

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**13q DELESYONLU MULTİPL MİYELOMLU
HASTALARDA BORTEZOMİB ETKİ
MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI**

ZEYNEP FİLİZ ZADEOĞLULARI

TEMEL ONKOLOJİ PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR–2010

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**13q DELESYONLU MULTİPL MİYELOMLU
HASTALARDA BORTEZOMİB ETKİ
MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI**

TEMEL ONKOLOJİ PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

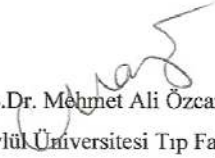
ZEYNEP FİLİZ ZADEOĞLULARI

Danışman Öğretim Üyesi: **Doç. Dr. Mehmet Ali ÖZCAN**

Bu araştırma İzmir Kan Hastalıkları ve Kanser Araştırma Yardım Derneği tarafından desteklenmiştir.

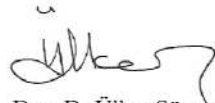
Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji Yüksek Lisans Programı öğrencisi Zeynep Filiz Zadeoğluları'nın **"13q Delesyonlu Multipl Miyelomlu Hastalarda Bortezomib Etki Mekanizmasının Araştırılması"** isimli yüksek lisans tezi 11.01.2010 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek **başarılı** bulunmuştur.

JÜRİ BAŞKANI


Doç.Dr. Mehmet Ali Özcan
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Hematoloji Bilim Dalı

JÜRİ ÜYELERİ


Prof.Dr.Münir Kınay
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Radyasyon Onkolojisi AD
(ÜYE)


Doç. Dr. Ülker Sönmez
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji- Embrioloji AD
(ÜYE)

Doç.Dr. Işıl Tekmen
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji – Embrioloji AD
(YEDEK ÜYE)

Prof. Dr.G. Hayri Özsan
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Hematoloji Bilim Dalı
(YEDEK ÜYE)

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İçindekiler.....	<i>i</i>
Tablo listesi.....	<i>ii</i>
Şekil listesi.....	<i>iii</i>
Resim listesi.....	<i>iii</i>
Kısaltmalar.....	<i>iv</i>
Teşekkür.....	<i>vi</i>
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ ve AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	7
3. GEREÇ ve YÖNTEM	25
4. BULGULAR	34
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	51
7. KAYNAKLAR	52
8. EKLER	57

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1: Multiple miyelomda klinik belirtiler.....	9
Tablo 2: Plazma hücre diskrazileri tanı kriterleri.....	10
Tablo 3: Multiple miyelom tanı kriterleri.....	11
Tablo 4: MGUS tanı kriterleri.....	12
Tablo 5: Durie- Salmon evreleme sistemi.....	15
Tablo 6: Uluslararası evreleme sistemi.....	16
Tablo 7: Multipl miyelomda prognostik faktörler.....	16
Tablo 8: Çalışmamızdaki olgulara ait demografik özellikleri.....	34
Tablo 9: FISH sonuçları.....	35
Tablo 10: FISH sonuçlarının cinsiyete göre karşılaştırılması.....	36
Tablo 11: NF-kB sonuçları.....	36
Tablo 12: NF-kB değerlerinin 13q delesyon sonuçları ile karşılaştırılması:.....	37
Tablo 13: ICAM sonuçları.....	39
Tablo 14: ICAM değerlerinin 13q delesyon sonuçları ile karşılaştırılması:.....	39
Tablo 15: 13q delesyonu negatif hastalarda ICAM ve NF-kB değerlerinin karşılaştırılması..	40
Tablo 16: 13q delesyonu pozitif hastalarda ICAM ve NF-kB değerlerinin karşılaştırılması..	40
Tablo 17: 13 q delesyonu pozitif ve negatif hastalardaki ICAM kültür öncesi değer ve ICAM kültür sonrası değerler farkı (DICAM) ile NF-kB kültür öncesi değerler ile NF-kB kültür sonrası değerler farklarının (DNF-kB) karşılaştırılması.....	41
Tablo 18: Çalışmada yer alan hastalara ait demografik, klinik veriler.....	42
Tablo 19: 13q delesyon varlığı ile klinik verilerin karşılaştırılması.....	43

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1: Multipl miyelom hücresi ve kemik iliği stroma hücre ilişkisi.....	13
Şekil 2: Multipl miyelom hücresi ve sinyal yolları ilişkisi.....	13
Şekil 3: Proteozom.....	23
Şekil 4: Bortezomib etki mekanizması.....	24
Şekil 5: Kullanılan yöntemlerin akış şeması.....	25

RESİM LİSTESİ

Sayfa No

Resim 1: Kemik iliği miyelom hücre morfolojisi.....	14
Resim 2: DAPI görüntüsü.....	35
Resim 3: 13q del. Negatif hücre.....	35
Resim 4: 13q del. Pozitif hücre.....	35
Resim 5: ICAM kültür öncesi görüntü-1.....	38
Resim 6: ICAM kültür öncesi görüntü-2.....	38
Resim 7: ICAM kültür sonrası görüntü-1.....	38
Resim 8: ICAM kültür sonrası görüntü-2.....	38

KISALTMALAR

MM: Multipl miyelom

KT: Kemoterapi

ICAM: İntersellüler adezyon molekülü

FISH: Floresan insitu hibridizasyon

NF-kB: Nükleer faktör kappa B

Ig: İmmunglobulin

POEMS: Polinöropati, organomegali, endokrinopati, monoklonal gammopati, deri değişiklikleri

β 2 MG: Beta 2 mikroglobulin

CRP: C reaktif protein

LDH: Laktat dehidrogenaz

BT: Beyin Tomografisi

MR: Magnetik Rezonans

MGUS: Sebebi bilinmeyen monoklonal gammopati

SMM: Smoldering multiple myelom- Asemptomatik multiple miyelom

IL-6: Interlökin-6

IL-1 β : Interlökin-1 β

MIP-1 α : Makrofaj inflamatuvar protein 1 α

VEGF: Vasküler endotel growth faktör,

IGF: İnsülin growth faktör,

TNF- α : Tümör nekrosis faktör α

VLA4-5: Very late antijen 4-5

DS: Durie Salmon

ISS: Uluslararası evrelendirme sistemi

ALB: Albumin

Del 13q: 13 q delesyonu

IFN: İnterferon

EBMT: European Group for Blood and Marrow Transplantation- Kan ve İlik Transplantasyonu için Avrupa Grubu

RB1: Retinoblastoma 1 geni

IkB: İnhibitör kappa B

IkK: İnhibitör kappa B kinaz
TNF: Tümör nekroz faktör
MMP-2: Matriks metalloproteinaz 2
MMP-9: Matriks metalloproteinaz 9
VCAM-1: Vasküler hücre adezyon molekülü
MDR-1: Multidrug rezistance geni
APC: Antijen sunan hücreler
LFA: Lenfosit ilişkili molekül
TCR: T hücre reseptörü
BMSC: Kemik iliği stromal hücreler
MNC: Mononükleer hücre
ELISA: ‘sandwich’ enzyme immunoassay
IHK: İmmunohistokimya
PBS: Fosfat tampon solusyonu
FBS: Fetal sığır serumu
DMSO: Dimetil sülfoksit
HRP: Horseradish peroksidaz
TMB: Tetra metil benzidin
H2O2: Hidrojen peroksit

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın yürütülmesi ve yazım aşamalarında bilimsel görüşlerini ve desteğini esirgemeyen danışmanım Doç. Dr. Mehmet Ali ÖZCAN’a,

Tezimin deney ve yazım aşamalarında uygun ortam sağlayarak bana destek olan Onkoloji Enstitüsü Müdürü Prof. Dr. Münir KINAY’a,

Tez çalışmamı maddi açıdan destekleyen ‘İzmir Kan Hastalıkları ve Kanser Araştırma Yardım Derneği’ ne;

Hastaların seçimi ve hasta örneklerinin alınmasında gösterdiği yardımlardan dolayı Yrd.Doç.Dr.Özden Pişkin, Uzm.Dr. Nur Hilal TURGUT ve tüm Dokuz Eylül Üniversitesi Hematoloji Bilim Dalı çalışanlarına,

Tezimin laboratuvar çalışmalarının planlanması ve deneylerin gerçekleştirilmesinde bilgi ve deneyimlerini paylaşarak destek olan Öğr.Gör.Uzm.Dr.Zübeyde ERBAYRAKTAR’a

Tez çalışmam sırasında bilimsel ve manevi desteklerini esirgemeyen, Öğr.Gör.Uzm.Dr. Serpil T. AKHİSAROĞLU ve Doç. Dr. Ataç SÖNMEZ’e;

Tezimin immunohistokimyasal deney çalışmalarını titizlikle planlayan ve yürüten Araş.Gör. Serap CİLAKER- MICILI ve Doç. Dr. Ülker SÖNMEZ’e;

İstatistiksel analizlerin yapılmasındaki katkıları için Doç. Dr. Hülya ELLİDOKUZ’a,

Bütün çalışmalarım boyunca her zaman yanımda olan, bana inanan ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen SEVGİLİ AİLEM’E, amcam Halil AY’a,

Varlığı için Yrd.Doç.Dr. Cenk DEMİRDÖVER’e teşekkürlerimi bir borç biliyorum.

Zeynep Filiz ZADEOĞLULARI

ÖZET

13q DELESYONLU MULTIPL MİYELOMLU HASTALARDA BORTEZOMİB ETKİ MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI

Zeynep Filiz ZADEOĞLULARI

Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, 35340 İnciraltı-İzmir

Multipl miyelom (MM), malign plazma hücrelerinin klonal proliferasyonu ile karakterize malign hematolojik bir hastalıktır. Multipl miyelomdaki en önemli sorunlardan biri ortalama sağkalımın 3-7 yıl ile sınırlı olmasıdır. Ayrıca, konvansiyonel ve yüksek doz terapilerin sıklıkla uygulanmasına rağmen, tümör hücrelerinin çeşitli tedavilere karşı direnç geliştirmesi etkin tedavi için diğer önemli sorunu oluşturur. Multipl miyelomda kazanılmış tedavi direncinin patogenezi açıklayan mekanizmaların anlaşılması için ayrıntılı çalışmalara gereksinim vardır.

Yapılan çalışmalarda 13.'cü kromozomda gözlenen anomalilerin kısa yaşam süresi, kötü prognoz ve konvansiyonel kemoterapötiklere yanıt azlığı ile ilişkisi bildirilmiş ve İntersellüler Adezyon Molekülü (ICAM) ve Nükleer Faktör Kappa B (NF-kB) molekülünün MM'da gelişen kazanılmış ilaç direncinde etkin rol oynayabileceğine dair sonuçlar bulunmuştur.

Bu çalışmadaki amacımız, multipl miyelom tedavisinde umut vaat eden bir ajan olan bortezomibin, 13q delesyonu, ICAM ekspresyonu ve NF-kB aktivitesi ile ilişkisini inceleyebilmektir.

Çalışmamızda, tedavisinde bortezomib kullanılmamış 18 multipl miyelom hastasının kemik iliği aspirasyon örneklerinden Ficoll yöntemiyle izole edilen mononükleer hücreler kültüre edildi ve bortezomib uygulandı. Kültür öncesi ve sonrası ICAM düzeyleri immunohistokimyasal olarak ve NF-kB seviyeleri ELİZA yöntemi ile incelendi. Ayrıca FISH yöntemi ile 13q delesyon incelemesi yapıldı.

Sonuçlarımıza göre, 13q delesyon pozitifliği %44 olarak bulunmuştur. 13q delesyon varlığı ile NF-kB aktivitesi karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamamışken, 13q delesyonu negatif hastalarda ICAM kültür öncesi değerlerin kültür sonrası değerlere göre yüksek olduğu bulunmuştur. Diğer yandan 13q delesyonu pozitif hastalarda kalsiyum, C- reaktif protein ve kemik iliği plazma hücre yüzdeleri anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur.

Bu alışma sonucunda elde ettiğimiz veriler, ile 13q delesyon varlığının ilaç direnci gelişiminde ICAM üzerinden ilişkisinin olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, NF-kB aktifliğinin, ICAM ekspresyonun daha fazla sayıdaki hasta serileri ile ayrıntılı incelenmesi gerektiğini düşündürmüştür.

Anahtar kelimeler: Multipl miyelom, 13q delesyonu, ICAM, NF-kB, ilaç direnci

ABSTRACT
THE INVESTIGATION OF BORTEZOMIB ACTIVATION MECHANISIM IN 13q
DELETION POSITIVE MULTIPLE MYELOMA PATIENTS

Zeynep Filiz ZADEOĞLULARI

Dokuz Eylül University, Institute of Oncology, 35340 İnciraltı-İzmir/TURKEY

Multiple myeloma (MM) is a malignant hematological disorder characterized by the clonal proliferation of malignant plasma cells. Despite conventional and high dose therapies MM remains incurable disease with a median survival of 3-7 years and resistance of tumor cells to various treatments. Developing drug resistance in MM represents the main obstacle to satisfactory treatment. In order to clarify the pathogenesis of acquired drug resistance in MM, further detailed studies should be performed.

Study findings have shown that abnormalities of chromosome 13 are associated with reduced life span, poor prognosis and lower responses to conventional therapies. Also recent studies suggest that ICAM and NF-kB molecules are important factors in the pathogenesis of acquired drug resistance in MM.

The aim of this study is to evaluate the interaction between bortezomib, which is the promising novel agent for multiple myeloma treatment, and 13q deletion, the expression of ICAM and the activation of NF-kB.

In this study, bone marrow samples from 18 patients with MM were used. Mononuclear cells were isolated by Ficoll separation and cultured overnight. Before and after treating bortezomib, ICAM levels are evaluated by immunohistochemistry and the activation of NF-kB was investigated by ELISA. In addition, 13q deletion was detected by FISH.

According to our results, 44% of MM patients were positive for 13q deletion. The relation ship between the presence of 13q deletion and the activation of NF-kB was not significant. But, before treatment, the expression levels of ICAM were higher than after treating bortezomib in patients with 13q deletion negative. On the other hand, in patients with 13q deletion positive, the level of calcium, CRP and plasma cells in bone marrow were significantly higher.

Our study findings suggest, there can be association between the presence of 13q deletion and acquired drug resistance. Furthermore, NF-kB activation and the expression of ICAM should be investigated in large patient series studies.

Keywords: Multipl myeloma, 13q deletion, ICAM, NF-kB, Drug resistance

Multipl miyelom (MM), post germinal merkezli B hücrelerinin plazmoblast (plazma hücreleri- difreransiye olmuş B hücreleri) ile karakterize malign hematolojik bir hastalıktır (1). Malign plazma hücrelerinin kemik iliğini infiltre etmesiyle ortaya çıkar. Erişkinlerdeki tüm malignansilerin %1'ini oluşturur. Multipl miyelom insidansı yaşa bağlı olarak artar (2). Multipl miyelomda B hücreleri lenf nodlarının germinal merkezine göç ettikleri zaman, plazma hücrelerindeki immunglobulin değişken bölge genlerinde somatik hipermutasyon gelişir bu mutasyon sonucunda da B hücrelerinin malignant değişimi gözlenir (3).

Multipl miyelomdaki en önemli sorunlardan biri ortalama sağkalımın konvansiyonel tedavi ya da yüksek doz KT'yi takiben otolog kök hücre transplantasyon tedavisi sonrasında 3-7 yıl ile sınırlı olmasıdır. Ayrıca, konvansiyonel ve yüksek doz terapilerin sıklıkla uygulanmasına rağmen, tümör hücrelerinin çeşitli tedavilere karşı direnç geliştirmesi etkin tedavi için diğer önemli sorunu oluşturur (4).

Son yıllarda yapılan çalışmalar MM'da sınırlayıcı bir basamak olarak karşımıza çıkan, ortalama sağ kalım sürelerini kısaltan, kemoterapi sonrası gelişen relapsların ana nedenini oluşturan, geliştirilmiş tedavi direncinin patogenezi açıklayan mekanizmaları anlamaya yönelik olmuştur. Çalışmalarda kemik iliği mikro çevresi ile miyelom plazma hücreleri arasında sinerjistik patolojik bir ilişki olduğu ortaya konmuştur. MM hücreleri ve kemik iliği mikro çevre elemanları arasındaki direkt etkileşimler hücre yüzey proteinleri ve hücre adezyon molekülleri ile sağlanmaktadır, bu direkt etkileşimlerin, kemoterapötik ajanlara direnç gelişiminde etkili olduğu gösterilmiştir (5,6).

İntersellüler Adezyon Molekülü (ICAM) immun globulin süper ailesine dahil adezyon molekülleri grubunda yer almaktadır. Yapılan birçok çalışmada ICAM molekülünün MM'da gelişen ilaç direncinde etkin rol oynayabileceğine dair sonuçlar bulunmuştur (7).

Diğer yandan, MM patogenezi açıklamaya yönelik birçok genetik çalışma yapılmıştır. İnterfaz aşamasında Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) yöntemi kullanılarak yapılan incelemelerde 13.'cü kromozomdaki anomalilerin plazma hücreli neoplazımların her aşamasında bulunduğu saptanmıştır. Birçok hastada 13.'cü kromozom monozomileri, ve sıklıkla 13q14 bandında gözlenen intersiyel delesyonlar saptanmıştır (8-10). Yapılan çalışmalarda 13.'cü kromozomda gözlenen anomalilerin kısa yaşam süresi, kötü prognoz ve konvansiyonel kemoterapötiklere yanıt azlığı ile ilişkisi bildirilmiştir.

Multipl miyelomda özellikle konvansiyonel kemoterapötiklere karşı ilaç direnci geliştiren hastalarda proteozom inhibitörü olan bortezomib ile tedavi son yıllarda umut vaad eden bir gelişme olmuştur (11).

Nükleer Faktör Kappa B (NF-kB), aralarında büyüme faktörleri, anjiogenez modulatorleri, hücre adezyon molekülleri ve anti-apoptotik faktörlerinde bulunduğu birçok gen için transkripsiyon faktörü olarak işlev gören kritik regülatuar proteindir. NF-kB ilk olarak B lenfositlerde immunglobulin kappa hafif zincir geninin transkripsiyonu için gerekli nükleer faktör olarak tanımlanmıştır (12).

Bu çalışmadaki amacımız, MM hastalarında tedavisinde kısıtlayıcı bir aşama olan birinci sıra tedaviye geliştirilen ilaç direnci için umut vaad eden bir ajan olan bortezomibin, ilaç direnci gelişmesinde yüksek risk olarak tanımlanmış 13q delesyonu ile ilaç direnci mekanizmasında önemli yeri olan ICAM ekspresyonu ve NF-kB aktivitesi ile ilişkisini inceleyebilmektir. Böylece 13q delesyonlu MM hastalarda ilaç direnci gelişmesinde önemi belirlenmiş ICAM ve NF-kB moleküllerinin düzeyleri incelenebilecek ve gelecekte bu hastaların tedavilerinin planlanması aşamasında daha etkin ve hedefe yönelik tedaviler geliştirilmesine katkı sağlanabilecektir. Bu amaçla MM'da kötü prognoz ve ilaç direnci gelişiminde önemli bir faktör olarak tanımlanan 13q delesyon varlığı ile ilaç direnci gelişiminden sorumlu moleküller olarak belirlenen ICAM ve NF-kB ekspresyon değişikliklerini invitro olarak bortezomib ile kültüre edilmiş kemik iliği mononükleer hücrelerinde kültür öncesi ve sonrası ekspresyon değişiklikleri ilişkisi incelenmiştir.

