

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**MULTİPLE MYELOMDA PUMA VE p53' ÜN PROGNOSTİK ÖNEMİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

DR. İSMAİL BALOĞLU
UZMANLIK TEZİ

KONYA, 2015

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**MULTİPLE MYELOMDA PUMA VE p53' ÜN PROGNOSTİK ÖNEMİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

DR. İSMAİL BALOĞLU
UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN: PROF. DR. AYNUR UĞUR BİLGİN

KONYA, 2015

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince yardım ve desteklerini esirgemeyen başta Prof. Dr. Nedim Yılmaz SELÇUK olmak üzere tüm İç Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Tez konusunun belirlenmesi, çalışmanın planlanması ve sürdürülmesi, ortaya çıkan problemlerin çözülmesi konularında desteğini esirgemeyen; uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım değerli hocam Prof. Dr. Aynur Uğur BİLGİN' e teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışmamda yardımcı olan değerli hocam Doç. Dr. Hatice TOY' a çok teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum, unutulmaz dostluklarını benden esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Dr. Fatih PEKTAŞ, Dr. Serkan AKŞAN, Dr. Cem Onur KIRAC ve Dr. Fatma YAVUZ' a teşekkür ederim.

Tez sürecinde isimlerinin bu bölümde yazılmış olması da dahil hiçbir beklenti içinde olmadan, yardımlarını esirgemeyen hemşire, asistan doktor ve uzman doktor arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Verilerin istatistiksel analizi aşamasındaki emeklerinden dolayı Sn. Sinan İYİSOY' a teşekkür ederim.

Yaptığım her işte emeği ve desteği olan annem, babam ve kardeşlerime teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca bana her an destek olan, varlıklarıyla bana güç veren, çoğu zaman onları ihmal etmek zorunda kaldığım sevgili eşim Sena BALOĞLU' na ve çok kıymetli kızlarım Dilara ve Pelin' e destek ve sabırları için sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

MULTİPL MİYELOMDA PUMA VE P53' ÜN PROGNOSTİK ÖNEMİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Multipl myelom (MM) anemi, tekrarlayan enfeksiyonlar, serum ve/veya idrarda monoklonal protein, osteolitik kemik lezyonları, hiperkalsemi ve böbrek yetmezliği ile karakterize neoplastik bir plazma hücre diskreziyidir. Myelom patogenezi tam olarak bilinmeyen bir hastalıktır. Konuyla ilgili farklı hipotezlerde ileri sürülse de son zamanlarda apoptozis yollarındaki mutasyonlar ön plana çıkmaktadır. Apoptozis programlı hücre ölümüdür. Bu süreçte rol oynayan PUMA bcl-2 protein ailesinin bir üyesi olup bcl-2 bağlayıcı komponent 3 olarak da bilinir. PUMA ekspresyonu bir tümör süpresör gen olan p 53 tarafından düzenlenir. PUMA p53 ile ilişkili veya ilişkisiz olarak transkripsiyon faktörlerince düzenlenen çeşitli sinyallerle apoptozisde rol alabilir.

Amaç: Bu çalışmada; p53 ve PUMA ekspresyonlarını çalışılmış ve p53-PUMA ekspresyonu ile hastalık progresyonu arasında bir ilişki aranmıştır.

Yöntem: p53 ve PUMA ekspresyonları immunhistokimyasal yöntemle değerlendirildi. İşlem p53 ve PUMA'ya karşı spesifik antikor kullanılarak gerçekleştirildi. MM hastalarının tanı anındaki kemik iliği biyopsiler örnekleri (n=31) çalışma grubu olarak alındı. Normal hematopoez tespit edilen kemik iliği biyopsileri (n=12) kontrol grubu olarak alındı. Boyandıktan sonra pozitif boyanan her bir örneğin boyanma kuvveti ve yaygınlığı hesaplandı.

Bulgular: MM hastalarının kemik iliklerinde PUMA ekspresyonu gösteren hücrelerin yüzdesi, normal bireylerin kemik iliklerine göre önemli ölçüde yüksekti ($p=0.000$). Plazma hücre yüzdesi ile PUMA boyanma yaygınlığı arasında istatistiksel olarak olmasada anlamlı bir ilişki mevcuttu ($p=0.385$). PUMA ekspresyonları ile hastalığın evresi arasında bir ilişki yoktu.

Sonuç: Sonuçlarımız, MM hastalarının kemik iliği örneklerinde özellikle PUMA ekspresyonunun, sağlıklı kontrollere göre önemli ölçüde daha yüksek olduğunu gösterdi. PUMA pozitifliğinin p53' e oranla daha fazla olması tanı anında PUMA' nın nongentoksik nedenlerle indüklendiğini düşündürdü. p53 ve PUMA pozitifliğinin kontrol grubuna göre yüksek olması miyelom patogenezinde apoptozisin rol oynadığını düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Multipl miyelom, p53, PUMA

SUMMARY

EVALUTION OF THE PUMA AND P53 PROGNOSTIC SIGNIFICANCE IN MULTIPLE MYELOMA

Multiple myeloma (MM) is a plasma cell malignancy and is characterized by anemia, recurrent infections, serum and/or urine monoclonal protein, osteolytic bone lesions, hypercalcemia and renal failure. Myeloma is a disease of unknown pathogenesis. Although there were different hypotheses on the subject, recently mutations in the pathway of apoptosis came to the fore. Apoptosis is programmed cell death. PUMA is a member of the bcl-2 protein family and that plays a role in this process is known as BCL-2 binding component 3 and. PUMA expression is regulated by a tumor suppressor gene, p53. PUMA may play a role in apoptosis, bound or unbound p53. The role is regulated by various signals of transcription factors.

Aim: In this study; the expressions of p53 and PUMA in bone marrow hematopoietic cells of MM patients have been worked and the relationship between myeloma prognosis with p53- PUMA was searched.

Method: The expression of p53 and PUMA was evaluated using immunohistochemistry. The procedure was carried out using specific antibodies against p53 and PUMA. Bone marrow biopsies of MM patients at the time of diagnosis (n=31) were included in the study group. Bone marrow biopsies from individuals who had normal hematopoiesis (n=12) were included as control. After staining, strength and prevalence were calculated of each positively staining cells.

Findings: The percentage of cells showing PUMA expression was significantly higher in bone marrow of MM patients as compared to normal bone marrow samples ($p=0.000$). We found a correlation between the percentage of plasma cells with staining prevalence of PUMA, but it was not statistically significant ($p=0.385$). There was no correlation between the stage of the disease with PUMA expression.

Results: Our results showed that specially PUMA expression is significantly higher in bone marrow cells of MM patients compared to healthy controls. Higher positivity of PUMA suggested that, PUMA induced nongenotoxic reasons at the time of diagnosis. The lack of p53 and PUMA positivity suggests that, apoptosis plays a role in myeloma pathogenesis.

Key words: Multiple myeloma, p53, PUMA

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
SUMMARY	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar	VIII
ŞEKİLLER	IX
GRAFİKLER	IX
KISALTMALAR	X
1.GİRİŞ AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1.MULTİPL MİYELOM	2
2.1.1.Tanım ve İnsidans	2
2.1.2.Tanı	2
2.1.3.Evreleme	3
2.1.4.Prognoz	4
2.1.5.Tedavi	6
2.1.6.Yanıt Değerlendirme	7
2.2.APOPTOZİS	7
2.2.1.Tanım	7
2.2.2.Apopitoziste p53' ün Rolü	8
2.2.3.Apopitoziste PUMA' nın Rolü	9
3.MATERYAL METOD	11
3.1.HASTA SEÇİMİ	11
3.2.ÇALIŞMA PROTOKOLÜ	11
3.3.MM HASTALARININ KLİNİK VE LABORATUAR DEĞERLENDİRİLMESİ	11
3.4.İMMUNHİSTOKİMYASAL METOD	11

3.5.İSTATİKSEL METOD	12
3.6.ETİK KURUL ONAYI	12
4.BULGULAR	13
5.TARTIŞMA	25
6.SONUÇLAR VE ÖNERİ	28
7.KAYNAKLAR	29

TABLÖLAR

Tablo 1: Multipl miyelom tanısı için önerilen incelemeler

Tablo 2: Smoldering (asemptomatik) multipl miyelom tanı kriterleri

Tablo 3: Aktif multipl miyelom tanı kriterleri

Tablo 4: Uluslararası evreleme sistemi

Tablo 5: Durie- Salmon evreleme sistemi

Tablo 6: Prognostik faktörler

Tablo 7: Mayo risk sınıflaması

Tablo 8: Multipl miyelom tedavi

Tablo 9: Yanıt değerlendirme

Tablo 10: Hasta bilgileri

Tablo 11: p53 ve PUMA boyanma sıklığı

Tablo 12: PUMA pozitifliği ile hastalık evresi karşılaştırılması

Tablo 13: Anemi ile PUMA boyanma kuvvet ve yaygınlığının karşılaştırılması

Tablo 14: Nötropeni ile PUMA boyanma kuvvet ve yaygınlığının karşılaştırılması

Tablo 15: Trombositopeni ile PUMA boyanma kuvvet ve yaygınlığının karşılaştırılması

Tablo 16: Hipoalbuminemi ile PUMA boyanma kuvvet ve yaygınlığının karşılaştırılması

Tablo 17: Kreatinin yüksekliği ile PUMA boyanma kuvvet ve yaygınlığının karşılaştırılması

Tablo 18: Beta2 mikroglobulin yüksekliği ile PUMA boyanma kuvvet ve yaygınlığının karşılaştırılması

Tablo 19: Litik lezyon varlığı ile PUMA boyanma kuvvet ve yaygınlığının karşılaştırılması

Tablo 20: Plazmasitom varlığı ile PUMA boyanma kuvvet ve yaygınlığının karşılaştırılması

Tablo 21: Plazma oranı ile PUMA boyanma kuvvet ve yaygınlığının karşılaştırılması

ŞEKİLLER

Şekil 1: p53 aracılıklı apoptozis modeli

Şekil 2: p53 pozitif boyanan MM kemik iliği örneği

Şekil 3: PUMA pozitif boyanan MM kemik iliği örneği

GRAFİK

Grafik 1: Durie- Salmon evreleme sistemine göre dağılım

Grafik 2: ISS evreleme sistemine göre dağılım

Grafik 3: Immunglobulin alt tiplerine göre dağılım

Grafik 4: Plazma oranı ile PUMA boyanma kuvvet karşılaştırılması

KISALTMALAR

MM: Multipl miyelom

Ig: Immunglobulin

SMM: Smoldering multiple myeloma

MGUS: Monoclonal gammopathy of undetermined significance

IMWG: International myeloma working group

ISS: International staging system

DS: Durie- Salmon

DNA: Deoksiribonükleik asit

KLL: Kronik lenfositik lösemi

AML: Akut miyeloid lösemi

Vit: Vitamin

B2 mikroglobulin: Beta2 mikroglobulin

Hgb: Hemoglobin

Wbc: White blood cell

Plt: Platelet

Neu: Nötrofil

Alb: Albumin

Std: Standart

Min: Minimum

Max: Maximum

PUMA: p53 upregüle apoptozis düzenleyicisi

MULTİPLE MİYELOMDA PUMA VE p53' ÜN PROGNOSTİK ÖNEMİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Multiple miyelom anemi, serum ve/veya idrarda monoklonal protein artışı, osteolitik kemik lezyonları, hiperkalsemi, tekrarlayan enfeksiyonlar ve böbrek yetmezliği ile karakterize neoplastik bir plazma hücre diskrezişidir. Lenfomadan sonra en sık görülen hematolojik neoplazmdır.

