosit:<100000/mm³

Çizelge 2.5. IPSS’e göre genel sağkalım ve lösemiye dönüşüm olasılığı

Risk Grubu	Skor	Ortalama Sağkalım (Yıl)	AML'ye Dönüşüm (Yıl)
Düşük	0	5.7	9.4
Orta-1	0.5-1	3.5	3.3
Orta-2	1.5-2	1.2	1.1
Yüksek	≥2.5	0.4	0.2

Dünya Sağlık Örgütü Prognostik Puanlama Sisteminin (WPSS) sınıflaması ve hastaların transfüzyon gereksinimini göz önüne alarak yeni bir risk sınıflama sistemi oluşturulmuştur.

Çizelge 2.6. Dünya Sağlık Örgütü Prognostik Puanlama Sistemi (WPSS)

Değişken	0	1	2	3
DSÖ	RA, RARS, İzole -5q	RCMD, RCMD-RS	RAEB-1	RAEB-2
Karyotip*	İyi	Orta	Kötü	
Anemi	Yok	Var		

*İyi: Normal ya da izole -5q, -Y, -20q, Orta: Diğer anormallikler, Kötü: 7, kompleks (≥3) anormallik

Çizelge 2.7. R-IPSS prognostik puanlama sistemi

Değişken	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Sitogenetik*	Çok iyi		İyi		Orta	Kötü	Çok kötü
Kemik İliğindeki Blast Oranı	≤%2		>%2≤5		%5-10	>%10	
HGB (g/dL)	≥10		8≤10	<8			
PLT (x1000/mm3)	≥100	50≤100	<50				
Nötrofil (x1000/mm3)	≥0.8	<0.8					

Çok düşük: ≤1.5, Orta: >3-4.5, Yüksek: >4.5-6, Çok Yüksek: >6

2.8. Tedavi

MDS tanılı hastalarda çoğu minimum düzeyde etkili olabilen birçok tedavi yaklaşımı bulunmaktadır. MDS tedavisi hastanın bulunduğu alt grup ve prognostik değerine göre planlanmalıdır. Temel tedavi prensipleri; sağkalımı uzatma, lösemiye dönüşümü erteleme, enfeksiyonların azaltılması ve kontrolü, hayat kalitesini arttırmaktır. Çok daha genç ve sağlık durumu müsait olan hastalarda uzun süre sağkalım için bilinen tek tedavi yaklaşımı allojenik kemik iliği transplantasyonudur. Bu tedavi dışındaki tedavi yaklaşımları destek tedavilerini içermektedir. Tedavi risk grubuna göre belirlenir. IPSS sınıflamasına göre düşük ve orta-1 grup düşük, orta-2 ve yüksek grup ise yüksek risk olarak belirlenmiştir.

Allojenik Kemik İliği Transplantasyonu

MDS tedavisinde allojenik kemik iliği transplantasyonu önemli küratif tedavi seçeneğidir. Genellikle, orta-1 risk grubuna dahil olup; genç, tedavilere yanıt vermemiş hastalara ve orta-2 ve/veya yüksek risk grubundaki hastalara önerilmektedir. Her ne kadar MDS’de kök hücre defektinin ve malign klonun yok edilmesi yolu seçilmiş hastalarda %60’a yakın oranlarda kür sağlanabilir bir tedavi seçeneği olsa da, mevcut hastaların çoğunun 60 yaş ve üzeri olması, mevcut komorbiditeleri nedeniyle bu tedavi modalitesinin yaygın olarak kullanımı henüz mümkün görülmemektedir.

Destek Tedavisi

MDS'de anemi için; eritrosit süspansiyonu, enfeksiyonlar için antibiyotik ve trombositopeniler için trombosit transfüzyonu tedavileri destek tedavileri olarak verilmektedir. Çok sık transfüzyon uygulanan hastaların demir oranlarının yükselmesi ihtimaline karşı gerektiğinde demir bağlayıcı ve C vitamin tatbiki yapılmalıdır (Tricot ve diğ. 1987).

İmmünesüpresif İlaçlar

Semptomatik anemisi ve sitopenisi olan, IPSS'ye göre düşük risk grubundaki MDS hastalarında ve izole ve/veya diğer sitogenetik değişikliklerle birlikte 5q delesyonuna sahip hastalara lenalidomid önerilmektedir. Kök hücre nakil adayı olan genç hastalarda kök hücrelerin rezervlerini koruyabilmek adına lenalidomid tedavisinden kaçınılmalıdır.

Konvansiyonel tedavilere yanıt vermeyen hastalara talidomid tedavisi başlanabilmektedir. MDS'nin RA alt tipinde fayda sağlayabilmektedir.

MDS'nin RA alt tipinde; anemi, transfüzyon bağımlılığı, trombositopeni, sık enfeksiyon bulguları olan ve yaşı 60'tan düşük IPSS skoru orta-1 olarak belirlenmiş, kemik iliğindeki blast sayısı %5'ten küçük olan hastalara antitimosit globulin-siklosporin önerilmektedir.

Hipometile Edici İlaçlar

IPSS skorlarmasında orta-2 ve/veya yüksek risk grubuna dahil edilmiş hastalarda azasitidin tedavisi uygulanabilmektedir. Bu tedavi aynı zamanda; IPSS skorlarmasında orta-1 grubuna dahil olup sitopenilere sahip, standart tedavilere yanıt vermeyen ve kök hücre nakli şansı olmayan hastalarda köprü tedavisi olarak kullanılabilir.

IPSS skorlarmasına göre orta-2 ve yüksek risk grubuna dahil ve kemik iliği nakli şansı olmayan ve blast sayısı %20-30 oranındaki hastalarda desitabin tedavisi uygulanabilmektedir.

2.9. Miyelodisplastik Sendrom'da Sık Gözlenen Kromozom Anomalileri

Hücrelerin normal davranışlarını kontrol altına alan genetik mekanizmanın bozulması sonucu kanser hastalığı oluşmaktadır. Araştırmalar sonucunda hücrelerin normal davranışlarındaki bu değişimlerin kromozom anomalilerinin neden olduğu bildirilmektedir (Sandberg 1994). Kansere neden olan bu genetik bozukluklar çoğu hematolojik malignansilerde olduğu için miyelodisplastik sendromda da prognozu etkilemesi açısından önem teşkil etmektedir. Bu sebeple tanı almış miyelodisplastik sendrom hastalarında sitogenetik analiz oldukça önemlidir ve mutlaka yapılmalıdır.

Kromozom anomalileri, sayısal ve yapısal anomaliler olarak iki farklı şekilde oluşabilmektedir.

Sayısal anomaliler

Öploidi: Hücreler normalde diploid ($2n=46$ kromozom) yapıdadırlar. Yirmi üç (n) kromozomun katlarının olması hali öploidi olarak tanımlanmaktadır.. Yirmi üç kromozoma haploid (n), iki katına diploid ($2n$), üç katına triploid ($3n$), dört katına ise tetraploid ($4n$) denir. İki katından fazla n kromozomun katlarının bulunması hali poliploidi olarak tanımlanır. Triploidi ($3n=69$), yumurtanın iki farklı sperm ile döllenmesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Tetraploidi ($4n=92$), hücrede bölünme olmazken nükleer bölünmenin görülmesidir (Robert L. Nussbaum, 2005).

Anöploidi: Hücrede diploid ($2n$) sayıda kromozom bulunması gerekirken, n katlarından daha çok yada daha az kromozom bulunması durumuna denir. Bu durumun hücre çoğalması sırasında ayrılamama (non-disjunction) durumundan ileri geldiği yada kromozomların ayrılma safhasında geri kalma durumundan ortaya ıktığı düşünülmektedir (Yirmibeş Karaoğuz M, 2007).

Hipoploidi: Hücrede bir kromozomun yada bir kromozom çiftinin olmaması durumuna denir. Eğer eksik olan tek bir kromozomsa bu duruma monozomi, şayet eksik olan bir çift kromozomsa bu duruma nullizomi denir.

Hiperploidi: Hücrede bulunan bir kromozom çiftinden başka aynı kromozomdan bir yada birden fazla olması durumuna hiperploidi denir. Şayet kromozom çiftine bir

kromozom eklenirse bu duruma trizomi, iki kromozom eklenmesi durumuna da tetrazomi denmektedir.

Miksoplloidi: Bu durum iki şekilde karşımıza çıkmaktadır. Bunlar kimerizm ve mozaisizmdir. Mozaisizm, tek bir zigottan meydana gelen iki veya ikiden daha fazla farklı hücre dizilerinin varlığıdır. Kimerizm ise, iki yumurtanın birleşmesi ve aralarında hücre değişimi olması neticesinde meydana gelir.

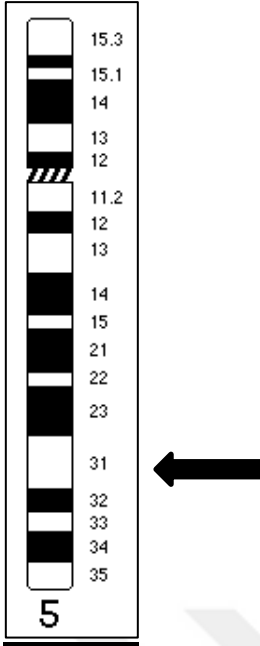
MDS'li hastalardaki genetik değişimler genellikle heterojenite göstermektedir. Hastaların %30-60'ında normal karyotip izlenmektedir. Uluslararası MDS risk değerlendirme çalışmasında normal karyotipe sahip hastaların olumlu risk grubu hastalarından sayıldığı bilinmektedir (Greenberg ve diğ. 1997).

Yapılan sitogenetik ve moleküler sitogenetik çalışmalarda miyelodisplastik sendrom için de birçok genetik anomali bildirilmiştir. MDS'de en sık görülen kromozom anomalileri; kromozomun delesyona uğraması veya bütün kromozomun kaybıdır. Bu kromozom anomalileri ise IPSS tarafından saptanan; kromozom 8 trizomisi, delesyon 5q31.2, delesyon 7q22, delesyon 20q12 ve Y kromozomunun kaybıdır (Steensma, 2008).

Delesyon 5q31.2

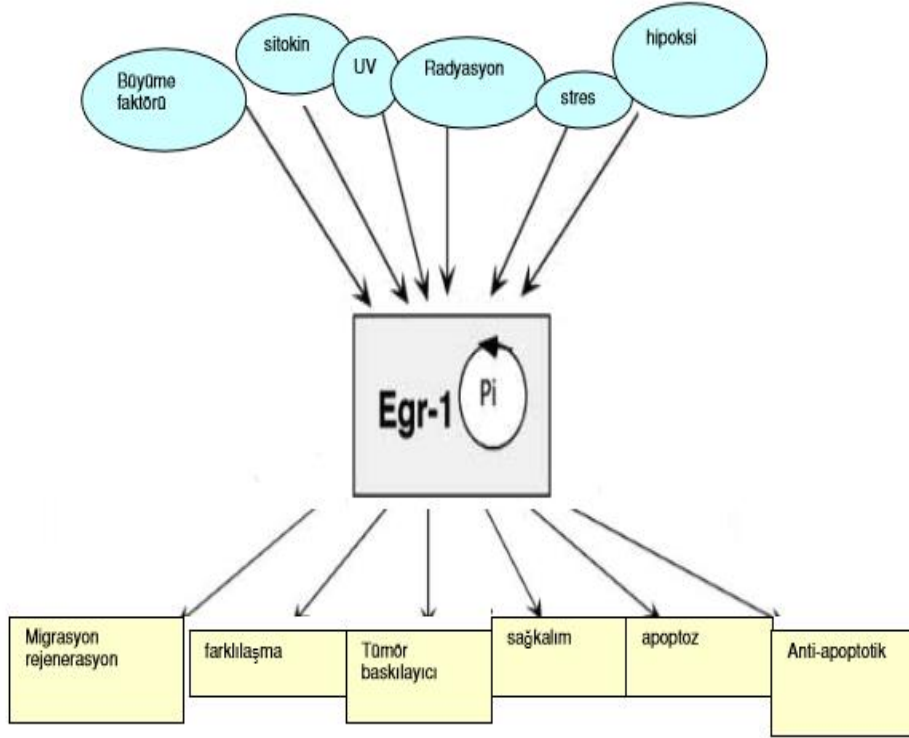
Kromozom 5'in uzun kolunda q31.2 lokusunda yer alan EGR1 geninin delesyonu veya kromozom 5 monozomisi akut miyeloid lösemi (AML) ve miyelodisplastik sendrom gibi farklı hematolojik malignitelerde gözlenmektedir (Charrin, 1998).

MDS'li hastaların yaklaşık olarak %10-15'inde izole veya diğer kromozom anomalileriyle birlikte saptanan bu genetik değişim hastalığın prognozunun belirlenmesinde önemlidir. Klinik olarak 5q31.2 delesyonu diğer sitogenetik anomalilerle birlikte lösemnin erken gelişimine, tedaviye karşı direnç ve kısa yaşam süresine sahip olması nedeniyle kötü prognoz olarak değerlendirilmektedir. Yapılan çalışmalarda 5q31.2 delesyonu saptanan hastalara özel ilaç tedavisi belirlenmekte, lenalidomid gibi immunomodülatör ilaçların tedavide etkin olduğu gösterilmiştir (Belickova ve diğ. 2012).



Çizim 2.1. Kromozom 5'in idiogramı

EGR1 geni, erken büyüme yanıtı faktörü olarak bilinmektedir. NGFI-A, Zif268, Krox 24 ve Tis8 olarak da adlandırılmaktadır. Kromozom 5q31 kolunda yer almaktadır. Egr1 hücre farklılaşması ve hücre proliferasyonunda rol oynamaktadır. EGR1 geni tarafından kodlanan EGR1 proteini C2H2-tip çinko parmak proteinlerinden EGR ailesinin üyesidir. EGR gen ailesi dört üyeden oluşmaktadır. Bunlar, EGR1, EGR2, EGR3 ve EGR4 genlerinden oluşmaktadır. EGR gen ailesinin DNA'ya bağlanan bölgeleri homoloji gösterip, diğer bölgeleri çok az homoloji göstermektedir. Genellikle EGR gen ailesinin bütün üyeleri büyüme faktörleri ile uyarılmaktadır. EGR1 diğer EGR ailesinin üyelerini kontrol etmektedir. EGR1 hücre çekirdeğinde yer alan bir protein olup bir transkripsiyon faktörü olarak görev yapmaktadır. EGR gen ailesinden en çok EGR1 çalışılmaktadır. EGR1 hücre dışından gelen bir çok sinyal ile uyarılmaktadır.



Çizim 2.2. Çeşitli sinyaller tarafından EGR1 ekspresyonunun uyarılması durumunda, farklı hücre tiplerinde farklı yanıtlar ortaya çıkmaktadır.

EGR1'i uyarın faktörlerden olan büyüme faktörleri oldukça önemlidir. İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve hepatosit büyüme faktörü (HGF) EGR1 uyarımında rol alan büyüme faktörlerindedir (Houston P. ve diğ. 2001).