2.1. MULTİPL MİYELOM

Multipl miyelom (MM), kemik iliğinde B hücrelerinden köken alan plazma hücrelerinin monoklonal çoğalması ile karakterize malign hematolojik bir hastalıktır (1).

Bu hücreler terminal olarak farklılaşmış olgun B hücreleridir. Hücrelerin kaynakları postfoliküler B hücreleri ya da kemik iliği kaynaklı pre-B hücreleridir. Multipl miyelomda B hücreleri lenf nodlarının germinal merkezine göç ettikleri zaman, plazma hücrelerindeki immunglobulin değişken bölge genlerinde somatik hipermutasyon gelişir bu mutasyon sonucunda da B hücrelerinin malignant değişimi gözlenir. Malignant plazma hücrelerinin kemik iliğini infiltre etmesiyle ortaya çıkar. (2, 3).

Hastalığın en sık gözlenen klinik sendromu; plazma hücre diskrazileri ya da monoklonal gammopatilerdir. Bu değişikliklerden en sık gözleneni immunglobulin salgılayan hücrelerin monoklonal proliferasyonu ve bunun sonucunda da tek bir immunglobulin (Ig)'in serum seviyesinin artışıdır. Monoklonal protein serum ve idrar elektroforezinde ve/veya daha duyarlı bir teknik olarak immunfiksasyon elektroforezi ile tespit edilir (4).

Diğer karakteristik bulgular; ilgili doku ve organ hasarı, hiperkalsemi, renal yetmezlik, anemi, kemik lezyonları ve tekrarlayan bakteriyel enfeksiyonlar ile tanımlanabilir (5).

İskelet belirtileri hiperkalsemi ve kemik ağrısı ile daha sonraki dönemlerde osteolitik kemik rezopsiyonu ve osteoblastik kemik yapısının inhibe edilmesi ile ortaya çıkan patolojik fraktürler ile karakterizedir. Direkt grafilerde özellikle yassı kemiklerde tipik olarak osteolitik lezyonlar ve/veya osteoporoz görülür. Tanısal değer taşıyan bu bulguyu saptamak üzere her miyelomlu hastaya kemik taramaları yapmak gerekir. Osteolitik lezyonlar kafa, pelvis, vertebra, kosta, klavikula, humerus başı ve diğer uzun kemiklerde görülür. Miyelomlu hastaların %3'ünde kemik lezyonları ostoesklerotik olabilmektedir (POEMS-Polinöropati, organomegali, endokrinopati, monoklonal gammopati, deri değişiklikleri-sendromu) (5-7).

Renal yetmezlik genellikle 'Bence Jones' proteinürisi ile ortaya çıkmaktadır, fakat ikincil olarak amiloidoz ya da enfeksiyonlar sonucunda da gelişebilir. Birçok hasta hipogamma globulinemi göstermektedir (normal serum Ig düzeyi < %50). Tanı sırasında miyelomlu hastaların %25'inde serum kreatinin seviyesi > 2 mg/dl'nin üzerinde, %25'inde ise daha hafif kreatinin artışı mevcuttur. Böbrek yetersizliğini arttıran risk faktörleri; hafif

zincir hastalığı, IgD miyelom, hiperkalsemi, hiperürisemi, dehidratasyon, nefrotoksik ilaç kullanımı ve bifosfanatlardır (6).

Miyelomda görülebilecek diğer bir bulgu da hiperkalsemidir. Serum kalsiyum düzeyinin > 11 mg/dl'nin üzerinde olması olarak tarif edilen bu durum, miyelomda %18-30 oranda görülmekte, klinik olarak yorgunluk, kabızlık, bulantı, dehidratasyon ve konfüzyon ile kendini göstermektedir (4-6).

Miyelomda en sık görülen periferik kan bulgusu renal yetmezlik ve kemik iliği eritroid elementlerin azalması ile ortaya çıkan anemidir. Anemi normokrom normositer, nadiren mikrositer özelliktedir. Multipl miyelom'lu hastaların periferik kan yayma preparatlarında %1-2 kadar plazma hücresi görülebilir. Periferik yaymalarda görülen rulo formasyonu paraproteinin yol açtığı diğer bir bulgudur. Multipl miyelomda sedimentasyon, paraproteinin eritrosit yüzeyindeki negatif yükleri bloke etmesi nedeni ile daima çok yüksektir. Ancak non sekretuar miyelomlarda, hafif zincir hastalığı ve kryoglobinemide sedimentasyon yüksek olmayabilir. Miyelomlu hastalarda çeşitli tipte hemostatik bozukluklara bağlı olarak kanama eğilimi oluşabilir. Hemostatik bozukluk tipine bağlı olarak trombositopeni, trombosit agregasyon bozuklukları, koagülasyon ve fibrinolitik testlerde uzama, D-dimer'de artma görülür. Serum $\beta 2$ mikroglobulin ($\beta 2$ MG), C reaktif protein (CRP), laktik dehidrogenaz (LDH) seviyelerinde artma, albumin seviyesinde azalma prognostik değer taşıyan diğer laboratuvar bulgularıdır (6).

Miyelomda paraprotein yapımını azaltmak üzere baskılatıcı T lenfositlerde artma olur ve bu artmış baskılayıcı T lenfosit faaliyeti normal immunglobulin azalmasına yol açar. Bu durum miyelomda görülen sık enfeksiyonların ana nedenini oluşturur (6,7).

Plazma hücreleri, çeşitli plazma hücre ilişkili ya da diğer antijenleri eksprese ederler. CD45 negatif, CD38, CD138 pozitif, son dönem hastalık ve plazma hücreli lösemi dışında CD56 pozitif, CD19 ve CD20 pozitifdir. Az sayıdaki hastada CD10, CD28 ve c-kit pozitif saptanabilir. MM tanısının doğrulanması için kemik iliği aspirasyonu ve biopsisi gereklidir(8)

Tablo1: Multiple miyelomda klinik belirtiler

Klinik Bulgular	Klinik Bulgu Nedenleri ve Patogenezi
Hiperkalsemi, osteoporoz, patolojik fraktürler, litik kemik lezyonları, kemik ağrısı	○ Tümör yükü ○ Tümör hücreleri tarafından salgılanan osteoklast aktive edici faktörün üretimi ○ Osteoblast inhibitör faktörleri
Böbrek yetmezliği	○ Hiperkalsemi ○ Hafif zincir birikimi ○ Amiloidozis ○ Nefropati ○ İlaç toksisitesi
Anemi	○ Kemik iliği infiltrasyonu ○ İnhibitör faktör üretimi ○ Hemoliz ○ Kırmızı kan hücrelerinin üretiminin azalması ○ Eritropoetin düzeylerinin azalması
Tekrarlayan Enfeksiyonlar	○ Hipogamaglobülinemi ○ Düşük CD4 düzeyleri ○ Nötrofil migrasyonun azalması
Nörolojik Semptomlar	○ Hiperviskozite ○ Krioglobülinemi ○ Amiloid birikimi ○ Hiperkalsemi ○ Sinir basısı ○ Antinöronal antikorlar ○ POEMS sendromu ○ Tedavi ilişkili toksisite
Bulantı ve Kusma	○ Böbrek yetmezliği ○ Hiperkalsemi
Kanama ve Koagülasyon Bozuklukları	○ Pıhtılaşma faktörlerinin inhibisyonu ○ Endotelin amiloid hasarı ○ Trombosit disfonksiyonu ○ Tedavi ilişkili hiperkoagülasyon bozuklukları

Plazma hücresi “labelling index” kemik iliğindeki plazma hücre klonalitesi ve bölünme hızını gösterir. Prognostik önemi de olan bu önemli laboratuvar incelenmesi 5-bromo-2 deoksiüridin immunfloresan boyama, timidin işaretleme veya flow sitometri ile tayin edilir. Kemik iliği aspirasyonlarında atipik özellikler de içeren plazma hücrelerinde %10 veya daha fazla artma, kemik iliği biyopsilerinde ise interstisyumda miyelom plazma hücreleri ile infiltrasyon görülür (5).

Tablo 2: Plazma hücre diskrazileri tanı kriterleri

Plazma Hücre Diskrazisi	Tanı Kriteri
MGUS tanı kriterleri	Aşağıdakilerden en az 3 kriterin varlığı: ○ Serum M protein < 3 gr/dl ○ Kemik iliğinde sitolojik anomali gösteren plazma hücresi < %10 ○ İdrarda Bence- Jones proteini < 1 gr/ 24 s ○ Normal poliklonal Ig ○ Kemik lezyonu yok (BT veya MRI ile kanıtlanmış) ○ Anemi, hiperkalsemi, böbrek yetmezliği yok
Smoldering Miyelom (SMM)- Asemptomatik MM tanı kriterleri	Aşağıdakilerden hepsinin varlığı: ○ Serum monoklonal protein > 3 gr/dl veya ○ Kemik iliğinde > %10 plazma hücresi veya ○ Kemik iliği biyopsisinde agregatlar veya ikisi birden ○ Anemi, böbrek yetmezliği veya hiperkalsemi yok
Multipl Miyelom tanı kriterleri	Aşağıdakilerden 3 kriterin varlığı: ○ Serum ve idrarda monoklonal protein ○ Kemik iliğinde > %10 plazma hücresi veya plazmasitom ○ Ek olarak aşağıdakilerden bir veya daha fazlası Anemi Litik kemik lezyonu ve/ veya osteoporoz Kemik iliği plazma hücre labeling indeks > %1 Kemik iliğinde ≥ 30 plazma hücresi Böbrek yetersizliği Hiperkalsemi
Waldenström's Makroglobülinemi tanı kriterleri	Aşağıdakilerden hepsinin varlığı: ○ IgM monoklonal gammopati ○ Kemik iliğinde $\geq$ %10 lenfoplazmasitik infiltrasyon
Soliter Plazmasitom tanı kriterleri	Aşağıdakilerden hepsinin varlığı: ○ Kemikte biopsi ile kanıtlanmış soliter lezyon ya da yumuşak dokuda klonal plazma hücreleri varlığı ○ Klonal plazma hücresi bulunmayan normal kemik iliği ○ Normal kemik surveyi ○ Uç organ hasar varlığı
Sistemik AL*Amiloidozis tanı kriterleri	Aşağıdakilerden hepsinin varlığı: ○ Amiloid ilişkili sistemik sendrom varlığı ○ Herhangi bir dokuda Kongo kırmızısı ile pozitif amiloid işaretleme ○ Direk amiloid incelemesi ile amiloidin hafif zincir olduğunun kanıtlanması ○ Monoklonal plazma proliferatif hastalık varlığı
POEMS sendromu tanı kriterleri	Aşağıdakilerden hepsinin varlığı: ○ Monoklonal plazma hücre hastalık varlığı ○ Periferik nöropati ○ Osterosikleratik kemik lezyonu, Castleman hastalığı, organmegali, endokrinopati, ödem, tipik deri değişiklikleri ve papilla ödemi bulgularında en az birinin varlığı

* Amiloid hafif zincir

Tablo 3: Multiple miyelom tanı kriterleri

Multiple Miyelom Tanı Kriterleri*	
Major Kriterler	o Doku biyopsisinde plazmositom varlığı
	o Kemik iliğinde > %10 plazma hücresi
	o Serum elektroforezinde monoklonal globülin pik seviyesi IgG >3.5 g/dl ya da IgA >2.0 g/dl veya 24 saatlik idrar elektroforezinde κ ve λ hafif zincir sekresyon seviyesi 1.0g/24 h
Minör Kriterler	o Kemik iliği plazmasitozu %10-30
	o Monoklonal globülin pik seviyesi varlığı fakat düzeyinin majör kriterlerdekinden daha az olması
	o Litik kemik lezyon varlığı
	o Normal IgM <0.05 g/dl, IgA <0.1g/dl ya da IgG<0.6 g/dl

*MM tanısı semptomatik hastada en az bir major ve bir minör kriter olduğunda ya da en az 3 minör kriter varlığında konur.

2.1.1 Epidemiyoloji

Miyelom ileri yaş hastalığı olup, tanı yaşı erkekler için ortalama 62, kadınlarda ise 61'dir. Hastaların %2'sinde tanı yaşı 40 yaş altındadır. Erişkinlerdeki tüm malignansilerin %1'ini ve hematolojik malignansilerin %13'ünü oluşturur. MM insidansı yaşa bağlı olarak artar. Gelişmiş ülkelerde insidans 4:100000'dir. Sağkalım oranları konvansiyonel tedavi sonrasında 3-4 yıl, yüksek doz kemoterapi (KT) sonrası otolog kök hücre transplantasyon tedavisinden sonra 3-7 yıldır (9).

Multipl miyelom etyolojisi bilinmeyen bir hastalıktır. Diğer malignitelerde olduğu gibi radyasyon, çalışma alanları, hayat tarzı ile ilişkilendirilmek istenmiştir, fakat bu gruplarda çelişkili veriler söz konusudur. Multipl miyelom etyolojisinde öncü medikal problemlerin rolü üzerinde çok eski tarihlerden beri durulmuştur. Geçirilmiş enfeksiyonlar, inflamasyonlar, otoimmün ve alerjik hastalıkların miyeloma yol açabileceği düşünülmüştür. Hiç kuşkusuz miyelom etyolojisi için en önemli öncü medikal problem MGUS (monoklonal gammopathy undetermined significans – Sebebi bilinmeyen monoklonal gammopati)'dur (6).

MGUS; Multipl miyelom, makroglobinemi, amiloidoz ve diğer proliferatif plazma hücre hastalıkları olmaksızın monoklonal protein varlığıdır (6).

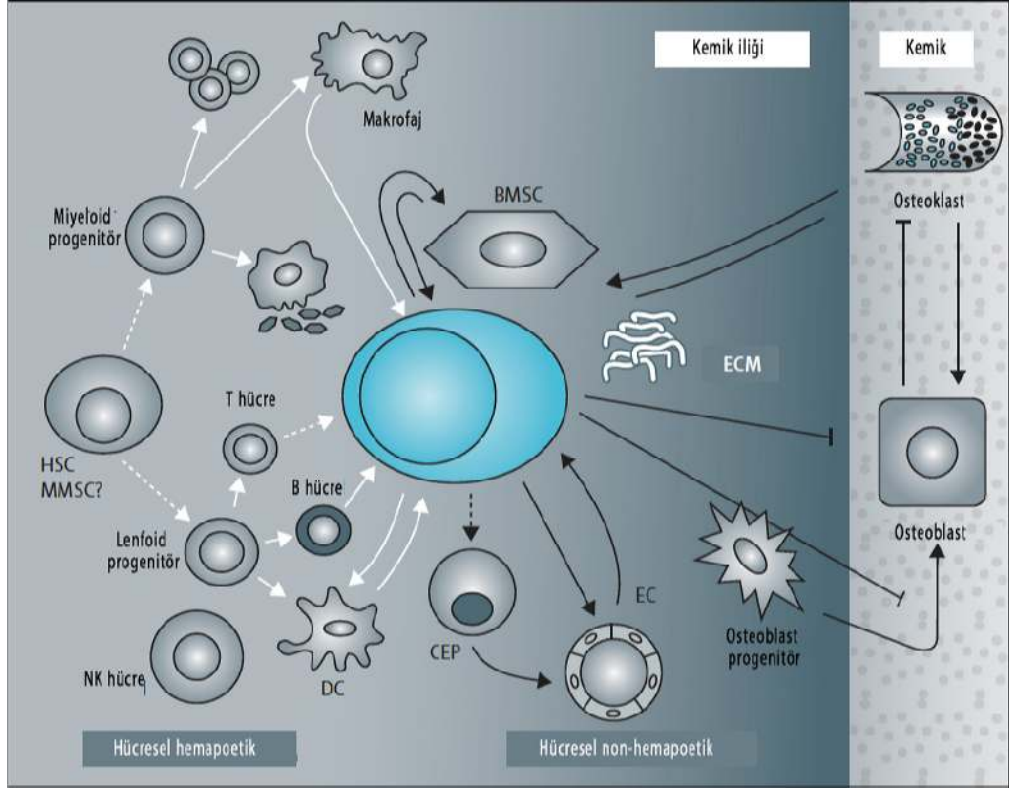
Tablo 4: MGUS tanı kriterleri

MGUS – Sebebi Bilinmeyen Monoklonal Gammopati Kriterleri
Serum M protein düzeyi < 30 g/l
Kemik iliği klonal plazma hücresi <%10
Başka bir B hücreli proliferatif hastalığın bulunmaması
Miyelom ilişkili uç organ ve doku hasarının bulunmaması

2.1.2 Patogenez

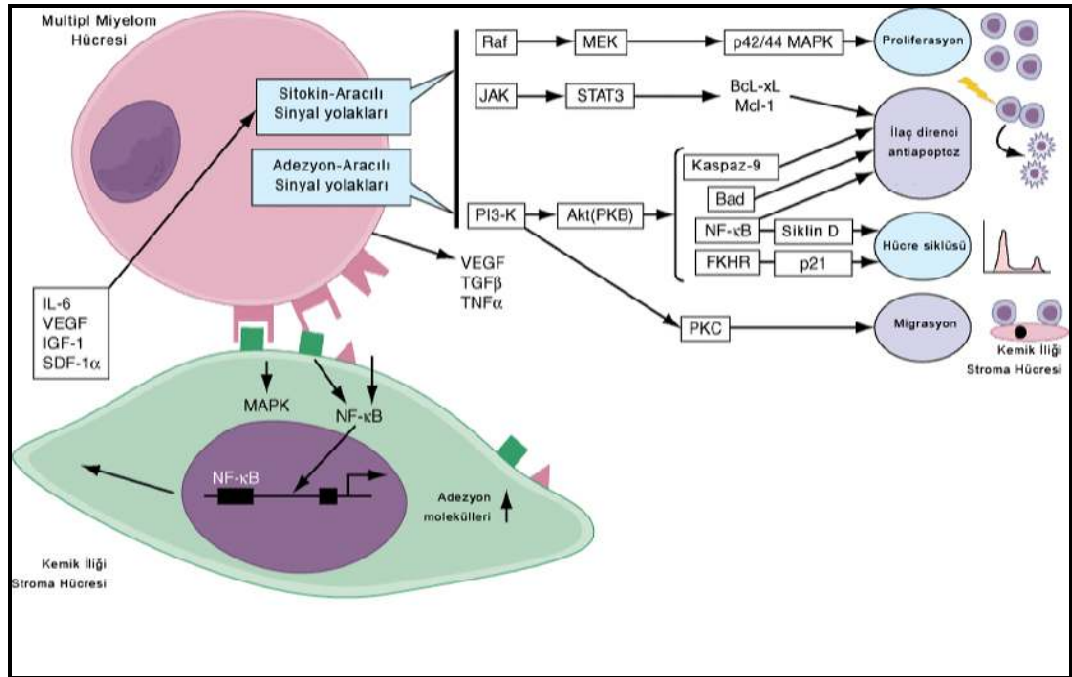
Bir çok B hücre kökenli malignitede olduğu gibi miyelom plazma hücreleri de germinal merkez veya post germinal merkez kaynaklı hücrelerdir. Multipl miyelom patogenezinde birçok moleküler değişikliğin yanı sıra kemik iliği mikro çevre ilişkileri de önemli rol oynamaktadır (9).