Miyelom patogenezi tam olarak bilinmeyen bir hastalıktır. Konuyla ilgili farklı hipotezlerde bulunsada son zamanlarda apoptozis yollarındaki mutasyonlar ön plana çıkmaktadır. Bu süreçte rol oynayan p53 ve PUMA, Bcl- 2 aracılığı ile fonksiyon gösterir ve temel olarak apoptozisin gerçekleşmesini sağlar. PUMA p53 ilişkili ve ilişkisiz olarak apoptozisi indükleyebilir.

Apoptozis programlı hücre ölümüdür. Aşırı apoptotik hücre ölümü sitopenilere ve kemik iliği yetmezliğine yol açarken, yetersiz apoptozisin de lösemi gibi neoplazilerin gelişimi ile sonuçlanabildiği çalışmalarda gösterilmiştir. Multipl miyelomda apoptozis ile ilgili çalışmalar bulunsada daha önce PUMA ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, p53 ve PUMA gen mutasyonlarının Multipl miyelom prognozu üzerine olan etkilerinin değerlendirilmesi planlanmıştır. İngilizce literatür taramasında MM ve PUMA ve/veya p53 ilişkisini değerlendiren bir çalışma olmadığı izlenmiştir. Çalışmanın sonucunda apoptozis yollarındaki değişikliklerin ve özellikle PUMA gen mutasyon varlığının multipl miyelom gelişim mekanizması hakkında yeni bir bakış açısı elde edilmesi ve belki de yeni bir hedefe yönelik tedavi seçeneği olasılığının gündeme gelmesi hedeflenmiştir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. MULTİPL MİYELOM

2.1.1 Tanım ve İnsidans :

Multipl miyelom (MM) plazma hücreleri olarak da bilinen diferansiye B-lenfositlerinin kanseridir. Kemik iliğinde monotipik plazma hücresi sayısında artış, serum ve / veya idrarda monoklonal immünglobulin artışı ve osteolitik lezyonlar ile karakterizedir. Tüm malignitelerin %1' ini hematolojik malignitelerin % 10' unu oluşturmaktadır. ABD' de insidansı yüz binde 4- 5' dir (Siegel 2014). MM erkeklerde daha sık görülmekte olup (yaklaşık 1,4/ 1), tanı anında ortalama yaş erkeklerde 69 kadınlarda 72' dir. Hastaların %35' i 65 yaşın altında, %28' i 65-74 yaş, %37' si 75 yaşın üzerindedir (Ciolli 2012).

Birinci derece akrabalarında multipl miyelom öyküsü olanlarda hastalık riski yaklaşık 3,7 kat artmaktadır (Lynch 2001). MM öyküsü olan 15 ailede yapılan çalışmada 10 ailede multipl miyelomun kardeşlerde görüldüğü, 7 ailedeki hastalarda ise aynı IgG kappa monoklonal paterni gösterdiği bulunmuştur (Grosbois 1999). Ayrıca geniş kapsamlı bir genom çalışmasında 1675 multiple miyelom hastası 5903 kontrol grubu ile karşılaştırılmış ve 3p22.1 veya 7p15.3 genetik varyasyonları olan bireylerde MM gelişme riskinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Broderick 2012).

2.1.2. Tanı :

Tanı, hastalığın klinik ve laboratuvar özelliklerine dayanılarak konulur. Tanı anında hastaların yaklaşık %73' ünde anemi, %58' inde kemik ağrısı, %48' inde kreatinin değerlerinde yükselme, %32' sinde iştahsızlık ve halsizlik, %28' inde hiperkalsemi ve %24' ünde kilo kaybı görülür (Kyle 2003). Extramedüller plasmazitoz tanı anında hastaların yaklaşık %7' sinde görülürken hastalık yaklaşık %6' sında ilerleyen dönemde gelişebilmektedir (Blade 2011).

Tanı için tam kan sayımı, periferik yayma, sedimentasyon, serum kalsiyumu ve kreatinini içerek şekilde biyokimya, idrar tahlili, beta 2 mikroglobulin, protein elektroforezi, immunfiksasyon, immünglobulinlerin nefelometrik ölçümü, serbest hafif zincir ölçümü, kemik iliği aspirasyonu ve biyopsisi, sitogenetik incelemeler ve radyolojik iskelet taraması yapılmalıdır (Bird 2011) (Tablo 1).

Multipl miyelom, genellikle tedavi gerektiren aktif ve tedavi gerektirmeyen sessiz miyelom (smoldering multiple myeloma- SMM) olmak üzere sınıflandırılabilir. Genel olarak hastaların MM tanısı almadan önce selim bir evre olan belirsiz monoklonal gamopati (Monoclonal gammopathy of undetermined significance-MGUS) olduğu kabul edilmektedir (Tablo 2-3) (NCCN 2015).

Tablo 1: Multipl miyelom tanısı için önerilen incelemeler

Tarama testleri	Tanı koydurucu Testler	Tümör yükünü ölçen testler	Organ hasarını saptayan testler	Bazı hastalar için gerekli testler
Kan sayımı Sedimentasyon Plazma vizkositesi Üre Kreatinin Ürik asit Serum ve idrar elektroforezi Semptomatik alanlara X-ray	Kemik iliği biopsi ve aspirasyonu Serum ve idrar immunfiksasyon elektroforezi Kemik survi	Kemik iliği sitogenetik veya FISH incelemesi Serum ve idrar monoklonal protein tayini Kalsiyum Albumin B2 mikroglobulin Labelling indeks Kemik survi	Kan sayımı Üre ve kreatinin klirensi Kalsiyum Albumin Ldh Crp Kemik survi	Kemik iliği immun histokimya Flow sitometri Sitogenetik Vit B12 Folat MR, BT PET CT

Tablo 2: Smoldering (asemptomatik) multipl miyelom tanı kriterleri

Serumda M protein Ig G >3 gr/dl Ig A >1 gr/dl	Kemik iliğinde>%10 plazma hücresi
ve/veya	Organ hasarı, kemik lezyonu ve semptom yokluğu
Veya	
Bence- Jones proteini >1 gr/24 s	

Tablo 3: Aktif multipl miyelom tanı kriterleri

Aşağıdakilerden bir yada daha fazlasının olması
- Kalsiyum yüksekliği (>11.5 mg/dl) - Böbrek yetmezliği (kreatinin >2 mg/dl) - Anemi (hgb< 10 g/dl veya normalden 2g/dl azalma) - Kemik hasarı (litik veya osteopenik)

2.1.3. Evreleme:

Durie-Salmon evreleme sistemi miyelomda tümör yükünü belirlemek için standart evreleme sistemi olarak 30 yıldır kullanılmaktadır (Tablo 5). Durie-Salmon sisteminde

litik kemik lezyonlarının belirlenmesi çok objektif olmadığından IMWG tarafından sadece $\beta 2$ mikroglobulin ve albüminin parametre olarak kullanıldığı daha basit bir prognostik sistem olan Uluslararası Evreleme Sistemi (International Staging System/ISS) önerilmiştir (Tablo 4).

Tablo 4: Uluslararası evreleme sistemi

Evre	Beta 2 mikroglobulin	Albumin
Evre 1	< 3.5	>3.5
Evre 2	<3.5 Veya 3.5-5.5	<3.5
Evre 3	>5.5	

Tablo 5: Durie Salmon evreleme sistemi

EVRE	KRİTERLER
1	Aşağıdakilerden hepsi 1)Hb>10 2)Serum kalsiyumu normal 3)Normal kemik tarama(osteoporoz da yok) 4)M komponenti düzeyi düşük Ig G < 5 g/dl Ig A < 3 g/dl İdrar hafif zinciri <4/g/24 saat
2	1 VE 3'E UYMAYANLAR
3	Aşağıdakilerden 1 veya daha fazlası 1)Hb< 8.5 2)Serum kalsiyum artmış 3)Yaygın iskelet hasarı(>3 litik lezyon) ve majör kırıklar 4)M komponenti düzeyi yüksek Ig G >7 g/dl Ig A >5 g/dl İdrar hafif zinciri >12g/24 saat
A:Serum kreatinin <2 mg/dl	B:Serum kreatinin > 2 mg/dl

2.1.4. Prognoz:

Miyelom tanısı konan bütün hastalarda FISH, metafaz sitogenetik ve imkan varsa plazma hücre proliferatif indeksi ile risk sınıflaması yapılmalıdır. Prognostik faktörler arasında hastalığın evresi, sitogenetik özellikler, kemik iliğinde plazma hücre sayısı yer alır (Lai 1995) (Tablo 6). Durie-Salmon ve Uluslar Arası Evreleme Sistemi hastalık

prognozu açısından bilgi vermekle birlikte risk tayini açısından yeterli görülmemektedir. Mayo klinik grubu miyelomu genetik özelliklere ve plazma hücre proliferasyon hızına göre risk gruplarına ayırmıştır (Kumar 2009) (Tablo 7).

Yaşlı hastalar ve performans durumu kötü olan grupta, infeksiyon ve tromboz gelişim riski daha fazla olduğundan bu hasta grubunda yüksek doz kemoterapiden kaçınılır. Genç yaştaki MM hastalarında yüksek doz tedaviler mümkün olabileceği için yaş bir prognostik faktör olarak kabul edilmektedir (Alexanian 1990).

C- reaktif protein, hepatositlerden IL-6 vasıtasıyla ortama verilen bir akut faz reaktan proteindir. Düzeyi serum IL-6 düzeyini yansıtan bir moleküldür. IL-6 ise MM patogenezinde hücre içi yolaklara aktive ederek; plazma hücrelerinde proliferasyona, angiogenik ve anti-apoptotik aktivasyona yol açan önemli bir protein olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (Sirohi 2004). Bundan dolayı hastalardaki CRP yüksekliğinin kötü prognostik faktör olarak kabul edilmesi ileri sürülmüştür (Barlogie 2006).

Ig alt gruplarının evreleme sistemleri ve bağımsız prognostik faktörlere anlamlı katkısı yoktur. Ig A alt tipinde 40 ay, Ig G alt tipinde yaklaşık sağ kalım süresi 49 ay, sadece hafif zincir hastalığı olanlarda ise 35 aydır (Rajkumar 2005).

İdrarda hafif zincir atılımı fazla olanlarda ise prognoz kötü olup özellikle artan serum hafif zincir oranı akut böbrek yetersizliğinin habercisidir (Kyritsonis 2009). Yine anormal k/λ serbest hafif zincir oranı kötü prognoz belirteçidir (Snozek 2008).

