

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, **YÜKSEK LİSANS TEZİ**;
Doktora ise **DOKTORA TEZİ** ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**MİR-21, MİR-32 VE MİR-181A/B'NİN MULTİPLE
MYELOMA'DA TEDAVİYE YANIT AÇISINDAN
ARAŞTIRILMASI**

HANİ H.S. ALSAADONİ

**DANIŞMAN
PROF. DR. SADRETTİN PENÇE**

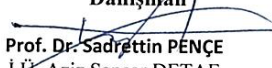
**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP PROGRAM**

İSTANBUL-2018

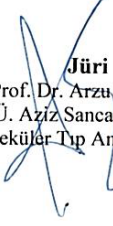
TEZ ONAYI**DOKTORA TEZİ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İ.Ü. Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı Programında Doktora Programı öğrencisi **Hani H.S.ALSAADONİ**'nin tarafından **Prof. Dr. Sadrettin PENÇE**'nin danışmanlığında hazırlanan "**MiR-21, MiR-32 ve MiR-181 a/b'nin Multiple Myeloma'da Tedaviye Yanıt Açısından Araştırılması**" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 07/08/2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Programı Tezi olarak kabul edilmiştir.


**Jüri Başkanı
Danışman**


Prof. Dr. Sadrettin PENÇE
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

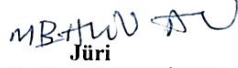
Jüri


Prof. Dr. Arzu ERGEN
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı


Jüri


Prof. Dr. Sacide PEHLİVAN
İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi
Biyoloji Anabilim Dalı

Jüri


Prof. Dr. Mustafa PEHLİVAN
Gaziantep Üniv. Tıp Fakültesi İç
Hastalıkları A.D.

Jüri


Doç. Dr. Mustafa DUMAN
Sağlık Bilimleri Ü. Tıp Fakültesi Genel
Cerrahi A.D.


BEYAN

iii

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

HANİ H.S. ALSAADONİ

 (İmza)

İTHAF

Aileme; eşim Ola'ya, çocuklarım Hala'ya, Muayyed'e, Jana'ya ve Muhammed'e ve sabırla iyileşmeyi bekleyen tüm hastalara ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasındaki yardım ve desteklerinden dolayı İ.Ü. DETAE Moleküler Tıp ABD öğretim üyesi ve danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sadrettin Pençe'ye ve Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. İlhan Yaylım'a; çalışmamızın klinik bölümünün yürütülmesinde göstermiş oldukları katkı ve desteklerinden dolayı Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı öğretim üye Sayın Prof. Dr. Mustafa Pehlivan'a ve onun ekibine; kurgusundan tamamlanmasına kadar geçen süreçte tezimin her aşamasında, çalışmam boyunca bir ekip olduğumuz ve bu çalışmanın ortaya çıkmasında en az benim kadar emek harcamış olan Prof. Dr. Sacide Pehlivan'a; tüm destekleri için sevgili arkadaşım Sağlık Bilimleri Tıbbi Fizyoloji doktora öğrencisi Bekir Erdoğan'a; gerek ders döneminde gerekse tez aşamasında bilgi ve yönlendirmeleriyle hiçbir zaman yardım ve desteklerini esirgemeyen Moleküler Tıp ABD'de görevli tüm öğretim üyesi hocalarıma ve diğer görevli arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Ayrıca maddi ve manevi hiçbir yardımı esirgemeyen anne ve babama, her zaman yanımda olan ve desteği olmadan doktora çalışmamın tamamlanmasının mümkün olmayacağı sevgili eşime çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 56338.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	XV
ABSTRACT.....	XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	8
2.1. Kanser	8
2.2. Multipl Myelom	9
2.3. Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri.....	10
2.3.1. Risk faktörleri	10
2.4. Multipl Myelom Biyolojisi - Etyopatogenez	11
2.5. Multipl Myelomun Biyolojisi	12
2.5.1. Tanı	14
2.6. Evreleme ve Prognoz	16
Evre I ya da III'e uymayan durumlar	16
2.7. Multipl Myelomda Kemik Hastalıkları.....	18
2.8. Prognostik Faktörler.....	20
2.9. Tedavi	21
2.9.1. Kemoterapi.....	22
2.9.2. Multipl Myelom Tedavisi	32
2.10. MikroRNA'lar.....	36
2.10.1. MikroRNA'lar ve Kanser.....	38
2.10.2. Multipl Myelom'da MikroRNA'lar	40
2.10.2.1. MM'de miRNA deregülasyonu.....	40

2.10.3. MM tedavisinde miRNA'lar	42
2.10.4. MiR-21	44
2.10.5. MiR-32	47
2.10.6. MiR-181a	49
2.10.7. MiR-181b	51
3. GEREÇ VE YÖNTEM	53
3.1. Materyal	53
3.2. Kimyasal Maddeler ve Diğer Gereçler	53
3.3. Cihazlar	54
3.4. Yöntem	54
3.4.1. Kandan mikroRNA İzolasyonu	54
3.4.2. Eşlenik DNA (cDNA) Sentezi	56
3.4.3. Nicel Gerçek Zamanlı PZR	56
3.4.4. İstatistiksel Analiz	58
4. BULGULAR	60
4.1. Çalışmanın Popülasyonu	60
4.1.1. Cinsiyet Dağılımı	60
4.1.2. Miyelom Örneklerinin Sitogenetik Sınıflandırması	63
4.1.3. MM hastalarının klinik özellikleri ve tedavi rejimleri	64
4.2. MikroRNA İfadesinin Nicel Değerlendirmesi	66
4.2.1. SYBR Green Kantitatif Deneyleerin Validasyonu.	66
4.3. Tedavi Yanıtı	69
4.4. Multipl Miyelom Hastalarında miR-21, miR-32, miR-181a ve miR-181b Gen Ekspresyon Seviyeleri	73
4.4.1. Multipl Miyelom Hastalarında Tedavi Öncesi ve Sonrası miR-21, miR-32, miR-181a ve miR-181b Gen Ekspresyon Seviyeleri	74
4.4.2. Remisyon ve Gen İfadesi	77
5. TARTIŞMA	79
KAYNAKLAR	85
HAM VERİLER	110
FORMLAR	121
ETİK KURUL KARARI	124
PATENT HAKKI İZİNİ	127

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	128
ÖZGEÇMİŞ	129

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1:Plazma hücresi bozuklukları için 2009’da güncellenen IMWG tanı kriterleri (58, 59). MGUS, SMM ve MM için tanı kriterleri.	14
Tablo 2.2: Multipl Myelom İçin Evreleme Sistemleri.....	16
Tablo 2.3: Multipl Myelom prognozunda hasta ile ilişkili ve tümörle ilişkili kötü prognostik faktörler.....	18
Tablo 2.4: Kemoterapi ajanlarının sınıflandırılması.....	25
Tablo 2.5:Myelomda hastalık yanıtı veya progresyonun sınıflandırılması (127).....	35
Tablo 3.1:Kantitatif PZR bileşenleri.....	57
Tablo 3.2: Kantitatif PZR koşulları	58
Tablo 4.1:MM hastalarının klinik özellikleri ve tedavi rejimleri.	64
Tablo 4.2: MM'li 38 hastada prognostik faktörlerin tek değişkenli analizi (Logrank testi).	71
Tablo 4.3: 38 MM hastasının çok değişkenli analizi (Cox orantısal risk modeli geriye doğru).....	72
Tablo 4.4: MiRNAlar gen ekspresyonunun ifade düzeylerinin ortalama farkı (Kontrol & Hasta).	73
Tablo 4.5: miR-21, miR-32, miR-181a ve miR-181’b genlerin ekspresyon seviyeleri arasındaki İlacın Ortalama farkı Tedaviden önce ve sonra.....	74
Tablo 4.6: Remisyonda miR-21, miR-32, miR-181a ve miR-181b gen ekspresyonunun ortalama seviyeleri (Azalan veya Değimeyen).	77

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1: miRNA'ların terapötik uygulamaları (29)	6
Şekil 2.1: Multipl myelomda yer alan genetik olaylar (54).....	12
Şekil 2.2:MM aşamalarının şematik modeli ve moleküler patogenez (57).....	13
Şekil 2.3:Doksozobisinin kimyasal yapısı (102).....	23
Şekil 2.4:Tümör hücrelerinde ilacın işlenişi ile ilişkili potansiyel yollar (101).....	26
Şekil 2.5:Kemoterapi tarafından tetiklenen sitotoksikite ile ilişkili potansiyel yollar (101).....	28
Şekil 2.6: miRNA biyogenezinin ve translasyonel düzenlemenin şematik gösterimi (142).....	38
Şekil 2.7: miRNA yolları ve multipl myelom patogenezi (174).....	45
Şekil 2.8: miR-21transkripsiyonu, STAT3 üzerinden IL-6 tarafından kontrol edilmektedir (180).....	46
Şekil 2.9:B hücresi gelişiminde mikroRNA'ların rolü (227).	50
Şekil 2.10:miR-181b tarafından etkilenen hedefler ve yollar (246).	52
Şekil 3.1: Amplifikasyon Eğrileri	58
Şekil 4.1: Olgu grubunun cinsiyete göre dağılımı.	60
Şekil 4.2: Kontrol grubunun cinsiyete göre dağılımı.....	61
Şekil 4.3: Olguların Durie-Salmon (S-D) Sistemine göre sınıflandırılması.	62
Şekil 4.4: Olguların Uluslararası Evreleme Sistemine (ISS) göre sınıflandırılması.....	62
Şekil 4.5: (A) (B) Multipl Myelom (MM) olgusunda kan filmi, eksantrik çekirdekli plazma hücreleri, koyu mavi sitoplazma, hof, nükleol. Multipl Myelomda (C) (D) Kemik İliği.....	63
Şekil 4.6:Vakaların tedavi durumu.	65
Şekil 4.7: Örneklerin miR-21 geninin ayrışma eğrileri: x eksenini Sıcaklık °C ve y eksenini floresan değerini temsil eder.....	66
Şekil 4.8: Örneklerin miR-181a geninin ayrışma eğrileri: x eksenini Sıcaklık °C ve y eksenini floresan değerini temsil eder.....	67
Şekil 4.9: Örneklerin miR-181b geninin ayrışma eğrileri: x eksenini Sıcaklık °C ve y eksenini floresan değerini temsil eder.....	67
Şekil 4.10: Örneklerin miR-32 geninin ayrışma eğrileri: x eksenini Sıcaklık °C ve y eksenini floresan değerini temsil eder.....	68

Şekil 4.11: Örneklerin U6 geninin ayrışma eğrileri: x ekseni Sıcaklık °C ve y ekseni floresan değerini temsil eder.....	68
Şekil 4.12: Multipl miyelom vakalarında remisyon dağılımı.	70
Şekil 4.13: Kemoterapiyi takiben, miR-21(A), miR-32(B), miR-181a(C) ve miR-181b(D) ekspresyon düzeyleri, kemoterapi tedavisi öncesi ile kıyaslandığında anlamlı derecede düşüktü.....	76
Şekil 4.14: miR-32 azalan ve değişmeyen seviyeleri.	78

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- 5FU: 5-Florourasil
- AGO2: Argonaut 2 Protein
- AML: Akut Miyeloid Lösemi
- APL: Akut Promiyelositik Lösemi
- APSCT: Otolog Periferik Kan Kök Hücre Transplantasyonu
- ASCT: Otolog Kök Hücre Nakli
- B2M: beta 2-mikroglobulin
- BM: Kemik İliği
- BMM: kemik iliği mikroçevresi
- CBX7: Chromobox Homolog 7'yi bastırmak
- CD: Farklılaşma Kümesi
- CDKN2A: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2A
- CDKN2C: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2A
- CDNA: Tamamlayıcı DNA
- CKS1B: CDC28 Protein Kinaz Düzenleyici Alt Ünitesi 1B
- CLL: Kronik Lenfositik Lösemi
- CR: Tam Cevap
- CRAB: Hiperkalsemi, Böbrek yetmezliği, Anemi ve Kemik lezyonları
- CRP: C-Reaktif Protein
- CXCR5: C-X-C motifli kemokin reseptörü 5
- CYLD: Cylindromatosi s
- Del (13): Delesyonu 13 Kromozom
- Del (17p): Delesyonu 13 Kromozom
- DKK-1: Dickkopf ile ilgili Protein 1
- DKK-1: Dickkopf-1
- DNA: DeoxyRibonucleic Acid
- ECOG: Performans Durumu

eGFR: Glomerüler Filtrasyon Oranı
ER-Negatif: Östrojen Reseptörü-Negatif
FBXW7: F-kutusu ve WD tekrarlayan etki alanı 7
FGFR3: Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 3
FISH: Floresan in situ hibridizasyon
FLC: Serbest Hafif Zinciri
GEPs: Gen Ekspresyon Profilleri
GFR: Glomerüler Filtrasyon hızı
HER-2 Pozitif: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü-2 Pozitif
HMCL: İnsan Miyelom Hücre Hatları
Ig: İmmüoglobulin
IGH: İmmüoglobulin Ağır Zincir Geni
IL-7: Interlukin7
IMiDS: İmmünomodülatör İlaçlar
IMWG: Uluslararası Miyelom Çalışma Grubu
IPI: Uluslararası Prognostik İndeks
ISS: Uluslararası Evreleme Sistemi
KDIGO: Kidney Disease Improving Global Outcomes
LDH: Laktat Dehidrogenaz
LMIC: Düşük ve Orta Gelirli Ülkeler.
MDRD: Böbrek Hastalığında Diyetin Modifikasyonu
MGUS: Belirsiz Önemi olan Monoklonal Gamopati
MIP-1a: İnflamatuar Protein-1a
MiRNAs: MikroRNA'lar
MM: Multipl Miyelom
MMCs: Multipl Miyelom Hücreleri
M-Protein: Monoklonal Protein
MRNAs: Mesajcı RNA'lar
NHL: Hodgkin olmayan lenfoma
OKHN: Otolog Kök Hücre Nakli

OncomiRNAs: Onkogen MikroRNA'lar
OPG: Decoy reseptör osteoprotegrin
OS: Genel Sağkalım
PBMC: Periferik Kan Mononükleer Hücreleri
PCAF: P300 / CBP ilişkili faktör
PCL: Plazma Hücre Lösemi
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PCs: Plazma Hücreleri
PFS: İlerlemesiz Sağkalım
PR: Kısmi Yanıt
PSMD4: Proteasome 26S alt Ünitesi, ATPase Olmayan 4
RANK: NF- κ B reseptör aktivatörü
RANK-L: NF- κ B ligandının reseptör aktivatörü
RNA: Ribonucleic Acid
ROTI: İlgili Organ veya Doku Bozukluğu
RT-PCR: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
S-D system: Durie-Somon sistemi
SD: Stabil Hastalık
SMM: Smoldering Multiple Myeloma
SOCS-1: Suppressor of Cytokine Signaling 1
STAT3: Sinyal Transdüseri ve Transkripsiyon Aktivatörü 3
TC: Translokasyon / Siklin
TPK3: Tiamin Pirofosfokinaz 3
TS-miRNAs: tümör baskılayıcılar mikroRNA'lar
VGPR: Çok İyi Kısmi Yanıt
WBCs: Beyaz Kan Hücreleri Sayar
WHO: Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

ALSAADONI H. MiR-21, MiR-32 ve MiR-181'a/b'nin Multipl Myelom'da Tedaviye Yanıt Açısından Araştırılması. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2018.

Multiple miyeloma (MM) kemik iliğinde klonal malignant plazma hücrelerinin çoğalması ile karakterize edilen B-hücre neoplazmadır. İnsidans oranı lösemiden daha yüksektir ve hematolojik sistem malignant tümörleri arasında lenfomadan sonra ikinci sırada olan MM tüm hematolojik kanserlerin yaklaşık %15'ini oluşturmaktadır. MM tedavisinde yüksek tam cevap oranı ve daha uzun yaşam süresi sağlayan thalidomid, bortezomib ve lenalidomide gibi yeni ilaçların tanımlanmasına rağmen MM hala tedavi edilemeyen bir hastalıktır.

MikroRNA (miRNA)'lar kanserde hücre farklılaşması, apoptoz ve hücre çoğalması gibi kritik biyolojik süreçlerde rol oynamaktadırlar. Son yıllarda yapılan çalışmalarla insan miyeloma hücre hatlarında ve primer hasta örneklerinde miRNA profilleri tanımlanmış ve ekspresyon paternleri spesifik genetik anomaliler ve hastanın surveyansı ile ilişkilendirilmiştir.

Tez çalışmamızda tedaviye yanıtla ilişkili olduğu tahmin edilen 4 miRNA'nın ekspresyon düzeyleri (miR-21, miR-32, miR-181a ve miR-181b) hastalığın farklı gruplarında incelenerek MM patogenizindeki etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir. 38 MM hastası (tedavi öncesi ve sonrası) ve sağlıklı kontrol grubunun tam kan örneklerinden elde edilen RNA örneklerinde Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu tekniği kullanılarak ekspresyon seviyeleri araştırıldı.

Sonuçlarımız kemoterapi tedavisine başlamadan önce 4 miRNA'nın kontrole göre daha yüksek oranda eksprese olduğunu ve tedaviden sonra bu ekspresyon seviyelerinin tedaviye yanıtla azaldığını, ancak bazı hastaların tedaviye yanıtız kaldığını gösterdi. Kemoterapi yanıt veren grupta MM hastalığından bağımsız olarak geçen süre, tedaviye yanıtın bir sonucu olarak azalmış miR-32 ekspresyon seviyeleri ile ilişkili bulundu.

Anahtar Kelimeler: Multipl Myelom, kanser, mikroRNA, plazma Hücre, real-time PCR

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 56338.

ABSTRACT

ALSAADONI H. Investigation of MiR-21, MiR-32 and MiR-181a/b in terms of Treatment Response in Multiple Myeloma. Istanbul University Institute of Health Sciences, Department of Molecular Medicine. Doctoral Thesis. Istanbul. 2018.

Multiple myeloma (MM) is a B-cell neoplasm characterized by the proliferation of clonal malignant plasma cells in the bone marrow. The incidence rate is higher in leukemia and hematologic system comes second after lymphoma among malignant tumors and constitutes about 15% of all haematological cancers. Despite the identification of new drugs such as thalidomide, bortezomib, and lenalidomide, which result in a higher overall response rate and longer life span in MM treatment, MM is still an untreatable disease.

MicroRNAs (miRNAs) play a role in critical biological processes such as cell differentiation, apoptosis and cell proliferation in cancer. Recent studies have identified miRNA profiles in human myeloma cell lines and primer patient specimens, and these miRNA expression patterns have been associated with specific genetic anomalies and the patient's surveillance. The aim of this thesis work was to examine that difference in expression levels of the 4 miRNAs (miR-21, miR-32, miR-181a and miR-181b) associated with response to treatment.

RNA samples that obtained from whole blood samples of 38 MM patients (pre-treatment and post-treatment) and healthy control groups were investigated the expression pattern of miRNAs using Real-Time PCR technique.

The comparison of MM group with healthy controls revealed upregulation of 4 miRNAs levels before starting of chemotherapy treatment, and after treatment there were decreased in these levels as response in treatment but some patients showed non-response effect to treatment. In chemotherapy response group, the length of time free from MM disease was associated with decreased miR-32 Expression levels as a result of treatment response.

Keywords: Multiple myeloma, cancer, microRNA, plasma cell, real-time PCR
The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 56338.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, vücuttaki hücrelerin anormal hale geçerek kontrolsüz bir biçimde çoğalma gösterdiği bir hastalık grubudur. Kanserli hücreler, yakındaki diğer dokuları istila edebilir ve aynı zamanda kan dolaşımı ve lenfatik sistem aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine yayılabilir.

Kanser hastalığı, hem gelişmekte olan hem de gelişmiş ülkelerde, yüksek insidansı, maliyeti ve mortalite nedeniyle en önemli sağlık sorunlarından birini oluşturmaktadır. Dünya genelinde kanser, morbidite ve mortalite açısından en önde gelen nedenlerden birisidir. 2012 yılında yaklaşık 14 milyon yeni kanser vakası ortaya çıkmıştır (1). Önümüzdeki 20 yıl içerisinde yeni vakaların %70 oranında artması beklenmektedir. Tüm dünyada kanser hastalığı, en yaygın ölüm nedenleri arasında ikinci sıradadır ve 2015 yılında 8,8 milyon insan kanser nedeniyle hayatını kaybetmiştir. Dünya çapında neredeyse 6 ölümden biri kanser hastalığına bağlıdır. Kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %70'i, düşük ve orta gelir düzeyindeki ülkelerde gerçekleşmektedir (1).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2011 yılı değerlendirmelerine göre kanser, bütün koroner kalp hastalıklarına veya bütün inmelere bağlı olarak gerçekleşen ölümlere kıyasla daha fazla sayıda ölüme sebebiyet vermektedir (2). Tüm dünyada kanserle ilgili demografik ve epidemiyolojik değişikliklerin oluşturduğu tablo, önümüzdeki yıllar içerisinde düşük ve orta gelirli ülkeler başta olmak üzere kanser hastalığının giderek büyüyen bir sorun oluşturacağına işaret etmektedir ve 2025 gibi yakın bir tarihte 20 milyon yeni kanser vakasının görülmesi beklenmektedir (3).

Multipl myelom (MM) bütün kanserlerin %1'ini ve hematolojik malignitelerin ise %10'unu oluşturmaktadır (4, 5). Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl 20,000'in üzerinde yeni tanı konulmaktadır (6). Yaşa göre düzeltilmiş yıllık insidans, Amerika Birleşik Devletleri'nde on yıllardır sabit bir seyir göstermektedir ve 100,000'de 4 civarındadır (7). Multipl myelom, erkeklerde kadınlara oranla biraz daha sık görülürken; Afrika kökenli Amerikalılarda beyaz ırka kıyasla iki kat daha sık görülmektedir (8). Medyan tanı yaşı ise yaklaşık 65'tir (9).

Multipl myelom hastalarının neredeyse tamamında, hastalık, önemi belirsiz monoklonal gamopati (MGUS) olarak adlandırılan premalignant bir evreden gelişim göstermektedir (10, 11). MGUS, 50 yaş ve üzeri popülasyonun %3'ünden daha fazlasında görülmekte iken; MGUS'un multipl myelom veya ilişkili malignitelere doğru ilerleme gösterme oranı yılda %1'dir (12-15). MGUS asemptomatik olduğundan, MGUS'lu bireylerin %50'sinden daha fazlası, klinik tanı konulmasının öncesinde 10 yıldan daha fazla süreyle bu duruma sahiptirler (16). Bazı hastalarda ise, sessiz (smoldering) multipl myelom (SMM) adı verilen, asemptomatik ancak daha ileri bir premalign ara evre klinik olarak gözlemlenmektedir (17). SMM, tanıyı takip eden ilk 5 yıl içerisinde yılda %10 oranında, daha sonraki 5 yıl içerisinde yılda %3 oranında ve daha sonraki yıllarda ise yılda %1,5 oranında multipl myeloma doğru ilerleme göstermektedir.

Multipl myelom için tedavi, hastada semptomların görülüp görülmemesine ve hastanın genel sağlık durumuna bağlı olmaktadır. Tedavi için hedef, myelom hücrelerinin ortadan kaldırılması, tümör büyümesinin kontrol altına alınması, ağrı kontrolü ve hastanın aktif yaşamına devam edebilmesini sağlamaktır. Multipl myelom

için bir tedavi bulunmamakla birlikte, birçok hastada kanser yıllarca başarılı bir biçimde yönetilebilmektedir.

Günümüzde, yeni tanı alan MM hastalarının tedavisi, yeni terapötik ajanlar olan proteozom inhibitörleri (bortezomib), immünomodulator ajanlar (IMiDs) (lenalidomid ve talidomid), kortikosteroidler (deksametazon ve prednizolon) ve alkilleyici ajanların (siklofosamid ve melfalan) kombinasyonuna dayanmaktadır (18-20). Bu tedavi stratejileri hastaların medyan sağkalım süresi üzerinde olumlu sonuçlar sağlamakla birlikte, MM hastalarının çoğunluğunda hastalık nüks etmektedir. Bu nedenle MM hala tedavisi olmayan bir hastalık olarak kabul edilmektedir ve daha gelişmiş tedavilerin geliştirilmesi zorunlu bir ihtiyaç haline gelmiştir.

Myelom, genellikle önemi belirsiz monoklonal gamopati (MGUS) olarak adlandırılan ve asemptomatik prekanseröz bir aşama olan klonal plazma hücre proliferasyonundan gelişmektedir. MGUS, 50 yaş ve üzeri popülasyonun %3'ünden daha fazlasında bulunmaktadır ve myelom ya da ilişkili malignetelere yılda %1 oranında ilerleme göstermektedir (21). MGUS'un bir varyantı, asemptomatik veya sessiz plazma hücresi myelomu olarak adlandırılmaktadır. Sessiz plazma hücresi myelomunda, multipl myelom tanısı için gerekli klinik kriterler bulunmakla beraber, organ veya dokularda ilişkili bir bozukluk görülmemektedir (22). Multipl myelom, çeşitli sitogenetik anormalliklerle karakterizedir. Bu anormalliklerin bazıları prognostik öneme sahip olabilmektedir. Ancak bu kromozom anormallikleri ve hastalık progresyonu arasındaki ilişkiler net değildir ve sağkalımla ilgili güvenilir bir öngörü sağlayamamaktadır (21). MGUS'un myeloma doğru ilerleyip ilerlememesi ile ilgili tek bir etkenin belirleyici olmamasından dolayı, hastaların düzenli aralıklarla kontrol edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle, kanser progresyonu için yüksek risk altında olan

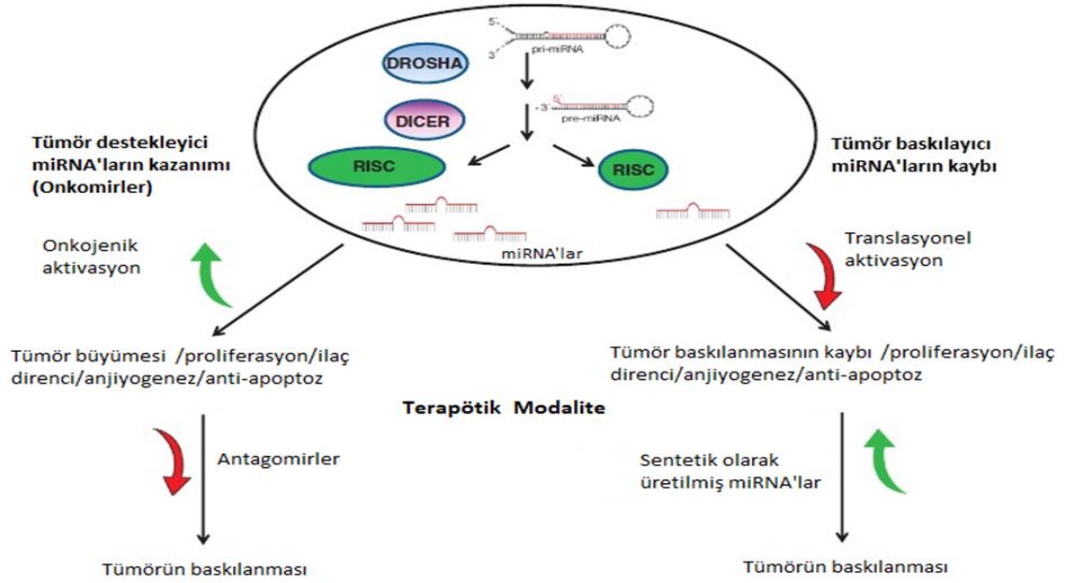
hastaları belirleyebilecek bir tanı yöntemi, hastalar için büyük fayda sağlayacaktır ve erken tedavi ile daha iyi bir prognoz için de zemin oluşturabilecektir.

Son zamanlarda, kodlama yapmayan ve gen ekspresyonunu düzenlediği bilinen küçük RNA parçaları olarak tanımlanan mikroRNA'ların (miRNA), prognostik ve tanısal biyobelirteç olarak etkinliği üzerine bir çok sayıda çalışma yapılmaktadır (23). Günümüzde, insan genomunda 2042 miRNA'nın yer aldığı bilinmektedir (miRBase 19.0, Ağustos 2012) ve bunların çoğu belirli dokulara özgü biçimde eksprese olmaktadır. miRNA'lar, hedef mRNA'ların genellikle 3' çevrilmemiş bölgelerine (untranslated region, 3'UTR) bağlanarak, translasyonun baskılanmasına veya hedef mesajcı mRNA'ların kesimi ve degradasyonuna neden olarak protein ekspresyonunun down-regülasyonuna yol açmaktadır (24). miRNA'ların kan dolaşımında da bulunmasının keşfinden sonra biyobelirteç olarak kullanımları oldukça artmıştır. Kan dolaşımındaki bazı miRNA alt gruplarının seviyelerinin çeşitli kanserlerle ilişkili olduğu kaydedilmiştir.

MikroRNA'lar (miRNA); doğal olarak oluşan, evrimsel olarak korunmuş, proteine translasyonu olmayan ancak gen ekspresyonunun negatif olarak düzenlenmesinde önemli rol oynayan büyük bir RNA sınıfıdır. miRNA'lar, mesajcı RNA (mRNA)'ların komplementer bölgelerine spesifik olarak bağlanarak degradasyonuna yol açarlar ve/veya translasyonu inhibe ederler (25). Hedef mRNA'ların degradasyonunu veya translasyonunu durduran miRNA'lar, insan genomundaki protein kodlayan genlerin yarısından fazlasının ekspresyonunu düzenlemektedir (26). Genomik ve biyoinformatik analiz çalışmaları, miRNA'ların hücre büyümesi, farklılaşması, gelişimi ve apoptoz gibi birçok farklı biyolojik süreçte gen ekspresyonunun düzenlenmesinde temel rol oynadığını göstermektedir (27). Bu

nedenle, tek bir miRNA'nın deregülasyonu, her bir miRNA'nın birçok mRNA'ya bağlanıp kontrol edebilmesinden dolayı oldukça önemli etkilere neden olmaktadır.

Son zamanlarda yapılan birçok çalışmada, miRNA'ların anormal ekspresyonunun birçok solid tümör ve hematolojik malignitenin patogeneziyle ilişkisi gösterilmektedir (28-30). Tümör baskılayıcı miRNAların içeriğe bağlı olarak kaybı sonucunda hedef onkogenlerin ekspresyonu artış gösterirken, onkojenik miRNAların ekspresyonundaki artış, hedef tümör baskılayıcı genleri baskılamaktadır (Şekil 1.1) (29-31). miRNA'lar, insan genomu içerisinde dağınık bir düzende yer almakla birlikte, miRNA'ların neredeyse yarısı, kanserlerde değişik ekspresyon gösteren kırılğan bölge veya alanlarda yer almaktadır (32). Aynı zamanda, önemli sayıda miRNA'nın kanserle ilişkili genomik bölgelerde kodlanmış olması, ekspresyondaki değişikliklerin tümör oluşumu ile bir nedensellik ilişkisi içinde olduğunu düşündürmektedir. Özet olarak, miRNA'ların aşırı ekspresyonu, amplifikasyonu ve/veya delesyonu ve miRNA'lar tarafından gerçekleştirilen epigenetik susturma, onkogeneze katkıda bulunabilecek olaylar üzerinde etki göstermektedir (33).



Şekil 1.1: miRNA'ların terapötik uygulamaları (29)

Günümüzde, talidomid, bortezomib ve lenalidomid gibi yeni ilaç tedavileri, tam yanıt oranını ve progresyonsuz sağkalımın yükselmesini sağlasa da; MM hala tedavisi olmayan bir hastalıktır (34-36). Tedaviye yanıt ve hastalık progresyonunun değerlendirilmesi, kemik iliğinin incelenmesi için yapılan girişimsel işlemler ile gerçekleştirilmektedir, zira tümör hücreleri kemik iliğinde yer almaktadır ve genellikle kan dolaşımında yer almamaktadır.

Epigenetik değişiklikler, tümör oluşumunda çok önemli bir rol oynamaktadır ve miRNA'lar epigenetik değişimlerin temel bileşenleridir. MikroRNA'lar (miRNA'lar), hücre farklılaşması, kendini yenileme, apoptoz, stres yanıtı ve hüce metabolizması gibi çeşitli hücresel süreçlerde görev alan temel düzenleyici moleküller olarak son zamanlarda ortaya çıkmıştır. İnsan genlerinin %30'undan daha fazlasının postranskripsiyonel olarak miRNA'lar tarafından düzenlendiği tahmin edilmektedir (30). MM'de plazma hücrelerindeki genetik değişiklikler, siklinler, miRNA'lar ve CD markerları gibi yüzey moleküllerinin ekspresyonunun normalden farklı olmasına neden

olmakta ve sonuç olarak kemik iliğindeki myelom hücrelerinin büyüme ve sağkalımını arttırmaktadır. Yukarıda bahsedilen moleküllerin ekspresyonundaki değişikliklere ilişkin bilgi edinilmesi ve bu değişikliklerin MM'deki genetik değişimlerle ilişkisinin belirlenmesi, bu hastalığın tanısı, prognozu, patogenezi ve tedavisi için önemli katkılar sağlayabilecektir. miRNA'lar, hematopoezde ve hematolojik kanserlerin düzenlenmesinde onkogen veya tümör baskılayıcılar olarak rol oynamaktadırlar.

Kan dolaşımında yer alan miRNA'lar üzerine yoğun bir biçimde araştırmalar yapılmaktadır ve bu araştırmalar sonucunda insan kan dolaşımında yer alan miRNA'a ilişkin bir veri tabanı geliştirilmiştir. Son yıllarda, insan myeloma hücre hatları ve primer hasta örneklerinden miRNA profilleri belirlenmiştir ve miRNA ekspresyon paterni spesifik genetik anormallikler ve hasta sağkalımı ile ilişkilendirilmiştir.

MM hastalarının ve kontrol gruplarının kanlarından elde edilen RNA örneklerinde, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) kullanılarak miR-21, miR-32, miR-181a ve miR-181b'nin ekspresyon paternleri araştırılmıştır. Bu bilgilere dayanılarak, bu 4 miRNA'nın ekspresyon düzeyleri, tedavi öncesi ve tedavi sonrasında ve aynı zamanda kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Araştırmada, bu 4 miRNA'nın ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerin, tedaviye yanıtla olan ilişkisinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Bu yaklaşım ile, kanser tanısının daha doğru bir biçimde sağlanması, hastaların en iyi yanıt alabilecekleri spesifik tedaviye ideal bir biçimde yönlendirilebilmesi, etkin tedavilerin geliştirilmesi ve hasta sağkalımının iyileştirilmesi amaçlanmaktadır.

Mevcut çalışmada, multipl myelom hastalarından, MGUS hastalarından ve kontrollerden alınan kandan elde edilen serumlarda miRNA ekspresyon paternleri değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, bir grup hücrenin kontrolsüzce büyüme ve bölünmesi, ayrıca yayılımı sonucunda primer tümörün yakınındaki dokulara yayılımı ve tahribatı ile karakterize olan hastalıklar grubu için kullanılan ortak terimdir. Kanser, ayrıca metastaz adı verilen ve kansere bağlı ölümlerin %90'ının sebebi olan bir süreç yoluyla vücutta başka bölgelere de yayılabilmektedir (37). Günümüzde kanser hala en zorlu hastalıklardan birisidir ve kanser insidansı yaşlanan nüfusa bağlı olarak çoğu ülkede, özellikle de gelişmiş ülkelerde artış göstermektedir. Kanser genellikle etkilenen hücrelerin genetik materyalindeki anormalliklerin sonucunda ortaya çıkmaktadır. Tümör oluşumu, onkogenlerin ve baskılayıcı genlerin birbirini izleyen mutasyonların birikimi sonucunda hücre döngüsünde deregülasyonunu kapsayan çok aşamalı bir süreçtir. Tümör oluşumuna neden olan olaylar içerisinde, nokta mutasyonları gibi DNA sekansındaki küçük ölçekli değişiklikler ve daha büyük ölçekli olan translokasyon, delesyon ve amplifikasyon gibi kromozomal bozukluklar ile kromatin yapısını etkileyen değişiklikler yer almaktadır. Aynı zamanda, DNA metilasyonunda ve histon asetilasyonundaki anormallikler gibi epigenetik kontrolün bozulduğu durumlar da tümör oluşumu ile ilişkilidir (38). Gen transkripsiyonunun düzenlenmesinde ve bu düzenleyicilerin aktivitelerini düzenleyen kompleks sinyal yolları ile ilişkili yaklaşık 2,000-3,000 proteinin olası bir rolü olduğu tahmin edilmektedir. Kanser sadece hücrenel bir hastalık olmayıp, aynı zamanda epitel hücreler ve onların altında yer alan stroma hücreleri arasındaki normal ilişkinin bozulduğu bir doku hastalığıdır (39). Günümüzde kanser, gelişmiş ülkelerdeki ölümlerin %25'inden; dünya genelindeki ölümlerin ise %15'inden sorumludur. Her yıl yaklaşık 1,45 milyon yeni kanser vakasının

öngörüldüğü göz önüne alındığında kanser, en önemli sağlık sorunlarından birini oluşturmaktadır (37). Sonuç olarak kanser; yüksek insidansı, oluşturduğu maliyet ve mortalite dolayısıyla, hem gelişmekte olan hem de gelişmiş ülkeler için en büyük sağlık sorunlarından biri olarak kabul edilmektedir.

2.2. Multipl Myelom

Multipl myelom (MM), malignant bir plazma hücresi bozukluğu olup, bütün kanserlerin %1'ini, hematolojik malignitelerin ise %10'unu oluşturmaktadır. Dünya genelinde yıllık MM insidansı, 100.000 kişide yaklaşık olarak 0.4-5 arasındadır. Kuzey Amerika, Avustralya/Yeni Zelanda, Kuzey Avrupa ve Batı Avrupa'da, Asya ülkelerine kıyasla daha yüksek insidans oranı görülmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde MM insidansı, Afrika kökenli Amerikalılarda beyaz ırka kıyasla yaklaşık iki kat daha yüksek iken; Japon ve Çin kökenine sahip insanlarda daha düşük insidans görülmektedir (40). Hollanda'da, MM insidansı 100.000'de 5'tir. Bu oran, yaşla birlikte kademeli bir artış göstermektedir ve ortalama tanı yaşı 70'dir (41).