Delesyon 7q22

7q delesyonu MDS'de en sık tespit edilen sitogenetik değişikliklerdendir. MDS tiplerinden; RAEB, RAEB-T'de %30, KMML'de %20 ve RA'da %5 oranlarında gözlemlenen, enfeksiyonlara yatkınlık ve tedaviye direnç ile karakterize bir değişimdir. Erkek/kadın oranı: 1,5/1 olup, yaş ortalaması 60 yaş ve üzeri olarak belirlenmiştir (Desangles, 1999). MDS ve AML'den hariç diğer konstitüsyonel bozukluklara eşlik eden miyeloid hastalıklarda da gözlenmesi miyeloid lösemi süpressör gen delesyonuna neden olabileceğini düşündürmektedir. -7 olan MDS'de Ras geni mutasyonu, NF1 gen kaybı önemli noktayı oluşturmaktadır. Bu bölgede

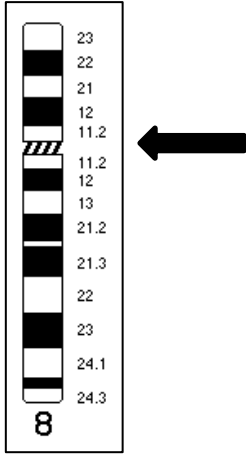
ASNS (Aspargin Sentetaz), ACHE (Asetil Kolinesteraz), PLANH1 (Plasminogen Aktivatör İnhibitor 1) ve EPO genlerinin kodlandığı bilinmektedir. 7q delesyonu ile p170 MDR ekspresyonunun arttığı ve bu nedenle de 7q22 bölgesinin DNA tamir genlerini kodladığı belirlenmiştir (Johnson ve Cotter, 1997).



Çizim 2.3. Kromozom 7'nin idiogramı

Kromozom 8 Trizomisi

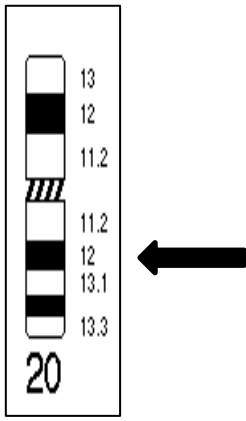
MDS'de kromozom 8 trizomisi; hastaların yaklaşık %15-20'sinde ve RA, RARS, RAEB-T ve KMML olmak üzere tüm MDS alt gruplarında gözlenebilmektedir. RARS alt grubunda bu oran %30'a çıkabilmektedir. Trizomi 8; %55 oranda izole, %20 oranda basit karyotipik değişikliklerde ve %25 oranında ise kompleks karyotip eşlik etmektedir. Bu kromozom anomalisi genellikle; delesyon 5q31.2 / monozomi 5 veya delesyon 7q22 / monozomi 7 ile birlikte görülmektedir. Bu hastalarda kromozom 8 kazanımının prognostik değeri tam anlamıyla değerlendirilememiştir ancak uluslararası risk analizi çalışmasında orta seviyede risk grubuna dahil edilmiş, hematolojik malignite ve diğer kanserlerin risklerinin arttırdığı gösterilmiştir. (Steensma, 2008). Yaş, cinsiyet, radyasyon, sitotoksik ajanlarla tedavi gibi farklı etkenlere bağlı olarak görülme sıklığı değişkenlik gösterebilmektedir (Mecucci, 1998).



Çizim 2.4. Kromozom 8'in idiogramı

Delesyon 20q12

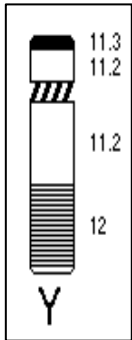
20. kromozomun q kolunun delesyonu MDS hastalarının yaklaşık olarak %5'inde gözlenen, değişim izole olarak karşımıza çıktığında hastaların karakteristik özellikleri ile düşük risk grubuna dahil edilen sitogenetik değişikliktir. MDS risk analizi çalışmalarında, ortalama sağkalım süreci kısa olarak belirtilen bu anomaliyi içeren hastaların kompleks karyotip sahip olduğu belirlenmiştir. Tümör süpressör genlerde delesyona neden olarak patolojik miyeloid hücrelere çoğalma avantajı sağladığı ileri sürülmektedir. Delesyona uğrayan bölgede topoizomeras 1, hepatosit nükleer faktör 4, fosfolipaz C ve adozin deaminaz genleri ile son yıllarda malign miyeloid hastalıklarda KRML transkripsiyon regülatör geninin bulunduğu gözlemlenmiştir.



Çizim 2.5. Kromozom 20'nin idiogramı

Kromozom Y Kaybı

Sadece malign hastalıklarla gözlenmeyen ayrıca yaşlanma ile birlikte erkeklerde herhangi bir hastalık göstergesi olmadan da görülebilen bu sitogenetik değişiklik izole olması halinde iyi prognoza işaretler. Tam olarak klinik ve biyolojik olarak önemi bilinmese de kaybının hücrelere proliferasyon önceliği kazandırdığı yani hücre siklusunu kısalttığı bilinmektedir. Heterozigozite kaybı (LOT) olarak bilinen ve sitogenetik tekniklerle her zaman belirlenemeyen ancak mikrosatellit bölgelerin analizi ile tespit edilebilen allel kayıpları solid doku tümörleri kadar olmasa da MDS'de söz konusudur (Mori ve diğ. 2000). Solid tümörlerde sıklıkla tümör süpresör genlerde kayıplar gözlemlendiği tespit edilmiş ancak AML ve MDS'de delesyonu en çok görülen 5q, 7q ve 20q bölgelerinde tümör süpresör gen kayıpları gösterilememiştir. Bu sebeple başka mekanizmalarla malign dönüşüme neden olabileceği düşünülmektedir. (Kelly ve diğ. 2002).



Çizim 2.6. Kromozom Y'nin idiogramı

2.10. Miyelodisplastik Sendrom'da Genetik Analiz Yöntemleri

Canlılara ait kalıtsal bilgiler ökaryot hücrelerde çekirdekte DNA molekülü olarak saklanmaktadır. Kalıtsal bu bilgi hücre bölünmesi henüz interfaz evresindeyken histon proteinlerinin sarılmasıyla yoğunlaşarak kromatin yapıyı oluşturur. Bu yapı da kısalıp kalınlaşarak kromozomları meydana getirir. Hücre bölünmesi metafaz evresine geldiğinde kromozomlar en net görüldüğü halini almaktadırlar. Sitogenetik, bu kromozomların yapı ve fonksiyonlarını inceleyen bilim dalıdır. (Marilyn ve Daniel, 2006).

Sitogenetikte; tanı ve takibinde belirleyici kromozomal bozuklukların görüldüğü malign rahatsızlıklar, hematolojik malignansiler, kromozom sendromlarının kesin tanısı ve/veya dışlanması, cinsel değişim ve gelişim anomalileri, infertilite, tekrarlayan düşükler ya da ölü doğum hikayeleri, dismorfik özellikler ile birlikte olan ya da tek başına görülebilen psikomotor ve mental retardasyon gibi hastalıklar araştırılabilmektedir (Kearney ve Horsley, 2005).

Bir hücredeki kromozomların çiftler halinde eşlenerek yapısal ve sayısal olarak incelenmesi işlemine karyotipleme denilmektedir. Çekirdeği olan ve bölünebilen tüm hücre ve dokulardan kromozom elde edilebilmektedir ancak bazı materyaller kromozom analizi için en elverişli örnek grubundadır. Karyotiplemede en çok kullanılan materyaller; perifer kanı, kemik iliği aspirasyonu, amniyon sıvısı, kordon kanı, koryon villus ve deri dokularıdır.

Kromozom analizi yani karyotipleme için genel olarak iki yöntem kullanılmaktadır. Bunlar kültür ve direkt yöntemleridir.

Kültür yöntemi; spontan bölünme yeteneğine sahip olmayan hücreler için uygulanan bir yöntemdir ve materyalin kültürünün kurulması gerekmektedir. Materyale göre kültür besiyeri ve süresi değişiklik göstermektedir. Spontan bölünme yetisine sahip olmayan hücreler için; protein, mineral, hormon ve vitaminlerce zengin, bölünmeye teşvik edici fitohemaglutinin (PHA) içeren besiyerine ihtiyaç duyulmaktadır. Örneğin; perifer kanı lenfositleri, koryon villuslar, amniyon sıvısındaki bebeğe ait hücreler için mitotik ajan içeren besiyerlerine ihtiyaç vardır. Bu hücrelerin kültür süreleri de değişkenlik gösterebilmektedir. Örneğin; perifer kanı lenfosit kültürü 72 saat iken, amniyositlerin kültürü birkaç haftayı bulabilmektedir. Direkt yöntem ise; spontan şekilde bölünebilen hücreler için uygulanan bir yöntemdir. Bu hücrelere; kemik iliği, solid tümörler ve lenf nodülleri örnek verilebilir ve kültür süreleri 24 saattir.

Kemik iliği ve perifer kanı gibi materyallere yapılacak kromozom analizi çalışması için örneklerin steril, 0,2 ml heparin eklenmiş enjektöre ve/veya vakumlu laboratuvar tüplerine alınması gerekmektedir. Örnekler taşıma ve bekleme süreleri boyunca asla dondurulmamalı, oda ısısında veya +4°C'lik dolaplarda saklanmalıdır. Kültür ortamı mutlaka, kontaminasyon sonucu mikroorganizmaların çoğalmasını önlemek amacıyla Penisilin/Streptomisin gibi antibiyotikler bulundurulmalıdır.

Kültür ve direkt yöntemler için; hücreler 37°C'lik etüvlerde çoğalmaya bırakılır. Bu hücrelere yapılacak kromozom analizi için ilk aşama olarak hücrelerin kültür

sırasında metafaz evresinde durdurulması gerekir. Bu aşama kolsemid solüsyonları ile yapılmaktadır. Kolsemid solüsyonları, hücre bölünmesi sırasında kardeş kromatidlerin iğ iplikçiklerinden zıt kutuplara çekilmesini önleyerek mitoz durdurucu etki yaratır ve bölünmenin metafaz evresinde kalmasını sağlar. İkinci aşama ise kromozomların hücre içinde kolayca dağılabilmeleri için hücreye hipotonik şok uygulamaktır. Bu aşamada hücrelerin hacimleri 0,075 M KCl hipotonik solüsyonuyla arttırılır. Hacmi artan hücreler içerisinde kromozomlar daha rahat dağılabilecek alan bulmuş olurlar. Üçüncü aşama fiksasyon olarak geçmektedir. 1:3 Asetik asit-Metanol ile hazırlanan fiksatif solüsyonu kullanılmaktadır. Bu aşamada fiksatif, hipotonik solüsyonun etkisini durdurarak hücreleri sabitler ve eritrositleri parçalar. Daha sonra da boyama ve bantlama işlemleri yapılarak elde edilen kromozomlar uygun mikroskoplarla incelenir (Morhead ve diğ, 1960).

Kromozom inceleme yöntemleri; sitogenetik ve moleküler sitogenetik olmak üzere iki yöntemi içermektedir.

2.10.1. Sitogenetik Yöntemler

Kromozom analizi yöntemleri kromozomları tanımlamak ve kromozomlardaki sayısal ve yapısal anomalileri tespit etmek amacıyla yapılan en önemli sitogenetik yöntemlerdir. Bu yöntemde klasik bantlama yöntemi kullanılmaktadır. Kromozom analizi için belirli bir bant seviyesi olmalıdır. Bant seviyesi, X kromozomu içeren bir haploid sette görülen açık ve koyu renklerde gözüken ökromatin ve heterokromatin bölgelerin toplamını belirtmektedir. Klasik bantlama tekniğiyle birlikte genellikle 450-550 bant seviyesindeki metafazlar analiz edilebilmektedir. Bu bant düzeyi daha küçük kromozom parçalarının kayıplarında ve/veya artışlarında yeterli değildir. Daha küçük kromozom parçalarının kayıp ve/veya analizi için daha yüksek bant seviyesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun için genellikle 550-850 bant seviyesi yeterli olmaktadır. G-Bantlama, klasik sitogenetikte en yaygın olarak kullanılan bantlama tekniğidir. G-Bantlama haricinde; R, Q, C ve HRB teknikleri de amaca uygun olarak kullanılabilir (Başaran 1999).

2.10.2. Moleküler Sitogenetik Yöntemler

Klasik sitogenetik çalışmaları mutlaka yeterli ve kaliteli metafaz plaklarından yapılmaktadır ancak her zaman yeterli ve kaliteli metafaz gözlenmeyebilmektedirler. Bu gibi durumlarda; klasik sitogenetik analiz ile belirlenemeyen, çözümlenemeyen, kompleks, submikroskopik düzenlenmelerin analizleri için moleküler sitogenetik yöntemler geliştirilmiştir. (Teixeira 2002).

Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH), Metafaz FISH, Interfaz FISH, Reverse FISH, Multi Color FISH, PRINS, Fiber FISH, Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (CGH) ve DNA Array yöntemleri başlıca bilinen moleküler sitogenetik yöntemlerdir.

Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH); kanserlerin sitogenetik analizlerinde en sık kullanılan moleküler sitogenetik yöntemdir. In situ hibridizasyon (ISH), hücrel incelemlerde tanı ve araştırma amaçlı, işlevsel protein kodlayan DNA dizilerinin yapısal olarak korunmuş; hücreler, kromozomlar veya dokularda yerinin belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir (Jain 2004). Southern ve Northern Blot gibi melezleme yöntemlerden farklı olarak bu teknik; nükleik asitlerin kendi buldukları hücrel ortamlarında gösterilmesidir (Pala 2005).

Klasik sitogenetik analiziyle tespit edilemeyen, 5 megabaz (Mb) küçük anomaliler veya 3 Mb'dan büyük ancak yeterince belirgin olmayan bölgeler bu teknikle analiz edilebilmektedir. Bu teknik, anomalilere uygun DNA problemleri kullanılarak uygulanmaktadır (Sreekantaiah 2007). Bu yöntemin hassasiyeti ve çözünürlüğü, klasik sitogenetiğe göre daha fazladır. Bu yöntemde hücre kültürü her zaman gerekli değildir ve spontan bölünme yeteneğine sahip olan ve olmayan hücre tiplerine kolayca uygulanabilmektedir. Klasik sitogenetik yöntemlerde metafaz eldesi mutlak gerekliken bu yöntem; interfaz ve metafaz hücrelerine uygulanabilmektedir. Böylece diğer sitogenetik tekniklere göre çok daha hızlı sonuç verilebilmesi özelliğiyle de sıkça kullanılan bir tekniktir.

Bir kromozoma ait bölgenin ve/veya DNA parçasının tespiti için analiz edilecek bölgeye özgü tasarlanmış FISH probunun kullanılması gerekir. FISH probu, hedef nükleik asit dizilerine komplementer olarak işaretli nükleik asit dizilerinden oluşur. Günümüzde kullanılan FISH problemleri florokromlarla işaretlidir (Bayani ve Squire 2004).