Son yıllarda kemik iliği mikro çevre ile miyelom plazma hücreleri arasında sinerjistik patolojik bir ilişki olduğu ortaya konmuştur (Şekil 1). Miyelom plazma hücreleri için en önemli büyüme faktörü ve antiapoptotik faktör interlökin-6 (IL-6)'dır. IL-6 ise başlıca mikro çevre stromal hücrelerinden salgılanır. Miyelom hücreleri interlökin 1 β (IL-1 β), makrofaj inflamatuvar protein 1 α (MIP-1 α), vasküler endotel growth faktör (VEGF), insülin growth faktör (IGF), tümör nekrosis faktör α (TNF- α) ve az miktarda IL-6 salgılar. Bu sitokinler stromal hücreleri uyarak stromal hücrelerden IL-6 salınımına yol açar. Diğer taraftan miyelom hücrelerinden salgılanan VEGF endotel hücrelerini proliferate ederek anjiogeneze sebep olurken, aynı zamanda endotel hücrelerinden IL-6 salınımına sebep olur (10).



Şekil 1: Multipl miyelom hücresi ve kemik iliği stroma hücre ilişkisi *(9)

*BMSC: Kemik iliği stromal hücresi, CEP: Sirkulatuar endotelial progenitör, DC: Dendritik hücre, EC: Endotelial hücre, ECM: Ekstrasellüler matriks, HSC: Hemapoetik kök hücre, MMSC: Multipl miyelom kök hücre, NK: Doğal öldürücü

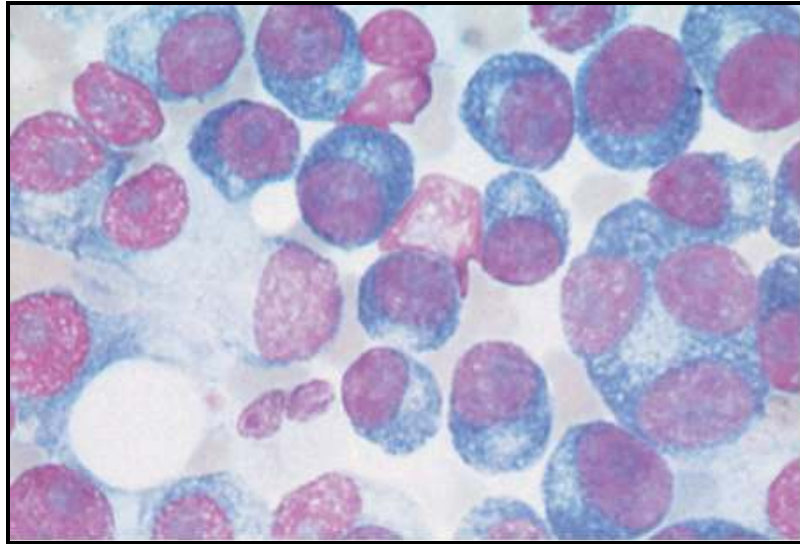


Şekil 2: Multipl miyelom hücresi ve sinyal yolları ilişkisi (11)

Miyelom patogenezinde adhezyon moleküllerinin de önemli yeri vardır. Bir çok miyelom hücresi CD56, very late antijen 4-5 (VLA4-5) ve $\beta 1$ integrin gibi adhezyon molekülleri eksprese eder. Miyelom hücreleri bu moleküllerle bir taraftan birbirlerine, diğer taraftan stromal hücrelerle tutunurlar ve stromal hücrelerden IL-6 salgınımına yol açarlar. Kemik iliği ekstrasellüler matriks de salgıladığı hyaluronin ile stromal hücrelerden IL-6 salgılanmasına yol açar. Böylece stromal hücre ve endotel kaynaklı IL-6 miyelom hücrelerinin apoptozunu önleyerek miyelom hücre kitlesinin genişlemesini sağlar. CD56 pozitif miyelom hücrelerinin osteoblastlarla interaksyonu osteoblastların inaktivasyonuna yol açarak yeni kemik oluşumuna engel olur. Miyelomdaki osteoporoz bu şekilde gelişir. Adhezyon moleküllerinden $\beta 1$ integrin miyelom hücrelerinden salgılanan MIP-1 α ve IL-1 β ile birlikte osteoklastları aktive ederek kemik resorpsiyonuna, yani litik kemik lezyonuna yol açar (9-11).

2.1.3 Tanı

Multipl miyelomda tanı miyelomu, MGUS ve smoldering miyelom (SMM)'dan ayırarak yapılır. Miyelom tanısı için serum ve/veya idrarda monoklonal protein varlığı, kemik iliğinde $\geq$ %10 plazma hücresi (Şekil 2) veya plazmositom ve ek olarak; anemi, litik kemik lezyonu ve/veya osteoroz, kemik iliği plazma hücre labelling indeks $>$ %1, böbrek yetersizliği ve hiperkalsemiden biri ve daha fazlasının varlığı gerekmektedir (12).



Resim 1: Kemik iliği miyelom hücre morfolojisi (11)

2.1.4 Evreleme

Multipl miyelom evrelendirmesi için iki çeşit sistem kullanılmaktadır. Bunlardan ilki miyelom hücre sayısı, hemoglobin değeri, serum kalsiyum değeri, kemik lezyon değerlendirilmesi, M proteini değerleri, elektroforozde hafif zincir değeri ve serum kreatinin değerlerinin baz alındığı Durie Salmon (DS) evreleme sistemidir (13). Diğer sistem ise serum β -2 mikroglobulin ve serum albumin miktarlarına göre ayırımın yapıldığı uluslararası evrelendirme sistemidir (ISS) (14).

2.1.4.1 Durie-Salmon Evreleme Sistemi

Bu sistemde miyelom hücre sayısı, hemoglobin değeri, serum kalsiyum değeri, kemik lezyon değerlendirilmesi, M proteini değerleri, elektroforezde hafif zincir değeri ve serum kreatinin değerleri evreleme açısından önemlidir (13).

Tablo 5: Durie- Salmon evreleme sistemi

Evre	Parametre
Evre I	○ Hemoglobin > 10 gr/dl ○ Serum kalsiyum < 12 mg/dl ○ Kemik lezyonu yok veya soliter kemik plazmositomu ○ IgG < 5 gr/dl, IgA < 3 gr/dl ○ İdrar hafif zincir < 4 gr/24 saat
Evre II	Evre I ve III dışında kalanlar
Evre III	Aşağıdakilerden bir veya daha fazlası mevcut: ○ Hemoglobin < 8.5 gr/dl ○ Serum kalsiyum > 12 mg/dl ○ Litik kemik lezyonları ○ IgG > 7 gr/dl, IgA > 5 gr/dl ○ İdrarda hafif zincir $\geq$ 3f 12 gr/24 saat Alt grup ○ A. Serum kreatinin < 2 mg/dl ○ B. Serum kreatinin > 2 mg/dl

2.1.4.2 Uluslararası Evreleme Sistemi

Uluslararası evrelendirme sisteminde (ISS) ise serum β -2 mikroglobulin ve serum albumin miktarlarına göre ayırımın yapılır (14).

Tablo 6: Uluslararası evreleme sistemi

Evre	Parametre
Evre 1	○ $\beta 2$ MG < 3.5 mg/dl ○ ALB $\geq$ 3.5 g/dl
Evre 2	○ $\beta 2$ MG < 3.5 mg/dl ○ ALB < 3.5 g/dl veya ○ $\beta 2$ MG 3.5-5.5 mg/dl
Evre 3	○ $\beta 2$ MG > 5.5 mg/dl

2.1.5 Prognoz

Multipl miyelom için belirlenmiş prognostik faktörler; Evre II ve III hastalık, $\beta 2$ MG $\geq$ 3 mg/dl, CRP $\geq$ 6 mg/dl, artmış LDL değeri, kemik iliğinde plazma hücre sayısı ve immatür plazma hücreleri ve plazmoblastların bulunması, plazma ücre labeling indeksin $\geq$ %1 oluşu ve sitogenetik özellikler olarak sıralanabilir. Tablo 4’de prognostik faktörler özetlenmiştir (15).

Tablo 7: Multipl miyelomda prognostik faktörler

Prognostik Faktörler	
Evre	○ Evre II ve III hastalık
Laboratuvar Bulguları	○ $\beta 2$ MG: $\geq$ 3-8 mg/dl ○ CRP: $\geq$ 6 mg/dl ○ LDH: Olguların % 7-11’inde artış
Plazma Hücre Bulguları	○ İmmatür plazma hücreleri ve plazmoblastlar ○ Plazma hücre labeling indeks: $\geq$ %1
Sitogenetik Bulgular	○ Sitogenetik: del 13q ve t(4:14)

Miyelomlu hastaların % 18-30’unda delesyon (Del), anaploidi ve translokasyon şeklinde sitogenetik anomaliler bulunur. Del 13q ve t(4: 14) tüm tedavi seçenekleri ile kötü prognoz gösterir. p53 gen kaybı da kötü prognostik bir sitogenetik anomalidir. Del 13q varlığı $\beta 2$ MG miktarı ve plazma hücre “labelling indeks” artışı ile korelasyon göstermektedir (6).

2.1.6 Tedavi

Multipl miyelom ilk kez 1844 yılında İngilterede bir cerrah olan S. Silly tarafından tanımlanmıştır. Bu güne kadar geçen süre içerisinde tedavisinde değişik ajan ve yöntemler kullanılmıştır. MM hastalarının %10’u yıllar içinde yavaş progresyon gösterir. Bu hastalar

antitümör tedaviyi hastalığın anemi, hiperkalsemi, progresif litik kemik lezyonları, serum miyelom protein düzey artışı, tekrarlayan enfeksiyonlar geliştirip semptomatik hale dönüştürdüğünde gerektirir. Soliter kemik plazmasitomu ya da ekstramedüller plazmasitom lokal radyasyon terapisinden sonra uzun hastalıksız sağkalıma ulaşır (16).

Semptomatik ve/veya progresif miyelom hastaları terapötik müdahale gerektirir. Genellikle bu tedaviler ikiye ayrılır; birincisi MM'un progresyonunu kontrol eden sistematik terapi diğeri ise, semptomatik destek tedavisidir (11,12).

Yeni tanı almış MM hastasının tedavisinin planlanması hastaya yüksek doz KT sonrası otolog kök hücre transplantasyonu yapıp yapılamayacağına bağlıdır. Transplant adayı hastada hematopoetik kök hücre hasarını engelleyebilmek için indüksiyon tedavisi hematopoetik kök hücre toksik rejimleri içermez. Örneğin; melphalan gibi alkilleyici ajanlar kök hücre hasarına neden oldukları için kullanılmazlar. Yüksek doz glukokortikoidler tek başına ya da VAD (Vinkristin, Doksorubisin, Deksametazon), deksametazon ile thalidomid kombinasyonu, DT-PACE (Deksametazon, Thalidomid, Sisplatin, Doksorubisin, Siklofosfamid, Etoposid) kombinasyon terapileri sitoredüksiyon için kullanılır. Transplantasyon sonrası idame tedavisi hastalığın kontrolü ve sağkalımı için gereklidir (11,12,17).

Transplant adayı olmayan hastada, tedavi için alkilleyici ajanlar, L-fenilalanin mustard (L-PAM- melphalan) ve prednizon kullanılır. Kullanılan ilaç dozları hasanın yararlanımı ve kemik iliği toleransına bağlıdır (12).

MM'da standart bir idame tedavisi bulunmamaktadır. Aylık bifosfanat tedavisi MM'da kemik hastalığının yönetimi için önemlidir. IFN kullanımının yararlanması fazla olmasının yanı sıra birçok yan etkisi bulunmaktadır. Oral prednizon kullanımının idame tedavisinde yararlı olabileceğini gösteren klinik çalışmalar vardır. Devam eden çalışmalarda, thalidomid ve lenalidomid'in idame tedavisi için kullanımı incelenmektedir (16-18).

Relaps MM hastaları, hem tümör hücrelerini hem de tümör hücresi ile kemik iliği etkileşimini, kemik iliği mikroçevresini hedef alan yeni ajanlar kullanılmaktadır. Daha önce tedavi edilmiş MM hastaları için yeni ajanlardan lenalidomid ve/veya bir proteozom inhibitörü olan bortezomib ile tedavi edilebilir. Bu ajanların deksametazon ile kombinasyonu relaps MM hastalarında %10-15 oranında tam yanıt sağlamaktadır. Bortezomib'in melphalan ve doksorubisin ile kombinasyonunun relap MM'da etkili olduğunu kanıtlayan klinik çalışmalar bulunmaktadır. 1999 yılında thalidomid'in refrakter ve ileri evre miyeloma için

etkin olduğu bildirilmiştir. Thalidomid ve deksametazon arasındaki invio sinerji klinik olarak kanıtlanmıştır ve ototransplantasyon sonrası idame tedavisinde bu kombinasyon oldukça yararlıdır. Thalidomid kemoterapi ile kombine edilebilir çünkü miyelosupresif değildir. Hastaların %50-80'ini etkileyen doz ve süre bağımlı olarak gelişen periferik nöröpati thalidomid'in tedavi sınırlayıcı toksisitesidir (19,20).

Yeni terapötik ajanlardan biri olan Revlimid (CC-5013); immunmodülatuar bir ajandır. Sedatif etki göstermez fakat nörotoksik yan etkileri bulunmaktadır. İleri evre ya da refrakter MM hastalarının 1/3'ünde etkin yanıt oluşturmaktadır. Thalidomid'in aksine revlimid miyelospresyona neden olmaktadır. Revlimid'in tek başına ya da deksametazon ile kullanımını inceleyen devam eden klinik çalışmalar bulunmaktadır (20).

Miyelomda tedaviye yanıt; tam remisyon (CR), objektif yanıt (nCR), kısmi yanıt (PR), plato (MR) olarak değerlendirilir. Çeşitli grupların bu tanımlamalar için koyduğu değerik kriterler mevcuttur, ancak genellikle Avrupa'da ve lkemizde EBMT (European Group for Blood and Marrow Transplantation- Kan ve İlik Transplantasyonu için Avrupa Grubu) kriterleri kullanılmaktadır (11,12,15).

EBMT tedavi yanıt kriterleri;

- Tam remisyon: 6 hafta ara ile bakılan
 - Kemik iliği plazma hücre oranının < % 5
 - Serum ve idrarda immunfiksasyon elektroforozinde M protein olmaması
- Kısmi yanıt: 6 hafta ara ile bakılan
 - Serum M proteininde $\geq$ %50 azalma
 - İdrar M proteininde $\geq$ % 90 azalma
- Plato hastalık:
 - Serum M proteininde %25-49 azalma
 - İdrar M proteininde % 50- 89 azalma
- Progresif hastalık:
 - Serum M proteininde > % 25 artış
 - İdrar M proteininde > % 25 artış
 - Kemik iliği plazma hücrelerinde > %25 artış (en az %10 plazma hücresi)
 - Litik kemik lezyonlarında veya yumuşak doku plazmositomlarında artış
 - Yeni kemik lezyonları veya yumuşak doku plazmositomlarının oluşması
 - Hiperkalsemi

2.2. 13q DELESYONU

Multipl Miyelom'da en sık rastlanan genetik değişikliklerden biri 13. kromozomdaki anomalilerdir. Bu anomaliler 13. kromozomun tamamen (-13) ya da kısmen uzun kolu (q) delesyonu (13q-) şeklinde gözlenmektedir (21).

Yapılan çalışmalarda konvansiyonel sitogenetik yöntemler ile incelendiğinde kromozom 13'deki anomalilerin multipl miyelom hastalarının %50'sinde görüldüğü ve tüm kromozom kayıplarının %10-12'sini oluşturduğu bildirilmiştir (22). t(4;14) (p16.3;q32) ya da t(14;16) (q32;q23) sitogenetik anomalilerine sahip hastalarda -13/ 13q- görölme oranı yaklaşık %90'dır. İnterfaz aşamasında Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) yöntemi kullanılarak yapılan incelemelerde kromozom 13'deki anomalilerin plazma hücreli neoplazımların her aşamasında bulunduğu saptanmıştır. MGUS hastalarındaki delesyon varlığı ve oranı çelişkili olarak bildirilmiştir, fakat bu durumu açıklamak için yapılan büyük bir FISH taraması ile (n=147) 13q delesyonunun varlığı %21 olarak belirlenmiştir (23). MGUS'da 13q- sıklığının az olması -13 ya da 13q-'nun MM gelişiminde rol oynayabileceğini düşündürmüştür. İki ya da daha fazla 13q probu kullanılarak yapılan çalışmalarda 13q anomalilerinin sıklığı %40-50 olarak bildirilmiştir. Kromozom bantlama çalışmalarında kromozom 13 delesyonu, monozomi 13 ile uyumlu bulunmuştur (24).

İncelemeler ile parsiyel kayıpların 13q14 bölgesinde olduğu belirlenmiştir. "Overlapping DNA" problemleri kullanılarak yapılan DNA bantlamasında 13q14-q21 bölgesinde distalde 350 Kb'lık RB1 genini kritik bir bölge olarak tanımlamışlardır. İleri aşamalarda yapılan mikro array çalışmalarında da 13q14 bölgesinin delesyonlar için kritik bölge olduğu kanıtlanmıştır (21-24).

Tüm çalışmalarda 13q- negatif prognostik faktör olarak tanımlanmış, kısa yaşam süresi ve konvansiyonel kemoterapötikler ya da yüksek doz kemoterapiye düşük yanıt ile ilişkilendirilmiştir (23). Bu durum konvansiyonel kemoterapötik tedavisi alanların yanı sıra yüksek doz kemoterapi alan ve kök hücre nakli yapılmış hastalar için de geçerlidir. Allogeneik kök hücre nakli yapılmış hastalarda -13 / 13q- varlığı nadir olarak bildirilmesine rağmen delesyon varlığı negatif prognostik faktör olarak tanımlanmıştır. Diğer yandan proteozom inhibitörü bortozomib ile tedavi edilen relaps ya da refrakter hastalarda bu aberasyondan önemli ölçüde etkilenmediği gözlenmiştir (23,24) .

