



**T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**MULTİPLE MYELOMALI HASTALARDA NOS3 ve
TNF ALFA GEN POLİMORFİZMLERİNİN
KLİNİK PARAMETRELERLE İLİŞKİSİ VE PROGNOZ
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Cem BASMACI
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Mustafa PEHLİVAN**

Ocak-2010

**T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**MULTİPLE MYELOMALI HASTALARDA NOS3 ve
TNF ALFA GEN POLİMORFİZMLERİNİN
KLİNİK PARAMETRELERLE İLİŞKİSİ VE PROGNOZ
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Cem BASMACI
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Mustafa PEHLİVAN**

Ocak-2010

**Bu tez, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından TF.09.26 proje
numarası ile desteklenmiştir.**

I. ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleşmesi için gerekli ortamı hazırlayan ve araştırmanın planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarda bana danışmanlık yaparak yardımlarını esirgemeyen tez hocam Doç. Dr. Mustafa Pehlivan'a, İç Hastalıkları AD. Başkanı Prof. Dr. Celalettin Usalan'a, Hematoloji BD. hocalarından Doç. Dr. Vahap Okan ve Doç. Dr. Mehmet Yılmaz'a, İç Hastalıkları AD' da görev yapan tüm hocalarıma, tezimin laboratuvar çalışmalarında uygun ortamı hazırlayan ve laboratuvar çalışmalarımı tamamlayan Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD. öğretim üyesi Doç. Dr. Sacide Pehlivan'a, Uz. Biyolog Tuğçe Sever'e, Selin Büdeyri'ye, iyi ve kötü günleri paylaştığım çalışma arkadaşlarıma, ihtisasım boyunca beni her zaman destekleyen ve yanımda olan aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Dr. Cem BASMACI

Gaziantep, 2010

II. İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
KISALTMALAR	VI
TABLO LİSTESİ	VII
ŞEKİL LİSTESİ	IX
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tanım	3
2.2. Epidemiyoloji	3
2.3. Etiyoloji	3
2.4. Patogenez	4
2.5. Klinik Özellikler	5
2.5.1. Kemik Tutulumu	5
2.5.2. Böbrek Tutulumu	5
2.5.3. İnfeksiyonlar	5
2.5.4. Hiperkalsemi	6
2.5.5. Kanama ve Anemi	6
2.6. Laboratuvar	6
2.7. Tanı	7
2.7.1. Tanı kriterleri	7
2.8. Evrelendirme ve prognostik faktörler	8
2.9. Tedavi	11

2.10. Tedaviye yanıt	12
2.11. Tümör Nekrozis Faktör alfa	14
2.12. Nitrik Oksit	19
2.12.1. Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz	20
3.MATERYAL ve METOD	23
3.1. Örneklerin Seçimi	23
3.2. Kemik İliği Yayma Preparatları İçin DNA İzolasyonu	23
3.2.1. Gerekli Alet ve Kimyasallar	23
3.2.2. DNA İzolasyonu	24
3.3. Tuzla Çöktürme Yöntemi ile DNA İzolasyonu	24
3.3.1. Tuzla Çöktürme Yöntemi ile Kandan DNA İzolasyonu İşleminde Kullanılan Araç ve Kimyasallar	25
3.4. DNA Amplifikasyonu	26
3.4.1. PCR Kimyasal Konsantrasyonları	26
3.5. PCR Amplifikasyonu Sonuçlarının Görüntülenmesi ve Değerlendirilmesi	27
3.5.1. Agaroz Jel Elektforezi (Yatay Jel Elektforezi)	27
3.6. DNA'nın Enzimatik Kesim İşlemi	27
3.6.1. DNA'nın Enzimatik Kesim İşleminde Kullanılan Alet ve Enzimler	27
3.6.2. Enzim Kesimi ve Değerlendirilmesi	28
3.7. İstatistikî analiz	29
4.BULGULAR	31
5.TARTIŞMA	41
6. KAYNAKLAR	48

V. ÖZET

MULTİPLE MYELOMALI HASTALARDA NOS3 ve TNF ALFA GEN POLİMORFİZMLERİNİN KLİNİK PARAMETRELERLE İLİŞKİSİ VE PROGNOZ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Dr. Cem BASMACI

Uzmanlık Tezi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mustafa PEHLİVAN

Ocak 2010, 56 sayfa

Bu çalışmada, Multipl Myeloma'lı hastalarda NOS3 (+894, VNTR) ve TNF α (-308, -238 ve -857) gen polimorfizmleri ile klinik parametrelerin ilişkisi ve prognoz üzerindeki etkileri değerlendirildi. Çalışmaya Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Hematoloji Bilim Dalında multipl myeloma tanısı konulan 77 hasta dahil edildi. Kontrol grubu olarak hematolojik malignitesi olmayan sağlıklı 77 kişi alındı. NOS3 (+894) gen polimorfizmi dağılımı GG: 37 (%48.1), GT: 25 (%32.5), TT: 15 (%19.4), NOS3 (VNTR) gen polimorfizmi dağılımı AA: 40 (%51.9), AB: 28 (%36.4), BB: 9 (%11.7), TNF α (-308) gen polimorfizmi dağılımı AA: 0, AG: 18 (%23.4), GG: 59 (%76.6), TNF α (-238) gen polimorfizmi dağılımı AA: 0, AG: 13 (%16.9), GG: 64 (%83.1), TNF α (-857) gen polimorfizmi dağılımı TT: 16 (%20.8), TC: 28 (%36.4), CC: 33 (%42.8) oranlarında tespit edildi. TNF α (-238 ve -857) gen polimorfizmleri ile MM arasında ilişki tespit edilmedi. TNF α (-308) gen polimorfizminde GG genotipi (p=0.012) ile NOS3 (+894) geninde TT genotipinin (p=0.008) MM hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu, NOS3 (VNTR) gen polimorfizminde AA genotipi (p=0.007), NOS3 (+894) gen polimorfizminde GG genotipinin (p=0.004) MM hastalarında kontrol grubuna göre düşük olduğu saptandı.

Sonuç olarak; NOS3 (+894) polimorfizminde TT genotipinin, TNF α (-308) polimorfizminde ise düşük ekspresyonla ilişkili GG genotipinin MM'lı hastalarda yüksek olması bu polimorfizmlerin MM hastalığı etyopatogenezinde rolü olabileceğini göstermektedir. Ayrıca, MM'da TNF α (-238) geninde GG genotipi ilk sıra tedavi seçeneklerinden (OPKHT, bortezomib, talidomid bazlı) etkilenmeksizin erken progresyon ile ilişkili olup total sağkalım sürelerini etkilememektedir.

Anahtar kelimeler: Multipl myeloma, NOS3 (+894, VNTR), TNF α (-308, -238 ve -857)

VI. ABSTRACT

RELATIONS OF CLINICAL PARAMETERS AND EFFECTS ON PROGNOSIS OF GENOMIC POLYMORPHISMS IN NOS3 AND TNF ALPHA IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA

Dr. Cem BASMACI, MD

Residency Thesis, Department on Internal Medicine

Supervisor: Assos. Prof. Mustafa PEHLIVAN

January 2010, 56 pages

In this study, relations of clinic parameters and effects on prognosis of genomic polymorphisms in NOS3 (+894, VNTR) and TNF α (-308, -238 and -857) are assessed in patients with multiple myeloma. Seventy seven patients with multiple myeloma in Haematology department in Internal Medicine of Gaziantep University Hospital are included. Healty 77 people without any heamotological malignancies are included as control group. Distribution of NOS3 (+894) gene polymorpism is GG: 37 (48.1%), GT: 25 (32.5%), TT: 15 (19.4%), distribution of NOS3 (VNTR) gene polymorpism is AA: 40 (51.9%), AB: 28 (36.4%), BB: 9 (11.7%), distribution of TNF α (-308) gene polymorpism is AA: 0, AG: 18 (23.4%), GG: 59 (76.6%), distribution of TNF α (-238) gene polymorphism is AA: 0, AG: 13 (16.9%), GG: 64 (83.1%) and distribution of TNF α (-857) gene polymorphism is TT: 16 (20.8%), TC: 28 (36.4%) CC: 33 (42.8%). No significant relation is found between TNF α (-238 and -857) gene polymorphisms and MM. GG genotype in TNF α (-308) gene polymorphism ($p=0.012$) and TT genotype in NOS3 (+894) gene polymorphisms ($p=0.004$) are significantly increased in patients with MM in comparison with control group. However AA genotype in NOS3 (VNTR) gene polymorphism ($p=0.007$) and GG genotype in NOS3 (+894) gene polymorphisms ($p=0.004$) are significantly decreased in patients with MM incomparison with control group. As a result, TT genotype in NOS (+894) polymorphism and GG genotype in TNF α (-308) polymorphism which related to decreased expression are increased in patients with MM, thus, this may play a role in etiopathogenesis of multiple myeloma. Moreover, GG genotype in TNF α (-238) gene is not affected whatever the first-line therapy (OPKHT, bortozomibe, thalidomide) is, but related with early progression not affecting total survival.

Key words: Multipl myeloma, NOS3 (+894, VNTR), TNF α (-308, -238 ve -857)

VII. KISALTMALAR

IPI	: International prognostic index
ISS	: International staging system
IG F-1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
IL-6	: İnterlökin-6
Ig	: İmmün globülin
MM	: Multipl Myelom
NF-κβ	: Nükleer faktör κβ
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
NOS3	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi
TNFα	: Tümör nekrozis faktör α
VEGF	: Vasküler endoteliyal büyüme faktörü
VAD	: Vinkristin adriamisin deksametazon
MP	: Melfelan prednizolon
OPKHT	: Otolog periferik kök hücre transplantasyonu
BODEC	: Bortezomib deksametazon siklofosamid
TD	: Talidomid deksametazon
ECOG	: Eastern Cooperative Oncology Group
HWE	: Hardy Weinberg Eşitsizliği

VIII. TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. MGUS, asemptomatik ve semptomatik myelom IMVG tanı kriteri

Tablo 2. MM tanısı için WHO tanı kriterleri

Tablo 3. MM evrelendirme (Durie ve Salmon evreleme sistemi)

Tablo 4. Remisyon kriterleri

Tablo 5. NOS3 (+894, VNTR) ve TNF α (-308, -238 ve -857) polimorfizmi analizinde kullanılan bölgelere ait dizi, amplifikasyon ve kesim koşulları

Tablo 6. MM hastalarının klinik özellikleri ve tedavi rejimleri

Tablo 7. NOS3 (+894 ve VNTR) gen polimorfizmlerine ait sonuçların MM hastaları ve sağlıklı kontroller ile karşılaştırılması

Tablo 8. NOS3 (+894 ve VNTR) gen polimorfizmlerine ait sonuçların MM hastaları ve sağlıklı kontroller ile Hardy-Weinberg eşitsizliği ile karşılaştırılması

Tablo 9. TNF α (-308, -238 ve -857) gen polimorfizmlerine ait sonuçların MM hastaları ve sağlıklı kontroller ile karşılaştırılması

Tablo 10. TNF α (-308, -238 ve -857) gen polimorfizmlerine ait sonuçların MM hastaları ve sağlıklı kontroller ile Hardy-Weinberg eşitsizliği ile karşılaştırılması

Tablo 11. MM'lı hastalarda prognostik faktörler ile NOS3 (+894, VNTR) ve TNF α (-308, -238 ve -857) gen polimorfizmlerinin total sağkalım ve olaysız sağkalım üzerine etkisi (Tek değişkenli analiz/ Logrank test)

Tablo 12. MM'lı 66 hastanın çok değişkenli analizi (Cox proportional hazard model backward)

Tablo 13. MM'lı hastalardaki NOS3 (+894, VNTR) ve TNF α (-308, -238 ve -857) gen polimorfizminin başlangıç tedavisine yanıt ile karşılaştırılması

Tablo 14. OPKHT tedavisi uygulanan MM'lı hastalarda NOS3 (+894, VNTR) ve TNF α (-308, -238 ve -857) gen polimorfizmlerinin sağkalım üzerine etkisi (Tek değişkenli analiz/ Logrank test)

Tablo 15. Talidomid tedavisi uygulanan MM'lı hastalarda NOS3 (+894, VNTR) ve TNF α (-308, -238 ve -857) gen polimorfizmlerinin sağkalım üzerine etkisi (Tek değişkenli analiz/ Logrank test)

Tablo 16. Bortezomib tedavisi uygulanan MM'lı hastalarda NOS3 (+894, VNTR) ve TNF α (-308, -238 ve -857) gen polimorfizmlerinin sağkalım üzerine etkisi (Tek değişkenli analiz/ Logrank test)

IX.ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. TNF α 'nın MM patofizyolojisindeki rolü

Şekil 2. 6. kromozom ve MHC lokusu (6p21.3)

Şekil 3. TNF α geninin intron ve ekzonları

Şekil 4. TNF α 'nın karsinogenez üzerine etkileri

Şekil 5. NOS3 Geni ve Çalışılan Polimorfizm Bölgeleri

Şekil 6. NOS3 (+894) gen polimorfizmine ait jel görüntüsü

Şekil 7. NOS3 (VNTR) gen polimorfizmine ait jel görüntüsü

Şekil 8. TNF α -308 gen polimorfizmine ait jel görüntüsü

Şekil 9. TNF α -238 gen polimorfizmine ait jel görüntüsü

Şekil 10. TNF α -857 gen polimorfizmine ait jel görüntüsü

Şekil 11. MM hastalarının total ve olaysız sağkalımı

Şekil 12. MM'lı hastaların IPI evrelemesi ile total sağkalım arasındaki ilişki

Şekil 13. MM'lı hastaların trombosit sayısı ile total sağkalım arasındaki ilişki

Şekil 14. MM'lı hastalardaki TNF α (-238) allelleri ile olaysız sağkalım arasındaki ilişki

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Multipl myelom (MM) kemik iliğinde malign plazma hücrelerinin birikimi ve aşırı miktarda monoklonal protein sentezinin görüldüğü B hücreli lenfoproliferatif bir hastalıktır. Kemik iliği mikroçevresi ile tümör hücreleri arasındaki etkileşimler sıklıkla kemik yıkımıyla sonuçlanır. Tümörün kendisi, ürünleri ve konak yanıtı MM için karakteristik olan kemik ağrısı, renal yetmezlik, enfeksiyon yatkınlığı, anemi ve hiperkalsemi gibi geniş semptom ve organ disfonksiyonlarına neden olur. Tanı anında ortalama yaş 66'dır (1).

Hastalık rutin taramalar sırasında tesadüfen saptanabilirse de genellikle enfeksiyonlar, kemik yakınmaları veya renal yetmezlikle başvuran hastalarda belirlenebilir. Myelom hücreleri soliter plazmositom veya önemi bilinmeyen monoklonal gammopati (MGUS) denilen serumda izole monoklonal paraprotein varlığıyla karakterli bir premyelomatöz durumdan gelişebilir. Hastaların çoğu tanı sırasında tedavi gerektirecek şekilde semptomatiktir. Son 10 yılda MM tedavisinde büyük değişiklikler olmuş ve standart tedavi destek tedavisinin yanı sıra infüzyonel kemoterapi kürlerini takiben genç hastalarda yüksek doz melfalan ile otolog periferik kök hücre transplantasyonu (OPKHT) yapılmaktadır. Altmış beş yaşının altındaki hastaların ortalama sağkalım olasılığı kemik iliği transplantasyonu 2 katına çıkarmış olup, %50 tam morfolojik ve biyokimyasal remisyon elde edilebilmektedir (1).

Tümör nekrozis faktör alfa (TNF α) enflamasyonun ana sitokindir. Dokuların yıkım ve tamirinde (doku şekillenmesi) etkilidir. Enflamasyon bölgesindeki hastalıklı hücrelerin ölümünün uyarılması sırasında TNF α fibroblast büyümesini ve anjiyogenik faktörleride uyarır (2). Aynı şekilde malign dokularda bulunan yüksek miktardaki TNF α , selektif olarak tümör anjiyogenezisini baskılar. Fakat bu sitokin uzun süreli üretildiğinde, endojen tümör destekleyicisi gibi davranabilir, tümör büyümesi ve yayılımı için gerekli doku şekillenmesine ve stromal gelişiminde katkıda bulunabilir. TNF α geni 6. kromozomda MHC lokusunda 6p21.3 bölgesinde yer alır.

Nitrik oksit (NO), nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından L.arginin aminoasidinin oksidasyonu ile sentez edilir (3,4). NO sentezine aracı olan NOS enziminin nöronal (nNOS), endotelyal (eNOS) ve immunolojik (iNOS) olmak üzere üç izoformu vardır (3). Endotel hücrelerinde eNOS aktivitesi sonucu üretilen NO, endotel tabakası altındaki düz kas dokusuna difüzyon ile ulaşır ve gevşemeye yol açarak vasküler tonus ile kardiyovasküler hemoastazın düzenlenmesinde önemli rol oynar (5). eNOS geni kromozom 7q 35-36'da bulunur ve 21 kb'lık 26 ekson içerir (6). Bu gende meydana gelecek bir varyasyon NO sentezinin azalmasına yol açar ve devamında bir hastalık gelişebilir (3).

TNF α ve NOS3 genine ait polimorfizmlerin MM gelişmesinde, takibinde ve tedavisinde önemli etkilerinin olduğu, hastalığın prognozu ile doğrudan ilişkili olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur. MM'da etyolojik ve prognostik faktörlerin iyi belirlenmesi hastalığın patogenezinin aydınlanmasına ve en uygun tedavi rejimlerinin seçimine yardım ederek hastaların yaşam sürelerini arttırmaya katkı sağlayabilmektedir.

Bu çalışmanın amacı; Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Kliniğinde takip ve tedavi edilen hastaların NOS3 (+894, VNTR) ve TNF α (-308, -238 ve -857) gen polimorfizmlerinin sağlıklı ve MM hastaları arasında bir farklılığın olup olmadığını belirlemek ve hastalara ait klinik parametrelerle (cinsiyet, yaş, evre A/B, ECOG, LDH, CRP, başlangıç tedavisi, başlangıç tedavisine cevap) karşılaştırarak tedavi ve prognoz üzerine bir etkilerinin olup olmadığını belirlemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tanım

MM genellikle monoklonal immünglobulin veya immünglobulin parçası üreten tek bir plazma hücresi ve plazmasitoid hücre klonunun neoplastik proliferasyonu ile karakterize bir hastalıktır. Bu plazma hücre proliferasyonu genellikle osteopeni, osteolitik lezyonlar ile yaygın iskelet hasarı, hiperkalsemi, anemi ve bazen farklı organ ve dokularda plazma hücresi infiltrasyonuna neden olur. M proteininin fazla miktarda üretilmesi tekrarlayan bakteriyel enfeksiyonlar, renal yetmezlik ve nadiren hiperviskozite sendromuna yol açabilir. İlk kez 1844'te Solly ve ardından 1850'de MacIntyre tarafından tanımlanmışsa da 1889'da Kahler bir olgu tanımlayana kadar seyrek olarak tanınmıştır (1). Kahler aslında kendinden neredeyse 50 yıl önce Henry Bence Jones tarafından tanımlanmış olan idrar proteinini tanımış ve bu bulguyu klinik sendromla korele etmiştir. 1890'da plazma hücresinin bulunmasını takiben 1900'de multiple myelom kemik iliğindeki plazmositozla ilişkilendirilmiştir. Serum ve idrar protein elektroforezi ilk olarak 1939'da yapılabilmış ve bunu 1953'te immünoelektroforez izlemiştir (7,8).