Tümör yükünü belirlemede Durie- Salmon evrelemesi ve β-2 mikroglobulin düzeyleri en yararlı belirteçlerdir. β-2 mikroglobulin tek başına en güçlü sağkalım belirleyici faktördür. 4 gr/dl'nin altındaki değerlerde median sağkalım 43 ay iken, üzerindekilerde 12 aydır (Longo 2001).

Tablo 6: Prognostik faktörler

- Evre 2-3 hastalık
- Beta 2 mikroglobulin :>3-8 mg/dl
- LDH yüksekliği
- IL-6 ve CRP artışı
- Plazma hücre sayısı
- Yaş
- Performans

Tablo 7: Mayo risk sınıflaması

Yüksek Risk: 1) FISH -del 17 p -t (14;16) -t (14;20) -t (4;14) 2) Sitogenetik del 13q 3) Sitogenetik hipodiploidi 4) PCLI >%3	Standart Risk: 1) Hiperdiploidi 2) t(11;14) 3) t(6;14) Ara Risk: - Beta 2 mikroglobulin <4 mg/dl - Hgb >10 gr/dl
--	--

2.1.5. Tedavi:

Yeni tanı MM hastasının tedavi planını yapılırken ilk değerlendirilmesi gereken hastanın otolog kök hücre nakline aday olup olmadığıdır. Multipl miyelomlu genç hastalarda yüksek doz kemoterapi ve otolog kök hücre nakli genellikle uygulanan tedavi şeklidir. Genç hasta terimi genellikle 65 yaşını geçmemiş hastalar için kullanılmakla beraber 65 yaş üstündeki performansı iyi, koroner hastalığı olmayan, özellikle istekli ve uyulu hastalarda da otolog kök hücre nakli yapılabilmektedir.

Kök hücre nakline uygun olmayan hastaların fiziksel durumlarına ve spesifik komplikasyonlarına göre farklı tedavi seçenekleri verilebilir (Tablo 8).

Tablo 8: Multipl Miyelom tedavi (NCCN 2015)

	Tercih edilen tedavi	Diğer tedavi
Nakil adayları için birinci basamak tedavi (2 siklusta bir cevap değerlendirilir)	-Bortezomib/dexamethasone Bortezomib/siklofosfamid/dexamethasone -Bortezomib/doxorubicin/dexamethasone Bortezomib/lenalidomide/dexamethasone -Bortezomib/thalidomide/dexamethasone -Lenalidomide/dexamethasone	Carfilzomib/lenalidomide/dexamethasone -Dexamethasone -Liposomal doxorubicin/vincristine/dexamethasone -Thalidomide/dexamethasone
Nakil adayı olmayan hastalar için tedavi (2 siklusta bir cevap değerlendirilir)	-Bortezomib/dexamethasone -Lenalidomide/düşük doz dexamethasone -Melphalan/prednisone/lenalidomide -Melphalan/prednisone/bortezomib -Melphalan/prednisone/thalidomide	-Dexamethasone -Liposomal doxorubicin/vincristine/dexamethasone -Melphalan/prednisone -Thalidomide/dexamethasone -Vincristine/doxorubicin/dexamethasone

2.1.6. Yanıt Değerlendirme :

Multiple miyelomda tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde günümüzde Uluslararası Miyelom Çalışma Grubunun oluşturduğu kriterler kullanılmaktadır (NCCN 2015) (Tablo 9).

Tablo 9: Yanıt değerlendirme

Komplet remisyon	- İdrar ve serumda negatif immunfiksasyon - Plazmositom yokluğu - Kemik iliğinde %5' in altında plazma hücresi
Sıkı komplet remisyon	- Komplet remisyon yanıtlarına ek olarak - İmmunhistokimyasal olarak plazma hücre yokluğu
İmmunfenotipikkomplet remisyon	- Sıkı komplet remisyon yanıtlarına ek olarak - Flow sitometri ile en az bir milyon kemik iliği hücre analizinde plazma hücre yokluğu
Moleküler komplet remisyon	- Komplet remisyonu ek olarak PCR ile negatif allel spesifik oligonükleotid
Çok iyi kısmi yanıt	- Elektroforez tespit edilemeyen fakat immunfiksasyonla tespit edilen serum ve idrar Mprotein veya M protein %90 azalma ve idrar M protein <100 mg/24s
Parsiyel yanıt	- Serum M protein % 50 azalma ve 24 saatlik idrar M proteininde %90 azalma veya <200 mg/24s
Stabil hastalık	- Komplet, çok iyi kısmi yanıt, kısmi yanıt, parsiyel yanıt kriterlerini karşılamayan - Hastalığın progresyon gösterdiğine dair herhangi bir bulgunun olmaması
Progresif hastalık	- Serum ve idrar M proteininde %25 artış olması - Yeni gelişen kemik lezyonu veya plazmasitom - Yeni gelişen hiperkalsemi

2.2. APOPTOZİS

2.2.1 Tanım :

Apoptozis biyolojik sistemlerde yaygın olarak meydana gelen, fazlalık halindeki veya istenmeyen hücreleri kontrol altında tutan, programlı hücre ölümüdür. İnflamatuar reaksiyona yol açan bir lizozomal veya granül içeriği salınımı olmaksızın apoptotik hücre yıkımı meydana gelir. Kompleks olaylar serisi, caspase proteazların aktivasyonu, DNA fragmentasyonu ve makrofajlar tarafından apoptotik cisimlerin fagositozu ile sonlanır (Yoshida 2009).

Bcl-2 ailesi proteinleri apoptozisde önemli bir yere sahiptir. Bcl-2' nin proapoptotik üyeleri, Bax, Bcl-Xs, Bad, Bak ve Bid iken antiapoptotik üyeleri, Bcl-2, Bcl-X, Mcl-1' dir. Antiapoptotik üyelerin proapoptotik üyelere oranı hücre ölümüne karar verir(Yoshida 2009).

Apoptozis, hücre üretiminin negatif düzenleyicisi olarak düşünülebilir. Hematopoez üzerinde yetersiz apoptozis etkisi lösemi gibi neoplazilerin gelişimine neden olabilirken, artmış apoptozis kemik iliği yetersizliğine ve sitopenilere yol açabilmektedir (Gordon 2005).

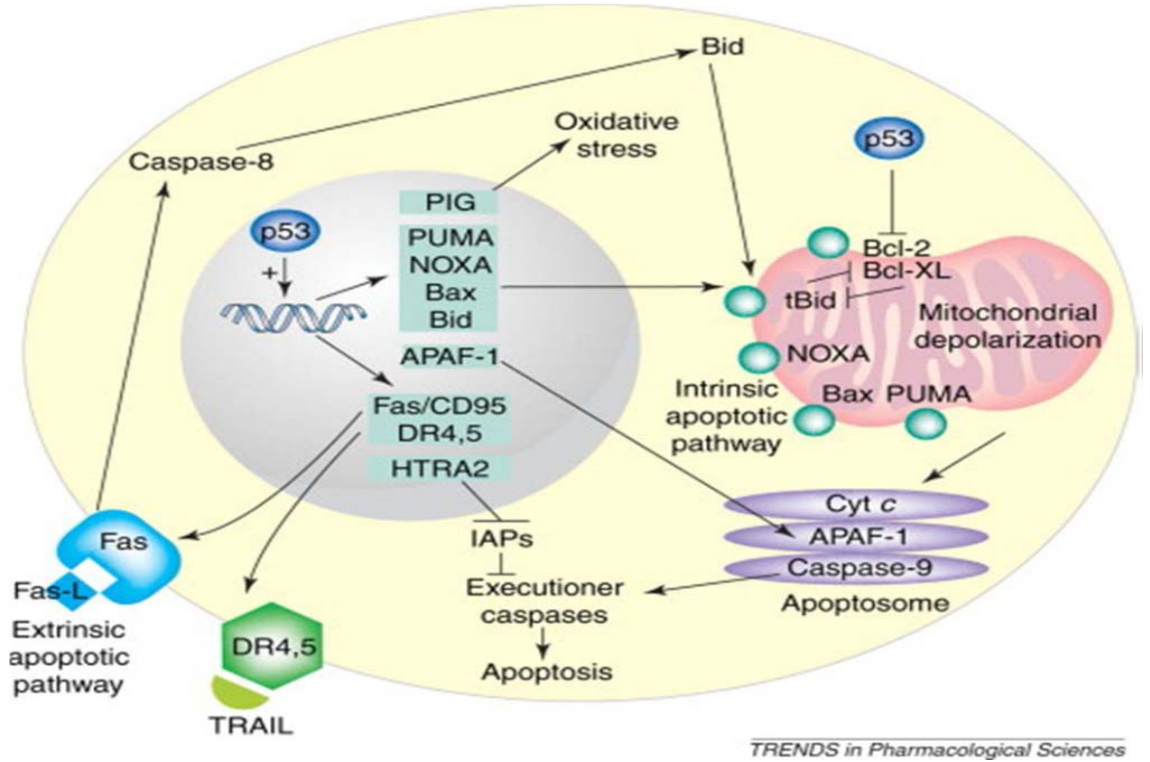
2.2.2 Apoptoziste p53' ün Rolü:

P53 tümör supresör geni apoptoziste önemli bir göreve sahiptir. P53 aracılı apoptozise yol açan nedenler hücrel stresler; DNA hasarı, onkojen aktivasyonu, hipoksi ve oksidatif hasardır. Bu durumlarda p53 tümör supresör geni devreye girmekte ve hücre proliferasyonunu durdurmaktadır (Yu 2003).

P53 apoptozis sırasında aynı zamanda Bcl-2 gen ailesinin ürünlerini de regüle etmektedir. Bcl-2; özellikle mitokondri dış membranında bulunmakta ve iyon geçişini düzenleyen bir moleküldür. Mitokondri ise apoptozisi başlatan yolların kesişme noktasıdır. Bcl-2' nin mitokondri ile ilişkisi nedeniyle antioksidan bir etkiye sahip olduğu ve oksidan stresin neden olduğu apoptozisi önlediği gösterilmiştir (Tsujimoto 1998). Bu nedenle Bcl-2 apoptotik programda p53' ün tersi etki gösterir. Yapısal olarak Bcl-2 ile ilişkili proteinler Bax, Bad, Bid, Bcl-Xs, Bcl-Xl' dir. Bunlardan Bax, Bad, Bid, Bcl-Xs apoptozisi artırır. Bcl-2' nin Bax'a oranı hücre sağ kalımını belirler. AML M1 lösemik hücrelerinde p53 overekspresyonu aracılığı ile oluşan apoptoziste hem mesaj hem de protein düzeyinde Bcl-2' de azalma ve Bax' da artış oluşur. Bu da p53' ün Bcl-2/Bax oranını etkileyerek apoptozisi regüle ettiğini düşündürmektedir (Lowe 2000).

P53 apoptozisi, nükleotit kopyalamaya bağımlı ve bağımsız mekanizmalarla sağlar. P53 aracılı transkripsiyon bağımsız apoptotik aktivite büyük ölçüde p53' ün mitokondriye transportu ile sağlanır. P53 burada Bcl-2 ailesi üyeleri ile etkileşir. Bu, mitokondrial dış membranın geçirgenliğinin artmasına ve sitokrom c salınımına yol açar (Şekil 1). P53, proapoptotik Bcl-2 genlerinin transkripsiyonal upregülasyonu aracılığıyla hücre siklus ölümü, DNA onarımı ve apoptozis dahil olmak üzere birkaç yolağı düzenleyici fonksiyon gösterir (Jabbour 2012).