MM, kemik iliğindeki malign plazma hücrelerinin klonal ekspansiyonu ile karakterize bir hastalıktır. Myelom plazma hücresi; somatik hipermutasyon ve immunglobulin sınıf değişimi gerçekleştiren bir post germinal merkez plazma hücresidir. MM hücreleri, serum ve/veya kanda tespit edilebilen bir monoklonal protein (M-protein) üretmektedir. M-proteini hastaların %50 sinde IgG, %30'unda IgA'dır veya hafif zincirden oluşmaktadır (%15). Nadir vakalarda, IgD (%1-2), IgM (%0,2) ve daha seyrek rastlanmakla birlikte IgE sekresyonu veya sekresyon olmadığı durumlar (sekresyon yapmayan MM) görülmektedir (42, 43).

Osteolitik kemik lezyonları, MM'nin ayırıcı özelliğidir. MM'ye özgü diğer klinik özellikler arasında; böbrek hasarı, anemi, hiperkalsemi ve tekrarlayan

enfeksiyonlarla birlikte immün yetmezlik yer almaktadır. Bu durumlar, doğrudan plazma hücrelerinin dokularda toplu birikiminden (plazmasitom) kaynaklanabileceği gibi dolaylı olarak M-proteininin ve/veya plazma hücrelerinin salgıladığı sitokinlerin etkisi sonucunda da gelişebilmektedir. Buna ek olarak yüksek seviyelerde M-proteini, hiperviskoziteye, böbrek yetmezliğine ve nöropatiye neden olabilmektedir.

2.3. Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri

Multipl myelom (MM), en yaygın ikinci hematolojik kanser olup, Amerika Birleşik Devletleri'nde yeni tanı konulan malignitelerin %2'sini oluşturmaktadır. 2014 yılında, 24.000 yeni MM vakası olduğu ve MM'e bağlı olarak 11.000 ölüm gerçekleştiği tahmin edilmektedir (44). MM, ortalama tanı yaşı 69 olmak üzere büyük çoğunlukla yaşlılıkta görülen bir hastalıktır. MM insidans oranı, erkeklerde 100.000 kişide 7,7 iken; kadınlarda ise 100.000'de 4,9'dur. Beyaz ırkla kıyaslandığında, hastalık siyah ırkta 2 ila 3 kat daha sık görülmektedir. Mortalite oranları da siyah ırkta erkeklerde 100.000'de 7,9, kadınlarda 54 iken, beyaz ırkta erkeklerde 100.000'de 4,0 ve kadınlarda 2,5 olmak üzere siyah ırkta beyaz ırka göre 2-3 kat daha yüksektir (45).

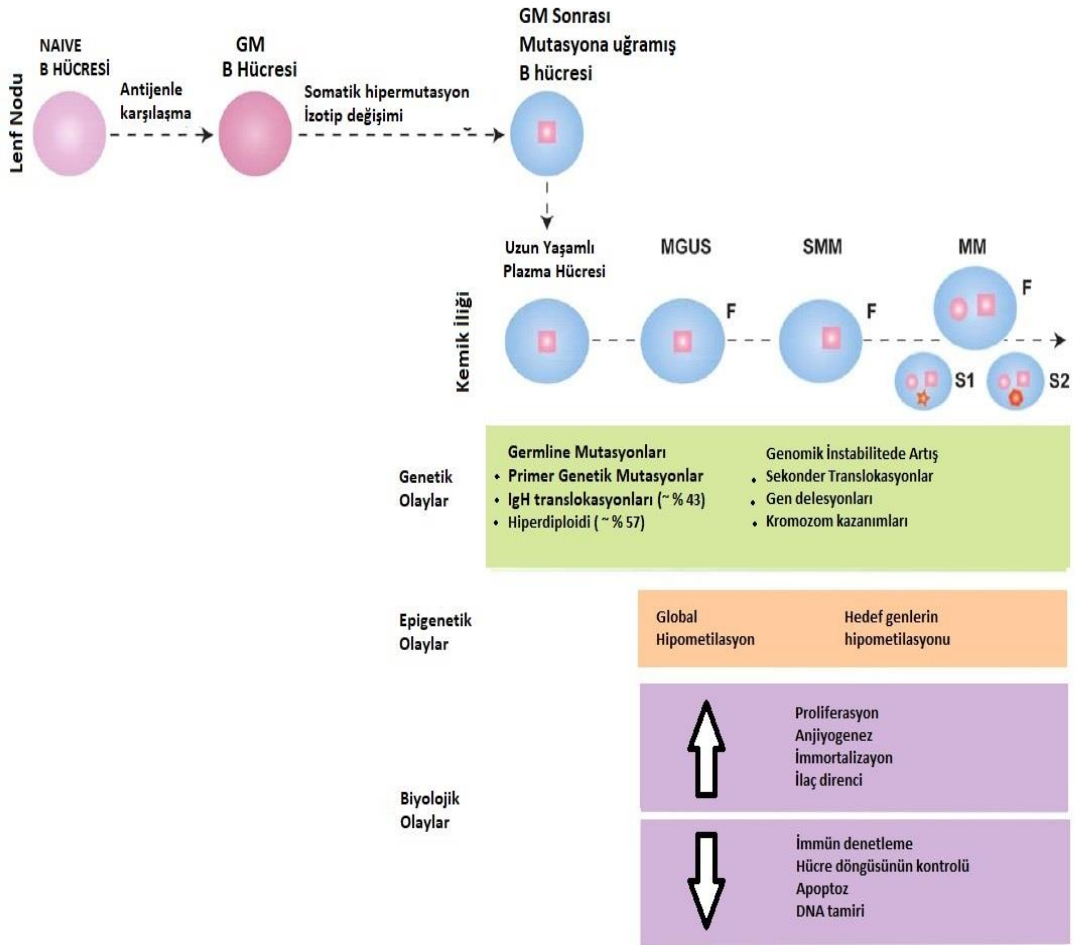
2.3.1. Risk faktörleri

MM oluşumuna neden olan etyopatogenez tam olarak bilinmemekle birlikte, çeşitli risk faktörleri belirlenmiştir. Çevresel ve mesleki maruziyetler açısından, nükleer radyasyon ve petrol ürünleri bilinen tek risk faktörleri olmakla birlikte, epidemiyolojik çalışmalar, MM insidansının çiftçilerde, ahşap ve deri imalatçılarındaki yüksek olduğu göz önüne alındığında, pestisitler gibi başka diğer çevresel maruziyetlerin de etkili olabileceğini düşündürmektedir. Aile geçmişinde önemi belirsiz monoklonal gamopati (MGUS), sessiz (smoldering) multipl myelom (SMM) veya diğer B hücresi malignitelerinin bulunması, elli yıldan uzun bir süredir bir risk faktörü olarak bilinmektedir. MM ve/veya MGUS'un olduğu ailevi vakaların parametrik olmayan

analizler ve parametrik bağlantı analizleri sonucunda; 1q ve 4q lokusları, germinal genetik mutasyonlarda ilgili bölge olarak belirlenmiştir (43). MM ve MGUS'un ailesel vakalarında, işlevi bilinmeyen bir protein olan Paratarg-7'nin (P-7) hiperfosforile formu, otozomal dominant şekilde kalıtılmaktadır ve bu nedenle patojenitede olası bir rolünün olabileceği düşünülmektedir (44-47). Kişide MGUS veya SMM hikayesinin olması ise MM gelişimi için oldukça bilinen bir risk faktörüdür.

2.4. Multipl Myelom Biyolojisi - Etyopatogenez

Multipl myelomun, antikor üreten bir plazma hücresi alt grubu olan ve kemik iliğine (Kİ) yerleşen ve orada yıllarca yaşayarak immunolojik hafızaya katkıda bulunan uzun ömürlü plazma hücrelerinin (PH) transformasyonundan ortaya çıktığına inanılmaktadır (48, 49). Antijenik profilin analizi ve immunglobulin (Ig) değişken bölgelerinin sekanslanması sonucunda, MM hücrelerinin (MMh) postgerminal merkezden, pre-B hücresi evresinde erken genetik mutasyonlara uğrayan ortak bir öncül (progenitör) hücreden ve daha sonrasında PH aşamasında gerçekleşen onkogenik olaylardan köken aldığı gösterilmiştir (Şekil 2.1) (50, 51). MGUS, tutarlı bir oran olarak yılda %1 oranında MM'ye progresyon gösterebilmektedir, bu durum ise kanseröz dönüşüme doğru hayat boyu taşınan bir risk oluşturmaktadır (52, 53).



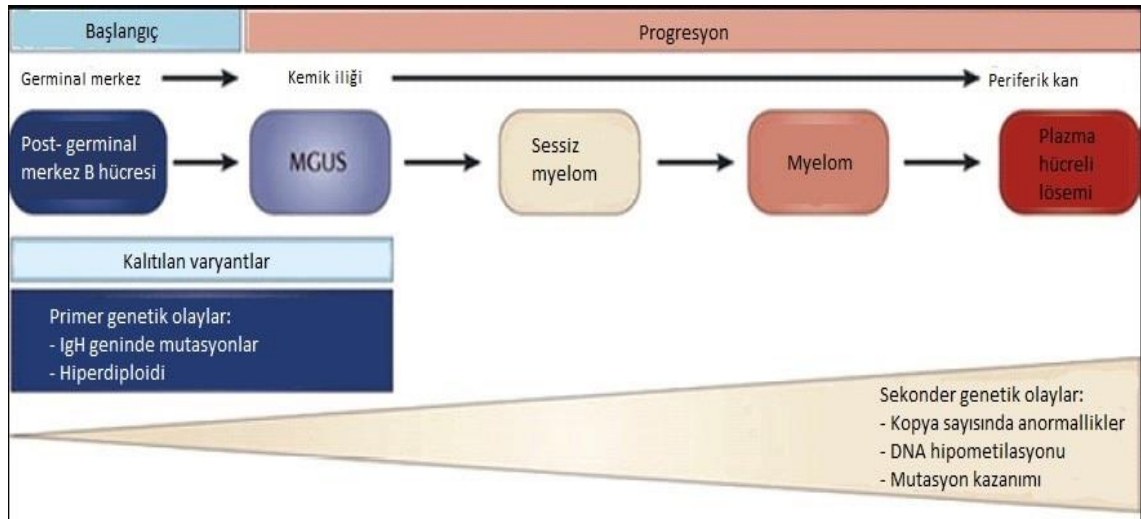
Şekil 2.1: Multipl myelomda yer alan genetik olaylar (54).

2.5. Multipl Myelomun Biyolojisi

MM, postgerminal merkez B hücreleri kökenli asemptomatik premalign proliferatif klonal plazma hücrelerinin (PH) malignan dönüşümü ile sonuçlanan çok aşamalı bir süreçler dizisinin son aşaması olarak ortaya çıkmaktadır. Neredeyse bütün MM vakaları, premalign benign bir aşama olan, önemi belirsiz monoklonal gamopati (MGUS) olarak adlandırılan bir aşamadan gelişim göstermektedir. MGUS ise daha sonra premalign ve asemptomatik bir aşama olan sessiz multipl myeloma (SMM) ve son olarak semptomatik MM'e doğru progresyon gösterebilmektedir. (Şekil 2.2). MM ise sonrasında Plazma Hücreli Lösemi (PHL) olarak adlandırılan yaygın bir forma ilerleme

gösterebilmektedir (51, 52, 53). MM'nin çok aşamalı gelişim süreci iki ana etkene bağlıdır: 1) PH'de hastalık sürecinde gerçekleşen genetik ve epigenetik değişimleri içeren iç faktörler (54) ve 2) MM plazma hücrelerinin Kİ mikroçevresinde gerçekleştirdiği etkileşimleri içeren dış faktörler (55).

MM'de görülen genetik anormallikler iki ana gruba ayrılmaktadır: Primer erken dönem kromozomal sapmalar ve sekonder geç başlangıçlı kromozomal mutasyonlar ve gen mutasyonları. Bu genetik lezyonlar; hücre proliferasyonu, sağkalımı, farklılaşması ve transformasyonunu düzenleyen önemli genlerin ekspresyonunu ve işlevini etkilemelerinden dolayı MM oluşumunda büyük öneme sahiptir. Primer genetik olaylar açısından MM, hiperdiploid ve hiperdiploid olmayan biçiminde iki gruba ayrılabilir. Hiperdiploid grup, tek sayılı kromozomlardaki trizomi ile karakterize iken, hiperdiploid olmayan formda immünglobulin ağır zincir (IgH) bölgelerinde translokasyonlarının yer aldığı bilinmektedir (53, 56).



Şekil 2.2:MM aşamalarının şematik modeli ve moleküler patogenezi (57).

2.5.1. Tanı

MM tanısı, M-proteini seviyesi, kemik iliğinde plazmasitoza ve genellikle CRAB (hiperkalsemi, böbrek yetmezliği, anemi ve kemik lezyonları) olarak adlandırılan ilişkili organ ya da doku bozuklukları (ROTI) temel alınarak yapılmaktadır. Tablo 2.1’de, Uluslararası Myelom Çalışma Grubu (IMWG) tarafından 2003’de belirlenen (58) ve sonrasında 2009’da güncellenen tanı kriterleri verilmiştir (59). Tablo 2.1’de, yalnızca önemi belirsiz monoklonal gamopati (MGUS), sessiz multipl myelom (SMM) ve multipl myeloma ilişkin tanı kriterlerine yer verilmiştir.

Tablo 2.1:Plazma hücresi bozuklukları için 2009’da güncellenen IMWG tanı kriterleri (58, 59). MGUS, SMM ve MM için tanı kriterleri.

Önemi belirsiz monoklonal gamopati (MGUS)

3 kriterin de sağlanmış olması gerekmektedir:

- Serum monoklonal protein < 3 g/ 100 ml
 - Klonal kemik iliği plazma hücreleri < 10% ve
 - Hiperkalsemi, böbrek yetmezliği, anemi ve kemik lezyonları (CRAB) gibi plazma hücresi proliferatif bozukluğuna ilişkin hedef organ hasarının bulunmaması
-

Sessiz multipl myelom (SMM) veya diğer yaygın adıyla asemptomatik multipl myelom

2 kriterin de sağlanmış olması gerekmektedir:

- Serum monoklonal protein (IgG veya IgA) \geq 3 g/ 100 ml ve /veya klonal kemik iliği plazma hücreleri \geq 10% ve
 - Litik kemik lezyonları, anemi, hiperkalsemi veya böbrek yetmezliği gibi
-

plazma hücresi proliferatif bozukluğuna ilişkin hedef organ hasarının bulunmaması

Multipl Myelom

3 kriterin de belirtilen istisnalar haricinde sağlanmış olması gerekmektedir.

- Klonal kemik iliği plazma hücreleri $\geq 10\%$
 - Serum ve/veya idrarda monoklonal protein varlığı (sekresyon yapmayan multipl myelom hastalarında hariç) ve
 - Plazma hücresi proliferatif bozukluğu ile ilişkili olabilecek hedef organ hasarının varlığı, özellikle:
 - o Hiperkalsemi: serum kalsiyumu $\geq 11,5$ mg/ 100 ml veya
 - o Böbrek yetmezliği: serum kreatinin seviyesi $\geq 11,5$ mg/ 100 ml
 - o Anemi: Hemoglobin değer normal değerin > 2 g/ 100 ml altında olan veya hemoglobin değerinin < 10 g/ 100 ml olduğu normokromik ve normositer anemiler
 - o Kemik lezyonlar: Ağır osteopeni veya patolojik kırıklar
-

2.6. Evreleme ve Prognoz

Multipl myelom için iki evreleme sistemi mevcuttur. Bunlar 1970'lerin ortalarında geliştirilen ve tümör yükünün ölçümlendirilmesi olan Durie-Salmon evreleme sistemi ve hastaları β 2-mikroglobulin ve serum albumin düzeylerine göre 3 gruba ayıran Uluslararası Evreleme Sistemi (ISS)'dir. Yeni tedavi ajanlarının (bortezomib ve immünomodulator ilaçlar (İMİDs) kullanılmaya başlanması ile birlikte sadece ISS prognostik olarak geçerli evreleme sistemi olmuştur (Tablo 2.2.2) (60, 61).

Hasta veya tümöre ait kötü prognozla ilişkili olan faktörler, yeni tanı alan hastaların %15 - %20'sini oluşturan yüksek risk altındaki MM hastalarının belirlenmesi için kullanılmaktadır (Tablo 2.3) (62). Hasta ile ilişkili faktörler genellikle aşırı toksisitenin önlenmesi için tedavi yoğunluğunun azaltılmasını gerekli kılarken, tümörle ilişkili faktörler, tümörün biyolojik agresiflik derecesini veya yüksek hastalık yükünü yansıtmaktadır (63).

Tablo 2.2: Multipl Myelom İçin Evreleme Sistemleri

Evre	Durie-Salmon evreleme sistemi	ISS	ISS'e göre Genel Sağkalım (ay)
I	Aşağıdaki kriterlerin hepsi sağlanmış olmalıdır: Hemoglobin > 10 g/dl, Serum kalsiyum seviyesi \leq 12 mg/dl, kemik hastalığı ya da soliter plazmasitomun bulunmaması, M proteini seviyesi IgG için < 5 g/dl veya IgA için < 3g/dl ise, ve/veya Bence-Jones proteinürisi < 4g/24s	Serum β 2-mikroglobulin düzeyi < 3,5 mg/dl ve serum albumini \geq 3.5 g/dl	62
II	Evre I ya da III'e uymayan durumlar	Evre I ya da III'e uymayan durumlar	44
III	Aşağıdaki kriterlerden en az biri sağlanmış olmalıdır: Hemoglobin <8,5 g/dl, Serum kalsiyum seviyesi > 12mg/dl, büyük kemik lezyonları, M proteini seviyesi IgG için > 7 g/dl, IgA için > 5g/dl, ve/veya Bence-Jones proteinürisi > 12 g/24s		29

Hasta ile ilişkili faktörler arasında, böbrek fonksiyonlarının sitoredüktif tedaviye rağmen sürekli bozuk olması MM hastaları için kötü bir prognostik faktördür (65). Böbrek bozukluğunun belirlenmesinde genel olarak, serumda 2 mg/dL üzerinde kreatinin seviyesi eşik değer olarak belirlenmiştir (66). Bununla birlikte serum kreatinin seviyesi, yaşa, ırka, kas kütlesine bağlı olarak değişim gösterebilmektedir ve aynı zamanda özellikle zayıf olan yaşlılarda böbrek fonksiyonunun olduğundan daha iyi değerlendirilmesine sebep olabilmektedir. MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) formülüne göre belirlenen tahmini glomerüler filtrasyon hızı (GFR), böbrek fonksiyonunun değerlendirilmesi için daha iyi bir ölçüt olup, KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) sınıflandırılmasına göre 5 ayrı evreye sınıflandırma yapılabilmesini sağlamaktadır (67, 68). MM' de laktat dehidrogenaz (LDH) seviyesinin üst limitin üzerinde olması, diğer faktörlerle birleştiğinde yüksek hastalık yükü ve daha kötü genel sağkalım ve progresyonsuz sağkalım ile ilişkili bir etkidir (69). ISS ve Durie-Salmon evreleme sistemine göre Evre III hastalık, daha kötü sonlanımla ilişkilidir (70).

Tablo 2.3: Multipl Myelom prognozunda hasta ile ilişkili ve tümörle ilişkili kötü prognostik faktörler

Hasta ile ilişkili faktörler
Böbrek fonksiyonlarında bozukluk
İleri yaş (> 75)
Zayıf performans durumu (ECOG > 2)
Tümör ile ilişkili faktörler
İleri evre
Yüksek risk taşıyan sitogenetik
<ul style="list-style-type: none"> • t (4:14), t(14:16), t(14:20) translokasyonları • del (17) ve del (17p) delesyonları
Hiperdiploid olmayan karyotip
Primer plazma hücreli lösemi
Kötü gen ekspresyon profili
LDH artışı

2.7. Multipl Myelomda Kemik Hastalıkları

Hastaların yaklaşık %80'inde görülen osteolitik kemik lezyonları, multipl myelomda en sık görülen ve en sarsıcı komplikasyonlardan biridir (71) ve çoğunlukla patolojik kırıklar, kemiğe radyasyon veya cerrahi tedavi gerekliliği, omurilikte sıkışma ve hiperkalsemi gibi iskeletle ilişkili durumlara neden olmaktadır. Osteoklastlar tarafından gerçekleşen kemik rezorpsiyonu (geri emilimi) ve osteoblastlar tarafından gerçekleşen kemik oluşumu arasındaki dengenin kemik rezorpsiyonu yönünde bozulması sonucunda, osteolitik kemik lezyonları oluşmaktadır (72).

Osteoklastlar tarafından gerçekleşen kemik rezorpsiyonunun artışı üzerinde farklı mekanizmalar etkili olmaktadır. Osteoklast aktivasyonu için en temel bileşenlerden biri, myelom hücresi kökenli makrofaj Makrofaj İnflamatuar Protein-1 α (MIP-1 α) ve RANK/RANK-L/OPG sistemidir. Myelom hücreleri, MM hastalarının kemik iliği mikro çevresinde, NF- κ B ligandı nükleer kappa B ligand reseptör aktivatörünün (RANK-L) ekspresyonunu arttırabilmektedir (73). RANK-L, myelom hücrelerinde ve

osteoblastlarda eksprese edilmekte olup, aynı zamanda IL-17 aracılı gerçekleşen bir süreç sonucunda T hücrelerinde de eksprese edilebilmektedir (74). RANK-L, osteoklast hücrelerinde yer alan reseptörüne (RANK) bağlanarak direkt olarak osteoklast farklılaşması ve aktivasyonuna neden olabilmektedir (73). Bununla birlikte tuzak (decoy) reseptör osteoprotegerin (OPG) ise azalan bir ekspresyon göstermektedir. OPG, osteoblastlar tarafından kemik kütlesini korumak için üretilen çözünebilir bir reseptördür. Normalde OPG, RANK-L ve RANK arasındaki etkileşimi engelleyerek RANK-L'in etkisini bloke etmektedir (75). Bozulan OPG-RANK-L oranı, RANK ve RANK-L etkileşiminde artışa sonucunda osteoklastların farklılaşması ve aktivasyonuna neden olmaktadır (73).

Multipl myelomda görülen kemik hastalıklarında etkili olan önemli bir diğer faktör ise MIP-1 α 'dır (76). MIP-1 α , bir osteoklast kemokini olan CXCR5 ve RANK-L'i aktive ederek osteoklast RANK'ının aktivasyonuna ve OPG ile yarışma neden olmaktadır (77). Osteoklast aktivitesi sonucu gerçekleşen kemik rezorpsiyonu bifosfonatlar tarafından bloke edilmekle birlikte (78), osteolitik lezyonlarda iyileşmenin gerçekleşmemesi; osteoblast farklılaşması ve aktivitesi bakımından önemli bir sorun olduğunu göstermektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, osteolitik kemik lezyonlarının gelişiminde myelom plazma hücrelerinin önemi vurgulanmıştır. Tian vd., gen ekspresyon profili (GEP) çalışmaları sonucunda, MM hastalarında CD-138 saflaştırılmış kemik iliği aspiratlarında, Dickkopf-1 (DKK-1) gibi WNT sinyal yolu inhibitörlerinin fazla ekspresyonunu, fokal kemik lezyonlarının varlığı ile ilişkili bulmuştur (79). WNT sinyal yolu, farklı gelişimsel süreçlerde etkili olan bir mekanizma olup, osteoblastların büyüme ve farklılaşması üzerinde önemli etkilere sahiptir (80). DKK-1, bir WNT sinyal yolu inhibitörüdür ve osteoblast farklılaşması ve işlevini inhibe

ederken aynı zamanda osteoklast aktivitesini arttırmaktadır (81). Günümüzde multipl myelomda kemik hastalıklarının gelişimi ve tedavisi, büyük bir sorun oluşturmaktadır.

2.8. Prognostik Faktörler

Serum $\beta 2$ –microglobulin (B2M) ve albumin seviyelerini temel alan Uluslararası Evreleme Sistemi (ISS), yeni tanı alan MM hastalarının prognostik olarak üç sınıfa ayrılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (82). ISS'nin, bir prognostik faktör olarak güvenilirliği klinik çalışmalar ile doğrulanmıştır (83). Ek olarak, serum laktat dehidrogenaz düzeyi (LDH), serum monoklonal IgA izotipi, ekstramedüller hastalıkların varlığı, tanı anında böbrek yetmezliğinin olması, plazmablastik hastalık morfolojisi ve plazma hücreli lösemi, prognoz için diğer olası belirteçlerdir (84, 85). ISS evrelemesine ek olarak, myelom hücrelerinde görülen sitogenetik bozukluklar, prognoz üzerinde bağımsız bir etkiye sahiptir. MM hastalarında sıklıkla 13.kromozomda bozukluklar görülmektedir. Geleneksel sitogenetik yöntemlerle, bu kromozomal bozukluğun hastaların yaklaşık %15'inde görüldüğü kaydedilmiştir. Ancak yapılan interfaz floresan in situ hibridizasyon (FISH) çalışmaları ile, çoğunlukla monozomi 13 (%85), geri kalan hastalarda (%15) ise kromozom 13'de delesyon (del(13)) olmak üzere hastaların yaklaşık %50'sinde 13.kromozomda anormallikler bulunduğu kaydedilmiştir. Metafaz FISH ve geleneksel karyotipleme yöntemleri ile belirlenen kromozom 13 monozomisi ve del(13), daha kötü prognoz ile ilişkilendirilirken (86); interfaz FISH ile bakıldığında t(4;14)'ün olmaması halinde sağkalım üzerindeki olumsuz etki ortadan kalkmaktadır (87, 88).

Bazı çalışmalarda ise t(4;14) ve t(14;16) translokasyonları, daha düşük sağkalım ile ilişkili bulunmuştur (87, 88, 89). Bunun aksine t(11;14) olması durumunda, prognoz için ya olumlu ya da önemi olmayan etkiler görülmektedir (87, 88).

MM ile ilişkili diğer olumsuz sitogenetik faktörler, del(17p) ve 1q kazanımıdır. MM hastalarının yaklaşık %10'unda hemizigöz del(17p) görülmektedir ve bu durum da p53 mutasyonlarında artışla ilişkilidir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, del(17p)'ye sahip hastaların %27 ila %37'sinde p53 mutasyonu gösterilmişken, delesyon bulunmayan hastalarda bu oran %1'den daha az olarak ifade edilmiştir (90, 91). Del(17p) görülen ancak mutasyon olmayan hastalarda işlevsel p53'lerin bulunup bulunmadığı ise gösterilmemiştir. Geleneksel kemoterapi veya yüksek dozla tedavi olan MM hastalarında, del(17p), daha agresif bir hastalık ve çok daha kısa sağkalım ile ilişkilidir (87, 89). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, translokasyonlar t(4;14), t(14;16) ve delesyon del(17p) ile ilişkili kötü prognoz, hastalarda hiperdiploid özellik gösteren trizomi bulunması durumunda görülmediği kaydedilmiştir (92).

Kromozom 1'de görülen anormallikler, MM'de en yaygın olarak bulunan yapısal anormallik olup, çoğunlukla 1p'de delesyonlar ve 1q'da amplifikasyonlar görülmektedir. Hastaların yaklaşık %35'inde 1q21 amplifikasyonu görülmekte olup, bu durum kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (93, 94). 1q21 bölgesinde, aşırı ekspresyonu myelom hücrelerinin büyüme ve farklılaşmasına neden olan CKS1B gibi genler ve PSMD4 yer almaktadır (95, 96). Yaygın olarak görülen bir diğer anormallik ise 1.kromozomun kısa kolunda görülen delesyondur (del(1p)). Bu durumda 1p13–1p31 arasındaki bölgede interstisyel delesyonlar görülmekte olup, kötü bir prognozla ilişkilidir (97, 98).

2.9. Tedavi

Kanser tedavisi, temel olarak mümkün olan durumlarda başarılı bölgesel müdahaleler ile cerrahi yöntemler ve radyoterapi ile sistemik kemoterapi yoluyla

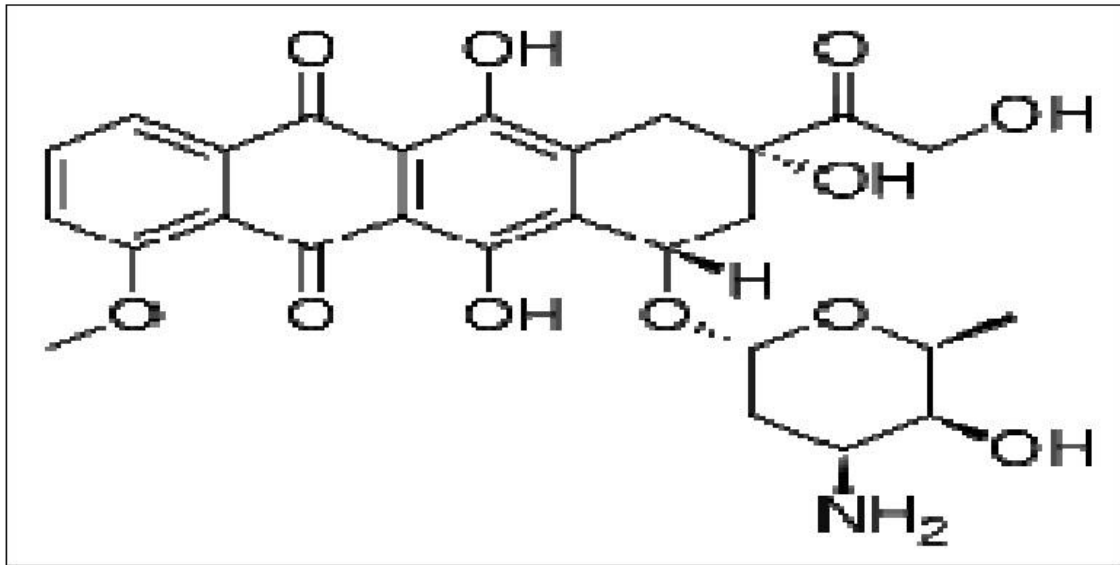
gerçekleşmektedir. Hastaların yaklaşık yarısı, bu yöntemler ile iyileşme gösterememektedir ve sadece sağ kalımları uzamaktadır veya hiçbir fayda görememektedir. Günümüzde klinikte kullanılan çoğu kanser kemoterapi ilaçlarının hedefi, hücre bölünmesinde yer alan bazı mekanizmaların inhibisyonudur ve bu amaçla geliştirilen antitümör bileşenleri sitostatik veya sitotoksik etkilere sahiptir (99). Tedavi, kanda total beyaz hücre sayısı (WBC), hücrelerin morfolojisi, sitogenetik analizler, kanserin tipi, tedaviye yanıt ve hastanın yaşı gibi prognostik etkenlere yapılmaktadır. Birçok multipl myelom hastası için kemoterapi tedavisi daha yaygındır. Çoğu sitotoksik kemoterapi kanser ilacı, kanser hücrelerinin büyüme ve bölünme yeteneğinin engellenmesi yoluyla çalışmaktadır. İlaçlar farklı yollarla uygulanmaktadır. Ağız yoluyla alındığında, ilaçlar bağırsaklardan hızlı bir emilim göstererek kan dolaşımına katılmaktadır ve kanser hücrelerine ulaşmak üzere taşınmaktadır. İyi emilim göstermeyen ilaçlar ise yağ veya kas dokusuna subkutanöz yolla enjekte edilmekte veya damar yoluyla verilmektedir. Bu sayede, ilaçlar kanser hücrelerine gecikme göstermeksizin hızlı bir yolla ulaşabilmektedir (99).

2.9.1. Kemoterapi

Kemoterapi, özellikle kanser tümörleri olmak üzere iyi ya da kötü özellikteki hücreleri öldüren kimyasallar yolu ile tedavi olarak tanımlanmaktadır. Yaygın kullanımıyla kemoterapi, kanser tedavisi için kullanılan antineoplastik ilaçlar veya bu ilaçların kombinasyonu ile standardize sitotoksik tedavi rejimleri olarak bilinmektedir. Kemoterapi, temel özelliklerinden biri hızlı bir biçimde bölünmek olan kanser hücrelerinin öldürülmesi yoluyla işlev sağlamaktadır. Bu durumda kemoterapi, normal koşullarda da hızlı bölünen kemik iliği hücreleri, sindirim kanalı hücreleri ve saç folikülleri gibi hücrelere de zarar verebilmektedir (100).

A. Antineoplastik ilaçlar

Neoplastik (kanser) hücrelerini kontrol eden veya öldüren ilaçlar, antineoplastik ilaçlar olarak tanımlanmaktadır. Bu grup ilaçların tamamı, bulantı, kusma, saç dökülmesi ve kemik iliği işlevlerinin baskılanması gibi istenmeyen yan etkilere sahiptir (101). Antineoplastik ilaçlara örnek olarak hidrosidaunorubisin adıyla da bilinen doksorubisin veya hidrosidaunorubisin (ticari adıyla Adrimisin) verilebilir (Şekil 2.3). Doksorubisin, bir antrasiklin antibiyotiktir ve doğal bir ürün olan daunomisin ile yakın ilişkilidir. Bütün antrasiklinler gibi doksorubisin de interkalasyonu ve makromolekül biyosentezinin inhibisyonu yoluyla DNA interkalasyonu yaparak etki göstermektedir (102).



Şekil 2.3:Doksorubisinin kimyasal yapısı (102).

Doksorubisin, DNA sarmalını transkripsiyon için açan topoizomeraz II enziminin ilerlemesini inhibe etmektedir. Doksorubisin, DNA zincirini replikasyon için açtıktan sonra topoizomeraz II kompleksini stabil hale getirerek DNA çift sarmalınının serbest kalmasını önleyerek replikasyon sürecini durdurmaktadır (102). Hematolojik

maligniteler, birçok tipte karsinom ve yumuşak doku sarkomları olmak üzere birçok kanserin tedavisinde kullanılmaktadır. İlaç hidroklorid formunda, intravenöz yoldan uygulanmaktadır.

Sitotoksik kemoterapi ilaçların hepsinin kendine özgü bir etki mekanizması vardır. Bazı ilaçlar kanser hücrelerini sadece çoğalırken öldürürken, bazıları bütün kanser hücrelerini öldürmektedir. İlaçlar tek olarak veya kombinasyon kemoterapi olarak birlikte işlev gören ilaçlarla birlikte kullanılabilir. Hematolojik kanser tedavi planlarının çoğunda, kemoterapi ilaçlarının kombinasyonu, bazı durumlarda radyasyon terapisi, immünoterapi, ve daha yeni bir tedavi olan monoklonal antikor tedavisi yer almaktadır. Hematolojik maligniteler için ilaç tedavisi planı yapılırken, birçok faktör göz önünde bulundurulmaktadır.

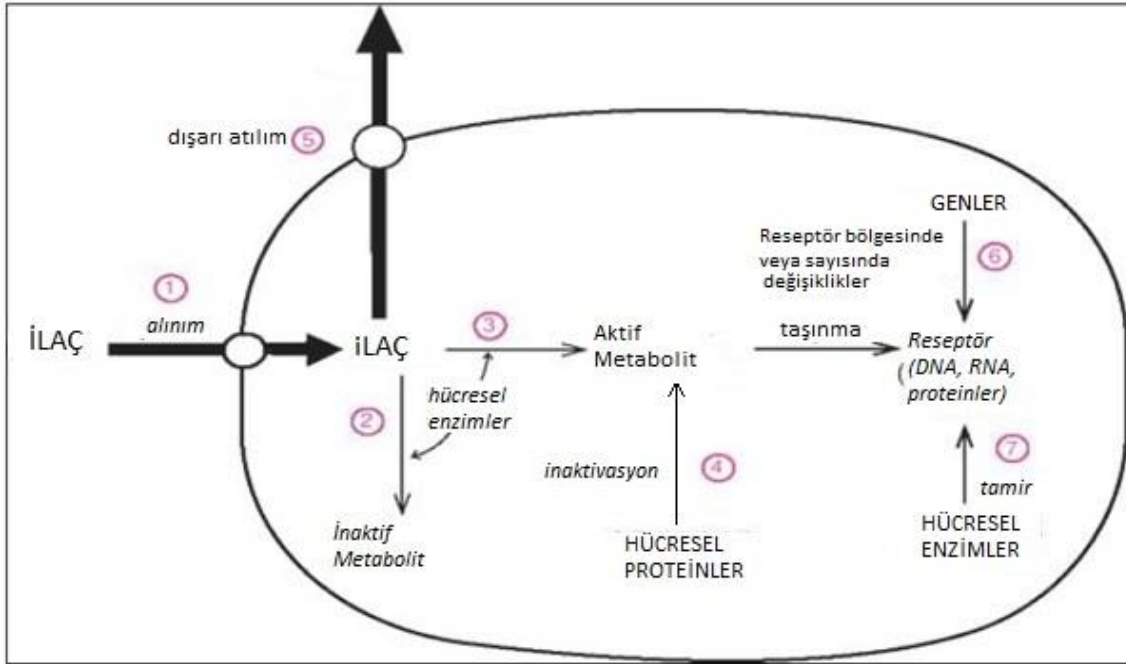
Bu faktörler; hastalığın şiddeti, hastanın durumu, vücudun tedaviye yanıtı, yaş, kilo, organ işlevlerinde değişiklik, toksisite riski ve beyaz kan hücresi (WBC) sayısı ile ilişkilidir (103, 104). Bu kanser ilaçlarının ideal bir biçimde kullanımı için gerekli önemli bilgiler arasında: a. Etki mekanizması; b. ilacın biyoyararlanımı, eliminasyonu ve önemli ilaç etkileşimleri vb. farmakolojik bilgiler ve c. toksisite sayılabilir. Tablo 2.4'de bu değişkenler gösterilmiştir (101).