2.2. Epidemiyoloji

MM ABD'deki tüm malign hastalıkların yaklaşık %1'ini ve hematolojik malignitelerin yaklaşık %10'unu oluşturur (9). Erkeklerde kadınlardan biraz daha sık ve zencilerde beyazların iki katı sıklıkta görülür. Bir seride tanıda ortanca yaş 66 (20-92 arası) olarak saptanmıştır (10). Başka bir seride 5, 10 ve 20 yıllık sağkalımlar sırasıyla %31,%10 ve %4 olarak bildirilmiştir (9).

2.3. Etiyoloji

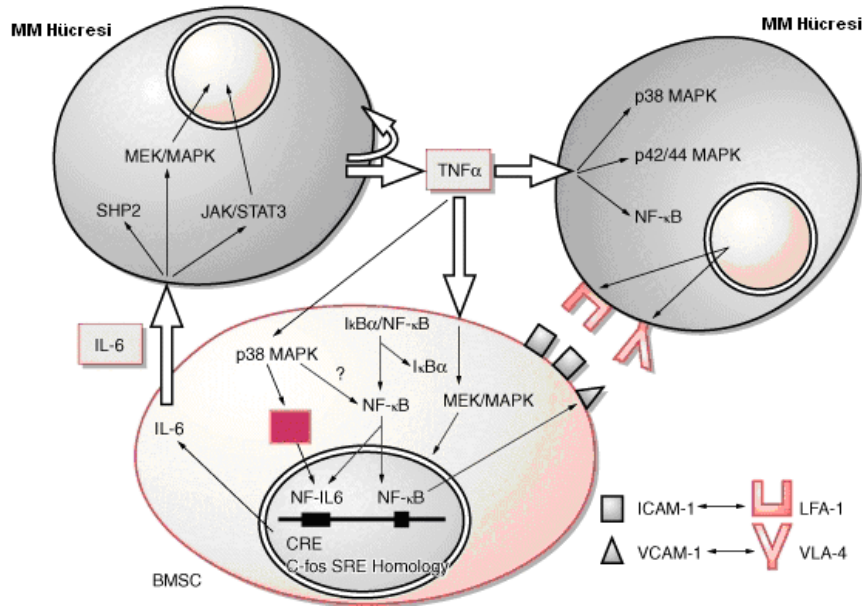
MM nedeni tam olarak bilinmemektedir. Radyasyon, benzen ve diğer organik çözücülere maruziyetin veya böcek ilaçlarının rolü olabileceğini bildiren çalışmalar mevcuttur. Örneğin 50 raddan fazla radyasyona maruz kalan atom bombası kurbanlarında (11) uzun dönem yüksek doz radyasyona maruz kalan radyologlarda, nükleer santrallerin

yakınlarında yaşayanlarda değil ama nükleer santrallerde çalışanlarda ve böcek ilacı kullanan çiftçilerde multipl myelom riskinde artış gözlenmiştir. Fakat bu olguların sayıları az olduğundan veriler çok ikna edici değildir (12). Genetik faktörlerin rolü kesin değildir. Çoğu aynı monoklonal paterne sahip MM kümelenmesi olan aileler bildirilmiştir (13).

2.4. Patogenez

MM gelişiminde birçok sistem bozukluğunun rol aldığı düşünülmektedir. Sinyal ileti sistemi, apoptoz, kemik iliği mikroçevresi ve hücre siklusu bunlar arasındadır. Malign plazma hücreleri oluşumunda hücre siklusunda yer alan gen ekspresyon bozuklukları rol almaktadır (14).

Myelom hücreleri, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), tümör nekrozis faktör α (TNF α) ve az miktarda IL-6 salgırlar (Şekil 1). IGF-1 myelom hücrelerinin yaşamında, proliferasyonunda ve ilaç direncinde rol oynar. VEGF tümör hücrelerinin büyüme, migrasyonunda ve angiogenezinde rol alırken, TNF α ise Nükleer faktör $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$)'yı aktive ederek myelom hücrelerinin yaşam sürelerini arttırır (15). MM'da gerek sitokinler aracılığı ile gerekse genetik faktörlerin rol oynaması sonucu apoptotik kontrol bozukluğu meydana gelebilir. Apoptozis bozukluğunda MM patogenezinde ve tedaviye direnç te kritik öneminin olduğu belirtilmektedir (16).



Şekil 1. TNF α 'nın MM patofizyolojisindeki rolü

2.5. Klinik Özellikler

Özellikle sırt ve göğüste kemik ağrısı tanı anında hastaların yaklaşık %60'ında bulunur. Halsizlik sıktır (%32) ve sıklıkla anemi ile ilişkilidir. Kilo kaybı hastaların %24 ünde mevcuttur. Hastalarda myelom komplikasyonlarına ait hiperkalsemi, renal yetmezlik veya amiloidozla ilişkili yakınmalar da olabilir (14).

2.5.1. Kemik Tutulumu

MM' nin en sık belirtisi osteolizise bağlı kemik kaybı ile ilişkilidir. Tanı aşamasında bile hastaların yaklaşık %75'de yaygın osteoporoz veya tümöral tutulum nedeni ile patolojik durumlar görülür (17). Kemik ağrıları en sık bulunan semptom olup ve olguların yaklaşık %75'inde görülür. Ağrı ise sık olarak, sırt, bel ve göğüs bölgelerinde olup ve hareketle şiddeti artar. Osteoklastik aktivite artışı lokal osteolitik alanlar oluşturur. Bu osteolitik lezyonlar daha sık olarak kafa, pelvis, kostalar ve vertebralar gibi yassı kemiklerde görülür (10). MM'da osteoklastik aktivite artışı plazma hücreleri ve stromal hücrelerden açığa çıkan birçok sitokin ile meydana gelmektedir. Bu sitokinlerden özellikle NF- κ B preosteoklastların farklılaşmasına, oluşmasına ve yaşam sürelerinin uzamasına neden olarak kemik yıkımını arttırmaktadır (18).

2.5.2. Böbrek Tutulumu

Tanıda hastaların neredeyse yarısında serum kreatinini yüksektir ve yaklaşık %20'sinde 2 mg/dl'nin üzerindedir. Renal yetmezlik myelomun başlangıç görüntüsü olabilir. Renal yetmezliğin iki major nedeni myelom böbreği (cast nefropatisi olarak ta bilinir) ve hiperkalsemidir. Cast nefropatisi ana olarak distal ve toplayıcı tübüllerde presipite olmuş monoklonal hafif zincirlerden oluşan geniş, mumsu, katmanlı cast'lerin varlığı ile karakterizedir. Dipstick idrar tetkiki protein için negatiftir. Ayrıca bazı farklı renal hastalık türleri de myelomda görülebilir. Bunlar primer amiloidoz ve hafif zincir depolanma hastalığıdır. Kontrast madde sonrası akut böbrek yetmezliği ve hafif zincirlerin proksimal tübül disfonksiyonuna neden olması ile Fanconi sendromu da bunların arasında sayılabilir (10,19).

2.5.3. Enfeksiyonlar

İnfeksiyon, MM'da mortaliteyi ve morbiditeyi etkileyen major komplikasyondur (20). MM'da ölümlerin en sık (yaklaşık %50) nedenidir (21). İnfeksiyona eğilimi artıran en önemli faktör, normal immunglobulin (Ig) sentezinde azalma, Ig katabolizmasında artış ve bozulmuş

antikor üretimidir. Ayrıca böbrek yetmezliği ve kemoterapi MM hastalarında infeksiyon gelişimine katkıda bulunur (20,22,23).

2.5.4. Hiperkalsemi

Myelom hastalarında hiperkalsemi genel olarak tümörün indüklediği kemik destrüksiyonudur. Bu primer olarak malign plazma hücreleri ve stromal hücrelerce salgılanan potent sitokinlere bağlı oluşan osteoklastik kemik rezorpsiyonu sonucu oluşur ve bu sitokinlerde en önemlileri, receptor activator of nuclear factor – $\kappa\beta$ ligand (RANKL), macrophage inflammatuar protein (MIP)-1 α ve tümör nekrozis faktör alfa (TNF α)'dır (24).

2.5.5. Kanama ve Anemi

Ciddi kanama bulguları, myelomlu hastalarda nadirdir. Ancak, terminal dönem hastalarda artmış kemik iliği plazma hücresi infiltrasyonuna bağlı olarak ağır trombositopeni ve aşırı yüksek M proteinine bağlı hiperviskosite sonucu mukozal kanamalar gelişebilmektedir. Trombositopeni, hastalığın erken döneminde kemik iliğinin şiddetli tutulumunda bile nadirdir (25). Anemi patogenezinde eritropoetine azalmış cevap, azalmış eritrosit yaşam süresi ve azalmış demir kullanılabilirliği anemi patogenezine katkıda bulunur. Tanı sırasında olguların 2/3'ünde normokrom normositer anemi bulunurken, olguların ancak %20'sinde anemi ile ilişkili semptomlar ön plandadır. Etyolojide ayrıca plazma hücre infiltrasyonu, böbrek yetersizliği varlığında eritropoetin salınımında yetersizlik ve TNF- α ve IL-1 gibi sitokinlerin varlığı suçlanmaktadır (26).

2.6. Laboratuvar

Normokrom normositer bir anemi (Hb<12gr/dl) tanıda hastaların %78'inde varken hastalık seyrinde herhangi bir zamanda %97 hastada görülür. Rulo formasyonu hastaların yarısından fazlasında bulunurken eritrosit sedimentasyon hızı %84 hastada >20 mm/saat, üçte birinde >100 mm/saat'tir. Lökopeni (beyaz küre sayısı <4000/mm³) %29, trombositopeni (trombosit <100.000/mm³) %5 hastada görülür (10).

MM en önemli tanısal bulgu monoklonal bir M proteininin serum ve idrarda gösterilmesidir (%97 hastada). Bir seride serum protein elektroforezinde lokalize band veya pik %82 hastada, idrar immünfiksasyonda M proteini yaklaşık %75 hastada gözlenmiştir (10). Yine aynı seride serumda M ptoteinleri %51 Ig G, %21 IgA, %16 hafif zincir, %2 IgD, %2 biklonal, %0.5 IgM ve %7 nonsekretuar olarak saptanmıştır. Myelomda Kappa hafif zincir

lambda'ya göre 2 kat daha sık görülür. İlgili olmayan immünglobulinlerin (örneğin IgG myelom için A ve M) düzeylerinde düşme %91 hastada görülür. Renal yetmezlik insidansı yalnızca hafif zincir sekrete eden myelomda diğer alt gruplara göre artmış iken, nonsekretuar myelomda hafif zincir olmadığı için myelom böbreği de görülmez (10).

MM tanısı tipik olarak kemik iliği incelemesiyle doğrulanır. Kemik iliği tutulumu diffüzen ziyade fokal de olabilir ve bu nedenle bazı hastalara tekrar veya multiple alanlardan kemik iliği aspirasyon ve biopsisi gerekebilir. Plazma hücrelerindeki monoklonal immünglobulinin immünperoksidaz boyama ile tanımlanması otoimmün hastalıklar, metastatik karsinom, AIDS, karaciğer hastalığı veya enfeksiyonlara bağlı reaktif plazmositozdan ayırma önemlidir (27).

2.7. Tanı

MM tanısından sıklıkla aşağıda belirtilen klinik prezentasyonlar nedeniyle şüphelenilir (1):

- Kemik ağrısı ile çekilen grafilerde saptanan litik lezyonlar
- Artmış serum total protein konsantrasyonu ve/veya idrar ve serumda monoklonal protein varlığı
- Açıklanamayan anemi gibi malignite düşündüren sistemik belirti ve bulgular
- Semptomatik veya insidental olarak bulunan hiperkalsemi
- Akut böbrek yetmezliği

2.7.1. Tanı kriterleri

Uluslararası Myelom Çalışma Grubu semptomatik MM tanısı için aşağıdaki 3 basitleştirilmiş kriter üzerinde uzlaşmıştır (27) (Tablo 1).

Tablo 1. MM için International Myeloma Working Group (IMWG) kriterleri**Multipl Myeloma (3 kriter de tutmalı)**

1. Serum veya idrarda monoklonal protein varlığı
2. Kemik iliğinde klonal plazma hücrelerinin varlığı veya plazmositom*
3. Plazma hücre diskrazisiyle ilişkili olduğu düşünülen uç organ hasarı:
 - a. Hiperkalsemi
 - b. Litik kemik lezyonları
 - c. Anemi
 - d. Renal yetmezlik

Asemptomatik (smoldering) multiple myelom (SMM, her iki kriter de tutmalı)

1. Serum monoklonal protein düzeyi ≥ 3 g/dL ve/veya kemik iliği plazma hücreleri $\geq \%10$
2. Uç organ hasarı yok

Önemi bilinmeyen monoklonal gammopati (MGUS, 3 kriterin tümü)

1. Serum monoklonal protein düzeyi <3 g/dL
2. Kemik iliği plazma hücresi $<\%10$
3. Plazma hücre diskrazisi veya B hücreli lenfoproliferatif hastalıkla ilişkili uç organ hasarı yok

*Yüzde belirtilmemiş. Hastaların %5'inde %10'dan az olabilir, fokal tutulum olabilir, en iyi MR veya PET ile gösterilebilir.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kriterleri yukarıdaki IMWG kriterlerinden biraz farklıdır (Tablo 2);

Tablo 2. MM tanısı için WHO kriterleri

Majör kriterler
1. Kemik iliği plazma hücresi >%30
2. Biopside plazmositom
3. Serum veya idrarda monoklonal protein(M komponent) varlığı
Serum IgG >3.5 g/dL, veya
Serum IgA >2 g/dL, veya
İdrar Bence-Jones proteini >1g/24 saat
Minör kriterler
a. Kemik iliği plazma hücreleri %10-30 arası
b. Yukarıda belirtilen miktarlardan daha düşük monoklonal protein konsantrasyonları
c. Litik kemik lezyonlarının varlığı
d. Normal immünglobülin düzeylerinde normalin %50'sine kadar olan azalma
IgG <600 mg/dL, veya
IgA <100 mg/dL, veya
IgM <50 mg/dL

Tanı için: 1 majör+1 minör kriter veya a ve b'nin mutlaka dahil olduğu 3 minör kriter. Bu kriterler semptomatik, progresif hastalığı olan hastalarda bulunmalıdır.

2.8. Evrelendirme ve Prognostik faktörler

Evrelendirme prognoz, uzun dönem sağkalımı özellikle tedaviye yaklaşımı belirlemede temel oluşturmaktadır. Tablo 3'de evrelendirme özetlenmiştir.

Tablo 3. MM evrelendirmesi (Durie-Salmon evreleme sistemi) (10)

<p>Evre-I</p> <p>Aşağıda tanımlananların hepsi;</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hemoglobin > 10 gr/dl • Normal kalsiyum düzeyi (< 12 mg/dl) • Normal kemik grafileri veya soliter kemik plazmasitomu veya sadece osteoporoz varlığı • Düşük M komponent (IgG < 5gr/dl, IgA < 3gr/dl, idrar hafif zincir M komponenti < 4 gr/dl) <p>Evre-II</p> <p>Bulgular evre I.dekiler kadar düşük ve evre III.teki kadar yüksek değil</p> <p>Evre-III</p> <p>Aşağıda tanımlananlardan bir veya daha fazlasının varlığı</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hemoglobin < 8.5 gr/dl • Serum kalsiyum > 12 mg/dl • İlerlemiş litik kemik lezyonu, 3 veya daha fazla • Artmış M komponent varlığı <p>IgG > 7 gr/dl IgA > 5 gr/dl Elektroforezde idrar hafif zincir M komponenti >12gr/dl/24 h</p> <p>Alt sınıflandırma</p> <ul style="list-style-type: none"> • A= relatif olarak normal böbrek fonksiyonları • B= anormal böbrek fonksiyon testleri (serum kreatinin > 2 mg/dl)

Durie Salmon evreleme sistemine ek olarak MM hastalarının b2 mikroglobulin ve albümin düzeylerine göre yapılmış uluslar arası evreleme sistemi (International staging system-ISS=International prognostic index-IPI) de kullanılmaktadır. Bu evreleme sistemine göre;

Evre I: b2 mikroglobulin < 3.5 mg/L ve serum albumini \geq 3.5 g/dL

Evre II: Evre I veya III'e uymayanlar

Evre III: b2 mikroglobulin \geq 5.5 mg/L olarak tespit edilmiştir.

ISS, MGUS ve SMM'u multiple myelomdan ayırtmaya yaramaz. Bu nedenle MGUS veya SMM'da değeri yoktur. Durie-Salmon evrelemesinin aksine ISS tümör yükünün güvenilir bir göstergesi değildir. Fakat ISS'in de prognostik önemi vardır. ISS evre I için median sağkalım 62, II için 44, III için 29 aydır.

1027 hastalık bir seride sağkalım için kötü prognostik faktörler (10):

Performans statusu ECOG 3 veya 4

Serum albümini <3 g/dl

Serum kreatinini ≥ 2 mg/dl

Trombosit sayısı <150.000/ μ l

Yaş ≥ 70

Beta-2-mikroglobulin >4mg/l

Plazma hücre işaretleme indeksi ≥ 1

Kalsiyum ≥ 11 mg/dl

Hb <10g/dl

Kemik iliğinde plazma hücre yüzdesi ≥ 50 olarak bulunmuştur.

2.9. Tedavi

Multipl myeloma'da agresif tedavi yaklaşımları olmasına rağmen, halen kür elde edilebilmiş bir hastalık değildir. Bununla birlikte uygun tedavi ile hastaların yaşam süresi ve kalitesi artmaktadır. MM'da tedavi; spesifik antitümör tedavi ile birlikte, böbrek yetmezliği, kemik ağrıları, kırık, anemi, enfeksiyon ve hiperviskozite gibi komplikasyonların destek tedavisinden oluşmaktadır (14).

Oral melfalan, MM tedavisine 50 yıl kadar önce girmiş ve o zamandan beri prednisolonla kombine halde bazı (özellikle yaşlı) hastaların standart tedavisi olmuştur. Yanıt oranı %40-60'tır. Hiçbir hastada tam remisyon sağlanamaz ve ortanca sağkalım 24-30 aydır. Vincristin ve adriamisin'in sürekli infüzyonları dahil çeşitli kombinasyon kemoterapi rejimleri geliştirilmiştir. Fakat melfalan-prednisolon (MP)'a sağkalım üstünlüğü gösterilememiştir. Yirmiyedi randomize çalışmadaki 6633 hastayı içeren bir meta-analizde kombinasyon kemoterapisi MP ile karşılaştırılmıştır. Yanıt oranları kombinasyon tedavisiyle daha yüksek bulunmakla beraber (%60'a karşılık %53, $p < 0.0001$) sağkalım süreleri arasında fark saptanmamıştır. Tek başına deksametazon da %43'lük yanıt oranı ve VAD'a benzer sağkalım süresi ile hızlı yanıt sağlayabilir (28).