Bir kromozoma ait bölgenin ve/veya DNA parçasının tespiti için uygulanacak FISH çalışmasında proplar; sinyal paternlerine ve hedeflerine göre seçilmektedirler.

Hedef bölgelerine göre tasarlanan proplar; lokusa özgü, telomerik, kromozomun tümünün veya belirli bir kısmını boyayan ve tekrarlayan dizilerden oluşan proplar olmak üzere dört gruptan oluşmaktadır.

Lokusa özgü proplar; analiz edilecek genin yer aldığı lokusa özgü DNA dizilerini içeren 15-500 kilobaz (Kb) uzunluğunda tasarlanan proplardır. Duplikasyon-mikrodelesyon gibi yapı anomalilerinin tespitinde, inversiyon-translokasyon gibi yapı anomalilerinde gözlenen kırık noktalarının tespitinde kullanılmaktadırlar.

Telomerik proplar; 5'-TTAGGG-3' tekrar dizilerinden oluşan, 2-15 Kb uzunluğundaki telomer dizilerine özgü proplardır.

Kromozomun tümünün veya belirli bir kısmını boyayan proplar; bir kromozomda bulunan DNA dizilerine eş olan propların karışımlarından oluşmaktadır (McNeil ve Ried 2000).

Tekrarlayan dizi propları; alfa, beta, klasik satellit propları olarak üç gruptan oluşmaktadır.

Alfa satellit proplar; kromozomların sentromer bölgelerine spesifik tekrar dizilerinden oluşan proplardır. Bu sayede kromozomların sentromer bölgelerinin tespitinde kullanılabilen proplardır.

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

Klasik satellit proplar; AATGG tekrar dizilerinden oluşan, 1., 9., 15., 16. Kromozomların perisentrik heterokromatin bölgelerine ve kromozom Y'nin q koluna özgü tasarlanmış proplardır.

Bu proplara ek olarak sinyal paternlerine göre tasarlanmış proplar da bulunmaktadır. Bu proplara; translokasyon ve kırık noktalarındaki yeniden düzenlenmelere özgü proplar ve lokusa özgü proplar örnek gösterilebilir. Özelliklerine göre tasarlanan bu proplar tek ve/veya çift renkli, prob setlerinde ise üç ve/veya beş renkle işaretlenmiş olarak tasarlanabilirler (McNeil ve Ried 2000).

Çalışmalarımızda Miyelodisplastik Sendromu olgularında gözlenen kromozom anomalileri için beş farklı prob kullanılmıştır.

Kromozom 8 trizomisini saptamak için; CEN 8 FISH probu kullanılmıştır. Bu prob; kromozom 8'in sentromeri temsil eden yeşil renk işaretli probtan oluşturulmuştur. Bu probun uygulandığı normal hücrelerdeki kromozomlarda iki yeşil sinyal görülürken, trizomi görülen hücrelerdeki kromozomlarda üç yeşil sinyal görülmektedir.

7q (7q22) delesyonunu ve monozomisini saptamak için; Del (7q) Delesyon çift renkli FISH probu kullanılmıştır. Bu prob; 7q22 bölgesini temsil eden kırmızı ve 7q31.2 bölgesini temsil eden yeşil renk işaretli problemlerin karışımıyla oluşturulmuştur. Bu probun uygulandığı normal hücrelerdeki kromozomlarda iki kırmızı iki yeşil sinyal görülürken, delesyon görülen hücrelerdeki kromozomlarda bir kırmızı iki yeşil sinyal görülmektedir.

20q (20q12) delesyonunu saptamak için; Del (20q) Delesyon çift renkli FISH probu kullanılmıştır. Bu prob; 20q12 bölgesini temsil eden kırmızı ve 20q13.1 bölgesini temsil eden yeşil renk işaretli problemlerin karışımıyla oluşturulmuştur. Bu probun uygulandığı normal hücrelerdeki kromozomlarda iki kırmızı iki yeşil sinyal görülürken, delesyon görülen hücrelerdeki kromozomlarda bir kırmızı iki yeşil sinyal görülmektedir.

5q (5q31.2) delesyonunu saptamak için; EGR1/5p15 çift renkli FISH probu kullanılmıştır. Bu prob; EGR1 genini temsil eden yeşil ve 5q15 bölgesini temsil eden kırmızı renk işaretli problemlerin karışımıyla oluşturulmuştur. Bu probun uygulandığı normal hücrelerdeki kromozomlarda iki kırmızı iki yeşil sinyal görülürken, delesyon görülen hücrelerdeki kromozomlarda iki kırmızı bir yeşil sinyal görülmektedir.

Kromozom Y kaybını saptamak için; CEN X/Y çift renkli FISH probu kullanılmıştır. Bu prob; cinsiyet kromozomları olan X için yeşil ve Y için de kırmızı renk işaretli problemlerin karışımıyla oluşturulmuştur. Bu probun uygulandığı normal hücrelerdeki kromozomlarda; erkekler için bir yeşil bir kırmızı, kadınlar için de iki yeşil sinyal görülmektedir.

3. AMAÇ

Yapılan araştırmalarda miyelodisplastik sendromda birçok kromozom anomalisi tanımlanmıştır. Bu anomaliler konvansiyonel sitogenetik ve FISH yöntemleriyle tespit edilebilmektedir. Miyelodisplastik sendromda; 5q (5q31.2) delesyonları, kromozom 8 trizomisi, 7q (7q22) delesyonu ve monozomisi, , 20q (20q12) delesyonları ve kromozom Y kaybı gözlenmektedir. Amacımız; konvansiyonel sitogenetik ve FISH yöntemlerini kullanarak, miyelodisplastik sendrom tanılı olgularda kromozomal anomalilerinin sıklığını belirlemek, prognoz ve tanıda bu iki yöntemin kullanımının avantaj ve dezavantajlarını karşılaştırarak tanıda en etkin stratejiyi belirlemektir.



4. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu yüksek lisans tezi çalışmasında Temmuz 2013- Şubat 2017 tarihleri aralığında, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Anabilim Dalı'ndan yönlendirilen Miyelodisplastik Sendrom ön tanılı olguların klinik ve laboratuvar sonuçları retrospektif olarak incelenmiştir. Hastalığın tanısında önemli hematolojik parametreler hastaların dosyalarından elde edilip retrospektif olarak değerlendirilmiştir.

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

Olguların kromozomlarını incelemek için G-Bantlama, kromozom 8 trizomisini, 7q (7q22) delesyonunu ve monozomisini, 5q (5q31.2), 20q (20q12), delesyonlarını ve kromozom Y kaybını gözlemek amacıyla Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) yöntemi uygulanmıştır.

Çalışmada kemik iliği aspirasyon materyaline 24 saatlik kemik iliği kültür yöntemi uygulanmıştır. Kromozom analizi için G-Bantlama yöntemi uygulanmıştır. Kromozom 8 trizomisini; CEN 8 Prob, 7q (7q22) delesyonunu ve monozomisini; Del (7q) Deletion Prob, 5q (5q31.2) delesyonu EGR1/5p15 Dual Color Prob, 20q (20q12) delesyonu; Del (20q) Deletion Prob ve kromozom Y kaybını gözlemek için de CEN X/Y Dual Color Prob Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) yöntemiyle uygulanmıştır.

4.1. Kullanılan Solüsyonlar

Kemik İliği Kültüründe Kullanılan Solüsyonlar

- ❖ Kültür Besiyeri – Kemik İliği Karyotip Medyum – Biological Industries
- ❖ Kolsemid Solüsyonu – Capricorn 10µl/ml
- ❖ Hipotonik Solüsyon – 0,75 M KCl Çözeltisi – Merck
- ❖ Carnoy Fiksatif – 1:3 Asetik Asit:Metanol – Merck

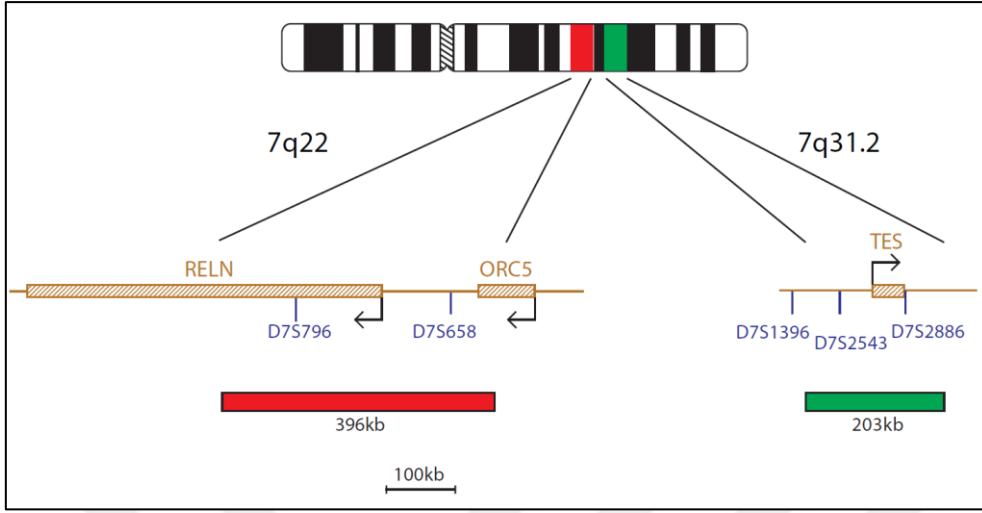
G-Bantlama Yönteminde Kullanılan Solüsyonlar

- ❖ PBS Solüsyonu - Merck
 - 4 g NaCl + 0,1g KCl + 0,57 g Na₂POH₄ + 0,1 g KH₂PO₄ + 500 ml su
- ❖ Tripsin – Multicell
 - 0,0050 g Tripsin + 50 ml PBS Solüsyonu
- ❖ Gurr Buffer – GIBCO
 - 1 adet Gurr Buffer Tablet + 1000 ml su
- ❖ Leishmann Boya Kullanım Solüsyonu – Merck
 - 1:4 Leishmann Boya Stok Solüsyonu:Gurr Buffer

FISH Yönteminde Kullanılan Solüsyonlar

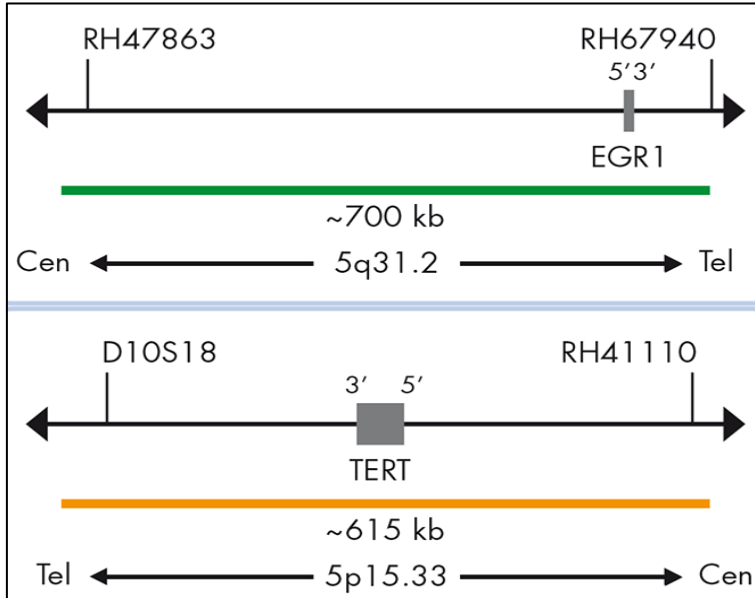
- ❖ 20xSSC – Merck
 - 48,5 g NaCl + 22,05 g Tri-Sodyum Sitrat Dihidrat + 250 ml su
- ❖ 2xSSC – Merck
 - 50 ml 20xSSC + 450 ml su
- ❖ Etanol Serileri – Merck
 - %70'lik etanol çözeltisi: 700 ml etanol + 300 ml su
 - %85'lik etanol çözeltisi: 850 ml etanol + 150 ml su
 - %100'lik etanol çözeltisi: 1000 ml etanol
- ❖ 0,4xSSC – Merck
 - 10 ml 20xSSC + 490 ml su
- ❖ FISH Probları
 - Kromozom 8 trizomisini gözlemlemek için sentromere özgü FISH probu (Zytovision – Zytolight CEN 8 Probe) kullanıldı.

- 7q (7q22) delesyonunu ve monozomisini gözlemlemek için gene özgü FISH probu (Cytocell - Del (7q) Deletion Probe) kullanıldı.



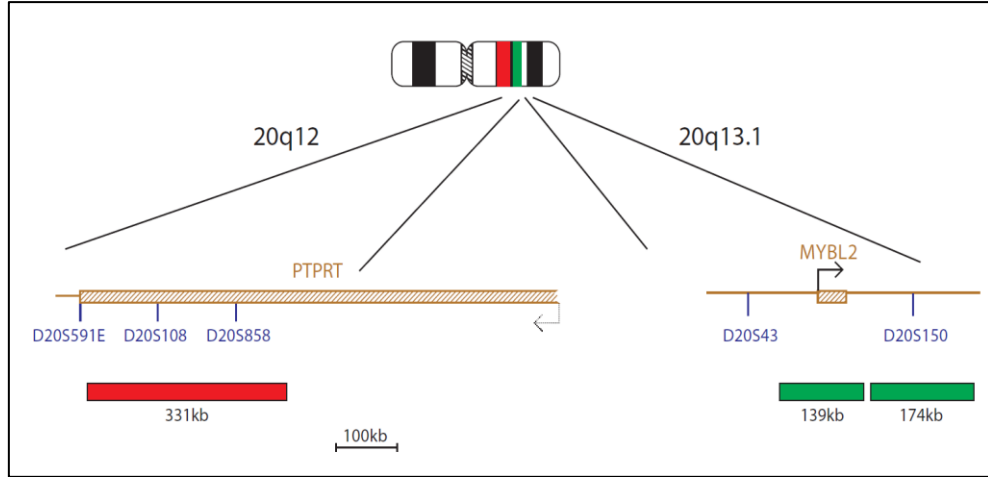
Çizim4.1. Cytocell - Del(7q) Deletion Probe şematik çizimi

- 5q (5q31.2) delesyonu gözlemlemek için gene özgü delesyon FISH probu (Zytovision – Zytolight EGR1/5p15 Dual Color Probe) kullanıldı.



Çizim 4.2. Zytovision – Zytolight EGR1/5p15 Dual Color Probe şematik çizimi

- 20q (20q12) delesyonu gözlemek için gene özgü delesyon FISH probu (Cytocell - Del (20q) Deletion Probe) kullanıldı.



Çizim 4.3. Cytocell - Del (20q) Deletion Probe şematik çizimi

- Kromozom Y kaybını gözlemek için ise sentromere özgü FISH probu (Zytovision – Zytolight CEN X/Y Dual Color Probe) kullanıldı.