Birçok hematolojik malignenside tümör supressor p53 fonksiyon kaybı mutasyonu veya delesyonu söz konusudur. AML ve KLL'de p53 kaybı ve bunun sonucunda oluşan 17p delesyonu kötü prognoz ve tedavi yetersizliği ile ilişkilidir (Jabbour 2010).



Şekil 1: P53 aracılıklı apoptozis modeli (Hofseth 2004)

2.2.3 Apoptoziste PUMA' nın Rolü:

PUMA, Bcl-2 ailesi üyelerinden BH-3 subgrubu arasında bulunur ve en güçlü öldürücülerden birisidir. P53 tümör baskılayıcısı tarafından düzenlenen stres – aracılı apoptoziste rol oynar ve düzeyleri arttığında kanser hücrelerini birkaç saatte öldürür (Yu 2003).

Diğer BH-3 proteinlerinden farklı olarak PUMA' nın aktivasyonu transkripsiyon ile kontrol edilir. DNA hasarı gibi genotoksik stres durumlarında PUMA p53 tarafından transaktive edilir. Bunun yanında growth faktör/sitokin yoksunluğu, endoplazmik retikulum stresi ve iskemi gibi nongenotoksik uyarı ile p53 bağımsız apoptotik yanıtlar ile de uyarılır.

Apoptozis indüksiyonu p53' ün önemli bir tümör baskılayıcı fonksiyonudur. PUMA p53' ün tüm proapoptotik aktivitelerine katkıda bulunur (Yu 2008). p53' ün antiapoptotik Bcl-XL'den ayrılmasını aynı zamanda proapoptotik Bax' ı aktive

etmesini sağlar. Böylece mitokondri dış membran permeabilitesini arttırılıp apopitozis gerçekleştirir (Haupt 2006).

P53' ün fonksiyon kayıp mutasyonları veya delesyonları AML' de diğer tümörlere göre relatif olarak nadir görülür ve görüldüğünde kötü prognozla güçlü ilişkilidir. Bu durumun muhtemel nedenlerinden biri, PUMA gibi proapopitotik faktörlerin, kemoterapötik ajanlara yanıtılığın önemli öngörücüleri olmasıdır (Ni Chonghaile 2011). Literatürde PUMA ile ilgili MDS, lenfoma, hepatoselüler kanser gelişimi gibi çalışmalar bulunsa da MM' de PUMA ile ilişkili bir çalışma mevcut değildir.

3.MATERYAL VE METOD

3.1. HASTA SEÇİMİ

Çalışma, 2010-2014 tarihleri arasında Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji Ünitesine başvuran ve MM tanısı koyulan hastalar ile yapıldı. Multipl miyelom hastaları içinden sitogenetik sonuçları veya prognostik kriterleri mevcut olan ayrıca tanı veya nüks anındaki kemik iliği biyopsileri olan ve biyopsi örneklerinde CD 138 pozitif olan hastalar çalışmaya dahil edildi. Kontrol grubu olarak, kemik iliği yapılmış ve kemik iliği hematopoez bulguları normal kabul edilen 12 birey alındı. Çalışma protokolü Necmettin Erbakan Üniversitesi etik kurulunca onaylandıktan sonra (etik) çalışma başlatıldı.

3.2. ÇALIŞMA PROTOKOLÜ

Çalışmaya dahil etme kriterlerine uyan 30 hasta ve kemik iliğinde normal hematopoez saptanan 12 birey kontrol grubu olarak çalışmaya alındı. Hastaların tanı anındaki klinik ve laboratuvar bilgileri dosya verilerinden geriye dönük olarak elde edildi. Tanı anındaki kemik iliği parafin bloklarına Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Patoloji laboratuvarından ulaşıldı. Her bir kemik iliği örneği immünohistokimyasal olarak p53 antikor ve PUMA antikor ile boyandı.

3.3. MM HASTALARININ KLİNİK VE LABORATUAR DEĞERLENDİRİLMESİ

Hastaların klinik verilerine hasta dosyalarındaki bilgilerden ulaşıldı. Laboratuvar verileri Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Enlil veri tabanından elde edildi. IMWG ve DURİE-SALMON tanı kriterlerine göre multiple miyelom tansı konan her bir hasta ISS ve DURİE-SALMON evreleme sistemlerine göre kategorize edildi. Hastaların tanı anındaki klinik ve laboratuvar bulguları SSPS veri tabanına kaydedildi.

3.4. İMMUNHİSTOKİMYASAL METOD

Multipl miyelom hastalarının tanı anında alınmış kemik iliği biyopsi kesitleri parafin blok halindeki kemik iliği örneklerinden hazırlandı.

Ve örneklerin hepsine immunhistokimyasal boyama uygulandı. Boyama için 5 µm doku kesitleri hazırlandı. Kesitler önce deparafinize ve rehidrate edildi. Endojen peroksidaz aktivitesi 15 dk boyunca %80 metanol, % 0.5 hidrojen peroksit içeren solusyonda bloke edildi. Ardından 10 mmol/L sitrat tampon (pH 6.0) ve mikrodalgada (700 W) 15 dk muamele edildi. Oda ısısında 40 dk soğumaya bırakıldı. İmmunhistokimya işlemi öncesinde fosfat tampon tuzunda (PBS) 5 dk yıkandı. Her bir kesit P53 antikoru (A00021.0025 - p53; Clone DO-7, ScyTek) ve PUMA antikoru ([EP512Y], GeneTex, GTX61282) ile 60 dk inkübe edildi. PBS ile yıkandıktan sonra biotin işaretli sekonder antikor ve ardından streptavidin + peroksidaz uygulandı. Kesitler 3,3'diaminobenzidin ve hematoksilin ile boyandı.

İmmunhistokimyasal boyama sonrası pozitif boyanın her kemik iliğinin boyanma yaygınlığı kuvveti hesaplandı.

3.5. İSTATİKSEL METOD

Sürekli değişkenlerin karşılaştırılması için T testi ve ANOVA kullanıldı. Sürekli değişkenler ortalama, standart sapma, (min, max, medyan) şeklinde, kategorik değişkenler yüzdeler kullanılarak verildi. Ki kare testi kullanıldı, anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak alındı.

3.6. ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma N.E.Ü.Meram Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 07.06.2013 tarih ve 2013/437 toplantı karar sayısı ile onay alınarak yapılmıştır

4.BULGULAR

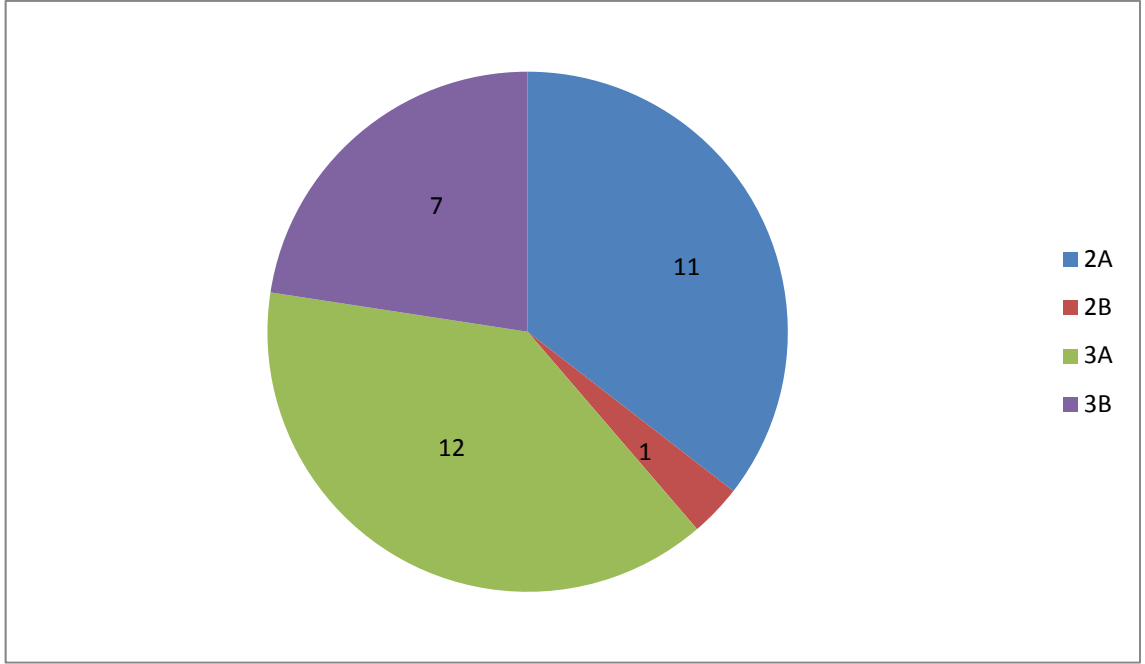
Çalışmamıza 13 kadın (%42) ve 18 erkek (%58) olmak üzere 31 multipl miyelom hastası dahil edildi. Kontrol grubunda 6 erkek 6 kadın olmak üzere toplam 12 normal bireyden alınmış kemik iliği örneği mevcuttu. Hastalarımızın tanı anındaki ortalama yaş 69/ yıl (min-max) idi. Çalışmamızdaki hastalarımızın 3' ü nüks multipl miyelomdu. Tanı anında hemogloblin değerleri 10.092 ± 1.9525 g/dl, trombosit sayısı 231.42 ± 98.415 (μ/L), lökosit sayısı 6.684 ± 3.2733 (μ/L) idi. Hastalarımızın kreatinin değerleri 1.4626 ± 1.12619 (mg/dl), kalsiyum değerleri 9.1758 ± 1.42068 (mEq/L) idi (Tablo 10).

Çalışmamıza katılan hastalarımızın ikisinde nötrojeni ($neu < 1500 \mu/L$) dokuzunda trombositopeni ($plt < 150.000 \mu/L$) ve beşinde hipoalbuminemi ($albumin < 2.5$ g/dl) tanı anında mevcuttu.