Pratikte 65 yaşın altındaki hastalara standart tedavi indüksiyon tedavisini takiben periferik kan kök hücre transplantasyonu ile yüksek doz melfalan'dır (200 mg/m²). Kök hücre transplantasyonu öncesi; hızlı yanıt elde edilmesi nedeniyle vinkristin, adriablastin, deksametazon (VAD) sıklıkla remisyon indüksiyonunda kullanılır. OPKHT ile tedavi ilişkili mortalite %10'un altındadır. Artık bu prosedür renal yetmezlikli veya 65 yaşın üzerindeki hastalar için de genişletilmektedir. OPKHT ile çeşitli çalışmalarda %21-44 arası tam yanıt oranları; 41-84 ay arası ortanca total sağkalım ve 21-42 ay arası ortanca olaysız sağkalım süreleri elde edilmiştir (29). Uygun hastalarda indirgenmiş doz (RIC) allogeneik periferik kök hücre transplantasyonu (APKHT) yapılabilmektedir. OPKHT/APKHT yapılan hastalarda en uzun yaşam süreleri elde edildiği bildirilmektedir.

MM'un biyolojisinin daha iyi anlaşılmaya başlanması hastalık patogenezinde kritik rol oynayan, myelom hücresi ve kemik iliği mikroçevresini hedef alan talidomid, lenalidomid ve bortezomib gibi biyolojik tedavilerin geliştirilmesinin önünü açmıştır. Bu tedavilerin kullanıma girmesinden önce relaps veya refrakter hastalarda ortanca total sağkalım en fazla 4-6 ay idi (1).

Talidomid ve analogları kemik iliğindeki artmış mikrodamar dansitesini hedefler. Tek ajan olarak relaps veya refrakter MM hastalarında %37'lik bir yanıt oranı ve 2 yıllık %60 total sağkalım oranı elde edilmiştir (30). Yeni tanı hastalarda da tek ajan olarak %36; deksametazonla kombine olarak %72'lik yanıt oranı (%16 CR) elde edilmiştir (30).

Talidomid analogu lenalidomid relaps ve refrakter hastalarda %38'lik toplam yanıt oranına (%6 CR) ve %47 hastada hastalık stabilizasyonuna ulaştırmıştır (31).

Proteazom inhibitörü bortezomib ile relaps veya refrakter myelom hastalarında faz 2 çalışmalarda %4'ü CR; %6'sı near CR olmak üzere %35'lik toplam yanıt oranına ulaşılmıştır (32). Faz 3 çalışmalarında tek ajan olarak %38'lik toplam yanıt oranı oluşturmuştur (%18 CR veya nCR). Ortanca total sağkalım 16.6 ay bulunmuştur (33). Talidomid ve/veya lenalidomid, bortezomib, siklofosfamid, melfelan ve deksametazon içeren üçlü ve dörtlü tedavi rejimleri ile OPKHT ye eşdeğer yaşam süreleri elde edildiği son çalışmalarda bildirilmektedir.

2.10. Tedaviye Yanıt

Tümör yanıtının değerlendirilmesi serum M protein ve/veya idrar hafif zincir ekskresyonundaki değişikliklere dayanarak yapılır.

Ek olarak klinik yanıt yeni hiçbir myelom ilişkili organ veya doku hasarının gelişmemesini gerektirir. Uluslararası myelom çalışma grubunun yanıt kriterleri Tablo 4'te verilmiştir (34).

Tablo 4. Uluslararası myelom çalışma grubu tedavi yanıt kriterleri

Yanıt kategorisi	Yanıt kriterleri ¹
Sıkı tam yanıt(sCR)	Tam yanıt'a ek olarak normal serbest hafif zincir oranı ve immünohistokimya veya immüno Floresanda ² kemik iliğinde klonal hücrelerin yokluğu ³
Tam yanıt(CR)	Serum ve idrar immüno fiksasyon negatif ve yumuşak doku plazmositomlarında kaybolma ve kemik iliğinde \leq %5 plazma hücresi
Çok iyi kısmi yanıt(VGPR)	Elektroforez negatif ancak immüno fiksasyonda saptanabilen serum ve idrar M proteini veya serum M proteininde \geq %90 azalma ve idrar M protein düzeyi <100 mg/24 saat
Kısmi yanıt(PR)	Serum M proteininde \geq %50 azalma ve idrar M proteininde \geq %90 azalma veya <200 mg/24 saat düzeyine düşme. Serum-idrar M proteinleri ölçülemezse etkilenen ve etkilenmeyen serbest hafif zincir düzey farkında \geq %50 azalma veya bunlar da ölçülemiyorsa kemik iliği plazma hücresinde \geq %50 azalma.
Stabil hastalık	CR,VGPR,PR veya progresif hastalık kriterlerine uymayanlar
Progresif hastalık	Serum veya idrar M komponentinde \geq %25 artış. Yeni kemik lezyonları veya yumuşak doku plazmositomları ortaya çıkması veya varolan plazmositom boyutlarında artışı; başka nedene bağlanamayan hiperkalsemi (düzeltilmiş serum kalsiyum>11,5 mg/dl) gelişmesi
Klinik relaps	Yeni yumuşak doku plazmositomları veya kemik lezyonların ortaya çıkışı; varolan litik lezyonlarda veya plazmositomlarda artış, hiperkalsemi (>11,5 mg/dl), hemoglobinde \geq 2 g/dl düşüş, serum kreatinininde \geq 2 mg/dl yükselme
CR'dan relaps	Serum veya idrar M proteininin immüno fiksasyon veya elektroforezde tekrar saptanması; kemik iliğinde \geq %5 plazma hücresi; diğer progresyon bulgularının ortaya çıkması

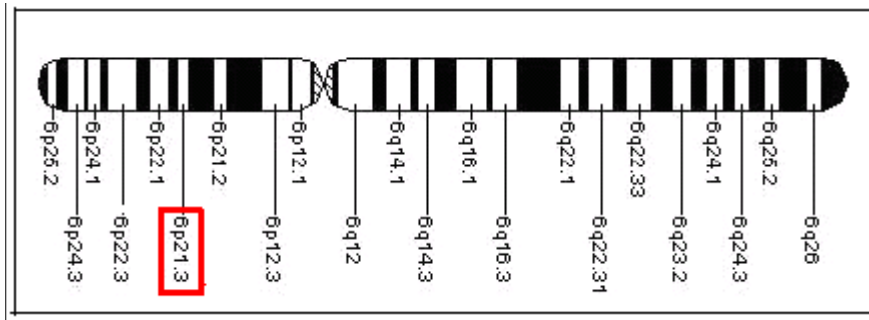
¹: Tüm yanıt veya relaps kategorileri yeni tedavi başlanmasından önce yapılmış iki ardışık değerlendirmeyi gerektirir.

²: Klonal hücrelerin varlığı/yokluğu kappa/lambda oranına dayanır. Anormal kappa/lambda oranı analiz için minimum 100 plazma hücresi gerektirir. Anormal oran >4:1 veya <1:2 dir.

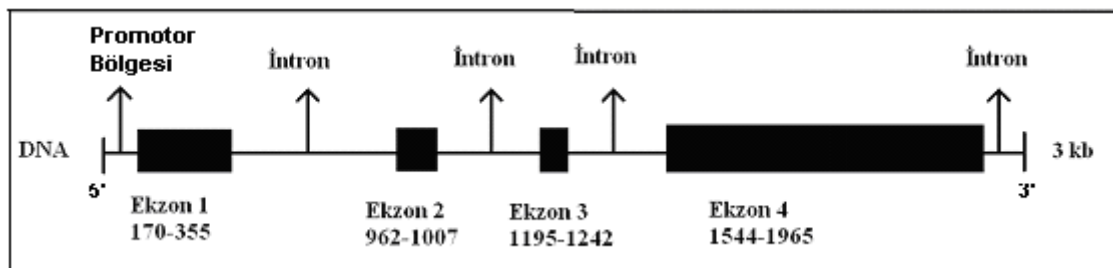
³: Tekrar kemik iliği yapılarak doğrulama gerekli değildir.

2.11. Tümör Nekrozis Faktör alfa (TNF α)

TNF α (diğer isimleri kaşektin, lenfotoksin) ilk olarak 1975 yılında tanımlanmış bir sitokindir. Bu sitokin çeşitli tümörlerde hemorajik nekroza yol açtığından bu ismi almıştır. İnsan TNF α geni 6. kromozomda MHC lokusunda 6p21.3 bölgesinde yer alır (Şekil 2,3). TNF α başta 212 aminoasit uzunluğunda stabil homotrimer yapısında tip II transmembran proteini olarak üretilir. Membranda bulunan protein, metalloproteaz TNF α dönüştürücü (converting) enzimin (TACE) proteolitik yıkımı ile çözünür homotrimerik sitokin dolaşıma salınır. 17 kD' luk TNF α protomerleri ise iki antiparalel beta pileli tabaka ve antiparalel beta zincirden oluşur (35).



Şekil 2. 6. kromozom ve MHC lokusu (6p21.3)



Şekil 3. TNF α geninin intron ve ekzonları

TNF α ; TNF reseptör ailesine ait olan iki tip hücre yüzey reseptörüne yüksek afinite ile bağlanır; TNF R1 ve TNF R2. TNF R1 birçok dokuda bulunur, membrana bağlı ve çözünür trimer yapıda olan TNF α ile aktive olur, TNF R2 ise sadece immün sistemde bulunur ve membrana bağlı TNF α homotrimere yanıt verir (36).

TNF α , gram negatif bakteri ve diğer enfeksiyöz mikroorganizmalara karşı üretilen temel medyatördür. İnflamasyon ve apoptozisde rol oynayan TNF α , makrofaj/monosit, nötrofil, aktive T hücreleri, NK (Natural killer), endotel hücreleri ve mast hücreleri tarafından üretilmektedir. TNF α kan akımını ve vasküler endotel hücrelerinin adhezyon molekül ekspresyonunu arttırarak nötrofil ve monositlerin inflamasyon sahasına göçünü ve makrofaj hücrelerin kemokin (IL1 gibi) salgılamasını sağlar. Ciddi enfeksiyonlarda TNF α yüksek miktarda üretilir ve sistemik klinik ve patolojik anormalliklerle seyreder. Hipotalamus üzerindeki etkisiyle ateş, karaciğerden akut faz protein yapımı, kas ve yağ dokusunda katabolik aktivite artışına yol açar. Yüksek konsantrasyonda kanda trombozise yol açar, miyokard kasılmasını azaltır, vasküler genişlemeye yol açar ve kan basıncını düşürür. Bakteriyel lipopolisakkarit (LPS) uyarımı sonrası makrofajlar tarafından salgılanan yüksek konsantrasyondaki TNF α , düşük kan basıncı, dissemine intravasküler koagülasyon ve metabolik bozukluk ile karakterize septik şok tablosuna yol açar. TNF α 'nın birçok otoimmün ve inflamatuvar hastalıkta rol oynadığı bilinmektedir.

TNF α , hücre yüzeyinde bulunan reseptörlerine bağlanması ile hücre içinde yer alan çok sayıda sinyal ileti mekanizmasını tetikler ve sonuçta apoptoz, nekroz, anjiyogenez, immün hücre aktivasyonu, diferansiyasyonu ve hücre migrasyonunu uyarır. Bu etkiler tümör gelişiminde ve progresyonunda ve tümöre karşı immün yanıt oluşumunda önemli rol oynar (37).

TNF α 'nın bahsedilen etkilerine aracılık eden önemli sinyal mekanizmaları (37,38);

1. NF- κ B aktivasyonu: Nükleer faktör- κ B (NF- κ B) heterodimer transkripsiyon faktörüdür. Hücre sağ kalımı, proliferasyon, inflamatuvar yanıt ve antiapoptotik faktörlerle ilişkili çeşitli proteinlerin transkripsiyonuna aracılık eder (37).

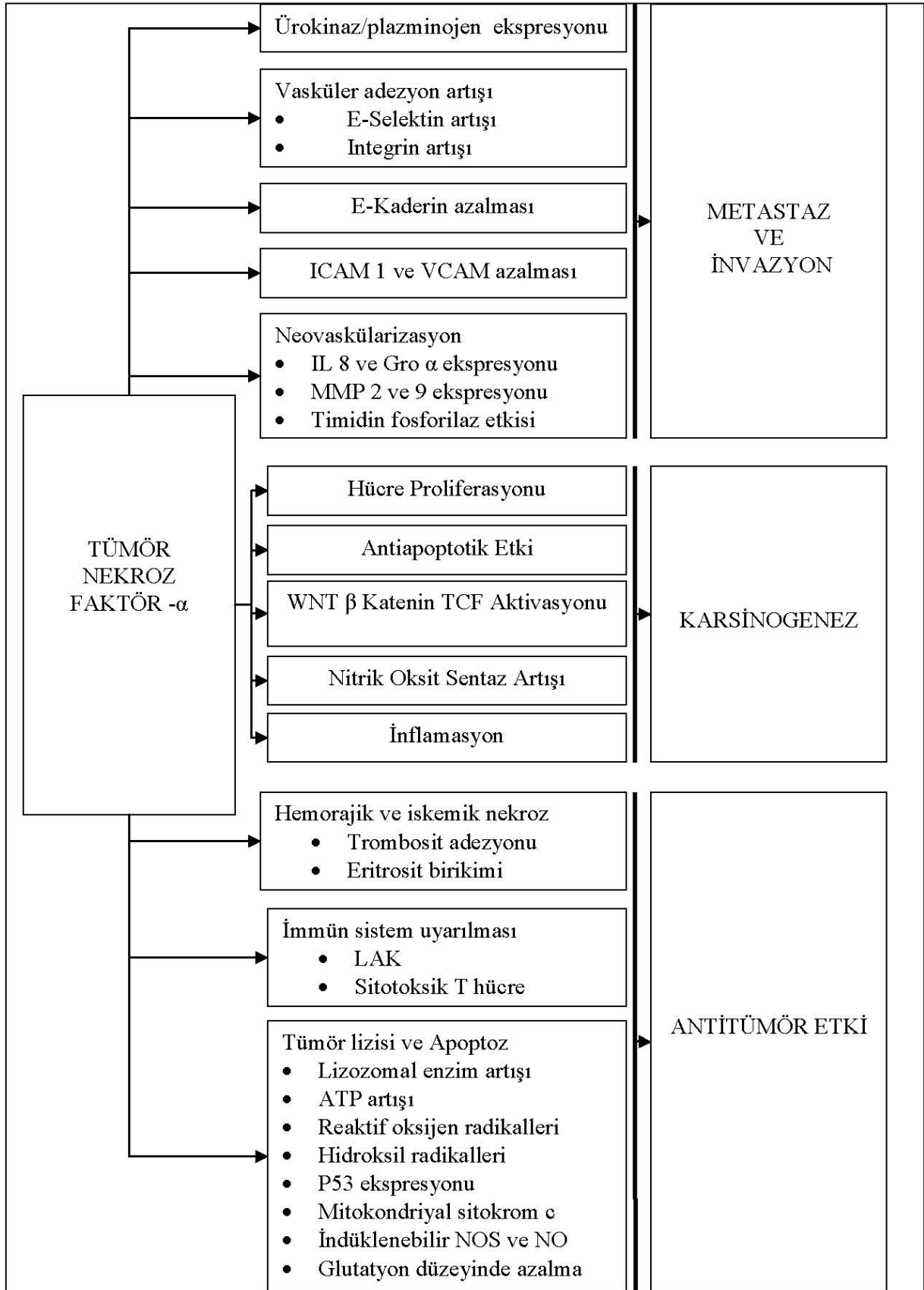
2. MAPK yolunun aktivasyonu: Üç önemli mitogen-activated protein kinase (MAPK) kaskatında; stres ile ilişkili Jun N-terminal kinase (JNK) grubunu güçlü aktive eder, p38 MAPK' de orta derece yanıt oluşturur ve extracellular signal regulated kinaase (ERK)

sisteminde ise minimal aktivasyon yapar. JNK sisteminin aktivasyonu hücre farklılaşmasında, proliferasyonunda rol alır ve genelde proapoptotik etki gösterir (38).

3. Ölüm sinyali oluşturulması; TNF R1 aracılığıyla ölüm sinyali oluşturur fakat diğer antiapoptotik mekanizmalar bu etkinin gerçekleşmesini önler (39).

TNF α etkisiyle neoplastik transformasyon eğilimini azaltan mekanizmalar yanında neoplastik transformasyon eğilimi oluşturan mekanizmalar uyarılır (Şekil 4). Yapılan çalışmaların bir kısmında TNF α 'nın kansere karşı koruyucu etkisi olduğu gösterilmişken diğerlerinde ise kanser gelişim riskini arttırdığı ve progresyonunu hızlandırdığı, metastaz eğilimini arttırdığı belirtilmektedir (36).

Spesifik kanser tiplerinin gelişimi ve progresyonunda TNF α etkisinin (olumlu veya olumsuz) daha kesin bir biçimde belirlenmesi; hastalık gelişme riskini değerlendirmede, hastalığın takibinde, hastalığın progresyonu ile prognozunu öngörmeye ve yeni tedavi alternatiflerinin geliştirilmesinde etkili olabilir.



Şekil 4. TNF α 'nın karsinogenez üzerine etkileri (Kaynak :Waterston A ve ark. TNF and cancer: good or bad? Cancer Therapy 2004;2:131-148. den yararlanılmıştır)

TNF α -308 ve -238 promotor dizi değişikliği beyaz ırkta en sık görülen polimorfizmlerdir. TNF α polimorfizmi ile bir çok hastalık arasındaki ilişki (Alzheimer, şizofreni, parkinson, astım, atopi, kronik obstruktif akciğer hastalığı, organ nakilleri, greft versus host reaksiyonu, metabolik hastalıklar, siroz, ankilozan spondilit, Behçet gibi otoimmün hastalıklar, multipl myelom, septik şok vb) incelenmiş, hastalığa yatkınlığı arttırdığı, ve/veya hastalığın seyrini değiştirdiği gösterilmiştir. Fakat bazı araştırmacılar, bu bölgedeki polimorfizmlerin aslında sessiz olduğunu ve belirli HLA allelleri (HLA-A1, B8, DR3) ile birlikte olduklarında fonksiyonda değişikliğe yol aıtığını savunmaktadırlar (40).

TNF α polimorfizmleri ile hematolojik malignensiler arasında yapılmış birçok çalışmada bu polimorfizmlerin hematolojik malignensilere yatkınlığı attırmadığı yönünde sonuçlar elde edilmişsede yapılan bazı çalışmalarda bu polimorfizmler ve hastalıklar arasında bir ilişkinin olduğu gözlenmiştir. Jevtovic ve ark (41) yaptığı bir çalışmada TNF α -308 GA genotipinin ve A allelinin Non-Hodgkin lenfoma gelişmesine yatkınlığı arttırdığı gözlenmiştir. Wihlborg ve ark (42) yaptığı çalışmada ise 36 Hodgkin lenfomalı ve 49 kronik lenfositik lösemili hastalardaki TNF α -308 promotor bölgesindeki polimorfizmler araştırılmış ve bu polimorfizmin Hodgkin lenfomalı ve konik lenfositik lösemili hastalarda kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı derecede bir sıklığa neden olmadığı gözlenmiştir. Zhao ve ark (43) yaptığı diğer bir çalışmada ise Çinli akut lenfoblastik lösemili 29 hasta ile 72 kontrol grubundaki TNF α -308 polimorfizmi araştırılmış, hasta grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel fark saptanmamıştır. Bu çalışmanın sonucunda TNF α -308 polimorfizminin akut lenfoblastik lösemi patogenezinde, klinik seyrinde ve prognozunda önemli olmadığı tespit edilmiştir. Gyulai ve ark (44) yaptığı diğer bir çalışmada ise 55 myelodisplastik sendromlu hasta ile 74 kontrol grubundaki TNF α -308 polimorfizmi araştırılmış ve bu polimorfizmin myelodisplastik sendrom gelişmesinde katkıda bulunmadığı tespit edilmiştir. Seidemann ve ark (45) yaptığı Almanya Avusturya İsviçre ülkelerinin katıldığı çok merkezli çalışmada ise 488 çocuk ve adölesan Non-Hodgkin lenfomalı hastada TNF α -308 polimorfizmi araştırılmış ve -308 GA genotipinin çocukluk dönemi Burkitt's lenfomalı ve B hücreli lenfoblastik lösemili hastalarda negatif prognostik faktör olduğu gözlenmiştir. Takeuchi ve ark (46) yaptığı diğer bir çalışmada ise 214 çocuk akut lenfoblastik lösemili hastanın TNF haplotipleri ile cinsiyet, lökosit sayısı, santral sinir sistemi tutulumu, immünofenotipi, tedaviye cevabı ve olaysız sağkalımı karşılaştırılmış ve aralarında anlamlı bir ilişki olmadığı tespit edilmiş.