4.2. Kullanılan Cihazlar

- ❖ Çeker ocak
- ❖ Etüv – Heraeus
- ❖ Floresan ve ışık mikroskopları – Olympus Bx51 ve Cx31
- ❖ Su banyosu – Hy-Bex
- ❖ Bozdolabı – Vestel
- ❖ Hassas terazi (AND)
- ❖ Denatürasyon ve hibridizasyon cihazı – Hy-Chrome
- ❖ Su ısıtıcısı – CVS
- ❖ Derin dondurucu - Arçelik

- ❖ Santrifüj – Universal 320 ve 320R
- ❖ Vorteks – Heidolph
- ❖ Dijital saat
- ❖ Nem ve sıcaklık ölçer – Hygro Termometre
- ❖ Hot plate

4.3. Kullanılan Malzemeler

- ❖ 15 ml'lik santrifüj tüpü – Corning
- ❖ Yüzeysel ve sıvı termometreleri
- ❖ Mikropipet ve pipet uçları – Eppendorf
- ❖ Pastör pipeti
- ❖ Enjektör – Setecoject
- ❖ pH metre
- ❖ Yapıştırıcı – Fixo-Gum
- ❖ Elmas uçlu kalem
- ❖ Kronometre
- ❖ Pens
- ❖ Mape
- ❖ Otoklav bandı
- ❖ Tüp standı

4.4. Kullanılan Cam Malzemeler

- ❖ Lam ve lameller – Superfrost Thermo Scientific
- ❖ Mezür
- ❖ Beher

4.5. Yöntemler

4.5.1. Kemik İliği Kültürü

Hastalara ait kemik iliği aspirasyonu materyali kültürü için aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanmıştır.

1. Her hasta için mitotic ajan içermeyen hazır besiyeri iki ayrı santrifüj tüpüne 5 ml paylaştırılarak ekim süresine kadar ısınmaları için 37°C'lik etüve bırakıldı.
2. Tüplere 0,4 ml heparinize edilmiş kemik iliği materyali damlatılarak ekim yapıldı ve 37°C'lik etüve hücrelerin üremesi için koyuldu.
3. Ekimin 22. Saatinde hücreleri metafaz evresinde durdurmayı sağlaması amacıyla 0,2 ml colsemid (kolşisin) eklemesi yapıldı ve tüpler tekrar 37°C'lik etüve koyuldu.
4. Ekimin 24. Saatinde hücrelerin dibe çökmesini sağlamak için tüpler 1500 rpm'da 8 dakika santrifüje alındı.
5. Hipotonik şok için tüplere 0,75 M KCl ilave edildi ve 37°C'lik etüvede 1 saat inkübe edildi.
6. İnkübasyondan sonra hücrelerin dibe çökmesini sağlamak için 1500 rpm'da 8 dk santrifüj edildi ve 1:3 oranında Cornoy fiksatifisi ile fikse edildi. Bu işlem 4 kez tekrarlandı ve böylece parçalanmış hücreleri ve artıklar uzaklaştırılmış oldu.

4.5.2. Preparatların Hazırlığı, G-Bantlama ve Analiz

Hastalara ait kemik iliği aspirasyonu materyali kültürüne sitogenetik analiz için aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanmıştır.

1. Yıkama işlemlerinden sonra, 25°C ve %55-60 nem oranındaki ortamda tüplerdeki süpernatant atılıp pelletten birkaç damla slayta yayıldı. Yayma işleminden sonra 1:3 oranında taze hazırlanmış Cornoy fiksatifisi slayta damlatıldı ve slayt kurumaya bırakıldı.
2. Kuruyan slaytlar yaşlanma işlemi için 60°C'lik etüvede 20 dakika inkübe edildi.
3. Yaşlanma işlemi tamamlanmış slaytlar sırasıyla; tripsin ve fosfat buffer salin (PBS)

çözeltilerinden geçirildi.

4. Slaytlar 1:4 oranında hazırlanmış Leishman boyası kullanımının solüsyonuyla 1 dakika boyandı.
5. Hazırlanan slaytlar ışık mikroskopuyla tarandı ve metafazlar Cytovision Version 7.2 Build 147 sisteminde her bir hasta için metafaz sayısı ve kalitesine bakılarak 2-20 metafaz analiz edildi. Metafazla ISCN 2013'e göre değerlendirilmeye alındı (Shaffer 2013).

4.5.3. FISH Yöntemi ve Analizi

Hastalara ait kemik iliği aspirasyonu materyali kültürüne FISH yöntemi ve analizi için aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanmıştır.

1. Tüplerdeki süpernatant atılıp pelletten birkaç damla slayta yayıldı. Yayma işleminden sonra 1:3 oranında taze hazırlanmış Cornoy fiksativi slayta damlatıldı ve slayt kurumaya bırakıldı.
2. Kuruyan slaytlar sırasıyla; 2xSSC, %70, %85 ve %100'lük etanol serilerinden 2'şer dakika geçirildi ve slaytlar tekrar kurumaya bırakıldı.
3. Kullanılacak problar her bir çalışma için 10 µl olacak şekilde ependorflara alındı ve slaytlarla birlikte 37°C'lik etüvde bekletildi.
4. Işık almayan ortamda kullanılacak problar, slaytlarda hücre yoğunluğunun çok olduğu bölgeye muamele edildi ve üzerleri lamel yardımıyla hava almayacak şekilde kapatıldı.
5. Slaytlar ısıtıcı üzerinde 10 dakika denature edildi. Bu süre sonunda slaytlar nemli ve karanlık bir kutuya alınıp 37°C'lik etüvde 16-17 saat hibridizasyon için bırakıldı.
6. Hibridizasyon sonrasında slaytların üzerlerindeki lamellar dikkatlice kaldırıldı ve slaytlar önce; 72°C'lik su banyosunda 1 dakika sonra da 10 µl Tween 20 içeren 2xSSC solüsyonunda 30 saniye yıkandı ve kurumaya bırakıldı.
7. Slayt üzerlerinde prob muamele edilmiş bölgelere 10 µl DAPI Antifade eklendi ve lamel yardımıyla hava almayacak şekilde kapatıldı.
8. Hazırlanan slaytlar ışık almayan mapelere yerleştirildi ve +4'lik buzdolabında muhafaza edildi.

9. Hazırlanan slaytlar floresan mikroskopuyla, 100X objektifte tarandı. Her bir hasta için; çekirdek sınırları belli, sinyallerin güçlü ve net olduğu 100-200 hücre analiz edildi.



5.BULGULAR

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Laboratuvarında yürütülen bu tezde Miyelodisplastik Sendrom öntanısı almış 143 hastadan alınan kemik iliği aspirasyon materyaline; kemik iliği kültürü, G-Bantlama ve Floresan In Situ Hibridizasyon tekniği uygulanmış çıkan sonuçlar retrospektif olarak değerlendirilmiştir.

Olguların yaş ortalaması 67,9 (42-92) ve kadın/erkek oranı 71/72 olarak bulunmuştur. Olgularımızın; cinsiyet, yaş, trombosit (PLT), eritrosit (RBC), anemi (HGB), nötrofil (NEU), lökosit (WBC) ve sağkalım verileri olgu dosyalarından elde edilmiştir. Olgulara ait yaş, cinsiyet ve bazı hematolojik parametrelerin dağılımı Çizelge 4.1.de verilmiştir.

Çizelge 5.1. Miyelodisplastik Sendrom öntanlı olgulara ait yaş, cinsiyet ve ilgili hematolojik parametrelerin dağılımı

Bulgu	Olgu sayısı
Cinsiyet K/E	71/72
Yaş	67,9 (42-92)
PLT $<152 \times 10^3/\mu\text{L}$ / $\geq 348 \times 10^3/\mu\text{L}$	5,06/578,5
RBC $<4,06 \times 10^6/\mu\text{L}$ / $\geq 5,63 \times 10^6/\mu\text{L}$	1,68/5,9
HGB $<12,5 \text{g/dL}$ / $\geq 16,3 \text{g/dL}$	5,33/16,23
NEU $<1,7 \times 10^3/\mu\text{L}$ / $\geq 7,6 \times 10^3/\mu\text{L}$	0,03/93,6
WBC $<3,6 \times 10^3/\mu\text{L}$ / $\geq 10,2 \times 10^3/\mu\text{L}$	0,56/71,67

Bu çalışmada baz aldığımız gruplar, FISH ile birlikte konvansiyonel sitogenetik çalışılan olgular ve sadece FISH çalışılan olgular olmak üzere iki ana gruba ayrılarak değerlendirilmiştir.

İlk grup olan FISH ile birlikte konvansiyonel sitogenetik çalışılan grup 103(%72,1), sadece FISH çalışılan grup ise 40(%27,1) olgudan ibarettir.

FISH ile birlikte konvansiyonel sitogenetik çalışılan grupta 14 (%13,6) olguda anomali tespit edilmiştir. Sadece FISH çalışılan grupta 12 (%30) olguda anomali saptanmıştır.

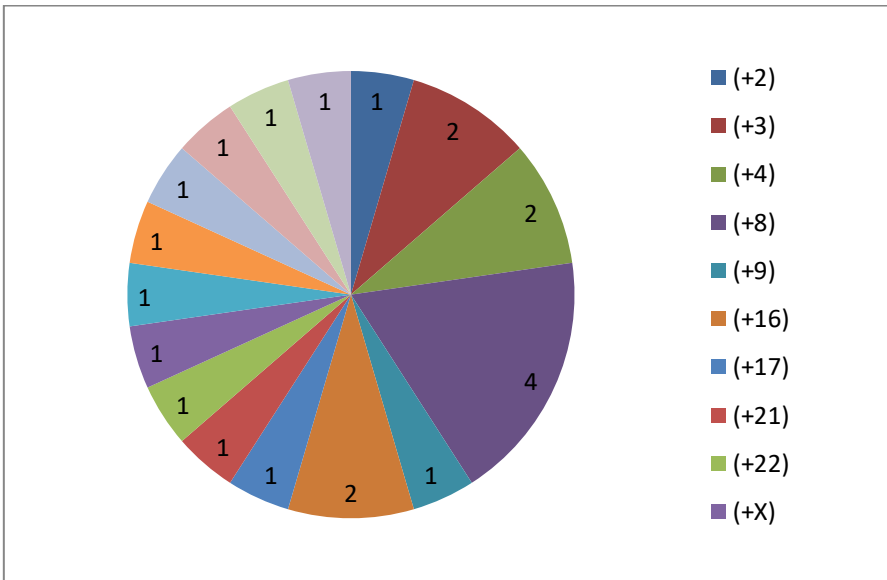
Çalışmada analizi yapılan FISH olgularının tamamı değerlendirildiğinde anomali görülenlerin sayısı 27 olup oranı %18,9 olarak bulunmuştur. Bu olguların sadece 1'inde birden fazla anomali saptanmıştır.

5.1. Sitogenetik Bulgular

Konvansiyonel sitogenetik analiz çalışması 103 olguya (%72) yapılmış fakat bunların 74'ünde (%71,8) kromozom elde edilerek anlamlı sonuç bulunmuştur. Analiz aşamasında yeteri kadar yada değerlendirilecek kalitede metafaz saptanamamasından ötürü 29 (%28,2) olgunun kromozom analizi sonucu bulunamamıştır. Bunların dışındaki 40 (%27) olgu ise kromozom analizi çalışması yapılmayan grupta bulunmaktadır.

Çalışmada yer verilen olgulardan kromozom analiz sonucu saptanan 74 olgunun 61'inde (%82,4) normal karyotip görülmüştür. Çalışmadaki kromozom analizi yapılan 13 (17,6) olguda ise anomaliler bulunmuştur.

Çizelge 5.2. Gözlenen sayısal/yapısal kromozom anomalilerinin oranları



Çalışmada kromozom anomalisi saptanan 13 olgunun 8'i (%61,5) kadın, 5'i (%38,5) ise erkek olgulara aittir. Kromozom analizi çalışmasına alınan ancak değerlendirilebilecek metafaz elde edilemeyen 29 (%28,2) olgunun 12'si (%41,4) kadın iken 17'si (%58,6) erkek olgulardan oluşmaktadır. Kromozom analiz yöntemi uygulanmayan 40 (%38,8) olgunun 15'i (%37,5) kadınlardan oluşurken 25'i (%62,5) erkek olarak belirlenmiştir.

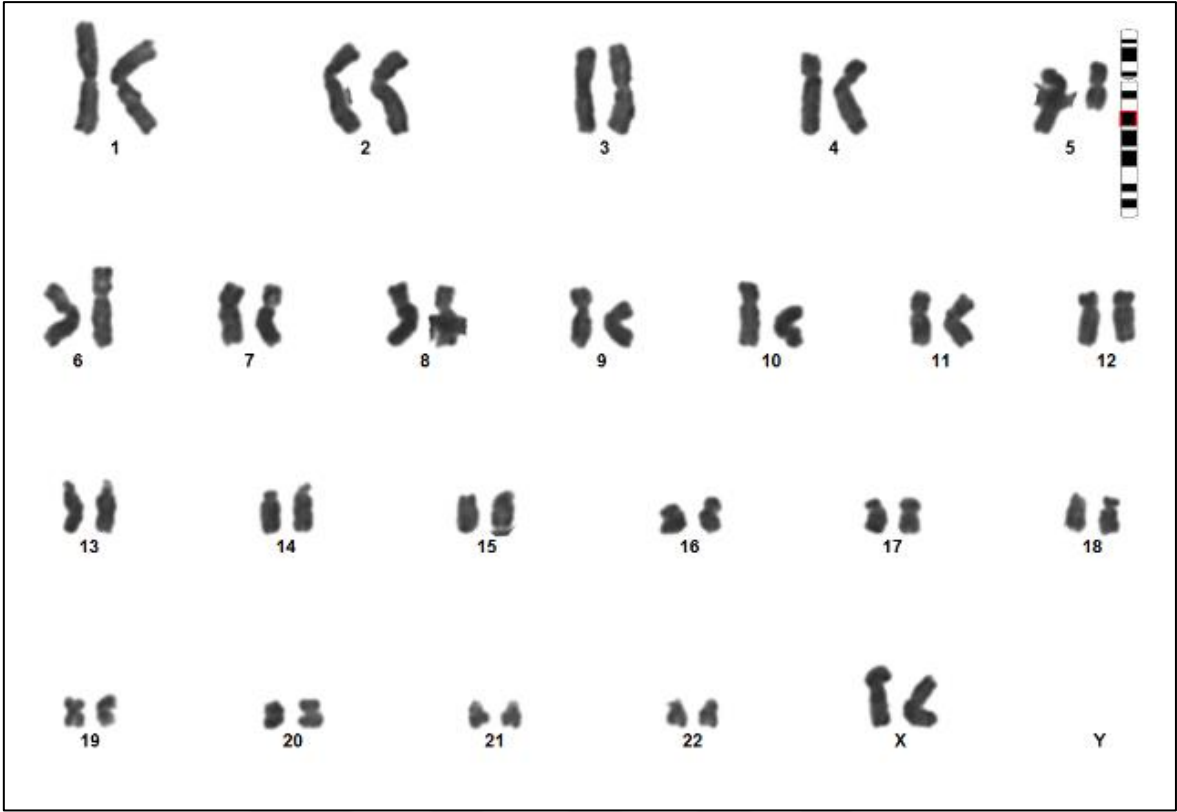
Karyotip analizi ile gözlenen sayısal/yapısal kromozom anomalilerinin oranları Çizelge 5.2.de verilmiştir.