Kromozom 13 anomalileri ile $\beta 2$ MG kombinasyonları bulunan hastalar “Intergroup Francophone du Miyeloma” (IFM) tarafından klinik çalışmalara alınırken agresif grup olarak ayrılmaya başlanmıştır. “Eastern Cooperative Oncology Group” ve IFM tarafından yayınlanan retrospektif karşılaştırmalı sonuçları yüksek doz kemoterapiye cevabın kromozom 13 delesyonu olmayan hastalarda daha yüksek olduğu, kromozom 13 delesyonu olan hastalarda ise klinik yanıtın daha sınırlı olduğunu belirtmiştir (21).

2.3. NÜKLEER FAKTÖR KAPPA B (NF-kB)

Nükleer faktör kappa B (NF-kB), ilk kez 1986 yılında B hücrelerinde kappa immun globulin hafif zincirinin ‘enhancer’ bölgesindeki 10 bp’lik DNA elementine bağlanan transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmıştır. Memeli NF-kB ailesi 5 üyeden oluşur: NF-kB1 (p50/p105), NF-kB2 (p52/p100), cRel, RelA (p65) ve RelB. RelA, cRel ve RelB olgun formlarından sentezlenir. Diğer yandan NF-kB1 ve NF-kB2 C terminal bölgesinde ankrin tekrarları içeren proteozom tarafından proteolize edilen öncül form (p100 ve p105)’dan sentezlenir ve proteolitik kesimden sonra olgun protein halleri olan p50 ve p52’ye dönüşürler. NF-kB proteinleri uyarılmamış hücrelerde spesifik inhibitör olarak bilinen I κ B (İnhibitör kappa B) proteinine bağlı şekilde bulunurlar. N terminal bölgelerinde DNA bağlanması, dimerizasyon ve I κ B’ye bağlanmadan sorumlu 300 aa’lık Rel homoloji bölgesi varlığı ile karakterizedir (25).

Nukleusda aktif olan NF-kB, sitoplazmada inhibitörü olan I κ B tarafından inhibe edilir. I κ B, NF-kB’ye bağlanır ve nükleer lokalizasyon dizilerini bozarak fonksiyonunu inhibe edip uyarılmamış hücrelerde sitoplazmada tutulumuna neden olur (25,26).

I κ B kinaz (I κ K) çok alt üniteli bir protein kinazdır ve I κ B’yi fosforile eden 2 homolog katalitik alt birimden oluşur. I κ B’nin N terminal bölgesindeki 2 kritik serin rezidülerinin fosforilasyonu, poliubikitinasyon ve 26S proteozom tarafından degregasyonuna neden olur. Serbest kalan NF-kB dimerleri nukleusa geçer. NF-kB sitokinler, büyüme faktörleri, hücre adezyon molekülleri ve pro antiapoptotik proteinleri kodlayan çeşitli genlerin transkripsiyonunu regüle eder. Aktive edilmiş NF-kB “feedback” mekanizması ile yeniden sitoplazmaya çıkartılır (26-28).

NF-kB proinflamatuvar sitokinler, T ve B hücre mitojenleri, bakteriler, lipopolisakkaritler, virüsler, viral proteinler, çift iplikli RNA ve hücresel stres gibi çeşitli uyarılar ile aktive edilebilir (27). Üç NF-kB aktivasyon yolağı bulunmaktadır: Birincisi;

klasik yolak. Mikrobial ve viral enfeksiyonlar ya da pro inflamasyon sitokinleri maruziyeti I κ K kompleksini aktive eder ve fosforilasyon ile I κ B'nin degregasyonu gerçekleşir. Bu yolak genellikle p50:RelA ve p50: cRel dimerlerini hedef alır. Bu klasik yolağın aktivasyonu, doğal immunité ve apoptozun çeşitli koşullardaki inhibisyonunda görülür. İkinci yolak: alternatif yolaaktır. p100 prokürsör proteinin işlenmesi ile p52: RelB dimerlerinin selektif aktivasyonunu içerir. Bu yolak TNF sitokin ailesi ile olur. Alternatif yolak ikincil lenfoid organ gelişimi ve adaptif immun cevap için önemlidir. Üçüncü sinyal yolağı atipik olarak tanımlanır çünkü I κ K'den bağımsız olarak DNA hasarına yol açan UV ve doksorubisin ile aktive edilir. UV radyasyon, I κ B alfa degregasyonunu p38 tarafından aktive edilen kazein kinaz ile indükler (25) .

NF- κ B'nin hücresele hedefleri sitokinler (IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α), kemokinler (MIP-1alfa, MCP1) adezyon molekülleri (ICAM, VCAM, E selektin), efektör proteinler ve apoptoz regülasyonunda yer alan hücresele proteinlerdir. Birçok çalışmada NF- κ B'nin hematolojik ve solid tümörlerin birçoğunda aktive olduğu gösterilmiştir. Örneğın: B hücreli lenfomada bozulmuş I κ K aktivitesi I κ B α 'nın yarılanma süresi kısalır. Hodgkin lenfomada I κ B α mutasyonu ile NF- κ B'nin nükleer aktivesinin bozulmasına neden olur (26, 27).

NF- κ B'nin kanserdeki rolüne baktığımızda apoptoz regülasyonunda birçok antiapoptotik proteinin ekspresyonunu indükleyerek ve proapoptotik proteinlerin aktivite ve ekspresyonlarını düzenleyerek apoptozu suprese eder. Tümör hücrelerinin invazyon ve anjiogenezinde önemli rol oynayan matriks metalloproteinaz 2 (MMP2), MMP9 ve serin proteaz ürokinaz tipi plazminojen aktivatör (uPA) NF- κ B tarafından regüle edilir. Ayrıca, tümör metastazı ve kötü prognoz ile ilişkili olan intersellüler adezyon molekülü 1 (ICAM-1) ve vasküler hücre adezyon molekülü 1 (VCAM-1)'in ekspresyonu da NF- κ B tarafından regüle edilir (27). Hücre siklusünde G1'deki kontrol noktasından S fazına geçiş siklin bağımlı kinazların aktivasyonuna ihtiyaç duyar. NF- κ B hücre siklusünü S fazına geçişteki gerekli olan siklinlerin gen ekspresyonlarını kontrol ederek regüle eder. TNF- α indüklü apoptozun yanısıra, NF- κ B DNA hasarına neden olan kemoterapötik ajanlar ve ionizan radyasyon indüklü apoptozu da inhibe eder. NF- κ B radyasyon ya da kemoterapötik ajanlar ile artan antiapoptotik aktivitesi ile tümör kemo ya da radyo rezistans geliştirir. Bazı çalışmalarda multi drug rezistance 1 (MDR-1) geninde NF- κ B bağlanma bölgeleri olduğu bulunmuştur (25-28).

2.4. İNTERSELLÜLER ADEZYON MOLEKÜLÜ (ICAM)

Adezyon molekülleri, hücrelerin özgül olarak dokulara yönelmelerinde, birbirlerini tanımalarında, embriogenez, hücre büyümesi, hücre farklılaşması ve inflamasyon gibi olguların düzenlenmesinde görev alırlar. Adezyon molekülleri bugün dört ana sınıfta incelenmektedirler; integrinler, selektinler, immun globulin süper ailesine dahil adezyon molekülleri ve kaderinler (29).

İntersellüler Adezyon Molekülü-1 (ICAM-1), lökositler, endotel hücrelerinde ve daha birçok hücrede eksprese edilen immunglobulin (Ig) benzeri hücre adezyon molekülüdür. ICAM-1 ve ICAM -2, CD11/18 integrinlerinin karşıt reseptörleridir (29).

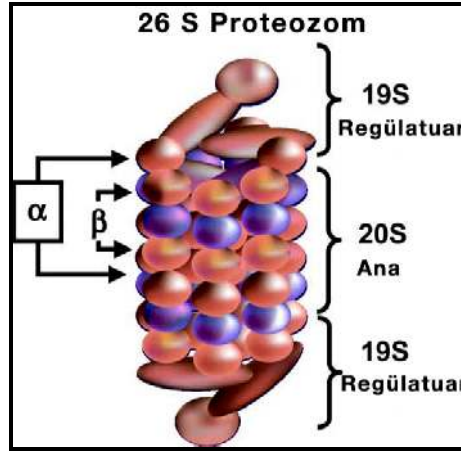
ICAM-1, tip 1 transmembran proteindir. Molekül ağırlığı glikolizasyon düzeyine bağlı olarak değişim göstermekle birlikte 80-114 kDa arasındadır. ICAM-1'in ekstrasellüler kısmı 5 immunglobulin benzeri kısımdan oluşur, tek hidrofobik transmembran bölgesi ile tutunur ve kısa sitoplazmik kuyruğu vardır (30). ICAM-1 hem doğal hem de adaptif immun yanıtta önemli role sahiptir. Lökositlerin inflamasyon bölgesine doğru transendotelial migrasyonunda, antijen sunan hücreler (APC) ve T hücreler ile etkileşiminde rol oynar. Transendotelial migrasyonda, çeşitli kemokinler tarafından aktive edilen lökositler ICAM-1 aracılığıyla epitele adezyonlarını gerçekleştirirler. ICAM-1'in ayrıca, immunolojik sinaps formasyonu oluşumunda da rolü vardır. Bağlanma aşamasında ICAM-1'in LFA (Lenfosit fonksiyon ilişkili molekül)'e bağlanması APC hücreleri ile T hücre arasında yakın ilişki olmasını sağlar ve T hücre reseptörü (TCR) ile MHC class I ya da MHC class II'ye özgü antijen sunumu sırasında kositümülatör ligand olarak yer aldığını göstermiştir. ICAM-1'in dış sinyalleri dönüştürme fonksiyonu reseptör multimerizasyonu ile gerçekleştirir. ICAM-1'in lökosit migrasyonundaki rolüne ek olarak lökosit diapedezinde yardımcı aktin sitoskeletonunun yeniden düzenlenmesine neden olan ve proinflamatuvar yanıtta devam eden proinflamatuvar kaskadların aktivasyonunda da rol aldığı gösterilmiştir (30,31).

2.5. PROTEOZOM VE PROTEOZOM İNHİBİTÖRLERİ

Proteozom, intrasellüler proteolizde yer alan nükleus ve sitoplazmada bulunan hedef proteinlerin hızlı degregasyonunu selektif bir şekilde gerçekleştiren multikatalitik enzim kompleksinden oluşmuş intrasellüler proteolitik sistemdir (32,33).

Proteozom, 20S ana ve 19S regülatuar partikülden oluşmuş 2 büyük alt üniteli 2.4 Mda'luk bir komplekstir (Şekil 2) . Protein homeostazını sağlamanın yanı sıra, ubiquitin-

proteozom yolağı hücre siklusünün kontrolü, proapoptotik uyarının cevabı için önemli bir mekanizmadır. Sinyal molekülleri, tümör supresörler, hücre siklus regülatörleri, transkripsiyon faktörleri, inhibitör moleküller ve anti apoptotik proteinler proteozom degregasyonuna uğrarlar (32-34).



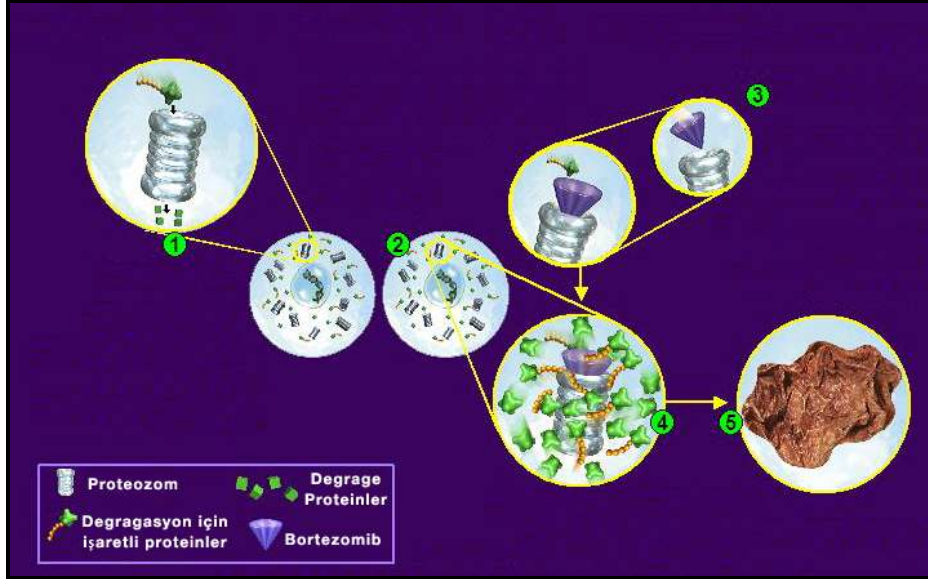
Şekil 3: Proteozom (33)

Son yıllarda proteozom inhibisyonu kanser ve ilaç direnci araştırmalarında önemli bir yere sahip olmuştur. Ökaryotik hücrelerde proteolizisin regülasyonunu sağlayan ubiquitin-proteozom yolağının inhibisyonu MM, non-Hodgkin lenfoma ve bazı solid tümörler için önemli bir strateji oluşturur. Tümör hücrelerinde ubiquitin- proteozom yolağının inhibisyonu tümör supresör ve proapoptotik proteinlerin birikimine neden olacaktır. Bu nedenle kanser tedavisinde bu yolağın hedef alınması geçerli bir seçenektir (34,35).

MM'da ilaç indüklü apoptoza gelişen direncin ana nedenlerinden birisi antiapoptotik proteinler olan bcl-xl, bcl-2 ve mcl-1'in artan ekspresyonudur. Ayrıca, bu direncin gelişmesinde büyüme ve sağkalım transkripsiyon faktörü olan NF-kB'nin aktivasyonu, mitojen aktivated protein kinaz (MAPK) yolağı ile fosfoditilinositol-3 (PI3) kinaz sinyal yolağının aktive edilmesi de önemli rol oynar (35).

Son yıllarda, MM'da hastalığın biyolojisine uygun tedavi yöntemleri geliştirilmektedir. Proteozom inhibitörleri, thalidomid ve thalidomid'in immun modülatuar analogları, relaps ve refrakter MM tedavisinde önemli bir etki göstermiştir. İlk proteozom inhibitörü sonradan Bortezomib olarak adlandırılan boranik asit dipeptiddir. Bortezomib hem MM hücrelerine hem de kemik iliği mikroçevresine etki ederek ilaç direncini ortadan kaldırabilir (Şekil 3). Bortezomib, MAP kinaz sinyal yolağını, MM hücre proliferasyonunu inhibe eder, kaspaz bağımlı apoptozu indükler ve ilaç direncini NF-kB'yi inhibe edip,

adezyon molekül ekspresyonunu ve MM hücrelerinin BMSC'ye bağlanmasının azalmasına yol açarak ortadan kaldırır. Ayrıca, BMSC'den IL-6 salınımını bozar ve IL-6 reseptör ekspresyonunun azalmasına neden olur. Bortezomib relaps ve refrakter MM tedavisinde şu ana kadar anlamlı aktivite gösteren tek ajandır (33).

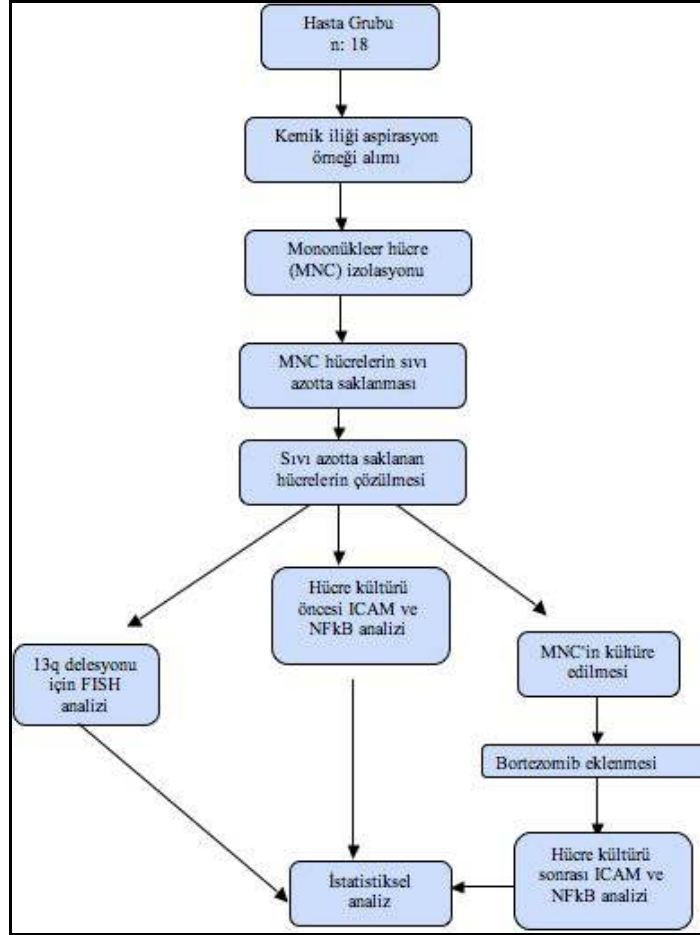


Şekil 4: Bortezomib etki mekanizması* (36)

*1: Proteozomlar hem sağlıklı hem de kanser hücrelerinde intrasellüler proteinleri degrade eden enzim kompleksleridir. 2: Kanser hücreleri proteozomlar tarafından regüle edilen proteinlere proliferasyon, metastaz ve sağkalım için bağımlıdır. 3: Proteozomun bortezomib ile inhibisyonu intrasellüler proteinlerin degradasyonunu ve hücreler arasındaki çoklu sinyal yollarını etkiler. 4: Kanserde sinyal yollarının hasarlanması kanser hücrelerinin ölümüne ve tümör büyümesinin inhibisyonuna neden olur.

Bu çalışmadaki amacımız, MM hastalarında tedavisinde kısıtlayıcı bir aşama olan birinci sıra tedaviye geliştirilen ilaç direnci için umut vaat eden bir ajan olan bortezomibin, ilaç direnci gelişmesinde yüksek risk ve kötü prognoz belirtici olarak tanımlanmış 13q delesyonu ile ilaç direnci gelişiminden sorumlu moleküller olarak belirlenen ICAM ve NF-kB ekspresyon değişikliklerini invitro olarak bortezomib ile kültüre edilmiş kemik iliği mononükleer hücrelerinde ICAM ve NF-kB kültür öncesi ve sonrası ekspresyon değişiklikleri ilişkisinin incelemektir.

Tezde yapılan çalışmaların akış şeması Şekil 5’te verilmektedir.



Şekil 5: Kullanılan yöntemlerin akış şeması

3.1. ÇALIŞMA MATERYALİ

Çalışmada kullanılan kemik iliği aspirasyon örnekleri Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEÜTF) Hastanesi, Hematoloji Bilim Dalı Polikliniğine Kasım 2008 - Nisan 2009 tarihleri arasında başvuran multipl miyelom tanısı konmuş, birinci sıra tedaviye ilaç direnci gelişmesi ile ikinci sıra tedavisine geçilmiş hastalardan alındı. DEÜTF Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu'nun 05.Haziran.2008 tarih ve 225/2008 sayılı izni (Ek1) ile hastalardan aydınlatılmış onam (Ek2) alındıktan sonra standart protokollere göre sıvı azotta mononükleer hücre (MNC) arşivi oluşturuldu. Çalışmaya ikinci sıra tedavisine geçilmiş, bortezomib almamış 18 multipl miyelom hastasının kemik iliği aspirasyon örnekleri dahil edildi.