Iokopava ve ark (47) yaptığı çalışmada ise 69 MM hastası ile 102 kontrol grubunda TNF α -308 polimorfizmi hastalık şiddeti ile karşılaştırılmış ve TNF α -308 polimorfizmi ile MM ve klinik varyantları arasında predispozan bir ilişki bulunamamış. Gareth ve ark (48) yaptığı çalışmada ise 181 MM hastası ve 233 kontrol grubunda TNF α genini 5'promotor bölgesindeki -1031, -863, -857, -308 ve -238 tek nükleotid polimorfizmleri karşılaştırılmış ve TNF α -308 promotor bölgesinde A varyantı taşıyan kişilerde MM riskinin açık olarak azaldığı gözlenmiştir.

2.12. Nitrik Oksit (NO)

Nitrik oksit (NO), 1979'da siklik guanozin monofosfat (cGMP) üzerinden etki gösteren potent bir periferik vasküler düz kas gevşetici olarak tanımlanmıştır (49). NO, hücre içi ve hücre dışında düzenleyici işlev gören küçük, reaktif bir serbest radikal moleküldür (49). Birçok hücrel işlem; endotel, trombosit, vasküler düz kas hücreleri, nöronlar ve diğer NO üreten hücrelerden salınan NO tarafından düzenlenmekte ve birçok dokuda sentezlenmektedir. NO, endojen L-argininden Nitrik Oksit Sentaz (NOS) enzim sistemi tarafından sentezlenir ve işlev sonrasında hızlı ve kararlı bir şekilde okside edilerek inaktif bileşikler olan nitrit ve nitrat gibi son ürünlere dönüşür. Hemoglobine NO'yu inaktive eder. NO'nun en önemli fizyolojik hedefi, çözünebilir guanilat siklaz (sGC) enziminin hem grubudur. Düz kas hücresine geçen NO, guanilat siklazı uyararak, guanozin trifosfatın cGMP'ye dönüşümünü sağlar. Artan cGMP de protein kinazı ve iyon kanallarını aktif hale getirir. Sekestrasyon ve hücre dışına çıkarılma yolu ile hücre içi kalsiyum azalır ve gevşeme sağlanır. cGMP'nin fizyolojik etkisi 3'5' bağının fosfodiesteraz enzimi tarafından hidrolize edilmesi ile sonlandırılır. NOS'un nöronal (nNOS veya NOS-1), indüklenebilir (iNOS veya NOS-2), endotelial (eNOS veya NOS-3) olmak üzere 3 farklı formu vardır. Endotelial ve nöronal sürekli bulunan, iNOS ise uyarıya bağlı olarak yapılan NOS'tur (49,50).

Vücutta NO konsantrasyonu düzenli olarak düşük seviyelerde olup ve eNOS ve nNOS tarafından kontrol edilir (51). Bu iki enzimin sentezi posttranskripsiyonel seviyede kontrol edilirken, iNOS uygun uyarı veya NF κ B gibi transkripsiyonel faktörlere cevap olarak sentezlenir (49). Bu sentezi tetikleyen, NF κ B'ye yanıt veren elemanların iNOS promotor gen bölgesini aktive etmesidir (49). Enfeksiyon, enflamasyon veya vasküler travma durumlarında diğer iki NOS formunun ürettiğinin 100-1000 katı kadar daha fazla NO üretir. Ayrıca iNOS, kalsiyum ve uyarıcı ajanlardan bağımsız çalıştığı için, aktivitesi daha uzundur. Bunlara bağlı olarak, iNOS'un ürettiği NO seviyesi, fizyolojik sınırların üstündedir. Bu durum, hücrel

süperoksit anyon (O_2^-) varlığında ileri derecede toksik olan peroksinitrit molekülünün oluşmasına neden olur. Bunun sonucunda da lipid peroksidasyonu, DNA fragmentasyonu, plazma antioksidanlarının azalması, protein hasarı ve endotelial düz kas gevşemesinin engellenmesi gibi nedenlerle hücrel hasar oluşabilir. Peroksinitrit oluşumu; süperoksit ile süperoksit dismutaz (SOD) üretimi ve NO üretimi/harcanması arasındaki dengeye bağlıdır. Sonuç olarak, düşük konsantrasyondaki NO, hücrel fonksiyonları pozitif olarak düzenlerken, yüksek konsantrasyonlarda hücre üzerinde toksik etkiler yaratabilir (51,52).

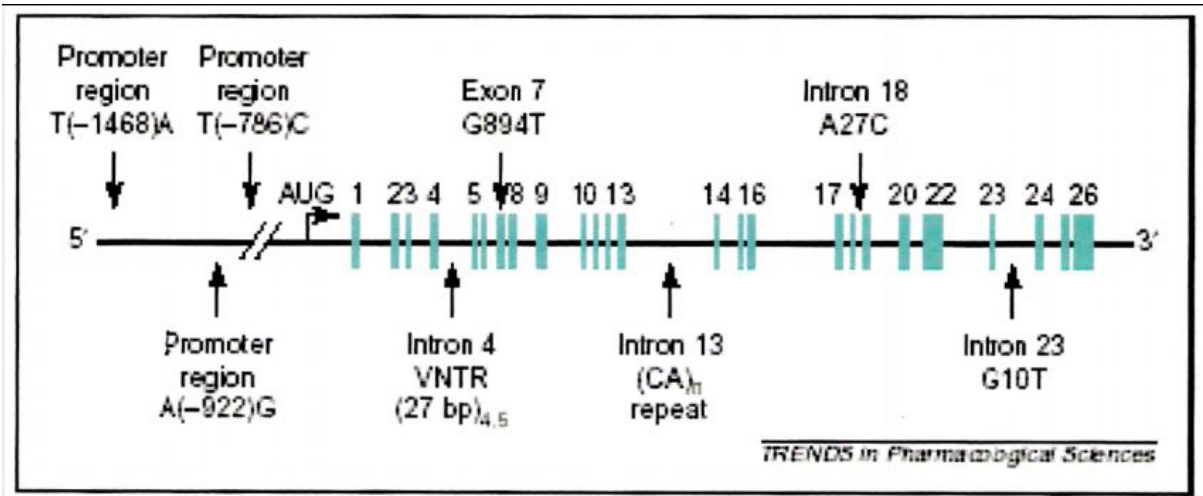
Ayrıca NO' in anjiogenezdede önemli etkileri olduğu gözlenmiştir. Anjiogenezde en önemli rol oynayan faktörlerden biri VEGF 'tir . Güçlü bir eNOS ve iNOS indükleyicisi olan VEGF'in anjiogenezdeki etkilerine NO'nun aracılık ettiği ortaya konmuştur. Anjiogenez, mevcut kan damarlarından yeni kapillerlerin gelişmesi olarak tanımlanır. Anjiogenez yara iyileşmesi, fertilizasyondan sonra plasenta gelişmesi ve menstruasyondan sonra uterus iç tabakasının yenilenmesi gibi fizyolojik olaylarda son derece önemlidir. Proanjiogenik ve antianjiogenik faktörler arasındaki denge bozulduğunda anjiogenez kontrol edilemez. Artrit, kronik inflamasyon, çeşitli bağırsak hastalıkları, psöriazis gibi inflamatuvar hastalıklarda; meme, mesane, kolon, akciğer, nöroblastom, melanom, böbrek, pankreas, uterus, serviks, glioblastom gibi kanser türlerinde ve yaşla ilişkili maküler dejenerasyon, proliferatif retinopati gibi oftalmolojik rahatsızlıklarda anjiyogenez patolojik bir rol üstlenmektedir (53).

2.12.1 Endotelial Nitrik Oksit Sentaz (NOS3)

Endotelial nitrik oksit sentaz geni 7 q 32-7 q terminal bölgesinde yer alır. NOS3 geni 26 ekson içerir ve yaklaşık olarak 21 kilobazlık genomik DNA'dan oluşur. NOS3 geninin kodladığı mRNA 4052 nükleotid içerir ve haploid genomda tek kopya olarak bulunur (54). Aynı tür organizmalar genellikle birbirinden farklı fenotip gösterirler. Bir çok gen lokusunda iki allel yer alır. Mutasyonların fenotipe farklı yansımalarının nedeni çoklu allel varlığındandır. Genetik polimorfizm, bir populasyonda farklı allellere bağlı, genetik olarak belirlenmiş iki ya da daha çok alternatif fenotipin görülmesidir. Çoklu allel içeren bir bölge polimorfiktir. Bir gen veya DNA dizisinin alternatif formlarından (allel) birinin toplumda %1'den fazla bulunduğu durumlar polimorfizm olarak adlandırılmaktadır. NOS3 geninde bugüne kadar tanımlanmış olan yaklaşık 161 tek nükleotid polimorfizmi (TNP) bulunmasına rağmen fonksiyonel önemi olan polimorfizmler (Şekil 5) şunlardır:

- a) İtron 4, 27 bp'lik variable number tandem repeat (VNTR) (4b/4a)
- b) Ekson 7, missense Glu298Asp (+894)
- c) İtron 13, CA repeat
- d) İtron 18, Ala27Cys (A-C nukleotid değişimi, TNP)
- e) İtron 23, Gly10Thr (G-T nukleotid değişimi, TNP)
- f) Promotor bölgesinde 3 tane TNP tanımlanmıştır. Thr786Cys, Ala922Gly, Thr1468Ala (13).

Bunların sonucunda normal fonksiyonel bir enzim oluşsa da polimorfizmler transkripsiyon işlev ve hızlarında değişime sebep olabilmektedir. Orneğin intron 13'de polimorfizmi olan bireylerde artmış koroner arter hastalığı riski olduğu, intron 4'de polimorfizmi olan bireylerde ise artmış diyabetik nefropati riski olduğu saptanmıştır (55,56).



şekil 5. NOS3 Geni ve çalışılan Polimorfizm Bölgeleri

Otoimmün hastalıkların NOS3 gen polimorfizmi ile ilişkili olduğuna dair çalışmalar vardır. Sistemik lupus eritematozus tanılı olgularda yapılan bir çalışmada NOS3 gen polimorfizm varlığının SLE ve otoimmün hastalıklara yatkınlığı arttırdığı belirlenmiştir (57).

Romatoid artrit ve SLE tanılı olgularda yapılan geniş popülasyonlu bir çalışmada ise NOS3 gen polimorfizmin varlığının hastalığa bağlı gelişen glomerulonefrit oluşumunu belirgin arttırdığı gösterilerek NOS3 gen polimorfizmin varlığının hastalığın seyrinde olumsuz etkilerinin bulunduğu belirtilmiştir (58).

NOS3 gen polimorfizmleri ile çeşitli hastalıklar arasında ilişki olup olmadığı farklı hastalık gruplarında çalışılmıştır. NOS3 geni +894 polimorfizmi; kronik glomerulonefrit, diyabet, hipertansiyon, polikistik böbrek hastalığı, interstisyel nefrit gibi renal hastalıklar sonucu son dönem böbrek yetmezliği gelişen ve hemodiyalize giren hastalarda kontrol grubuna göre belirgin yüksek bulunmuştur. Bu çalışmalarda +894 polimorfizminin kötü prognoz göstergesi olduğu, son dönem böbrek yetmezliği için bir risk oluşturduğu ve olası bir prognostik faktör olduğu gösterilmiştir (59-61).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Örneklerin Seçimi

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Şahinbey Hastanesi Hematoloji kliniğinde Multiple Myeloma (MM) tanısı konan 77 hasta çalışmaya alındı. MM tanısı klinik bulgular, kemik iliği aspirasyon ve biyopsisi, serum ve idrar immünoelektroforezi, serum protein elektroforezi ile konuldu. Yetmiş yedi sağlıklı kontrol grubundan oluşan bireylerden, kontrol grubu için EDTA'lı tüplere kan örnekleri alındı. Hasta grubu için kan örneklerinden ve ulaşılamayan hastalardan kemik iliği yayma preparatlarından DNA'ları izole edildi. Bu çalışma Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Etik Kurulu 04.09.2009 tarih ve 09-2009/2 sayılı numaralı onayı alınarak yapıldı.

3.2. Kemik iliği Yayma Preparatları İçin DNA İzolasyonu

3.2.1. Gerekli Alet ve Kimyasallar

- İnvitrogen Pure Link (Katolog No: K1820-01)
- Fitreli tüpler
- Receiver tüpleri
- Eppendorf tüpleri
- Proteinaz K
- Lysis Buffer A
- Binding Buffer B6
- Wash Buffer I
- Wash Buffer II
- Elution Buffer D
- Etanol (%95-99)
- Otomatik pipetler (1-100 µl ve 1-1000 µl)
- Steril pipet uçları
- 1.5 ml Eppendorf tüp
- Santrifüj
- Su banyosu

3.2.2. DNA İzolasyonu

Hasta grubundan kemik iliği yayma preparatları steril olarak kazınarak 1,5 ml'lik ependorf tüplere pipet yardımıyla alındı. Üzerine 200 µl Lysis Buffer A ve 20 µl Proteinaz K ilave edildi. Kısa süreli vorteksle karıştırma işlemi yapıldıktan sonra 56°C'de 10 dakika su banyosunda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası 400 µl Binding Buffer B6 ilave edilip pipet yardımıyla karıştırıldı. Kit içindeki 2.0 ml'lik ependorf taşıyıcı tüplere filtreli tüpler yerleştirildi ve örnekler bu filtreli tüplere transfer edildi. 12.000 rpm'de 2 dakika örnekler santrifüj edildikten sonra alttaki taşıyıcı süpernatantlı tüpler yenileri ile değiştirildi (DNA filtrede) ve üzerine 500 µl Wash Buffer I ilave edildi. 12.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldıktan sonra alttaki taşıyıcı tüplerin içindeki süpernatant atıldı. 800 µl Wash Buffer II ilave edildi ve 12.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Tekrar alttaki taşıyıcı tüpteki süpernatant atıldı, filtredeki etanol'ün tamamen uzaklaşması için 14.000 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında 2.0 ml'lik alttaki taşıyıcı tüp 1.5 ml'lik ependorf tüp ile değiştirildi. 56°C'deki su banyosuna önceden bırakılmış Elution Buffer D'den 200 µl filtrenin tam ortasına gelecek şekilde ilave edildi ve 1 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldıktan sonra, filtreli tüpler atıldı (DNA 1.5ml'lik ependorf tüpte). Ependorf tüplerin kapakları kapatılıp, parafilm ile izole edildikten sonra etiketleme işlemi yapıldı. PCR işlemi yapılan kadar -20°C'de derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.3. Tuzla Çöktürme Yöntemi İle DNA İzolasyonu

1. EDTA'lı tüpte bulunan 2 ml periferik kan 15 ml'lik falkon tüpüne aktarılıp üzerine 1:3 oranında eritrosit lizis tamponu (0.155M NH₄Cl; 10mM KHCO₃; 0.1mM Na₂ EDTA; pH 7.4) eklenir. +4°C'de 20 dakika bekletilip, 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.
2. Örnek santrifüjden alınarak üzerindeki süpernatant atılır. Pellet üzerine 2 ml eritrosit lizis tamponu eklenir. Tekrar 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir ve süpernatant atılır.
3. Pelet üzerine 200 µl %10'luk SDS (Sodium dodecyl sulphate), 20 µl proteinaz K (20mg/ml) ve 1 ml WBL (White Blood-Cell Lysis) tamponu (75mM NaCl; 25 mM Na₂ EDTA; pH 8.0) eklenerek 56°C'de su banyosunda gece boyunca bekletilir.

4. İnkübasyon sonrası üzerine 400 µl Amonyum asetat (9.5 M) eklenip iyice karıştırılır. 20 dakika +4°C ve 4500 rpm’de santrifüj edilir.
5. Süpernatant yeni bir falkon tüpe alınır, pellet atılır. Ayrı tüpe aktarılan supernatantın üzerine -20°C’de beklemekte olan %99’luk etanol’dan 2 ml eklenir ve DNA’nın yüzeyde toplanması sağlanır.
6. Toplanan DNA pipet yardımıyla alınarak, 100 µl %70 etanol içeren bir eppendorf tüpüne aktarılır.
7. Maksimum hızda (13.000 rpm) 10 dakika santrifüj edilerek DNA çöktürülür ve süpernatant atılır.
8. Etüvde kapakların ağzı açık bırakılarak DNA üzerinde kalan alkol uzaklaştırılır.
9. Elde edilen DNA’nın miktarına göre 100–300 µl kadar TE (Tris-EDTA) tamponu (1M Tris-HCl; 0.5M EDTA; pH 8.0) eklenir.
10. 56°C’de 1 saat bekletilerek DNA’nın TE tampon içerisinde iyice çözülmesi sağlanır.
11. Elde edilen stok DNA’lar -20°C saklanır.

3.3.1. Tuzla Çöktürme Yöntemi ile Kandan DNA İzolasyonu İşleminde Kullanılan Araç ve Kimyasallar

1. 15 ml’lik Falkon Tüp
2. EDTA
3. SDS
4. Amonyum Asetat
5. Mezür
6. Erlen
7. Etanol
8. Mikropipetler (1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)
9. Steril sarı ve beyaz pipet uçları
10. 1.5 ml’lik Eppendorf tüpleri
11. Eppendorf tüp taşıyıcıları

12. Vorteks

13. Santrifüj Aleti

14. Su banyosu

15. Steril lateks eldiven

3.4. DNA Amplifikasyonu

3.4.1. PCR Kimyasal Konsantrasyonları

PCR karışımları aşağıdaki gibi hazırlanmıştır (örnek başına):

- ddH₂O : 14.2 mikrolitre
- Buffer : 2.5 mikrolitre (10xTaq Buffer, Fermantes)
- MgCl₂ : 2.5 mikrolitre (25 mM MgCl₂, Fermantes)
- dNTP : 1.5 mikrolitre (10 mM dNTP, Sigmo)
- primer 1 : 0.6 mikrolitre (20 pmol konsantrasyonda)
- primer 2 : 0.6 mikrolitre (20 pmol konsantrasyonda)
- Taq : 0.1 mikrolitre (Taq DNA polymerase, Fermantes)
- DNA : 3 mikrolitre (150-200 ng)

Polimeraz zincir reaksiyonu toplam 25 µl hacimde gerçekleştirildi. NOS3 (+894, VNTR) ve TNFα (-308, -238 ve -857) polimorfizmi analizinde kullanılan bölgelere ait dizi, amplifikasyon ve kesim koşulları (Tablo 5).