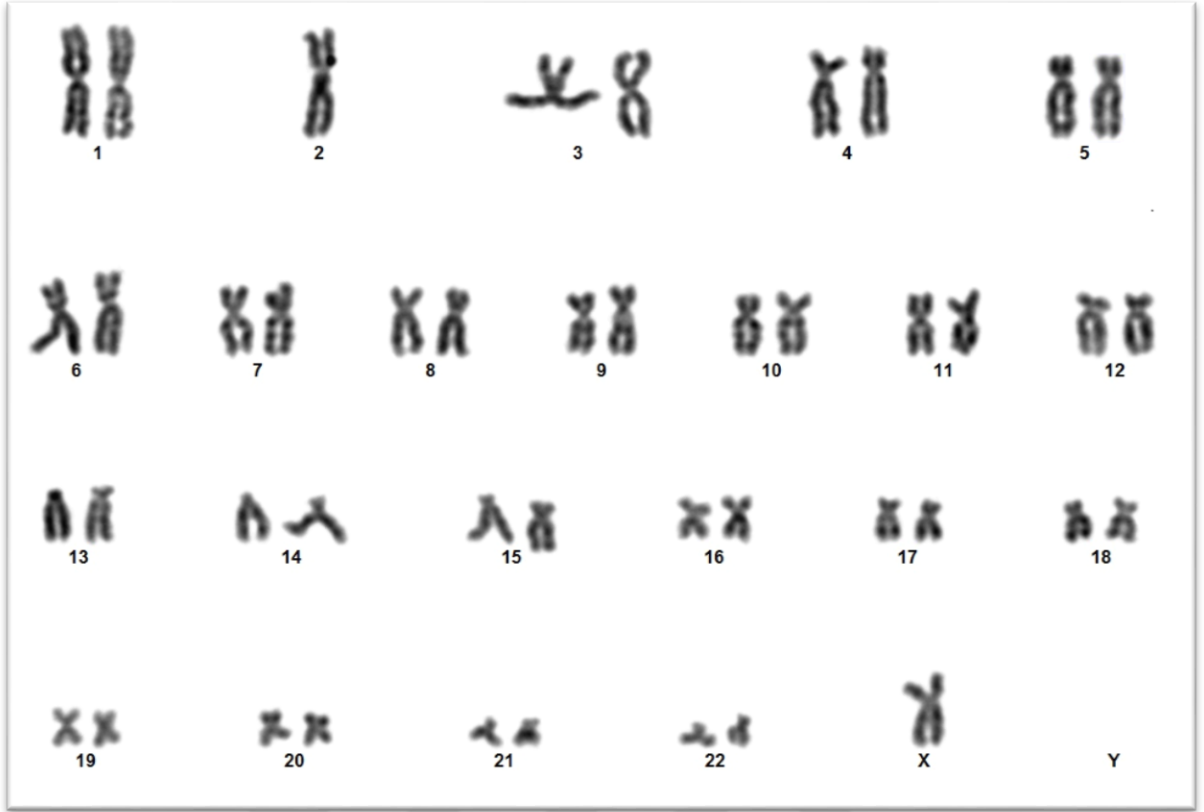
Çizelge 5.3. Karyotip analizi ile gözlenen anomalilerin oranları

Vaka no	Yaş	Cinsiyet	Karyotip	Vaka no	Yaş	Cinsiyet	Karyotip
1	66	K	X	73	71	E	46,XY[15]
2	79	E	X	74	42	E	DMB
3	76	K	X	75	71	E	46,XY[16]
4	77	K	DMB	76	66	K	46,XX[20]
5	58	E	46,XY[16]	77	76	E	46,XY[15]
6	71	E	46,XY[11]	78	54	K	46,XX[10]
7	57	E	46,XY[6],45,X,-Y[4],47,XY,+9[3],+16[2]	79	77	K	46,XX[11]
8	83	E	46,XY[16]	80	72	E	46,XY[16]
9	67	E	46,XY[7]	81	70	E	46,XY[12]
10	72	K	DMB	82	74	E	46,XY[11]
11	75	E	DMB	83	69	K	46,XX[4],45,XX,-5[4]
12	72	E	DMB	84	79	K	DMB
13	72	K	46,XX[17]	85	64	E	46,XY[9]
14	65	K	46,XX[19]	86	71	K	X
15	76	K	46,XX[20]	87	69	K	46,XX[8],46,XX,-18(p11)[2]
16	54	K	46,XX[20]	88	53	K	46,XX[17]
17	61	K	46,XX[11],47,XX,+4[4],+17[2],+21,[2],+22,[2]	89	62	K	46,XX[11]
18	61	K	46,XX[18]	90	71	K	46,XX[20]
19	61	K	46,XX[20]	91	75	E	46,XY[6]
20	52	K	46,XX[11]	92	74	K	DMB
21	57	K	46,XX[13]	93	76	K	DMB
22	49	K	46,XX[2]	94	74	E	47,XY,+8[6],46,XY,del(12)(p13)[5],46,XY[7]
23	85	K	X	95	66	K	46,XX[5]
24	72	K	46,XX[19]	96	70	E	46,XY[9]
25	65	E	DMB	97	76	E	X
26	55	E	DMB	98	74	K	DMB
27	65	E	DMB	99	60	E	DMB
28	54	E	DMB	100	75	K	46,XX[7]
29	72	K	46,XX[15]	101	84	K	46,XX[9]
30	82	E	46,XY[11]	102	76	E	X
31	61	K	46,XX[12]	103	63	K	46,XX[3]
32	50	K	46,XX[17]	104	65	E	46,XY[13]
33	72	E	46,XY[20]	105	68	K	46,XX[8]
34	75	K	DMB	106	75	E	46,XY[5]
35	56	E	DMB	107	73	E	46,XY[4]
36	72	E	47,XY,+4[4],+8[3],+16[3],45,XY,-9[16]	108	66	K	46,XX[6]
37	75	K	46,XX[20],inv(9)(p11q12)[15]	109	77	K	46,XX[3]
38	78	K	46,XX[16]	110	60	K	DMB
39	70	E	46,XY[20]	111	46	K	46,XX[9]
40	65	E	46,XY[8]	112	74	K	47,XX,+X[14]46,XX[2]
41	50	K	DMB	113	77	K	X
42	56	K	DMB	114	68	E	X
43	65	E	DMB	115	71	E	X
44	68	E	46,XY[11],47,XY,+8[5]	116	70	K	X
45	69	E	46,XY[11],47,XY,+8[5]	117	64	K	X
46	55	K	46,XX,[12],47,XX,+2[2],+3[6],45,X,-X[4]	118	65	K	X
47	71	K	46,XX,[20]	119	56	E	X
48	85	K	DMB	120	58	E	X
49	82	K	46,XX[5]	121	74	E	X
50	63	E	DMB	122	81	E	X
51	72	E	DMB	123	59	E	X
52	70	E	X	124	58	E	X
53	51	E	DMB	125	69	E	X
54	55	E	46,XY[14]	126	61	E	X
55	76	K	46,XX[10]	127	77	K	X
56	87	E	DMB	128	70	E	X
57	70	E	DMB	129	78	E	X
58	63	E	46,XY[4]	130	79	K	X
59	61	E	46,XY[6]	131	92	E	X
60	68	K	46,XX[20]	132	51	E	X
61	65	K	DMB	133	68	E	X
62	68	K	X	134	67	E	X
63	73	E	46,XY[6]	135	63	E	X
64	71	E	DMB	136	72	K	X
65	76	K	46,XX[14],47,XX,+2[3],+3[3]	137	81	E	X
66	54	K	46,XX[17]	138	72	E	X
67	61	K	46,XX[6]	139	83	K	X
68	45	K	46,XX[3]	140	68	E	X
69	67	K	46,XX[5]	141	78	K	X
70	48	K	46,XX[2]	142	78	E	X
71	72	E	DMB	143	53	K	X
72	72	E	46,XY[14]				

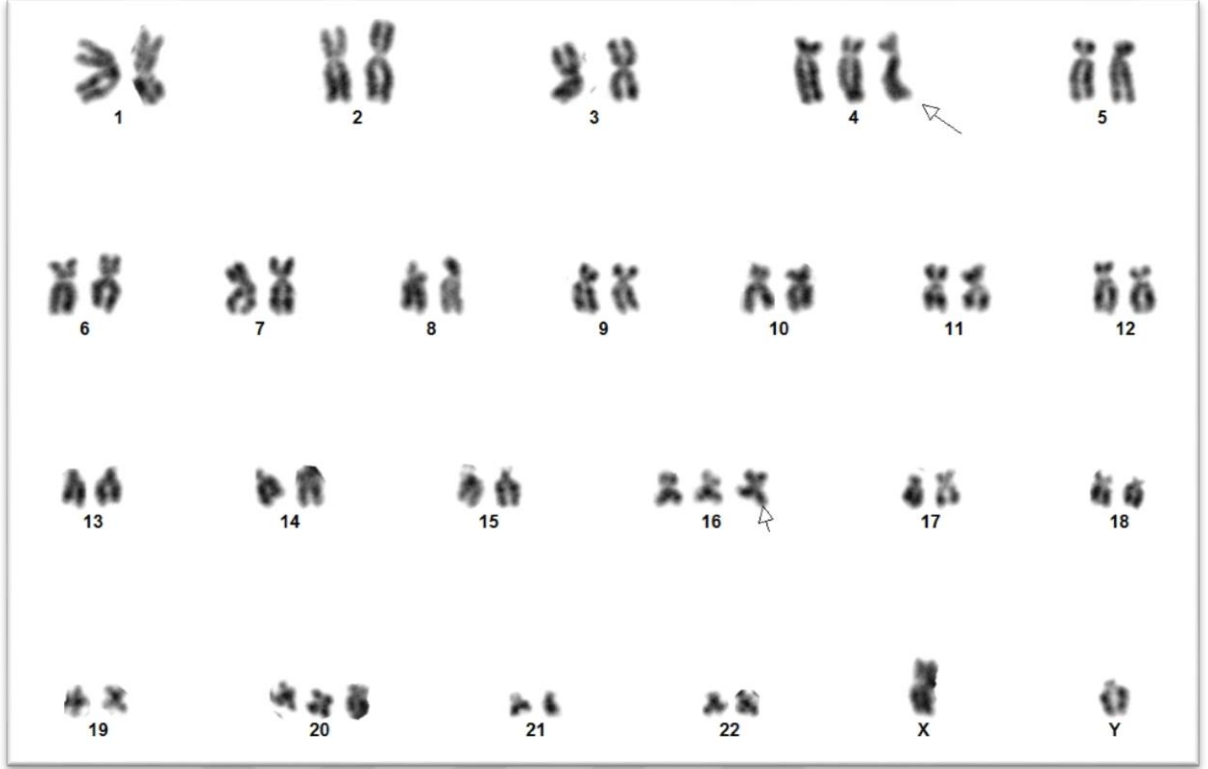
Analiz yorumlarında; X(Çalışma yapılmadı), Analiz yorumlarında;
 DMB(Değerlendirilecek metafaz bulunamadı), [](Analiz edilen hücre sayısı)



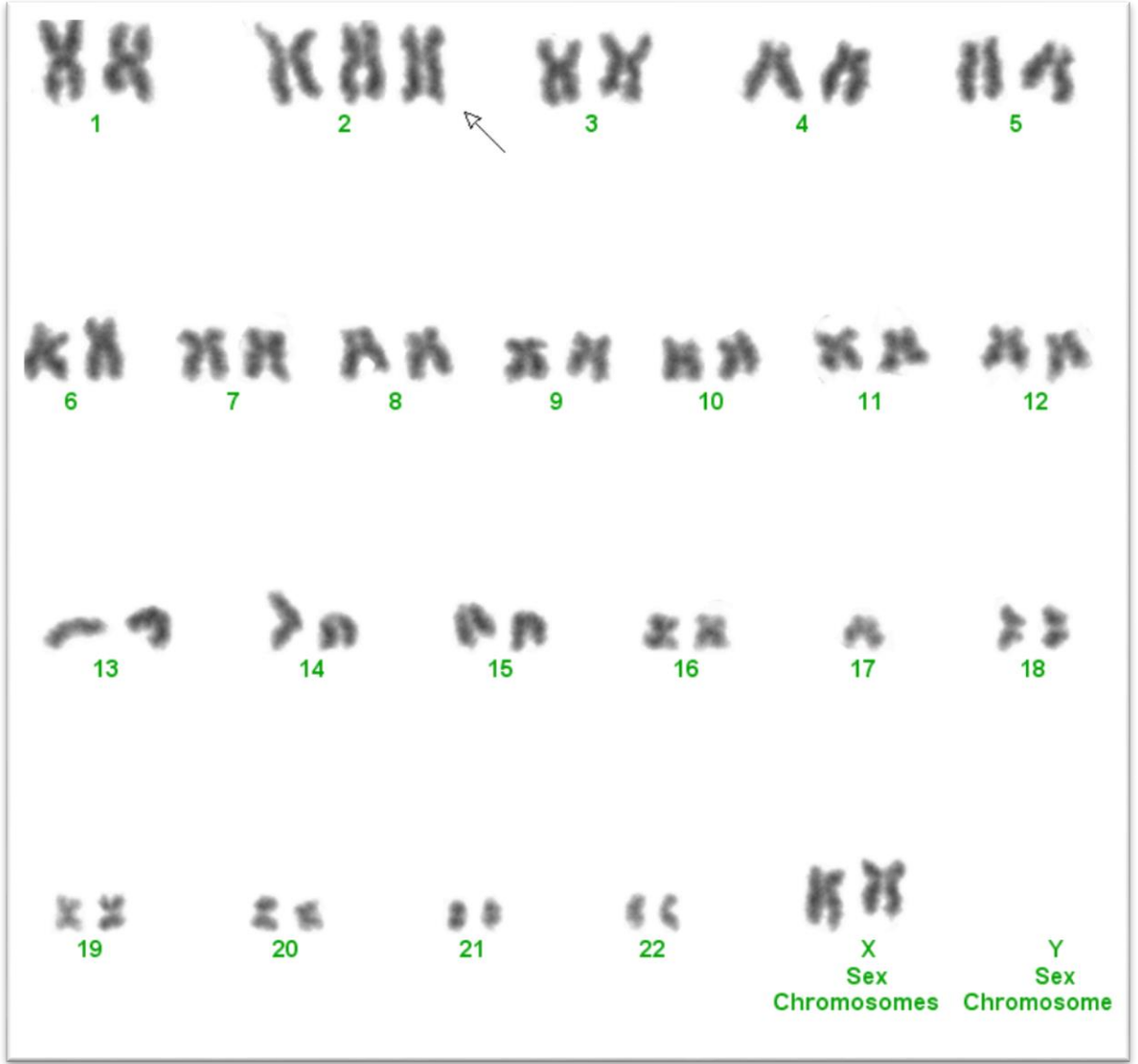
Çizim 5.1. 83 nolu olguya ait karyogram. Olguda 46,XX,del(5)(q31,2) [4] karyotipi saptanmıştır.