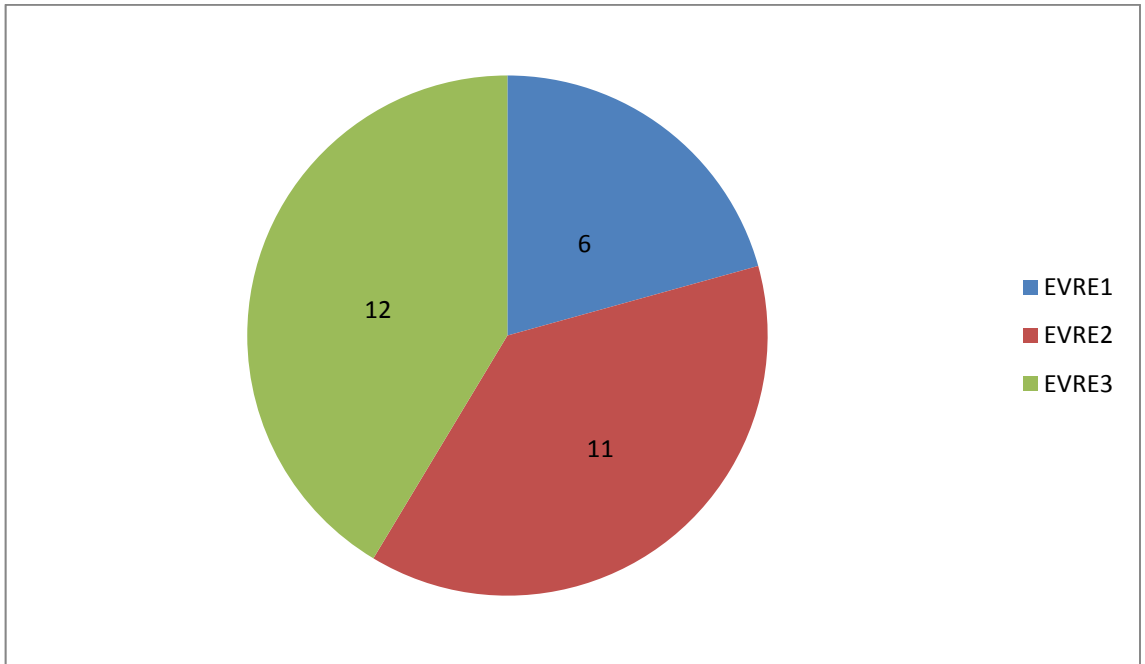
Tablo 10: Hasta bilgileri

	N	Minimum	Maximum	Ortalama	Std. Sapma
Yaş	31	45	76	65,74	9,007
Hgb	31	6,0	14,8	10,092	1,9525
Neu	31	1,0	11,8	3,963	2,4338
Wbc	31	2,0	14,7	6,684	3,2733
Plt	31	129	515	231,42	98,415
Sedimantasyon	31	8	130	72,58	41,612
Albumin	31	2,0	4,3	3,213	,6541
Total protein	31	5,3	14,2	9,117	2,3890
Kreatinin	31	0,50	5,09	1,4626	1,12619
Kalsiyum	31	7,70	14,05	9,1758	1,42068
Beta2mikroglobulin	29	0,37	23,60	7,1258	6,58243

Durie- Salmon evreleme sistemine; göre hastalarımızın 11'i (%35) evre 2A, 1' i (%3) evre 2B, 12' si (%39) evre 3A ve 7' si (%23) 3B idi. Beta 2 mikroglobulin sonucu bulunmayan 2 hasta ISS evreleme sistemine göre evrelendirilemedi. Diğer hastalarımızın 6' sı (%21) ISS evreleme sistemine göre evre 1, 11' i (%38) evre 2, 12' si (%41) evre 3 idi (Grafik1- 2).

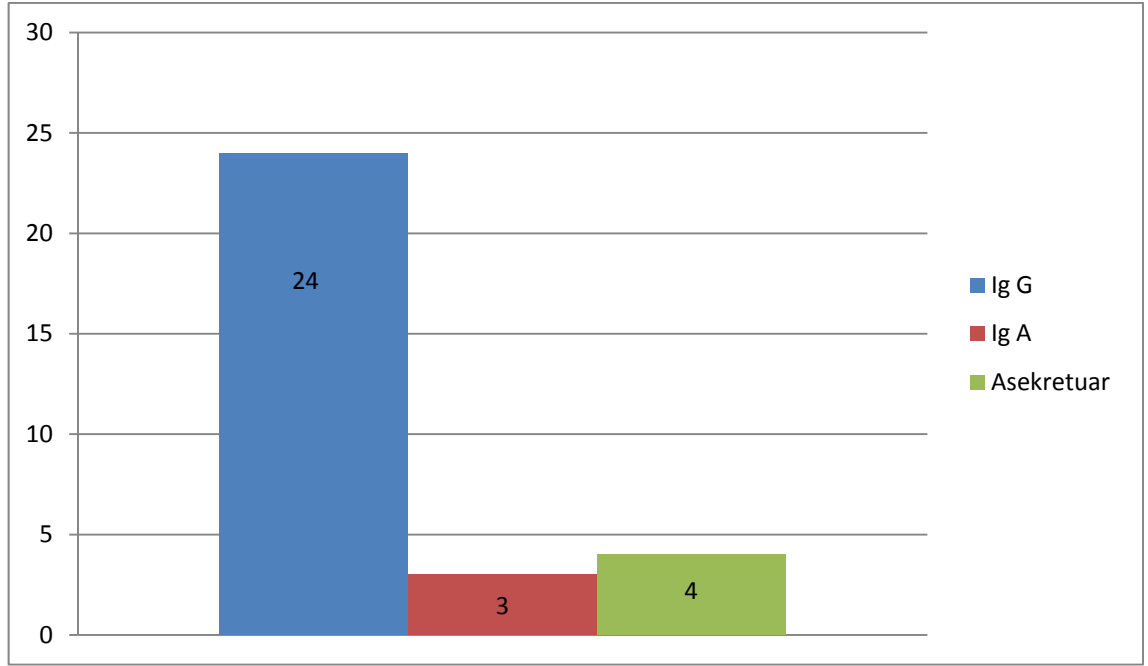


Grafik 1: Durie- salmon evreleme sistemine göre dağılım



Grafik 2: ISS evreleme sistemine göre dağılım

İmmunglobulin alt gruplarına göre hastalarımızın 24' ü Ig G miyelom, 3' ü Ig A miyelom, 4 tanesi ise asekretuar miyelomdu. Tanı anında immunglobulin düzey ortalaması 49.642 ± 26.19 (mg/dl) idi (Grafik 3).

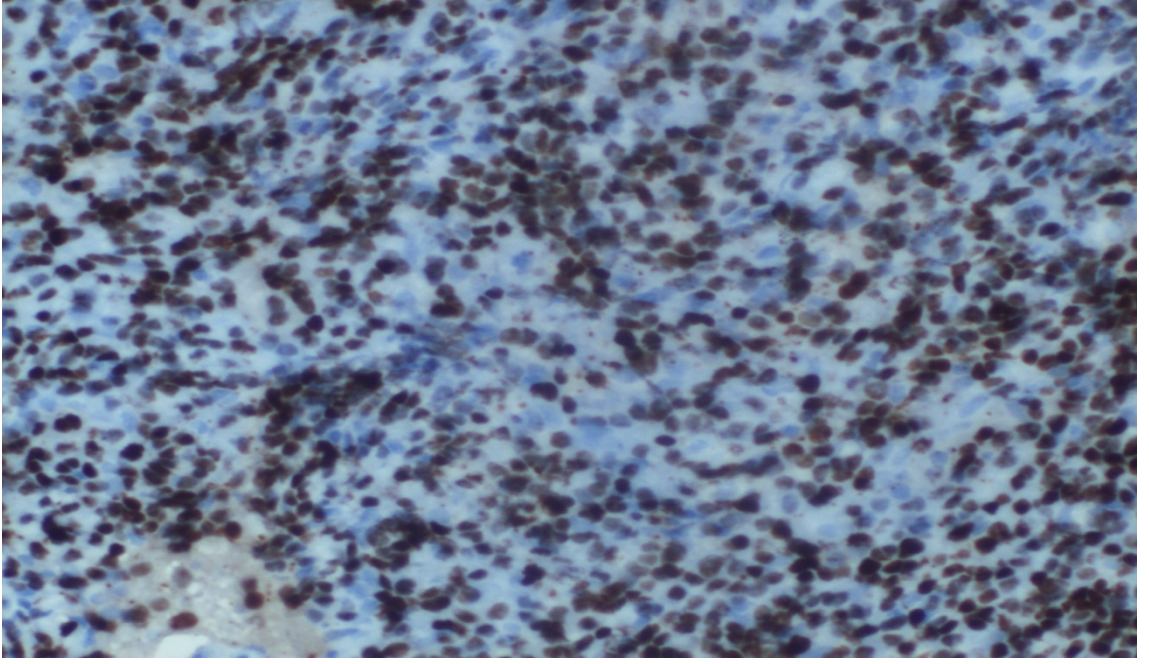


Grafik 3: İmmunglobulin alt tiplerine göre dağılım

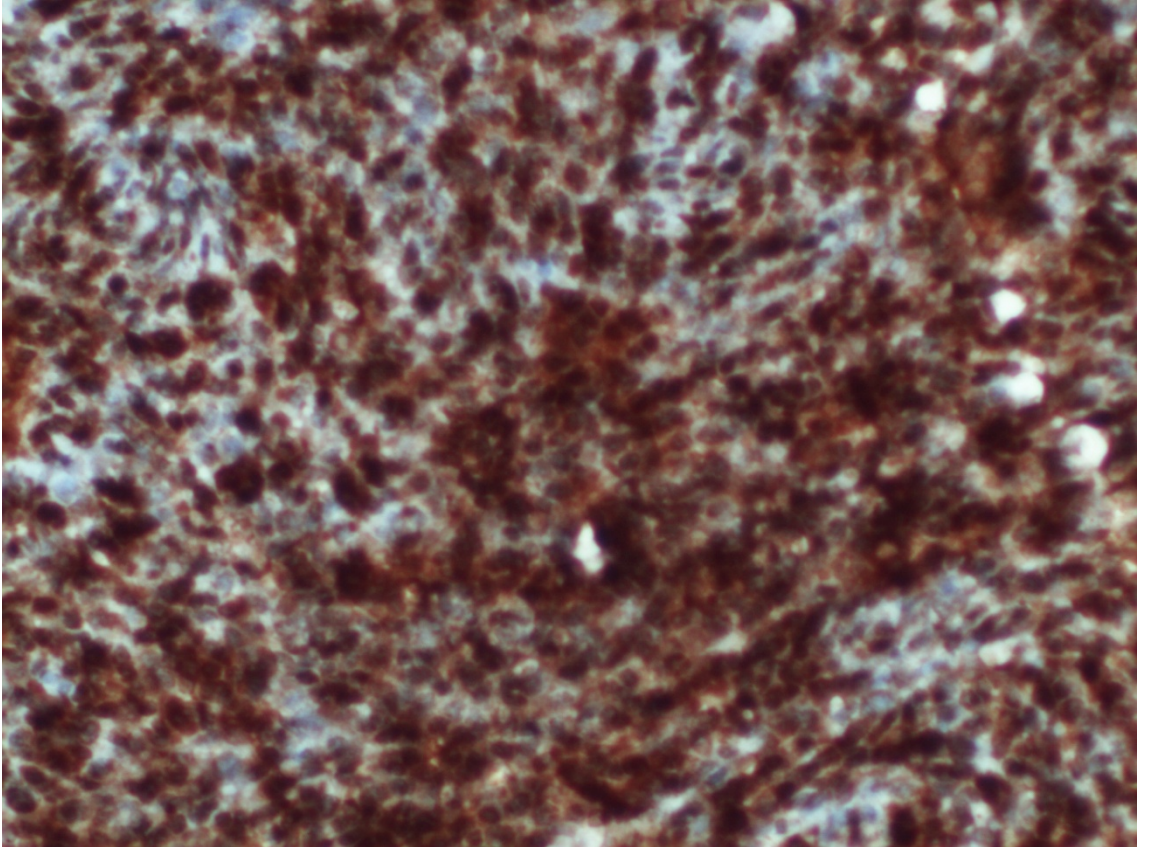
Hastalarımızın serum ve idrar immun elektroforez değerlendirilmesinde 21' inde (%68) kappa, 9' unda (%29) lambda monoklonal proteini saptandı. Tanı anında hastalarımızın 25' inde (%81) litik lezyon, 7 tanesinde (%23) ise plazmasitom bulumaktaydı. Hastalarımız bence- jones proteini açısından tarandığında 4 hastanın sonucuna ulaşılabildi ve sadece birinde bence- jones protein pozitifliği saptandı.