Tablo 5. NOS3 (+894, VNTR) ve TNF α (-308, -238 ve -857) polimorfizmi analizinde kullanılan bölgelere ait dizi, amplifikasyon ve kesim koşulları.

Analiz edilen bölge	Primer dizisi	Primer bağlanma sıcaklığı	Kesim enzimi ve koşulları
TNF alfa (-308)	GAG GCA ATA GGT TTT GAG GGC CAT GGG ACA CAC AAG CAT CAA G	56.3 °C ve 30 siklus	NcoI, 37°C ve ON inkübasyon
TNF alfa (-238)	AAA CAG ACC ACA GAC CTG GTC CTC ACA CTC CCC ATC CTC CCG GAT	63.4 °C ve 30 siklus	MspI, 37°C ve ON inkübasyon
TNF alfa (-857)	AAG TCG AGT ATG GGG ACC CCC CGT TAA CCC CAG TGT GTG GCC ATA TCT TCT T	65.8 °C ve 30 siklus	Hinc II, 37°C ve ON inkübasyon
NOS3 (+894)	F:5'CATGAGGCTCAGCCCCAGAAC-3' R:5'AGTCAATCCCTTTGGTGCTCAC-3'	58 °C ve 35 siklus	MboI, 37°C ve ON inkübasyon
NOS3 intron 4 VNTR	F:5'AGGCCCTATGGTAGTGCCCTT-3' R: 5'-TCTCTTAGTGCTGTGGTAC-3'	58 °C ve 35 siklus	-

Amplifikasyon koşullarında hazırlanan karışım daha sonra PCR aletine konularak, istenen TNF α (-308, -238, -857) ve NOS3 (+894, VNTR) gen gölgeleri çoğaltılmıştır.

3.5. PCR Amplifikasyonu Sonuçlarının Görüntülenmesi ve Değerlendirilmesi

3.5.1. Agaroz Jel Elektroforezi (Yatay Jel Elektroforezi)

TNF α (-308, -238, -857) ve NOS3 (+894, VNTR) geni PCR ürünleri amplifikasyonun kontrolü %2.5'lük agaroz jelde yapıldı. NOS3 VNTR polimorfizmi agaroz jel elektrofrezinde yürütülerek analiz edildi (Şekil 7).

3.6. DNA'nın Enzimatik Kesim İşlemi

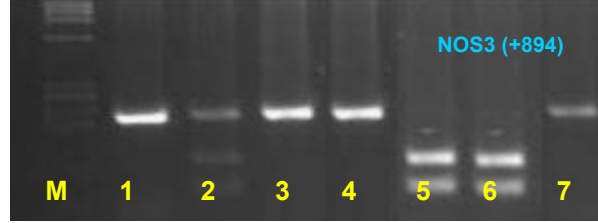
TNF α (-308, -238, -857) ve NOS3 (+894) PCR ürünlerinin agaroz jel elektrofrezinde amplifikasyonun oluşumu kontrol edildikten sonra restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimleri yapıldı (Şekil 6-10).

3.6.1. DNA'nın Enzimatik Kesim İşleminde kullanılan Alet ve Enzimler:

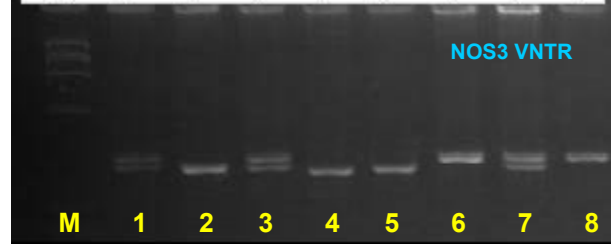
- Su banyosu
- Etüv
- 0.5 ml.'lik eppendorf tüpler
- Pipetler (1-10 μ l. ve 10-100 μ l)
- Steril beyaz ve sarı pipet ucu
- 0.5'lik eppendorf
- Orange G
- Görüntüleme cihazı
- Kesim enzimleri (Resriksiyon endonükleaz enzimleri).

3.6.2. Enzim Kesimi ve Değerlendirilmesi

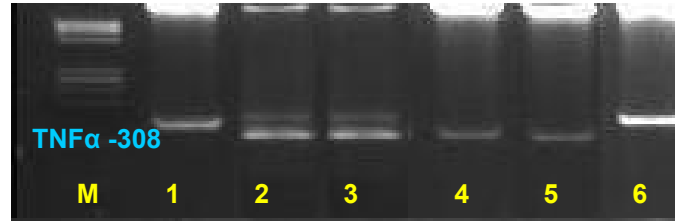
TNF α (-308, -238, -857) ve NOS3 (+894) genlerinin PCR ürünlerinin enzim kesimi olup olmadığı %3.5'luk agaroz jelde kontrol edildi.



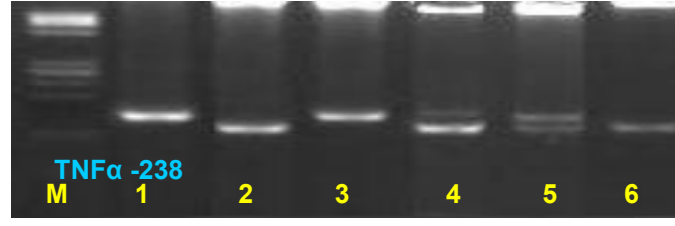
Şekil 6. NOS3 (+894) gen polimorfizmine ait jel görüntüsü M:Marker, 1,3,4,7: GG genotipi, 2: GT genotipi, 5-6: TT genotipi.



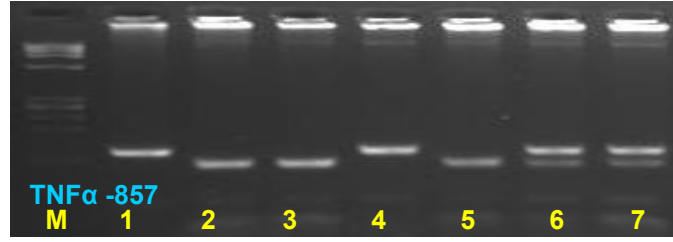
Şekil 7. NOS3 (VNTR) gen polimorfizmine ait jel görüntüsü M:Marker, 6,8:AA genotipi, 1,3,7: AB genotipi, 2,4,5: BB genotipi (27 kb'lık tandem tekrarları).



Şekil 8. TNF α -308 gen polimorfizmine ait jel görüntüsü. M:Marker. 2,3: AG genotipi, 4,5: GG genotipi, 1,6: AA genotipi.



Şekil 9. TNF α -238 gen polimorfizmine ait jel görüntüsü. M:Marker. 4,5: CT genotipi, 2,6: CC genotipi. 1,3: TT genotipi.



Şekil 10. TNF α -857 gen polimorfizmine ait jel görüntüsü. M:Marker: 6,7: AG genotipi, 2,3,5,: G/G genotipi. 1,4: AA genotipi.

3.7. İstatistikî analiz

Çalışma sonuçlarının istatistiksel analizi için SPSS 11.5 paket programı içinde olaysız sağkalım ve total sağkalım ile klinik parametrelerin karşılaştırılmasında Log Rank Test, polimorfizmlerin klinik parametreler ile karşılaştırılmasında pearson Ki-Kare testi kullanıldı. Ayrıca, Logistic regression modeli olan; Odds ratio (OR), %95 confidence interval (CI)'de hesaplandı. OR (%95CI) yaş ve cinsiyete göre ayarlandı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Elde edilen sonuçlar hem kendi içinde hem de klinik parametrelerle (Salmon-Drue ve IPI evrelemesi, Ig Subtipleri, ECOG, trombosit sayısı, LDH ve CRP değerleri, başlangıç tedavisi, başlangıç tedavisine yanıt, 6 yıllık total sağkalım ve 6 yıllık olaysız sağkalım) karşılaştırılarak analiz edildi.

4. BULGULAR

Hastaların klinik özellikleri ve tedavi rejimleri Tablo 6’de görülmektedir. Çalışmaya alınan 77 hastanın 46’sı erkek, 31’i kadın olup medyan yaşı 59 (31–81)’ dur. Kontrol grubuna alınan hematolojik malignitesi olmayan 77 sağlıklı gönüllü kişinin 39’u erkek, 38’i kadın olup medyan yaşı 45 (20–66)’ dir. Hastaların tespit edilen Ig subtipleri; Hafif zincir: 14 (%18), IgA: 15 (%20), IgG: 48 (%62), Kappa: 54 (%70), Lambda: 23 (%30) olarak belirlendi. Salmon-Durie sınıflamasına göre hastaların 12 tanesi evre II (%16), 65 tanesi evre III (%84), 55 tanesi evre A (%71) ve 22 tanesi evre B (%29) idi. International Prognostic Index (IPI) değerlendirmesine göre hastaların 19 tanesi I. (%25), 36 tanesi II. (%46), 22 tanesi III. (%29) evrede yer alıyordu. Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performans skalası 1 den büyük olan hastaların sayısı 32 (%42) idi (Tablo 7). Hastaların ortalama hemoglobin miktarı, lökosit sayısı, trombosit sayısı, CRP, LDH, b2-mikroglobulin ve albumin değerleri sırası ile 9,8 (6.0–14.8) gr/dL, 6500 (1290–17300) μ L, 170 (26–700) $10^3/\mu$ L, 6.25 (2.9–70) mg/dL, 390 (164–2540) IU/L, 4.2 (1.7–27) mg/L, 3.3 (1.6–5.2) gr/L olarak tespit edildi (Tablo 6).

İlk sıra tedaviye yanıt değerlendirmesi yapılan en az 6 aydır yaşamda olan hastalar tedaviye yanıt ve sağkalım anaizine alınmıştır. Bu hastalardan 1. sıra tedavisini alan 60 hasta vinkristin adriamisin deksametazon (VAD) tedavi rejimi, 6 hasta melfelan prednizolon (MP) tedavi rejimi almıştır. 2. sıra tedavi alan hastalardan 18 hasta otolog periferik kök hücre transplantasyonu (OPKHT), 21 hasta bortezomib deksametazon siklofosfamid (BODEC), 15 hasta talidomid deksametazon (TD) tedavi rejimi almıştır. 3. sıra tedavi alan hastalardan ise 8 hasta OPKHT, 15 hasta BODEC, 3 hasta TD tedavi rejimi almıştır. Hastalar ortalama olarak 26.4 (6.1–85.2) ay takip edilmiş, mortalite oranı %32 olarak tespit edilmiştir. MM hastası grubunda olan 77 hastanın TNF α (-308, -238 ve -857), NOS3 (VNTR ve -894) gen polimorfizmleri ile kontrol grubuna ait karşılaştırmalı sonuçlar Tablo 7 ve Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 6. MM hastalarının klinik özellikleri ve tedavi rejimleri

		Multiple Myeloma		Kontrol
		medyan	n ^a (%)	n ^a (%)
Yaş		59 (31-81)		45 (20-66)
Cinsiyet	Kadın/Erkek		31/46 (40/60)	38/39 (49/51)
Ig subtipleri	κ/λ		54/23 (70/30)	
	G/A		48/15 (62/20)	
	Hafif zincir		14 (18)	
Evre (Salmon-Durie)	II/III		12/65 (16/84)	
	A/B		55/22 (71/29)	
IPI	I		19 (25)	
	II/III		36/22 (46/29)	
ECOG	>1		32 (42)	
Hemoglobin	gr/dL	9.8 (6.0-14.8)		
Lökosit	µL	6500 (1290-17300)		
Trombosit	10 ³ /µL	170 (26-700)		
C-reaktive protein	mg/dL	6.25 (2.9-70)		
LDH	IU/L	390 (164-2540)		
b2-mikroglobulin	mg/L	4.2 (1.7-27)		
Albumin	gr/L	3.3 (1.6-5.2)		
Tedavi (n=66)	1. sıra (VAD, MP)		60/6	
	2. sıra (OPKHT/T, BODEC, TD)		18/21/15	
	3. sıra (OPKHT/T, BODEC, TD)		8/15/3	
Mortalite			21 (32)	
Ortalama takip (ay)		26.4 (6.1-85.2)		

n=77; VAD, vinkristin, adriamisin ve deksametazon; MP, melfelan, prednizolon; BODEC, bortezomib, deksametazon, siklofosamid; TD, talidomid, deksametazon; OPKHT, otolog periferik kök hücre transplantasyonu; ECOG, performans durumu ; LDH, laktik dehidrojenaz, IPI; Uluslararası prognostik indeksi

Tablo 7. NOS3 (+894 ve VNTR) gen polimorfizmlerine ait sonuçların MM hastaları ve sağlıklı kontroller ile karşılaştırılması

	Genotip	MM		Sağlıklı Kontrol		OR	%95 CI	P
		n ^a	(%)	n ^a	(%)			
NOS3 (VNTR)	AA	40	(51.9)	57	(74.0)	0.075*	0.011-0.499*	0.007*
	AB	28	(36.4)	18	(23.4)	0.167*	0.024-1.165*	0.071*
	BB	9	(11.7)	2	(2.6)	0.201 [§]	0.042-0.965 [§]	0.056 [§]
NOS3 (+894)	GG	37	(48.1)	51	(66.2)	0.041*	0.005-0.365*	0.004*
	GT	25	(32.5)	25	(32.5)	1.000 [§]	0.509-1.963 [§]	1.000 [§]
	TT	15	(19.4)	1	(1.3)	0.049*	0.005-0.450*	0.008*

^an=77, *OR (%95CI) yaş ve cinsiyetle düzeltilmiş, [§]Fisher's Exact Test.

NOS3 genine ait VNTR polimorfizmi genotiplerinin değerlendirilmesinde AA genotipinin kontrollere göre MM hastalarında anlamlı şekilde düşük olduğu (p=0.007, OR=0.075) tespit edildi (Tablo 7). NOS3 genine ait VNTR polimorfizminde hem hasta grubunda hem de kontrol grubunda Hardy-Weinberg Eşitsizliği (HWE)'den sapma gözlenmedi (Tablo 8).

Tablo 8. NOS3 (+894 ve VNTR) gen polimorfizmlerine ait sonuçların MM hastaları ve sağlıklı kontroller ile Hardy-Weinberg eşitsizliği ile karşılaştırılması

	Genotip	MM		Sağlıklı Kontrol		HWE p	
		<i>n</i> ^a	(%)	<i>n</i> ^b	(%)	<i>n</i> ^a	<i>n</i> ^b
NOS3 (VNTR)	AA	40	(51.9)	57	(74.0)	0.246	0.689
	AB	28	(36.4)	18	(23.4)		
	BB	9	(11.7)	2	(2.6)		
NOS3 (+894)	GG	37	(48.1)	51	(66.2)	0.010	0.281
	GT	25	(32.5)	25	(32.5)		
	TT	15	(19.4)	1	(1.3)		

HWE; Hardy-Weinberg eşitsizliği

NOS3 genine ait (+894) polimorfizmi genotiplerinin değerlendirilmesinde ise, GG genotipinin kontrollere göre MM hastalarında anlamlı şekilde düşük olduğu ($p=0.004$, $OR=0.041$), TT genotipinin ise anlamlı şekilde yüksek olduğu ($p=0.008$, $OR=0.049$) tespit edildi (Tablo 7). NOS3 genine ait (+894) polimorfizminin değerlendirilmesinde hasta grubunda HWE' den sapma gözlenirken, kontrol grubunda sapma gözlenmedi (Tablo 8).

TNF α genine ait (-308) polimorfizmi genotiplerinin değerlendirilmesinde GG genotipinin kontrollere göre MM hastalarında anlamlı şekilde yüksek olduğu ($p=0.012$, $OR=0.368$), TNF α (-238) ve TNF α (-857) polimorfizmlerine ait genotiplerin değerlendirilmesinde ise hem hasta hem kontrol grubunda anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi (Tablo 9).

Tablo 9. TNF α (-308, -238 ve -857) gen polimorfizmlerine ait sonuçların MM hastaları ve sağlıklı kontroller ile karşılaştırılması

	Genotip	MM		Sağlıklı Kontrol		OR	%95 CI	P
		<i>n</i> ^a	(%)	<i>n</i> ^a	(%)			
TNF α (-308)	AA	-	(0)	-	(0)	0.368*	0.169-0.803*	0.012*
	AG	18	(23.4)	35	(45.6)			
	GG	59	(76.6)	42	(54.4)			
TNF α (-238)	AA	-	(0)	-	(0)	0.883*	0.311-2.507*	0.815*
	AG	13	(16.9)	10	(13.0)			
	GG	64	(83.1)	67	(87.0)			
TNF α (-857)	TT	16	(20.8)	11	(14.3)	0.635 [§]	0.274-1.476 [§]	0.387 [§]
	TC	28	(36.4)	25	(32.5)	0.985*	0.349-2.778*	0.977*
	CC	33	(42.8)	41	(53.2)	1.137*	0.407-3.181*	0.806*

^a*n*=77, *OR (%95CI) yaş ve cinsiyetle düzeltilmiş, [§]Fisher's Exact Test.

TNF α genine ait (-308) polimorfizminin değerlendirilmesinde hasta grubunda HWE' den sapma gözlenmez iken, kontrol grubunda sapma gözlemedi. TNF α genine ait (-238) polimorfizminde hem hasta grubunda hem de kontrol grubunda HWE' den sapma gözlenmedi. TNF α genine ait (-857) polimorfizmin ise hem hasta grubunda hem de kontrol grubunda HWE' den sapma gözlemedi (Tablo 10).

Tablo 10. TNF α (-308, -238 ve -857) gen polimorfizmlerine ait sonuçların MM hastaları ve sağlıklı kontroller ile Hardy-Weinberg eşitsizliği ile karşılaştırılması

	Genotip	MM	Sağlıklı Kontrol	HWE p	
		<i>n</i> ^a (%)	<i>n</i> ^b (%)	<i>n</i> ^a	<i>n</i> ^b
TNF α (-308)	AA	- (0)	- (0)	0.245	0.009
	AG	18 (23.4)	35 (45.6)		
	GG	59 (76.6)	42 (54.4)		
TNF α (-238)	AA	- (0)	- (0)	0.418	0.542
	AG	13 (16.9)	10 (13.0)		
	GG	64 (83.1)	67 (87.0)		
TNF α (-857)	TT	16 (20.8)	11 (14.3)	0.038	0.039
	TC	28 (36.4)	25 (32.5)		
	CC	33 (42.8)	41 (53.2)		

HWE; Hardy-Weinberg eşitsizliği

Çalışmaya alınan 66 hastada 6 yıllık toplam sağkalım 65 ay, 6 yıllık olaysız sağkalım 34.5 ay olarak bulunmuştur (Şekil 11). 6 yıllık toplam sağkalımı etkileyen faktörlerden cinsiyet, yaş, evre A/B, ECOG, LDH, CRP, başlangıç tedavisi, başlangıç tedavisine cevap, NOS3 (+894, VNTR) ve TNF α (-308, -238 ve -857) gen polimorfizmleri değerlendirildiğinde istatistiksel bir anlam bulunamamıştır. 6 yıllık total sağkalımı etkileyen faktörlerden Salmon-Durie evre II olan 26 hastada total sağkalımı %84, Salmon-Durie evre III olan 40 hastada ise total sağkalımı 56,3 ay saptandı (p=0.055). IPI' e göre evre I olan 19 hastanın total sağkalımı %70, evre II olan 27 hastanın total sağkalımı %61, evre III olan 20 hastanın total sağkalımı 56.3 ay saptandı (p=0.033) (Şekil 12). ECOG \leq 1 olan 53 hastanın total sağkalımı 73.2 ay, ECOG >1 olan 23 hastanın total sağkalımı 53.2 ay saptandı (p=0.018). Trombosit sayısı < 150 x103/L olan 19 hastanın total sağkalımı 34.1 ay, trombosit sayısı \geq 150 x103/L olan 47 hastanın total sağkalımı 73.2 ay saptandı (p=0.013) (Tablo 11) (Şekil 13).