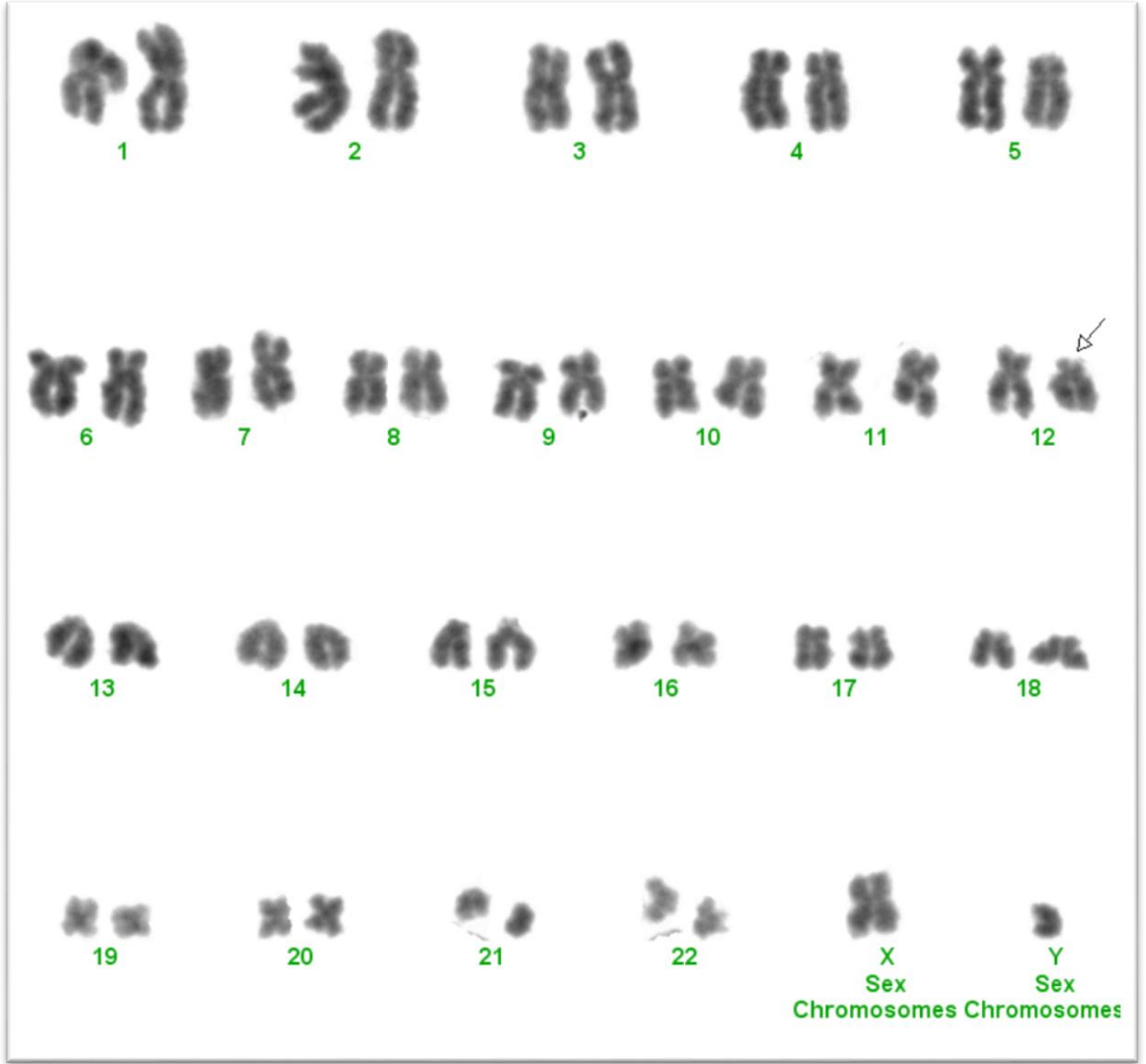
Çizim 5.2. 8 nolu olguya ait karyogram. Olguda 46,XY[6],45,X,-Y[4],47,XY,+9[3],+16[2] karyotipi saptanmıştır.



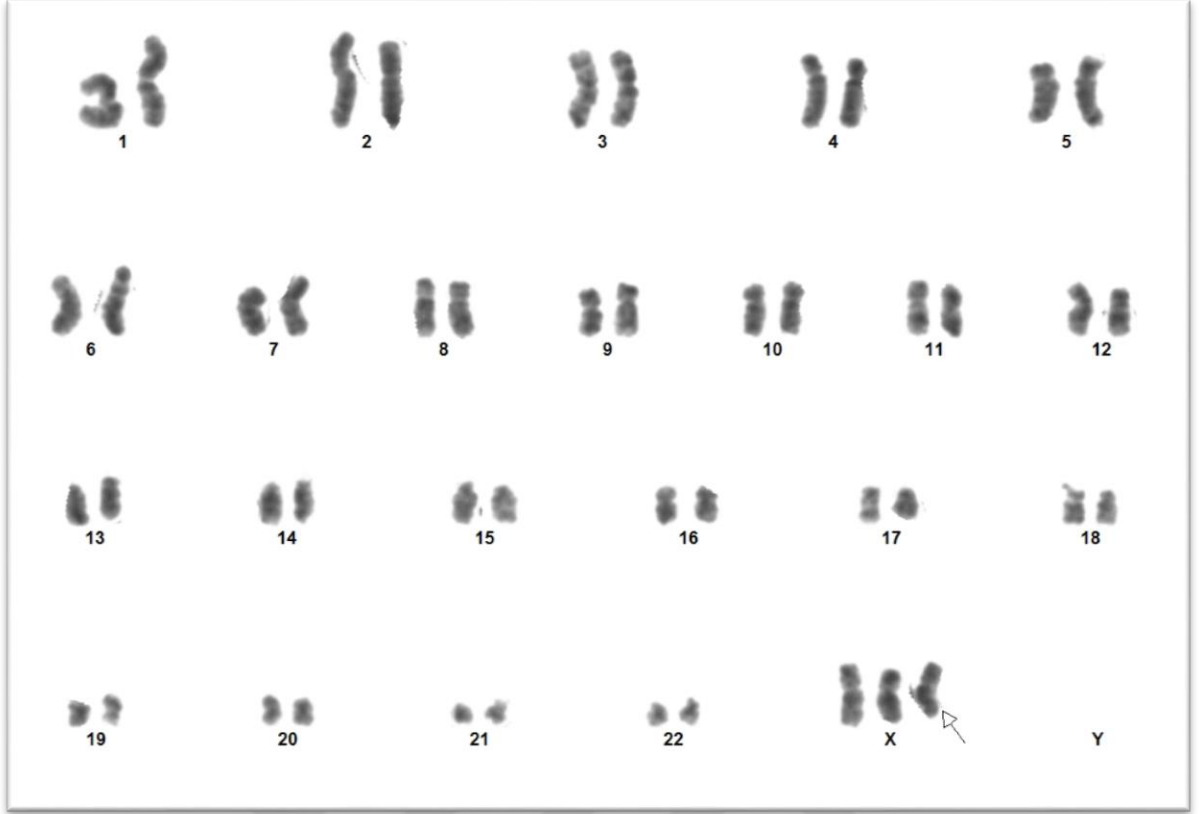
Çizim 5.3. 36 nolu olguya ait karyogram. Olguda $47,XY,+4[4,+8[3],+16[3],45,XY,-9[16]$ karyotipi saptanmıştır.



Çizim 5.4. 65 nolu olguya ait karyogram. 46,XX[14],47,XX,+2[3] ,+3[3] karyotipi saptanmıştır.



Çizim 5.5. 94 nolu olguya ait karyogram. Olguda 47,XY,+8[6], 46,XY,del(12)(p13)[5],46,XY[7]karyotipi saptanmıştır.



Çizim 5.6. 112 nolu olguya ait karyogram. Olguda 47,XX,+X[14]46,XX[2] karyotipi saptanmıştır.

5.2. Moleküler Sitogenetik Bulgular

Çalışmamızda olan 143 olguya delesyon ve sentromer bölgelerine özgü problemler kullanılarak FISH analiz çalışması yapılmıştır. Yapılan analizler neticesinde;

Kromozom 5 anomalileri

Çalışmamızdaki 143 olgudan kromozom 5 anomalisi saptananlar bulunmaktadır. Kromozom 5 anomalileri olguların 11'inde gözlenmiştir. Olgulardaki kromozom 5 anomali oranı %7,7 dir.

Kromozom 7 anomalileri

Çalışmamızdaki 143 olgulardan kromozom 7 anomalisi saptananlar bulunmaktadır. Kromozom 7 anomalileri olguların 2'inde gözlenmiştir. Olgulardaki kromozom 7 anomali oranı %0,4 tür.

Kromozom 8 anomalileri

Çalışmamızdaki 143 olgulardan kromozom 8 anomalisi saptananlar bulunmaktadır. Kromozom 8 anomalileri olguların 5'inde gözlenmiştir. Olgulardaki kromozom 8 anomali oranı %3,5 tir.

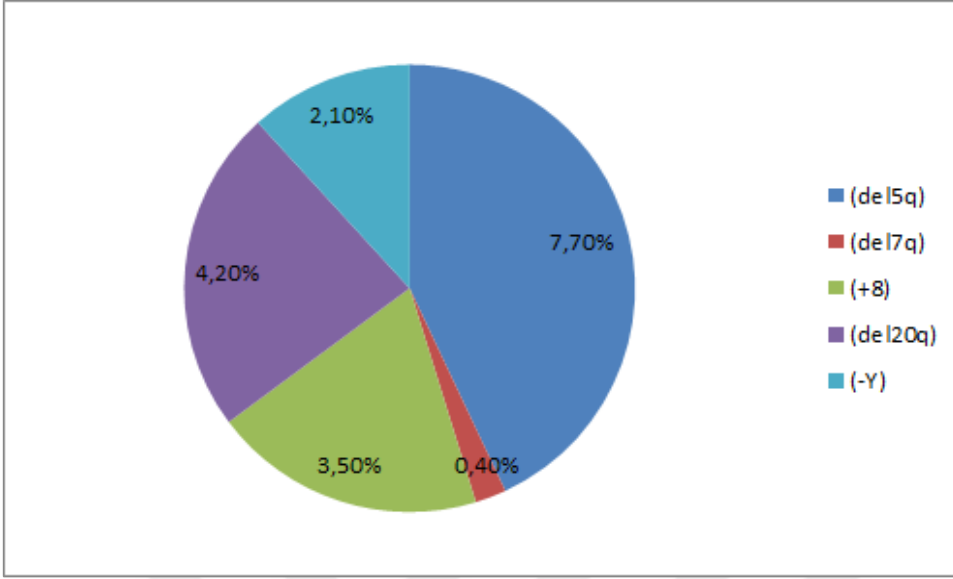
Kromozom 20 anomalileri

Çalışmamızdaki 143 olgulardan kromozom 20 anomalileri saptanan veriler elde edilmiştir. Kromozom 20 anomalileri olguların 6'sında gözlenmiştir. Çalışmamızda kromozom 5 anomalilerinden sonra en fazla saptanan anomalidir. Olgulardaki kromozom 20 anomali oranı %4,2 dir.

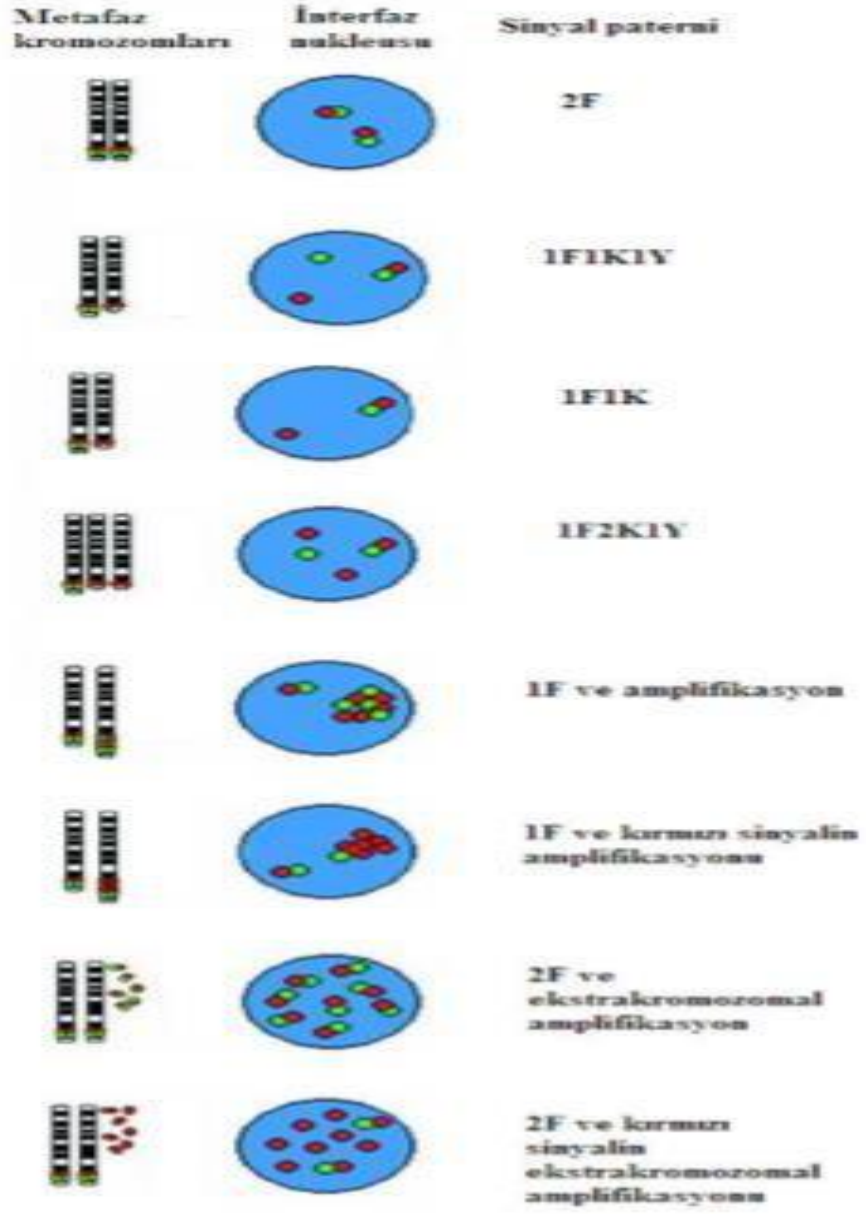
Kromozom Y anomalileri

Çalışmamızdaki 143 olgulardan kromozom Y anomalileri saptanan veriler elde edilmiştir. Kromozom 20 anomalileri olguların 3'ünde gözlenmiştir. Olgulardaki kromozom Y anomali oranı %2,1 dir.