Tablo 2.4: Kemoterapi ajanlarının sınıflandırılması

İlaç Adı	İlaç Sınıfı	Etki	Klerens yolu	Temel Toksikite
Daunorubisin (Cerubidine)	Antibiyotik (antrasiklin)	Topoizomeraz inhibisyonu, DNA interkalasyonu, serbest radikal oluşumu	Safra salgıları, karaciğer metabolizması	Myelosupresyon, N&V, kardiyomiyopati, vezikan,kırmızı idrara, mukozit
Busulfan (Myleran)	Alkilleyici ajan	DNA'da çapraz bağlar oluşturur	Metabolizma	Myelosupresyon, hepatotoksisite (Venoklüsif hastalık), pulmoner fibrozis
Siklofosfamid (Cytosan, Neosar)	Alkilleyici ajan	DNA zincirlerini çapraz olarak bağlar	Karaciğer metabolizması (renal)	Myelosupresyon, N&V, Sistit, kardiyak (yüksek dozda)
Sitarabin (Cytosar, Ara-C, cytosine Arabinoside)	Antimetabolit (pirimidin analoğu)	DNA içerisine yerleşir, DNA polimerazı inhibe eder	Karaciğer metabolizması	Myelosupresyon, N&V, mukozit, oküler, hepatik
Dosetaksel (Taxotere)	Bitkisel alkaloid	Mitotik içcik inhibisyonu	Safra salgıları, karaciğer metabolizması	Myelosupresyon, hipersensitivite
Klorambusil (Leukeran)	Alkilleyici ajan	DNA'da çapraz bağlar oluşturur	Metabolizma	Myelosupresyon, pulmoner toksikite, hepatotoksisite

Antineoplastik bir ilacın aktif olabilmesi için a) kanser hücresi içerisine alınması b) aktif ajana dönüştürülmesi c) metabolik olarak inaktive olması d) kimyasal olarak inaktive olması veya e) hücreden ekskresyonunun gerçekleşmesi gerekmektedir (101)

Şekil 2.4.



Şekil 2.4:Tümör hücrelerinde ilacın işlenişi ile ilişkili potansiyel yollar (101).

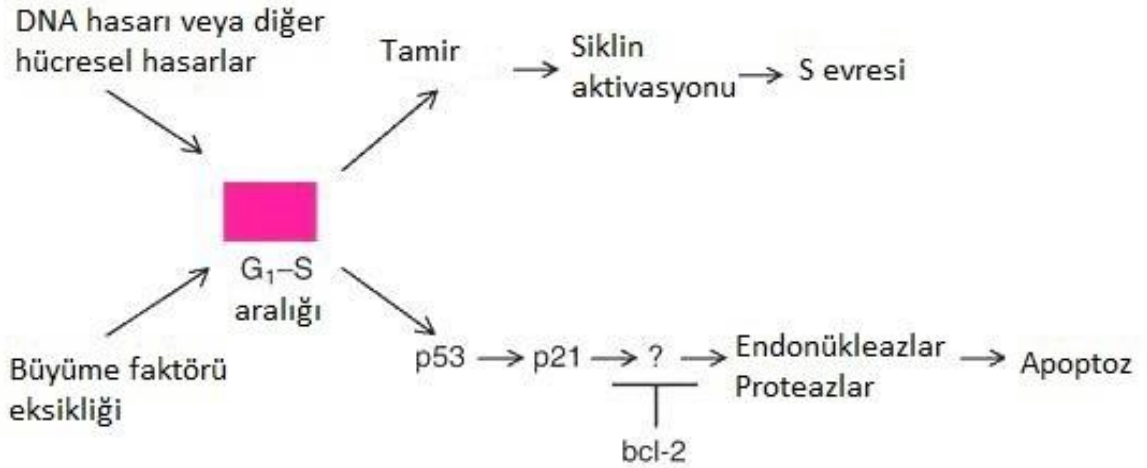
B. Antineoplastik ilacın etki mekanizması

Antineoplastik ajanlar, hücre büyümesi ve bölünmesine ilişkin bazı temel aşamalar ile etkileşime girmektedir. Antineoplastik ilaçların başlangıç hedefi, DNA molekülü üzerine direkt müdahaleden, hücre bölünmesi için gerekli olan mitotik iğciğin oluşumunun engellenmesine kadar uzanan büyük bir çeşitlilik göstermektedir. Antineoplastik ajanların tamamı, normal hücrel süreçlerde bozulmalara neden olarak, hücrenin ya hasarı hızlı bir şekilde tamir etmesini ya da apoptoz (programlı hücre ölümü) sürecine girmesini zorunlu kılmaktadır. Böylece bu ilaçların tamamı apoptozun başlaması yoluyla hücre ölümüne neden olmaktadır. Apoptoz, hücrel intihar olup; bütün yaşayan organizmalarda istenmeyen, anormal işlev gören veya zararlı hücrelerin yok edilmesi için gerçekleşen normal bir fizyolojik süreçtir (105).

C. Sitotoksik ilaçlar, apoptozu başlatmaktadır.

Bu ilaçların etki mekanizmasının anlaşılması için normal hücre döngüsünün işleyişinin bilinmesi önemlidir. Hücre döngüsü, hücrenin hazırlık sürecini ve mitozu kapsayan 4 ayrı evreden oluşmaktadır. G1 evresi, bölünmeyi yakın zamanda gerçekleştirmiş ve proliferasyona hazır hücrelerden oluşmaktadır. Hücreler, değişkenlik gösteren sürelerin sonunda DNA sentezine başlamaktadır, bu aşama S evresinin başlangıcıdır. S evresi bitiminde DNA sentezinin tamamlanmasını takiben, hücre mitoz öncesi bir ara dinlenme evresi olan G2 evresine girer. Son olarak, M evresinde kromozom kondensasyonu ve hücre bölünmesi gerçekleşmektedir. Mitoz evresi (M-evresi), hücre döngüsünün çok küçük bir kısmını oluşturmaktadır. Birçok hücrede, hücre döngüsü G1-S ve G2-M evreleri arasında geçici olarak durmaktadır. Bu aralık evrelerinde, hücrede S-evresine devam edilip edilmeyeceği, apoptoz ya da DNA tamirine geçilip geçilmeyeceği belirlenmektedir (106). Hücre döngüsünün yeni bir evresine devam edilebilmesi, siklin-bağımlı kinazlar olarak adlandırılan bir grup enzimin aktivasyonuna gerek duymaktadır. Bu enzimler ise diğer bir grup enzim olan siklinleri aktive etmektedir (107).

Hücrelerde kemoterapi ajanlarının oluşturduğu hasarın tamir edilemediği durumlarda, G1-S ve G2-M evreleri arasında apoptoz ile ilgili mekanizmaların yer alması durumunda hücre apoptoz sürecine girmektedir. Apoptotik proteinlerin bulunması ya da bulunmaması, tümör hücresinde ölümün gerçekleşmesi açısından sitotoksik ilacın başlangıçta efektörü ile etkileşim süreci kadar önemli bir faktördür. Antineoplastik ajanlar, programlı hücre ölümü yolağının başlangıcı için tetikleyici görevi görmektedir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: Kemoterapi tarafından tetiklenen sitotoksosite ile ilişkili potansiyel yollar (101).

D. İlaç Aktivitesini etkileyen faktörler

İlacın uygulanma anından itibaren vücutta hedef bölgeye ulaşmadan önce birikimine kadar olan süreçte, ilacın hücre içindeki fonksiyonunu etkileyen birçok faktör vardır. Bu faktörler, antitümör yanıtın alınmasında kritik öneme sahiptir. Bir ilacın fonksiyon görebilmesi için, vücuda alınması ve vücuttan metabolizma veya ekspresyon yoluyla temizlenmesinin önlenmesi gerekmektedir. İlaç hedef bölgeye aktif formunda iken ulaşmalı ve bu esnada protein bağlanması yoluyla inaktifleştirilmemiş olmalıdır (Şekil 2.4). Farmakokinetik, hastanın belirli dozda verilen ilacı nasıl işleyeceği ile ilgilidir (108).

En önemli dört farmakokinetik parametre:

a. Biyoyararlanım (ilaç emilimi): İlaçlar, vücutta plazmada yer alan ilaç dozunun yüzdesi olan biyoyararlanım açısından farklılıklar göstermektedir. Örnek olarak; intravenöz olarak uygulanan bir ilacın biyoyararlanımı %100'dür.

b. Dağılım hacmi: İlaç kan dolaşımında girdikten sonra, dokulara dağılım göstermektedir. İlacın plazma proteinlere (genellikle albumin veya a-asid glukoprotein) bağlanımı, dağılımı etkilemektedir.

c. Klerens: İlacın belirli bir zaman biriminde vücuttan uzaklaştırılması

d. İlacın yarılanma ömrüdür (109-115).

Kemoterapötik İlaç Çeşitleri

Kemoterapötik ajanlar, etki mekanizmalarına göre sınıflandırılmaktadır. Kemoterapötik ajanların çoğu; alkilleyici ajanlar, antimetabolitler, bitkisel alkaloidler, topoizomeraaz inhibitörleri ve antitümör antibiyotikler olmak üzere bazı genel gruplara ayrılmaktadır: Bu ilaç grupları, hücre bölünmesini veya DNA sentezini etkileyerek kanser hücrelerinin ölümüne neden olmaktadır (100).

A.Alkilleyici ajanlar

Alkilleyici ajan grubundaki ilaçlar, hücre içi koşullarda (sulu çözelti, 37°C, pH 7.4) birçok elektronegatif gruba alkil grubu ekleyebilme yeteneklerinden dolayı bu ismi almışlardır. DNA alkilleyici ajanlar, hücre döngüsünün herhangi bir evresindeki dinlenen veya çoğalmakta olan hücrelerle etkileşime girebilmekle birlikte, geç G1 ve S fazları daha çok sitotoksik etkiye sahiplerdir. Alkilleme, DNA replikasyonunu engellemekte ve etkilenen DNA'dan RNA transkripsiyonunun gerçekleşmesini önlemektedir. Aynı zamanda hidrolitik reaksiyonlar yoluyla ve alkillenen bazları tamir ile görevli tamir enzimlerinin aktivitesi sonucunda DNA'da parçalanmalara neden olmaktadır (99).

Bu grup ilaçlar, DNA'ya doğrudan saldırıda bulunarak çift sarmal üzerinde yer alan guanin bazlarının çapraz bağlanması sonucunda tümör büyümesini durdurmaktadır.

Bu durum, DNA zincirlerinin replikasyon için açılmasını ve ayrılmasını engellediği için hücre bölünmesini gerçekleştirememektedir. Bu ilaçlar genellikle nonspesifik olarak çalışmaktadır ve bazılarının (örn; siklofosfamid) in vivo ortamda aktif maddelere dönüşmesi gerekmektedir. Bu tür ajanlara örnek olarak; sisplatin, karboplatin, ifosfamid, klorambusil, busulfan ve tiyotepa verilebilir (102).

B. Antimetabolitler

Antimetabolitler, doğal olarak bulunan bileşiklerin analogları olarak tanımlanmaktadır ve oluşumu ya da kullanımları yoluyla temel metabolik yolları engellemektedirler. DNA'nın temel yapı taşları olan pürin veya pirimidin bazıları analogları olarak etki edebilmektedirler. Böylelikle hücre döngüsünün S evresinde bu bileşiklerin DNA'da yer almasını engelleyerek normal hücre gelişimi ve bölünmesini durdurmaktadırlar. Bu grup ilaçlar arasında, timidilat sentetazı inhibe eden 5-Fluorourasil (5-FU) önemli bir örnektir. Fludarabin, çoklu olarak DNA polimerazları, DNA primaz ve DNA ligaz I'in işlevlerini engellemektedir ve bu enzimlerin DNA replikasyonu esnasında yüksek aktivite göstermesinden dolayı S evresine özgü çalışmaktadır. Bir folat antagonisti olan metotreksat; pürin ve pirimidin sentezi için gerekli olan dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe etmektedir (100).

C. Bitkisel Alkaloidler

Bu alkaloid grubu, bitkilerden elde edilmektedir ve mikrotübül sentezini ve mitotik içcik oluşumunu engelleyerek hücre bölünmesini durdurmaktadırlar. Mikrotübüller, sitotoksik doğal ürünlerin ana hedefidir. Mikrotübüller üzerinde etki eden ilaçlar, tübülün üzerinde birçok bölgeye ve mikrotübüllerin farklı pozisyonlarında bağlanarak metafaz/anafaz geçişi esnasında mitozu durdurarak hücre ölümüne neden olmaktadır. Bu gruptaki ilaçlara örnek olarak Vinca bitkisinden elde edilen alkaloidler

olan ve tblin üzerinde spesifik bölgelere bağlanarak tblinlerin mikrotübül oluşturması engelleyen vinkristin, vinblastin ve vinorelbin verilebilir. Taksanlar içerisinde ye alan yeni bir grup olan ve *Taxus brevifolia* bitkisinden elde edilen paklitaksel, sentetik türevi olan dosetaksel, tblinlerin polimerleşmesini arttıarak mikrotübül formasyonunu ve stabilizasyonunu sağlayarak hücre bölünmesini engellemektedir (100).

D. Topoizomeraz inhibitörleri

Farklı sayıda burguya sahip eř DNA döngülerine topoizomer adı verilmektedir. Bir başka deyişle, aynı formüle sahip ancak farklı topolojide moleküllerdir ve birbirlerine çevirimleri için DNA zincirlerinin kesilmesi gerekmektedir. DNA topoizomerazlar, DNA'nın üç boyutlu geometrisini (topoloji) düzenleyen enzimlerdir. Bu sayede topolojik izomerlerin dönüşümünü ve açılmasını sağlamaktadırlar. Bu durum DNA sarmalının transkripsiyon ve replikasyonda gerekli enzimatik düzeneğin düzgün bir işlev gösterebilmesi için açılmasının gerekli olduğu, DNA süper sarmalının düzenlenmesi süreci ile ilişkilidir (116).

Topoizomerazlar, DNA'nın topolojisini düzenleyen temel enzimlerdir. Tip I veya tip II topoizomerazların inhibisyonu, DNA'nın süper sarmal yapısını etkileyerek hem transkripsiyon hem de replikasyonu engellemektedir. Tip I topoizomeraz inhibitörlerinin bir grubu, irinotekan ve topotekanın yer aldığı kamptotekanlardır. Tip II inhibitörlere örnek olarak ise; amsakrin, etoposid, etoposid fosfat ve tenoposid sayılabilir. Bu grup, mayıs elması (*Podophyllum peltatum*) bitkisinin kökünden elde edilen alkaloidler olan epipodofilotoksinlerin yarı sentetik türevleridir (117).

E. Antitümör Antibiyotikler

Klinikte kullanılan pek çok kanser ilacı (antrasiklinler, mitoksantron, daktinomisin vb.) DNA ile interkalasyon yoluyla etkileşime girmektedir. İnterkalasyon ise, Watson-Crick baz eşleşmesinin düzenini değiştirmeksizin, düzlemsel aromatik veya heterosiklik halka sistemlerinin, komşu baz çiftlerinin arasına DNA sarmalının eksenine dik bir biçimde yerleşmesi olayıdır.

Antitümör antibiyotik ilaçların birçok grubu bulunmaktadır ancak genel olarak hücre bölünmesini çeşitli yollarla engellemektedirler: (1) DNA'da iki komşu nükleotidin arasına interkalasyon gerçekleştirerek ayrılmanın engellenmesi (2) ribonükleik asidi (RNA) inhibe ederek enzim sentezinin engellenmesi ve (3) hücrenin replikasyon sürecinin bozulması. Bu grup, bir toprak mantarı olan *Streptomyces*'in çeşitli türlerinden elde edilmektedir. Örnek olarak antrasiklinlerden doksorubisin ve aynı zamanda topoizomera II'yi inhibe eden daunomisin, aktinomisin, bleomisin, mitomisin ve plikamisin verilebilir. Bleomisinin kendine has bir etki mekanizması vardır. Fe(II) bleomisin kompleksinin oksidasyonu ile serbest radikallerin oluşumu sonucunda hücrede hasar ve kromozomal anormallikler gerçekleşmektedir (100).

2.9.2. Multipl Myelom Tedavisi

MM tedavisinde hedef, hastalığın kontrolü, hastanın hayat kalitesinin korunması ve sağkalımın uzatılmasıdır. Birkaç istisna dışında, yalnızca semptomatik hastalığa sahip bireyler tedaviye ihtiyaç duymaktadır. Tedavi için yaş, performans durumu ve komorbiditeler göz önüne alınmaktadır. En uygun tedavi sırası ve kombinasyonunun seçimi ise hala tartışma konusudur. Bu nedenle hastalar, uygun durumlarda klinik araştırmalara katılım için yönlendirilmektedir. Temel soru, hastanın olog kök hücre nakli (OKHN) için uygun olup olmadığıdır. Yapılan çalışmalarda, transplantasyonun

yapıldığı ve yapılmadığı durumlar arasında yapılan ilk tedavi sonrasında maksimal yanıt ve uzun dönem sonlanım arasında bir bağlantı gözlemlenmiştir (118, 119). Bu nedenle tedaviye yanıtın etkinliğinin artırılması, en büyük hedefdir.

Önemi belirsiz monoklonal gamopati (MGUS) ve asemptomatik myelom hastaları, düzenli olarak takip edilmektedir ancak semptomatik myelom gelişinceye kadar tedavi edilmemektedirler. MGUS'un myeloma progresyonunu geciktirecek veya engelleyecek bir müdahale yöntemi henüz bulunmamaktadır (120, 121). Asemptomatik myelom hastalarının, uzman bir hematolog tarafından düzenli takip edilmesi gerekmektedir. Randomize kontrollü çalışmalarda, asemptomatik myelomun kemoterapi ile tedavisinin sağkalım üzerinde hiçbir etkisinin bulunmadığı gösterilmiştir (120). Günümüzde yapılan çalışmalarda, semptomatik myeloma doğru progresyon riski altında bulunan hastaların tedavisi için yeni tedavi ajanlarının kullanımı araştırılmaktadır ve uygun hastalara klinik çalışmalara dahil olmaları önerilmektedir (120). BCSH (British Committee for Standards in Haematology) kılavuzları; progresyon açısından düşük risk altındaki MGUS hastalarının birinci basamak sağlık hizmetlerindeki doktorlar tarafından takibini önerirken, yüksek risk altında olanların uzman bir hematoloğun danışmanlığı altında takibini önermektedir.

Geçtiğimiz on yılda, bortezomib, talidomid ve lenalidomidin (immünomodulator ajanlar) kullanılmaya başlanması ile birlikte, semptomatik myelom tedavisinde benzersiz bir ilerleme gerçekleştirilmiştir. Bu ilaçlar, günümüzde tedavinin temelini oluşturmaktadır. Birçok hasta, ilk tedaviye yanıt vererek hastalığın stabil olduğu bir döneme girmektedir, bu durum da daha iyi bir hayat kalitesi ile ilişkilidir (122-126). Hastalığı iyileştirecek bir tedavinin bulunmamasından ötürü, hastalıkta nüks kaçınılmaz olarak gerçekleşmektedir. Yine de, hastaların en az yarısı, benzer ya da farklı ilaçlarla

ikinci defa uygulanan kemoterapiye yanıt verebilmektedir. Tedaviye yanıt, birbirini takip eden nüksler boyunca giderek zayıflamaktadır. Bu durum, refrakter son evre hastalığa kadar devam etmektedir, bazen ekstramedüller tablolar ve sitopeni de eşlik edebilmektedir. Tedavinin çoğu aşamasına ilişkin klinik çalışmalar bulunmaktadır ve kriterleri uygun olan hastalar bu çalışmalara yönlendirilmelidir.

Yani tanı alan semptomatik myelom hastaları için tedavi yaklaşımı hastanın yaşı ve komorbiditelere bağlı olarak planlanmaktadır. Başlangıçtaki kemoterapi rejimleri, en düşük toksisite ile en büyük yanıt alınımını hedeflemektedir. Genç (genelde 65 yaş altı) ve iyi durumdaki hastalarda, bu tedaviye yüksek doz kemoterapi ve otolog kök hücre nakli ile devam edilmektedir. Otolog transplantasyon için uygun olmayan daha yaşlı veya ağır komorbiditelere sahip hastalarda ise yalnızca kemoterapi uygulanmaktadır. Tedaviye yanıt, paraproteinler veya hafif zincir düzeyindeki azalmaya göre evrelendirilmektedir (Tablo 2.5).

Tablo 2.5: Myelomda hastalık yanıtı veya progresyonun sınıflandırılması (127)

Sınıflandırma, paraproteinlerdeki artış veya azalmaya dayanarak gerçekleştirilmektedir. Ancak kemik iliğindeki plazmasitozun derecesi, kemik lezyonlarının progresyonu, ve yumuşak doku plazmasitomunun varlığı gibi faktörler de değerlendirmede kullanılmaktadır. Kemik iliğindeki rezidüel myelom hücrelerini belirlemek için kullanılan teknikler geliştikçe, yanıtla ilişkin örnek olarak şiddetli tam yanıt gibi farklı yanıtlar teşhis edilebilmektedir.

Tam yanıt

Paraprotein tespit edilmemesi ve yumuşak dokularda plazmositomların yok olması ve kemik iliğinde plazma hücresi sayısının $< \%5$ olması.

Çok iyi kısmi yanıt

Paraprotein seviyelerinde $\% 50$ 'den daha fazla düşüş veya paraproteinlerin ölçülemeyecek kadar düşük seviyede olması.

Kısmi Yanıt

Paraprotein seviyelerinde $\%90$ 'dan daha fazla azalma

Stabil hastalık

Hastalık yanıtı veya progresyonuna ilişkin herhangi bir kriterin sağlanamaması

Progresif hastalık

Paraprotein seviyelerinde en az $\%25$ 'lik artış (en az 5 g/L 'lik bir artış), yeni kemik lezyonlarının oluşumu veya (düzeltilmiş serum kalsiyum seviyesi >2.65 mmol/L)

Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalardan elde edilen önemli bulgular, MM büyümesinde ve sağkalım ile ilişkili olan moleküler yolların daha iyi anlaşılmasını olanaklı kılmıştır (128, 129). Ek olarak, kodlama yapmayan RNA'lar alanındaki çalışmadan elde edilen bulgular sonucunda hastalığın tedavisinde çığır açabilecek gelişmeler olması beklenmektedir. Kodlama yapmayan RNA'lar içerisinde yer alan miRNA'lar, gen ekspresyonunun posttranskripsiyonel düzenlenmesi ile ilgili oldukça

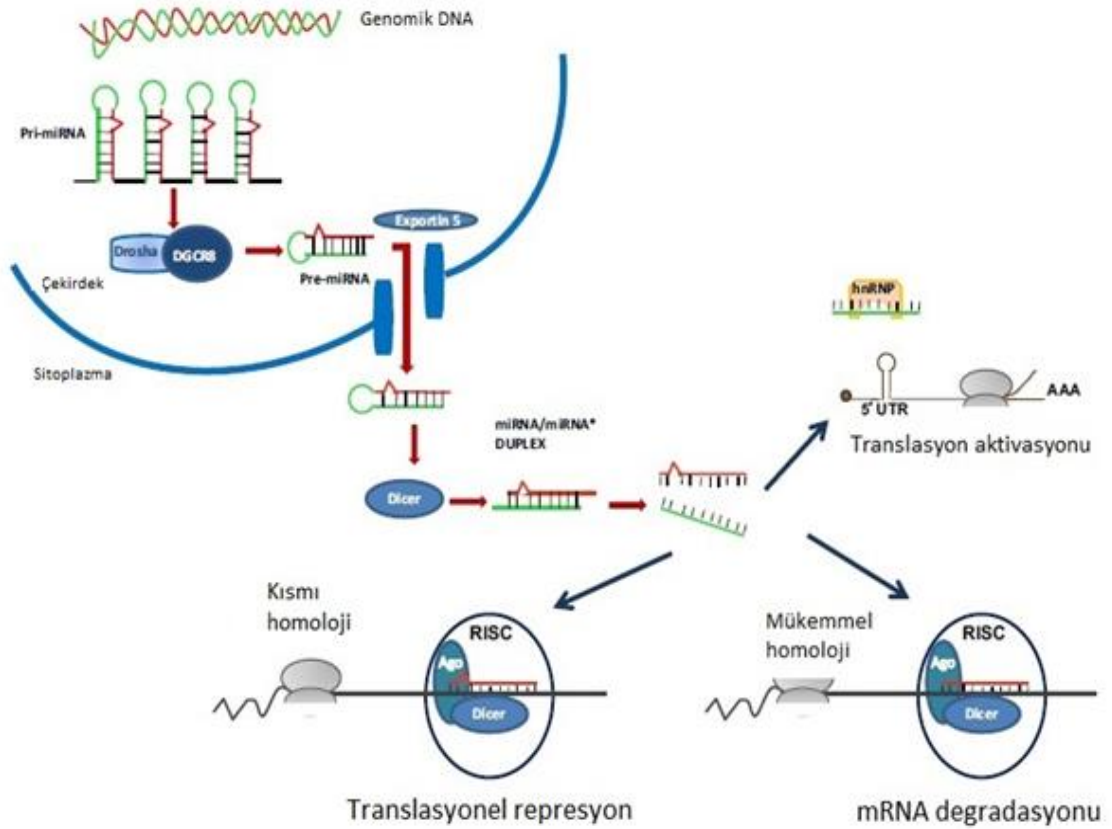
önemli görevlere sahiptirler (128, 130, 131) ve protein sentezinin engellenmesine veya mRNA degradasyonuna neden olabilmektedirler. miRNA'lar onkogen olarak (onkomiRNA'lar) veya tümör baskılayıcı (TS-miRNA'lar) olarak etki gösterebilmektedir (132, 133) ve kanser oluşumunun kilit aşamalarında büyük rol oynamaktadırlar (134, 135). Bütün bu bilgiler ışığında, kanser oluşumunu sağlayabilen veya baskılayabilen birçok geni hedefleme yeteneğine sahip miRNA'lar, potansiyel kanser hücresi hedefleri/antikanser ajanları olarak araştırmacılardan büyük ilgi görmektedir (136). MM hastalığında çeşitli miRNA'ların düzenlenmesinde bozulmalar olduğu bulunmuştur (128). MM patogenezinde miRNA'ların rol oynadığı net bir biçimde gösterildiği halde, miRNA temelli tedavi için çalışmalar henüz başlangıç aşamasındadır ve MM tedavisinde miRNA'ların potansiyel klinik uygulamalarına ilişkin çok az çalışma bulunmaktadır (137, 138). miRNA'lar kullanılarak etkili bir tedavinin geliştirilebilmesinin önündeki en önemli engel, uygun miRNA'ların kemik iliği mikroçevresine ulaştırılması ve hedef dışında etkilere yol açmaksızın malignant plazma hücreleri tarafından alınabilmesinin sağlanmasıdır (136).

2.10. MikroRNA'lar

MikroRNA'lar (miRNA'lar), kısa, kodlama yapmayan 22 nükleotidden oluşan RNA'lardır ve fizyolojik ya da hastalıkla ilişkili süreçlerde önemli işlevlere sahiptirler. Hedef genlerin mRNA'larına bağlanabilme özelliğine sahiptirler. Bu sayede translasyonun baskılanmasına neden olmaktadır. RNA interferansı yoluyla post-transkripsiyonel düzeyde gen ekspresyonunun potansiyel düzenleyicileridirler (139). miRNA'ların, transkripsiyonu, RNA polimeraz II veya III tarafından gerçekleştirilmektedir ve saç tokası şeklinde bir yapıya sahiplerdir. Daha sonra, nukleusta bir RNAz enzim kompleksi olan Drosha ve çift zincirli RNA'ya bağlanan bir domain proteini olan DGCR8/Pasha tarafından işlenirler ve pre-miRNA'lara dönüşürler (Şekil 2.6).

Sonrasında ise pre-miRNA'lara Exportin-5 proteini ile sitoplazmaya aktarılır ve Dicer enzimi ve birlikte görev alan TRBP/PACT proteinleri ile çift zincirli miRNA'lara dönüştürülürler. Daha sonra yer alan olgunlaşma sürecinde ise iki miRNA zinciri birbirinden ayrılarak zincirlerden bir tanesi, RISC (RNA-induced silencing complex) kompleksinde yer alan Argonaut 2 (AGO2) proteini ile bağlantı kurarak, burada hedef mRNA'ların baskılanması için bir rehber görevi görür (140).

MiRNA'lar, gelişim sırasında lineajın belirlenmesi ve yönetiminde önemli görevlere sahiptir ve çoğu embriyonik kök hücrede sentezlenmemekle birlikte gelişim sırasında dokuya özgü bir biçimde oluşmaktadırlar. Hayvan evrimi sürecinde fenotipik varyasyonlarla ilişkilidirler ve miRNA hedef genlerinin düzenlenmesindeki değişikliklerin insanlarda bazı hastalıklara karşı hassasiyet gibi fenotipik varyasyonlar üzerinde etkili olabileceği düşünülmektedir (141).



Şekil 2.6: miRNA biyogenezinin ve translasyonel düzenlemenin şematik gösterimi (142).

2.10.1. MikroRNA'lar ve Kanser

Kronik lenfositik lösemi (KLL), akut promyelositik lösemi (APL), akut myeloid lösemi (AML) önemi belirsiz monoklonal gamopati (MGUS), multipl myelom ve non-Hodgkin lenfoma, meme kanseri, özofagus kanseri, gastrik kanser, berrak hücreli böbrek kanseri, serviks kanseri gibi birçok kanser türünde, miRNA'larda çeşitli değişiklikler görülmektedir (143). miRNA'lar, c-MYC, p53, RAS, BCR/ABL ve TWIST1- miR10b-HOXD10 gibi onkojenik, tümör baskılayıcı ve metastatik yolların düzenlenmesinde yer alabilmelerinden dolayı, tümör oluşumunda birçok role sahiptir. Ayrıca miRNA'ların ekspresyonu da onkogenlere ve tümör baskılayıcılara göre şekillenebilmektedir (143, 144). Neoplastik hastalıklarda görülen anormal miRNA düzeyleri, genetik ve epigenetik mekanizmaların birlikte veya ayrı ayrı etkileri ile

transkripsiyonel ve postranskripsiyonel modifikasyonların sonucunda ortaya çıkmaktadır ve hücrede homeostazın bozulmasına ve kanserin temel özelliklerinden biri olan daha az farklılaşmış bir hücrenel duruma neden olmaktadır (145, 146). miRNA'lar, onkogen olarak etki göstererek; neoplastik hücrelerin dışsal büyüme sinyallerinden bağımsız hale gelmesi, kontrolsüz proliferasyon ve sağkalım gibi kansere özgü olaylara etki edebilmektedir ve tümör hücrelerinin büyüme karşıtı sinyallere hassasiyetsiz hale geçmesine neden olabilmektedir. Klinik uygulamalarda miRNA'lar prognostik bir faktör olarak gösterilmiştir. Örnek olarak, KLL hastalarında miRNA'ların ekspresyon seviyeleri, ilk tedaviye kadar geçen süre için belirleyici olabilirken; bilinen bazı moleküler prognostik faktörlerinin mutasyonu ile de ilişkili bulunmuştur (147). miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin, aynı zamanda hepatosellüler karsinom, pankreas kanseri, kolon adenokarsinomu, akciğer kanseri, özofagus kanseri ve melanom gibi çeşitli kanserlerde hastaların genel sağkalımı ile ilişkili olduğu kaydedilmiştir (148). Ek olarak miRNA'lar, hastaların bireysel olarak kimyasal yanıtlarının değerlendirilmesi amacıyla hem in vitro hem de in vivo ortamlarda incelenmiştir (149). miRNA'ların serum veya plazmada ölçülebilmesi, onları kolorektal, akciğer, prostat ve böbrek kanserleri gibi solid tümörlerin tanısı için kullanışlı bir biyobelirteç haline getirmiştir (148, 150). Kan dolaşımındaki miRNA seviyeleri, tümör kökenli olabilmekte veya sistemik yanıtı yansıtabilmektedir. Ancak miRNA paternlerinin belirlenebilmesi açısından serum, plazma veya periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC) arasından hangisinin çalışma için en uygun örnek olduğu henüz net olarak belirlenememiştir (151). miRNA'ların kanser üzerindeki önemli etkileri, onları terapötik bir hedef aday olarak çekici hale getirmektedir. miRNA'ların tedavi etkilerinin düzenlenmesi ile klinikte kanser için faydalı olabilecek uygulamalar geliştirilebilecektir.

2.10.2. Multipl Myelom'da MikroRNA'lar

İlk olarak 2004 yılında Chen ve arkadaşları, miRNA'lar ve hematopoez düzenlenmesi arasındaki ilişkiyi göstermiştir (152). Böylelikle, bütün hücre hatlarında aynı miRNA'ların her zaman eksprese edilmediği göz önüne alındığında, hematopoetik hücre çeşitlerinden her birisinin farklı şekillerde miRNA ekspresyonu yaptığı belirlenmiştir. Non-Hodgkin lenfoma, Hodgkin lenfoma, KLL, AML, APL, ALL ve MM gibi hematolojik kanserlerin hemen hemen tamamında, miRNA ekspresyon profillerinde çeşitli anormallikler gözlenmiştir.

MM, malignant plazma hücrelerinin klonal proliferasyonu ile karakterize, kronik ve günümüzde hala tedavisi olmayan bir hastalıktır. Sayısal kromozom anomalileri, translokasyonlar, gen mutasyonları, epigenetik değişiklikler ve kemik iliği mikroçevresinde malignant plazma hücreleri ile stroma hücrelerinin doğrudan etkileşimi gibi faktörler, MM patogenezinde rol oynamaktadır (153). MM patogenezi, çok basamaklı bir süreçtir ve 14q32.33 ile 4p16.3 primer erken kromozomal translokasyonları sonucunda MMSET ve FGFR3 genlerindeki deregülasyon, bu süreçte rol oynamaktadır. Bu erken kromozomal değişiklikler, hem MM'de hem de MGUS'da görülmektedir. Hastalık ilerledikçe; KRAS ve NRAS'ın aktivasyonu, MYC geninde kompleks karyotipik anormallikler, TP53 ve FGFR3 genlerinde mutasyonlar ve CDKN2A ve CDKN2C'nin inaktivasyonu gibi çeşitli sekonder kromozomal translokasyonlar ve gen mutasyonlarına rastlanmaktadır. MM biyolojisinde miRNA'ların olası etkileri, MM patogenezinin aydınlatılması için gerçekleştirilen çalışmalar için vaat edici bir alan oluşturmaktadır.

2.10.2.1. MM'de miRNA deregülasyonu

Şu ana kadar pek çok araştırmacı tarafından MM'de miRNA ekspresyon paternlerinin detaylı analizi gerçekleştirilmiştir. MGUS'tan MM'ye doğru progresyonun

çok aşamalı doğasını göz önüne alarak, Pichiorri ve arkadaşları farklı MM soylarında, sağlıklı insanlardan elde edilen CD138+ primer plazma hücrelerinde ve MGUS olan veya medüller/ekstramedüller MM hastalarında miRNA ekspresyon analizi gerçekleştirmişlerdir (154). Sağlıklı insanlardan ve MGUS hastalarından elde edilen plazma hücreleri (PH) kıyaslandığında, 48 miRNA'nın up regülasyon veya down regülasyon yoluyla deregüle olduğunu bulmuşlardır. MM örnekleri ve sağlıklı PH karşılaştırıldığında, deregüle olan miRNA sayısı 37 tanesinde up regülasyon ve 37 tanesinde down regülasyon olmak üzere 74'e yükselmiştir. Bu sonuçlar, miRNA deregülasyonunun hastalık progresyonu ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir. İlginç bir biçimde, MM hücre hatlarından elde edilen miRNA ekspresyon paternleri MM hastalarından elde edilenlerdekine çoğunlukla down-regüle olanlardan ziyade (%30 uyumluluk) up-regüle olan miRNA'lar (%90 uyumluluk) olmak üzere benzer profiller sergilemiştir. Zhou ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise, yeni tanı almış 52 MM hastası ve 2 sağlıklı donörün miRNA ekspresyon profilleri karşılaştırılmıştır (155). Analiz edilen 464 insan miRNA'sı içerisinde, araştırmacılar MM örneklerinde sağlıklı donörlerinkine kıyasla 95 miRNA'nın ortalama ekspresyon düzeyinin daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Yapılan gen kümesi zenginleştirme analizi (GSEA; gene set enrichment analysis) ile, daha yüksek seviyelerdeki total miRNA ekspresyon düzeyinin, kanserin başlangıcı ve progresyonu ile ilişkili genlerin ekspresyonu ile anlamlı düzeyde ilişkili olduğu kaydedilmiştir (156). Denetimsiz hiyerarşik kümeleme analizi ile, eksprese olan 95 miRNA, iki farklı ekspresyon kümesine ayrılmıştır. Birinci kümedeki hastaların, ikinci kümedeki hastalara kıyasla gen ekspresyonuna dayalı risk skoru anlamlı derecede daha yüksek olarak bulunmuştur. Bu durum, toplam miRNA ekspresyonu ile risk skoru arasında pozitif bir korelasyon olabileceğini düşündürmektedir (157). MM'de miRNA ekspresyon profilinin

araştırılması için Lionetti ve arkadaşları, alternatif bir yöntem denemiştir (158). Çalışmada, 48 MM ve PHL Hastası, translokasyon/siklin (TC) sınıflandırılmasına göre ayrılmıştır (159). Buna göre, ayrı karyotipik anormalliklere sahip 5 ayrı altgrup belirlenmiştir. 74 miRNA içerisinde, ekspresyon düzeyi veri seti içerisindekilerin ortalamasına kıyasla iki kat değişiklik gösteren 26 miRNA; çoklu sınıf analizine göre 5 translokasyon/siklin (TC) grubu içerisinde yüksek derecede farklılaşmış biçimde eksprese edilmektedir. Daha sonrasında bu kritik miRNA'lar, 1q kazanımı, 13 ve 17 delesyonu ve hiperdiploidi gibi genetik değişikliklerin tiplerine göre sınıflandırılmıştır. Bu çalışmalarda benimsenen yaklaşım, miRNA ekspresyonları ile MM patogenezinde etkili temel kromozomal değişiklikler arasında korelasyon kurulabilmesine olanak sağlamıştır. Bu sayede miRNA paternleri ile gen ekspresyon profilleri ve karyotipik imza arasında bir ilişki kurulabilecektir. Elde bulunan genomik veri ile miRNA profillerini birleştirme yaklaşımı, tercih edilebilir olmakla birlikte; analizi yapılan total miRNA sayısının sürekli güncellenmesi gibi, kullanılan mikroarray platformlarının farklılığı nedeniyle tam olarak kıyaslama yapabilmek mümkün olmayabilmektedir. Özet olarak, bu çalışmaların sonucunda MM gelişiminde kritik rol oynayan genlerin kontrolünü sağlayabilecek birçok miRNA keşfedilmiştir.