3.2. ÖRNEK TOPLANMASI

3.2.1. Kemik iliğinden Mononükleer Hücre İzolasyonu

Kemik iliği aspirasyon örneğinden standart yöntemlerle MNC izolasyonu yapıldı. Bu yöntemde yoğunluğu 1,077 g/ml'ye ayarlanmış polisükröz ve sodyum diatrizoat solüsyonu (Biocoll-Ficoll, Biochrom L6115) kullanıldı. 1:2 oranında antikoagülanlı kan örneği Ficoll üzerinde tabakalandırıldıktan sonra 1650 rpm'de 15-20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan interfaz tabakasındaki MNC'ler alındı. Fosfat tamponu (PBS, Biochrom AG, L1825) ile yıkama sonrası örneklerden hücre sayımı gerçekleştirildi.

Yöntem:

1. Dibi konik santrifüj tüpüne 4.0 ml Ficoll ilave edildi.
2. Ficoll üzerine 8.0 ml kemik iliği aspirasyon örneği tüp 45⁰'lik açı ile eğilerek tabakalandırıldı.
3. Oda ısısında 20 dakika 400 x g'de (1650 rpm) santrifüj edildi.
4. Santrifüjden sonra dikkatlice bir pastör pipetiyle mononükleer hücre içeren opak interfaz tabakası toplandı.
5. Opak interfaz tabaka dibi konik temiz bir konik santrifüj tüpüne aktarıldı.
6. Bu tüpe 8 ml %10 FBS'li RPMI-1640 ilave edilip, yavaşça karıştırıldı.
7. 250 g'de (1200 rpm) 5 dakika santrifüj edildi.
8. Süpernatantı çekilip atıldı (Ficoll-paque'ın tamamen uzaklaştırılması).
9. Yıkama işlemi tekrarlandı.

3.2.2. Mononükleer hücrelerin dondurulması

MNC'ler daha sonra yapılacak deneyler için dondurma ortamının içinde sıvı azotta saklandı.

Gereç ve Solüsyonlar:

1. Isı ile inaktive edilmiş fötal dana serumu (FBS / Gibco, 10108)
2. Dimetilsülfoksit (DMSO, D-2650, Sigma Chemical Co.)
3. RPMI-1640 medium (Gibco, 31870)
4. Sıvı azota dayanıklı dondurma tüpleri (Greiner bio one, 122278)
5. Steril, dibi konik 15 ml'lik tüp (CellStar, Grenier bio one, 188271)
6. Santrifüj, J6-MI (Beckman)
7. Sıvı nitrojen tankı (MVE Cryo System 4000, USA)

Dondurma ortamı (Freezing medium): %10 DMSO, %20 FBS içeren RPMI-1640. Dondurma ortamı +4°C’de soğutulup kullanıldı.

Yöntem:

- 1) MNC izolasyonunda en son yıkamada üst faz atıldıktan sonra dipte kalan hücre pelleti 2 ml +4°C’de soğutulmuş dondurma ortamıyla (%70 ortam,%20 FBS,%10 DMSO) resüspanse edilerek, dondurma tüplerine 1’er ml olacak şekilde porsiyonlandı.
- 2) Dondurma tüpleri kontrollü soğutucu içinde -80°C’lik dondurucuya konup, ertesi gün sıvı azota (-196°C) kaldırıldı.

3.2.3. Sıvı Azotta Dondurulan Hücrelerin Çözülmesi

Sıvı azot arşivinden çıkarılan hücreler, hızla 37°C su banyosunda (Nüve, BM 420) hafifçe sallayarak hızlı bir şekilde çözüldü. Hücreler 15 ml’lik steril dibi konik tüpe aktarıldı üzerine RPMI-1640 ilave edildi. Hücre süspansiyonu 200 g’de 10 dakika santrifüjde döndürüldü. Süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. FISH ve IHK preparatları için kullanılacak hücreler PBS’de, kültüre edilecek hücreler DMEM’de resüspanse edildi.

3.2.4. Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığı Testi

Hücreler kültüre edilmeden önce % 0.4’lük tripan mavisi ile canlılıkları kontrol edildi. Test, canlı hücrelerin boyayı membranlarından içeri geçirmeme prensibine dayanır. 20 µl %0.4 tripan mavisi boyası, bire bir oranında hücre süspansiyonu örneği ile lam üzerinde hafifçe karıştırıldı. Yaklaşık 2-3 dakika bekletildikten sonra ışık mikroskopunda 300 hücre sayıldı. Tripan mavisi ile boyanmayan hücrelerin yüzdesi hesaplandı. Tüm hücrelerde canlılık testi % 95’in üzerindeydi.

3.3. MONONÜKLEER HÜCRE KÜLTÜRÜ

Kemik iliği aspirasyon örneklerinden izole edilen mononükleer hücreler, standart süspansiyon hücre kültürü yöntemine göre kültüre edildi. Hücreler sıvı azottan çıkartılıp çözüldükten sonra, % 83 DMEM, % 15 FBS, % 1 Penisilin-Streptomisin, %1 L- glutamin olarak hazırlanan hücre kültür ortamı içerisine, süspansiyon kültür için uygun 6 kuyucuklu platelere ekildi. Herbir platede bortezomib eklenmesi sonrasında 10^6 hücre kalacak şekilde başlangıç hücresi 2×10^6 olarak hücre ekildi. Hücreler ekildikten 8 saat sonra literatür ile uyumlu optimize doz olan 5Nm bortezomib (37) her bir kuyucuğa eklendi ve 37 C⁰, %5

CO₂'li inkübatörde 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik inkübasyon sonrasında kuyucuklardaki ortam çekilip 15 ml'lik tüplere alındı. 250 g'de (1200 rpm) 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Hücre pelleti PBS ile resüspanse edildi. IHK deneylerindeki bortezomib sonrası grub için preparat hazırlandı ve kalan hücreler ELİZA deneyi için nükleer ekstraksiyonda kullanıldı.

Mononükleer Hücre Kültürü Sırasında Kullanılan Gereç ve Solusyonlar

1. DMEM Medium (Gibco, 41965)
2. Isı ile inaktive edilmiş fötal dana serumu (FBS / Gibco, 10108)
3. Penisilin-Streptomisin (Gibco, 15140)
4. L-Glutamin (Gibco, 25030)
5. Fosfat Tamponu (PBS/ Biochrom AG, L1825)
6. Süspansiyon Hücre Kültürü Plakları (Grenier bio one, 665-102)
7. Steril 15 ml'lik tüp (CellStar, Grenier bio one, 188271)
8. Cell scraper (Grenier bio one, 541070)
9. %5 CO₂'li İnkübatör (Thermo Form 381, 302444295)
10. Santrifüj (Sigma, 3 – 16 K)

3.4. İMMUNHİSTOKİMYA

İmmunhistokimya deneyleri için herbir hastadan mononükleer hücre kültürü öncesi ve sonrası olacak şekilde lamlar hazırlandı. İmmunboyama streptavidin-biotin immünoperoksidaz yöntemi kullanılarak yapıldı.

Yöntem:

1. Örnekler lamlara yayma yapıldıktan sonra lamların üzerini kaplayacak şekilde asetona (Merck, K38554213 815) eklendi ve kurumaya bırakıldı.
2. Hücrelerin bulunduğu alanlar sınırlama kalemi ile sınırlandıktan sonra %95'lik ve %80'lik alkolde (Etanol, Riedel de Haen, 32221) hücrelere zarar verilmeyecek şekilde rehidratasyon sağlandı.
3. Daha önce belirlenen alanlarının üzerinden sınırlama kalemi ile tekrar geçildi ve bu alanların üzerine distile su damlatıldı.
4. Ardından PBS damlatıldı ve 5 dk bekletildi.
5. Hücrelerin endojen peroksidadını inhibe etmek amacıyla %3'lük Hidrojen peroksit (Merck, 1.08597.1000 Darmstadt, Germany) uygulandı ve oda ısısında 5 dk bekletildi.

6. Fosfat tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler 1 saat oda ısısında bloklama solusyonu (İnvitrogen, Histostain- Plus Broad Spectrum, 85-9043) ile inkübe edildi.
 7. Ardından yıkama yapılmadan ICAM (MAB2130, Mouse Anti-Human CD54 (ICAM-1), Chemicon) antikoru ile bir saat +4°C’de enkübe edildi.
 8. Fosfatlı tampon solüsyonu ile 3 defa dikkatlice yıkanan hücreler biyotinlenmiş sekonder antikor (İnvitrogen- Plus Broad Spectrum, 85-9043) ile 30 dk inkübe edildi.
 9. PBS solusyonu ile yıkama yapıldıktan sonra enzimle işaretli (peroksidaz) avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) (İnvitrogen, Histostain- Plus Broad Spectrum, 85-9043) 30 dakika uygulandı.
 10. Reaksiyonun görünür hale getirilmesi için Diaminobenzidin (DAB) (Roche, 1718096) kullanıldı.
 11. Zemin boyaması Mayer’s hematoksilen (Applichem, A4278 0500) ile yapıldı.
 12. Dereceli alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen hücreler ksilol (Saf Kimya) ile şeffaflaştırma işleminden geçirildikten sonra entellan ile kapatıldı.
- İmmunhistokimyasal değerlendirme şu şekilde yapıldı; her preparattan 5 alan, bu 5'er alanda 100'er hücre sayıldı. 100 hücreden pozitif boyanma gösteren hücreler belirlendi. 5'er alanın ortalamaları alındı.

3.5. FLORESAN İNSİTU HİBRİDİZASYON

Sıvı azotta dondurulup çözölen hücreler FISH preparatları için PBS’de resüspanse edildi. Özel lizinli lamlara 10 µL damlatıldı ve cell scraper yardımı ile lama yayıldı. Hücre yoğunluğu inverted mikroskopda kontrol edildi. 20 dakika -20 C⁰’ de metanol (Riedel de Haen, 24229) içinde bekletildi ve çıkartılıp kurutuldu. Hücre alanları cam çizir ile çizilip sınırlandı. Hibridizasyon aşamasına geçildi.

Yöntem:

1. Hazırlanan preapratlar 37 C⁰’deki su banyosunda bulunan %5 NP40’lı 2 X SSC yıkama solusyonuna konuldu 20 dakika bekletildi.
2. Yıkama solusyonundan çıkan preparatlar artan (% 70 etanol, % 85 etanol, %96 etanol) sıcak alkol serilerinden geçirildi. Her bir alkolde 2 şer dakika bekletildi.
3. Preparatları 72 C⁰’deki formamid solusyonuna konup 2 dakika bekletildi.
4. Formamid solusyonunda çıkan preparatlar artan (% 70 etanol, % 85 etanol, %96 etanol) soğuk alkol serilerinden geçirildi. Her bir alkolde 2 şer dakika bekletildi.

5. Su banyosu probun denatüre olamsı için gerekli sıcaklığa ayarlandı ve prob su banyosunda 90 C⁰'de 5 dakika denatürasyon için bekletildi.
6. Lamellerin üzerine 7 µL prob konuldu ve lameller cam çizir ile sınırlanmış alana yapıştırıldı.
7. Lam- lamel alanının çevresi Fixo gum yapıştırıcı ile yapıştırıldı.
8. Preparatlar içinde 4 ml su bulunan içi ve dışı aliminyum kaplı kutuya konup, üstü kapatılıp, 36 C⁰'deki etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı.
9. 24 saatlik inkübasyon sonrasında preparatların lamelleri çıkartıldı, fixo-gum kalıntıları temizlendi.
10. 37 C⁰'deki 0.5 SSC / % 0.1 SDS yıkama solusyonuna konuldu. 2 dakika bekletildi.
11. 0.5 SSC / % 0.1 SDS yıkama solusyonu 65 C⁰'ye ısıtıldı.
12. Preparatlar 65 C⁰'deki 0.5 SSC / %0.1 SDS yıkama solusyonuna alındı ve 5 dakika bekletildi.
13. Oda ısısındaki 1 X PBD (50 µL NP40 ve 100 µL Twin 20 içeren) yıkama solusyonuna konuldu. Burada 5 dakika bekletildi. Kurutucuya alındı.
14. 24 x 32' lik lamellere DAPİ nükleus boyasından 8 µL konuldu
15. Cam çizir ile sınırlanan alana lameller kapatıldı.
16. Aliminyum folyoya sarılıp 5 dakika bekletildi.
17. Analiz aşamasına geçildi. Analiz yapılana kadar preparatlar karanlıkta + 4 C⁰'de saklandı.

FISH analizi 13q14 bölgesine ait probun delesyonlu hastalarda tek kırmızı sinyal, delesyonu olmayan hastalarda iki yeşil sinyal vermesi prensibine dayanarak analizi yapıldı.

Gereç ve Solüsyonlar:

1. Fosfat Tamponu (PBS/ Biochrom AG, L1825)
2. Non iyonik P40 (NP40 / Igepal - Kreatech-Poseidon, LK069A)
3. Formamidin disülfid (SSC) (20 X SSC, Stok solusyon, Kreatech-Poseidon, LK061A)
4. Etanol (Riedel de Haen, 32221)
5. Formamid (Riedel de Haen, 47630)
6. 13q prob (Kreatech-Poseidon, PKB 10102)
7. Sodyum dodesil sülfat (SDS/ Biochemika Applichem, A2572 1000)
8. Etüv (Thermo Heraeus, T12)
9. Su banyosu (Nüve, BM 402)

10. Tween 20 (Applichem, A4974)
11. Nukleus boyası antifade/ DAPI (Kreatech-Poseidon, LK067A)

3.6. NÜKLEER EKSTRAKSİYON

Kemik iliği aspirasyon örneklerinden izole edilen hücrelerden kültür öncesi ve sonrasında ELİZA deneylerini çalışabilmek için nükleer ekstraksiyon yapıldı. Nükleer ekstraksiyon 'Chemicon Nuklear Extraction Kit (Millipore, 2900)' ile gerçekleştirildi.

Yöntem:

1. ml'de $1,5 \times 10^6$ hücre bulunan hücre süspansiyonu 50 ml'lik santrifüj tüpüne konuldu.
2. Üzerine 10 ml PBS eklendi.
3. 250 g x 5 dk, 4 C⁰'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
4. Pellet buzda soğutulmuş 40 ml PBS ile resüspanse edildi.
5. 250 g x 5 dk, 4 C⁰'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
6. 50 mikrolitre 1X Cytoplasmic Lysis Buffer (sitoplamik lizisyon tamponu) eklendi. Hücreler resüspanse edildi.
7. Hücre süspansiyonu 15 dk. Buz üzerinde bekletildi.
8. 250 g x 5 dk, 4 C⁰'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
9. 100 mikrolitre 1X Cytoplasmic Lysis Buffer (sitoplazmik lizis tamponu) eklendi. 1.5 ml'lik ependorflara aktarıldı.
10. İnsülin iğnesi ile 5 kere çekilip bırakıldı.
11. 8000g x 20 dk, 4 C⁰'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
12. 50 mikrolitre Nuklear Extraction Buffer (Nükleer ekstraksiyon tamponu) eklendi .
13. İnsülin iğnesi ile 5 kere çekilip bırakıldı.
14. 4 C⁰'de, salınlımlı çalkalayıcıda 60 dk çalkalandı.
15. 16000 g x 5 dk, 4 C⁰'de santrifüj edildi.
16. Nükleer ekstrat santrifüj sonrasındaki süpernatant kısmında kaldı. Süpernatant alikotlanarak -80 C⁰'de ELİZA deneylerinde çalışılmak için saklandı.

Gereç ve Solüsyonlar:

1. 50 ml'lik steril tüp (Grenier bio one, 227261)
2. 1,5 ml'lik ependorf (Axygen Scientific, MCT-200-C)
3. Fosfat tamponu (PBS / Biochrom AG, L1825)

4. Sitoplazmik Lizis Tamponu (Chemicon Nuklear Extraction Kit, Millipore, 2900 Part no: 90497)
5. Nükleer ekstraksiyon tamponu (Chemicon Nuklear Extraction Kit, Millipore, 2900 Part no: 90498)
6. Santrifüj (Sigma, 3 – 16 K)
7. Salınlımlı çalkalayıcı (IKA HS 260)
8. Mikro santrifüj (Thermo microlite, 35810153)
9. -80 C⁰ dondurucu (Sanyo Ultra Low, MDF- U40860S)

3.7. ELİZA ANALİZİ

NF-kB konsantrasyonu “sandwich” enzim immunoassay yöntemiyle tayin edildi. Kemik iliği aspirasyon örneklerinden izole edilen hücrelerden kültür öncesi ve sonrasında elde edilen nükleer ekstraktlar ile ELİZA analizi yapıldı. ELİZA analizi 'NF-kB p50 / p65 EZ-TFA Transcription Factor Assay (Millipore, 70-510') kiti ile gerçekleştirildi.

Yöntem:

1. Kuyucuklara sırasıyla 1 X TFA tamponu, oligonükleotid problemler ve nükleer ekstrakt 100'er µL eklendi
2. Plak kapatıcı film ile kaplanarak +4 C⁰ 'de 90 dakika inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar üç kez 1 X Enhanced TFA tamponu ile yıkandı.
4. Kuyucuklara 1 X Enhanced TFA tamponu ile 1:500 oranında dilüe edilmiş primer antikordan 100'er µL eklendi.
5. Plak kapatıcı film ile kaplanarak oda ısısında 60 dakika inkübe edildi.
6. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar üç kez 1 X Enhanced TFA tamponu ile yıkandı.
7. Kuyucuklara 1 X Enhanced TFA tamponu ile 1:500 oranında dilüe edilmiş IgG- HRP konjuge sekonder antikordan 100'er µL eklendi
8. Plak kapatıcı film ile kaplanarak oda ısısında 30 dakika inkübe edildi.
9. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar dört kez 1 X TFA tamponu ile yıkandı
10. Daha önceden oda sıcaklığına getirilmiş olan 100'er µL TMB substratı pipetlendi.
11. Plak kapatıcı film ile kaplanarak oda ısısında 10 dakika inkübe edildi
12. Kuyucuklara 100'er µL stop solüsyonu pipetlendi.
13. Absorbanslar spektrofotometrik plak okuyucu ile 450 nm'de ölçüldü.

Konsantrasyonları 0,15 - 10 µg / ml arasında olan NF-kB standartları kullanılarak oluşturulan standart eğri ile kantitasyon yapıldı.