Tablo 11. MM'lı hastalarda prognostik faktörler ile NOS3 (+894, VNTR) ve TNF α (-308, -238 ve -857) gen polimorfizmlerinin total sağkalım ve olaysız sağkalım üzerine etkisi (Tek değişkenli analiz/ Logrank test)

		n	Medyan TS ay (6 yıl %)	Log Rank p-value	Medyan OS ay (6 yıl %)	Log Rank p-value
		66	65		34.5	
Cinsiyet	<i>Kadın / Erkek</i>	25/41	(56) / 65	0.970	30.1/47.8	0.106
Yaş	<i><65 / ≥65</i>	47/19	65 / 53.2	0.359	30.5/35	0.888
Evre (Salmon-Durie)	<i>II/III</i>	26/40	(84) / 56.3	0.055	33.5/34.5	0.765
	<i>A/B</i>	46/20	67.1 / 65	0.331	38.8/30.5	0.295
IPI (ISS)	<i>I</i>	19	(70)		48.7	
	<i>II</i>	27	(61)		16.8	
	<i>III</i>	20	56.3	0.033	29.7	0.004
Ig subtipleri	<i>κ/λ</i>	46/20	67.1 / 34.1	0.085	34.5/20.6	0.179
	<i>G</i>	39	65		35	
	<i>A</i>	13	67.1		67.1	
	<i>Hafif zincir</i>	14	73.4	0.839	20.6	0.088
ECOG	<i>≤1 / >1</i>	53/13	73.2 / 53.2	0.018	33.5/35	0.872
Trombosit (x103/L)	<i><150 / ≥150</i>	19/47	34.1 / 73.2	0.013	24.6/38.8	0.479
LDH (IU/L)	<i><480 / ≥480</i>	51/14	53.2 / 67.1	0.171	34.5/57.3	0.049
CRP (mg/L)	<i><5 / ≥5</i>	24/39	67.1 / 56.3	0.970	35/33.5	0.464
Başlangıç Tedavisi	<i>VAD + OPKHT</i>	18	73.4		38.8	
	<i>VAD or M + BODEC</i>	20	(62)		23.2	
	<i>VAD or M + TD</i>	15	65	0.178	33.5	0.183
Başlangıç Tedavisine Yanıt	<i>CR</i>	16	73.2		62.7	
	<i>VGPR</i>	10	(89)		34.5	
	<i>PR</i>	21	37.9		24.6	
	<i>SD+PROG</i>	6	56.3	0.055	14.8	0.066
NOS3 (+894)	<i>GG</i>	32	73.2		33.5	
	<i>GT</i>	19	56.3		29.7	
	<i>TT</i>	15	53.2	0.536	48.7	0.975
NOS3 (VNTR)	<i>AA</i>	36	73.2		34.5	
	<i>AB</i>	21	65		30.5	
	<i>BB</i>	9	67.1	0.963	57.3	0.393
TNFα (-308)	<i>AA</i>					
	<i>AG</i>	16	35		30.1	
	<i>GG</i>	50	67.1	0.197	38.8	0.320
TNFα (-238)	<i>AA</i>					
	<i>AG</i>	10	53.2		47.8	
	<i>GG</i>	56	65	0.971	30.1	0.043
TNFα (-857)	<i>TT</i>	13	65		48.7	
	<i>TC</i>	24	67.1		33.5	
	<i>CC</i>	29	73.4	0.830	30.5	0.951

VAD, vinkristin, adriamisin and deksametazon; MP, melfelan, prednizolon; BODEC, bortezomib, deksametazon, siklofosfamid; TD, talidomid, deksametazon; OPKHT, otolog periferik kök hücre transplantasyonu; ECOG, performans durumu ; LDH, laktik dehidrojenaz, IPI; Uluslararası prognostik indeksi = ISS ; International staging system OS; toplam sağkalım, EFS; olaysız sağkalım, CR; tam yanıt, VGPR; çok iyi kısmi yanıt, PR; kısmi yanıt, SD; stabil hastalık, PROG; progresif hastalık

6 yıllık olaysız sağkalımı etkileyen faktörlerden cinsiyet, yaş, evre, ECOG, Ig subtipleri, trombosit sayısı, CRP, başlangıç tedavisi, başlangıç tedavisine cevap, NOS3 (+894, VNTR) ve TNF α (-308 ve -857) gen polimorfizmleri değerlendirildiğinde istatistiksel bir anlam bulunamamıştır. IPI' e göre evre III olan 20 hastanın 6 yıllık olaysız sağkalımı 29.7 ay saptandı (p=0.004). LDH < 480 IU/L olan 5 hastanın 6 yıllık olaysız sağkalımı 34.5 ay, LDH ≥ 480 IU/L olan 14 hastanın 6 yıllık olaysız sağkalımı 57.3 ay saptandı (p=0.049). TNF α (-238) gen polimorfizmi GG genotipi olan 56 hastanın 6 yıllık olaysız sağkalımı 30.1 ay saptandı (p=0.043) (Tablo 11) (Şekil 14).

Değerlendirmeye alınan tek değişkenli analizde 6 yıllık total sağkalımı anlamlı olarak etkileyen evre (Salmon-Durie) II/III, IPI I/II/III, Ig subtipleri κ/λ , ECOG, trombosit sayısı çok değişkenli analizde değerlendirildiğinde (Cox proportional hazard model backward); IPI I/II/III ($p=0.035$, $RR=3.667$) ve trombosit $<150 / \geq 150$ ($p=0.015$, $RR=0.265$) anlamlı olarak kalmıştır (Tablo 12).

Tablo 12. MM' lı 66 hastanın çok değişkenli analizi (Cox proportional hazard model backward)

	TS			OS		
	Exp (B) Relative risk	%95 CI	p	Exp (B) Relative risk	%95 CI	P
Evre (Salmon-Durie) II/III	0.866	0.175-4.294	0.860			
IPI I/II/III	3.667	1.099-12.235	0.035	2.106	0.952-4.656	0.066
Ig subtipleri κ/λ	0.551	0.189-1.604	0.274			
Ig subtipleri G/A/Hafif zincir				0.693	0.231-2.086	0.515
ECOG $\leq 1 / >1$	3.127	0.663-14.755	0.150			
Trombosit ($\times 10^3/L$) $<150 / \geq 150$	0.265	0.091-0.774	0.015			
LDH (IU/L) $<480 / \geq 480$				2.079	0.751-5.758	0.159
TNF α (-238) AG/GG				0.257	0.060-1.090	0.065

OS: olaysız sağkalım, TS: total sağkalım.

Değerlendirmeye alınan tek değişkenli analizde 6 yıllık olaysız sağkalımı anlamlı olarak etkileyen IPI I/II/III, Ig subtipleri G/A/Hafif zincir, LDH (IU/L) $<480 / \geq 480$, TNF α (-238) AG/GG çok değişkenli analizde değerlendirildiğinde (Cox proportional hazard model backward); parametreler istatistiksel anlamını kaybetmiş olmakla birlikte ($p>0.05$) sadece TNF α (-238) ($p=0.065$, $RR=0.257$) anlamlı değere en yakın olarak saptanmıştır.

MM' lı hastalardaki NOS3 (+894, VNTR) ve TNF α (-308, -238 ve -857) gen polimorfizminin başlangıç tedavisine yanıt ile karşılaştırılmasında başlangıç tedavisine yanıtı olmayan 6 hastada TNF α (-238) GG genotipinin %100 olduğu saptandı ancak diğer polimorfizmler ile tedaviye yanıt arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı (Tablo 13).

Tablo 13. MM'lı hastalardaki NOS3 (+894, VNTR) ve TNF α (-308, -238 ve -857) gen polimorfizminin başlangıç tedavisine yanıt ile karşılaştırılması

	Genotype	*Objektif yanıt + n ^a (%)	*Yanıt yok n ^b (%)	OR	%95 CI	P
NOS3 (VNTR)	AA	29 (61.7)	3 (50)	1.611 ^{&}	0.293-8.863 ^{&}	0.671 ^{&}
	AB	14 (29.8)	3 (50)	2.357 ^{&}	0.423-13.138 ^{&}	0.372 ^{&}
	BB	4 (8.5)	0 (0)	1.093 ^{&}	1.002-1.193 ^{&}	1.000 ^{&}
NOS3(+894)	GG	26 (55.3)	2 (33.3)	1.028*	0.070-15.089*	0.984*
	GT	11 (23.4)	3 (50)	3.590*	0.260-49.525*	0.340*
	TT	10 (21.3)	1 (16.3)	0.740 ^{&}	0.077-7.076 ^{&}	1.000 ^{&}
TNF α (-308)	AA					
	AG	10 (21.3)	2 (33.3)			
	GG	37 (78.7)	4 (66.7)	1.577*	0.219-11.372*	0.651*
TNF α (-238)	AA					
	AG	8 (17)	0 (0)			
	GG	39 (83)	6 (100)	1.205 ^{&}	1.059-1.372 ^{&}	0.574 ^{&}
TNF α (-857)	TT	9 (19.1)	3 (50)	0.191*	0.020-1.859*	0.154*
	TC	18 (38.3)	1 (16.7)	0.161*	0.014-1.844*	0.142*
	CC	20 (42.6)	2 (33.3)	1.481 ^{&}	0.247-8.901 ^{&}	1.000 ^{&}

^an=47, ^bn=6, *:OR(95%CI) yaş ve cinsiyet ile düzeltilmiş, [&]Fisher's Exact Test, Objektif yanıt= CR, VGPR, PR, Yanıtsız= SD, Progresif hastalık, *: başlangıç tedavisi

OPKHT tedavisi uygulanan 26 hastanın 6 yıllık total sağkalımı 61.2 ay, 6 yıllık olaysız sağkalımı 28.1 ay tespit edildi. OPKHT tedavisi uygulanan hastalardaki NOS3 (+894, VNTR) ve TNF α (-308, -238 ve -857) polimorfizmlerine ait genotiplerin tek değişkenli analizinde anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi (Tablo 14).

Tablo 14. OPKHT tedavisi uygulanan MM'lı hastalarda NOS3 (+894, VNTR) ve TNF α (-308, -238 ve -857) gen polimorfizmlerinin sağkalım üzerine etkisi (Tek değişkenli analiz/ Logrank test)

		n	Medyan TS ay (6 yıl %)	Log Rank p-value	Medyan OS ay (6 yıl %)	Log Rank p-value
		26	61.2		28.1	
NOS (+894)	GG	14	61.2		35	
	GT	5	26.3		22.2	
	TT	7	(63)	0.165	22.8	0.569
NOS (VNTR)	AA	18	(65)		28.1	
	AB	6	(80)	0.776	35	
	BB	2	(100)		16.8	0.796
TNF α (-308)	AA					
	AG	8	26.3		22.8	
	GG	18	61.2	0.126	28.1	0.724
TNF α (-238)	AA					
	AG	3	22.8		22.8	
	GG	23	61.2	0.472	28.1	0.820
TNF α (-857)	TT	3	(100)		35	
	TC	11	(70)		28.1	
	CC	12	(66)	0.738	22.8	0.951

TS: total sağkalım, OS: olaysız sağkalım

Talidomid tedavisi uygulanan 39 hastanın 6 yıllık total sağkalımı 50.2 ay, 6 yıllık olaysız sağkalımı 23.2 ay tespit edildi. Talidomid tedavisi uygulanan hastalardaki NOS3 (+894, VNTR) ve TNF α (-308, -238 ve -857) polimorfizmlerine ait genotiplerin tek değişkenli analizinde anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi (Tablo 15).

Tablo 15. Talidomid tedavisi uygulanan MM'lı hastalarda NOS3 (+894, VNTR) ve TNF α (-308, -238 ve -857) gen polimorfizmlerinin sağkalım üzerine etkisi (Tek değişkenli analiz/Logrank test)

		n	Medyan TS ay (6 yıl %)	Log Rank p-value	Medyan OS ay (6 yıl %)	Log Rank p-value
		39	50.2		23.2	
NOS (+894)	GG	20	61.2	0.585	23.2	0.620
	GT	11	26.3		22.2	
	TT	8	41.0		36.5	
NOS (VNTR)	AA	23	61.2	0.963	24.4	0.619
	AB	13	50.2		24.4	
	BB	3	(68)		16.8	
TNFα (-308)	AA			0.740		0.979
	AG	8	26.3		22.8	
	GG	31	50.2		24.4	
TNFα (-238)	AA			0.185		0.792
	AG	5	22.8		22.8	
	GG	34	50.2		23.2	
TNFα (-857)	TT	9	41	0.655	24.4	0.370
	TC	15	(52)		23.2	
	CC	15	50.2		22.8	

TS: total sağkalım, OS: olaysız sağkalım

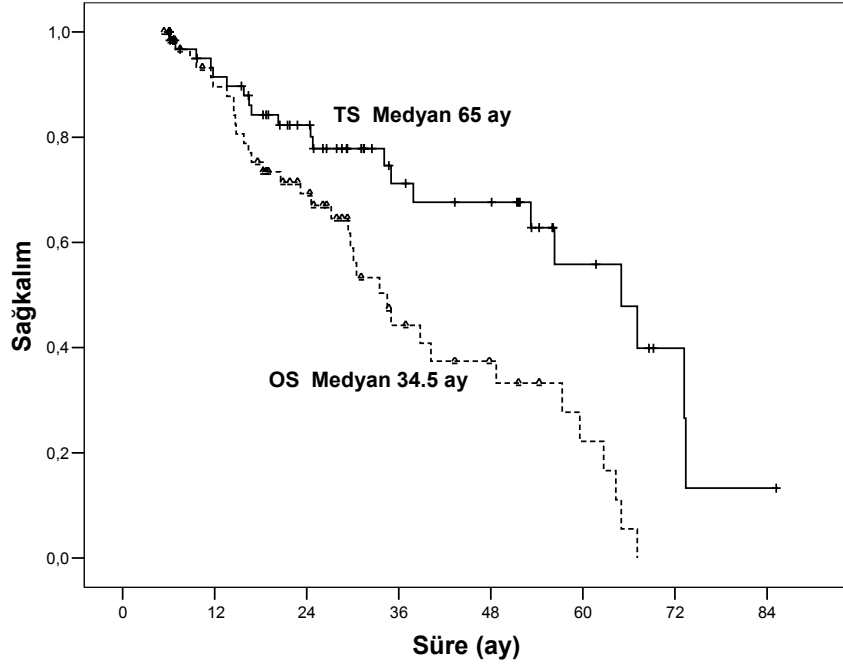
Bortezomib tedavisi uygulanan 32 hastanın 6 yıllık total sağkalımı 50.2 ay, 6 yıllık olaysız sağkalımı 15.5 ay tespit edildi. Bortezomib tedavisi uygulanan hastalardaki NOS3 (+894, VNTR) ve TNF α (-308, -238 ve -857) polimorfizmlerine ait genotiplerin tek değişkenli analizinde anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi (Tablo 16).

Tablo 16. Bortezomib tedavisi uygulanan MM'lı hastalarda NOS3 (+894, VNTR) ve TNF α (-308, -238 ve -857) gen polimorfizmlerinin sağkalım üzerine etkisi (Tek değişkenli analiz/Logrank test)

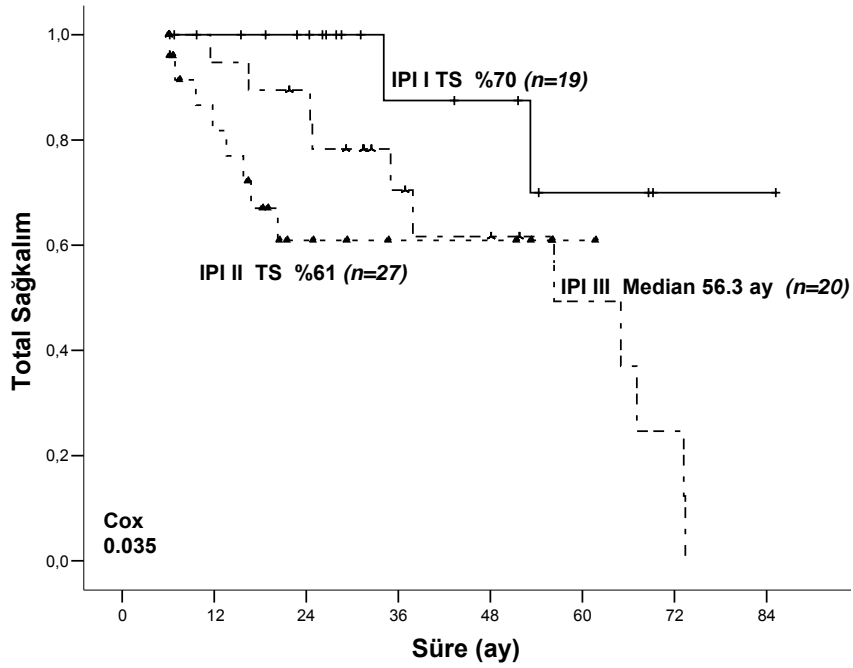
		n	Medyan TS ay (6 yıl %)	Log Rank p-value	Medyan OS ay (6 yıl %)	Log Rank p-value
		32	50.2		15.5	
NOS (+894)	GG	18	(55)	0.096	13.3	0.135
	GT	9	26.6		17.2	
	TT	5	5.3		5.3	
NOS (VNTR)	AA	21	(53)	0.616	13.0	0.429
	AB	11	26.6		17.2	
	BB					
TNFα (-308)	AA			0.541		0.359
	AG	7	(57)		12.3	
	GG	25	26.6		15.5	
TNFα (-238)	AA			0.893	70	0.610
	AG	3	(68)		(68)	
	GG	29	26.6		5.5	
TNFα (-857)	TT	9	(52)	0.836	15.5	0.490
	TC	9	13.3		13.3	
	CC	14	26.6		17.2	

TS: total sağkalım, OS: olaysız sağkalım

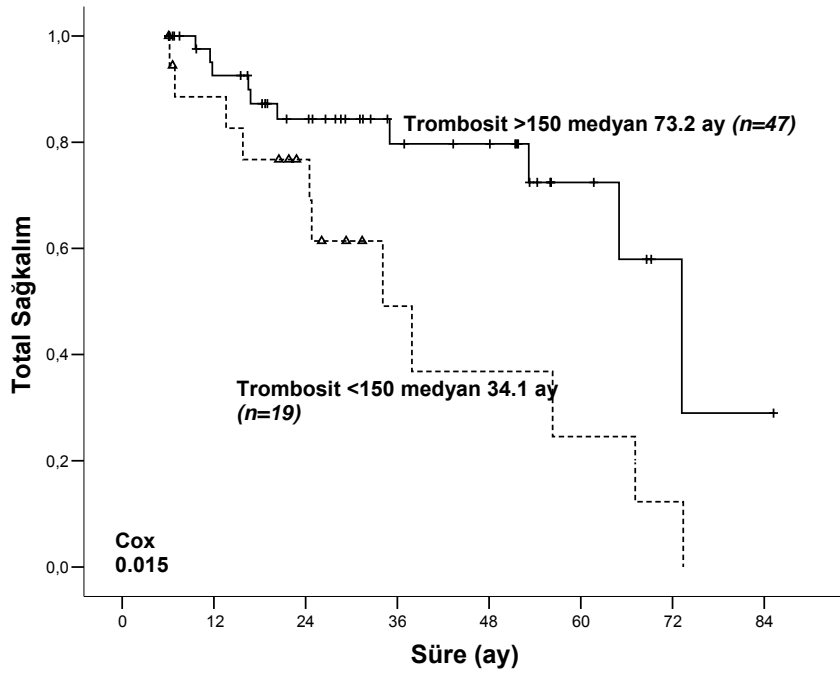
MM hastalarının total ve olaysız sağkalımı (Şekil 11). MM'lı hastaların IPI evrelemesi ile total sağkalım arasındaki ilişki (Şekil 12). MM'lı hastaların trombosit sayısı ile total sağkalım arasındaki ilişki (Şekil 13). MM'lı hastalardaki TNF α (-238) alleleri ile olaysız sağkalım arasındaki ilişki (Şekil 14).