2.10.3. MM tedavisinde miRNA'lar

miRNA'ların keşfi yeni olmamasına rağmen, miRNA'ların tedavi edici özellikleri üzerine son birkaç yıl içerisinde çalışılmaya başlanmıştır. miRNA'lar gen ekspresyonunun posttranskripsiyonel düzenleyicileridir ve normal ve anormal hücrenin karmaşık biyolojisi içerisinde temel görevler almaktadırlar. Tümörlerde genetik değişikliklerle ilgili diğer alanlara ilişkin uzun süredir bazı bilgiler mevcutsa da; kanser gelişiminde bir aracı olarak miRNA regülasyonundaki bozukluklar yeni tanınmaya başlanmıştır. Bu moleküllerin nasıl çalıştığı ve çeşitli hedefleri düzenlediğinin

anlaşılmasından sonra, miRNA'lar transkriptom ve proteom üzerinde ince düzenlemeler yapma imkânı sağlayacaktır (160). Her bir miRNA molekülü, birçok hücresel fonksiyonu düzenleyen bir ağın uyumlu bir parçası olarak yüzlerce mRNA'yı hedefleyebilmektedir. Günümüzde, birçok hastalığın aslında miRNA ekspresyonundaki bozukluklarla ilişkili olduğu anlaşılmaktadır. Bu nedenle, insanda kanser hastalığının tedavisi için, eksik olan miRNA'ların takviyesi veya aşırı eksprese olan miRNA'lar için antagonistik bir tedaviyi temel alan bir yaklaşım, mantıklı bir yöntem olabilir. Hızla gelişmekte olan bu yeni alan, "miRNA hedefli terapi" olarak tanımlanabilir ve hedeflenen tedavi planı içerisine dahil edilebilir. İnsanda kanser hastalığı için moleküler hedefli birçok tedavi ajanı geliştirilmesine rağmen çoğu durumda tedaviye yanıt süresi istenilen düzeyde olamamaktadır. miRNA terapisi, tek bir hedeften çoklu hedefe dayalı bir yaklaşıma geçilmesi gibi oldukça faydalı bir imkân sağlayabilecektir ve böylelikle tümör hücrelerinde önemli zararlar oluşturma potansiyeline sahiptir.

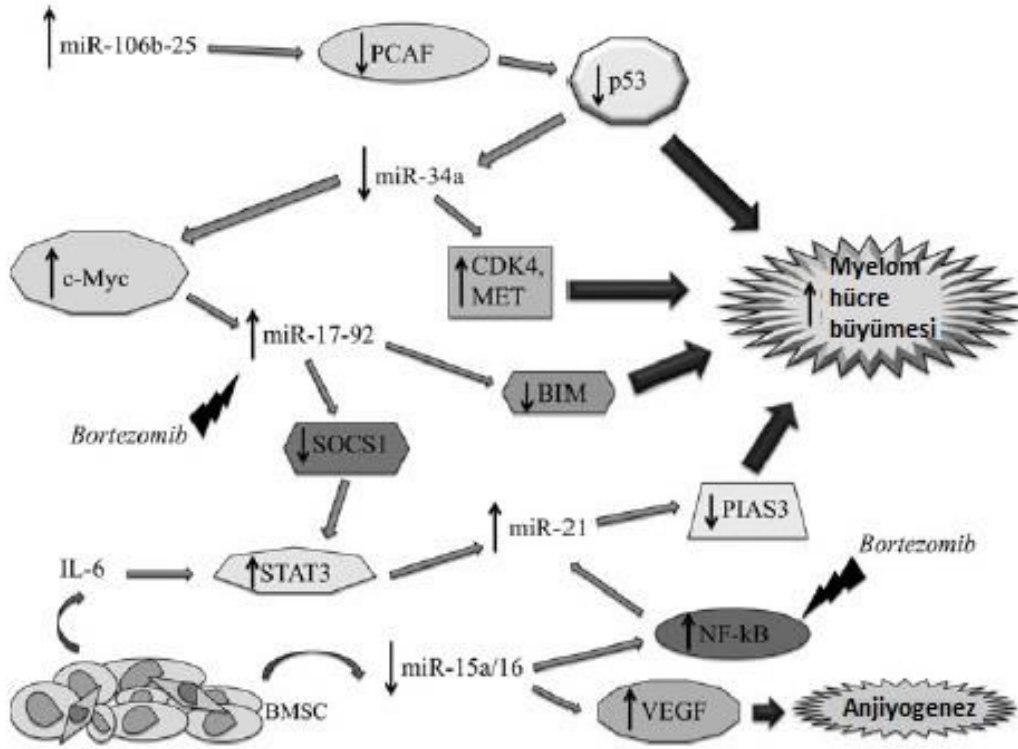
Son zamanlarda, MM'de genetik sınıflandırılmanın sağlamış olduğu bilgiler ışığında spesifik miRNA imzaları tanımlanmıştır ve hastalığın farklı alt grupları ile ilişkilendirilmiştir (161-163). PH'lerin malignant transformasyonu üzerindeki olası etkilerinin belirlenebilmesi amacıyla pigenetik düzenleyicilerin bu sınıfının görevleri araştırılmaktadır. Seckinger ve arkadaşları, normal ve malignant PH arasında miRNA profillerinde bazı farklılıklar tespit etmişlerdir ve farklı eksprese edilen bu miRNA'lar MM'de sağkalımı kuvvetli bir biçimde etkilemektedir (164).

MM hücrelerinde disregüle olan miRNA ekspresyonu, sitogenetik anormalliklerle ilişkilidir ve MM genetik alt gruplarına özgü biçimde gen ekspresyonunda değişiklikler ile bağlantılıdır. Bu durum, hastalığa karşı yeni tedavi stratejilerinin belirlenmesi için bir zemin sağlamaktadır (165-168). Aslında, son

zamanlarda yapılan çalışmalarda MM de dahil olmak üzere birçok malignitede, onkojenik miRNAların (onkomiRler) bağlantısı gösterilmiştir ve bu bulgular doğrudan bu onkomiRleri hedefleyen terapötiklerin tasarlanmasına neden olmuştur. “Bir ilaç olarak miRNA’lar” olarak tanımlanabilecek bu alternatif yaklaşım, sentetik olgun miRNA kopyalarının uygulanması yoluyla tümör hücrelerinin yeniden programlanmasını hedeflemektedir. Örnek olarak MM’de tümör hücrelerinde birçok miRNA büyük ölçüde up regüle veya down regüle olmaktadır ve bunların inhibisyonu (169, 170) veya ekspresyonlarının yeniden oluşturulması durumunda (171, 172) hücre proliferasyonu ve sağkalımının etkilendiği gösterilmiştir.

2.10.4. MiR-21

MiR-21, antiapoptotik özelliklere sahip bir onkojenik miRNA olarak tanımlanmıştır. miRNA’ların MM’deki rolünü gösteren ilk çalışma, 2007 yılında iki HCML hattı (İnsan myelom hücre hattı) ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada (173), miR-21’in IL-6/STAT3 yolağı ile upregüle olduğu ve aşırı ekspresyonunun IL-6’nın yokluğu durumunda bile apoptozun inhibisyonuna neden olduğu bulunmuştur (Şekil 2.7).

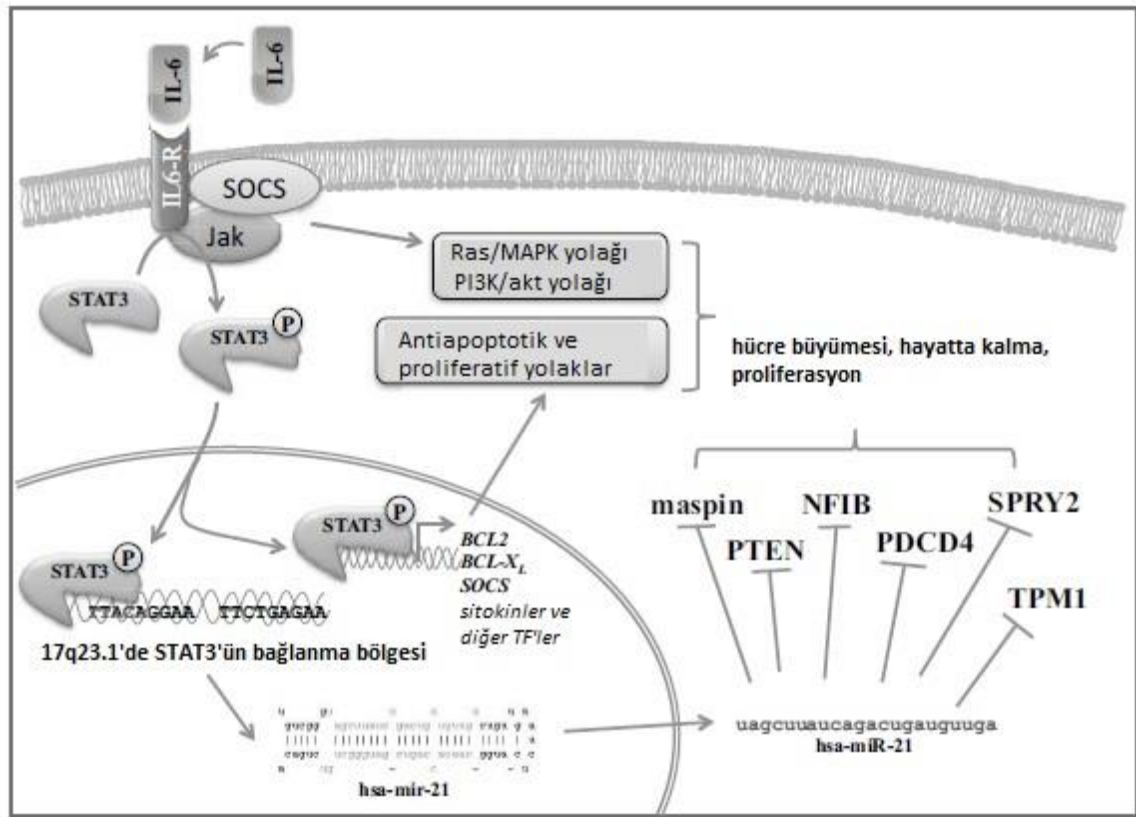


Şekil 2.7: miRNA yolları ve multipl myelom patogenezi (174).

MiR-21'in kanser ve kardiyovasküler hastalıkların da dahil olduğu birçok patolojide up regüle olduğu gösterilmiştir (175). MiR-21'in up regülasyonuna ilişkin transkripsiyonla ilişkili olmayan bir mekanizma olarak promotör hiperaktivasyonundan ziyade gen amplifikasyonu önerilmiştir (176). Ancak mevcut verilerin çoğuna göre miR-21 ekspresyonu transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel olaylarla düzenlenmektedir (177, 178).

Çeşitli biyolojik süreçlerde geniş rollere sahip miRNA-21, son zamanlarda özellikle kanser ve diğer hastalıklar için ilgi çekici bir konu oluşturmaktadır. Kromatin İmmünopresipitasyon çalışmalarında, insan myelom hücrelerinde IL-6'ya yanıt olarak STAT3'ün miR-21 upstream bölgesine katıldığı gösterilmiştir. MM hücre hatlarında miRNA-21 transkripsiyonunun IL-6 tarafından kontrol edildiği ve STAT3 aktivasyonu ile yönlendirildiği ve bu sayede malignant hücre sağkalımını desteklediği

düşünülmektedir. IL-6'nın bulunmadığı ve miR-21'in ektopik ekspresyonunun gerçekleştiği durumlarda, apoptotik olmayan hücre düzeylerinde anlamlı bir artış görülmüştür. Bu durum, miR-21'in STAT3'ün anti-apoptotik işlevlerine katkı sağladığını göstermektedir (Şekil 2.8). Bu sonuçlar, miR-21'in STAT3'ün onkojenik aktivitesi üzerinde önemli bir role sahip olduğunu ve myelom oluşumunda etkili olduğunu göstermektedir (179).



Şekil 2.8: miR-21 transkripsiyonu, STAT3 üzerinden IL-6 tarafından kontrol edilmektedir (180).

Yapılan birçok genom çapında miRNA profillemesi çalışması ile, MM'de miR-21'in bir onkomiR olduğu doğrulanmıştır (181-184). Munker ve arkadaşları, (İnsan myelom hücre hatlarında (HMCL) miR-21'in up regülasyonunun, melfalan direnci ile ilişkili olduğunu göstermiştir (185). Wang vd. ise tek başına kültüre edilen HMCL hatlarında miR-21'in ekspresyonunun düşük olduğunu, buna karşılık HMCL kültürleri

ile kemik iliği stroma hücreleri birlikte kültüre edildiğinde miR-21'in yüksek düzeyde eksprese edildiğini bulmuşlardır (186). Bu sonuçlar, myelom hücrelerinde miR-21'in up regülasyonunun kemik iliği mikro çevresindeki etkileşimler aracılığıyla gerçekleştiğini ifade etmektedir (Şekil 2.8). Aynı çalışmada, bortezomibin myelom hücrelerinde miR-21 ekspresyonunu azalttığı kaydedilmiştir. Aynı zamanda bir antagomiR ile miR-21 ekspresyonunun down regülasyonu sonucunda, deksametazon ve doksorubisine hassasiyetin arttığı gösterilmiştir. Araştırmanın sonuçları, miR-21 ekspresyonunun ilaç direnci ile ilişkili olduğunu önermektedir (186). Başka çalışmalarda da miR-21'in down regülasyonunun, in vivo ortamda myelom hücrelerinin apoptozuna neden olduğunun gösterilmesi sonucunda miR-21, tedavi için potansiyel bir hedef olarak görülmeye başlanmıştır (187-189).

Meme kanserinde ise miR-21'in over ekspresyonunun mastektomi insidansı, daha büyük tümör, daha yüksek derecelendirme, daha yüksek evre, ER-negatif, HER2-pozitif meme kanseri alt tipi, Ki-67 ekspresyonu ile ilişkisi olduğu (190) ve invazif ve metastaz potansiyeli olduğu kaydedilmiştir (191, 192). Bu faktörlere ek olarak, miR-21 seviyelerindeki artış ile hastalığın kötü prognozu ilişkili bulunmuştur (190).

2.10.5. MiR-32

Yapılmakta olan araştırmalarda, miRNA'ların insanda kanser biyolojisinde temel görevlere sahip olduğu gösterilmektedir. Bu sayede kanser hastalığının tedavisinde yeni ve umut verici gelişmeler sağlanabilecektir (193-195). Kanserde miRNA ekspresyonunda disregülasyona sıkça rastlanırken aynı zamanda tümör başlangıcı, gelişimi ve progresyonu ile de ilişkilidir. miR-32 insanda birçok malignitenin patogenezinde rol oynamaktadır. miR-32 ekspresyonu, kolorektal kanserde (196), böbrek kanserinde (197), prostat kanserinde (198) ve multipl myelomda (199) up

regülasyon göstermekte olup, bu tümörlerde potansiyel bir onkogen işlevi görmektedir. Bununla birlikte, miR-32 ekspresyonu, mide kanserinde ve osteosarkomda anlamlı derecede düşüş göstermektedir ve bu durumda bir tümör baskılayıcı adaydır (200, 201). Yanaihara ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada, akciğer kanserinde miR mikroarray analizi ile miR-32'nin down regüle olduğu gösterilmiştir (202).

Kanser biyolojisinde, miRNA ekspresyonundaki bozulmalar, tümör oluşumu, progresyonu ve gelişimi ile ilişki göstermektedir (203-206). miR-32, çeşitli kanser tiplerinde farklı şekillerde çalışan bir miRNA'dır. miR-32, mide kanserinde ve osteosarkomda (207, 208) anlamlı derecede düşüş gösterirken; kolorektal kanser, (209) böbrek kanseri (210) ve prostat kanseri (211) gibi diğer birçok kanser türünde up regüle olmaktadır. Özellikle MM hastalığında miR-32, over ekspresyon göstermektedir ve hastalık patogenezi ile ilişkilidir (212). MM hastalarından elde edilen kanser hücrelerinin global miRNA ekspresyon profili analizi sonucunda; miR-21, miR-106b kümesi, miR-181a, miR-181b, miR-32 ve miR-17 kümesinin MM hastalarında upregüle olduğu tespit edilmiştir (212-214).

FBXW7 (F-box and WD repeat protein containing 7); c-Myc, c-Jun, rapamisinin memelideki hedefi ve myeloid hücreli lösemi (MCL) gibi onkoprotein substratlarının stabilitesini düzenleyen önemli bir gen olarak bilinmektedir (215-217). Birçok miRNA, gen dizilerinin bazı bölgelerinde hizalanmalarının eşleşmesi nedeniyle FBXW7 tarafından potansiyel olarak düzenlenebilmektedir. Aynı zamanda, yakın zamanda gerçekleştirilen bazı çalışmalarda FBXW7 genindeki değişikliklerin kanser gelişimine neden olabileceği gösterilmiştir.

Bir çalışmada, FBXW7'nin kolon kanserinde kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (218). Ayrıca bazı çalışmalarda gliomada (219, 220), gastrik kanserde

(221) ve meme kanserinde (222) FBXW7 kaybı ile kötü prognoz arasında korelasyon gözlenmiştir. Bununla birlikte MM’de FBXW7’nin ekspresyon düzeyleri üzerine çok az çalışma gerçekleştirilmiştir. FBXW7’nin kanser gelişimindeki önemi göz önüne alındığında, bu genin MM hastalığındaki rolü ve özellikle de miR-32 ile ilişkisinin araştırılması ilgi çekmektedir.

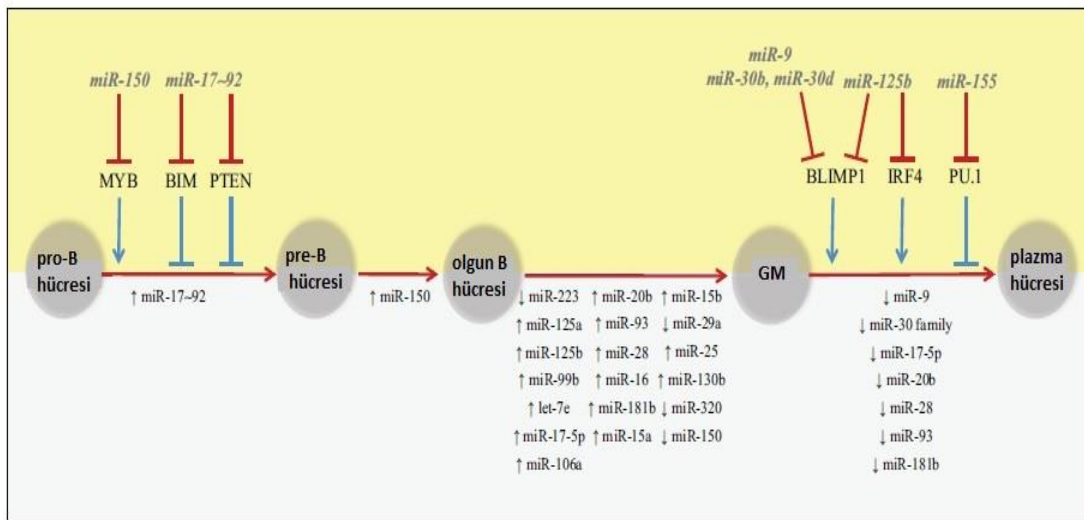
MiR-32 ve miR-17-92 kümesi, sadece MM’de upregüle olup; MGUS’da olmamaktadır. Bu durum, hastalığın MGUS’tan MM’e progresyonunda olası bir etkiye sahip olduklarını düşündürmektedir ve bu olay muhtemelen MM hastalığına özgü genetik değişiklikleri yansıtmaktadır. miR-32, miR-181a, miR-181b, ve miR106b-25 kümelerinin, p53’ün asetilasyonunda yer alan histon asetiltransferaz P300/CBP-ilişkili faktörü (PCAF) hedefleyerek negatif bir biçimde düzenlediği ve MM hastalığında dolaylı olarak p53 aktivitesini kontrol ettiği kaydedilmiştir (223).

2.10.6. MiR-181a

İnsanda miR-181a, 1q31.3’de yer alan miR-181 ailesinin bir üyesidir. Bu aile 4 miRNA’dan oluşmaktadır: miR-181a, miR-181b, miR-181c, ve miR-181d. Bu miRNA’ların tamamı, “seed region sequence” içerisinde yüksek oranda korunmuştur, bu da miR-181 ailesinin gen hedeflemede fazla miktarda kullanıldığı anlamına gelmektedir (224). miR-181a’nın ekspresyonundaki değişiklikler, birçok kanser tipinde gözlemlenmiştir. Çalışmalarda, birçok kanserde anormal düzeyde yüksek miR-181a ekspresyonunun hücre döngüsünü, apoptozu, proliferasyonu ve metastazı düzenliyor olabileceği ifade edilmiştir (225).

MM patogenezinde miRNA’ların rolünü araştırmak üzere Pichiorri ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, sınırlı sayıda sağlıklı kontrolde, MGUS ve MM örneklerinde ve bir dizi insan myelom hücre hattında (HCML) plazma

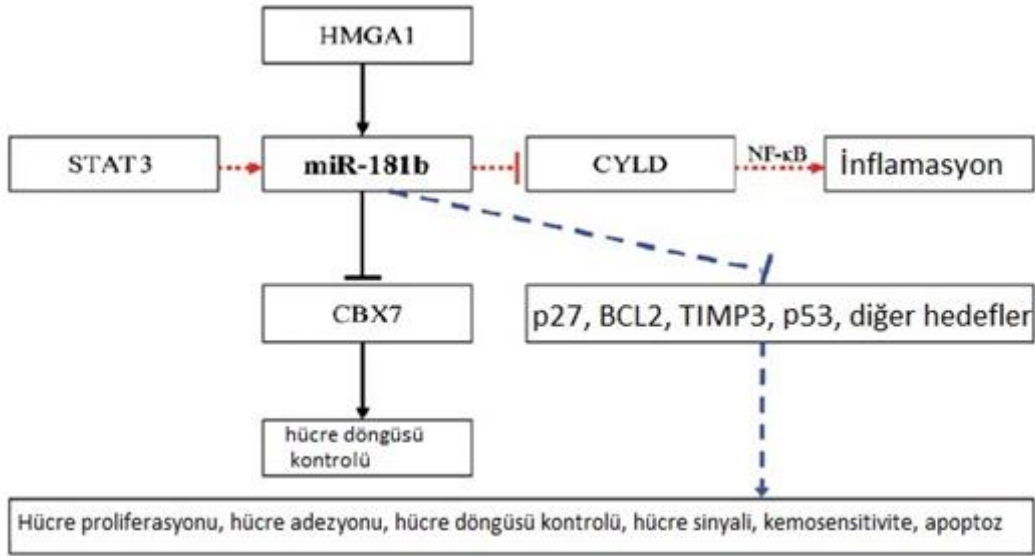
hücrelerinin (PH) miRNA ekspresyon profili oluşturulmuştur (226). Analizler sonucunda, anormal plazma hücrelerinde tümör progresyonuyla ilişkili olan farklı miRNA'ların ekspresyon imzaları belirlenmiştir. Özellikle de; B ve T hücrelerinin farklılaşmasında görev alan miR-181a, onkojenik küme miR-106b25 (özellikle de miR-93, miR-106b ve miR-25), ve miR-21'in ; MGUS ve MM örneklerinde up regüle olduğu belirlenmiştir. Buna karşılık, miR-32 ve miR-17-92 kümesi (özellikle miR-19a and miR-19b) ise sadece MM örneklerinde anlamlı seviyelerde up regülasyon göstermiştir ve bu durum hastalık progresyonu ile ilişkili olabileceklerini önermektedir. HCML'ler ile gerçekleştirilen fonksiyonel değerlendirilmelerde, bu miRNAlardan bazılarının ekspresyonlarının bozulması ile MM patogenezi ile ilişkili biyolojik süreçlerin bağlantılı olduğu görülmüştür: miR-181a ve miR-181b, miR-106b25 kümesi ve miR-32, myelom hücrelerinde TPK3 aktivitesini düzenleyen PCAF geninin 3'UTR ucu ile etkileşime geçmektedir (Şekil 2.9). Diğer yandan, miR-19a ve miR-19b ise IL-6R/STAT3 yolağının negatif bir düzenleyicisi olan SOCS-1'i; hedeflemektedir ve bu yolla IL-6 tarafından başlatılan antiapoptotik sinyal üzerinde rol oynayabilmektedirler.



Şekil 2.9: B hücre gelişiminde mikroRNA'ların rolü (227).

2.10.7. MiR-181b

MiR-181 ailesi, yüksek oranda korunmuş 4 olgun miRNA'dan oluşmaktadır: miR-181a, 181b, 181c and 181d (228). Bu miRNA'lar, üç kromozom üzerinde yer alan altı prekürsörden köken almaktadırlar. miR-181a 1 ve 181b 1, 1.kromozomda, miR-181a 2 ve 181b 2 kromozom 9'da, miR-181c ve 181d kromozom 19'da yer almaktadır. miR-181b 1 ve 181b 2 olgun formlarında aynı diziye sahiplerdir ancak farklı kromozomlar üzerinde yer almaktadırlar (229). miR-181'lerin tümör dokularında anormal bir biçimde eksprese edildiğini gösteren bulgular, bu miRNA'ların tümör gelişimi ve/veya progresyonunda önemli görevlere sahip olabileceğini düşündürmektedir (230, 231). MiR 181b'in pankreas (230, 232), baş ve boyun (233) ve mesane (234) kanserlerinde yüksek oranda eksprese edildiği kaydedilmiştir. Tersine, gastrik (235) ve prostat kanserlerinde (236) ise down regüle edilmektedir. Bu sonuçlar, miR-181b'nin tümör tipi ve hücresel içeriğe göre spesifik etki gösterebildiğini ifade etmektedir (237-239). Daha önce, miR-181b'nin inflamasyon ve malignant dönüşüm arasında kritik bir bağlantı olduğu gösterilmiştir (240). STAT3, IL-6 tarafından aktive edilen bir transkripsiyon faktörüdür (241-243) ve miR-21 ile 181b 1'yi doğrudan aktive etmektedir (244). Bir diğer önemli bulgu da, miR-181b'in kısa süreli ekspresyonunun epigenetik değişimi tetikleyerek, miR-181b'nin hedefi olan cylindromatosis (CYLD) tümör supresörlerini NF-κB aktivitesini negatif olarak düzenleyerek inhibe etmektedir. Sonuç olarak, miR-181b ve CYLD, inflamasyon ve kanser arasındaki epigenetik değişimde yer alan negatif feedback döngüsünün bir parçasıdır (244, 245). Mevcut bilgilere dayanarak tümör oluşumunda miR 181b'in rolü Şekil 2.10'de gösterilmiştir.



Şekil 2.10:miR-181b tarafından etkilenen hedefler ve yolaklar (246).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada 20 kişi sağlıklı kontrol, 38 multipl miyelom hastası iki grup vardır (tedavi öncesi ve tedavi sonrası) 01/2016-09/2017 tarihleri arasında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı'nda muayene amacıyla başvuran bireylerden alınana periferik kan örneklerinden oluşturulmuştur. Kontrol grubu ise herhangi hastalığı olmayan, yaş ve cinsiyet bakımından diğer hasta grubuna uygun olan 20 kişiden alınan kan örneklerinden oluşturulmuştur. Çalışmaya dahil edilen bütün bireylerden bilgilendirilmiş onam formu alınmıştır. Çalışmanın etik açıdan uygunluğu İstanbul Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu 26.06.2015 tarih ve 1309 sayılı etik kurul kararı ile teyit edilmiştir.

3.2. Kimyasal Maddeler ve Diğer Gereçler

PAXgen blood RNA tüp (QIAGEN, kat. No: 762165)

PAXgen blood miRNA kit (QIAGEN, kat. No:763134)

miScript II RT Kit (QIAGEN, kat. No:218161)

miScript SYBR Green PCR Kit (QIAGEN, kat. No:218073)

miScript Primer Assay (QIAGEN, kat. No:218300)

RNaz içermeyen su (QIAGEN, kat. No:129112)

Kloroform (Merck kat. No:102445,2500)

Etanol %99 (Merck kat. No:100983,2500)

İzopropanol %100 (Merck kat. No:100995,2500)

Mikropipet (0-10µl, 20-100µl, 100-1000µl) (AXYGEN)

Filtreli pipet ucu (10 µl, 100 µl, 1000 µl) (AXYGEN)

3.3. Cihazlar

Derin Dondurucu (-80°C) (Esco Lexicon II ULT Freezer)

Derin Dondurucu (-20°C) (Profilo)

Vortex (VWR International)

Soğutmalı Santrifüj (Beckman Coulter Allegra X-30R)

Masaüstü Mini Santrifüj (Beckman Coulter, Inc. Allegra 16)

PZR Cihazı (BioRad T100 Termal Cyclers)

Gerçek Zamanlı PZR Cihazı (BioRad CFX Connect™ Real-Time PCR)

Otoklav (Nuve)

Spektrofotometre (Thermo Scientific NanoDrop 2000)

Saf Su Cihazı (ELGA Millipore)

Hepa Filtreli Laminar Flow Kabin (Thermo Scientific)

3.4. Yöntem

Hasta ve kontrol bireylerden alınan PAXgene RNA tüplerinde alınan 5-10cc kan örnekleri kullanıldı. Gelen kanlar miRNA izolasyon kiti ile miRNA izole edildi ve saklanmak üzere -80°C'de muhafaza edildi. Total RNA miktarı spektrofotometre (ND-1000k; Nano-Drop Teknolojileri) ile ölçüldü.

3.4.1. Kandan mikroRNA İzolasyonu

Kan örneklerinden miRNA izolasyonu için PAXgen Blood miRNA İzolasyon Kiti kullanıldı. İzolasyon işlemi ilk olarak donmuş kan örnekleri çözülürdü.

PAXgene kan RNA tüpleri, soğutmalı santrifüj kullanılarak 3000-5000xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant (üstteki sıvı) atıldı ve 4 ml RNaz içermeyen su, tüpün dibinde kalan pellete (dipte kalan çökelti) eklendi. Oluşan pellet, "RNaz içermeyen su"da çözünene kadar vortekslendi. Bu aşamadan sonra, tüpler tekrardan 3000-5000xg'de 10 dakika santrifüj edilerek oluşan süpernatant atıldı. Tüpün dibinde kalan pellet üzerine Tampon BM1'den 350 µl ilave edildi ve pellet çözülene kadar vortekslendi. Karışım 1,5 ml steril tüpe aktarıldı, daha sonra Tampon BM2'den 300 µl ve 40 µl proteinaz K ilave edildi. 5 saniye boyunca karışım vortekslendi ve 10 dakika çalkalayıcı inkübatörde 55°C'de 400-1400 rpm'de inkübe edildi. Karışım, mor renkli PAXgene spin kolonuna eklendi ve 3 dakika süreyle tam hızda santrifüj edildi. Oluşan süpernatant, steril olan 1,5 ml eppendorf tüpüne aktarıldı ve üzerine %100'lük izopropanolden 700 µl vorteks ile karıştırılarak ilave edildi.

Karışım kırmızı renkli ikinci spin kolona eklendi ve 8.000-20.000xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Spin kolonu, yeni bir 2 ml'lik eppendorf tüpüne yerleştirildi. Spin kolon üzerine 350 µl BM3 tamponu eklendi ve 15 saniye 8.000-20.000 xg'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası spin kolon yeni bir steril tüpe yerleştirildi ve üzerine 80 µl DNaseI eklenerek 15 dakika boyunca, oda sıcaklığında (20-30°C) inkübe edildi.

İnkübasyondan sonra, BM3 tamponundan 350 µl spin kolon üzerine eklendi ve 15 saniye boyunca 8.000-20.000xg'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası spin kolon yeni bir 2 ml'lik eppendorf tüpe yerleştirildi ve üzerine BM4 tamponundan 500 µl eklendi ve tekrardan 15 saniye süreyle 8.000-20.000 xg'de santrifüj edildi. Spin kolonu iki defa 500 µl, BM4 tamponu ile yıkandı ve 8.000-20.000xg'de 2 dakika santrifüj edildi. Spin kolon, yeni bir 2 ml'lik steril tüpe yerleştirildi ve 8.000-20.000xg'de 1 dakika süreyle santrifüj edildi.

Alttaki tüp atılarak, spin kolon yeni bir 1,5 ml'lik tüpe yerleştirilip üzerine 40 µl BR5 tamponundan eklendi ve 1 dakika süre ile 8.000-20.000xg'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstteki spin kolon atılarak, alttaki 1,5 ml'lik tüp 65°C'de 5 dakika boyunca 1 inkübe edildi ve inkübasyon sonrası hemen buz üzerinde kısa bir süre bekletildi. Son olarak örnekler, -70°C derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.4.2. Eşlenik DNA (cDNA) Sentezi

Eşlenik cDNA sentezi için miScript RT II kiti kullanılmıştır. Bu kit içerisindeki iki farklı tampon ile tercihe göre total RNA'nın veya sadece miRNA'ların eşlenik DNA'ya dönüşümü sağlanabilmektedir. Bu çalışmada sadece miRNA analizi gerçekleştirileceği için arka plan sinyallerini mümkün olduğunca azaltmak amacıyla sadece miRNA'lardan cDNA sentezi gerçekleştirildi. Tez çalışmasında cDNA sentezi gerçekleştirilirken son hacim 20 µl olarak ayarlandı ve örnek başına 4 µl Hispec tampon, 2 µl Nucleic Mix, 2 µl Revers Transkriptaz, 10 µl RNaz içermeyen su ve her biri 50 ng RNA içerecek şekilde seyreltilmiş RNA örneklerinden 2 µl kullanıldı. Hazırlanan örnekler 37°C'de 60 dk inkübe edilerek cDNA sentezi gerçekleştirildi. Daha sonra, 95°C'de bekletilerek enzim inaktivasyonu sağlandı ve cDNA örnekleri sonraki aşamaya kadar -20°C'de saklandı.

3.4.3. Nicel Gerçek Zamanlı PZR

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile kantitatif tayin işlemi için, miScript Primer Assay ve miScript SYBR green PCR kit kullanıldı. cDNA sentezinden sonra QIAGEN miScript SYBR® Green PCR kiti ile Real -Time PCR analizi yapıldı. Her bir örnek PCR uygulaması için 20ng/reaksiyon olacak şekilde sulandırılarak sürece uygun hale getirildi.

Öncelikle beş ayrı tüpe sırasıyla RNU6_2(kontrol gen), miR-21, miR-32, miR-181a ve miR-181b primerleri için ayrı ayrı Tablo 3,1'de belirtilen miktarlar temel alınarak karışım hazırlandı ve kalıp RNA'lar eklenmeden her bir primer karışımı 96'lık plakalara her bir kalıp için ikişer ölçüm yapılacak şekilde dağıtıldı.

En son kalıp RNA karışımı plakaya eklendikten sonra Tablo 3.2'deki döngü koşullarıyla real-time PCR analizi yapıldı.

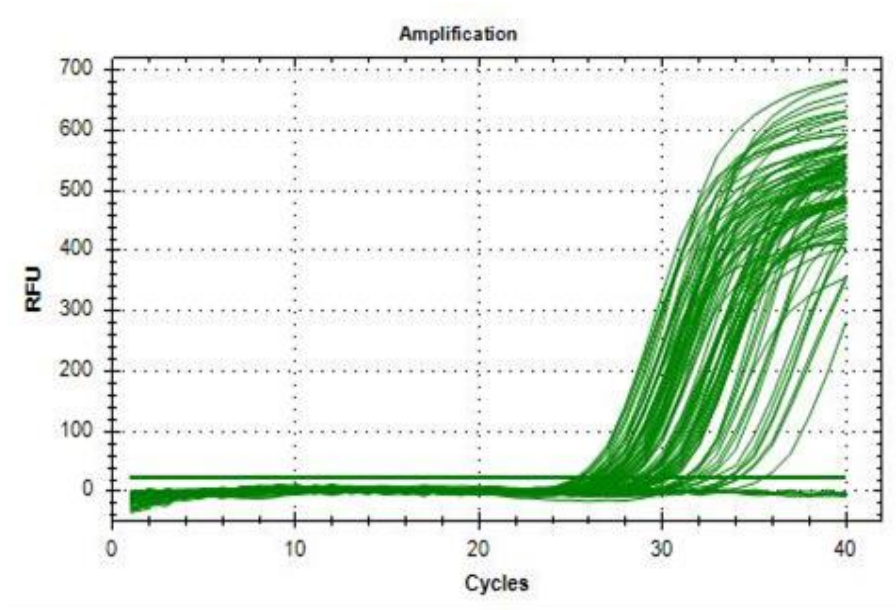
Tablo 3.1:Kantitatif PZR bileşenleri

Reaksiyon Bileşeni	Miktar
2 X SYBR Green Karışımı	10 µl
10 X miScript Universal Primer	2 µl
10 X miScript Primer Assay	2 µl
Kalıp cDNA	2 µl
RNaz içermeyen su	4 µl

Hazırlanan plakalar Bio-Rad CFX Connect Real-Time PCR” cihazına yerleştirilmiş ve reaksiyonlar Tablo 3.2'de belirtilen koşullarda gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1).