Hastaların sitogenetik analizinde 22 hastanın sonucuna ulaşılabildi. 20' sinde normal karyotip saptanırken 2' sinde y kromozom kaybı saptandı. FISH taramasında ise 24 hastanın sonucuna ulaşılabildi. 14 hastanın FISH sonucu normal iken 5 hastada 13q14.3 ve 1 hastada p53 gen bölgelerinde delesyon izlendi. t(4,14) 2, t(6,14) 3, t(11,14) 4 ve t(14,20) 2 hastada görüldü. Ayrıca birer hastada CKS1B gen amplifikasyonu, IGH/BREAKAPART (14. Kromozom üzerinde yeniden düzenlenme) ve CBFB/MYH11 gen füzyonu tespit edildi.

Kemik iliği biyopsi örneklerinde p53 nükleer (Şekil 2) ve PUMA sitoplazmik (Şekil 3) boyama paterni gösterdi. Kontrol grubunda p53 ve PUMA ile boyama olmazken hasta grubumuzda 8 hastada p53 ile boyama 28 hastada PUMA ile boyama saptandı (Tablo 11). Hastaların 6' sı hem p53 hem PUMA beraber boyanma özelliği gösterdi. PUMA ile boyanan preparatlar boyama kuvvetlerine göre hafif orta ve güçlü olarak sınıflandırıldı. Ayrıca PUMA ve p53 pozitifliği saptanan örneklerin yaygınlık derecesi belirtildi.



Şekil 2: P53 pozitif boyanan MM kemik iliği örneği



Şekil 3: PUMA pozitif boyanan MM kemik iliği örneği

Tablo 11: P53 ve PUMA boyanma sıklığı

		Sıklık	Yüzde	Geçerli Yüzde	Kümülatif Yüzde
p53	negatif	23	74,2	74,2	74,2
	pozitif	8	25,8	25,8	25,8
	Total	31	100,0	100,0	100,0

		Sıklık	Yüzde	Geçerli Yüzde	Kümülatif Yüzde
PUMA	negatif	3	9,7	9,7	9,7
	pozitif	28	90,3	90,3	90,3
	Total	31	100,0	100,0	100,0

		MM	Kontrol	p
PUMA	negatif	3	12	0.000
	pozitif	28	0	
	Total	31	12	

Hastalarımız tanı anındaki Durie- Salmon ve ISS evreleme sistemine göre sınıflandırıldıktan sonra PUMA boyanma kuvveti ve oranları ile karşılaştırmak için gruplandırıldı. Gruplar arasında boyanma kuvveti ve yaygınlığı arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p=0.771$ - $p=0.936$) (Tablo 12).

Tablo 12: PUMA pozitifliği ile hastalık evresi karşılaştırılması

			Durie-Salmon				Total
			2a	3a	2b	3b	
PUMA kuvvet	zayıf	Sayılan	2	0	1	2	5
		% evredurie	20,0%	0,0%	100,0%	33,3%	17,9%
	orta	Sayılan	6	5	0	1	12
		% evredurie	60,0%	45,5%	0,0%	16,7%	42,9%
	güçlü	Sayılan	2	6	0	3	11
		% evredurie	20,0%	54,5%	0,0%	50,0%	39,3%
Total		Sayılan	10	11	1	6	28
		% evredurie	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

			ISS			Total
			bir	iki	üç	
PUMA kuvvet	zayıf	Sayılan	1	1	3	5
		%evreiss	20,0%	9,1%	30,0%	19,2%
	orta	Sayılan	2	7	2	11
		% evreiss	40,0%	63,6%	20,0%	42,3%
	kuvvetli	Sayılan	2	3	5	10
		% evreiss	40,0%	27,3%	50,0%	38,5%
Total		Sayılan	5	11	10	26
		% evreiss	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Durie-salmon	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	Ortalama için Güven aralığı %95		Minimum	Maximum
					Alt Sınır	Üst Sınır		
2a	10	79,00	21,705	6,864	63,47	94,53	30	95
3a	10	86,50	5,798	1,833	82,35	90,65	80	95
2b	1	80,00	.	.	.	.	80	80
3b	6	81,67	16,931	6,912	63,90	99,43	50	95
Total	27	82,41	15,527	2,988	76,27	88,55	30	95

ISS	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	Ortalama için Güven aralığı %95		Minimum	Maximum
					Alt Sınır	Üst Sınır		
bir	5	80,00	17,321	7,746	58,49	101,51	50	90
iki	10	82,50	19,472	6,158	68,57	96,43	30	95
üç	10	83,00	13,166	4,163	73,58	92,42	50	95
Total	25	82,20	16,078	3,216	75,56	88,84	30	95

PUMA pozitif boyanan hastaların 14' ünde anemi (hgb<10 g/dl), 2' sinde nötropeni ve 9' unda trombositopeni mevcuttu. Hastalar anemi nötropeni ve trombositopeni özelliklerine gruplandırıldıktan sırasıyla PUMA boyanma kuvveti ve yaygınlığı karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık saptanmadı (p=0.549, p=0.445, p=0.496) (Tablo 13- 14- 15).

Tablo 13: Anemi ile PUMA boyanma kuvvet ve yaygınlığının karşılaştırılması

			Hgb grup		Total
			10 Altı	10 Üstü	
PUMA kuvvet	zayıf	Sayılan	3	2	5
		% hgb grup	21,4%	14,3%	17,9%
	orta	Sayılan	5	7	12
		% hgb grup	35,7%	50,0%	42,9%
	kuvvetli	Sayılan	6	5	11
		% hgb grup	42,9%	35,7%	39,3%
Total		Sayılan	14	14	28
		% hgb grup	100,0%	100,0%	100,0%

	Hgb grup	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata Ortalama
PUMA yaygınlık	10 Altı	13	82,69	17,031	4,724
	10 Üstü	14	82,14	14,639	3,912

Tablo 14: Nötropeni ile PUMA boyanma kuvvet ve yaygınlığının karşılaştırılması

			Neu grup		Total
			1500 Altı	1500 Üstü	
PUMA kuvvet	zayıf	Sayılan	1	4	5
		% neu grup	50,0%	15,4%	17,9%
	orta	Sayılan	1	11	12
		% neu grup	50,0%	42,3%	42,9%
	kuvvetli	Sayılan	0	11	11
		% neu grup	0,0%	42,3%	39,3%
Total		Sayılan	2	26	28
		% neu grup	100,0%	100,0%	100,0%

	Neu grup	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata Ortalama
PUMA yaygınlık	1,5 Altı	2	55,00	35,355	25,000
	1,5 Üstü	25	84,60	11,895	2,379

Tablo 15: Trombositopeni ile PUMA boyanma kuvvet ve yaygınlığının karşılaştırılması

			Plt grup		Total
			150 Altı	150 Üstü	
PUMA kuvvet	zayıf	Sayılan	1	4	5
		% plt grup	11,1%	21,1%	17,9%
	orta	Sayılan	5	7	12
		% plt grup	55,6%	36,8%	42,9%
	kuvvetli	Sayılan	3	8	11
		% plt grup	33,3%	42,1%	39,3%
Total		Sayılan	9	19	28
		% plt grup	100,0%	100,0%	100,0%

	Plt grup	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata Ortalama
PUMA yaygınlık	150 Altı	8	85,63	6,232	2,203
	150 Üstü	19	81,05	18,072	4,146

PUMA pozitifliği olan hastalar hipoalbuminemi (<2.5 g/dl), kreatinin yüksekliği (>1.5 mg/dl) ve beta 2 mikroglobulin (>3.5 mg/L) yüksekliğine göre sınıflara ayırıldı. Hipoalbuminemi (p=0.171), kreatinin yüksekliği (p=0.807), beta 2 mikroglobulin yüksekliği (p=0.702) PUMA boyanma kuvveti ve yaygınlığı ile kıyaslandığında anlamlı farklılık bulunmadı (Tablo 16- 17- 18)

Tablo 16: Hipoalbuminemi ile PUMA boyanma kuvvet ve yaygınlığının karşılaştırılması

			Alb grup		Total
			2,5 Altı	2,5 Üstü	
PUMA kuvvet	zayıf	Sayılan	2	3	5
		% alb grup	50,0%	12,5%	17,9%
	orta	Sayılan	2	10	12
		% alb grup	50,0%	41,7%	42,9%
	kuvvetli	Sayılan	0	11	11
		% alb grup	0,0%	45,8%	39,3%
Total		Sayılan	4	24	28
		% alb grup	100,0%	100,0%	100,0%

	Alb grup	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata Ortalama
PUMA yaygınlık	2,5 Altı	4	72,50	15,000	7,500
	2,5 Üstü	23	84,13	15,274	3,185

Tablo 17: Kreatinin yüksekliği ile PUMA boyanma kuvvet ve yaygınlığının karşılaştırılması

			Kreatinin grup		Total
			1,5 Altı	1,5 Üstü	
PUMA kuvvet	zayıf	Sayılan	2	3	5
		% kreatinin grup	10,0%	37,5%	17,9%
	orta	Sayılan	10	2	12
		% kreatinin grup	50,0%	25,0%	42,9%
	kuvvetli	Sayılan	8	3	11
		% kreatinin grup	40,0%	37,5%	39,3%
Total		Sayılan	20	8	28
		% kreatinin grup	100,0%	100,0%	100,0%

	Kreatinin grup	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata Ortalama
PUMA yaygınlık	1,5 Altı	19	82,89	16,357	3,752
	1,5 Üstü	8	81,25	14,330	5,067

Tablo 18: Beta2mikroglobulin yüksekliği ile PUMA boyanma kuvvet ve yaygınlığının karşılaştırılması

			Beta2 grup		Total
			3,5 Altı	3,5 Üstü	
PUMA kuvvet	zayıf	Sayılan	1	4	5
		% beta2grup	11,1%	23,5%	19,2%
	orta	Sayılan	5	6	11
		% beta2grup	55,6%	35,3%	42,3%
	kuvvetli	Sayılan	3	7	10
		% beta2grup	33,3%	41,2%	38,5%
Total		Sayılan	9	17	26
		% beta2grup	100,0%	100,0%	100,0%

	Beta2 grup	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata Ortalama
PUMA yaygınlık	3,5 Altı	9	83,89	13,642	4,547
	3,5 Üstü	16	81,25	17,654	4,414

Litik lezyon ve plazmositom saptanan hastalardan PUMA pozitif boyanma sayısı sırası ile 21 ve 7 idi. Litik lezyon ve plazmositom varlığının PUMA boyanma kuvveti ve yaygınlığı ile karşılaştırılmasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p=0.477$, $p=0.617$) (Tablo 19- 20).