Gereç ve Solüsyonlar:

1. Transcription Factor Assay (TFA) Buffer (Millipore, 90272)
2. Substrate TMB (Millipore, 90348)
3. Primer antikor (Millipore, 90274)
4. Stop solution (Millipore, 6013)
5. Gt x RB HRP Secondary antibody (Millipore, 2003482)
6. Blocking Reagent (Millipore, 90273)
7. Transcription factor assay plate (Millipore, 90268)
8. Spektrofotometrik plak okuyucu (Thermo Multiscan Ascent, 354)
9. 1 X Enhanced TFA tamponu: Herbir well için 1,5 ml TFA buffer + 0,09 Blocking Reagent

3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

İstatistiksel değerlendirmeler “SPSS for Windows 11.0” ticari programlar kullanılarak yapıldı. İstatistiksel değerlendirmelerde; grup ortalamalarını karşılaştırmak için non-parametrik bir test olan “Mann Whitney U testi”, FISH sonuçlarının cinsiyet ile karşılaştırılmasında ‘Pearson Chi-Square’ ve ‘Fisher's Exact Test’ kullanıldı. Tüm analizlerde *p* değerinin 0,05’ten küçük olduğu değerler anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Hasta Grubu: Çalışmamızda Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEÜTF) Hastanesi, Hematoloji Bilim Dalı Polikliniğine Kasım 2008 - Nisan 2009 tarihleri arasında başvuran multipl miyelom tanısı konmuş yaşları 47-89 arasında değişen 18 hastadan onam formu imzalatıldıktan sonra rutin kontroller sırasında alınan kemik iliği aspirasyon örnekleri kullanılmıştır. Çalışmamızdaki olgulara ait demografik özellikleri sırasıyla Tablo 8’de verilmektedir.

Tablo 8: Çalışmamızdaki olgulara ait demografik özellikleri

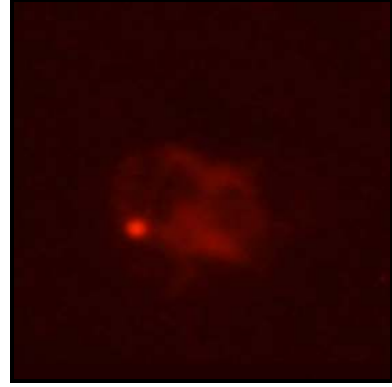
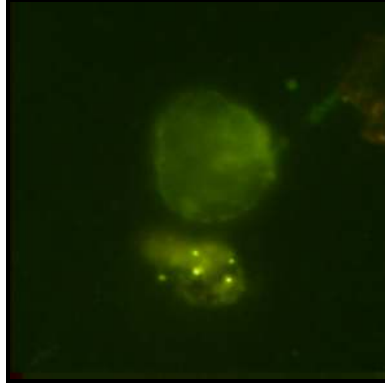
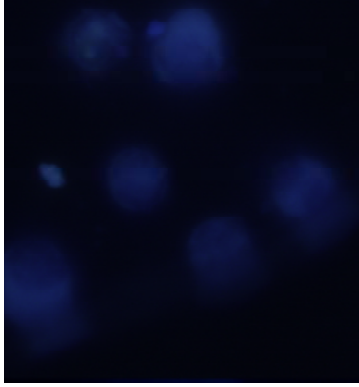
Örnek No	Yaş	Cinsiyet
Hasta 1	78	E
Hasta 2	69	E
Hasta 3	60	E
Hasta 4	62	K
Hasta 5	47	E
Hasta 6	59	E
Hasta 7	63	K
Hasta 8	76	E
Hasta 9	80	E
Hasta 10	69	K
Hasta 11	62	E
Hasta 12	55	K
Hasta 13	60	K
Hasta 14	57	E
Hasta 15	89	K
Hasta 16	66	K
Hasta 17	60	K
Hasta 18	71	K

E: Erkek, K: Kadın

4.1. FISH BULGULARI

Hasta örneklerinden yapılan FISH analizi 13q14 bölgesine spesifik probun delesyonlu hastalarda tek kırmızı sinyal, delesyonu olmayan hastalarda iki yeşil sinyal vermesi prensibine dayanarak yapıldı. Tek kırmızı sinyal olan hasta sonuçları 13q delesyonu açısından pozitif, iki yeşil sinyali olan hasta sonuçları negatif olarak tanımlanmıştır (Resim 2, Resim 3, Resim 4). FISH analiz sonuçları cinsiyete göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değildir

($p > 0.05$). Hasta örnekleri için ait FISH sonuçları Tablo 9'da verilmiştir. Tablo 10'da FISH sonuçları cinsiyet ile karşılaştırılmıştır.



Resim 2: DAPI görüntüsü **Resim 3:** 13q del. Negatif hücre **Resim 4:** 13q del. Pozitif hücre

Tablo 9: FISH sonuçları

Örnek No	13q Delesyon sonucu
Hasta 1	Negatif
Hasta 2	Pozitif
Hasta 3	Pozitif
Hasta 4	Negatif
Hasta 5	Pozitif
Hasta 6	Pozitif
Hasta 7	Negatif
Hasta 8	Pozitif
Hasta 9	Negatif
Hasta 10	Negatif
Hasta 11	Negatif
Hasta 12	Negatif
Hasta 13	Negatif
Hasta 14	Negatif
Hasta 15	Pozitif
Hasta 16	Pozitif
Hasta 17	Pozitif
Hasta 18	Negatif

Tablo 10: FISH sonuçlarının cinsiyete göre karşılaştırılması:

	13 q delesyonu	
	Negatif	Pozitif
Erkek	% 44,4	% 55,6
Kadın	%66,7	% 33,3
Toplam	% 55,6	% 44,4
Pearson Chi-Square	<i>p</i> : 0,343	
Fisher's Exact Test	<i>p</i> : 0,637	

4.2. NF-kB ELİZA SONUÇLARI

Çalışmanızda 18 hastanın kemik iliği aspirasyon örneklerinden elde edilen mononükleer hücreler ile yapılan hücre kültürü öncesi ve sonrası NF-kB değerleri ELİZA yöntemi ile ölçülmüştür ve konsantrasyonları 0,15 - 10 µg/ml arasında olan NF-kB standartları kullanılarak oluşturulan standart eğri ile kantitasyonları yapılmıştır. Sonuçlar Tablo 11’de görülmektedir. Tablo 12’de NF-kB değerlerinin 13q delesyon sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

Tablo 11: NF-kB sonuçları

Örnek No:	NF-kB Kültür Öncesi (mg/ml)	NF-kB Kültür Sonrası (mg/ml)
Hasta 1	0.46	0.45
Hasta 2	0.52	0.49
Hasta 3	0.29	0.32
Hasta 4	0.61	0.77
Hasta 5	0.55	0.45
Hasta 6	0.76	0.62
Hasta 7	0.65	0.6
Hasta 8	0.74	0.46
Hasta 9	0.31	0.4
Hasta 10	0.74	0.55
Hasta 11	0.6	0.42
Hasta 12	0.52	0.47
Hasta 13	0.35	0.49
Hasta 14	0.82	0.71
Hasta 15	0.07	0.14
Hasta 16	0.44	0.36
Hasta 17	0.41	0.57
Hasta 18	0.86	0.41
Ortalama	0,53	0,48

Tablo 12: NF-kB değerlerinin 13q delesyon sonuçları ile karşılaştırılması:

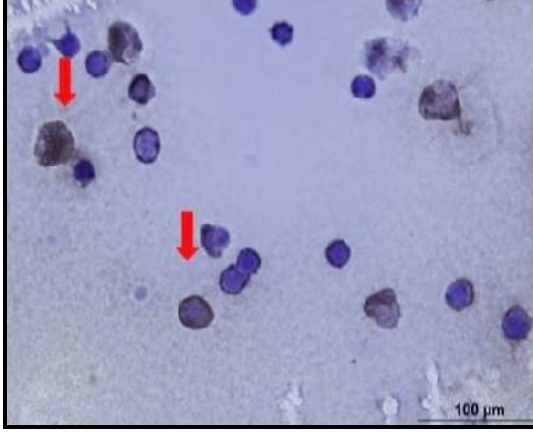
		NF-kB Kültür Öncesi	NF-kB Kültür Sonrası
13 q Delesyonu Negatif	Ortalama	0,59	0,52
	Sayı	10	10
	Standart Sapma	0,18	0,12
	Minimum	0,31	0,40
	Maksimum	0,86	0,77
13 q Delesyonu Pozitif	Ortalama	0,47	0,42
	Sayı	8	8
	Standart Sapma	0,22	0,15
	Minimum	0,07	0,14
	Maksimum	0,76	0,62
Toplam	Ortalama	0,53	0,48
	Sayı	18	18
	Standart Sapma	0,20	0,14
	Minimum	0,07	0,14
	Maksimum	0,86	0,77
Mann-Whitney U		27	28
Çift yönlü <i>p</i> değeri		0,24	0,28

13q delesyonu negatif hastalarda NF-kB kültür öncesi değerlerin ortalaması 0,59, kültür sonrası değerlerin ortalaması 0,52 ve 13q delesyonu pozitif hastalarda NF-kB kültür öncesi değerlerin ortalaması 0,47, kültür sonrası değerlerin ortalaması 0,42 olup fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. ($p>0,05$)

4.3. İMMUNHİSTOKİMYASAL SONUÇLAR

Çalışmanızda 18 hastanın kemik iliği aspirasyon örneklerinden elde edilen mononükleer hücreler ile yapılan hücre kültürü öncesi ve sonrası ICAM değerleri immunhistokimyasal yöntemi ile ölçülmüştür (Resim 5, Resim 6, Resim 7, Resim 8). İmmunhistokimyasal değerlendirme şu şekilde yapılmıştır; her preparattan 5 alan, bu 5'er alanda 100'er hücre sayıldı. 100 hücreden pozitif boyanma gösteren hücreler belirlendi. 5'er alanın ortalamaları alındı. Sonuçlar tablo 13'de görülmektedir. ICAM değerlerinin 13q delesyon sonuçları ile karşılaştırılmıştır (Tablo 14). Tablo 15'de 13q delesyonu negatif hastalarda ICAM ve NF-kB değerlerinin karşılaştırılmıştır. 13q delesyonu pozitif hastalarda ICAM ve NF-kB değerlerinin karşılaştırılması tablo 16'da görülmektedir. Ayrıca, 13q delesyonu pozitif ve negatif hastalardaki ICAM kültür öncesi değer ve ICAM kültür sonrası değerler farkı (DICAM) ile

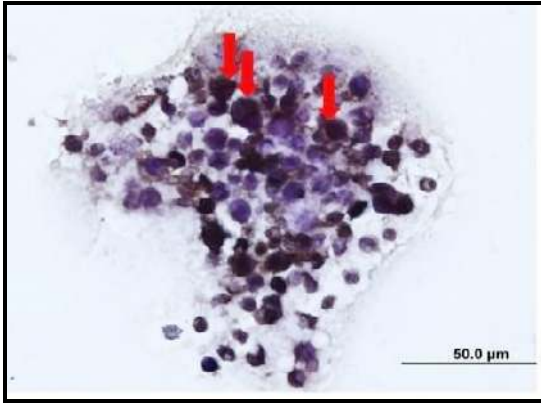
NF-kB kültür öncesi değerler ile NF-kB kültür sonrası değerler farklarının (DNF-kB) karşılaştırılması yapılmıştır (Tablo 17).



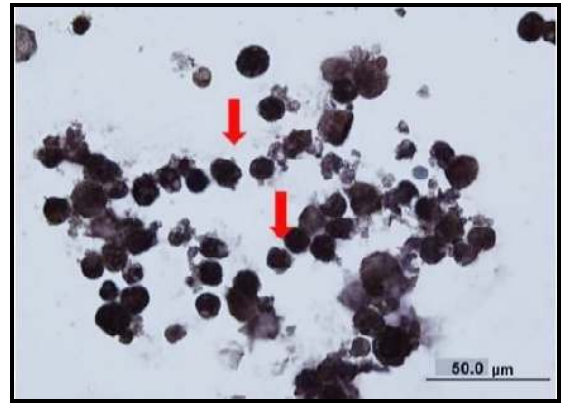
Resim 5: ICAM kültür öncesi görüntü-1



Resim 6: ICAM kültür öncesi görüntü-2



Resim 7: ICAM Kültür sonrası görüntü-1



Resim 8: ICAM kültür sonrası görüntü-2

Tablo13: ICAM sonuçları

Örnek No:	ICAM Kültür Öncesi (%)	ICAM Kültür Sonrası (%)
Hasta 1	34	44.3
Hasta 2	72.6	75.7
Hasta 3	75	74
Hasta 4	55	60
Hasta 5	0	75
Hasta 6	59.7	61.5
Hasta 7	82.5	85
Hasta 8	50.5	53.7
Hasta 9	46.3	50
Hasta 10	42.3	67
Hasta 11	60.2	75
Hasta 12	44.6	50
Hasta 13	81.6	80
Hasta 14	54	75
Hasta 15	79.5	75
Hasta 16	63	67.5
Hasta 17	68	69
Hasta 18	66.2	75
Ortalama	57,50	67,37

Tablo 14: ICAM değerlerinin 13q delesyon sonuçları ile karşılaştırılması:

		ICAM Kültür Öncesi	ICAM Kültür Sonrası
13 q Delesyonu Negatif	Ortalama	56,67	66,13
	Sayı	10	10
	Standart Sapma	16,24	14,21
	Minimum	34	44,30
	Maksimum	82,50	85
13 q Delesyonu Pozitif	Ortalama	58,53	68,92
	Sayı	8	8
	Standart Sapma	25,38	7,87
	Minimum	0,00	53,70
	Maksimum	79,50	75,70
Toplam	Ortalama	57,50	67,37
	Sayı	18	18
	Standart Sapma	20,14	11,60
	Minimum	0,00	44,30
	Maksimum	82,50	85
Mann-Whitney U		31	37
Çift yönlü <i>p</i> değeri		0,42	0,78

13q delesyonu negatif hastalarda ICAM kültür öncesi değerlerin ortalaması 56,67, kültür sonrası değerlerin ortalaması 66,13 ve 13q delesyonu pozitif hastalarda ICAM kültür öncesi değerlerin ortalaması 58,53, kültür sonrası değerlerin ortalaması 68,92 olup fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. ($p>0,05$)

Tablo 15: 13q delesyonu negatif hastalarda ICAM ve NF-kB değerlerinin karşılaştırılması:

13q delesyonu negatif		Ortalama	Sayı	Standart sapma	Wilcoxon	Çift yönlü p değeri
Grup 1	ICAM Kültür Öncesi	56,67	10	5,13	-2,70	0.007
	ICAM Kültür Sonra	66,13	10	4,49		
Grup 2	NF-kB Kültür Öncesi	0,59	10	0,05	-1,07	0.28
	NF-kB Kültür Sonrası	0,52	10	0,04		

13q delesyonu negatif hastalarda ICAM kültür öncesi değerlerin ortalaması 56,67, kültür sonrası değerlerin ortalaması 66,13 olup fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p< 0.05$). 13q delesyonu negatif hastalarda NF-kB kültür öncesi değerlerin ortalaması 0,59, kültür sonrası değerlerin ortalaması 0,52 olup fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p> 0.05$).

Tablo 16: 13q delesyonu pozitif hastalarda ICAM ve NF-kB değerlerinin karşılaştırılması:

13q delesyonu pozitif		Ortalama	Sayı	Standart sapma	Wilcoxon	Çift yönlü p değeri
Grup 1	ICAM Kültür Öncesi	58,53	8	25,38	-1,40	0,16
	ICAM Kültür Sonra	68,92	8	7,87		
Grup 2	NF-kB Kültür Öncesi	0,47	8	0,22	-0,91	0.36
	NF-kB Kültür Sonrası	0,42	8	0,15		

13q delesyonu pozitif hastalarda ICAM kültür öncesi değerlerin ortalaması 58,53, kültür sonrası değerlerin ortalaması 68,92 olup fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$).

13q delesyonu pozitif hastalarda NF-kB kültür öncesi değerlerin ortalaması 0,47, kültür sonrası değerlerin ortalaması 0,42 olup fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$).

Tablo 17: 13 q delesyonu pozitif ve negatif hastalardaki ICAM kültür öncesi değer ve ICAM kültür sonrası değerler farkı (DICAM) ile NF-kB kültür öncesi değerler ile NF-kB kültür sonrası değerler farklarının (DNF-kB) karşılaştırılması

		DICAM	DNF-kB
13 q Delesyonu Negatif	Ortalama	9,46	-0,06
	Sayı	10	10
	Standart Sapma	8,40	0,18
13 q Delesyonu Pozitif	Ortalama	10,38	-0,04
	Sayı	8	8
	Standart Sapma	26,26	0,13
Toplam	Ortalama	9,87	-0,05
	Sayı	18	18
	Standart Sapma	17,93	0,15
Mann-Whitney U		20	38,50
Çift yönlü p değeri		0,07	0,89

13q delesyonu negatif hastalarda ICAM kültür öncesi değerler ile kültür sonrası değerler arasındaki fark (DICAM) ortalaması 9,46, 13 q delesyonu pozitif hastalarda DICAM ortalaması 10,38 olup fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$). 13q delesyonu negatif hastalarda NF-kB kültür öncesi değerler ile kültür sonrası değerler arasındaki fark (DNF-kB) ortalaması -0,06, 13 q delesyonu pozitif hastalarda DNF-kB ortalaması -0,04 olup fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$).