Tablo 3.2: Kantitatif PZR koşulları

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95°C	15 dk	1
Denatürasyon	94°C	15 sn	39
Bağlanma	55°C	30 sn	
Uzama	70°C	30 sn	



şekil 3.1: Amplifikasyon Eğrileri

3.4.4. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel verilerin analizi için SPSS 21.0 yazılımından faydalanıldı. miRNA ifade seviye değişimlerinin istatistiksel anlamlılığı her miRNA için replika 2-deltaCT değerlerinin t-testi analizi ile belirlendi. Sürekli değişkenlerin analizinde, ilk olarak

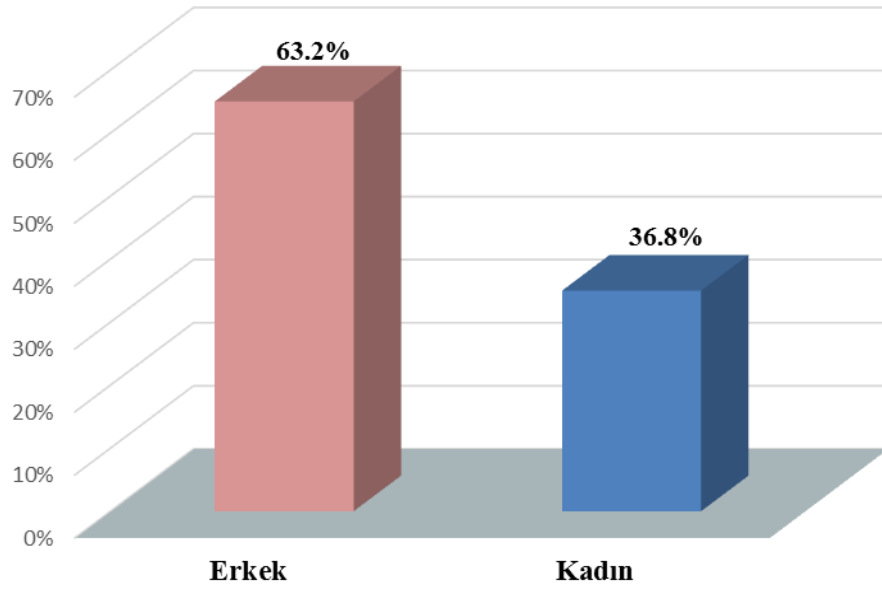
Shapiro-Wilk testi ile normallik ve varyans homojenliği incelendi. Bu analize göre parametrik olan değişkenlerin ikili grup karşılaştırmaları için t-testi, daha çok grubun karşılaştırılması için ANOVA testi kullanıldı. Parametrik olmayan değişkenlerin ikili karşılaştırmaları Mann-Whitney U testi ile, daha çok sayıda grubun karşılaştırılması ise Kruskal-Wallis testi ile gerçekleştirildi. Ikiden fazla grubun karşılaştırıldığı durumlarda anlamlı farklılık görüldüğü takdirde, bu farklılığın yönü ve büyüklüğü Tukey testi kullanılarak belirlendi. Kategorik değişkenlerin analizinde ki-kare testlerinden ve lojistik regresyon analizinden faydalanıldı. Klinik parametreler ile tez çalışmasında elde edilen veriler arasındaki korelasyon, Pearson korelasyon kat sayısının hesaplanması ile belirlendi. İfade seviyelerinin anlamlı farklılık gösterdiği belirlenen miRNA'ların ayırıcı gücü alıcı işletim karakteristiği (receiver operator characteristic) analiziyle tespit edildi. Bütün analizler için alfa yanılma düzeyi 0,05 olarak alındı. Yüksek ifade gösteren miRNA'ların hedef genlerinin ve yolaklarının belirlenmesi için bilinen bütün miRNA ve yolak veri bankalarından faydalanan bir web servisi olan miRSystem kullanıldı.

4. BULGULAR

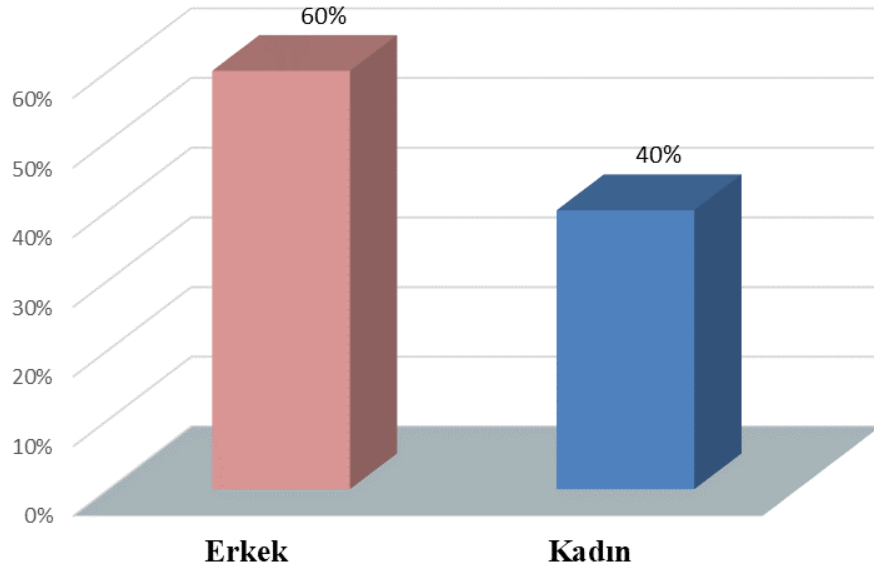
4.1. Çalışmanın Popülasyonu

4.1.1. Cinsiyet Dağılımı

Toplam 58 örnek çalışılarak iki gruba ayrılmıştır: Birinci grup (olgu) yeni tanı almış 38 multipl myelom hastasından (24 olgu erkek %63,2; 14 olgu kadın %36,8) oluşmaktadır (Şekil 4.1). İkinci grup ise (kontrol) normal sağlıklı deneklerden 20 örnek (12 olgu erkek %60; 8 olgu kadın %40) içermektedir (Şekil 4.2). Olgu grubunun yaş ortalaması $60,4 \pm 10,5$ yıl, kontrol grubunun yaş ortalaması $38,4 \pm 4,98$ yıl idi.

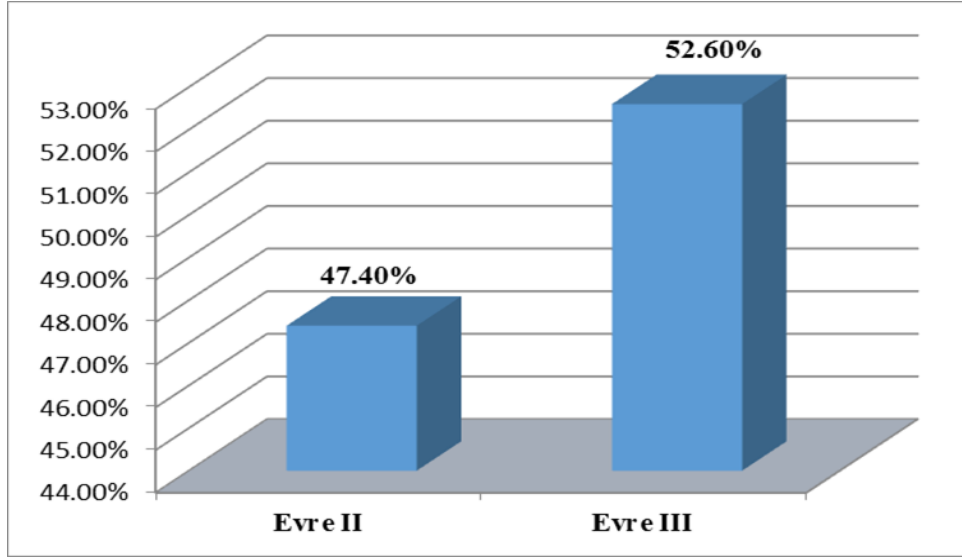


Şekil 4.1: Olgu grubunun cinsiyete göre dağılımı.

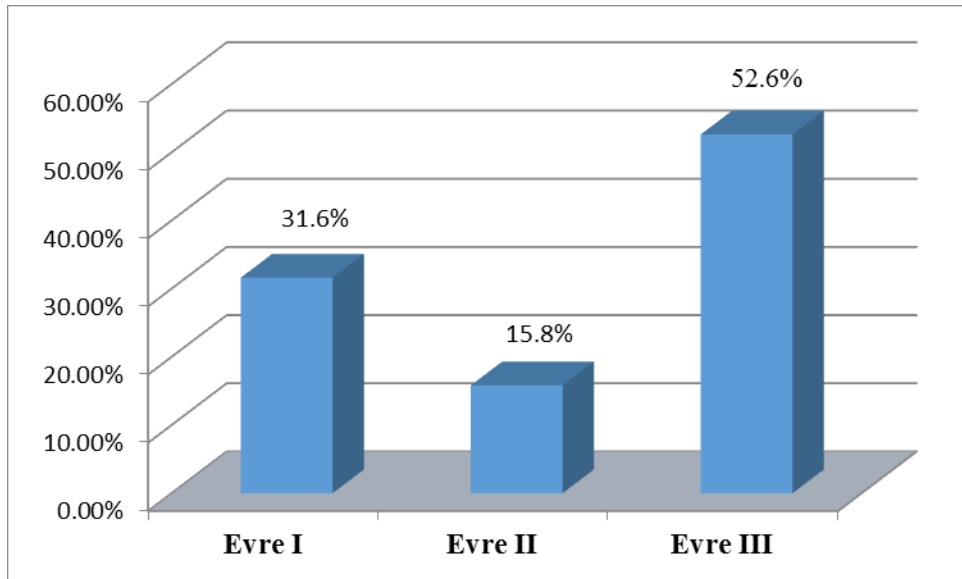


Şekil 4.2: Kontrol grubunun cinsiyete göre dağılımı.

Hasta örnekleri Durie-Salmon (S-D) Sisteminde hemoglobün değeri, kandaki kalsiyum miktarı, osteolitik madde sayısı ve M proteini üretim oranını içeren dört ölçüme göre üç evrede sınıflandırıldı: Evre I/II (18 olgu, % 47,4) ve evre III (20 olgu, % 52,6) (Şekil 4.3). Miyelom (ISS) uluslararası evreleme sisteminde ise iki kan testi, Beta2-Mikroglobulin ve albüminin değerlendirilmesine dayalı olarak hasta örnekleri evre I (12 olgu, % 31,6), evre II (6 olgu,% 15,8) ve evre III (20 olgu,% 52,6) olmak üzere sınıflandırıldı (Şekil 4.4).

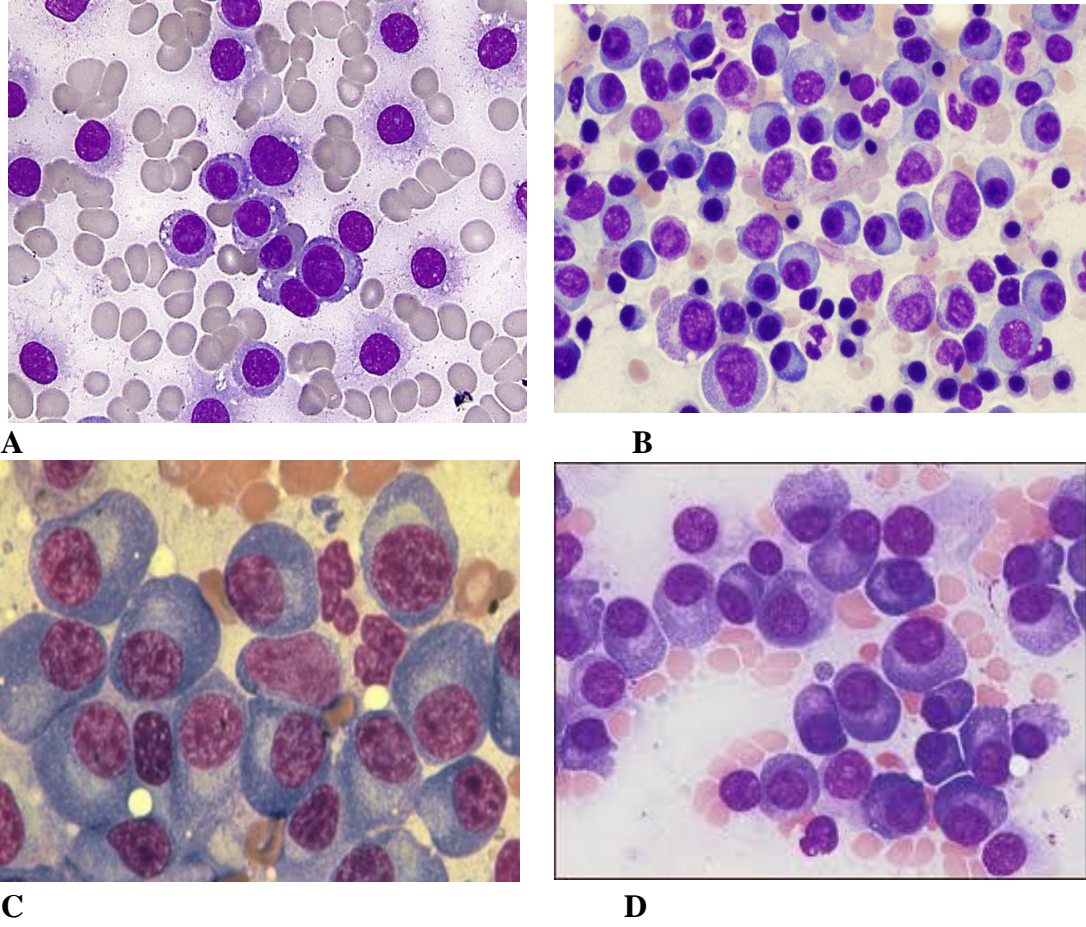


Şekil 4.3: Olguların Durie-Salmon (S-D) Sistemine göre sınıflandırılması.



Şekil 4.4: Olguların Uluslararası Evreleme Sistemine (ISS) göre sınıflandırılması.

Örneklerin, kan yayma preparatı ve kemik iliği aspirasyonu, diğer hematolojik (CBC) ve biyokimyasal incelemelerle değerlendirildi ve elde edilen sonuçlara göre miyelom tiplendirmesi yapıldı (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: (A) (B) Multipl Myelom (MM) olgusunda kan filmi, eksantrik çekirdekli plazma hücreleri, koyu mavi sitoplazma, hof, nükleol. Multipl Myelomda (C) (D) Kemik İliği.

4.1.2. Miyelom Örneklerinin Sitogenetik Sınıflandırması.

Multipl Miyelom (MM) örneklerinin sitogenetik anormalliklerini belirlemek için; 38 vaka mikrofluoresan in situ hibridizasyonu (FISH) kullanılarak 13q delesyonu, (8:14) ile (4:14) translokasyonu ve immüoglobulin ağır zincir geninin (IGH) yeniden düzenlenmesi incelendi ve sitogenetik sınıflandırma yapıldı.

Multipl miyelom 38 olgunun 1'inde 17p13.1 pozitif, ikinci olguda translokasyon (4:14) pozitif bulunurken 36 multipl miyelom hastasında normal FISH (46 XY veya 46 XX) gözlemlendi. 38 MM hastalarının sitogenetik anormalliklerin dağılımı Tablo 4.1'de özetlendi.

Tablo 4.1:MM hastalarının klinik özellikleri ve tedavi rejimleri.

		Multipl	Miyeloma	Kontrol
		Medyan	n^a (%)	n^b (%)
Yaş		60 (41-82)		38 (30-47)
Cinsiyet	Kadın/Erkek		14/24(36,8/63,2)	8/12(40/60)
Ig subtipleri	κ/λ		23/15(60,5/39,5)	
	G/A		25/8(65,8/34,2)	
	Hafif zincir		5(18)	
Evre (Salmon-Durie)	II/III		18/20 (16/84)	
	A/B		31/7 (71/29)	
IPI	I		12 (31,6)	
	II/III		6/20(15,8/52,6)	
ECOG	>1		14 (31,6)	
Hemoglobin	gr/dL	10.5(7,4-17)		
Lökosit	μL	7125 (3680-16800)		
Trombosit	10 ³ /μL	159 (37-680)		
C-reaktive protein	mg/dL	9(2,1-82)		
LDH	IU/L	380(151-2300)		
Karyotip	17p13.1		1	
	t(4:14)		1	
	Normal FISH		36	
B2-mikroglobulin	mg/L	5.7 (1,4-59)		
Albumin	gr/L	3.4 (1,9-4,7)		
Tedavi	VCD, APBSCT, LD		22 (57,9)	
	VCD, LD		16 (32,1)	
OS (2-years, %)		75		
PFS (2-years, %)		66		
Mortalite			10 (26,3)	
Ortalama takip (ay)		19,4 (4,1-34,2)		

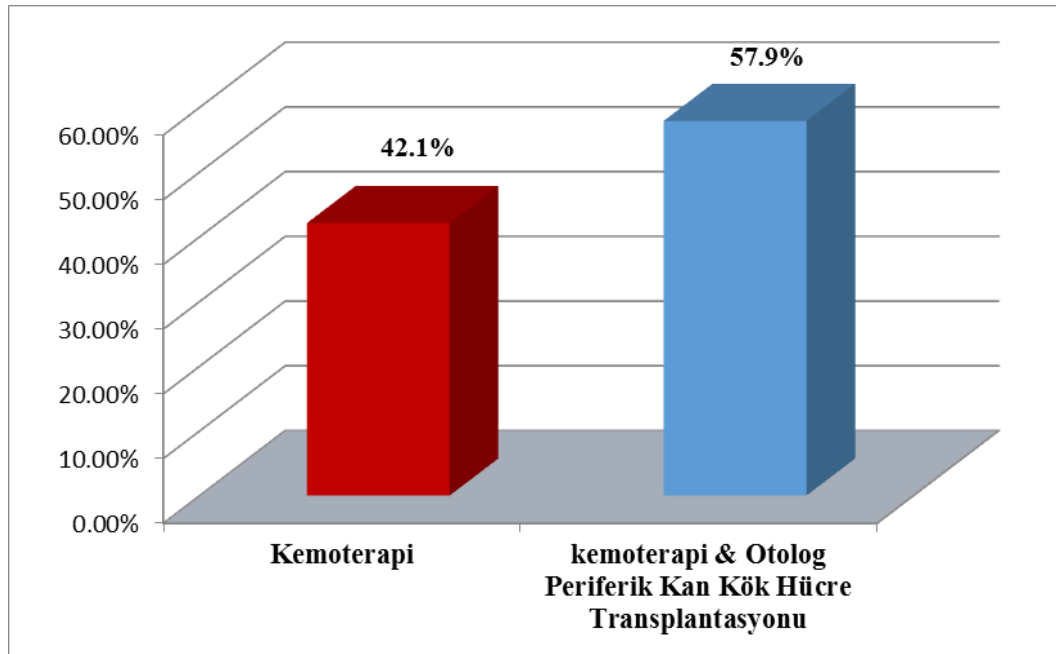
n^a = 38; n^b = 20; bortezomib, siklofosamid, deksametazon ; LD, lenolidomid, deksametazon; APBSCT, otolog periferik kan kök hücre transplantasyonu; ECOG, performans durumu; LDH, laktik dehidrojenaz; IPI, Uluslararası Prognostik İndeks; PFS, ilerlemesiz sağkalım, OS: Genel sağkalım.
* = medyan

4.1.3. MM hastalarının klinik özellikleri ve tedavi rejimleri

MM hastalarının klinik özellikleri Tablo 4.1'de verilmektedir, medyan takip süresi 19,4 ay (dağılım 4,1-34,2), % 26,3 mortalite oranı, PFS ise 66 ay bulundu (Tablo 4.1).Tanı sırasında Salmon-Durie evreleme sistemine göre yirmi hasta evre III (% 52.6) ve evre II olarak 18 (% 47.4) olarak belirlendi. MM'li 38 hastanın 12'si IPI I, 6'sı IPI II

ve 20'si IPI III idi. Ortalama hemoglobin düzeyleri, lökosit sayıları, trombosit sayıları, c-reaktif protein (CRP), laktat dehidrojenaz (LDH), B2-mikroglobulin ve albümin seviyeleri 10,5 g / dl (dağılım 6-14,8 g / dl), 7125 mm³ (dağılım 1290-17,300 mm³), 159×10^3 (aralık 26–700 $\times 10^3$), 9 mg / dl (aralık 3–193 mg / dl), 380 IU / L (126–2540 IU / L aralığında), 5,7 mg / L (1,5-28,7 mg / L aralığında) Sırasıyla 3,4 g / L (1.6-5,2 g / L aralığında) ve MM hastalarının diğer klinik özellikleri Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

İlk sıra tedaviden sonra en az 6 ay takip edilen hastalar yanıt durumu ve genel sağkalım (OS) için analiz edildi. MM hastalarında ilk sıra tedavi olarak, 16(%42,1) hastaya VCD bazlı rejimler (Bortezomib, Siklofosfamid ve Deksametazon), ve / veya (Lenalidomid ve Deksametazon) verildi (EK 1). 22(%59,9) hasta Lenalidomid ile VCD bazlı rejimler aldı ve Otolog Periferik Kan Kök Hücre Transplantasyonu (APSCT) uygulandı,ve bunu yüksek dozda Melfalan aldı (200). mg / m²) (şekil 4.6).

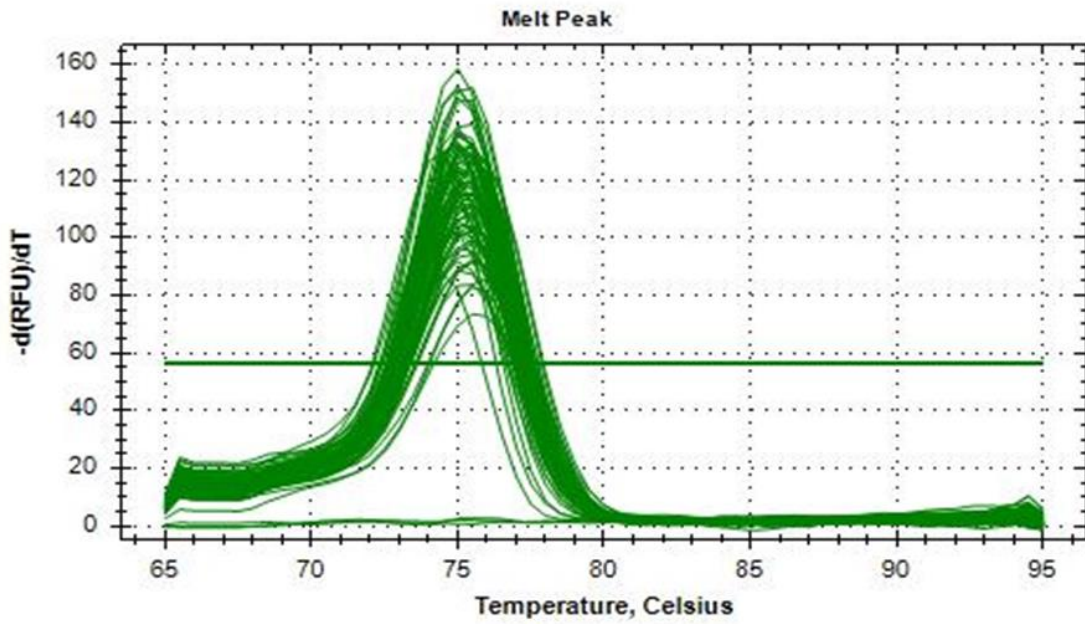


Şekil 4.6: Vakaların tedavi durumu.

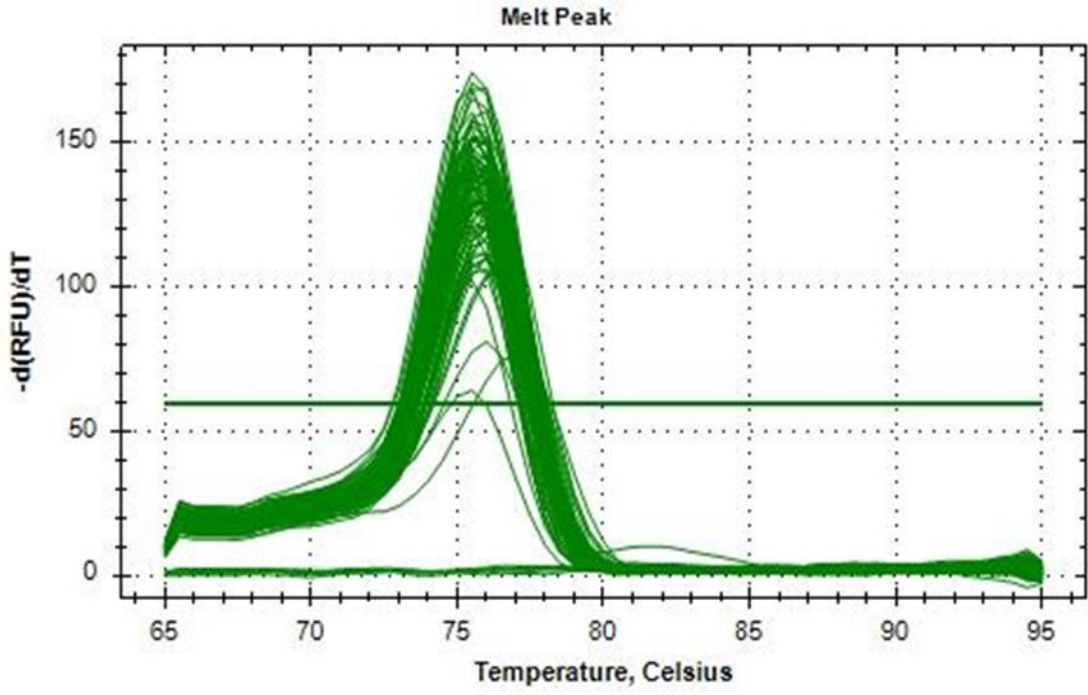
4.2. MikroRNA İfadesinin Nicel Değerlendirmesi

4.2.1. SYBR Green Kantitatif Deneylerin Validasyonu.

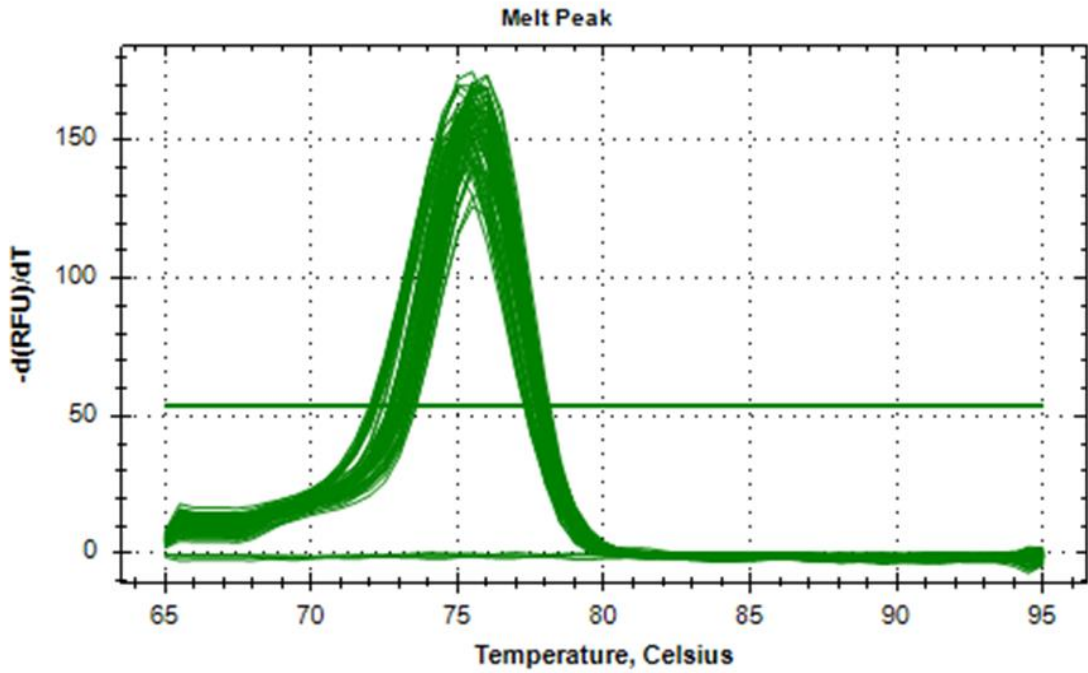
Tüm SYBR green kantitatif deneylerinde olduğu gibi, nicelik değerlerinde bir yanlılığı temsil edebilecek spesifik olmayan amplifikasyonu azaltmak için reaksiyonların sıklığı artırılmalıdır. Bu nedenle, primerler konsantrasyon ve kalıp miktarı optimize edildi ve her bir hedef ürün için erime eğrileri değerlendirildi (Şekil 4.7-4.11). Son reaksiyonlarda belirgin non-spesifik amplifikasyon mevcut değildi. Bununla birlikte, bu yüksek zorunluluk koşulu testin azalmış duyarlılıklarına yol açmıştır.



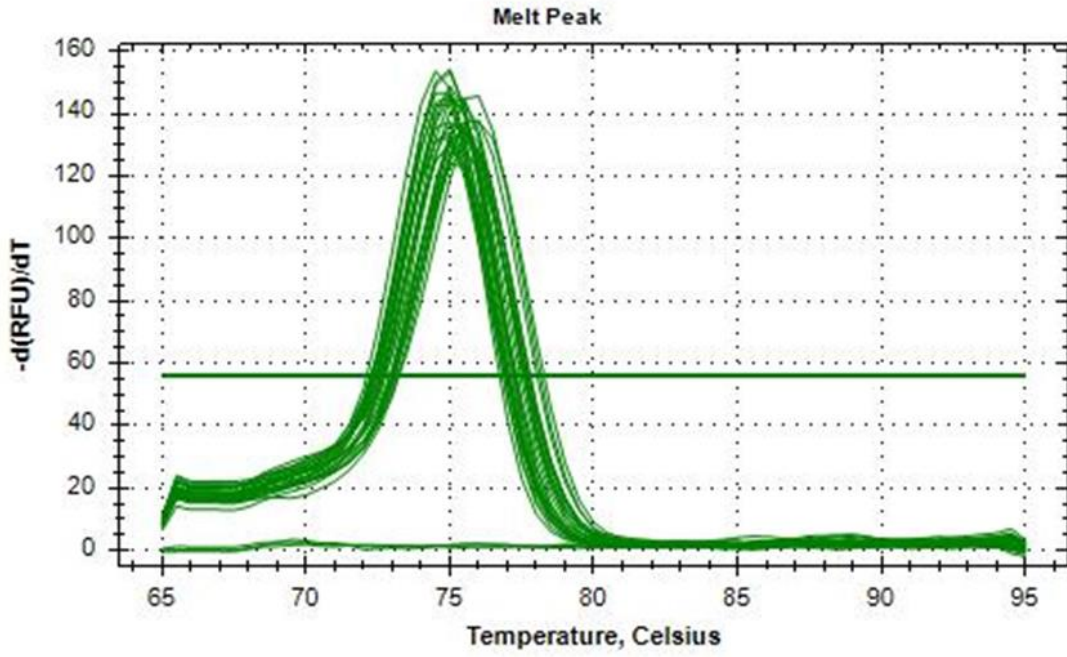
Şekil 4.7: Örneklerin miR-21 geninin ayrışma eğrileri: x eksenini Sıcaklık °C ve y eksenini floresan değerini temsil eder.



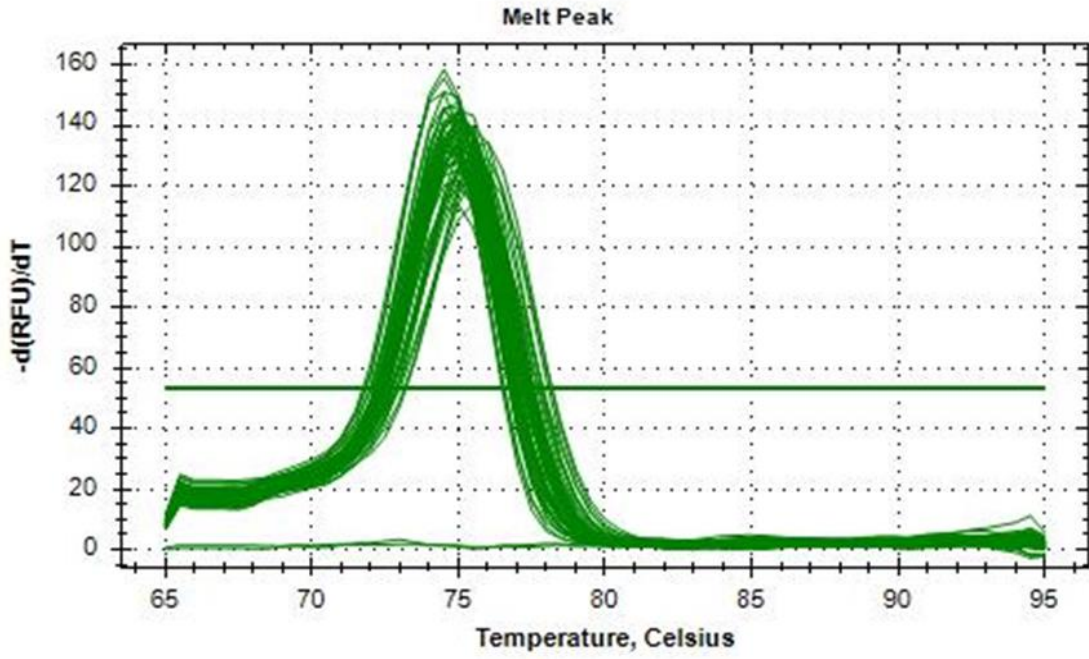
Şekil 4.8: Örneklerin miR-181a geninin ayrışma eğrileri: x eksenini Sıcaklık °C ve y eksenini floresan değerini temsil eder.



Şekil 4.9: Örneklerin miR-181b geninin ayrışma eğrileri: x eksenini Sıcaklık °C ve y eksenini floresan değerini temsil eder.



Şekil 4.10: Örneklerin miR-32 geninin ayrışma eğrileri: x eksenı Sıcaklık °C ve y eksenı floresan değeri temsil eder.



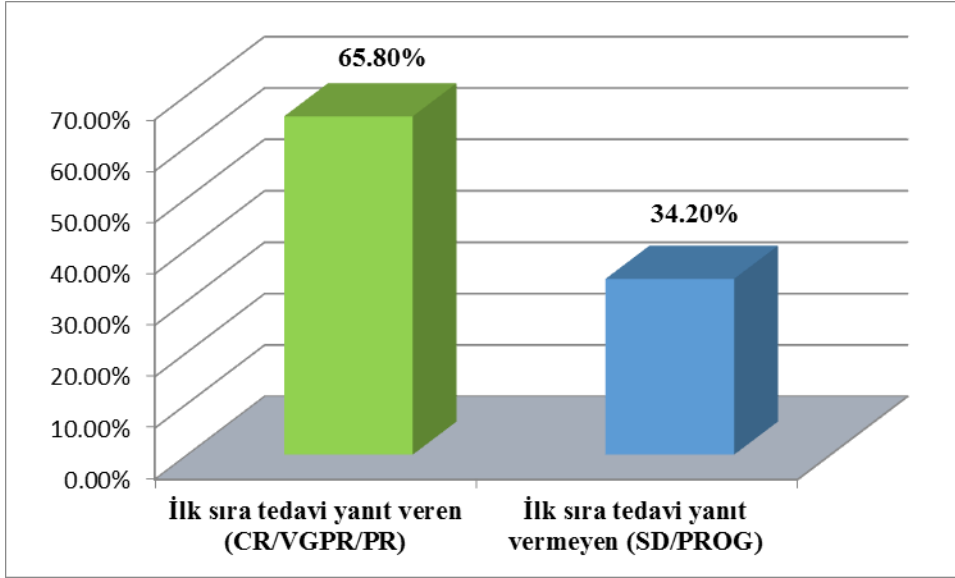
Şekil 4.11: Örneklerin U6 geninin ayrışma eğrileri: x eksenı Sıcaklık °C ve y eksenı floresan değeri temsil eder.

4.3. Tedavi Yanıtı

Uluslararası Miyelom Çalışma Grubu (IMWG) tarafından belirlenen standart cevap kategorileri, zorlu tam yanıtta (sCR) stabil hastalığa (SD), kan ve idrarda paraprotein seviyeleri, kemik iliği trefin biyopsisindeki yüzde plazma hücreleri ve sitoma (lar) yokluğu ile tanımlanmaktadır.

Hassas biyokimyasal teknikler ve klonal serum FLC'sinin yokluğu mevcudiyeti nedeniyle sCR kategorisi saptanabilmektedir. Kategoriler: Zorlu Tam Yanıt (sCR); Tam Yanıt (CR); Çok İyi Kısmi Yanıt (VGPR); Kısmi Yanıt (PR); Minimum Yanıt (MiR); Stabil Hastalık (SD).

Hastalar tam yanıt, kısmi yanıt aldı ve çok iyi kısmi yanıt çalışmaya dahil edildi. 38 MM hastalardan 9'u (%23,7) yanıt veren ve iyi prognozlu tam remisyon gösteren (CR), 9 olgu (%23,7) çok iyi kısmi cevap veren (VGPR). 7 olgu (%18,4) kısmi yanıtı gösterildi (PR). 12 olgu (%31,6) stabil hastalık (SD) ve 1 olgu (%2,6) kötü progresyon gösteren (Prog.) kategorideydi. Yirmi beş(%65,8) hastaya tam yanıt, kısmi cevap verildi ve çalışmaya çok iyi bir kısmi yanıt alındı. Takip sırasında MM'li 13(%34,2) hastada stabil ve kötü prognoz vardı, (Tablo 4.2) ve (Şekil 4.12).



Şekil 4.12: Multipl miyelom vakalarında remisyon dağılımı.

Tablo 4.2: MM'li 38 hastada prognostik faktörlerin tek değişkenli analizi (Logrank testi).