Tablo 19: Litik lezyon varlığı ile PUMA boyanma kuvvet ve yaygınlığının karşılaştırılması

			Litik lezyon	
			yok	var
PUMA kuvvet	zayıf	Sayılan	2	3
		% litik lezyon	33,3%	13,6%
	orta	Sayılan	2	10
		% litik lezyon	33,3%	45,5%
	kuvvetli	Sayılan	2	9
		% litik lezyon	33,3%	40,9%
Total		Sayılan	6	22
		% litik lezyon	100,0%	100,0%

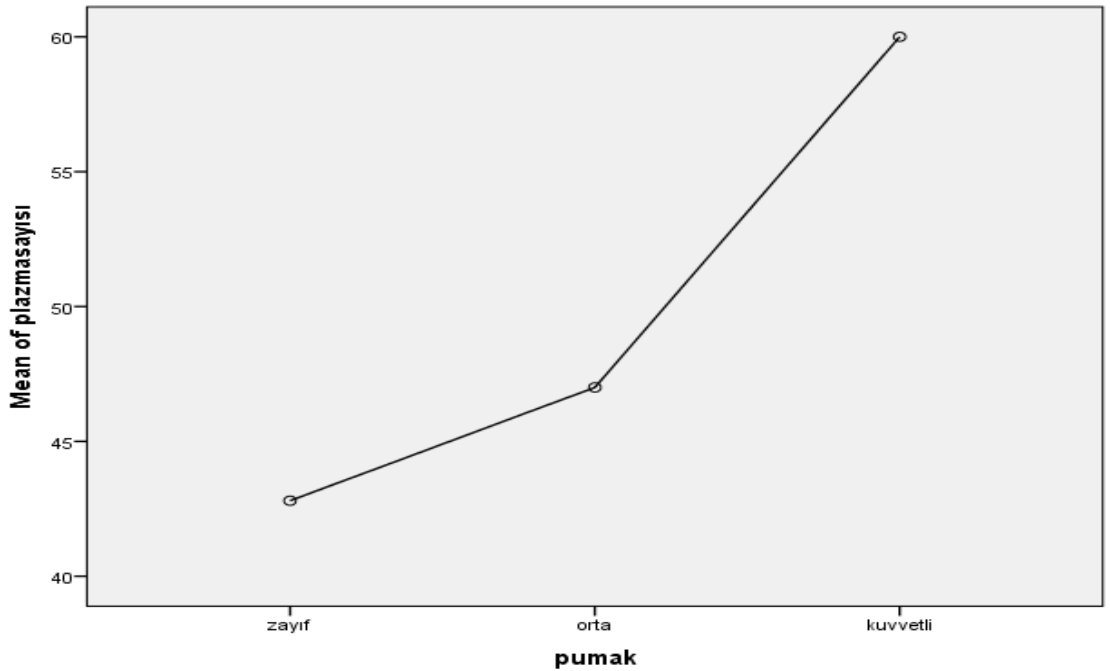
	Litik lezyon	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata Ortalama
PUMA yaygınlık	yok	6	78,33	24,631	10,055
	var	21	83,57	12,464	2,720

Tablo 20: Plazmasitom varlığı ile PUMA boyanma kuvvet ve yaygınlığının karşılaştırılması

			Plazmasitom		Total
			yok	var	
PUMA kuvvet	zayıf	Sayılan	4	1	5
		% plazmasitom	19,0%	14,3%	17,9%
	orta	Sayılan	8	4	12
		% plazmasitom	38,1%	57,1%	42,9%
	kuvvetli	Sayılan	9	2	11
		% plazmasitom	42,9%	28,6%	39,3%
Total		Sayılan	21	7	28
		% plazmasitom	100,0%	100,0%	100,0%

	Plazmasitom	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata Ortalama
PUMA yaygınlık	yok	20	81,50	17,704	3,959
	var	7	85,00	6,455	2,440

Hastalarımızın tanı anındaki kemik iliği biyopsisindeki plazma hücre oranları ortalama 51.42 ± 27.616 (%) idi. Plazma hücre oranı PUMA boyanma kuvveti ve yaygınlığı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkili saptanmasa da boyanma kuvveti arttıkça plazma oranının arttığı görüldü ($p=0.385$) (Grafik 4) (Tablo 21).



Grafik 4: Plazma oranı ile PUMA boyanma kuvvet karşılaştırılması

Tablo 21: Plazma oranı ile PUMA boyanma kuvvet ve yaygınlığının karşılaştırılması

Plazma oranı	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	Ortalama için Güvenli aralığı %95		Minimum	Maximum
					Alt Sınır	Üst Sınır		
zayıf	5	42,80	30,120	13,470	5,40	80,20	12	80
orta	12	47,00	27,977	8,076	29,22	64,78	12	95
kuvvetli	11	60,00	23,664	7,135	44,10	75,90	20	90
Total	28	51,36	26,704	5,047	41,00	61,71	12	95

5.TARTIŞMA

Multipl miyelom lenfoplazmaositer hücrelerin neoplastik monoklonal artışı ile karakterize bir hastalıktır. Lenfomadan sonra en sık görülen hematolojik malignitedir. Hastalığın patogeneğinde sitogenetik anomaliler, kronik antijen sunumu, apoptotik yoldaki mutasyonlar suçlanmasına rağmen halen tam bir netlik söz konusu değildir (Loth 1991).

Multipl miyelom gibi hücre döngüsü yavaş tümörlerin patogeneğinde kronik antijen sunumu önemlidir. Romatoid artritte miyelom sıklığının artması (Isomaki 1978), HIV ve HSV gibi viral uyarının hastalığın patogeneğinde rol oynayabileceğini gösteren çalışmalar bu hipotezi desteklemektedir (Berenson 1999).

MM patogeneğinde rolü olan bir diğer neden de sitogenetik anomalilerdir. Hastaların yaklaşık %30-50 kromozomal bozukluk gözükmemektedir (Hallek 1998). Bu oran hastalığın erken evrelerinde daha az ilerleyen evrelerinde daha yüksek oranlarda gözükmemektedir. Olguların büyük bir bölümünde tek bir kromozomal anormallik olmamakla beraber, çoğunda hiperdiploidi monozomi 13 tetrazomi 9 gibi sayısal anormallik vardır. Yapısal anormallikler içinde ise en sık rastlananlar translokasyonlar; t(8;14) (q24;q32) ve t(11;14) (q13;q32)' dir. Bunlardan 8q24, cmyc ve 11q13 ise bcl-1 protonkogenlerini tanımlamaktadır. 14q32 ise Ig ağır zincir geninin lokusudur (Taniwaki 1996).

Miyelom etyopatogeneğinde ön plana çıkan nedenlerden biri de apoptotik yolda ki mutasyonlardır (Feinman 1997). Apoptozis programlı hücre ölümüdür. DNA ve/veya proteinlerde hasar geldiği zaman birincil hücresel cevap hasarın düzeltilmesidir. Hasar ciddi ise programlı hücre ölümü ile ortadan kaldırılır. Bu süreci kontrol eden faktör p53' tür. Sağlıklı bireylerde transkripsiyon faktörü olarak görev yapan p53' ün hasar meydana geldiği zaman düzeyi artar ve hücre apoptozise gider (Ryan 2011).

P53 Bcl-2 aracılığıyla apoptozisi gerçekleştirmektedir. PUMA ise Bcl-2 ailesi üyelerinden BH-3 subgrubu arasında olup potent öldürücülerinden biridir. PUMA sitoplazmik p53'ün antiapoptotik Bcl-XL'den ayrılmasını sağlayarak, p53'ün proapoptotik Bax'ı aktive etmesini sağlar ve mitokondri dışı membran permeabilitesini artırıp apoptozisi gerçekleştirir. PUMA p53, iskemi, DNA hasarı gibi nedenlerle indüklenerek saatler içerisinde apoptozise neden olur (Yu 2003).

p53 mutasyonu multipl miyelomda tanı sırasında nadiren mevcut olup genellikle yüksek riskli ve ileri evre miyelom olgularında görülmektedir (Liu 1996). Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak tanı anında hastaların 8' inde p53 pozitifliği saptanırken, p53 yaygınlığı bir hastada %80 diğer hastalarda %20' nin altındaydı.

Tanı anında hastalarımızın 28' inde PUMA ve 8' inde p53 pozitifliği vardı. PUMA pozitif boyanan hastaların sadece 1' inde PUMA boyanma yaygınlığı %50' nin altında iken p53 boyanma özelliği gösteren örneklerin sadece 1' inde %50' nin üzerindeydi. PUMA pozitifliğinin p53 pozitifliğine oranla daha yüksek oranda pozitif bulunması ise hastalığın erken evrelerinde p53 bağımsız nongenotoksik nedenlerle PUMA' nın indüklenerek multipl miyelom patogeneze katkısı bulunduğunu düşündürmektedir.

Normal yaşam döngüsünde kök hücrelerinin varlığının idame ettirilmesi ve tümör oluşumunun engellenmesi için apoptozis mutlaka gereklidir. Defektif apoptozis olan hastalıklarda özellikle PUMA aracılıklı apoptozise hiperproliferasyon ve rejenerasyonlar, malign transformasyon gelişimini kolaylaştırabilir. Qui ve arkadaşları PUMA bağımlı apoptozisin, kompensatuar hiperproliferasyon ile hepatokarsinogenezi arttırdığını göstermişlerdir (Qiu 2011). Yine weber ve arkadaşları Bcl-2 ailesi üyelerinden antiapoptotik Mcl-1' in farelerde hepatosit spesifik delesyonunun, hiperapoptotik bir ortam oluşturarak, karaciğer hücrelerinde apoptozisi arttırdığını ve kompensatuar hiperproliferasyon ile hepatosellüler kanser gelişimini kolaylaştırdığını göstermişlerdir (Weber 2010). Yu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada PUMA eksikliğinin radyasyona karşı hematopoetik hücreleri koruyucu etkisi gösterilmiştir. Çalışmalarında radyasyon verildikten 24 saat sonra gelişen DNA hasarı değerlendirildiğinde, PUMA-/- farelerin PUMA+/+ farelere oranla daha az DNA hasarına sahip olduğunu öne sürmüşlerdir (Soenen 1998). Raza ve arkadaşlarının yaptığı çalışma da MDS' de kemik iliği parankimal ve stromal hücrelerde apoptozis olduğunu fakat lösemik transformasyon gösteren hücrelerde olmadığını göstermişlerdir (Raza 1995). Bu da; PUMA' ya bağlı apoptozisin normal hücrelerde klonal hücrelere kıyasla daha fazla olduğunu düşündürmektedir. Çalışmamıza katılan hastaların kemik iliğindeki plazma hücre yüzdesi ile PUMA boyanma kuvveti arasında ($p=0.385$) istatistiksel olarak anlamlı olmasa da bir ilişki bulunmuştur. Bu durum PUMA ekspresyonlarının DNA onarımını önleyerek apoptozise dirençli plazma hücre oluşumuna neden olabileceğini akla getirmektedir. Ek olarak apoptotik hücre kaybı nedeniyle oluşan boş alana, apoptozisin yok veya az olduğu klonal hematopoetik hücre

yerleşerek burada ki boşluğu doldurmak için artmış çoğalma ile hastalığın ilerleyişine katkıda bulunuyor olabilir.