Çizelge 5.4. FISH yöntemiyle tespit edilen kromozom anomalilerinin dağılımı



Yapılan FISH analizinde metafaz kromozomlarında ve interfaz nukleusunda sinyal görünümleri ve değerlendirmeleri Çizim 4.2.da verilmiştir.

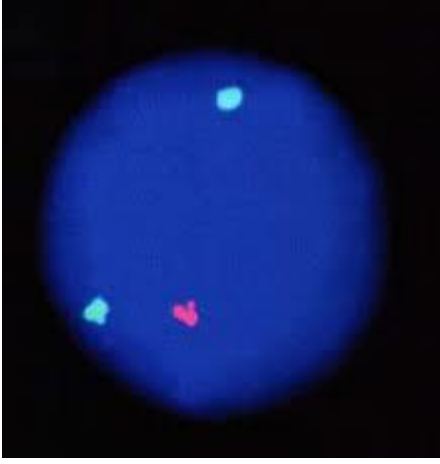


Çizim 5.7. FISH analizinde metafaz kromozomlarında ve interfaz nükleusunda sinyal görünümleri ve değerlendirmeleri

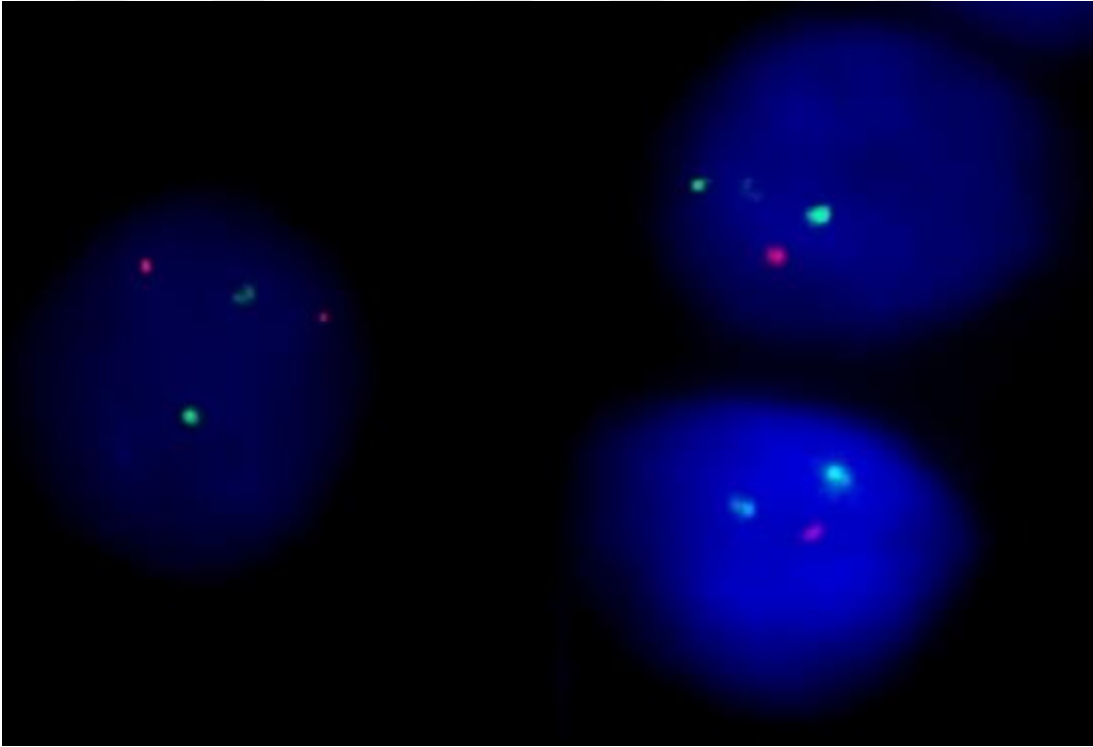
Çizelge 5.5. Anomali gözlenen olguların FISH ve karyotip sonuçları

Vaka No	Karyotip	5q del.	7q del.	20q del.	Trizomi 8	Mono Y
6	46,XY[11]	(-)	(-)	(-)	(-)	%25(+)
7	46,XY[6],45,X,-Y[4],47,XY,+9[3],+16[2]	%5(+)	(-)	(-)	(-)	X
9	46,XY[7]	(-)	%12(+)	(-)	(-)	(-)
11	DMB	(-)	(-)	(-)	(-)	%100(+)
17	46,XX[11],X,+4[4],+17[2],+21,[2],+22,[2]	(-)	(-)	(-)	(-)	X
23	X	%20(+)	(-)	%20(+)	(-)	X
29	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[20]	(-)	(-)	(-)	(-)	X
36	47,XY,+4[4],+8[3],+16[3],45,XY,-9[16]	(-)	(-)	(-)	SY	X
37	46,XX,inv(9)(p11q12)[15]	(-)	(-)	(-)	(-)	X
44	47,XY,+8[5],46,XY[11]	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
45	47,XY,+8[2],46,XY[5]	%7(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
46	47,XX,+2[2]+3[6],45,X,-X[4]	(-)	(-)	(-)	DMB	X
47	46,XX,[20]	%7(+)	(-)	(-)	HY	X
48	DMB	%46(+)	(-)	(-)	HY	X
62	X	%46(+)	X	X	X	X
65	47,XX,+2[3],+3[3]	(-)	(-)	(-)	(-)	X
71	DMB	(-)	(-)	%51(+)	(-)	(-)
73	46,XY[15]	(-)	(-)	(-)	%90(+)	(-)
83	46,XX[4],46,XX,del(5)(q31.2)[4]	%37(+)	(-)	(-)	(-)	X
87	46,XX[8],46,XX,-18(p11)[2]	(-)	(-)	(-)	(-)	X
92	DMB	%89(+)	(-)	(-)	(-)	X
94	47,XY,+8[6],46,XY, del(12)(p13)[5]	(-)	(-)	(-)	%7,5(+)	(-)
106	46,XY[5]	(-)	(-)	(-)	%50(+)	(-)
110	DMB	%58(+)	(-)	(-)	(-)	X
112	47,XX,+X[14]46,XX[2]	(-)	(-)	(-)	(-)	X
123	X	(-)	(-)	%20(+)	(-)	(-)
124	X	(-)	(-)	%20(+)	(-)	(-)
125	X	%99(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
126	X	(-)	(-)	(-)	(-)	%6(+)
131	X	%80(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
132	X	(-)	%6(+)	(-)	(-)	(-)
133	X	(-)	(-)	%6(+)	(-)	(-)
134	X	(-)	(-)	(-)	%32(+)	(-)
137	X	(-)	(-)	(-)	%7(+)	(-)
141	X	(-)	(-)	%8,5(+)	(-)	(-)

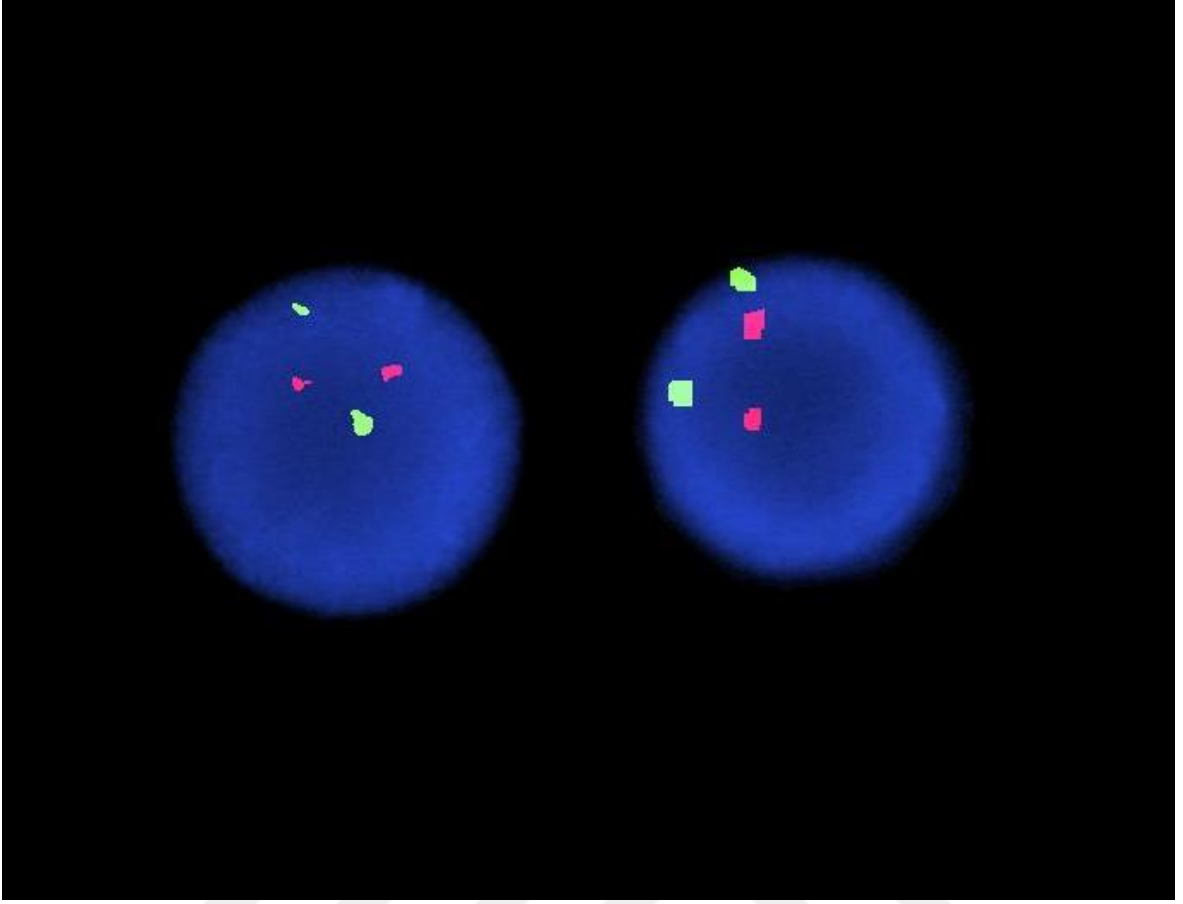
Analiz yorumlarında; (-) (Normal), X(Çalışma yapılmadı), DMB(Değerlendirilecek metafaz bulunamadı) , [](Analiz edilen hücre sayısı), HY(Hücre yetersiz), SY (Sinyal yetersiz) kısaltmaları ile ifade edildi.



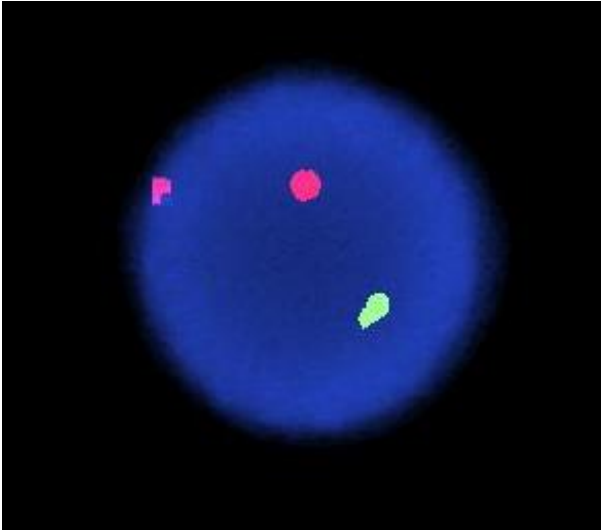
Çizim 5.8. 9 nolu olguya ait Cytocell - Del (7q) Deletion Probe FISH analizi görüntüsü. 2 yeşil, 1 kırmızı sinyal paterni 7q(7q22) delesyonunu temsil etmektedir.



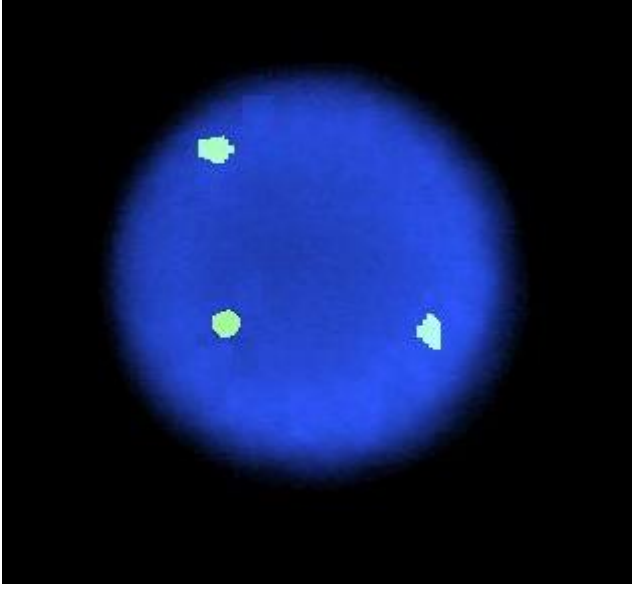
Çizim 5.9. 23 nolu olguya ait 20q (20q12) delesyon FISH probu Cytocell - Del (20q) Deletion Probe FISH analizi görüntüsü



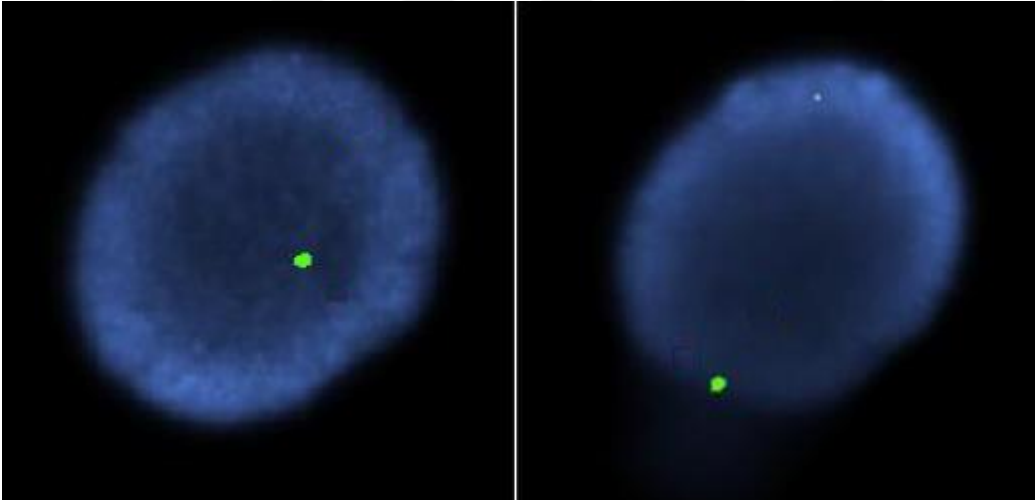
Çizim 5.10. 6 nolu olguya ait 5q (5q31.2) Zytovision – Zytolight EGR1/5p15 Dual Color Probe FISH analizi görüntüsü



Çizim 5.11. 83 nolu olguya ait 5q (5q31.2) delesyon Zytovision – Zytolight EGR1/5p15 Dual Color Probe FISH analizi görüntüsü



Çizim 5.12. 73 nolu olguya ait Kromozom 8 trizomisi Zytovision – Zytolight CEN 8 Probe FISH analizi görüntüsü



Çizim 5.13. 11 nolu olguya ait Kromozom Y kaybı Zytovision – Zytolight CEN X/Y Dual Color Probe FISH analizi görüntüsü

6. TARTIŞMA

Myelodisplastik sendrom (MDS), klinik bulguları homojenlik göstermeyen bir grup hastalıdır. Kemik iliğinde normal olmayan hücresel proliferasyonla seyreder. Periferik kanda hücre sayısında azalma sık rastlanan bir durumdur. MDS’de asıl problem sitopenilere bağı morbidite ve AML’ye dönüşüm riskidir. MDS için ileri yaş hastalığı denebilir. İleri yaştaki hastalarda açıklanamayan sitopeniler varsa MDS öncelikle düşünülmesi gereken durumlardandır.