		N	2 –yıl PFS (%)	Log Rank p-değer	2 –yıl OS (%)	Log Rank p-değer
		38	66		75	
Cinsiyet	Kadın / Erkek	14/24	86 / 53	0,177	84 / 45	0,251
Yaş	<65 / ≥65	24/14	62 / 77	0,733	46 / 77	0,695
Evre (Salmon-Durie)	II/III	20/18	78 / 51	0,223	76 / 32	0,323
	A/B	31/7	66 / 71	0,724	57 / 69	0,472
IPI (ISS)	I	12	91		91	
	II	6	100		100	
	III	20	42	0,013	25	0,012
IPI (ISS)	I/II	18	93		93	
	III	20	42	0,006	25	0,007
Ig subtipleri	κ/λ	23/15	76 / 57	0,122	73 / 47	0,126
	G	25	69		54	
	A	8	45		43	
	Hafif zincir	5	80	0,487	80	0,432
ECOG	≤ 1 / >1	24/14	66 / 69	0,712	57 / 69	0,624
Trombosit (x103/L)	<150 / ≥150	6/32	40 / 71	0,542	42 / 74	0,528
LDH (IU/L)	<480 / ≥480	26/12	66 / 73	0,885	52 / 71	0,912
CRP (mg/L)	<5 / ≥ 5	13/25	81 / 60	0,195	68 / 66	0,135
İlk sıra tedavi	VCD, APBSCT, LD	22	80		69	
	VCD ± LD	16	46	0,005	41	0,003
İlk sıra tedaviye yanıt	CR/VGPR/PR	25	100		100	
	SD+PROG	13	0	0,001	0	0,001
miR21*	Azalan	24	78		63	
	Değişmeyen	14	51	0,096	48	0,094
miR181a*	Azalan	30	68		72	
	Değişmeyen	8	63	0,491	51	0,403
miR181b*	Azalan	30	71		68	
	Değişmeyen	8	50	0,365	44	0,531
miR32*	Azalan	23	80		80	
	Değişmeyen	15	37	0,044	22	0,026

* ilk sıra tedavi sonrası, VAD, vinkristin, adriamisin and 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 = 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

Not. Kalın değerler istatistiksel olarak anlamlı değerler göstermektedir.

OS, genel sağkalım; PFS, ilerlemesiz sağkalım; ECOG, performans durumu; LDH, laktik dehidrojenaz; IPI, Uluslararası Prognostik İndeks; ISS, Uluslararası Evreleme Sistemi. * Medyan (ay).

38 hasta 2 yıllık OS ve 2 yıllık EFS için analiz edildi. 2 yıl bu 38 hastada OS 75 ay ve 2 yıllık PFS 66 ay idi. Tek değişkenli analizlerde, daha iyi OS için öngörülen üç

faktör, tanıda IPI III ($p = 0,007$), birinci basamak tedavisi (VCD rejimi ve / veya LD) ($p = 0,003$), ilk sıra tedavi cevabı (SD + PROG) idi.) ($P = 0,001$), miR-32 geninin ekspresyon seviyeleri (ortalama kat değişikliği) ($p = 0,026$).

Daha iyi PFS için öngörülen dört faktör, tanıda IPI III ($p = 0,006$), ilk sıra tedavi (VCD rejimi ve / veya LD) ($p = 0,005$), ilk sıra tedavi cevabı (SD + PROG.) ($P = 0,001$) ve miR-32 geninin ekspresyon seviyeleri (ortalama kat değişikliği) ($p = 0,044$) (Tablo 3).

Tablo 4.3: 38 MM hastasının çok değişkenli analizi (Cox orantısız risk modeli geriye doğru).

	OS			PFS		
	Exp (B) Relative risk	%95 CI	p	Exp (B) Relative risk	%95 CI	P
IPI I/II-III	0,182	0,022- 1,482	0,111	0,125	0,016- 0,998	0,050
İlk sıra tedavi VCD, APBSCT, LD / VCD ±LD	24,604	2,164- 279,678	0,010	10,537	1,802- 61,620	0,009
miR21*	3,072	0,720- 13,108	0,130	1,668	0,441- 6,307	0,451
miR32*	14,553	1,578- 134,212	0,018	8,044	1,433- 45,149	0,018

OS, overall survival; PFS, progression-free survival; IPI, International Prognostic Index; APBSCT, autologous peripheral blood stem cell transplantation.

Üç faktör- tanıda IPI I/II-III, ilk sıra tedavisi (VCD rejimi ve / veya LD) ve miR-32 geninin ekspresyon düzeyleri (ortalama kat değişikliği)- tek değişkenli analizde 2 yıllık PFS'yi anlamlı olarak etkilediği bulundu. Çok değişkenli analiz (Cox orantısız risk modeli geriye doğru) ve tanıdaki IPI I/II-III ($p = 0,050$), ilk sıra tedavisi ($p = 0,009$) ve miR-32 geninin ekspresyon düzeyleri ($p=0,018$) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. İki faktör- ilk sıra tedavisi (VCD rejimi ve / veya LD) ve miR-32 geninin ekspresyon düzeyleri (ortalama kat değişikliği)- tek değişkenli analizde 2 yıllık OS'yi

anlamli olarak etkilediği bulundu. Çok değişkenli analiz (Cox orantısal risk modeli geriye doğru) ve ilk sıra tedavisi ($p = 0,010$) ve miR-32 geninin ekspresyon düzeyleri ($p = 0,018$) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 4.3).

4.4. Multipl Miyelom Hastalarında miR-21, miR-32, miR-181a ve miR-181b Gen Ekspresyon Seviyeleri

Daha önce belirtildiği gibi, tüm gen ekspresyon değerleri, gen RNA'nın kopya sayısı ile bölünen hedef gen RNA kopyalarının sayısı olarak hesaplanan gen RNA'nın normalleştirilmiş kopya sayısı olarak temsil edilir. MiR-21, miR-32, miR-181'a ve miR-181b geninin normaliz edilmiş normal kıvrım değişimi, kontrolle karşılaştırıldığında vakalarda (tedaviden önce) daha yüksekti, ($P = 0,080$), ($P = 0,0001$), ($P = 0,002$) ve ($P = 0,0001$) (Tablo 4.4).

Tablo 4.4: MiRNAlar gen ekspresyonunun ifade düzeylerinin ortalama farkı (Kontrol & Hasta).

		Multipl Miyelom	Kontrol		
GEN	N	ORTALAMA (KAT DEĞİŞİMİ)	ORTALAMA (KAT DEĞİŞİMİ)	KAT DEĐİŐİKLİĐİNDE FARK	SİG. (*P VALUE)
miR-21	38/20	3,15	1,63	1,9	0,080
miR-32	38/20	0,019	0,003	6,3	0,0001
miR-181a	38/20	0,111	0,041	2,7	0,002
miR-181b	38/20	0,675	0,163	4,1	0,0001

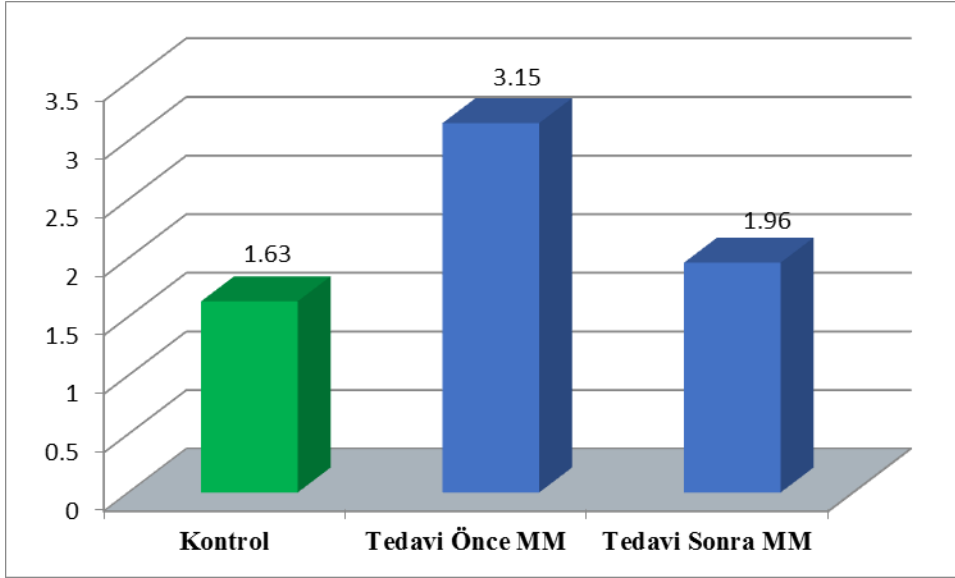
*P-değeri One-Way ANOVA (SPSS) analizi ile hesaplandı.

4.4.1. Multipl Miyelom Hastalarında Tedavi Öncesi ve Sonrası miR-21, miR-32, miR-181a ve miR-181b Gen Ekspresyon Seviyeleri

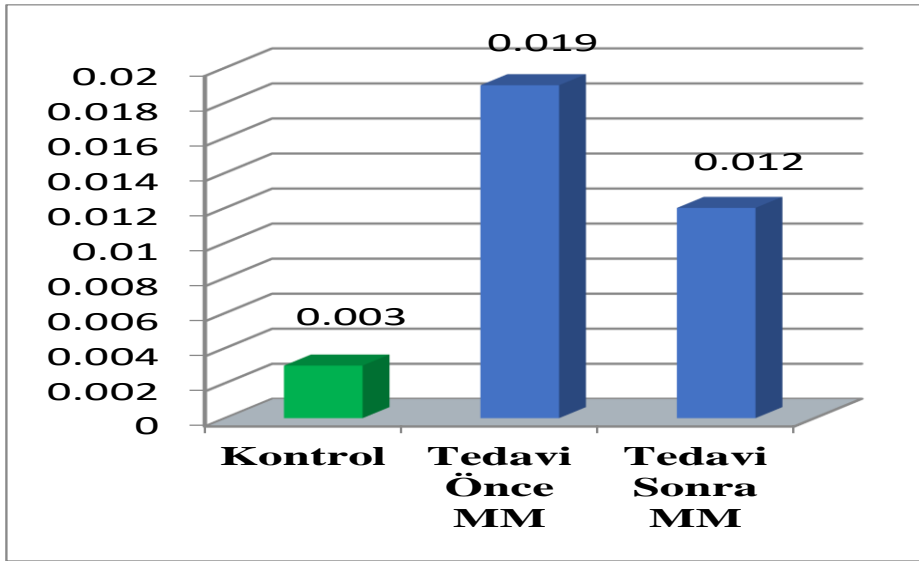
Multipl Miyelom hastalarında miR-21, miR-32, miR-181'a ve miR-181b'nin gen ekspresyon seviyeleri tedaviye başladıktan sonra ve tedavinin tamamlanmasından sonra belirlenmiştir. M.M hastalarında miR-21, miR-32, miR-181'a ve miR-181'b gen katmanı değişimini tedavi öncesi ve sonrası ile karşılaştırarak, Tedaviden sonra kat değişiminin ortalaması tedaviden daha az bulunmuştur ve bu açığa çıkma istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (miR-21: $p = 0,042$, miR-32: $p = 0,001$, miR-181'a: $p = 0,001$). & miR-181'b: $p = 0,044$) (Tablo 4.5) (Şekil 4.13).

Tablo 4.5: miR-21, miR-32, miR-181a ve miR-181'b genlerin ekspresyon seviyeleri arasındaki ilacın Ortalama farkı Tedaviden önce ve sonra.

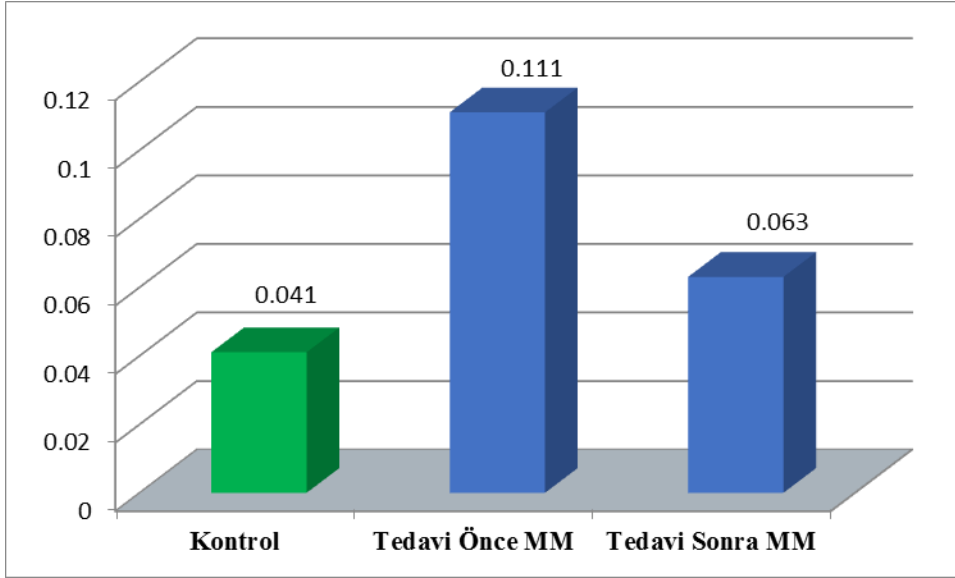
Gen	Tedavi Önce- Ortalama (kat değişimi)	Tedavi Sonra- Ortalama (kat değişimi)	Sig. (*P değeri)
MiR-21	3,15	1,96	0,042
MiR-32	0,019	0,012	0,001
MiR-181a	0,111	0,0631	0,001
MiR-181b	0,675	0,264	0,044



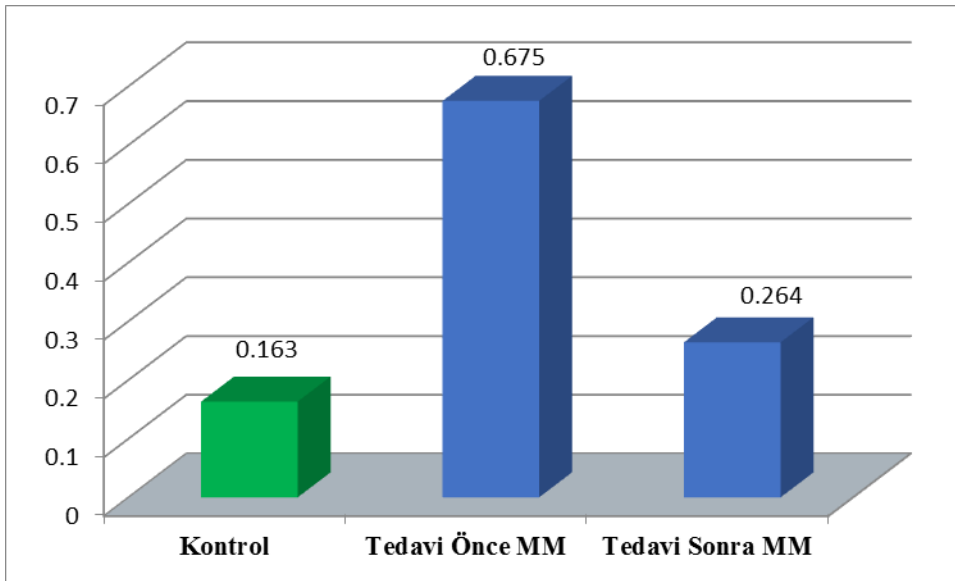
A



B



C



D

Şekil 4.13: Kemoterapiyi takiben, miR-21(A), miR-32(B), miR-181a(C) ve miR-181b(D) ekspresyon düzeyleri, kemoterapi tedavisi öncesi ile kıyaslandığında anlamlı derecede düşüktü.

4.4.2. Remisyon ve Gen İfadesi

Tüm hastalara miyeloma tedavisi için kemoterapi protokolleri uygulandı ve 22 hastaya kemoterapi protokolüne ek olarak Otolog Periferik Kan Kök Hücre Transplantasyonu (APSCT) uygulandı. Yanıt veren ve iyi prognoz gösteren olgu sayısı (remisyon) 22 olgu (%57,9) iken 16 olgu (%42,1) remisyonu olmayan kötü prognoza sahipti.

Remisyon hastalarında ortalama miR-21, miR-32, miR-181'a ve miR-181b göreceli ekspresyon düzeyleri, remisyon olmayan hastalardan daha azdı ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır (miR-21: $p = 0,060$, miR-181'a: $p = 0,628$, miR-181b: $p = 0,225$ ve miR-32: $p = 0,034$) (Tablo 4.6).

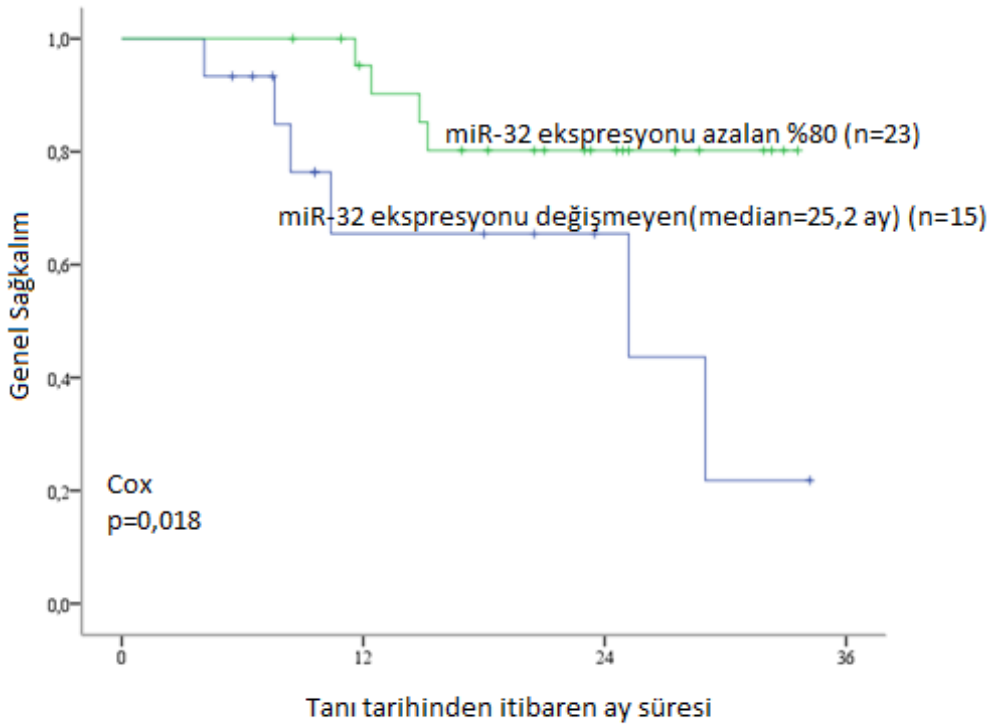
Tablo 4.6: Remisyonda miR-21, miR-32, miR-181a ve miR-181b gen ekspresyonunun ortalama seviyeleri (Azalan veya Değişmeyen).

	Katlama değişimi	MM Hasta	İlk sıra Tedaviye Yanıt	OR Exp(B)	95% CI	p*
		38	Objektif yanıt/yanıtsız			
miR21*	Azalan	24	18/6			
	Değişmeyen	14	7/7	6,091	0,928- 39,995	0,060
miR181a*	Azalan	30	20/10			
	Değişmeyen	8	5/3	1,557	0,260- 9,334	0,628
miR181b*	Azalan	30	22/8			
	Değişmeyen	8	3/5	3,036	0,504- 18,284	0,225
miR32*	Azalan	23	19/4			
	Değişmeyen	15	6 / 9	6,502	1,154- 36,636	0,034

^an= 38 *: OR (% 95 CI) yaş ve cinsiyete göre ayarlanmış ve Fisher'in Exact Testi edildi.

Yanıt veren grup (azalan ifade) ile yanıt vermeyen grup (değişmeyen) arasındaki miR-32 ekspresyon seviyelerini karşılaştırarak anlamlı bir fark bulduk ($p = 0,034$). Diğer miRNA türlerinde bulamadığımız anlamdaki fark, miR-21: $P = 0,060$, miR-181a: $P = 0,628$, miR-181b: $P = 0,225$ dir.

Kemoterapi tedavisinden sonraki süre boyunca genel sağkalımda (OS) yanıt veren grubu ve yanıtız grub arasındaki miR-32 ekspresyon seviyelerini (kat değişikliği) karşılaştırarak yanıt grubunda yer alan hastaların %80'i genel sağkalımı ve yaşam süresi içinde kararlı bir durum olduğunu saptadık. Karşılıklı olarak, yanıtız gruptaki hastalar zamanla %20 genel sağkalım gösterdi (Şekil 4).



Şekil 4.14: miR-32 azalan ve değişmeyen seviyeleri.

5. TARTIŞMA

Multipl Miyelom (MM), immün sistem lenfositlerinden kaynaklanan malign bir tümördür. Yaşlanan popülasyonda, MM insidansı her yıl artarak en yaygın ikinci hematolojik malignite haline gelmiştir (246). Batı ülkelerinde hematolojik malignitelerin yaklaşık % 10'unu ve kanser ölümlerinin % 1'ini oluşturmaktadır (247).

Kemik iliği ve monoklonal immünoglobulin hiperplazisindeki anormal plazma hücreleri şiddetli humoral immün yetersizliğine, kemik hasarına ve yüksek mortaliteye neden olur (247). MM'nin patogenezi halen belirsizdir ve tedavide bireysel farklılığın etkisi büyüktür. Mevcut prognostik göstergeler, hastalığın karmaşıklığını iyi yansıtmamaktadır. Patogenezin ve prognostik faktörlerin derinlemesine araştırılması, bu klinik problemi etkili bir şekilde çözümlenmenin anahtarı olabilir.

İyi bir tümör belirteci non-invaziv olmalı ve kolay tespit edilmelidir. MiR-21, popüler bir miRNA molekülüdür. MiR-21 ekspresyonunun çeşitli malign tümörlerde anormal ekspresyonları gösterilmiştir. PTEN, RECK, diğer tümör baskılayıcı genler ve apoptoz ilişkili moleküller gibi çoklu düzenleyici moleküller hedeflere sahiptir. Dolaşımda miRNA taraması yapılırken, araştırmacılar miR-21'in çeşitli kanser hastalarının periferik kanında tespit etmişlerdir (248).

Lawrie ve ark. dolaşımdaki miRNA'yı hastalık prognozu ile ilişkilendiren çalışmayı yapmışlardır (249). Difüz geniş B hücreli lenfoma hastalarında miR-21, miR-155 ve miR-210 ekspresyonunun kontrol grubundakinden anlamlı derecede yüksek olduğunu bulmuşlardır ve miR-21 seviyeleri hastalığın nüks oranı ve hastaların sağkalım oranı ile ilişkiliydi (250). 102 meme kanseri hastasında dolaşımdaki miR-21'i saptamak için gerçek zamanlı PZR (RealTime PCR) kullanarak; serum miR-21 düzeylerinin meme kanseri metastazı ile yakından ilişkili olduğu bulmuştur (250, 251,

252). Bu çalışmalar, dolaşımdaki miR-21'in tümör progresyonu ile yakından ilişkili olduğunu ve hastalık prognozu hakkında prediktif değer sunabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda miR-21'in yüksek ekspresyon düzeylerinin multipl miyelom hastalığının ortaya çıkmasıyla yakından ilişkili olduğu doğrulanmıştır. Tedavi öncesi miR-21 ekspresyon düzeyinin MM grubunda kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında ortalama kat değişiminin tedavi öncesi MM hastalarında 1,9 kat daha fazla kontrol grubundan olduğu bulunmuştur. Tedavi sonrası miR-21 ekspresyon düzeyinin kontrol grubuna göre kat değişimi 1,2 bulunmuştur. Tedaviden sonra miR-21'in ekspresyon değerinin azalması umut verici bir gelişmedir (Tablo 4.4). Tedavi öncesi ve tedavi sonrası gruplardaki kat değişimleri karşılaştırıldığında ekspresyon düzeylerinin ortalama farkı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P= 0,042$) (Tablo 4.5) .

MM grubunda evre III'te, miR-21, Beta2-mikroglobulin (B2-MG) düzeylerinin ekspresyon düzeyleri, evre I / II'deki değerlerden daha yüksek bulundu. Sonuçlarımız B2-MG'nin MM'nin oluşumu ve gelişimi ile ilişkili olabileceğini ve MM'nin patogenezinde önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. MM grubunda, B2-MG ≥ 3.5 olduğunda veya evre II ve III'te, miR-21 ekspresyonu, B2-MG <3.5 veya evre I'e göre anlamlı derecede daha yüksekti. MiR-21'in ekspresyon seviyesiyle MM hastalığının patogenezi arasında pozitif bir korelasyon bulduk. MM hastalarındaki miR-21 ekspresyon seviyeleri, paraprotein ($\kappa + \lambda$), (IgG + IgA) ve B2-MG ile pozitif korelasyon göstermiştir. Bu, miR-21'in yüksek ifade düzeylerinin MM'nin bir prognostik göstergesi olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, spesifik mekanizmaların daha fazla araştırılması gerekmektedir.

Çalışmamızda, relaps / refrakter grupta dolaşımdaki miR-21 ekspresyonunun yeni tanı grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğunu bulmuştur. Kemoterapi

sonrası miR-21 ekspresyonu önceki çalışmalarla tutarlı olarak daha düşüktü (252, 253) ve bu çalışmalarda MM' patogenezi ile miR-21 ekspresyonu arasındaki ilişkiyi öne sürmüştür.

Etkin tedavi grubunda miR-21 ekspresyonu progresif gruba göre anlamlı olarak daha düşüktü, bu da MM hastalarında yüksek miR-21 ekspresyonunun kemoterapiye yanıt vermeyebileceğini düşündürmektedir. Tam remisyonda (CR) ve çok iyi kısmi remisyonda (VGPR) miR-21 ekspresyon düzeylerini, stabil hastalık (SD) ve kısmi remisyoan (VGPR) göre daha düşük bulduk (Tablo 4.2). Bu sonuçlar ayrıca miR-21'in tümör hücre proliferasyonu, metastaz kapasitesi ve MM'nin prognozu ile yakından ilişkili olduğunu doğrulamıştır. Bu nedenle, zayıf prognozun bir göstergesi olarak kullanılabilir. Antisens oligonükleotid teknolojisi miRNA'nın geliştirilmesi ve uygulanması ile miR-21, potansiyel bir MM teşhis markeri olabilir.

Kromozom 9q31.2 üzerinde bulunan miR-32 MM dâhil bir dizi kanserde düzensiz ifadeleri rapor edilmiştir ve tümör oluşumu, göç ve metastaz gibi kanser süreçlerine doğrudan dahil olmaktadır (255, 256). Çalışmalar, p53 regülasyonunda rol oynayan p300-CBP-ilişkili faktörü (PCAF) hedef alan miR-32'nin MM'de up-regüle olduğunu ve p53 ekspresyonunu azaltarak tümör oluşumunu ve ilerlemesini desteklediğini bulmuştur (255). Gocek'in araştırması, miR-32'nin Bim'i hedeflediğini ve apoptoz inhibisyonuna yol açtığını bulmuştur. Dolayısıyla, miR-32 ekspresyonunu inhibe edebilen ajanlar, terapötik etkinliğini artırarak klinik fayda sağlayabilirler (257). Transkripsiyon faktörü E2F1, p21 ve BTG2'nin miR-32'nin muhtemel hedefleri olduğunu gösteren başka çalışmalar da mevcuttur (256, 258). Dolayısıyla miR-32, çeşitli hedef genleri ayarlayarak hücrelerin farklılaşmasını, proliferasyonunu ve apoptozunu etkileyebilir. MiR-32 ve olası etki mekanizmalarının bu çalışmalarda MM

patogenezinde önemli bir rol oynadığı sonucuna varılmıştır. Ancak miR-32 ekspresyonunun değişimi ve önemi, tedavi sırasında MM hastalarında henüz araştırılmamıştır.

Bu çalışmada, kemoterapiye başlamadan miR-32 ekspresyon düzeylerinin evre III'te, evre I/II'ye göre daha yüksek olduğunu bulduk. Korelasyon analizi yüksek miR-32 ekspresyon düzeylerini β 2-mikroglobulin düzeyi ve kanser evreleriyle ilişkili olduğunu gösterdi. Bu sonuç, miR-32 ifadesinin hücre proliferasyonu, MM'nin göçü ve prognozu ile ilişkili olduğunu doğrulamıştır. MiR-32'nin yüksek ifadesi, kötü bir prognozu temsil etmektedir. Çalışmamız, miR-32 ekspresyonunun, MM bulgularında, diğer bulgularla tutarlı olarak upregüle olduğunu bulmuştur. Kontrol grubundaki sağlıklı kişilerle kemoterapi tedavisi öncesi MM hastalarında miR-32 ekspresyon seviyeleri (kat değişikliği) karşılaştırıldığında ekspresyon seviyelerinin MM hastalarında normal kişilere göre 6,3 kat arttığı bulunmuştur ve sonuçlarımız Zhang et al. çalışmasıyla uyumaktadır (259). Ayrıca relaps/refrakter MM hastalarında miR-32 ekspresyonunun yeni tanı konulan MM hastalarına göre daha yüksek olduğunu bulduk. Bu sonuçlar miR-32'nin MM patogenezinde önemli bir düzenleyici rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Bizim çalışmamızda, miR-32 ekspresyonunun (kat değişim) MM hastalarında kemoterapi (ön tedavi) görmeden önce daha yüksek olduğu bulunmuştur ve sonuçlarımız Pichiorri ve arkadaşlarının (255) çalışmasıyla tutarlıdır. Ayrıca yanıtız grupta (SD/Prog.) MM miR-32 ekspresyonunun, kemoterapiye yanıt veren MM hastalarına göre anlamlı derecede yüksek olduğunu saptadık ($P= 0.034$) (Tablo 4.6, Şekil 4.12). Bu sonuçlar miR-32'nin MM patogenezinde önemli bir düzenleyici rol oynadığını göstermektedir. Ek olarak, miR-32 ekspresyonu tedaviden sonra etkili tedavi

grubunda (CR) belirgin olarak azalmıştır, fakat stabil hastalık (SD) grubunda bu etki görülmemiştir.

Kemoterapi tedavisinden sonraki süre boyunca tam sağ kalımda (OS) yanıt grubu ve yanıtız grup arasındaki miR-32 ekspresyon seviyelerini (kat değışikliği) karşılaştırıldı. Kemoterapiye yanıt veren grupta hastaların % 80'i genel sağ kalım ve stabil yaşam gösterirken, yanıt vermeyen gruptaki hastalar zamanla % 20'lik tam sağ kalım gösterdi (Şekil 4.14).

MiR-181a ve miR-181b'nin MM hücrelerinde miyelom patogeneğinde kritik olan proteinlerin ekspresyonunu modüle eden bir onkomiRNA olarak etki ettiği gösterilmiştir. MiR-181a ve miR-181b (kat değışiminde) her kemoterapi tedavisinde ekspresyon seviyeleri ve kemoterapi tedavisinden sonra azaldığı (260) tarafından desteklenmiştir. MGUS/MM hastalarında genom çapında miRNA ekspresyon profili tarandığında MM ve MGUS'ta normal plazma hücrelere göre deregüle edilen miRNA'lar tanımlanmıştır (261). Yeni tanı konulan 52 MM hastası ve 2 sağlıklı donörden alınan PC'lerde miRNA profillerini incelemiştir. Bu çalışmalarda elde edilen sonuçlarda miR-181a ve miR-181b seviyelerinin hücre proliferasyonu, göçü ve MM prognozu ile ilişkili olduğu doğrulanmıştır. Multipl miyeloma hastalarında son çalışmaları desteklemektedir; MM'nin göçü ve prognozu. MM'nin oluşumu ve ilerlemesi ile ilişkili olan miR-181'in yüksek ekspresyonu kemoterapi sonrasında azalmıştır.

Özet olarak, miR-21, miR-32, miR-181a ve miR-181b hücre farklılaşmasını, proliferasyonu, apoptozu düzenler ve tümör hücrelerinin vasküler invazyonuna ve metastaza katılırlar. miRNA'ların tümör büyümesini düzenlediği moleküler mekanizmalar açıkça anlaşılmamasına karşın bu çalışmada miR-32 ekspresyonunun

sağkalımla ilişkili olması, bir biyobelirteç olarak düşünölebileceğini göstermektedir. Daha geniş hasta grubunda çalışılarak bunun anlallılığının araştırılması hedeflerimizin başında yer alacaktır. Gelecekteki deneylerde miR-21, miR-32, miR-181a ve miR-181b inhibisyonunun antikanser ilaçlarla değerlendirilmesi, bu mikroRNA'ların inhibe olması durumunda ilaç etkinliğinin gelişip gelişmediğinin araştırılması da farmakogenetik açıdan hem hasta yararına hem de literatüre katkı sağlayabileceğine inanmaktayız.

KAYNAKLAR

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11
2. World Health Organization. Global health observatory data repository. 2011. Number of deaths (World) by cause. Available from: <http://apps.who.int/gho/data/node.main.CODWORLD?lang=en>. Last accessed 31 October 2013.
3. Bray F. Transitions in human development and the global cancer burden. In: Wild CP, Stewart B, eds. World cancer report 2014; Lyon: International Agency for Research on Cancer.
4. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International myeloma working group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014; 15: e538–e548.
5. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2014 Update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 2014; 89:998–1009.
6. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA: A Cancer J Clin* 2016; 66:7–30.
7. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Larson DR, Plevak MF, Melton LJ. 3rd. Incidence of multiple myeloma in Olmsted County, Minnesota: Trend over 6 decades. *Cancer* 2004;101: 2667–2674.
8. Landgren O, Weiss BM. Patterns of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma in various ethnic/racial groups: Support for genetic factors in pathogenesis. *Leukemia* 2009; 23:1691–1697.
9. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, et al. Review of 1,027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clinic Proc* 2003; 78:21–33.
10. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: A prospective study. *Blood* 2009; 113: 5412–5417.
11. Weiss BM, Abadie J, Verma P, Howard RS, Kuehl WM. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood* 2009; 113:5418–5422.

12. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. A long-term study of prognosis of monoclonalgammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2002; 346:564–569.
13. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. Prevalence of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med* 2006; 354:1362–1369.
14. Dispenzieri A, Katzmann JA, Kyle RA, et al. Prevalence and risk of progression of light-chain monoclonal gammopathy of undetermined significance: A retrospective population-based cohort study. *Lancet* 2010; 375:1721–1728.
15. Landgren O, Graubard BI, Katzmann JA, et al. Racial disparities in the prevalence of monoclonal gammopathies: A population-based study of 12 482 persons from the national health and nutritional examination survey. *Leukemia* 2014; 28:1537–1542.
16. Therneau TM, Kyle RA, Melton III LJ, et al. Incidence of monoclonal gammopathy of undetermined significance and estimation of duration before first clinical recognition. *Mayo Clin Proc* 2012; 87:1071–1079.
17. Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM, et al. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med* 2007; 356:2582–2590.
18. Suzuki K. Current therapeutic strategy for multiple myeloma. *Jpn J Clin Oncol.* 2013; 43(2):116-124.
19. Roussel M, Facon T, Moreau P, Harousseau JL and Attal M. Firstline treatment and maintenance in newly diagnosed multiple myeloma patients. *Recent Results Cancer Res.* 2011; 183:189-206.
20. Olteanu H., Wang H., Chen W., McKenna RW and Karandikar NJ. Immunophenotypic studies of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *BMC Clinical Pathology* 2008; 8:13.
21. Kyle RA and Rajkumar SV. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma: emphasis on risk factors for progression. *British Journal of Haematology*, 2007; 139, 730–743.
22. Reid G, Kirschner MB, Zandwijk N. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 80. 2011; 193–208.

23. Wang Z., Yao H., Lin S., Zhu X., Shen Z., Lu G., Poon WS, Xie D., Lin MC., Kung H. Transcriptional and epigenetic regulation of human microRNAs. *Cancer Letters* 331. 2013;1–10.
24. Palumbo A, Bringhen S, Ludwig H, Dimopoulos MA, Blade J, Mateos MV, Rosinol L, Boccadoro M, Cavo M, Lokhorst H, Zweegman S, Terpos E, Davies F, Driessen C, Gimsing P, Gramatzki M, et al. Personalized therapy in multiple myeloma according to patient age and vulnerability: a report of the European Myeloma Network (EMN). *Blood*. 2011; 118(17):4519-4529.
25. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005; 120: 15–20.
26. Amiel J, de Pontual L, Henrion-Caude A. miRNA, development and disease. *Adv Genet* 2012; 80: 1–36.
27. Yu Z, Tozeren A, Pestell RG. Function of miRNAs in tumor cell proliferation, Alahari S (ed.), in *MicroRNA in Cancer*, Springer: Dodrecht. ISBN:978-94-007-4654-1. 2013, pp 13–27.
28. Redis RS, Berindan-Neagoe I, Pop VI, Calin GA. Non-coding RNAs as theranostics in human cancers. *J Cell Biochem* 2012; 113: 1451 1459.
29. Jansson MD, Lund AH. MicroRNA and cancer. *Mol Oncol* 2012; 6: 590–610.
30. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 2007; 302: 1–12.
31. He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005; 435: 828–833.
32. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noc Eh, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 2999–3004.
33. Ventura A, Jacks T. MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way. *Cell* 2009; 136: 586–591.
34. Cavo M, Rajkumar SV, Palumbo A, Moreau P, Orłowski R, Bladé J, et al. International Myeloma Working Group consensus approach to the treatment of multiple myeloma patients who are candidates for autologous stem cell transplantation. *Blood* 2011; 117:6063-73.