Tablo 18: Çalışmada yer alan hastalara ait demografik, klinik veriler

Hasta No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	Ortalama
Yaş	78	69	60	62	47	59	63	76	80	69	62	55	60	57	89	66	60	71	65.72
Cinsiyet	E	E	E	K	E	E	K	E	E	K	E	K	K	E	K	K	K	K	-
Hb (g/dl)	9.6	12.49	10.2	7.7	12.5	11.2	11.9	8.3	11.5	13.1	11.5	13	10.5	12	8.6	9.6	11.2	9.6	10.80
WBC (u/l)	4.5	5.6	4.5	6.9	8.1	3.8	2.6	5	4.9	7.4	5.5	23.2	10.1	6.6	7.9	3.4	12.7	14.6	7.62
PLA (u/l)	208	157	213	174	383	198	102	123	195	325	237	204	333	196	319	145	393	399	239.11
Cr (mg/dl)	0.9	1.42	1.08	1.25	1.27	1.51	-	4.67	1.15	0.78	1.32	0.82	1.41	0.98	0.9	0.65	9.7	1.63	1.84
Ca (mg/dl)	7.9	10.8	9.02	8	12.8	9.3	8.6	11.5	9.5	9.8	10	8.8	8.6	8.9	9.1	9.1	9.5	8.9	9.45
LDH (u/l)	106	301	263	189	132	108	142	161	204	177	158	143	133	176	118	192	275	157	174.16
CRP (mg/dl)	2.85	10.21	20.5	7.43	12.72	1.51	7.97	9.53	13.37	18.09	1.43	1.51	3.86	3.52	10.9	18.4	11.15	-	8.60
B2 M (ng/ml)	3388	8087	4172	9768	3417	3092	-	> 20000	3682	1813	-	-	4589	2022	-	-	2574	-	5550.33
Plazma Hücresi (%)	23	70	70	11	75	85	22	90	26	21	13	17	29	22	80	80	85	85	50.22

Hb: Hemoglobin**WBC:** Beyaz Kan hücresi**Ca:** Kalsiyum**LDH:** Laktat dehidrogenaz**Cr:** Kreatin**B2 M:** Beta 2 Mikroglobulin**PLA:** Trombosit**CRP:** C reaktif protein

Tablo 19: 13q delesyon varlığı ile klinik verilerin karşılaştırılması

		Yaş	HB	WBC	PLA	Cr	Ca	LDH	CRP	ß2 M	Plazma Hücresi
13 q Delesyonu Negatif	Ortalama	65,70	11,04	8,63	237,30	1,13	8,9	158,50	6	4210	26,90
	Sayı	10	10	10	10	9	10	10	10	6	10
	Standart Sapma	8,51	1,69	6,10	88,67	0,28	0,69	29	5,81	2916,24	21,14
	Minimum	55	7,70	2,60	102	0,78	7,90	106	0	1813	11
	Maksimum	80	13,10	23,20	399	1,63	10	204	18,09	9768	85
13 q Delesyonu Pozitif	Ortalama	65,75	10,51	6,37	241,37	2,65	10,14	193,75	11,86	6890,33	79,37
	Sayı	8	8	8	8	8	8	8	8	6	8
	Standart Sapma	12,64	1,61	3,08	108,35	3,11	1,40	76,41	5,79	6720,22	7,28
	Minimum	47	8,30	3,40	123	0,65	9,02	108	1,51	2574	70
	Maksimum	89	12,50	12,70	393	9,70	12,80	301	20,50	20000	90
Toplam	Ortalama	65,72	10,80	7,62	239,11	1,84	9,45	174,16	8,60	5550,33	50,22
	Sayı	18	18	18	18	17	18	18	18	12	18
	Standart Sapma	10,20	1,63	5	94,87	2,21	1,21	56,34	6,37	5133,45	31,27
	Minimum	47	7,70	2,60	102	0,65	7,90	106	0	1813	11
	Maksimum	89	13,10	23,20	399	9,70	12,80	301	20,50	20000	90
Mann-Whitney U		37,50	31	32,50	38	25,50	14,50	32	17,50	14	6
Çift yönlü p değeri		0,82	0,42	0,50	0,85	0,31	0,02*	0,47	0,04*	0,52	0,002*

* Çift yönlü p değeri anlamlıdır $p < 0,05$

Hb: Hemoglobin
WBC: Beyaz Kan hücresi

Ca: Kalsiyum
LDH: Laktat dehidrogenaz

Cr: Kreatin
ß2 M: Beta 2 Mikroglobulin

PLA: Trombosit
CRP: C reaktif protein

- 13q delesyonu negatif hastalarda kalsiyum düzeyleri ortalaması 8,9 iken, 13q delesyonu pozitif hastalarda kalsiyum düzeyleri ortalaması 10,14 idi ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptandı ($p=0,02$).
- CRP düzeyleri ortalaması 13q delesyonu negatif hastalarda 6 iken, 13q delesyonu pozitif hastalarda 11,86 idi ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptandı ($p=0,04$).
- Plazma hücre yüzdesi ortalaması 13q delesyonu negatif hastalarda, 13q delesyonu pozitif hastalara göre düşüktü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,002$)

MM, malign plazma hücrelerinin proliferasyonu ile karakterize bir hastalıktır. MM'da ortalama sağkalımın konvansiyonel tedavi sonrasında 3-4 yıl, yüksek doz KT'yi takiben otolog kök hücre transplantasyon tedavisi sonrasında ise 5-7 yıl olması MM tedavisi için önemli bir sorun oluşturmaktadır. Ayrıca, konvansiyonel ve yüksek doz tedavilerin sıklıkla uygulanmasına karşın, tümör hücrelerinin çeşitli tedavilere karşı direnç geliştirmesi etkin tedavi için diğer önemli sorunu oluşturur. Böylece MM tedavi edilemez hastalık olarak kalır (1-10).

MM'da ortalama sağ kalımı sınırlayan kemoterapi sonrası görülen relapslarda minimal rezidüel hastalığın primer kaynağı olarak kemik iliği mikroçevresinin sorumlu olduğu bildirilmiştir. MM hücreleri ve Ki stromal hücreler ya da MM hücrelerinin ekstrasellüler matriks proteinleri arasındaki direk etkileşimler hücre yüzey proteinleri ve hücre adezyon molekülleri ile sağlanmaktadır. MM hücrelerinin ekstrasellüler matriks elemanlarına adezyonunun, kemoterapötik ajanlara direnç gelişiminde etkili olduğu gösterilmiştir. Bu antiapoptotik durum 'hücre adezyon aracılı ilaç direnci' (CAM-DR) olarak tanımlanır (38).

Hücre adezyon aracılı ilaç direncinde iki ana etmen yer alır. Bunlardan birincisi, tümör hücresi ile mikroçevre elemanları arasındaki fiziksel ilişki, diğeri ise çözünebilir faktörlerin (sitokinler vb.) lokal üretimidir. MM'da tümör hücrelerinin adezyon molekülleri ile fibronektine adezyonu ilaç direncini ortaya çıkardığı bulunmuştur. CAM-DR *de novo* ilaç direnci olarak adlandırılmaktadır ve kazanılmış ilaç direncinden yapı ve genetik olarak farklıdır (39).

Son yıllarda MM'nın genetik temelini anlaşılmaya yönünde birçok araştırma yapılmıştır. Sitogenetik ve FISH yöntemleri ile yapılan incelemelerde MM'da birçok genetik değişikliğin olduğunu göstermiştir. Yapılan FISH analizleri ile %40 oranında rastlanan 13. Kromozom delesyonları kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (21,31).

Yapılan çalışmalarda invitro olarak ilaç direnci geliştirmiş MM hücrelerinin alfa-4, β 1 integrin eksprese ettikleri ve Ki stromal hücrelere adezyonunun VLA-4/VCAM ve LFA-1/ICAM-1 adezyon molekülleri arasındaki ilişki ile sağlandığı ve bu moleküllerinin artmış ekspresyonlarının ilaç direncine neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca ilaç direnci gelişiminde diğer bir önemli mekanizmanın MM hücrelerinin bir transkripsiyon faktörü olan NF-kB aracılığıyla apoptoza direnç geliştirdikleri bilinmektedir (19,23,25).

MM'da hız sınırlayıcı basamak olan, gelişen ilaç direnci, relaps, refrakter ve daha yaşlı hastalar için yeni ilaçların kullanımının zorunluluğunu ortaya koymuştur. İlaç direnci ile kısıtlanan tedavi 1990'ların sonunda thalidomid ve onun analogu olan lenalidomid ile proteozom inhibitörü ailesinin ilk üyesi bortezomib'in MM'da kullanılmaya başlanması ile yeni bir boyut kazanmıştır. İlk çalışmalarda bortezomib relaps MM hastalarında klinik olarak etkili bulunmuştur. Bortezomib protein degradasyonunda önemli rol oynayan 26S proteozomu geri dönüşümlü olarak inhibe eder. Bu kompleksin inaktivasyonu, transkripsiyon faktörü olan NF-kB'nin inaktivasyonuna yol açar. Daha önce yapılan çalışmalarda MM hücre hattında CAM-DR'yi bortezomib'in geri çevirdiğini bildirmiştir. Bortezomib'in adezyon molekül ekspresyonunu etkilediğini bildirmektedir (32,33).

Bu çalışmadaki amacımız; MM'da kötü prognoz ve ilaç direnci gelişiminde önemli bir faktör olarak tanımlanan 13q delesyon varlığı ile ilaç direnci gelişiminden sorumlu moleküller olarak belirlenen ICAM ve NF-kB ekspresyon değişikliklerini invitro olarak bortezomib ile kültüre edilmiş kemik iliği mononükleer hücrelerinde kültür öncesi ve sonrası ekspresyon değişiklikleri ilişkisinin incelenmesidir.

Çalışmamızda 18 MM hastasının örneklerinde FISH ile 13q delesyonu incelendiğinde 13q delesyon oranı %44,4 olarak bulunmuştur. Largo C. ve ark. (40) 26 MM hastasında yaptıkları FISH analizinde 13q delesyonu oranını % 38 olarak bildirmişlerdir. Agnelli L. ve ark. (41) 80 yeni tanı almış MM hastalarında yaptıkları FISH analizi ile 13q delesyon oranını %53,8 olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda 13q delesyon varlığı cinsiyet ile karşılaştırılınca istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamamıştır. İlgili literatürde yapılan FISH tarama çalışmalarında cinsiyet ile 13q delesyon varlığı karşılaştırılmamıştır ancak Kröger N. ve ark. (42) 120 MM hastasında 13q delesyon varlığı ile birçok demografik veriyi karşılaştırdıkları çalışmada 13q delesyon oranını %45,5 olarak bulmuşlardır ve 13q delesyon varlığı ile cinsiyet karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir veri elde edilememiştir. Bu anlamda çalışmamızdaki 13q delesyon sonuçları literatür ile uyum göstermektedir.

NF-kB'nin karsinogenesisde önemli bir rol oynadığı yapılan birçok çalışma ile desteklenmiş ve NF-kB'nin hem hematolojik hem de solid tümörlerde aktive olduğu bulunmuştur. NF-kB'nin aktivasyonu ile kemoterapötik ajanlar ile indüklenen apoptozu inhibe ettiğine dair bilgiler mevcuttur (27). Çalışmamızda MM hastalarının kemik iliği aspirasyon örneklerinden elde edilen mononükleer hücreler ile yapılan hücre kültüründe kültür öncesi NF-kB ekspresyon değerleri ile kültürde bortezomib eklenmesi sonrasındaki

ekspresyon değerleri karşılaştırıldığında bortezomib eklenmesinden sonra NF-kB değerinin azaldığı bulunmuştur fakat bu veri 13q delesyon varlığı ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değildir. Cilloni D. ve ark. (43) kronik myeloid lösemi (KML)'de gelişen imatinib direnci ile NF-kB ilişkisini inceledikleri çalışmada; 19 imatinibe dirençli KML hastasında elde ettikleri kemik iliği mononükleer hücrelerde NF-kB aktivasyonu incelediklerinde aktivasyon oranını %87 olduğunu bulmuşlardır. İmatinibe dirençli ve duyarlı 2 KML hücre hattında ve imatinibe dirençli KML hasta örnekleri ile yapılan hücre kültüründe NF-kB'nin inhibitörü olan IKK'yi etkileyen PS1145 maddesi eklenmesi ile kültür sonrasında NF-kB aktifliğinin azaldığı ve imatinib direncinin ortadan kalktığını bildirmişlerdir. He H. ve ark. (44) multipl miyelom hücre hattında NF-kB aktivasyonun doksorubisin ve genistein eklenmesi ile değişimini inceledikleri çalışmada, NF-kB'nin doksorubisin eklenmesinden sonra aktifliğinin arttığını, miyelom hücrelerinde proliferasyon artışı ve apoptoz inhibisyonunun olduğunu gözlemlemişlerdir. Fakat genistein ile doksorubisin kombine olarak verildiğinde NF-kB'nin etkisinin azaldığı, miyelom hücrelerinde apoptozun indüklendiği ve proliferasyonun inhibe olduğunu bildirmişlerdir. Bu durum MM'da NF-kB aktivasyonunun ilaç indüklü apoptoza direnden sorumlu olabileceğini ve ilaç direnci gelişiminde ana rollerden birini oynadığını düşündürmektedir. Yapılan literatür taramasında ulaşılabilen literatürde MM'da 13q delesyonu ile NF-kB ekspresyon ilişkisinin incelendiği bir çalışma bulunamamıştır.

Birçok kanserde olduğu gibi MM'da da önemli sorunlardan birini oluşturan hücre adezyon aracılı ilaç direncinde adezyon moleküllerinin artmış ekspresyonu direnç gelişiminde ana etmenlerden biri olarak tanımlanmıştır (35). Çalışmamızda 13q delesyon varlığı ile kültür öncesi ve kültür sonrası ICAM değerleri karşılaştırıldığında fark istatistiksel olarak anlamsızdır. Fakat 13q delesyonu olmayan hastalarda ICAM kültür öncesi değerleri ile ICAM kültür sonrası değerleri karşılaştırıldığında bortezomib eklenmesi ile ICAM ekspresyon değerlerinin arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir. Schmidmaier R. (38) ve ark. yaptıkları çalışmada klinik ve laboratuvar özellikleri aynı 15 tedavi almış ve 17 tedavi almamış MM hastalarının kemik iliği aspirasyon örneklerinde adezyon molekül ekspresyon incelemesinde tedavi almış gruptaki ICAM ekspresyonun almamış gruba göre çok yüksek olduğunu bulmuşlardır. Tedavi almış grupta kemoterapiye direnç geliştirmiş hastaların değerleri tedavi almamış ve direnç geliştirmemiş grup ile karşılaştırıldığında ICAM ekspresyon değerlerinin oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu durum ilaç direnci

gelişiminde ICAM'ın ekspresyonun önemini tekrar vurgulamaktadır. Iqbal M.S. (46) ve ark. 55 MM hastalarının kemik iliği aspirasyon örneklerinden elde ettikleri mononükleer hücrelerde NF-kB aktivasyonu ile ICAM ekspresyonunu karşılaştırdıkları çalışmalarında, NF-kB'nin DNA bağlama aktivitesi ile ICAM ekspresyonunun pozitif yönde korelasyon gösterdiğini ve MM hastalarındaki ICAM ekspresyonunun normal kemik iliği plazma hücrelerindeki ekspresyona göre oldukça düşük olduğunu, ekspresyon alanının perivasküler alanda yoğun olduğunu vurgulamışlardır. Lin Y.C. ve ark. (45) akciğer kanserinde yaptıkları çalışmada, 40 akciğer kanserli hasta örneklerinde ICAM ekspresyonunu incelemişlerdir. Normal akciğer epitelinde ICAM ekspresyonu gözlenmezken tümör örneklerinde farklı derecelerde ekspresyon seviyeleri bulmuşlardır, yüksek ICAM ekspresyonun olduğu grupta ileri evre hastalık, lenf nod metastazı ve kötü prognoz olduğunu gözlemlemişlerdir. ICAM ekspresyonu ile tümör durumunun ilişkili olduğunu vurgulamışlardır. Ayrıca akciğer kanseri hücre hattında plazmit ile ICAM ekspresyonu artışı yapılan grupta kontrol grubuna göre artmış NF-kB aktivitesi ve proliferasyon gözlemlemişlerdir. Sampaio MS. ve ark. (47) yaptıkları çalışmada, 53 MM hastasının kemik iliği örneklerinden NF-kB ve ICAM gen ekspresyonu düzeyleri ile hastalık evre, sağkalım ve tedaviye yanıt ilişkisini incelemişlerdir, ileri evre hastalıkta artmış NF-kB ve ICAM ekspresyonu gözlemlerken, sağkalım ve tedaviye yanıt oranlarının azaldığını gözlemlemişlerdir. Bu durum MM hastalarında NF-kB ve ICAM ekspresyon düzeylerinin, sağkalım ve tedaviye yanıtta önemli bir faktör olduğunu kanıtlamıştır. Literatür taramalarımızda MM hastalarında NF-kB ve ICAM ekspresyonlarının 13q delesyon varlığı ile ilişkisini inceleyen çalışmaya rastlanmamıştır.

Bir proteozom inhibitörü olan Bortezomib'in MM tedavisine girmesi önemli bir sorun olan tedaviye yanıtızsızlık ve düşük sağkalım oranlarının aşılması için umut vaat eden bir gelişme olmuştur (33). Çalışmamızda NF-kB ve ICAM ekspresyon değerlerinin kültüre edilen hücrelere bortezomib eklenmesi ile azalması ilaç direnci gelişiminden sorumlu olan bu moleküller üzerinden etki eden bortezomibin etkinliğini vurgulamıştır. Fakat 13q delesyon varlığı ile bu değerler karşılaştırıldığında fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Baumann ve ark. (48), multipl miyelom hücrelerinde bortezomibin DNA hasar mekanizması ile çalışan melphalan ve doksorubisin ile etkileşimlerini incelemişlerdir. Melphalan ve doksorubisin ile inkübe edilen hücrelerde ilaç direnci gelişiminde önemli olan NF-kB'nin ekspresyonunun arttığını fakat bortezomib ile birlikte inkübasyon sonrasında melphalan ve doksorubisin ile indüklenen NF-kB aktivasyonunun inhibe edildiğini bulmuşlardır (25). Balsas P. ve ark. (49),

MM hücre hatlarında bortezomibin apoptotik bir yolak olan Apo2L/ TRAIL yolağı üzerinden etkisini incelediklerinde MM hücre hattında kültüre edilen hücrelere bortezomib eklenmesi sonrasında bu yolağın aktifleştiğini, apoptoz oranlarının arttığını bildirmişlerdir. Bu durum bortezomib'in birçok yolakda etkileşim yolu ile apoptozu indükleyebileceğini ortaya çıkarmıştır. Congdon L.M. ve ark. (50), MM hücrelerinde ilaç direncinin engellenmesinde bortezomib'in ilaç transportunda önemli bir molekül olan topoII üzerinden etkisini değerlendirmişlerdir. Yapılan çalışmada ilaç direnci gelişmiş MM hücre hattında bortezomib eklenmesi ile topoII aktivitesinin arttığını ve bu durumun ilaç etkisinin artışı ile apoptozu indüklediğini proliferasyon oranlarının azaldığını belirtmişlerdir. Yanamandra N. ve ark. (37) yaptıkları çalışmada ilaç direnci geliştirmiş MM hücre hatlarında ve primer MM hücrelerinde tipifarnib ve bortezomibin birlikte verilmesinin hücre adezyon aracılı ilaç direncinin engellenmesinde çok daha etkili olduğunu göstermişlerdir. Bu durum MM tedavisinde bortezomib ile diğer kematerapötik ajanların kombine olarak verilmeye başlanmasının hücre adezyon aracılı ilaç direncinin engellenmesinde daha yararlı olacağını vurgulamıştır. İncelenebilen literatürde MM'da bortezomibin NF-kB ve ICAM molekülleri üzerinden etkisinin 13q delesyon varlığı ile ilişkisini inceleyen çalışmalar bulunmamaktadır.

Çalışmamızda 13q delesyon varlığı ve klinik veriler incelendiğinde 13q delesyonu negatif hastalarda kalsiyum düzeyleri, 13q delesyonu pozitif hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı düşüktür. 13q delesyonu negatif hastalarda CRP düzeyleri, 13q delesyonu pozitif hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı düşüktür ve 13q delesyonu negatif hastalarda plazma hücre yüzdesi ortalaması, 13q delesyonu pozitif hastalara göre anlamlı düşüktür. Huang SY ve ark. (51) yeni tanı almış 150 multipl miyelom hastalarında yaptıkları çalışmada, hastaların klinik verileri ile 13q FISH analiz sonuçlarını karşılaştırdıklarında 13q delesyonu olan hastalarda kalsiyum ve CRP düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulmamalarına rağmen, 13q delesyonu pozitif hastalarda daha yüksek plazma hücre yüzdesi gözlemlemişlerdir.