Coutinho ve arkadaşlarını yapmış olduğu çalışmada oral squamöz hücreli karsinom nüksünde PUMA ekspresyonu yüksek iken, yine düşük ekspresyon daha iyi ve hastalıksız sağ kalım ile ilişkili bulunmuştur (Coutinho-Camillo 2010). Bu çalışmada hastalık evresi ile PUMA boyanma kuvvet ve yaygınlığı karşılaştırılmasında istatistiksel olarak ($p=0.771$, $p=0.936$) anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Ancak çalışmaya dahil edilen hasta sayısının az olması net bir sonuca ulaşamıyor olmamıza ve dolayısıyla yorum yapmamıza engel olmaktadır.

Sonuç olarak bu çalışmada multipl miyelomda PUMA ve p53 çalışılmıştır ve sonuçlarda özellikle normal hematopoz içeren kemik iliği örneklerine göre hastalara ait kemik iliği örneklerinde artmış PUMA ve p53 pozitifliği bulduk. Ayrıca PUMA boyanma kuvveti ile kemik iliği arasında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da bir ilişki saptadık. Hastalara ait anemi, nötropeni, trombositopeni, kreatinin yüksekliği, hipoalbuminemi, evre, ltik lezyon ve plazmasitom varlığı gibi diğer özelliklerle karşılaştırmamızda ise herhangi bir ilişki bulamadık. Çalışmamız multipl miyelomda PUMA ekspresyonunu değerlendiren ilk çalışmadır. MM hastaları ve normal hematopoez olan kemik iliğini örneklerini karşılaştırdığımızda PUMA pozitifliğini istatistiksel olarak ($p=0.000$) anlamlı bulunması apoptozisin miyelom patogenezisine katkıda bulunduğunu düşündürmüştür. Bütün bu sonuçlar her ne kadar bir ilişkiyi desteklemiyor gibi görünse de çok daha fazla hasta katılımlı bir çalışma ile daha net sonuçlar alınacağı açıktır.

6.SONUÇLAR VE ÖNERİ

1. PUMA oranları miyelom hastalarında, normale göre anlamlı derecede yüksekti. Bu, özellikle tanı zorluğu çekilen durumlarda PUMA' nın immunhistokimyasal yardımcı test olarak kullanılabileceğini düşündürdü.
2. Multipl miyelomda normal bireylere göre daha yüksek oranda p53 ve PUMA pozitifliği bulunması, miyelomda artmış apoptozisin bir göstergesi idi.
3. PUMA pozitifliğinin tanı anında p53 pozitifliğine kıyasla daha fazla olması miyelomda PUMA' nın p53 dışı nedenlerle harekete geçtiğini göstermektedir.
4. PUMA boyanma kuvveti ile kemik iliği plazma hücresi arasında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da bir ilişki mevcuttu. Bu durum apoptotik hücre kaybına bağlı boş alana, apoptozisin az veya yok olduğu bilinen klonal hematopoetik hücreler mobilize olarak burada kompanse olarak proliferasyon bulup hastalığın progresyonuna katkıda bulunuyor olabilir.
5. PUMA boyanma kuvvet ve yaygınlığı ile hastalığın evresi, anemi, trombositopeni, nötropeni, litik lezyon, plazmasitom gibi diğer klinik bulgularla istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ancak hasta sayısının az olması daha geniş katılımlı çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşündürmektedir.
6. Çalışmamız miyelomda PUMA ekspresyonu değerlendirilen ilk çalışmadır. Önerimiz, daha fazla sayıda kemik iliği ve daha spesifik apoptotik çalışmalar ile ileri değerlendirmeler gerekmektedir.

7.KAYNAKLAR

- Alexanian R, Barlogie B ,Dixon D. Renal failure in multiple myeloma. Pathogenesis and prognostic implications. Arch Intern Med. 1990;150(8):1693-1695.
- Barlogie B, Shaughnessy J, Epstein J, Sanderson R, Anaissie E, Walker R, Tricot G.Williams Hematology.7th ed.USA: Mc Graw-Hill companies;2006
- Berenson JR ,Vescio RA. HHV-8 is present in multiple myeloma patients. Blood. 1999;93(10):3157-3159; discussion 3164-3156.
- Bird JM, Owen RG, D'Sa S, Snowden JA, Pratt G, Ashcroft J, et al. Guidelines for the diagnosis and management of multiple myeloma 2011. Br J Haematol. 2011;154(1):32-75.
- Blade J, Fernandez de Larrea C, Rosinol L, Cibeira MT, Jimenez R ,Powles R. Soft-tissue plasmacytomas in multiple myeloma: incidence, mechanisms of extramedullary spread, and treatment approach. J Clin Oncol. 2011;29(28):3805-3812.
- Broderick P, Chubb D, Johnson DC, Weinhold N, Forst A, Lloyd A, et al. Common variation at 3p22.1 and 7p15.3 influences multiple myeloma risk. Nat Genet. 2012;44(1):58-61.
- Ciulli S. Multiple myeloma. Clin Cases Miner Bone Metab. 2012;9(3):150-152.
- Coutinho-Camillo CM, Lourenco SV, Nishimoto IN, Kowalski LP ,Soares FA. Expression of Bcl-2 family proteins and association with clinicopathological characteristics of oral squamous cell carcinoma. Histopathology. 2010;57(2):304-316.
- Feinman R, Sawyer J, Hardin J ,Tricot G. Cytogenetics and molecular genetics in multiple myeloma. Hematol Oncol Clin North Am. 1997;11(1):1-25.
- Gordon M.Postgraduate Haematology;2005;1-12
- Grosbois B, Jegou P, Attal M, Payen C, Rapp MJ, Fuzibet JG, et al. Familial multiple myeloma: report of fifteen families. Br J Haematol. 1999;105(3):768-770.
- Hallek M, Bergsagel PL ,Anderson KC. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. Blood. 1998;91(1):3-21.
- Haupt S, Alsheich-Bartok O ,Haupt Y. Clues from worms: a Slug at Puma promotes the survival of blood progenitors. Cell Death Differ. 2006;13(6):913-915.
- Hofseth LJ, Hussain SP ,Harris CC. p53: 25 years after its discovery. Trends Pharmacol Sci. 2004;25(4):177-181.
- Isomaki HA, Hakulinen T ,Joutsenlahti U. Excess risk of lymphomas, leukemia and myeloma in patients with rheumatoid arthritis. J Chronic Dis. 1978;31(11):691-696.
- Jabbour AM, Daunt CP, Green BD, Vogel S, Gordon L, Lee RS, et al. Myeloid progenitor cells lacking p53 exhibit delayed up-regulation of Puma and prolonged survival after cytokine deprivation. Blood. 2010;115(2):344-352.
- Jabbour AM, Gordon L, Daunt CP, Green BD, Kok CH, D'Andrea R, et al. p53-Dependent transcriptional responses to interleukin-3 signaling. PLoS One. 2012;7(2):e31428.
- Kumar SK, Mikhael JR, Buadi FK, Dingli D, Dispenzieri A, Fonseca R, et al. Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines. Mayo Clin Proc. 2009;84(12):1095-1110.
- Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. Mayo Clin Proc. 2003;78(1):21-33.
- Kyritsonis M, Maltezas D, Tzenou T, Kouliris E, Bradwell A.Semin Hematology;2009
- Lai JL, Zandecki M, Mary JY, Bernardi F, Izydorczyk V, Flactif M, et al. Improved cytogenetics in multiple myeloma: a study of 151 patients including 117 patients at diagnosis. Blood. 1995;85(9):2490-2497.

- Liu P, Leong T, Quam L, Billadeau D, Kay NE, Greipp P, et al. Activating mutations of N- and K-ras in multiple myeloma show different clinical associations: analysis of the Eastern Cooperative Oncology Group Phase III Trial. *Blood*. 1996;88(7):2699-2706.
- Loth TS, Perrotta AL, Lima J, Whiteaker RS, Robinson A. Genetic aspects of familial multiple myeloma. *Mil Med*. 1991;156(8):430-433.
- Longo D. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 5th ed. Nobel; 2001.
- Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*. 2000;21(3):485-495.
- Lynch HT, Sanger WG, Pirruccello S, Quinn-Laquer B, Weisenburger DD. Familial multiple myeloma: a family study and review of the literature. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93(19):1479-1483.
- Ni Chonghaile T, Sarosiek KA, Vo TT, Ryan JA, Tammareddi A, Moore Vdel G, et al. Pretreatment mitochondrial priming correlates with clinical response to cytotoxic chemotherapy. *Science*. 2011;334(6059):1129-1133.
- Qiu W, Wang X, Leibowitz B, Yang W, Zhang L, Yu J. PUMA-mediated apoptosis drives chemical hepatocarcinogenesis in mice. *Hepatology*. 2011;54(4):1249-1258.
- Rajkumar SV, Kyle RA. Multiple myeloma: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc*. 2005;80(10):1371-1382.
- Raza A, Gezer S, Mundle S, Gao XZ, Alvi S, Borok R, et al. Apoptosis in bone marrow biopsy samples involving stromal and hematopoietic cells in 50 patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1995;86(1):268-276.
- Ryan KM. p53 and autophagy in cancer: guardian of the genome meets guardian of the proteome. *Eur J Cancer*. 2011;47(1):44-50.
- Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014;64(1):9-29.
- Sirohi B, Powles R. Multiple myeloma. *Lancet*. 2004;363(9412):875-887.
- Snozek CL, Katzmann JA, Kyle RA, Dispenzieri A, Larson DR, Therneau TM, et al. Prognostic value of the serum free light chain ratio in newly diagnosed myeloma: proposed incorporation into the international staging system. *Leukemia*. 2008;22(10):1933-1937.
- Soenen V, Preudhomme C, Roumier C, Daudignon A, Lai JL, Fenaux P. 17p Deletion in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. Analysis of breakpoints and deleted segments by fluorescence in situ. *Blood*. 1998;91(3):1008-1015.
- Taniwaki M, Nishida K, Ueda Y, Takashima T. Non-random chromosomal rearrangements and their implications in clinical features and outcome of multiple myeloma and plasma cell leukemia. *Leuk Lymphoma*. 1996;21(1-2):25-30.
- Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells*. 1998;3(11):697-707.
- Weber A, Boger R, Vick B, Urbanik T, Haybaeck J, Zoller S, et al. Hepatocyte-specific deletion of the antiapoptotic protein myeloid cell leukemia-1 triggers proliferation and hepatocarcinogenesis in mice. *Hepatology*. 2010;51(4):1226-1236.
- Yoshida Y. Pathobiology and clinical management; 2009;107-125.
- Yu J, Zhang L. No PUMA, no death: implications for p53-dependent apoptosis. *Cancer Cell*. 2003;4(4):248-249.
- Yu J, Zhang L. PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene*. 2008;27 Suppl 1:S71-83.