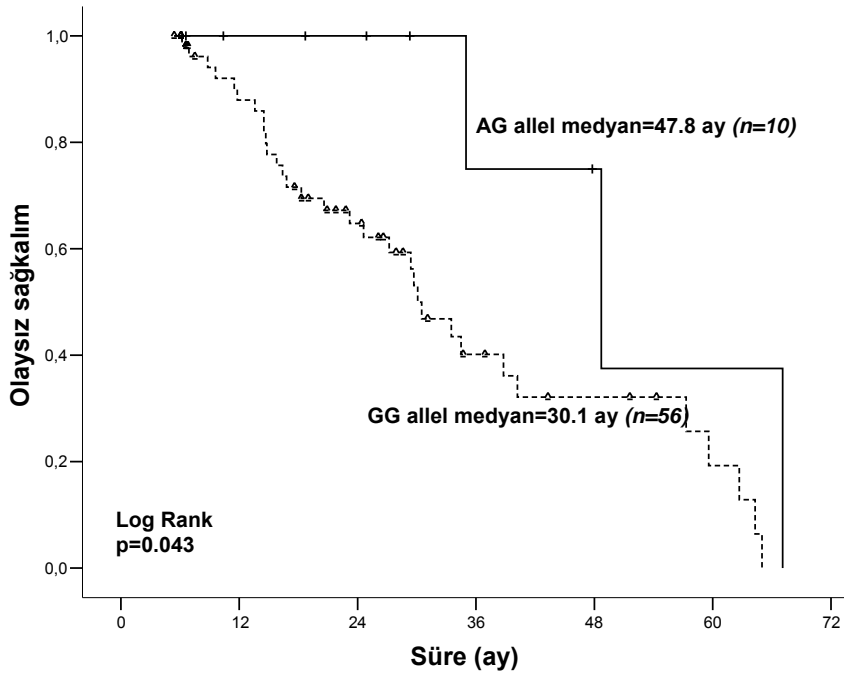
Şekil 11. MM hastalarının total ve olaysız sağkalımı



Şekil 12. MM'lı hastaların IPI evrelemesi ile total sağkalım arasındaki ilişki



Şekil 13. MM'lı hastaların trombosit sayısı ile total sağkalım arasındaki ilişki



Şekil 14. MM'lı hastalardaki TNF α (-238) alleleri ile olaysız sağkalım arasındaki ilişki

5. TARTIŞMA

MM plazma hücrelerinden kaynaklanan serum ve/veya idrarda monoklonal protein, kemik lezyonu, renal yetersizlik, anemi, enfeksiyonlara yatkınlık ve hiperkalsemi ile karakterize malign bir hastalıktır. MM'da 1980'lerin başına kadar ortalama yaşam süresi yaklaşık 2 sene iken birleşik ilaç kemoterapileri, kök hücre destekli yüksek doz kemoterapi ve talidomide, lenolidomide ve bortezomib gibi yeni tedavi seçeneklerinin ortaya çıkmasıyla 10 yılı aşan yaşam süreleri elde etmek mümkün olmuştur.

Bu çalışmada MM' lı hastaların NOS3 (+894, VNTR) ve TNF α (-308, -238 ve -857) genlerine ait polimorfizmleri ve prognoza etkili olan faktörlerden evre, ECOG, trombosit sayısı, LDH, CRP ve albümin miktarı ile başlangıç tedavisi ve başlangıç tedavisine yanıtı değerlendirilerek MM hastalarında bu genlere ait polimorfizmlerin prognoz ve tedaviye yanıtındaki önemi belirlenmeye çalışıldı. NOS3 (+894, VNTR) genine ait polimorfizmler ile meme, over, kolorektal, prostat ve vulvar kanser ilişkisini araştıran çalışmalar yapılmış ve bu polimorfizmler ile kanser riski arasında bazı çalışmalarda ilişki saptanmış bazı çalışmalarda ise anlalı ilişki saptanamamıştır. Ghilardi ve ark (62) yapmış olduğu bir çalışmada 71 hasta, 91 kontrol grubunda NOS3 (+894) genine ait polimorfizm araştırılmış ve bu polimorfizm ile meme kanseri arasında bir ilişki saptanamamıştır. Hefler ve ark (63) yaptığı bir çalışmada ise 269 meme kanserli hasta ile 244 kontrol grubu karşılaştırılmış ve NOS3 (+894) genine ait polimorfizmin meme kanseri riskini 2 kat arttırdığı ancak klinik parametrelerle bir ilişkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada NOS3 (VNTR) genine ait polimorfizmler ile meme kanseri arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Eva-Katrin ve ark (64) yaptığı çalışmada ise 68 vulva kanserli ve 227 kontrol grubunda NOS3 (+894, VNTR) genine ait polimorfizmler; tümör evresini etkileyen klinik parametreler, lenf nodu tutulumu, tümör derecesi ile karşılaştırılmış +894 polimorfizminin hastalıksız sağkalım ile ilişkisinin olmadığı ancak VNTR polimorfizminin hastalıksız sağkalım ile anlamlı şekilde ilişkili olduğu saptanmıştır (p=0.03).

NOS3 (+894, VNTR) genine ait polimorfizmlerin kan basıncı, koroner arter hastalığı, preeklampsi ve Alzheimer hastalığı ile ilişkili olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (67-70). NOS3 (-786T, VNTR) genine ait polimorfizmlerin lenf nodu tutulumu olan over kanseri ve yüksek histolojik dereceli (Gleason > 7) prostat kanseri ile ilişkili olduğu saptanmıştır (71,72). Lee ve ark (73) yaptığı diğer bir çalışmada ise 1385 meme kanseri hastası ile 968 kontrol grubunun NOS3 (-786, +894) genine ait polimorfizmler karşılaştırılmış ve tüm genotiplerde meme kanseri ile bir ilişki bulunamamıştır. Ancak -786C alelinin marjinal olarak meme kanserinin lenf nodu tutulumunu azalttığı, GT-GT taşıyanlarda ise lenf nodu tutulumlu invaziv meme kanseri ile anlamlı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir.

Literatürde hematolojik maligniteler ve NOS3 (+894) genine ait polimorfizmler arasındaki ilişkiyi inceleyen sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Lan ve ark (65) yaptığı ve Wang ve ark (66) yaptığı çalışmada NOS3 (+894) polimorfizmi ile Non-Hodgkin lenfomalı hastalar arasında yatkınlık yönünde ilişki saptanmamıştır.

Yaptığımız çalışmada MM tanısı ile takip edilen 77 hastanın NOS3 (+894) genine ait polimorfizm dağılımı GG: 37 (%48.1), GT: 25 (%32.5), TT: 15 (%19.4) olarak saptandı. NOS3 genine ait (+894) polimorfizminin değerlendirilmesinde hasta grubunda HWE' den sapma gözlenirken, kontrol grubunda sapma gözlenmedi. GG genotipinin MM da anlamlı oranda azalması ($p=0.004$), TT genotipinin ise artması ($p=0.008$) bize TT genotipinin MM gelişmesinde yatkınlık ile ilişkisinin olabileceğini, GG genotipinin ise koruyucu rolü olabileceğini düşündürmektedir. NOS3 (+894) polimorfizminde T allelinin (mutant) bulunmasının değişen protein fonksiyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (74). MM'da TT genotipinin anlamlı oranda artması (MM'da %19.4, kontrolde %1.3) MM etyopatogenezinde NOS3'ün rolü olabileceğini düşündürmektedir. Ancak başlangıç tedavisine yanıt, OPKHT tedavisi uygulanan hastaların sağkalımı, talidomid tedavisi uygulanan hastaların sağkalımı, bortezomib tedavisi uygulanan hastaların sağkalımı, 6 yıllık total sağkalım ve 6 yıllık olaysız sağkalım ile karşılaştırıldığında bu gene ait polimorfizmlerin etkisi olmadığı tespit edilmiştir.

Yeh ve ark (78) yaptığı çalışmada ise 727 kolorektal adenokarsinomlu hasta ile 736 kontrol grubunun NOS3 (-786, +894 ve VNTR) polimorfizmlerine bakılmış NOS3 (VNTR) ın farklı genotiplerini taşıyan 60 yaşından küçük hastalarda artmış kolorektal

kanser riski tespit edilmiştir. Genotip olarak bakıldığında ise (+894) için GG, (-786) için CT+TT ve (VNTR) için ise BA+AA genotipinin kolorektal kanser gelişme riskinin daha belirgin olduğu tespit edilmiştir (75). İspanya da yapılan bir çalışmada ise NOS3 polimorfizmi ile kolorektal kanser gelişim arasında bir ilişki saptanmamıştır (76). Yapılan bazı çalışmalarda ise NOS3 (VNTR) polimorfizminin A allelinin varlığının prostat kanseri gelişimi ve metastazı ile ilişkili olduğu ayrıca over kanseri ve vulva kanserinde de kötü prognoz ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (71,77-79).

Yaptığımız çalışmada MM tanısı ile takip edilen 77 hastanın NOS3 (VNTR) genine ait polimorfizm dağılımı AA: 40 (%51.9), AB: 28(%36.4), BB: 9 (%11.7) olarak saptanmıştır. AA genotipinin MM da anlamlı oranda azalması ($p=0.007$), AA genotipinin MM dan koruyucu olabileceğini düşündürmektedir. NOS3 genine ait VNTR polimorfizminde hem hasta grubunda hem de kontrol grubunda Hardy-Weinberg Eşitsizliği (HWE)'den sapma gözlenmedi. NOS3 (VNTR) polimorfizminde B normal allel iken A mutant alleli göstermektedir. A'nın bulunması da değişen mRNA ekspresyonu ile ilişkili olarak bildirilmiştir (74). MM'da AA genotipinin kontrolden anlamlı şekilde düşük olması NOS3 geninde mRNA ekspresyonunun MM etyopatogenezinde önemli olabileceğini düşündürmektedir. Ancak başlangıç tedavisine yanıt, OPKHT tedavisi uygulanan hastaların sağkalımı, talidomid tedavisi uygulanan hastaların sağkalımı, bortezomib tedavisi uygulanan hastaların sağkalımı, 6 yıllık total sağkalım ve 6 yıllık olaysız sağkalım ile karşılaştırıldığında bu gene ait polimorfizmlerin anlamlı olmadığı tespit edilmiştir.

Iokopava ve ark (46) yaptığı çalışmada, 69 MM hastası ile 102 kontrol örneğinde TNF- α -308 polimorfizmi hastalık şiddeti ile karşılaştırılmış ve TNF- α -308 polimorfizmi ile MM ve klinik varyantları arasında predispozan bir ilişki bulunamamıştır. Bel Hagj Jard ve ark (80) yaptığı çalışmada Tunus popülasyonundaki 194 Non-Hodgkin lenfomalı (NHL) ve 160 kontrol grubundaki TNF α (-308) gen polimorfizminin genetik dağılımı belirlenmiştir. NHL' lı hastalar ve kontrol grubunda TNF α (-308) genotiplerinin karşılaştırılması sonucu yüksek TNF α üretimi ile ilişkili olan AA genotipinde önemli artışlar tespit edilmiştir ($p=0.028$). Bu sonuçlar TNF α üretiminde artışa neden olan TNF α (-308) AA genotipinin NHL gelişimine yatkınlık yaratabileceğini göstermiştir.

Katalin ve ark (81) yaptığı çalışmada Macar populasyonuna ait 94 MM hastası ve 141 kontrol örneği kıyaslandığında MM hastalarında TNF α (-308) A alleli taşıyıcılarının azaldığı tespit edilmiştir (p=0.027). Bu bulgular sonucunda TNF α (-308) A allelinin MM gelişiminde koruyucu etkisinin olduğu gözlenmiştir. Gareth ve ark (47) yaptığı çalışmada ise 181 MM hastası ve 233 kontrol grubunda TNF- α genini 5' promotor bölgesindeki -1031, -863, -857, -308 ve -238 tek nükleotid polimorfizmleri karşılaştırılmış ve TNF- α -308 promotor bölgesinde A varyantı taşıyan kişilerde MM riskinin açık olarak azaldığı gözlenmiştir.

Yaptığımız çalışmada MM tanısı ile takip edilen 77 hastanın TNF α (-308) genine ait polimorfizm dağılımı AA: 0, AG: 18 (%23.4), GG: 59 (%76.6) olarak saptandı. GG genotipinin MM da anlamlı oranda artması (p=0.012), GG genotipinin MM gelişimine yatkınlık yaratabileceğini düşündürmektedir. TNF α genine ait (-308) polimorfizminin değerlendirilmesinde hasta grubunda HWE' den sapma gözlenmez iken, kontrol grubunda sapma gözlemlendi. TNF α (-308) plimorfizminde düşük ekspresyon gösteren GG genotipi kontrollere göre anlamlı olarak yüksek oranda bulundu. Bu sonuçlar MM etyopatogenezinde düşük TNF α ekspresyonunun rolü olabileceğini düşündürmektedir (82). Ancak başlangıç tedavisine yanıt, OPKHT tedavisi uygulanan hastaların sağkalımı, talidomid tedavisi uygulanan hastaların sağkalımı, bortezomib tedavisi uygulanan hastaların sağkalımı, 6 yıllık total sağkalım ve 6 yıllık olaysız sağkalım ile karşılaştırıldığında bu gene ait polimorfizmlerin anlamlı olmadığı tespit edilmiştir.

Du ve ark (83) yaptığı çalışmada talidomid bazlı tedavi alan 168 MM hastasında TNF α (-308 ve -238) genine ait polimorfizmler araştırılmış sonuçta TNF α (-238) GG genotipinin daha kısa progresyon ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Neben ve ark (84) yaptığı çalışmada ise talidomid tedavisi alan 81 refrakter ve relaps MM hastasındaki TNF α (-308 ve -238) genlerine ait tek nükleotid polimorfizmleri ile TNF α sitokin düzeyleri ölçülmüş ve TNF α (-238) GG genotipi taşıyan MM'lı hastalarda tedavi öncesi TNF α düzeyleri daha düşük bulunmuştur (p=0.047). Yine aynı çalışmada talidomid tedavisi sonrası TNF α (-238) G alleli taşıyan bu grupta progresyonsuz sağkalımın TNF α (-238) A alleli taşıyan gruba göre daha kısa olduğu tespit edilmiştir. Talidomid bazlı rejimde GG alleli erken progresyon ile ilişkili bulunup, total yaşamla ilişki bildirmemişlerdir (84).

Her iki (83,84) çalışmada sadece talidomid bazlı rejim alan hastalarda bu polimorfizm çalışılmış, bortezomib ve OPKHT yapılanlar çalışılmamıştır.

Yaptığımız çalışmada MM tanısı ile takip edilen 77 hastanın TNF α (-238) genine ait polimorfizm dağılımı AA: 0, AG: 13(%16.9), GG: 64(%83.1) olarak saptandı. Genotipler MM ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. TNF α genine ait (-238) polimorfizminde hem hasta grubunda hem de kontrol grubunda HWE'den sapma gözlenmedi. Ayrıca başlangıç tedavisine yanıt, OPKHT tedavisi uygulanan hastaların sağkalımı, talidomid tedavisi uygulanan hastaların sağkalımı, bortezomib tedavisi uygulanan hastaların sağkalımı, 6 yıllık total sağkalım ve 6 yıllık olaysız sağkalım ile karşılaştırıldığında da bu gene ait polimorfizmlerin anlamlı olmadığı tespit edildi.

Çalışmamızda araştırmaya alınan 77 hastanın TNF α (-857) genine ait polimorfizm dağılımı TT: 16(%20.8), TC: 28(%36.4), CC: 33(%42.8) olarak saptandı. Genotipler MM hastaları ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir ilişki saptanmadı. TNF α genine ait (-857) polimorfizmin ise hem hasta grubunda hem de kontrol grubunda HWE'den sapma gözlendi. Ayrıca başlangıç tedavisine yanıt, OKİT tedavisi uygulanan hastaların sağkalımı, talidomid tedavisi uygulanan hastaların sağkalımı, bortezomib tedavisi uygulanan hastaların sağkalımı, 6 yıllık total sağkalım ve 6 yıllık olaysız sağkalım ile karşılaştırıldığında da bu gene ait polimorfizmlerin anlamlı olmadığı tespit edildi.

Hastaların klinik özellikleri, prognoz üzerine etki eden yaş, evre (Salmon-Durie ve IPI), Ig subtipleri, ECOG performans skalası, trombosit sayısı, LDH ve CRP değerleri ile 6 yıllık total sağkalım ve 6 yıllık olaysız sağkalımı karşılaştırıldı. IPI evre I/II/III olan hastaların 6 yıllık total sağkalım olasılığı sırası ile %70, %61 ve %0 (medyan 56.3 ay) olarak saptandı (p=0.033). Yine IPI evre I/II/III olan hastaların medyan olaysız sağkalım süresi sırası ile 48.7 ay, 16.8 ay ve 29.7 ay olarak saptandı (p=0.004). Çok değişkenli analizle değerlendirildiğinde (Cox proportional hazard model backward) IPI anlamını korumuştur (p=0.035). Hastanın prognozu açısından önemli olan IPI evrelemesinin çalışmamızdaki hastalarla karşılaştırılmasında beklenildiği gibi evre III olan hastaların total sağkalımları evre I ve II ye göre azalmış olarak saptandı.

Tedaviye başlangıç aşamasında IPI evrelemesinin bilinmesi tedavi seçimi açısından yol gösterici olacak, hastanın prognozu ve sağkalımını değerlendirmede

kolaylık sağlayacaktır. Yaptığımız çalışma sonucunda ortaya çıkan sonuçlar IPI evrelemesinin prognoz açısından önemini bir kez daha ortaya koymuştur.