35. Rajkumar SV, Rosiñol L, Hussein M, Catalano J, Jedrzejczak W, Lucy L, et al. Multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study of thalidomide plus dexamethasone compared with dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2008; 26:2171-7.
36. Rajkumar SV, Jacobus S, Callander NS, Fonseca R, Vesole DH, Williams ME, et al. Lenalidomide plus high-dose dexamethasone versus lenalidomide plus low-dose dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma: an open-label randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2010; 11:29-37.
37. Avendano C., Menendez C. J., (2008): Medicinal chemistry of anticancer drugs. Elsevier's Science & Technology., first Edition, UK, P: 1-2.
38. Nelson M. S., Ferguson R. L., Denny A. W., (2004): DNA and chromosome varied targets for chemotherapy. *Cell & Chromosome*, 2:3.
39. Bissell M. J., Radisky D., (2001): Putting tumors in context. *Nat. Rev. Cancer*, (1): 46-54.
40. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005; 55:74-108.
41. The Netherlands cancer registry; 2017.
42. Avet-Loiseau H, Garand R, Lode L, Harousseau JL, Bataille R. Translocation t(11;14) (q13;q32) is the hallmark of IgM, IgE, and nonsecretory multiple myeloma variants. *Blood*. 2003; 101:1570-1571.
43. MacLennan IC. In which cells does neoplastic transformation occur in myelomatosis? *Curr Top Microbiol Immunol*. 1992; 182:209-214.
44. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014; 64:9-29.
45. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. SEER Cancer Statistics Factsheets: Myeloma. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2014.
46. Greenberg AJ, Rajkumar SV, Vachon CM. Familial monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma: epidemiology, risk factors, and biological characteristics. *Blood*. 2012;119: 5359-5366.
47. Grass S, Preuss KD, Thome S, et al. Paraproteins of familial MGUS/multiple myeloma target family-typical antigens: hyperphosphorylation of autoantigens

- is a consistent finding in familial and sporadic MGUS/MM. *Blood*. 2011; 118:635-637.
48. Anderson KC, Carrasco RD. Pathogenesis of myeloma. *Annu Rev Pathol*. 2011; 6:249-274.
 49. Hauser AE, Muehlinghaus G, Manz RA, et al. Long-lived plasma cells in immunity and inflammation. *Ann N Y Acad Sci*. 2003; 987:266-269.
 50. Sahota SS, Leo R, Hamblin TJ, Stevenson FK. Myeloma VL and VH gene sequences reveal a complementary imprint of antigen selection in tumor cells. *Blood*. 1997;89: 219-226.
 51. Bergsagel PL, Chesi M, Nardini E, Brents LA, Kirby SL, Kuehl WM. Promiscuous translocations into immunoglobulin heavy chain switch regions in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93:13931- 13936.
 52. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood*. 2009; 113:5412-5417.
 53. Weiss BM, Abadie J, Verma P, Howard RS, Kuehl WM. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood*. 2009; 113:5418-5422.
 54. Giada Bianchi, Kenneth C. Anderson, Understanding Biology to Tackle the Disease: Multiple Myeloma from Bench to Bedside, and Back. *CA CANCER J CLIN* 2014; 64:423–444.
 55. Kuehl WM and Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2(3):175-187.
 56. Morgan GJ, Walker BA and Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12(5):335-348.
 57. International_Myeloma_Working_Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol*. 2003; 121:749-757.
 58. Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia*. 2009; 23:3-9.

59. Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer*. 1975; 36:842-854.
60. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2005; 23:3412- 3420.
61. Avet-Loiseau H. Ultra-high-risk myeloma. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2010; 2010:489-493.
62. Bergsagel PL, Mateos MV, Gutierrez NC, Rajkumar SV, San Miguel JF. Improving overall survival and overcoming adverse prognosis in the treatment of cytogenetically high-risk multiple myeloma. *Blood*. 2013; 121:884-892.
63. Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer*. 1975; 36:842 854.
64. Kastritis E, Anagnostopoulos A, Roussou M, et al. Reversibility of renal failure in newly diagnosed multiple myeloma patients treated with high dose dexamethasonecontaining regimens and the impact of novel agents. *Haematologica*. 2007; 92:546- 549.
65. Anderson KC, Alsina M, Bensinger W, et al. Multiple myeloma. *J Natl Compr Canc Netw*. 2011; 9:1146-1183.
66. Dimopoulos MA, Terpos E, Chanan-Khan A, et al. Renal impairment in patients with multiple myeloma: a consensus statement on behalf of the International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol*. 2010;28: 4976-4984.
67. Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, et al. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int*. 2005;67: 2089-2100.
68. Moreau P, Cavo M, Sonneveld P, et al. The combination of international scoring system 3, high lactate dehydrogenase, and t (4;14) and/or del(17p) identifies patients with multiple myeloma (MM) treated with front-line autologous stem cell transplantation at high risk of early MM progression-related death. *J Clin Oncol*. 2014; 32:2173-2180.
69. Hari PN, Zhang MJ, Roy V, et al. Is the International Staging System superior to the Durie-Salmon staging system? A comparison in multiple myeloma patients undergoing autologous transplant. *Leukemia*. 2009; 23:1528-1534.

70. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc.* 2003; 78:21-33.
71. Yeh HS, Berenson JR. Myeloma bone disease and treatment options. *Eur J Cancer.* 2006; 42:1554-1563.
72. Giuliani N, Bataille R, Mancini C, Lazzaretti M, Barille S. Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment. *Blood.* 2001; 98:3527-3533.
73. Giuliani N, Colla S, Sala R, et al. Human myeloma cells stimulate the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) in T lymphocytes: a potential role in multiple myeloma bone disease. *Blood.* 2002; 100:4615-4621.
74. Seidel C, Hjertner O, Abildgaard N, et al. Serum osteoprotegerin levels are reduced in patients with multiple myeloma with lytic bone disease. *Blood.* 2001; 98:2269-2271.
75. Choi SJ, Cruz JC, Craig F, et al. Macrophage inflammatory protein 1-alpha is a potential osteoclast stimulatory factor in multiple myeloma. *Blood.* 2000; 96:671-675.
76. Abe M, Hiura K, Wilde J, et al. Role for macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *Blood.* 2002; 100:2195-2202.
77. Berenson JR, Lichtenstein A, Porter L, et al. Efficacy of pamidronate in reducing skeletal events in patients with advanced multiple myeloma. Myeloma Aredia Study Group. *N Engl J Med.* 1996; 334:488-493.
78. Tian E, Zhan F, Walker R, et al. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2003; 349:2483-2494.
79. Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* 1997; 11:3286-3305.
80. Qiang YW, Chen Y, Stephens O, et al. Myeloma-derived Dickkopf-1 disrupts Wnt-regulated osteoprotegerin and RANKL production by osteoblasts: a potential mechanism underlying osteolytic bone lesions in multiple myeloma. *Blood.* 2008; 112:196-207.
81. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2005; 23:3412-3420.

82. Avet-Loiseau H. Ultra-high-risk myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2010; 2010:489- 493.
83. Palumbo A, Anderson K. Multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2011; 364:1046-1060.
84. Munshi NC, Anderson KC, Bergsagel PL, et al. Consensus recommendations for risk stratification in multiple myeloma: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 2. *Blood*. 2011;117: 4696-4700.
85. Dewald GW, Therneau T, Larson D, et al. Relationship of patient survival and chromosome anomalies detected in metaphase and/or interphase cells at diagnosis of myeloma. *Blood*. 2005; 106:3553-3558.
86. Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome. *Blood*. 2007; 109:3489-3495.
87. Gutierrez NC, Castellanos MV, Martin ML, et al. Prognostic and biological implications of genetic abnormalities in multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: t(4;14) is the most relevant adverse prognostic factor, whereas RB deletion as a unique abnormality is not associated with adverse prognosis. *Leukemia*. 2007; 21:143-150.
88. Fonseca R, Blood E, Rue M, et al. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood*. 2003; 101:4569-4575.
89. Boyd KD, Ross FM, Tapper WJ, et al. The clinical impact and molecular biology of del(17p) in multiple myeloma treated with conventional or thalidomide-based therapy. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011; 50:765-774.
90. Lode L, Eveillard M, Trichet V, et al. Mutations in TP53 are exclusively associated with del(17p) in multiple myeloma. *Haematologica*. 2010; 95:1973-1976.
91. Kumar S, Fonseca R, Ketterling RP, et al. Trisomies in multiple myeloma: impact on survival in patients with high-risk cytogenetics. *Blood*. 2012; 119:2100-2105.
92. Fonseca R, Van Wier SA, Chng WJ, et al. Prognostic value of chromosome 1q21 gain by fluorescent in situ hybridization and increase CKS1B expression in myeloma. *Leukemia*. 2006; 20:2034-2040.

93. Shaughnessy J. Amplification and overexpression of CKS1B at chromosome band 1q21 is associated with reduced levels of p27Kip1 and an aggressive clinical course in multiple myeloma. *Hematology*. 2005;10 Suppl 1:117-126.
94. Zhan F, Colla S, Wu X, et al. CKS1B, overexpressed in aggressive disease, regulates multiple myeloma growth and survival through SKP2- and p27Kip1-dependent and -independent mechanisms. *Blood*. 2007; 109:4995-5001.
95. Shaughnessy JD, Jr., Qu P, Usmani S, et al. Pharmacogenomics of bortezomib test-dosing identifies hyperexpression of proteasome genes, especially PSMD4, as novel high-risk feature in myeloma treated with Total Therapy 3. *Blood*. 2011; 118:3512-3524.
96. Qazilbash MH, Saliba RM, Ahmed B, et al. Deletion of the short arm of chromosome 1 (del 1p) is a strong predictor of poor outcome in myeloma patients undergoing an autotransplant. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007; 13:1066-1072.
97. Walker BA, Leone PE, Chiecchio L, et al. A compendium of myeloma-associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value. *Blood*. 2010;116: e56 65.
98. Avendano C., Menendez C. J., (2008): Medicinal chemistry of anticancer drugs. Elsevier's Science & Technology., first Edition, UK, P: 1-2.
99. Rodgers P. G., Young S. N., (2005): Bethesda handbook of clinical hematology. Lippincott Williams& Wilkins, USA, p: 135-184.
100. Greer P. J., Foerster J., Lukens N. J., Rodgers M. G., Paraskevas F., (2004): Wintrobe's clinical hematology. 11th Edition, USA, Section 2, P: 1946-1954.
101. <http://www.cancer.gov/drugdictionary/?CdrID=38860> accessed in 17.04.2018.
102. Einhorn LH., (1992): Approaches to drug therapy in older cancer patients. *Oncology*, 6(suppl):69-73.
103. Balducci L., Corcoran MB., (2000): Antineoplastic chemotherapy of the older cancer patient. *Hematol Oncol Clin North Am*, 14:193-212.
104. Hickman JA., (1992): Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev*, 11:121-139.
105. Herr I., Debatim KM., (2001): Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood*, 98:2603-2614.
106. Roberts JM., (1999): Evolving ideas about cyclins. *Cell*, 98:129-132.

107. Oates JA., Wilkinson GP., (1998): Principle of drug therapy. In: Fauci J, et al., eds. Harrison's principles of internal medicine. Philadelphia: McGraw- Hill, 411-422.
108. Hande KR., Krozley MG., Greco FA., et al. (1993): Bioavailability of low dose oral etoposide. *J Clin Oncol*, 11:374-377.
109. Zimm S., Collins JM., Riccardi R., et al. (1983): Variable bioavailability of oral mercaptopurine. Is maintenance chemotherapy in acute lymphoblastic leukemia being optimally delivered? *N Engl J Med*, 308:1005-1009.
110. Fraile RJ., Baker LH., and Buroker TR., et al. (1980): Pharmacokinetics of fluorouracil administered orally, by rapid intravenous, and by slow infusion. *Cancer Res*, 40:2223-2228.
111. Hande KR., Messenger M., Wagner J., et al. (1999): Inter- and inpatient variability in etoposide kinetics with oral and intravenous drug administration. *Clin Cancer Res*, 5:2742-2747.
112. Stewart CF., Pieper JA., Arburk SG., and Evans WE., (1989): Altered protein binding of etoposide in patients with cancer. *Clin Pharmacol Ther*, 45:49-55.
113. Chabner BA., Stoller RG., Hande KR., et al. (1978): Methotrexate disposition in humans: case studies in ovarian cancer following high dose infusion. *Drug Metal Rev*, 8:107-117.
114. Gianni L., Kearns CM., Giani A., et al. (1995): Nonlinear pharmacokinetics and metabolism of paclitaxel and its pharmacokinetic pharmacodynamics relationships in humans. *J Clin Oncol*, 13:180-190.
115. http://en.wikipedia.org/wiki/Alkylating_antineoplastic_agent accessed in 17.04.2018.
116. Denny W. A., (2004): Emerging DNA topoisomerase inhibitors as anticancer drugs. *Exp. Opin. Emerg. Drugs*, Vol. 9, No. 1, p.p: 105-133.
117. Van de Velde HJ, Liu X, Chen G, et al. Complete response correlates with long-term survival and progression-free survival in high-dose therapy in multiple myeloma. *Haematologica*. 2007;92(10):1399-406.
118. Lahuerta JJ, Mateos MV, Martinez-Lopez J, et al. Influence of pre- and posttransplantation responses on outcome of patients with multiple myeloma: sequential improvement of response and achievement of complete response are associated with longer survival. *J Clin Oncol*. 2008;26(35):5775-82.

119. 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; 154:32-75.
120. Bird J, Behrens J, Westin J, Turesson I, Drayson M, Beetham R, et al. UK Myeloma Forum (UKMF) and Nordic Myeloma Study Group (NMSG): guidelines for the investigation of newly detected M-proteins and the management of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS). *Br J Haematol*2009; 147:22-42.
121. Cavo M, Rajkumar SV, Palumbo A, Moreau P, Orłowski R, Bladé J, et al. International Myeloma Working Group consensus approach to the treatment of multiple myeloma patients who are candidates for autologous stem cell transplantation. *Blood*2011; 117:6063-73.
122. Rajkumar SV, Rosiñol L, Hussein M, Catalano J, Jedrzejczak W, Lucy L, et al. Multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study of thalidomide plus dexamethasone compared with dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma. *J Clin Oncol*2008; 26:2171-7.
123. Rajkumar SV, Jacobus S, Callander NS, Fonseca R, Vesole DH, Williams ME, et al. Lenalidomide plus high-dose dexamethasone versus lenalidomide plus low-dose dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma: an open-label randomised controlled trial. *Lancet Oncol*2010; 11:29-37.
124. San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK, Dimopoulos MA, Shpilberg O, Kropff M, et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med*2008; 359:906-17.
125. Harousseau JL, Attal M, Avet-Loiseau H, Marit G, Caillot D, Mohty M, et al. Bortezomib plus dexamethasone is superior to vincristine plus doxorubicin plus dexamethasone as induction treatment prior to autologous stem-cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: results of the IFM 2005-01 phase III trial. *J Clin Oncol*2010; 28:4621-9.
126. Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS, Bladé J, Barlogie B, Anderson K, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 2006; 20:1467-73.

127. Benetatos, L.; Vartholomatos, G. Deregulated microRNAs in multiple myeloma. *Cancer* 2012, 118, 878-887.
128. Pichiorri, F.; De Luca, L.; Aqeilan, R. I. MicroRNAs: New players in multiple myeloma. *Front. Genet.* 2011, 2, 1-8.
129. Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004, 116, 281-297.
130. Friedman, R. C.; Farh, K. K.; Burge, C. B.; Bartel, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 2009, 19, 92-105.
131. Croce, C. M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 2009, 10, 704-714.
132. Esquela-Kerscher, A.; Slack, F. J. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2006, 6, 259-269.
133. Ambros, V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004, 431, 350-355.
134. Calin, G. A.; Sevignani, C.; Dumitru, C. D.; Hyslop, T.; Noch, E.; Yendamuri, S.; Shimizu, M.; Rattan, S.; Bullrich, F.; Negrini, M.; Croce, C. M. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, 101, 2999-3004.
135. Garzon, R.; Marcucci, G.; Croce, C. M. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2010, 9, 775-789.
136. Roccaro, A. M.; Sacco, A.; Thompson, B.; Leleu, X.; Azab, A. K.; Azab, F.; Runnels, J.; Jia, X.; Ngo, H. T.; Melhem, M. R.; Lin, C. P.; Ribatti, D.; Rollins, B. J.; Witzig, T. E.; Anderson, K. C.; Ghobrial, I. M. MicroRNAs 15a and 16 regulate tumor proliferation in multiple myeloma. *Blood* 2009, 113, 6669-6680.
137. Pichiorri, F.; Suh, S. S.; Rocci, A.; De Luca, L.; Taccioli, C.; Santhanam, R.; Zhou, W.; Benson, D. M. Jr.; Hofmainster, C.; Alder, H.; Garofalo, M.; Di Leva, G.; Volinia, S.; Lin, H. J.; Perrotti, D.; Kuehl, M.; Aqeilan, R. I.; Palumbo, A.; Croce, C. M. Downregulation of p53-inducible microRNAs 192, 194, and 215 impairs the p53/MDM2 autoregulatory loop in multiple myeloma development. *Cancer Cell* 2010, 18, 367-381.
138. Hammond SM. MicroRNAs as oncogenes. *Curr Opin Genet Dev.* 2006; 16:4-9.

139. Siomi H, Siomi MC. Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Mol Cell*. 2010; 38:323- 332.
140. Niwa R, Slack FJ. The evolution of animal microRNA function. *Curr Opin Genet Dev*. 2007; 17:145-510.
141. P. Tagliaferri, M. Rossi, M.T. Di Martino, N. Amodio, E. Leone, A. Gullà, A. Neri and P. Tassone. Promises and Challenges of MicroRNA-based Treatment of Multiple Myeloma. *Current Cancer Drug Targets*, 2012, 12, 838-846.
142. Di Leva G, Croce CM. Roles of small RNAs in tumor formation. *Trends Mol Med*. 2010; 16:257-267.
143. Chang TC, Yu D, Lee YS, et al. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet*. 2008; 40:43-50.
144. Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005; 435:834-838.
145. Nicoloso MS, Spizzo R, Shimizu M, Rossi S, Calin GA. MicroRNAs—the micro steering wheel of tumour metastases. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9:293-302.
146. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, et al. A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005;353: 1793-1801.
147. Ferracin M, Veronese A, Negrini M. Micromarkers: miRNAs in cancer diagnosis and prognosis. *Expert Rev Mol Diagn*. 2010; 10:297-308.
148. Malecova B, Morris KV. Transcriptional gene silencing through epigenetic changes mediated by non-coding RNAs. *Curr Opin Mol Ther*. 2010; 12:214-222.
149. Garzon R, Marcucci G, Croce CM. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2010; 9:775-789.
150. Nana-Sinkam P, Croce CM. MicroRNAs in diagnosis and prognosis in cancer: what does the future hold? *Pharmacogenomics*. 2010; 11:667-669.
151. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*. 2004; 303:83-86.
152. Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, Richardson PG, Anderson KC. Multiple myeloma. *Lancet*. 2009; 374:324-339.
153. Pichiorri, F.; Suh, S. S.; Ladetto, M.; Kuehl, M.; Palumbo, T.; Drandi, D.; Taccioli, C.; Zanesi, N.; Alder, H.; Hagan, J. P.; Munker, R.; Volinia, S.;

- Boccardo, M.; Garzon, R.; Palumbo, A.; Aqeilan, R. I.; Croce, C. M. MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105, 12885-12890.
- 154.** Zhou, Y.; Chen, L.; Barlogie, B.; Stephens, O.; Wu, X.; Williams, D. R.; Cartron, M. A.; van Rhee, F.; Nair, B.; Waheed, S.; Pineda-Roman, M.; Alsayed, Y.; Anaissie, E.; Shaughnessy, J. D. Jr. Highrisk myeloma is associated with global elevation of miRNAs and overexpression of EIF2C2/AGO2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010, 107, 7904-7909.
- 155.** Subramanian, A.; Tamayo, P.; Mootha, V. K.; Mukherjee, S.; Ebert, B. L.; Gillette, M. A.; Paulovich, A.; Pomeroy, S. L.; Golub, T. R.; Lander, E. S.; Mesirov, J. P. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, 102, 15545- 15550.
- 156.** Shaughnessy, J. D. Jr.; Zhan, F.; Burington, B. E.; Huang, Y.; Colla, S.; Hanamura, I.; Stewart, J. P.; Kordsmeier, B.; Randolph, C.; Williams, D. R.; Xiao, Y.; Xu, H.; Epstein, J.; Anaissie, E.; Krishna, S. G.; Cottler-Fox, M.; Hollmig, K.; Mohiuddin, A.; Pineda-Roman, M.; Tricot, G.; van Rhee, F.; Sawyer, J.; Alsayed, Y.; Walker, R.; Zangari, M.; Crowley, J.; Barlogie, B. A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood* 2007, 109, 2276-2284.
- 157.** Lionetti, M.; Biasiolo, M.; Agnelli, L.; Todoerti, K.; Mosca, L.; Fabris, S.; Sales, G.; Deliliers, G. L.; Biccato, S.; Lombardi, L.; Bortoluzzi, S.; Neri, A. Identification of microRNA expression patterns and definition of a microRNA/mRNA regulatory network in distinct molecular groups of multiple myelomas. *Blood* 2009, 114, e20-e26.
- 158.** Agnelli, L.; Biccato, S.; Mattioli, M.; Fabris, S.; Intini, D.; Verdelli, D.; Baldini, L.; Morabito, F.; Callea, V.; Lombardi, L.; Neri, A. Molecular classification of multiple myeloma: a distinct transcriptional profile characterizes patients expressing CCND1 and negative for 14q32 translocations. *J. Clin. Oncol.* 2005, 23, 7296-7306.
- 159.** Zhang Q, Yan W, Bai Y, et al Synthetic miR-145 mimic inhibits multiple myeloma cell growth in vitro and in vivo. *Oncol Rep.* 2015; 33:448–456.

160. Agnelli L, Tassone P, Neri A. Molecular profiling of multiple myeloma: from gene expression analysis to nextgeneration sequencing. *Expert Opin Biol Ther.* 2013;13 (Suppl 1): S55–S68.
161. Lionetti M, Agnelli L, Lombardi L, et al MicroRNAs in the pathobiology of multiple myeloma. *Curr Cancer Drug Targets.* 2012; 12:823–837.
162. Lionetti M, Musto P, Di Martino MT, et al Biological and clinical relevance of miRNA expression signatures in primary plasma cell leukemia. *Clin Cancer Res.* 2013; 19:3130–3142.
163. Seckinger A, Meissner T, Moreaux J, et al miRNAs in multiple myeloma - a survival relevant complex regulator of gene expression. *Oncotarget.* 2015; 6:39165–39183.
164. Tagliaferri P, Rossi M, Di Martino MT, et al Promises and challenges of microRNA-based treatment of multiple myeloma. *Curr Cancer Drug Targets.* 2012; 12:838–846.
165. Rossi M, Amodio N, Di Martino MT, et al MicroRNA and multiple myeloma: from laboratory findings to translational therapeutic approaches. *Curr Pharm Biotechnol.* 2014; 15:459–467.
166. Di Martino MT, Amodio N, Tassone P, et al. Functional analysis of microRNA in multiple myeloma. *Methods Mol Biol.* 2015: S125–S137. DOI:10.1517/14712598.2013.796356
167. Amodio N, Di Martino MT, Neri A, et al Non-coding RNA: a novel opportunity for the personalized treatment of multiple myeloma. *Expert Opin Biol Ther.* 2013;13(Suppl 1): S125–S137.
168. Gulla A, Di Martino MT, Gallo Cantafio ME, et al. A 13 mer LNA-i-miR-221 inhibitor restores drug-sensitivity in melphalan-refractory multiple myeloma cells. *Clin Cancer Res.* 2013;19(8):2096–2106. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3325
169. Leone E, Morelli E, Di Martino MT, et al Targeting miR-21 inhibits in vitro and in vivo multiple myeloma cell growth. *Clin Cancer Res.* 2013; 19:2096–2106.
170. Leotta M, Biamonte L, Raimondi L, et al A p53-dependent tumor suppressor network is induced by selective miR- 125a-5p inhibition in multiple myeloma cells. *J Cell Physiol.* 2014; 229:2106–2116.

171. Amodio N, Bellizzi D, Leotta M, et al. miR-29b induces SOCS-1 expression by promoter demethylation and negatively regulates migration of multiple myeloma and endothelial cells. *Cell Cycle*. 2013; 12:3650–3662.
172. Löffler D, Brocke-Heidrich K, Pfeifer G, et al. Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. *Blood* 2007; 110:1330–3.
173. Konstantinos Dimopoulos, Peter Gimsing, Kirsten Grønbaek. Aberrant microRNA expression in multiple myeloma. 2013; *European Journal of Haematology* 91 (95–105).
174. Jazbutyte V, Thum T. MicroRNA-21: From cancer to cardiovascular disease. *Curr Drug Targets* 2010; 11:926-35.
175. Haverty PM, Fridlyand J, Li L, Getz G, Beroukhir R, Lohr S, et al. High-resolution genomic and expression analyses of copy number alterations in breast tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2008; 47:530-42.
176. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 2004; 10:1957-66.
177. Davis BN, Hilyard AC, Lagna G, Hata A. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* 2008; 454:56-61.
178. Löffler D, Brocke-Heidrich K, Pfeifer G, et al. Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. *Blood*. 2007; 110:1330-1333.
179. Marta Lionetti, Luca Agnelli, Luigia Lombardi, Pierfrancesco Tassone , Antonino Neri. MicroRNAs in the Pathobiology of Multiple Myeloma. *Current Cancer Drug Targets*, 2012, 12, 823-837.
180. Chi J, Ballabio E, Chen X-H, et al. MicroRNA expression in multiple myeloma is associated with genetic subtype, isotype and survival. *Biol Direct* 2011; 6:23.
181. Corthals SL, Sun SM, Kuiper R, et al. MicroRNA signatures characterize multiple myeloma patients. *Leukemia* 2011; 25:1784–9.
182. Unno K, Zhou Y, Zimmerman T, Plataniias LC, Wickrema A. Identification of a novel microRNA cluster miR-193b-365 in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 2009; 50:1865–71.

183. Zhou Y, Chen L, Barlogie B, et al. High-risk myeloma is associated with global elevation of miRNAs and overexpression of EIF2C2/AGO2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:7904–9.
184. Munker R, Liu C-G, Taccioli C, Alder H, Heerema N. MicroRNA profiles of drug-resistant myeloma cell lines. *Acta Haematol* 2010; 123:201–4.
185. Wang X, Li C, Ju S, Wang Y, Wang H, Zhong R. Myeloma cell adhesion to bone marrow stromal cells confers drug resistance by microRNA-21 up-regulation. *Leuk Lymphoma* 2011; 52:1991–8.
186. Xiong Q, Zhong Q, Zhang J, Yang M, Li C, Zheng P, Bi L-J, Ge F. Identification of novel miR-21 target proteins in multiple myeloma cells by quantitative proteomics. *J Proteome Res* 2012; 11:2078–90.
187. Hu H, Li K, Wang X, Liu Y, Lu Z, Dong R, Guo H, Zhang M-X. Set9, NF- κ B, and microRNA-21 mediate berberine-induced apoptosis of human multiple myeloma cells. *Acta Pharmacol Sin* 2013; 34:157–66.
188. Leone E, Morelli E, Di Martino MT, et al. Targeting miR-21 inhibits in vitro and in vivo multiple myeloma cell growth. *Clin Cancer Res* 2013; 19:2096–106.
189. Lee JA, Lee HY, Lee ES, Kim I, Bae JW. Prognostic implications of microRNA-21 overexpression in invasive ductal carcinomas of the breast. *J. Breast Cancer* 14(4), 269–275 (2011).
190. Yan LX, Huang XF, Shao Q et al. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA* 14(11), 2348–2360 (2008).
191. Zhu S, Wu H, Wu F, Nie D, Sheng S, Mo YY. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res.* 18(3), 350–359 (2008).
192. Heneghan HM, Miller N, Kerin MJ. MiRNAs as biomarkers and therapeutic targets in cancer. *Curr Opin Pharmacol.* 2010;10(5):543–550.
193. Romero-Cordoba SL, Salido-Guadarrama I, Rodriguez-Dorantes M, Hidalgo-Miranda A. miRNA biogenesis: biological impact in the development of cancer. *Cancer Biol Ther.* 2014;15(11):1444–1455.
194. Shin VY, Chu KM. MiRNA as potential biomarkers and therapeutic targets for gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2014;20(30): 10432–10439.

195. Wu W, Yang J, Feng X, et al. MicroRNA-32 (miR-32) regulates phosphatase and tensin homologue (PTEN) expression and promotes growth, migration, and invasion in colorectal carcinoma cells. *Mol Cancer*. 2013; 12:30.
196. Petillo D, Kort EJ, Anema J, Furge KA, Yang XJ, Teh BT. MicroRNA profiling of human kidney cancer subtypes. *Int J Oncol*. 2009;35(1): 109–114.
197. Ambs S, Prueitt RL, Yi M, et al. Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. *Cancer Res*. 2008;68(15):6162–6170.
198. Pichiorri F, Suh SS, Ladetto M, et al. MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(35):12885–12890.
199. Zhang J, Kuai X, Song M, et al. microRNA-32 inhibits the proliferation and invasion of the SGC-7901 gastric cancer cell line in vitro. *Oncol Lett*. 2014;7(1):270–274.
200. Xu JQ, Zhang WB, Wan R, Yang YQ. MicroRNA-32 inhibits osteosarcoma cell proliferation and invasion by targeting Sox9. *Tumour Biol*. 2014; 35(10):9847–9853.
201. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*. 2006;9(3): 189–198.
202. Calin GA, Liu CG, Sevignani C, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(32):11755–11760.
203. Croce CM, Calin GA. miRNAs, cancer, and stem cell division. *Cell*. 2005;122(1):6–7.
204. Shang C, Lu YM, Meng LR. MicroRNA-125b down-regulation mediates endometrial cancer invasion by targeting ERBB2. *Med Sci Monitor*. 2012;18(4):BR149–BR155.
205. Zhang HH, Qi F, Cao YH, Zu XB, Chen MF. Expression and clinical significance of microRNA-21, maspin and vascular endothelial growth factor-C in bladder cancer. *Oncol Lett*. 2015;10(4):2610–2616.

206. Xu JQ, Zhang WB, Wan R, Yang YQ. MicroRNA-32 inhibits osteosarcoma cell proliferation and invasion by targeting Sox9. *Tumor Biol.* 2014;35(10):9847–9853.
207. Ambs S, Prueitt RL, Yi M, et al. Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. *Cancer Res.* 2008;68(15):6162–6170.
208. Wu W, Yang J, Feng X, et al. MicroRNA-32 (miR-32) regulates phosphatase and tensin homologue (PTEN) expression and promotes growth, migration, and invasion in colorectal carcinoma cells. *Mol Cancer.* 2013; 12:30.
209. Petillo D, Kort EJ, Anema J, Furge KA, Yang XJ, Teh BT. MicroRNA profiling of human kidney cancer subtypes. *Int J Oncol.* 2009;35(1): 109–114.
210. Ambs S, Prueitt RL, Yi M, et al. Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. *Cancer Res.* 2008;68(15):6162–6170.
211. Pichiorri F, Suh SS, Ladetto M, et al. MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(35):12885–12890.
212. He L, Thomson JM, Hemann MT, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature.* 2005;435(7043):828–833.
213. Zhou YM, Chen LJ, Barlogie B, et al. High-risk myeloma is associated with global elevation of miRNAs and overexpression of EIF2C2/AGO2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(17):7904–7909.
214. Welcker M, Clurman BE. FBW7 ubiquitin ligase: a tumour suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(2):83–93.
215. Mao JH, Kim IJ, Wu D, et al. FBXW7 targets mTOR for degradation and cooperates with PTEN in tumor suppression. *Science.* 2008; 321(5895):1499–1502.
216. Wertz IE, Kusam S, Lam C, et al. Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7. *Nature.* 2011;471(7336): 110–114.
217. Iwatsuki M, Mimori K, Ishii H, et al. Loss of FBXW7, a cell cycle regulating gene, in colorectal cancer: clinical significance. *Int J Cancer.* 2010;126(8):1828–1837.

218. Bredel M, Bredel C, Juric D, et al. Functional network analysis reveals extended gliomagenesis pathway maps and three novel MYC-interacting genes in human gliomas. *Cancer Res.* 2005;65(19):8679–8689.
219. Hagedorn M, Delugin M, Abraldes I, et al. FBXW7/hCDC4 controls glioma cell proliferation in vitro and is a prognostic marker for survival in glioblastoma patients. *Cell Div.* 2007; 2:9.
220. Yokobori T, Mimori K, Iwatsuki M, et al. p53-Altered FBXW7 expression determines poor prognosis in gastric cancer cases. *Cancer Res.* 2009;69(9):3788–3794.
221. Ibusuki M, Yamamoto Y, Shinriki S, Ando Y, Iwase H. Reduced expression of ubiquitin ligase FBXW7 mRNA is associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Cancer Sci.* 2011;102(2):439–445.
222. Pichiorri F, Suh SS, Ladetto M, et al. MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105:12885-12890.
223. Taylor MA, Sossey-Alaoui K, Thompson CL, Danielpour D and Schiemann WP. TGF- β upregulates miR-181a expression to promote breast cancer metastasis. *J Clin Invest.* 2013; 123: 150–163.
224. Zhang X, Nie Y, Du Y, Cao J, Shen B and Li Y. MicroRNA-181a promotes gastric cancer by negatively regulating tumor suppressor KLF6. *Tumour Biol.* 2012; 33: 1589–1597.
225. Pichiorri, F.; Suh, S. S.; Ladetto, M.; Kuehl, M.; Palumbo, T.; Drandi, D.; Taccioli, C.; Zanesi, N.; Alder, H.; Hagan, J. P.; Munker, R.; Volinia, S.; Boccadoro, M.; Garzon, R.; Palumbo, A.; Aqeilan, R. I.; Croce, C. M. MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008; 105, 12885-12890.
226. Lionetti M1, Agnelli L, Lombardi L, Tassone P, Neri A. MicroRNAs in the pathobiology of multiple myeloma. *Curr Cancer Drug Targets.* 2012; Sep;12(7):823-37.
227. Liu G, Min H, Yue S, et al: Pre- miRNA loop nucleotides control the distinct activities of mir 181a 1 and mir 181c in early T cell development. *PLoS One.* 2008; 3: e3592.

228. Ji J, Yamashita T and Wang XW: Wnt/beta catenin signaling activates microRNA 181 expression in hepatocellular carcinoma. *Cell Biosci.*2011;1: 4.
229. Ren Y, Gao J, Liu JQ, et al: Differential signature of fecal microRNAs in patients with pancreatic cancer. *Mol Med Rep.* 2012; 6: 201 209.
230. Chen L, Yang Q, Kong WQ, et al: MicroRNA 181b targets cAMP responsive element binding protein 1 in gastric adenocarcinomas. *IUBMB Life.* 2012;64: 628 635
231. Panarelli NC, Chen YT, Zhou XK, et al: MicroRNA expression aids the preoperative diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas.* 2012; 41: 685 690.
232. Nurul Syakima AM, Yoke Kqueen C, Sabariah AR, et al: Differential microRNA expression and identification of putative miRNA targets and pathways in head and neck cancers. *Int J Mol Med.* 2011; 28: 327 336.
233. Ratert N, Meyer HA, Jung M, et al: Reference miRNAs for miRNAome analysis of urothelial carcinomas. *PLoS One.*2012; 7: e39309.
234. Li X, Zhang Y, Zhang H, et al: miRNA 223 promotes gastric cancer invasion and metastasis by targeting tumor suppressor EPB41L3. *Mol Cancer Res.* 2011; 9: 824 833.
235. Schaefer A, Jung M, Mollenkopf HJ, et al: Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *Int J Cancer* 126: 1166 1176, 2010.
236. Calin GA and Croce CM: MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6: 857 866.
237. Gregory RI and Shiekhattar R: MicroRNA biogenesis and cancer. *Cancer Res.* 2005;65: 3509 3512.
238. Eis PS, Tam W, Sun L, et al: Accumulation of miR 155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA.* , 2005;102: 3627 3632.
239. Cervigne NK, Reis PP, Machado J, et al: Identification of a microRNA signature associated with progression of leukoplakia to oral carcinoma. *Hum Mol Genet.* , 2009; 18: 4818-4829.
240. Frank DA: STAT3 as a central mediator of neoplastic cellular transformation. *Cancer Lett.* 2007; 251: 199-210.

241. Yu H, Kortylewski M and Pardoll D: Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol.*, 2007; 7: 41-51.
242. Yu H, Pardoll D and Jove R: STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9: 798-809.
243. Iliopoulos D, Jaeger SA, Hirsch HA, et al: STAT3 activation of miR 21 and miR 181b 1 via PTEN and CYLD are part of the epigenetic switch linking inflammation to cancer. *Mol Cell.*, 2010; 39: 493-506.
244. Sun X, Icli B, Wara AK, et al: MicroRNA 181b regulates NF kappaB mediated vascular inflammation. *J Clin Invest.*, 2012; 122: 1973-1990.
245. Juan Liu, Weifeng Shi, Changping Wu, Jingfang Ju, Jingtong Jiang. MiR 181b as a key regulator of the oncogenic process and its clinical implications in cancer (Review). *Biomedical Reports.* 2014; 2: 7-11.
246. Hatzimichael E., Dasoula A., Benetatos L., Syed N., et al. Study of specific genetic and epigenetic variables in multiple myeloma. *Leuk. Lymphoma*, 2010; 51: 2270-2274
247. Wang J.H., Zhou W.W., Liu B.X., Man D.L., Yang Z.D., Liu F.R. and Shang H. Expression and significance of miR-21 in multiple myeloma patients. *Genetics and Molecular Research*, 2015; 15 (1): gmr.15016892
248. Xiong Q., Zhong Q., Zhang J., Yang M, et al. Identification of novel miR-21 target proteins in multiple myeloma cells by quantitative proteomics. *J. Proteome Res.*, 2012; 11: 2078-2090.
249. Lawrie CH., Gal S., Dunlop HM., Pushkaran B., et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br. J. Haematol*, 2008; 141: 672-675.
250. Asaga S., Kuo C., Nguyen T., Terpenning M., et al. Direct serum assay for microRNA-21 concentrations in early and advanced breast cancer. *Clin. Chem*, 2011; 57: 84-91.
251. Pichiorri F., Suh SS., Ladetto M., Kuehl M., et al. MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 12885-12890.