EGR1 geni, erken büyüme yanıtı faktörü olarak bilinmektedir. NGFI-A, Zif268, Krox 24 ve Tis8 olarak da adlandırılmaktadır. Egr1 hücre farklılaşması ve hücre proliferasyonunda rol oynamaktadır. Kromozom 5’in uzun kolunda q31.2 lokusunda yer alan EGR1 geninin delesyonu veya kromozom 5 monozomisi akut miyeloid lösemi (AML) ve miyelodisplastik sendrom gibi farklı hematolojik malignitelerde gözlenmektedir. Bu hastaların periferik yayma ve kemik iliği aspirasyonu ile değerlendirilmesi gerekir. Populasyonda görülme sıklığı yaşa göre değişkenlik gösterir. Hastalarda anemi, nötropeni, trombositopeni gibi bulgular gözlenmektedir.

MDS’nin konvansiyonel sitogenetik, moleküler genetik ve FISH yöntemleriyle belirlenmesi mümkündür.

Kullanılan yöntemler birbirlerini tamamlayıcı özellikte olup hastalığın tanı ve tedavisinde sağlıklı yönlendirmeler yapmaktadır.

Bu çalışmada Myelodisplastik sendrom öntanısı ile gelen 143 olgunun 71’i kadın 72’si erkeklerden oluşmaktadır. Erkek kadın oranı 1,01’dir. Kemik iliği materyallerine FISH ve konvansiyonel sitogenetik analiz işlemleri yapılmıştır. Araştırmamız sonucunda bulgular tartışılmıştır.

Çalışmamızda ele aldığımız 143 olgunun 103’üne konvansiyonel sitogenetik çalışması yapılmıştır. Sonucuna ulaştığımız olgu sayısı 74’tür (%71,8). Bu olguların 61’inde (%82,4) normal karyotip sonucu elde edilirken 13 (%17,6) farklı olguda kromozom anomalileri bulunmuştur. Bizim çalışmamız sonucunda kromozom 5 anomalisi 11 olguda bulunmuş olup saptanan anomaliler arasında en yüksek olgu sayısına sahiptir. Kromozom 7 anomalisi saptanan olgular oranı %0,4, kromozom 8 anomali oranı ise %3,5, kromozom 20 anomalisi oranı %4,2, kromozom Y anomali oranı %2,1 dir.

Maura Romeo ve arkadaşlarının 40 olgu üzerinde yaptıkları çalışmada 15 kadın ve 25 erkek olgu olduğu, medyan yaş da 64,1 olarak bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da erkek olgu sayısı daha fazla olup medyan yaş 67,9'dur. Kromozom 5 anomalisi saptadıkları olgu sayısı 6 olarak belirtilmiştir. Gao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise 50 olgu değerlendirilmiş ve bu olguların %50'sinde kromozom anomalisi tespit edilirken %40'ında FISH anomalisi tespit edilmiştir. Olguların %6'sının FISH bulgularında kromozom 5 anomalisi, %20'sinde kromozom 7 anomalisi, %6'sında kromozom 20 anomalisi, %20'sinde kromozom 8 anomalisi ve %2'sinde Y kromozomu anomalisi tespit edildiği bildirilmiştir. Kokate ve arkadaşları 136 olguda FISH yöntemiyle %39,7 oranında anomali tespit etmişlerdir. Maura Romeo ve arkadaşlarının çalışmasıyla bizim çalışma sonuçlarımız uyumluluk gösterirken Gao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayla uyum göstermemektedir. Bizim çalışmamız benzer çalışmalardan bazılarıyla kıyaslandığında anomali görülme sıklığının az olduğu dikkat çekmektedir. Bunun sebebinin; olguların hastalık evrelerinin dağılımının farklı ve hücre kültür tekniği farklılıklarından olabileceğini düşünmekteyiz. Bununla birlikte gözlenen yapısal anomalilerden biri de inv(9)(p11q12) bulgusudur. Bu perisentrik inversiyon, polimorfizm olarak kabul edilmektedir ve fenotipe etkisi beklenmemektedir (Mozdarani ve diğ. 2007).

Çalışmada yapılan sitogenetik analiz yöntemiyle tespit edilemeyen olması mümkün anomalileri saptamak için moleküler sitogenetik analizlere de başvurulmaktadır. FISH bu yöntemlerden biridir. Yaptığımız çalışmayı gruplara ayırdığımızda; FISH yöntemiyle analizleri yapılan olgu grubu ve hem FISH hem de konvansiyonel sitogenetik çalışılan olgu grubundan oluşmaktadır. FISH-Konvansiyonel sitogenetik birlikte çalışılan olgu grubunda her iki çalışmada da anomali bulunan 4 olgu vardır. Bu verilerin oranı %5,4'tür. Sadece FISH çalışılan olgu grubunun sayısı 40'tır. Bu grupta tespit edilen anomali olgu sayısı ise 12'dir. Sadece FISH çalışılan ve anomali saptanan olguların oranı %30'dur. Bu sonuçta göstermektedir ki FISH, konvansiyonel sitogenetik analiz yönteminin saptayamadığı anomalileri yakalamıştır. Çünkü FISH, interfaz evresi hücresiyle çalışma yapılabilen bir tekniktir. Dolayısıyla daha fazla hücre kullanılarak daha geniş tarama imkanı sağlamaktadır. Bununla birlikte FISH'le tespit edemediğimiz ancak sadece sitogenetikle tespit edebildiğimiz monozomiler, trizomiler, delesyon ve inversiyon gibi yapısal anomaliler gözlemledik.

Bu nedenden dolayı da MDS'de olgulara FISH ile birlikte konvansiyonel sitogenetik analizinin de uygulanması gerektiği öngörülmektedir.

7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Temmuz 2013-Şubat 2017 tarihleri aralığında, , Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Anabilim Dalı'ndan yönlendirilen Miyelodisplastik Sendrom öntanılı 143 olgunun kemik iliği örneklerine konvansiyonel sitogenetik ve FISH analizi yapılmış ve sonuçları incelenmiştir. Çalışmada elde ettiğimiz veriler yapılan diğer çalışmalarla uyumluluk göstermektedir.

Bu sonuçlar doğrultusunda Miyelodisplastik Sendrom'un tanı ve prognozunda FISH le birlikte konvansiyonel sitogenetik analiz yönteminin birlikte çalışılması daha anlamlı sonucuna ulaşmaktayız.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aksoy M, Ozeris S, Sabuncu H. ve diğ. Exposure to benzene in Turkey between 1983 and 1985: a haematological study on 231 workers. *British Journal Of Industrial Medicine*. 1987; 44(11): 785-87.
- Başaran N. Tıbbi Genetik Ders Kitabı. Güneş ve Nobel Tıp Kitabevi, Ankara, 1999.
- Bayani J, Squire J. Fluorescence in situ hybridization (FISH). *Curr Protoc Cell Biol*. 2004; 22(22.4): 1-51.
- Beers HM, Berkow R. Myelodysplastic syndromes. *The Merck Manual Seventeenth Edition*. 1999; 953-954.
- Belickova M, Cermak J, Merkerova DM. ve diğ. Changes Associated With Lenalidomide Treatment in the Gene Expression Profiles of Patients With Del(5q). *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*. 2012; 12:5 375-383.
- Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT. ve diğ. Proposals for classification of the myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol*. 1982; 51: 189-99.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1982;51:189-99.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT. ve diğ. Proposals for the classification of the acute leukemias .French-American-British (FAB) Cooperative group. *Br. J Haematol*. 1976; 33: 451-58.
- Branch MJ, Knutsen T, Spurbeck JL. The AGT Cytogenetics Laboratory Manual. 3rd ed. USA, *Lippincott-Raven*. 1997.
- Cardis E, Vrijheid M, Blettner M. ve diğ. Risk of cancer after low doses of ionising radiation: retrospective cohort study in 15 countries. *BMJ (Clinical research ed)*. 2005; 331(7508): 77.
- Charrin C. Del(5q) in Myeloid Malignancies. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. March 1998.
- Desangles F. -7/(del)7q in Adults. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. June 1999
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M. ve diğ. GLOBOCAN Cancer Incidence and Mortality Worldwide. 2013, Erişim:16.01.2017, <http://globocan.iarc.fr>
- Giagounidis A, Haase D. Morphology, cytogenetics and classification of MDS. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2013; 26(4): 337-353.
- Greenberg P, Cox C, Le Beau M. ve diğ. International Scoring System For Evaluating Prognosis İn Myelodysplastic Syndromes. *Blood*. 1997; 15; 89(6): 2079-88.
- Greenberg P, Cox C, LeBeau MM. ve diğ. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997; 89: 2079-2088.
- Houston P, Campbell CJ, Svaren J, Milbrandt J, Braddock M: The transcriptional corepressor NAB2 blocks Egr-1-mediated growth factor activation and angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;283:480-486.
- Jain KK. Current status of fluorescence in-situ hybridization. *Med Device Technol*. 2004; 15: 14-17.
- Johnson E, Cotter FE. Monosomy 7 and 7q- associated with myeloid malignancy. *Blood Rev*. 1997; 11: 46-55.
- Kearney L, Horsley SW. Molecular cytogenetics in haematological malignancy: current technology and future prospects. *Chromosoma* 2005; 114: 286-294.

- Kelly L, Clark J, Gilliland G. Comprehensive genotypicanalysis of leukemia: clinical and therapeuticimplications. *Curr Opin Oncol*. 2002; 14: 10-18.
- Marilyn L, Daniel P. Clinical cytogenetics and molecular cytogenetics. *J Zhejiang Univ SCIENCE B* 2006; 7: 162-163.
- McNeil N, Ried T. Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: Technology and applications in molecular medicine. *Expert Rev Mol Med*. 2000; 2000: 1-14.
- Mecucci C. Molecular Features of Primary MDS With Cytogenetic Changes. *Leukemia Research*. 1998 22: 293-302.
- Moorhead P, Nowell P, Mellman W. ve diğ. Chromosome preparations of leukocytes cultured from peripheral blood. *Exp Cell Res*. 1960; 20: 613-16.
- Mori N, Morosetti R, Hoflehner E. ve diğ. Allelic loss in the progressionof myelodysplastic syndrome. *Cancer Res*. 2000; 60: 3039-3042.
- Mozdarani H, Meybodi AM, Karimi H. Impact of pericentrix inversion of Chromosome 9 [inv (9)(p11q12)] on infertility. *Indian J Hum Genet*. 2007; 13(1): 26-29.
- Neukirchen J, Schoonen WM, Strupp C. ve diğ. Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: data from the Dusseldorf MDS-registry. *Leukemia research*. 2011; 35(12):1591-96.
- Nisse C, Haguenoer JM, Grandbastien B. ve diğ. Occupational and environmental risk factors of the myelodysplastic syndromes in the North of France. *British Journal Of Haematology*. 2001; 112(4): 927- 35.
- Pala F. Hematolojik kanserlerde FISH uygulamaları. *Trakya Üniv Tıp Fakültesi Dergisi*. 2005; 22: 132-36.
- Pedersen-Bjergaard J, Daugaard G, Hansen SW. ve diğ. Increased risk of myelodysplasia and leukaemia after etoposide, cisplatin, and bleomycin for germ-cell tumours. *Lancet*. 1991; 338(8763): 359-63.
- Pisani D, Rainaldi A: Management of high-risk myelodysplastic syndromes. *Clinical reviews in Oncology/Hematology*. 2001; 40; 215-228.
- Rigolin GM, Cuneo A, Roberti MG. ve diğ. Exposure to myelotoxic agents and myelodysplasia: case-control study and correlation with clinicobiological findings. *British Journal Of Haematology*. 1998; 103(1): 189-97.
- Robert L. Nussbaum, Roderick R. McInnes, Huntington F. Willard HF. Thompson ve Thompson Tıbbi Genetik. 6. baskı, Ankara, Güneş Kitabevi, 2005; 17-32, 135-155, 157-17.
- Sandberg A. Cancer cytogenetics for clinicians. *CA Cancer J Clin*. 1994; 44: 136-59.
- Shaffer L, McGowan-Jordan J, Schmid M. (Ed) ISCN(2013): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Karger, Basel, 2013.
- Sreekantaiah C. FISH panels for hematologic malignancies. *Cytogenet Genome Res*. 2007; 118: 284-96.
- Steensma DP. Myelodysplastic Syndromes: Pathobiology and Clinical Management Second Edition. 2008 1-86.
- Teixeira M. Combined classical and molecular cytogenetic analysis of cancer. *Eur J Cancer*. 2002; 38: 1580-84.

Tricot GJ, Lauer RC, Appelbaum FR. ve diğ. Management of the myelodysplastic syndromes. *Semin Oncol.* 1987; 14(4): 444-53.

Türk Hematoloji Derneği, 2010. Erişim: 02 Nisan 2018, <http://thd.org.tr/>
Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009;114(5):937-51.

Yirmibeş Karaoğuz M. İnsandaki genetik hastalıklar. MİSED (Türk Eczacılar Birliği Yayını/Meslek İçi Sürekli Eğitim Dergisi) 2007;19-20:5-15.



ÖZGEÇMİŞ

1.BİREYSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Seda REKA

Doğum Yeri ve Tarihi:18.07.1986-İzmit

Uyruğu: TC

Medeni Durumu: Evli

İletişim Adresi ve Telefonu: Kocatepe Mah., 104. Sokak,
No: 36, Daire: 5 Kuruçeşme İzmit/Kocaeli

Tel: 0544 2539791

2.EĞİTİM DURUMU

2006-2010: Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü

2000-2004: Merkez Bankası Derince Anadolu Lisesi

3.STAJLAR

2009: Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıp Bebek

Ünitesi

4.YABANCI DİL

İngilizce

5.ÜNVANLARI

2010- : Biyolog

6.MESLEKİ DENEYİMİ

-Periferik lenfosit hücre kültürü

-Kemik iliği kültürü

-Kordon kanı kültürü

-Koryon villus sitolojisi kültürü

7.BİLİMSEL ETKİNLİKLER

- Ulusal Kongrelerde Kabul Edilen Poster Bildirileri

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

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