Yine bu çalışmada trombosit sayısı ile total sağkalım ve olaysız sağkalım karşılaştırıldığında trombosit sayısı $< 150 \times 10^3/\mu\text{L}$ olan hastaların 6 yıllık total sağkalımı 34.1 ay, trombosit sayısı $\geq 150 \times 10^3/\mu\text{L}$ hastaların 6 yıllık total sağkalımı ise 73.2 ay olarak saptanmış, tek değişkenli analizde anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p=0.013$). Çok değişkenli analizle değerlendirildiğinde (Cox proportional hazard model backward) trombosit sayısı anlamını korumuştur ($p=0.035$). Daha önce yapılan çalışmalarda da trombosit sayısının prognozda önemli bir belirteç olduğu tespit edilmişti. Bizim yaptığımız çalışmada da trombosit sayısının prognoz açısından önemli bir parametre olduğu bir kez daha gösterilmiş oldu.

NOS3 (+894, VNTR) ve TNF α (-308, -238 ve -857) gen polimorfizmlerinin total sağkalım ve olaysız sağkalım üzerine etkisi değerlendirildiğinde ise TNF α (-238) GG genotipinde 6 yıllık olaysız sağkalımın 30.1 ay ($p=0.043$) olduğu ve tek değişkenli analizde anlamlı olduğu gözlemlendi.

MM'lı hastalardaki NOS3 (+894, VNTR) ve TNF α (-308, -238 ve -857) gen polimorfizminin başlangıç tedavisine yanıt ile karşılaştırılmasında başlangıç tedavisine yanıtı olmayan 6 hastasında TNF α (-238) GG genotipinde olması bu polimorfizme sahip hastaların tedaviye cevapsız ve prognozunun kötü olabileceğini düşündürmektedir. Ancak çalışmaya alınan hasta sayısının az olması nedeni ile bir anlam tespit edemediğimizi ve hasta sayısının daha fazla olacağı çalışmalarla bu verinin değerlendirilmesinin daha uygun olacağını düşünmekteyiz.

Yaptığımız çalışmada OPKHT, bortezomib ve talidomid tedavisi uygulanan MM hastalarında NOS3 (+894, VNTR) ve TNF α (-308, -238 ve -857) gen polimorfizmlerinin sağkalım üzerine etkisi (Tek değişkenli analiz/ Logrank test) değerlendirildiğinde OPKHT yapılan hastaların sağkalımının diğer tedaviler uygulanan hastalardan daha uzun olmasına karşın istatistiksel bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir. Tedavi maliyetleri ve daha uzun sağkalım göz önüne alındığında OPKHT tedavisinin MM hastalarının tedavisindeki önemini bir kez daha gösterilmiştir.

Çalışmamız pub med veri tabanına MM, NOS3 (+894 ve VNTR) anahtar kelimeleri ile girildiğinde NOS3 gen polimorfizmleri ile MM arasındaki ilişkiyi inceleyen bir makaleye rastlanmamış olup çalışmamız literatürdeki ilk araştırmadır.

TNF α (-308, -238 ve -857) gen polimorfizmi ile MM arasındaki ilişkiyi inceleyen Türkiye de yapılmış olan ilk çalışma olmasının yanında literatürde de bu konuda yapılmış olan az sayıdaki çalışmalardan biridir.

Sonuç olarak; NOS3 (+894) polimorfizminde TT genotipinin, TNF α (-308) polimorfizminde ise düşük ekspresyonla ilişkili GG genotipinin MM'lı hastalarda yüksek olması bu polimorfizmlerin MM hastalığı etyopatogenezinde rolü olabileceğini göstermektedir. Ayrıca, MM'da TNF α (-238) geninde GG genotipi ilk sıra tedavi seçeneklerinden (OPKHT, bortezomib, talidomid bazlı) etkilenmeksizin erken progresyon ile ilişkili olup total sağkalım sürelerini etkilememektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Kocabaş Ü. Hematoloji Ünitesince İzlenen Multipl Myelom Hastalarının Klinik Seyri ve Bortezomib Tedavisinin Etkileri. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Uzmanlık Tezi, Ankara, 2008.
2. Fairbaks FV, Klee GG. Biochemical Aspects of Hematology. In Tietz N. W (edi) Textbook of Clinical Chemistry-W.B. Saunders Company 7th ed. Toronto 1986 s: 1495-158849c- Lydyard P. Grossi C The lymphoid system I: Roitt 1, Brostoff J, Male D eds. Immunology, 2nd ed London Gower –Medical. 1989:31-3.9.
3. Kim JU, Chang HK, Lee SS, Kim JW, Kim KT, Lee SW. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms in Behçet's Disease and Rheumatic Diseases with Vasculitis. Ann Rheum Dis. 2003;62:1083-1087.
4. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular Endothelial Cells Synthesized Nitric Oxide from L- arginine. Nature. 1988;333:664-66.
5. Babaoğlu ÖM. İnsanda Endotelial NOS E298D Genetik Polimorfizminin Damar Yanıtları ve Nitrik Oksit Salıverilmesi Üzerine Etkileri. Türkiye Tıp Dergisi. 2004;11(3):109-115.
6. Marsden PA, Heng HH, Scherer SB, Sterward RJ, Hall AB, Shi XM. Structure and Chromosomal Localization of the Human Constitutive Endothelial nitric Oxide Synthase Gene. J Biol Chem. 1993;268:17478-17488.
7. Durie BGM. Staging and kinetics of multiple myeloma. Semin Oncol. 1986;13:300-309.

8. Kyle RA. Multiple myeloma: How did it begin?. *Mayo Clin Proc.* 1994;69:680-683.
9. Brenner, H. Long-term survival rates of cancer patients achieved by the end of the 20th century: a period analysis. *Lancet.* 2002;360:1131.
10. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenziere A, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc.* 2003;78:21-33.
11. Ichimaru M, Ishimaru T, Mikami M, Matsunaga M. Multiple myeloma among atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki, 1950-76: Relationship to radiation dose absorbed by marrow. *J Natl Cancer Inst.* 1982;69:323-328.
12. Riedel DA, Pottern, LM. The epidemiology of multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1992;6:225-232.
13. Grosbois B, Jego, P, Attal M, Payen C, Rapp MJ, Fuzibet JG, et al. Familial multiple myeloma: Report of fifteen families. *Br J Haematol.* 1999;105:768-774.
14. Çifçi S. Multiple Myelomalı Hastalarda XPD, XRCC1 ve XRCC4 Gen Polimorfizmlerinin Klinik Parametrelerle İlişkisi ve Prognoz Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması. Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Uzmanlık Tezi, Gaziantep, 2009.
15. Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC. Advances in biology of multiple myeloma: clinical application. *Blood.* 2004;104:607-618.
16. Marcela O, Aruna M, Mohamad AH, and Alexandru A. Apoptosis of Multiple Myeloma. *Int J Hematol.* 2004;80:224-231.
17. Berenson JR, Myeloma bone disease. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2005;18:653-672.

18. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligands is cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998;93:165-176.
19. Winearls CG. Acute myeloma kidney. *Kidney Int*. 1995;48:1347-1359.
20. Yetişyigit T. Multipl miyelomlu hastalarda çevresel kan lenfosit alt tiplerinin klinik laboratuvar parametreleri ve prognoz ile ilişkisi. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Uzmanlık Tezi, Edirne, 2006.
21. Dispenzieri A, Kyle RA. Multiple myeloma: clinical features and indications for therapy. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2005;18(4):553-568.
22. Dispenzieri A, Lacy M, Greipp R. Multiple myeloma. 2004;3:53-109.
23. Foerster J. Multiple Myeloma. Ed: Lee GR, Bithel TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN. *Wintrob's Clinical Hematology*. Ninth edition, 2. Volume. pp:24-37.
24. Oyajobi BO, Mundy GR. Pathophysiology of myeloma bone disease. Gahrton G, Durie BGM, Samson DS. editor. *Multiple Myeloma and Related Disorders*. 2. London, UK: Arnold. 2004:74-88.
25. Colwell NS, Tollefsen DM, Blinder MA. Identification of a monoclonal thrombin inhibitor associated with multiple myeloma and a severe bleeding disorder. *Br J Haematol*. 1997;97:219-226.
26. Drach J, Ackerman J, Fritz E. Presence of p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional dose chemotherapy. *Blood*. 1998;92:802-809.
27. International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Working Group. *Br J Haematol*. 2003;121:749-757.

28. Myeloma Trialists' Collaborative Group. Combination chemotherapy versus melphalan plus prednisone as treatment for multiple myeloma: an overview of 6,633 patients from 27 randomized trials. *J Clin Oncol*. 1998;16(12):3832-42.
29. Bruno, B, Rotta, M, Patriarca F, Mordini R, Allione B, Carnevalle SC, et al. A comparison of allografting with autografting for newly diagnosed myeloma. *N Engl J Med*. 2007;356:1110-1121.
30. Singhal S, Mehta J, Desikan R, Ayers D, Roberson P, EddlemonP, et al. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med*. 1999;341:1565-1571.
31. Dimopoulos M, Weber D, Chen C. Evaluating oral lenalidomide (Revlimid) and dexamethasone versus placebo and dexamethasone in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (abstract 0402). *Haematologica*. 2005;90(suppl 2):160-61.
32. Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, Singhal S, Jagannath S, Irwin D, et al. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med*. 2003;348:2609-2617.
33. Richardson P, Sonneveld P, Schuster MW, Irwin D, Stadtmauer AE, Facon T, et al. Bortezomib or high dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2004;352:2487-2498.
34. Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS, Bladé J, Barlogie B, Anderson K, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*. 2006;(20):1467-1473.
35. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*. 1997;385:729-733.

36. Waterston A, Bower M. TNF and cancer: good or bad? *Cancer Therapy*. 2004;2:131-148.
37. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*. 2003;10:45–65.
38. ChenmG, Goddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*. 2002;296:1634–5.
39. Gaur U, Aggarwal BB. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Bio Pharm*. 2003;66:1403–8.
40. Wilson AG, de Vries N, Pociot G, di Giovine FS, van der Putte LBA, Duff GW. An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor a promoter region is strongly associated with HLA A1, B8 and DR3 alleles. *J Exp Med*. 1993;177:557-60.
41. Jevtovic ST, Kocic G, Pavlovic D, Macukanovic GL, Marjonovic G, et al. Polymorphisms of tumor-necrosis factor-alpha - 308 and lymphotoxin-alpha + 250: possible modulation of susceptibility to apoptosis in chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphoma mononuclear cells. *Leuk Lymphoma*. 2008;49(11):2163-9.
42. Demeter J, Porzsolt F, Ramisch S, Schmidth D, Schmid T, Messer G. Polymorphism of the tumour necrosis factor-alpha and lymphotoxin-alpha genes in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 1997;97(1):107-12.
43. Zhao HY, Chen YX, Lin XB, Zhong XY, Zhong LY, Ou RM, et al. Relationship between tumor necrosis factor genetic polymorphisms and acute lymphocytic leukemia. *Ai Zheng*. 2003;22(8):861-6.
44. Gyulai Z, Balog A, Borbenyi Z, Mandi Y. Genetic polymorphisms in patients with myelodysplastic syndrome. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2005;52(3-4):463-75.

45. Seidemann K, Zimmermann K, Book M, Meyer U, Burkhardt B, Welte K, et al. Tumor necrosis factor and lymphotoxin alfa genetic polymorphisms and outcome in pediatric patients with non-Hodgkin's lymphoma: results from Berlin-Frankfurt-Münster Trial NHL-BFM 95. *J Clin Oncol*. 2005;23(33):8414-21.
46. Takeuchi S, Takeuchi N, Tsukasaki K, Bartram CR, Zimmermann M, Schrappe M, et al. Genetic polymorphisms in the tumour necrosis factor locus in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2002;119(4):985-7.
47. Iokupova EV, Grinchuk OV, Kalimullina DKh, Bakirov BA, Galimova OV, Khusnutdinova EK, et al. Molecular genetic analysis of the IL-6 and Tumor necrosis factor alpha gene polymorphisms in multiple myeloma. *Mol Biol (Mosk)*. 2003;37(3):420-4.
48. Gareth JM, Peter JA, Fiona KM, Charlotte FS, Graham RL, Leigh JK, et al. Haplotypes in the tumour necrosis factor region and myeloma. *Br J Haematol*. 2005;129:358-365.
49. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases. Roles, tolls and controls. *Cell*. 1994;78:915-918.
50. Bivalacqua TJ, Champion HC, Hellstrom WJG. Implications of nitric oxide synthases isoforms in the pathophysiology of Peyronie's disease. *Int J Imp Res*. 2002;14:345-352.
51. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine in collaboration with Society for Male Reproduction and Urology. The management of infertility due to obstructive azoospermia. *Fertil Steril*. 2008;90(5 Suppl):121-124.
52. Kyoung-Mu L, Daehee K, Park SK, Berndt S, Reding D, Chatterjee N, et al. Nitric oxide synthase gene polymorphisms and prostate cancer risk. *Carcinogenesis*. 2009;30(4):621-625.

53. Heil M, Eitenmuller I, Schmitz-Rixen T, Schaper W. Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. *J Cell Mol Med.* 2006;10:(1):45-55.
54. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem.* 1993;268:17473-17488.
55. Stangl K, Cascorbo I, Laule M. High CA repeat numbers in intron 13 of endothelial nitric oxide synthase gene and increased risk of coronary artery disease. *Pharmacogenetics J.* 2000;10:133-140.
56. Zanchi A, Moczulski DK, Hana LS, Wantman L. Risk of advanced diabetic nephropathy in type 1 diabetes is associated with endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism. *Kidney Int.* 2000;57:405-413.
57. Serrano NC, Paez C, Correa PA, Anaya JM. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2004;31:2163-2168.
58. Vazgiourakis V, Sidiropoulos P, Bertias G, Koutsounaki E, Fragouli E, Raptopoulou A, et al. Association of the nitric oxide synthase (eNOS) gene polymorphism with increased risk for both lupus glomerulonephritis and rheumatoid arthritis in a single genetically homogeneous population. *Lupus.* 2007;16:867-874.
59. Suzuki H, Nagase S, Kikuchi S, Wang Y, Koyama A. Association of a missense Glu298Asp mutation of the endothelial nitric oxide synthase gene with end stage renal disease. *Clin Chem.* 2000;46:1858-1860.
60. Persu A, Stoenoiu MS, Messiaen T, Davila S, Robino C, El-Khattabi O, et al. Modifier effect of eNOS in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet.* 2002;11:229-241.

61. Nagase S, Suzuki H, Wang Y, Kikuchi S, Hirayama A, Ueda A, et al. Association of eNOS gene polymorphisms with end stage renal diseases. *Mol Cell Biochem.* 2003;244:113-118.
62. Ghilardi G, Biondi ML, Cecchini F, DeMonti M, Guagnellini E, Scorza R. Vascular invasion in human breast cancer is correlated to T->786C polymorphism of NOS3 gene. *Nitric Oxide.* 2003;9:118-122.
63. Hefler LA, Grimm C, Lantsch T, Lampe D, Koelbl H, Lebrecht A, et al. Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2006;98:151-155.
64. Eva-Katrin R, Lukas AH, Christoph G, Arik G, Robert Z, Dan TC, et al. Polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene in women with vulvar cancer. *Gynecol Oncol.* 2004;(93):686-690.
65. Lan Q, Zheng T, Shen M, Zhang Y, Wang SS, Zahm SH, et al. Polymorphisms in oxidative stress pathway and risk for non-Hodgkin lymphoma. *Carcinogenesis.* 2006;100:1828-34.
66. Wang SS, Davis S, Cerhan JR, Hartge P, Severson RK, Cozen V, et al. Polymorphisms in oxidative stress pathway and susceptibility to non-Hodgkin lymphoma. *Carcinogenesis.* 2000;27(9):1828-1834.
67. Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase polymorphism and hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2003;5(1):19-25.
68. Rao S, Austin H, Davidoff MN, Zafari AM. Endothelial nitric oxide synthase intron 4 polymorphism is a marker for coronary artery disease in African-American and Caucasian men. *Ethn Dis.* 2005;15(2):191-197.

69. Yoshimura T, Yoshimura M, Tabata A, Shimasaki Y, Nakayama M, Miyamoto Y, et al. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with severe preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig.* 2000;7(4):238-241.
70. Ntais C, Polycarpou A. Association of the endothelial nitric oxide synthase (NOS3) Glu298Asp gene polymorphism with the risk of Alzheimer's disease—a meta analysis. *J Neurol.* 2005;252(10):1276-1278.
71. Hefler LA, Ludwig E, Lampe D, Zeillinger R, Leodolter S, Gitsch G, et al. Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene in ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2002;86(2):134-137.
72. Medeiros R, Morais A, Vasconcelos A, Costa S, Pinto D, Oliveira J, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and genetic susceptibility to prostate cancer. *Eur J Cancer Prev.* 2002;11(4):343-350.
73. Lee MK, Choi JY, Lee JA, Noh DY, Ahn SH, Han W, et al. Genetic polymorphisms of NOS are associated with risk of invasive breast cancer with lymph node involvement. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;106:433-438.
74. Erciyas K, Pehlivan S, Sever T, Igci M, Pehlivan M, Arslan A, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms associated with periodontal diseases in Turkish adult. *J Biotechnol.* 2010;8(25).
75. Yeh CC, Santella MR, Hsieh LL, Sung FC, Tang R. An intron 4 VNTR polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with early-onset colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2009;124:1565-1571.
76. Conde MC, Ramirez-Lorca R, Lopez-Jamar JM, Molero E, Ramirez-Armengol JA, Moreno Nogueira JA, et al. Genetic analysis of caveolin-1 and eNOS genes in colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2006;16:353-9.

77. Medeiros R, Morais A, Vasconcelos A, Costa S, Pinto D, Oliveira J, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and genetic susceptibility to prostate cancer. *Eur J Cancer Prev.* 2002;11:343-50.
78. Riener EK, Hefler LA, Grimm C, Galid A, Zeillinger R, Tong-Cacsire D, et al. Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene in women with vulvar cancer. *Gynecol Oncol.* 2004;93:686-90.
79. Medeiros R, Morais A, Vasconcelos A, Costa S, Carrilho S, Oliveira J, Lopes C. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and the shedding of circulating tumour cells in the blood of prostate cancer patients. *Cancer Lett.* 2003;189:85-90.
80. Bisma BHJ, Amel C, Adnene L, Slim BA, Abdelaziz R, Salem A et al. Tumor necrosis factor promotor gene polymorphism associated with increased susceptibility ton on-Hodgkin lymphomas. *Hum Mol Genet.* 2006;78:117-122.
81. Kadar K, Kovacs M, Karadi I, Meleg B, Pocsai Z, Mikala G et al. Polymorphism of TNF-alpha and LT-alpha genes in multiple myeloma. *Leuk Res.* 2008;32:1499-1504.
82. Akcali A, Pehlivan S, Pehlivan M, Sever T, Akgul P, Neyal M. TNF α promoter polymorphisms in multiple sclerosis: no association with -308 and -238 alleles, but the -857 alleles in associated with the disease in Turkish patient. *Int J immunogenet.* 2010;10(11):1744-313.
83. Du J, Yuan ZG, Zhang CY, Fu WJ, Jiang H, Chen BA, et al. Effect of TNF-alpha gene polymorphism on outcome of thalidomide-based regimens for multiple myeloma. *Zhonghau Xue Ye Xeu Za Zhi.* 2009;30(10);649-53.
84. Neben K, Mytilineos J, Moehler TM, Preiss A, Kreamer A, Ho DA. Polymorphisms of the tumor necrosis factot-alpha gene promoter predict for outcome after thalidomide therapy in relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood.* 2002;100:2263-2265.