Bortezomib'in MM'da kullanılmaya başlanması ile MM tedavisi yeni bir boyut kazanmıştır, fakat kullanılan bu ilacın birçok doz sınırlayıcı etkilerini oluşu ve birçok hastada relapsların gözlenmesi tedavi için aşılması gereken yeni sorunları ortaya çıkarmıştır. Devam eden prelinik çalışmalarda, MM'nın patofizyolojik mekanizmasının tanımlanması, tümör sitotoksitesine etkili, ilaç direncini, ortadan kaldıran, hasta yararlanımlığını arttıran yeni tedavi seçenekleri belirlenmeye çalışılmaktadır (35). Ayrıca, hücre adezyonundan sorumlu

mediatörlerin tanımlanması CAM-DR'yi yok etmede ve MM tedavisinde yeni hedefler oluşturmada önemlidir. MM'da negatif prognostik faktör olarak tanımlanmış 13q delesyon varlığı ve ilaç direnci ilişkisinin açıklanması için MM patolojisinde yer alan moleküller ile yapılan, geniş hasta gruplarını içeren çalışmalara gereksinim vardır. Bu çerçevede bizim çalışmamız, ulaşılabilen literatürlerde yapılmamış bir çalışma olan 13q delesyon varlığı ile bortezomib etki mekanizmasının NF-kB ve ICAM molekülleri üzerinden incelemesi yönünden CAM-DR gelişiminde rol oynayan NF-kB ve ICAM moleküllerini 13q delesyonu ile ilişkisini anlamada yararlı olmuştur. Fakat yapılan çalışmamızın daha geniş hasta serileri ile desteklenmesi gerekmektedir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarımız özetle şöyledir.

1. FISH bulgularına göre 13q delesyon pozitifliği % 44,4'dür.
2. 13q delesyon varlığı cinsiyet ile karşılaştırılınca istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamamıştır.
3. 13q delesyon negatif veya pozitifliğine göre NF-kB kültür öncesi ve sonrası değer farkları istatistiksel olarak anlamlı değildir.
4. 13q delesyonu negatif hastalarda kültür öncesi ICAM değerleri kültür sonrası değerlere göre istatistiksel olarak anlamlı düşüktür. 13q delesyonu pozitif olan hastalarda bu değerlerin farkı istatistiksel olarak anlamlı değildir.
5. NF-kB değerlerinin kültür öncesi ve sonrası farkı ve ICAM değerlerinin kültür öncesi ve sonrası farkı 13q delesyon pozitifliği veya negatifliğine göre incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı değildir.
6. 13q delesyonu negatif hastalarda kalsiyum düzeyleri, 13q delesyonu pozitif hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı düşüktür.
7. 13q delesyonu negatif hastalarda CRP düzeyleri, 13q delesyonu pozitif hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı düşüktür.
8. 13q delesyonu negatif hastalarda plazma hücre yüzdesi ortalaması, 13q delesyonu pozitif hastalara göre düşüktü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır.

MM tedavisinde önemli bir sorun haline gelen kazanılmış ilaç direnci gelişmesinde ICAM ve 13q delesyon varlığının rol oynayabileceği öne sürülmüştür. Çalışma sonuçlarımızda 13q delesyon varlığı ile ICAM ekspresyon değişikliğinin gözlenmesi, ilaç direncinde ve 13q delesyon ilişkisinin bu aşamada bir etki olabileceğini düşündürmüştür. Literatürde bu 3 parametreyi ilaç direnci gelişimi açısından aynı anda inceleyen çalışma olmadığı için çalışmamız bu anlamda önemlidir.

Verilerimizde NF-kB aktivitesi ile 13q delesyon varlığının anlamlı yönde ilişkili bulunamamıştır. Çalışmamızda NF-kB aktivitesine tek bir yöntem ile incelenmiş olması bu durumun nedeni olabilir. Bu sebeple ileride planlanan çalışmalarda NF-kB aktivitesini birden fazla yöntem ile değerlendirilmesini önermekteyiz.

Ayrıca, çalışmadaki hasta sayımızın kısıtlı olması ve cinsiyet dağılımının eşit olamaması bu çalışma için kısıtlayıcı bir aşama olmuştur.

İleride planlanan çalışmalarda, 13q delesyon varlığı ICAM ekspresyon ilişkisi ve NF-kB aktivliğinin ilaç direnci geliştiren daha çok sayıda hastada incelenmesi, tedavinin ilk aşamalarında ve ilaç direnci gelişiminden sonraki aşamalarda NF-kB aktivliğinin ve ICAM ekspresyon seviyelerinin incelenmesi bu ilişkiyi geniş bir çerçevede açıklayabileceği öngörülmektedir.

1. Shaheen SP, Talwalkar SS, Medeiros LJ. Multiple myeloma and immunosecretory disorders: an update. *Adv Anat Pathol*, 2008 ;15(4):196-210. Review.
2. Liebisch P, Döhner H. Cytogenetics and molecular cytogenetics in multiple myeloma. *Eur J Cancer* 2006; 42:1520-1529.
3. Higgins MJ, Fonseca R. Genetics of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol* 2005; 18:525–536.
4. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, Miguel JS et al. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia*, 2009;23(2):215-24. Review.
5. Mollee P. Current trends in the diagnosis, therapy and monitoring of the monoclonal gammopathies. *Clin Biochem Rev*, 2009;30(3):93-103.
6. Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia*, 2009;23(1):3-9. Review.
7. Hussein MA, Vrionis FD, Allison R, Berenson J et al. The role of vertebral augmentation in multiple myeloma: International Myeloma Working Group Consensus Statement. *Leukemia*, 2008;22(8):1479-84.
8. Dimopoulos M, Terpos E, Comenzo RL, Tosi P et al. International myeloma working group consensus statement and guidelines regarding the current role of imaging techniques in the diagnosis and monitoring of multiple Myeloma. *Leukemia*, 2009;23(9):1545-56. Review.
9. Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, Richardson PG et al. Multiple myeloma. *Lancet*, 2009;374(9686):324-39.
10. G. David Roodman, Irene M. Ghobrial, Angelo Vacca, Karin Vanderkerken et al. Myeloma microenviroment. *Clin Lymphoma Myeloma*, 2009; 9(2):25-32.
11. Fauci AS., Kasper DL., Longo DL., Braunwald E., Hauser SL, Jameson JL., Loscalzo J. Harrison's principles of internal medicine, Seventeenth Edition, US, The McGraw-Hill Companies, Inc, 2008, 1073-1078.

12. Lichtman MA., Beutler E., Kipps TJ., Seligsohn U., Kaushansky K, Prchal JT, Williams hematology, seventh eddition, US, The McGraw-Hill Companies, Inc, 2007, 986-998.
13. Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. *Cancer* 1975; 36:842–854.
14. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*, 2005;23(15):3412-20.
15. Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS, Bladé J et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*, 2007;21(5):1134.
16. Schwartz RN, Vozniak M. Current and emerging treatments for multiple myeloma. *J Manag Care Pharm*, 2008;14(7 Suppl):12-9. Review.
17. Lonial S, Cavenagh J. Emerging combination treatment strategies containing novel agents in newly diagnosed multiple myeloma. *Br J Haematol*, 2009 Jun;145(6):681-708. Review
18. Kastritis E, Charidimou A, Varkaris A, Dimopoulos MA. Targeted therapies in multiple myeloma. *Target Oncol*, 2009;4(1):23-36. Review.
19. Anderson KC. Targeted therapy of multiple myeloma based upon tumor-microenvironmental interactions. *Exp Hematol*, 2007;35:155-62. Review
20. Richardson PG, Mitsiades CS, Hideshima T, Anderson KC. Novel biological therapies for the treatment of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2005;18(4):619-34. Review.
21. Higgins MJ, Fonseca R. Genetics of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol* 2005; 18:525–536.
22. Rafael Fonseca, Hervé Avet-Loiseau, Johanness Drach, Gareth Morgan et al. Myeloma molecular pathways and cytogenetics. *Clin Lymphoma Myeloma*, 2009; 9(2):6-11.
23. Chng WJ, Glebov O, Bergsagel PL, Kuehl WM. Genetic events in the pathogenesis of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2007;20(4):571-96. Review.
24. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, Shaughnessy J et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia*. 2009 Oct 1. [Epub ahead of print]
25. Sethi G, Sung B, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB activation: from bench to bedside. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2008;233(1):21-31. Review.

26. Panwalkar A, Verstovsek S, Giles F. Nuclear Factor-KappaB Modulation As a Therapeutic Approach in Hematologic Malignancies. *Cancer* 2004; 10:1578-1589.
27. Van Waes C. Nuclear factor-kappaB in development, prevention, and therapy of cancer. *Clin Cancer Res*, 2007;13(4):1076-82. Review.
28. Hideshima T, Chauhan D, Richardson P, Mitsiades C et al. NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J Biol Chem*, 2002;277(19):16639-47.
29. Güç D. Adezyon Molekülleri. *ANKEM J* 2004; 18:158-163.
30. Lawson C, Wolf S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep*, 2009;61(1):22-32. Review.
31. Bergsagel PL, Kuehl WM. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma, *J Clin Oncol*. 2005;23(26):6333-8. Review.
32. Richardson PG, Mitsiades C, Hideshima T, Anderson KC. Proteasome inhibition in the treatment of cancer. *Cell Cycle* 2005; 4:290-296.
33. Bladé J, Cibeira MT, Rosiñol L. Bortezomib: a valuable new antineoplastic strategy in multiple myeloma. *Acta Oncol*, 2005;44(5):440-8. Review.
34. Anderson KC. Proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Semin Oncol*, 2009;36(2):20-6.
35. Catley L, Tai YT, Chauhan D, Anderson KC. Perspectives for combination therapy to overcome drug-resistant multiple myeloma. *Drug Resist Updat*, 2008;8(4):205-18. Review.
36. <http://onsopcontent.ons.org/Publications/SIGNewsletters/chemo/chemo15.2.html>
37. Yanamandra N, Colaco NM, Parquet NA, Buzzeo RW et al. Tipifarnib and bortezomib are synergistic and overcome cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma and acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*, 2006;12(2):591-9.
38. Schmidmaier R, Mörsdorf K, Baumann P, Emmerich B et al. Evidence for cell adhesion-mediated drug resistance of multiple myeloma cells in vivo. *Int J Biol Markers*, 2006;21(4):218-22.
39. Nimmanapalli R, Gerbino E, Dalton WS, Gandhi V et al. HSP70 inhibition reverses cell adhesion mediated and acquired drug resistance in multiple myeloma. *Br J Haematol*, 2008;142(4):551-61.
40. Largo C, Saéz B, Alvarez S, Suela J et al. Multiple myeloma primary cells show a highly rearranged unbalanced genome with amplifications and homozygous deletions

- irrespective of the presence of immunoglobulin-related chromosome translocations. *Haematologica*, 2007;92(6):795-802.
41. Agnelli L, Biccato S, Fabris S, Baldini L et al. Integrative genomic analysis reveals distinct transcriptional and genetic features associated with chromosome 13 deletion in multiple myeloma. *Haematologica*, 2007;92(1):56-65.
 42. Kröger N, Schilling G, Einsele H, Liebisch P et al. Deletion of chromosome band 13q14 as detected by fluorescence in situ hybridization is a prognostic factor in patients with multiple myeloma who are receiving allogeneic dose-reduced stem cell transplantation. *Blood*, 2004;103(11):4056-61.
 43. Cilloni D, Messa F, Arruga F, Defilippi I, Morotti A et al. The NF-kappaB pathway blockade by the IKK inhibitor PS1145 can overcome imatinib resistance. *Leukemia*, 2006;20(1):61-7.
 44. He H, Chen L, Zhai M, Chen JZ. Genistein down-regulates the constitutive activation of nuclear factor-kappaB in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Phytother Res*. 2009;23(6):868-73.
 45. Iqbal MS, Otsuyama K, Shamsasenjan K, Asaoku H et al. Constitutively lower expressions of CD54 on primary myeloma cells and their different localizations in bone marrow. *Eur J Haematol*. 2009;83(4):302-12.
 46. Lin YC, Shun CT, Wu MS, Chen CC. A novel anticancer effect of thalidomide: inhibition of intercellular adhesion molecule-1-mediated cell invasion and metastasis through suppression of nuclear factor-kappaB. *Clin Cancer Res*, 2006;12(23):7165-73.
 47. Sampaio MS, Vettore AL, Yamamoto M, Chauffaille Mde L et al. Expression of eight genes of nuclear factor-kappa B pathway in multiple myeloma using bone marrow aspirates obtained at diagnosis. *Histol Histopathol*, 2009;24(8):991-7.
 48. Baumann P, Mandl-Weber S, Oduncu F, Schmidmaier R. Alkylating agents induce activation of NFkB in multiple myeloma cells. *Leuk Res*. 2008Jul;32(7):1144-7.
 49. Balsas P, López-Royuela N, Galán-Malo P, Anel A et al. Cooperation between Apo2L/TRAIL and bortezomib in multiple myeloma apoptosis. *Biochem Pharmacol*, 2009;77(5):804-12.
 50. Congdon LM, Pourpak A, Escalante AM, Dorr RT et al. Proteasomal inhibition stabilizes topoisomerase IIalpha protein and reverses resistance to the topoisomerase II poison etoposide (AMP-53, 6-ethoxyazoposide). *Biochem Pharmacol*,

2008;75(4):883-90.

51. Huang SY, Yao M, Tang JL, Tsay W et al. Clinical significance of cytogenetics and interphase fluorescence in situ hybridization analysis in newly diagnosed multiple myeloma in Taiwan. *Ann Oncol.* 2005;16(9):1530-8.

EK.1: ETİK KURUL ONAYI

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

Tarih ve Sayı: 06.06.2008/ 248

Etik Kurul Üyeleri

Prof.Dr.Taner ÇAMSARI
Prof.Dr.Tunç ALKIN
Prof.Dr.Mustafa SEÇİL
Prof.Dr.Ayça Arzu SAYINER
Doç.Dr.M.Hakan ÖZDEMİR
Doç.Dr.Vesile ÖZTÜRK
Doç.Dr.Murat DUMAN
Doç.Dr.Güven ASLAN
Yard.Doç.Dr.Murat ÖRMEN
Öğr.Gör.Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN
Yunus KARSLI

Etik Kurul Başkanı

Prof.Dr.Taner ÇAMSARI

Etik Kurul Sekreteri
Hatice İÇCİ

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Etik Kurulumuzun 05 Haziran 2008 tarih ve 24/13/2008 no.lu toplantısında; 225/2008 Protokol numaralı Sağlık Bilimleri Enstitüsü Öğretim Üyelerinden Doç.Dr.Mehmet Ali ÖZCAN'ın proje yöneticisi ve Zeynep ZADEOĞULLARI'nın sorumlusu olduğu, "13q delesyonu multipl miyelomlu hastalarda bortezomib etkinlik mekanizmasının araştırılması" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.



Prof. Dr.Taner ÇAMSARI
Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları
Etik Kurul Başkanı

Tel: 0232 412 22 54

EK.2: GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME FORMU

GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME FORMU

Hekiminiz size Multipl Miyelom tanısı koymuştur. Bu hastalık kötü huylu bir kemik iliği kanseridir. Tedaviniz hekiminiz tarafından güncel yöntemlerle gerçekleştirilmektedir.

Bu çalışmadaki gönüllü kişiler Dokuz Eylül Üniversitesi Erişkin Hematoloji Bilim Dalı polikliniğinde Multipl Miyelom tanısı konmuş tedavi protokolüne göre birinci sıra ilaç tedavisini almış ve ilaç direnci geliştirmesiyle ikinci sıra tedavisine geçilmiş hastalar olacaktır.

Çalışmamızda hedeflediğimiz yaklaşık gönüllü sayısı 40 hastadır.

Çalışmamızın süresi 1 yıl ile sınırlıdır. Ancak, araştırma için gönüllülerden rutin tanısal işlemler sırasında bir kere alınacak olan kemik iliği örnekleri kullanılacaktır. Araştırma için gönüllülerden ek bir talepte bulunulmayacaktır.

Bu çalışmada, birinci sıra ilaç tedavi almış ve ilaç direnci geliştirmesiyle ikinci sıra tedaviye geçilmiş multipl miyelom hastalarında ilaç direnci gelişmesinde etkili olabileceği düşünülen 13. kromozom kayıplarına, Nükleer Faktör Kappa B (NF-kB) ve İnterselüler Adezyon Molekülü (ICAM) moleküllerinin sentez düzeylerine belirtilen hasta gruplarından rutin tanısal işlemler sırasında alınan kemik iliği örneklerinde bakılacaktır.

Bu araştırmada hedeflediğimiz tıbbi yarar; 13. kromozom kayıplı MM hastalarında ilaç direnci gelişmesinde önemli olduğu belirlenmiş ICAM-1 ve NF-kB moleküllerinin düzeyleri incelenmesiyle, gelecekte bu hastaların tedavilerinin planlanması aşamasında 13. kromozom kayıplarına bakılarak daha etkin, hedefe yönelik tedaviler geliştirilmesine katkı sağlanmasıdır.

Bu çalışma sırasında uygulanacak testlerin ve araştırma ile ilgili gerçekleştirilecek diğer işlemlerin masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir. Bu çalışmaya alınmakla hastalığınızın tanı ve tedavisi ile ilgili ek bir işlem kesinlikle yapılmamaktadır.

Gönüllü bu çalışmaya katılmayı red etme ya da araştırma başladıktan sonra devam etmeme hakkına sahiptir. Bu çalışmaya katılmanız veya başladıktan sonra herhangi bir safhasında ayrılmanız daha sonraki tıbbi bakımınızı etkilemeyecektir. Araştırmacı da gönüllünün kendi rızasına bakmadan, olguyu araştırma dışı bırakabilir.

Bu çalışmada yer aldığınız süre içerisinde kayıtlarınızın yanı sıra ilişkili sağlık kayıtlarınız kesinlikle gizli kalacaktır. Bununla birlikte kayıtlarınız kurumun yerel etik kurul komitesine ve Sağlık Bakanlığına açık olacaktır. Hassas olabileceğiniz kişisel bilgileriniz yalnızca araştırma amacıyla toplanacak ve işlenecektir. Çalışma verileri herhangi bir yayın ve raporda kullanılırken bu yayında isminiz kullanılmayacak ve veriler izlenerek size ulaşamayacaktır. Uygulama sırasında karşılaşılabileceğiniz olası risk ve rahatsızlıklar bulunmamaktadır.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Hastanın;

Adı :

Soyadı :

Tarih :

İmza :

Olur Alma İşlemine Başından Sonuna Kadar Tanıklık Eden Kuruluş Görevlisinin

Adı :

Soyadı :

Telefon Numarası :

Tarih :

İmza :

Araştırma Yapan Araştırmacının

Adı :

Soyadı :

Telefon Numarası :

Tarih :

İmza :