- 252.** Liu C, Yu J, Yu S, Lavker RM, et al. MicroRNA-21 acts as an oncomir through multiple targets in human hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol*, 2010; 53: 98-107.
- 253.** Löffler D, Brocke-Heidrich K, Pfeifer G, Stocsits C, et al. Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. *Blood*, 2007; 110: 1330-1333.
- 254.** Hu HY., Li KP., Wang XJ., Liu Y., et al. (2013). Set9, NF- κ B, and microRNA-21 mediate berberine-induced apoptosis of human multiple myeloma cells. *Acta Pharmacol. Sin*, 2013; 34: 157-166
- 255.** Pichiorri F., De Luca L., Aqeilan RI. MicroRNAs: new players in multiple myeloma. *Front Genet*, 2011; 2: 22.
- 256.** Ambs S., Prueitt RL., Yi M, et al. Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. *Cancer Res*, 2008; 68: 6162–6170.
- 257.** Gocek E., Wang X., Liu X., et al. MicroRNA-32 upregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human myeloid leukemia cells leads to Bim targeting and inhibition of AraC-induced apoptosis. *Cancer Res*, 2011; 71: 6230–6239.
- 258.** Jalava SE., Urbanucci A., Latonen L., et al. Androgen-regulated miR-32 targets BTG2 and is overexpressed in castration-resistant prostate cancer. *Oncogene*, 2012; 31: 4460–4471.
- 259.** Zhang TL., Jia WL., Sun L., et al. Expression and significance of microRNA-32 in multiple myeloma. *Chinese-German J Clin Oncol*, 2014; 13: 472–475.
- 260.** Pichiorri F., Suh SS., Ladetto M., Kuehl M., et al. MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 12885-12890.
- 261.** Chonglei Bi., Wee Joo Chng. MicroRNA: Important Player in the Pathobiology of Multiple Myeloma. *BioMed Research International*, 2014; Volume 2014, Article ID 521586, 12 pages

HAM VERİLER

EK 1: Multipl Miyelomada Majör Tedavi Rejimleri

Tedavi rejimi	Tedavi planı
Deksametazon	Deksametazon (dekort 8 mg amp. veya kordexa 4-8 mg tab.) 40 mg/gün PO veya İV D ₁₋₄ , D ₉₋₁₂ , D ₁₇₋₂₀ veya sadece D ₁₋₄ 4-6 haftada bir
Talidomid/ deksametazon (TD)	Talidomid 200 mg/gün PO Deksametazon (dekort 8 mg amp. veya kordexa 4-8 mg tab.) 40 mg/gün PO veya İV D ₁ , D ₈ , D ₁₅ ve D ₂₂ 4 haftada bir
Lenalidomid/ deksametazon (Rd)	Lenalidomid 25 mg/gün PO D ₁₋₂₁ Deksametazon (dekort 8 mg amp. veya kordexa 4-8 mg tab.) 40 mg/gün PO veya İV D ₁ , D ₈ , D ₁₅ , D ₂₂ 4 haftada bir
Bortezomib + deksametazon (VD)	Bortezomib 1,3 mg/m ² /gün İV veya SC bolus-D ₁ , D ₄ , D ₈ ve D ₁₁ 21 günde bir veya D ₁ , D ₈ , D ₁₅ , D ₂₂ 4 haftada bir deksametazon (dekort 8 mg amp. veya kordexa 4-8 mg tab.) 40 mg/gün PO veya İV-D ₁₋₄ , D ₉₋₁₂ 21 günde bir veya D ₁ , D ₈ , D ₁₅ , D ₂₂ 4 haftada bir (4 haftalık rejimde alternatif olarak deksametazon bortezomib uygulanan günde ve bir sonraki günde 20 mg olarak da uygulanabilir)
Melfalan + prednizon (MP)	Melfalan 8-10 mg/gün PO D ₁₋₇ Prednizon 60 mg/gün PO D ₁₋₇ 6 haftada bir
Melfalan + prednizon + talidomid (MPT)	Melfalan 0s25 mg/kg/gün PO D ₁₋₄ (75 yaşın üstündeki hastalarda 0,20 mg/kg/gün dozuna düşülebilir) Prednizon 2 mg/kg/gün PO D ₁₋₄ Talidomid 100-200 mg/gün PO 6 haftada bir
Melfalan + prednizolon + bortezomib (MPV- VMP)	Melfalan 9 mg/m ² /gün PO D ₁₋₄ Prednizon 60 mg/m ² /gün PO D ₁₋₄ Bortezomib 1,3 mg/m ² /gün İV veya SC bolus D ₁ , D ₈ , D ₁₅ , D ₂₂ 35 günde bir

Tedavi rejimi	Tedavi planı
Bortezomib + deksametazon + siklofosfamid (VCD)	Siklofosfamid 300 mg/m ² PO veya İV D ₁ , D ₈ , D ₁₅ , D ₂₂ veya 50 mg/gün PO D ₁₋₂₈ Bortezomib 1,3 mg/m ² /gün İV veya SC bolus D ₁ , D ₈ , D ₁₅ , D ₂₂ Deksametazon (dekort 8 mg amp. veya Kordexa 4-8 mg tab.) 40 mg/gün PO veya İV D ₁ , D ₈ , D ₁₅ ve D ₂₂ 4 haftada bir
Bortezomib + talidomid + deksametazon (VTD)	Bortezomib 1,3 mg/m ² /gün İV veya SC bolus D ₁ , D ₈ , D ₁₅ , D ₂₂ Talidomid 100-200 mg PO D ₁₋₂₁ Deksametazon (dekort 8 mg amp. veya kordexa 4-8 mg tab.) 40 mg/gün PO veya İV D ₁ , D ₈ , D ₁₅ , D ₂₂ (alternatif olarak deksametazon bortezomib uygulanan günde ve bir sonraki günde 20 mg olarak da uygulanabilir) 4 haftada bir
Bortezomib + lenalidomid + deksametazon (VRD)	Bortezomib 1,3 mg/m ² /gün İV veya SC bolus D ₁ , D ₈ , D ₁₅ Lenalidomid 25 mg PO D ₁₋₁₄ Deksametazon (dekort 8 mg amp. veya kordexa 4-8 mg tab.) 40 mg/gün PO veya İV D ₁ , D ₈ , D ₁₅ (alternatif olarak deksametazon bortezomib uygulanan günde ve bir sonraki günde 20 mg olarak da uygulanabilir) 3 haftada bir
Vinkristin + adriamisin + deksametazon (VAD)	Vinkristin 0,4 mg/gün İV >30 dak. perfüzyon D ₁₋₄ Doksorubisin (adriamisin) 9 mg/m ² /gün İV >30 dak. perfüzyon D ₁₋₄ Deksametazon (dekort 8 mg amp. veya kordexa 4-8 mg tab.) 40 mg/gün PO veya İV - D ₁₋₄ , D ₉₋₁₂ , D ₁₇₋₂₀ 4 haftada bir
Lipozomal doksorubisin + vinkristin + deksametazon (DVD)	Pegile lipozomal doksorubisin 40 mg/m ² İV D ₁ Vinkristin 2 mg İV D ₁ Deksametazon (dekort 8 mg amp. veya kordexa 4-8 mg tab.) 40 mg/gün PO veya İV D ₁₋₄ 4 haftada bir
Bortezomib + adriamisin + deksametazon (PAD)	Bortezomib (velcade) 1,3 mg/m ² /gün İV bolus D ₁ , D ₄ , D ₈ , D ₁₁ Deksametazon (dekort 8 mg amp. veya kordexa 4-8 mg tab.) 40 mg/gün PO veya İV D ₁₋₄ , D ₈₋₁₁ , D ₁₅₋₁₈ -1. kür, 2-4. kürler D ₁₋₄ Doksorubisin (adriamisin) 4,5-9 mg/m ² /gün İV D ₁₋₄ 3 haftada bir x 4 kür
Bendamustin	Bendamustin 80-150 mg/m ² /gün İV D ₁₋₂ 4 haftada bir

Tedavi rejimi	Tedavi planı
Karfilzomib	Karfilzomib 1. kürde İV D ₁ , D ₂ , D ₈ , D ₉ , D ₁₅ , D ₁₆ 20 mg/m ² , sonraki kürlerde 27 mg/m ² /gün 4 haftada bir
Karfilzomib + deksametazon (KD)	Karfilzomib 1. kürde İV D ₁ , D ₂ , D ₈ , D ₉ , D ₁₅ , D ₁₆ 20 mg/m ² , sonraki kürlerde 27 mg/m ² /gün Deksametazon 20 mg/gün haftada 2 gün 3 hafta boyunca 4 haftada bir
Karfilzomib + lenalidomid + deksametazon (KRd)	Karfilzomib 1. kürde İV 20 mg/m ² D ₁ , D ₂ , takiben 27 mg/m ² /gün D ₈ , D ₉ , D ₁₅ , D ₁₆ , sonraki 2-9. kürlerde 27 mg/m ² /gün D ₁ , D ₂ , D ₈ , D ₉ , D ₁₅ Lenalidomid 25 mg/gün PO D ₁₋₂₁ Deksametazon (dekort 8 mg amp. veya kordexa 4-8 mg tab.) 40 mg/gün PO veya İV D ₁ , D ₈ , D ₁₅ , D ₂₂ (alternatif olarak deksametazon bortezomib uygulanan günde ve bir sonraki günde 20 mg olarak da uygulanabilir) 4 haftada bir
Karfilzomib + siklofosamid + deksametazon	Karfilzomib 1. kürde İV 20 mg/m ² D ₁ , D ₂ , takiben 36 mg/m ² /gün D ₈ , D ₉ , D ₁₅ , D ₁₆ , sonraki 2-9. kürlerde 36 mg/m ² /gün D ₁ , D ₂ , D ₈ , D ₉ , D ₁₅ , D ₁₆ Siklofosamid PO 300 mg/m ² D ₁ , D ₈ , D ₁₅ Deksametazon (dekort 8 mg amp. veya kordexa 4-8 mg tab.) 40 mg/gün PO veya İV D ₁ , D ₈ , D ₁₅ 4 haftada bir
Pomalidomid + deksametazon	Pomalidomid 4 mg/gün D ₁₋₂₁ PO, deksametazon (dekort 8 mg amp. veya kordexa 4-8 mg tab.) 40 mg/hafta 4 haftada bir
Daratumumab	Daratumumab 16 mg/kg/gün İV infüzyon 1-8. hafta boyunca haftada bir, 9-24. haftalar boyunca 2 haftada bir, 25. haftadan sonra hastalık progresyonuna kadar 4 haftada bir uygulanır.
İxazomib + lenalidomid + deksametazon	İxazomib 4 mg PO D ₁ , D ₈ , D ₁₅ Lenalidomid 25 mg PO D ₁₋₂₁ Deksametazon (dekort 8 mg amp. veya kordexa 4-8 mg tab.) 40 mg/gün PO veya İV D ₁ , D ₈ , D ₁₅ 4 haftada bir
Karfilzomib + pomalidomid + deksametazon	Karfilzomib 1. kürde İV 20 mg/m ² D ₁ , D ₂ , takiben 27 mg/m ² /gün D ₈ , D ₉ , D ₁₅ , D ₁₆ , sonraki 2-9. kürlerde 27 mg/m ² /gün D ₁ , D ₂ , D ₈ , D ₉ , D ₁₅ Pomalidomid 4 mg/gün PO D ₁₋₂₁ Deksametazon (dekort 8 mg amp. veya kordexa 4-8 mg tab.) 40 mg/gün PO veya İV D ₁ , D ₈ , D ₁₅ , D ₂₂ (alternatif olarak deksametazon bortezomib uygulanan günde ve bir sonraki günde 20 mg olarak da uygulanabilir) 4 haftada bir

*Dozlar etkinlikte azalmaya sebep olmadan toksisiteyi en aza indirecek şekilde uyarlanmıştır.

Ortalama Eşik Döngü Sayısı Değerleri

#		MiRNA-21				MiR-32			
		CT	Delta CT	$2^{\Delta\text{-delta ct}}$	kat değişimi	CT	Delta CT	$2^{\Delta\text{-delta ct}}$	kat değişimi
K1	kontrol	21.1600	-1.0200	1.2454	2.0279	31.23	9.0500	0.5869	0.0019
K2	kontrol	21.1600	-0.9700	1.2030	1.9588	30.67	8.5400	0.8358	0.0027
K3	kontrol	21.1800	-1.4100	1.6320	2.6574	31.17	8.5800	0.8130	0.0026
K4	kontrol	21.2500	-0.9400	1.1782	1.9185	31.16	8.9700	0.6204	0.0020
K5	kontrol	21.2800	-0.6100	0.9373	1.5263	30.50	8.6100	0.7962	0.0026
K6	kontrol	21.3100	-0.8400	1.0993	1.7901	30.37	8.2200	1.0434	0.0034
K7	kontrol	21.3100	-0.8700	1.1224	1.8277	30.59	8.4100	0.9146	0.0029
K8	kontrol	21.3200	-1.3500	1.5655	2.5491	31.34	8.6700	0.7638	0.0025
K9	kontrol	21.3800	-0.7000	0.9976	1.6245	30.77	8.6900	0.7533	0.0024
K10	kontrol	21.4300	-0.7600	1.0400	1.6935	29.29	7.1000	2.2678	0.0073
K11	kontrol	21.4500	-0.0400	0.6314	1.0281	29.46	7.9700	1.2408	0.0040
K12	kontrol	21.4600	-0.0100	0.6184	1.0070	30.51	9.0400	0.5910	0.0019
K13	kontrol	21.6000	-0.5700	0.9117	1.4845	29.47	7.3000	1.9742	0.0063
K14	kontrol	21.6400	-0.9800	1.2113	1.9725	31.11	8.4900	0.8653	0.0028
K15	kontrol	21.6700	-0.7200	1.0116	1.6472	31.26	8.8700	0.6649	0.0021
K16	kontrol	21.7300	-0.3600	0.7882	1.2834	31.59	9.5000	0.4297	0.0014
K17	kontrol	21.8200	-0.5000	0.8685	1.4142	29.50	7.1800	2.1455	0.0069
K18	kontrol	22.0100	0.1600	0.5497	0.8950	31.02	9.1700	0.5401	0.0017
K19	kontrol	22.0900	-0.4300	0.8274	1.3472	29.95	7.4300	1.8041	0.0058
K20	kontrol	22.1400	0.1300	0.5612	0.9138	31.81	9.8000	0.3490	0.0011

#		MiRNA-181a				MiRNA-181b			
		CT	Delta CT	$2^{\Delta\text{-delta ct}}$	kat değişimi	CT	Delta CT	$2^{\Delta\text{-delta ct}}$	kat değişimi
K1	kontrol	27.0500	4.8700	0.8322	0.0342	25.62	3.4400	0.5637	0.0921
K2	kontrol	27.1800	5.0500	0.7346	0.0302	25.45	3.3200	0.6126	0.1001

K3	kontrol	26.7600	4.1700	1.3519	0.0556	23.70	1.1100	2.8344	0.4633
K4	kontrol	26.8200	4.6300	0.9828	0.0404	24.92	2.7300	0.9221	0.1507
K5	kontrol	26.0200	4.1300	1.3899	0.0571	24.70	2.8100	0.8724	0.1426
K6	kontrol	26.4600	4.3100	1.2269	0.0504	24.67	2.5200	1.0666	0.1743
K7	kontrol	26.9100	4.7300	0.9170	0.0377	24.71	2.5300	1.0592	0.1731
K8	kontrol	27.3000	4.6300	0.9828	0.0404	25.51	2.8400	0.8544	0.1397
K9	kontrol	25.9500	3.8700	1.6644	0.0684	24.69	2.6100	1.0021	0.1638
K10	kontrol	27.3100	5.1200	0.6998	0.0288	25.47	3.2800	0.6298	0.1029
K11	kontrol	26.6700	5.1800	0.6713	0.0276	24.07	2.5800	1.0232	0.1672
K12	kontrol	27.4600	5.9900	0.3829	0.0157	24.17	2.7000	0.9415	0.1539
K13	kontrol	25.8200	3.6500	1.9386	0.0797	25.42	3.2500	0.6431	0.1051
K14	kontrol	27.2800	4.6600	0.9626	0.0396	25.69	3.0700	0.7285	0.1191
K15	kontrol	27.1800	4.7900	0.8797	0.0361	25.32	2.9300	0.8028	0.1312
K16	kontrol	27.0100	4.9200	0.8039	0.0330	24.94	2.8500	0.8485	0.1387
K17	kontrol	27.2200	4.9000	0.8151	0.0335	25.39	3.0700	0.7285	0.1191
K18	kontrol	26.9000	5.0500	0.7346	0.0302	24.75	2.9000	0.8196	0.1340
K19	kontrol	26.8000	4.2800	1.2527	0.0515	23.83	1.3100	2.4675	0.4033
K20	kontrol	26.9800	4.9700	0.7765	0.0319	25.41	3.4000	0.5796	0.0947

#		CT	MiRNA-21 T.Önce			MiRNA-21 T.Sonra			
			Delta CT	2 ^Δ -delta ct	kat değişimi	Delta CT	2 ^Δ -delta ct	kat değişimi	
1.	Hasta	24.9900	-0.2200	0.7153	1.1647	24.0400	24.0400	0.7470	1.2163
2.	Hasta	23.1200	-3.1600	5.4892	8.9383	25.3900	25.3900	0.5478	0.8919
3.	Hasta	23.4400	-2.8575	4.4509	7.2476	24.7900	24.7900	1.8844	3.0684
4.	Hasta	23.5600	-1.1875	1.3987	2.2776	23.0100	23.0100	1.9008	3.0951
5.	Hasta	23.0500	-2.7575	4.1528	6.7622	24.5600	24.5600	1.6662	2.7132
6.	Hasta	23.4400	-2.6700	3.9085	6.3643	24.9700	24.9700	0.7470	1.2163
7.	Hasta	22.9000	-2.6633	3.8904	6.3350	22.1200	22.1200	8.5738	13.9610
8.	Hasta	23.4400	0.6625	0.3880	0.6318	26.7900	26.7900	1.0786	1.7563
9.	Hasta	23.1800	-0.8725	1.1244	1.8308	22.8900	22.8900	1.5655	2.5491
10.	Hasta	23.8650	-1.6850	1.9747	3.2154	27.4300	27.4300	0.5075	0.8265
11.	Hasta	23.0200	-1.5000	1.7370	2.8284	28.4500	28.4500	0.0151	0.0246
12.	Hasta	22.5700	-2.8575	4.4509	7.2476	24.1400	24.1400	0.3576	0.5824
13.	Hasta	23.1400	-2.4800	3.4262	5.5790	24.2300	24.2300	0.5810	0.9461
14.	Hasta	23.1100	-3.1000	5.2656	8.5742	25.2000	25.2000	0.1776	0.2892
15.	Hasta	23.2500	-0.9900	1.2198	1.9862	26.2600	26.2600	1.1031	1.7963
16.	Hasta	23.5000	-2.9200	4.6480	7.5685	21.9900	21.9900	1.4939	2.4326
17.	Hasta	23.3600	-2.3600	3.1527	5.1337	23.1800	23.1800	0.8160	1.3287
18.	Hasta	23.4600	-1.0375	1.2606	2.0527	21.9300	21.9300	2.9416	4.7899
19.	Hasta	22.8500	-0.3100	0.7613	1.2397	20.8100	20.8100	3.3849	5.5117
20.	Hasta	23.2300	-0.5900	0.9244	1.5052	27.0800	27.0800	0.0439	0.0714
21.	Hasta	23.1300	-0.1400	0.6767	1.1019	23.7700	23.7700	1.7430	2.8382
22.	Hasta	22.8600	-2.7500	4.1313	6.7272	25.1800	25.1800	1.2804	2.0849
23.	Hasta	23.3700	0.7400	0.3677	0.5987	27.6600	27.6600	0.2134	0.3475
24.	Hasta	22.7900	-2.0175	2.4865	4.0488	24.9800	24.9800	0.4358	0.7096
25.	Hasta	22.6100	-1.6800	1.9678	3.2043	30.0100	30.0100	0.0836	0.1362
26.	Hasta	23.7800	1.0600	0.2946	0.4796	22.3000	22.3000	2.8661	4.6670
27.	Hasta	23.3500	0.2200	0.5273	0.8586	25.0600	25.0600	0.6402	1.0425
28.	Hasta	23.4000	-1.3575	1.5736	2.5624	29.0300	29.0300	0.0582	0.0947

29.	Hasta	22.9800	-1.3275	1.5413	2.5097	24.0200	24.0200	0.8868	1.4439
30.	Hasta	22.7800	1.4600	0.2232	0.3635	24.3500	24.3500	0.5459	0.8888
31.	Hasta	23.4800	-1.0300	1.2541	2.0420	21.9300	21.9300	2.9827	4.8568
32.	Hasta	23.2000	-0.1000	0.6582	1.0718	23.7000	23.7000	1.8360	2.9897
33.	Hasta	25.0100	-0.1700	0.6909	1.1251	24.0100	24.0100	0.8103	1.3195
34.	Hasta	22.8100	1.4600	0.2232	0.3635	24.3800	24.3800	0.5459	0.8888
35.	Hasta	22.9000	-1.7100	2.0092	3.2716	25.1800	25.1800	0.6674	1.0867
36.	Hasta	23.4100	0.7600	0.3626	0.5905	27.7000	27.7000	0.2171	0.3536
37.	Hasta	25.2000	-0.1000	0.6582	1.0718	24.1000	24.1000	0.7561	1.2311
38.	Hasta	22.9500	-1.3700	1.5873	2.5847	24.0500	24.0500	0.8745	1.4241

		MiRNA-32 T.Önce				MiRNA-32 T.Sonra			
		Delta	2 ^Δ -delta	kat		Delta	2 ^Δ -delta	kat	
		CT	delta ct	değişimi	CT	CT	delta ct	değişimi	
1.	Hasta	31.5400	6.3300	3.8672	0.0124	36.0600	6.5075	3.4195	0.0110
2.	Hasta	30.8200	4.5400	13.3733	0.0430	32.0700	10.8350	0.1703	0.0005
3.	Hasta	30.7700	4.4725	14.0139	0.0450	32.1800	5.6625	6.1423	0.0197
4.	Hasta	30.7400	5.9925	4.8865	0.0157	31.0900	7.5400	1.6717	0.0054
5.	Hasta	30.3200	4.5125	13.6307	0.0438	33.2300	5.0900	9.1343	0.0294
6.	Hasta	30.6700	4.5600	13.1892	0.0424	32.1000	7.9775	1.2344	0.0040
7.	Hasta	32.1400	6.5767	3.2594	0.0105	36.4400	6.1767	4.3008	0.0138
8.	Hasta	30.3100	7.5325	1.6804	0.0054	33.0900	8.8375	0.6801	0.0022
9.	Hasta	30.7000	6.6475	3.1033	0.0100	31.2400	8.8500	0.6742	0.0022
10.	Hasta	30.6200	5.0700	9.2618	0.0298	30.5700	4.0850	18.3320	0.0589
11.	Hasta	30.7800	6.2600	4.0595	0.0130	34.2200	7.4625	1.7639	0.0057
12.	Hasta	30.4400	5.0125	9.6384	0.0310	36.0600	10.8600	0.1674	0.0005
13.	Hasta	30.1300	4.5100	13.6543	0.0439	34.2500	11.9100	0.0808	0.0003
14.	Hasta	30.5000	4.2900	15.9037	0.0511	31.4700	10.8400	0.1697	0.0005
15.	Hasta	30.3200	6.0800	4.5989	0.0148	33.2800	4.3650	15.0980	0.0485
16.	Hasta	30.7200	4.3000	15.7938	0.0508	31.5000	10.0075	0.3022	0.0010
17.	Hasta	30.5900	4.8700	10.6390	0.0342	30.5400	7.9100	1.2935	0.0042

18.	Hasta	30.2100	5.7125	5.9331	0.0191	29.0700	6.3500	3.8140	0.0123
19.	Hasta	31.0200	7.8600	1.3391	0.0043	28.8700	5.7975	5.5936	0.0180
20.	Hasta	30.9200	7.1000	2.2678	0.0073	34.1700	5.5975	6.4254	0.0207
21.	Hasta	30.7700	7.5000	1.7187	0.0055	35.3500	8.8950	0.6535	0.0021
22.	Hasta	30.4000	4.7900	11.2456	0.0361	31.3300	9.1100	0.5630	0.0018
23.	Hasta	30.4700	7.8400	1.3578	0.0044	30.3800	5.1950	8.4931	0.0273
24.	Hasta	30.3700	5.5625	6.5832	0.0212	34.6500	5.8950	5.2281	0.0168
25.	Hasta	30.4600	6.1700	4.3208	0.0139	35.6700	7.5167	1.6989	0.0055
26.	Hasta	30.1800	7.4600	1.7670	0.0057	31.2200	11.1475	0.1371	0.0004
27.	Hasta	30.7100	7.5800	1.6260	0.0052	30.7600	6.1000	4.5356	0.0146
28.	Hasta	30.5000	5.7425	5.8110	0.0187	32.4800	5.1300	8.8845	0.0286
29.	Hasta	30.6100	6.3025	3.9416	0.0127	32.1800	7.9300	1.2757	0.0041
30.	Hasta	30.1300	8.8100	0.6932	0.0022	30.6200	8.0000	1.2153	0.0039
31.	Hasta	30.2200	5.7100	5.9434	0.0191	34.1500	6.4100	3.6586	0.0118
32.	Hasta	30.8000	7.5000	1.7187	0.0055	30.9000	8.8700	0.6649	0.0021
33.	Hasta	31.5000	6.3200	3.8941	0.0125	32.1500	6.4900	3.4612	0.0111
34.	Hasta	30.1500	8.8000	0.6980	0.0022	35.3600	7.9400	1.2669	0.0041
35.	Hasta	30.5000	5.8900	5.2463	0.0169	31.8000	10.0600	0.2914	0.0009
36.	Hasta	30.5000	7.8500	1.3484	0.0043	30.5300	5.6000	6.4143	0.0206
37.	Hasta	31.6000	6.3000	3.9485	0.0127	32.5000	6.1300	4.4422	0.0143
38.	Hasta	30.7000	6.3800	3.7355	0.0120	30.8000	7.9400	1.2669	0.0041

#		CT	MiRNA-181a T.Önce			CT	MiRNA181a T.Sonra		
			Delta CT	2 ^Δ -delta ct	kat değişimi		Delta CT	2 ^Δ -delta ct	kat değişimi
1.	Hasta	28.6500	3.4400	2.2423	0.1713	27.4500	3.1275	2.7847	0.1144
2.	Hasta	28.5400	2.2600	5.0806	1.5476	29.6100	4.3850	1.1647	0.0479
3.	Hasta	28.3100	2.0125	6.0314	1.4820	29.0300	2.6225	3.9518	0.1624
4.	Hasta	27.3200	2.5725	4.0911	0.6678	27.9900	3.3500	2.3867	0.0981
5.	Hasta	27.7000	1.8925	6.5546	0.7887	28.7600	2.7600	3.5925	0.1476
6.	Hasta	28.2100	2.1000	5.6765	1.5369	29.3700	4.1175	1.4020	0.0576

7.	Hasta	27.9500	2.3867	4.6536	1.0234	29.0000	3.0767	2.8845	0.1185
8.	Hasta	28.5900	5.8125	0.4330	0.1231	30.0600	2.4575	4.4306	0.1821
9.	Hasta	27.9500	3.8975	1.6330	0.3304	29.0500	4.8100	0.8675	0.0356
10.	Hasta	28.4200	2.8700	3.3288	2.5491	31.9700	4.8150	0.8645	0.0355
11.	Hasta	28.3500	3.8300	1.7112	0.7120	26.2900	3.1825	2.6805	0.1101
12.	Hasta	28.0400	2.6125	3.9793	1.1231	28.0000	4.6400	0.9760	0.0401
13.	Hasta	28.4400	2.8200	3.4462	1.3195	28.6400	4.4900	1.0830	0.0445
14.	Hasta	27.6700	1.4600	8.8459	1.1810	29.9500	6.5400	0.2615	0.0107
15.	Hasta	28.2200	3.9800	1.5422	0.2973	31.9700	4.8650	0.8351	0.0343
16.	Hasta	28.2300	1.8100	6.9403	1.3566	26.5800	3.3075	2.4580	0.1010
17.	Hasta	27.6400	1.9200	6.4308	1.2058	29.0700	5.4800	0.5453	0.0224
18.	Hasta	28.0100	3.5125	2.1324	0.3181	27.6000	3.4100	2.2895	0.0941
19.	Hasta	28.4900	5.3300	0.6050	0.2300	29.1100	5.8375	0.4256	0.0175
20.	Hasta	28.2900	4.4700	1.0981	0.2449	29.3900	6.1175	0.3505	0.0144
21.	Hasta	27.6000	4.3300	1.2100	0.1397	30.6500	5.3750	0.5864	0.0241
22.	Hasta	27.8600	2.2500	5.1159	2.2815	31.1900	4.9500	0.7873	0.0324
23.	Hasta	27.9900	5.3600	0.5925	0.1158	32.2800	6.1450	0.3439	0.0141
24.	Hasta	27.9000	3.0925	2.8530	0.4226	31.4900	7.0050	0.1895	0.0078
25.	Hasta	27.8700	3.5800	2.0350	0.3439	28.2700	1.1367	11.0681	0.4548
26.	Hasta	28.1900	5.4700	0.5490	0.1330	29.0600	4.5375	1.0479	0.0431
27.	Hasta	28.8100	5.6800	0.4747	0.1948	36.4900	11.3700	0.0092	0.0004
28.	Hasta	28.3000	3.5425	2.0886	0.4168	34.0400	8.4100	0.0715	0.0029
29.	Hasta	28.5500	4.2425	1.2857	0.9710	30.1100	5.5600	0.5158	0.0212
30.	Hasta	28.0500	6.7300	0.2293	0.1406	31.1300	6.9500	0.1968	0.0081
31.	Hasta	28.0600	3.5500	2.0777	0.3209	27.6200	3.4100	2.2895	0.0941
32.	Hasta	27.6000	4.3000	1.2354	0.1358	30.6000	5.3200	0.6092	0.0250
33.	Hasta	28.6000	3.4200	2.2736	0.1627	27.5000	3.0900	2.8580	0.1174
34.	Hasta	28.1000	6.7500	0.2261	0.1387	31.2000	6.9900	0.1914	0.0079
35.	Hasta	27.9100	3.3000	2.4708	1.1173	31.2000	5.9000	0.4075	0.0167
36.	Hasta	28.1000	5.4500	0.5567	0.1166	32.3000	6.1000	0.3548	0.0146
37.	Hasta	28.6500	3.3500	2.3867	0.1756	27.5000	3.1000	2.8383	0.1166

38. Hasta	28.6100	4.2900	1.2440	0.9395	30.1500	5.5900	0.5052	0.0208
-----------	---------	--------	--------	--------	---------	--------	--------	--------

#	CT	MiRNA-181b T.Önce			MiRNA181b T.Sonra			
		Delta CT	2 ^{Δ-delta} delta ct	kat değişimi	CT	Delta CT	2 ^{Δ-delta} delta ct	kat değişimi
1. Hasta	27.7550	2.5450	1.0483	0.1713	25.3200	0.9975	3.0642	0.5009
2. Hasta	25.6500	-0.6300	9.4678	1.5476	26.6400	1.4150	2.2943	0.3750
3. Hasta	25.7300	-0.5675	9.0664	1.4820	26.5000	0.0925	5.7379	0.9379
4. Hasta	25.3300	0.5825	4.0855	0.6678	25.9600	1.3200	2.4504	0.4005
5. Hasta	26.1500	0.3425	4.8250	0.7887	28.2800	2.2800	1.2597	0.2059
6. Hasta	25.4900	-0.6200	9.4024	1.5369	27.9300	2.6775	0.9563	0.1563
7. Hasta	25.5300	-0.0333	6.2608	1.0234	27.0800	1.1567	2.7441	0.4485
8. Hasta	25.8000	3.0225	0.7529	0.1231	27.3900	-0.2125	7.0887	1.1587
9. Hasta	25.6500	1.5975	2.0216	0.3304	27.2500	3.0100	0.7594	0.1241
10. Hasta	24.2000	-1.3500	15.5951	2.5491	30.2200	3.0650	0.7310	0.1195
11. Hasta	25.0100	0.4900	4.3561	0.7120	25.3400	2.2325	1.3018	0.2128
12. Hasta	25.2600	-0.1675	6.8710	1.1231	25.7100	2.3500	1.2000	0.1961
13. Hasta	25.2200	-0.4000	8.0726	1.3195	26.3600	2.2100	1.3223	0.2161
14. Hasta	25.9700	-0.2400	7.2251	1.1810	26.6000	3.1900	0.6704	0.1096
15. Hasta	25.9900	1.7500	1.8188	0.2973	27.6100	0.5050	4.3110	0.7047
16. Hasta	25.9800	-0.4400	8.2995	1.3566	25.3100	2.0375	1.4902	0.2436
17. Hasta	25.4500	-0.2700	7.3770	1.2058	27,08	0.5050	4.3110	0.7047
18. Hasta	26.1500	1.6525	1.9460	0.3181	26.2200	2.0300	1.4980	0.2449
19. Hasta	25.2800	2.1200	1.4074	0.2300	35.4800	12.2075	0.0013	0.0002
20. Hasta	25.8500	2.0300	1.4980	0.2449	27.0300	3.7575	0.4524	0.0739
21. Hasta	26.1100	2.8400	0.8544	0.1397	27.7100	2.4350	1.1313	0.1849
22. Hasta	24.4200	-1.1900	13.9580	2.2815	28.2000	1.9600	1.5725	0.2570
23. Hasta	25.7400	3.1100	0.7086	0.1158	28.8200	2.6850	0.9513	0.1555
24. Hasta	26.0500	1.2425	2.5856	0.4226	29.5700	5.0850	0.1802	0.0295
25. Hasta	25.8300	1.5400	2.1038	0.3439	26.8200	-0.3133	7.6019	1.2426

26.	Hasta	25.6300	2.9100	0.8140	0.1330	27.3900	2.8675	0.8383	0.1370
27.	Hasta	25.4900	2.3600	1.1917	0.1948	33.0500	7.9300	0.0251	0.0041
28.	Hasta	26.0200	1.2625	2.5500	0.4168	30.0400	4.4100	0.2878	0.0470
29.	Hasta	24.3500	0.0425	5.9403	0.9710	31.4700	6.9200	0.0505	0.0083
30.	Hasta	24.1500	2.8300	0.8604	0.1406	28.2400	4.0600	0.3668	0.0600
31.	Hasta	26.1500	1.6400	1.9630	0.3209	26.2500	2.0400	1.4876	0.2432
32.	Hasta	26.1800	2.8800	0.8311	0.1358	27.7200	2.4400	1.1274	0.1843
33.	Hasta	27.8000	2.6200	0.9952	0.1627	25.3500	0.9400	3.1888	0.5212
34.	Hasta	24.2000	2.8500	0.8485	0.1387	28.3000	4.0900	0.3592	0.0587
35.	Hasta	24.4500	-0.1600	6.8354	1.1173	28.2500	2.9500	0.7917	0.1294
36.	Hasta	25.7500	3.1000	0.7135	0.1166	28.9000	2.7000	0.9415	0.1539
37.	Hasta	27.8100	2.5100	1.0740	0.1756	25.3500	0.9500	3.1668	0.5176
38.	Hasta	24.4100	0.0900	5.7479	0.9395	31.5100	6.9500	0.0495	0.0081

FORMLAR

**MULTİPL MİYELOMA ARAŞTIRMA FORMU
OLGU FORMU**

Form No:	Protokol No :	Tarih :
Adı Soyadı :	Yaş :	Cinsiyet :
Boy / Kilo :	Meslek :	Kan Grubu:
Memleket:	Yaşadığı yer:	

Hastanın Medikal Bilgileri

1- Multiple Miyeloma Türü:

2- Teşhis Tarihi:

3- Hastalığın Aşaması:

4- Risk Faktörleri:

a. Aile Öyküsü:

Varsa (kaçıncı derece, hangi kan hastalığı, hangi kanser):

b. Obezite:

5- Kronik Hastalıkları ve Süresi :

6- Eski Kullandığı İlaçların Dozları :

7- Daha önce ameliyat geçirmiş mi?:

8- Hastanın Tanısı :

9- Tedavi :

10. Hematolojik Değerler

	Tedavi Öncesi	Tedavi Sonrası
--	----------------------	-----------------------

a. Lökosit Sayımı	:	
--------------------------	---	--

b. Platelet Sayımı	:	
---------------------------	---	--

c. Blast Hücre Türü	:	
----------------------------	---	--

11. Tedaviye yanıt verme durumu	:	<input type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır
---------------------------------	---	--------------------------------------	---------------------------------------

ETİK KURUL KARARI

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

**Sayı : 802****Tarih : 30.05.2018****Konu: Prof. Dr. Sadrettin PENÇE hk.**


Sayın Prof. Dr. Sadrettin PENÇE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

İlgi : 24.05.2018 tarihli değişiklik isteminiz

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve MSc. Hani ALSAADONI' nin yürüteceği 2015/1247 dosya numaralı "MiR-21, MiR-32 ve MiR-181a/b'nin Multiple myeloma'da tedaviye yanıt açısından araştırılması" başlıklı çalışma kurulumuzun 26/06/2015 tarih ve 12 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuştu.

İlgi değişiklik isteminiz, Değişiklik Bilgi Formu, Örneklem Sayısının 40 hasta ve 20 kontrole artırılması hakkında, kurulumuzun 25/05/2018 tarih ve 10 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.


Prof. Dr. A.Yağız ÜRESİN

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 1309

Tarih : 26.06.2015

Konu : Prof. Dr. Sadrettin PENÇE

Sayın Prof. Dr. Sadrettin PENÇE
Deneyel Tıp Araştırma Enstitüsü

İlgi :Deneyel Tıp Araştırma Enstitüsünün 16/06/2015 gün ve 298 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve MSc. Hani ALSAADONİ' nin yürüteceği 2015/1247 dosya numaralı "MiR-21, MiR-32 ve MiR-181a/b'nin Multiple myeloma'da tedaviye yanıt açısından araştırılması" başlıklı çalışma kurulumuzun 26/06/2015 tarih ve 12 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.


Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

PATENT HAKKI İZİNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

MİR-21, MİR-32 VE MİR-181A/B'NİN MULTİPLE MYELOMA'DA TEDAVİYE YANIT AÇISINDAN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLIK RAPORU

%6 BENZERLİK ENDEKSİ	%3 İNTERNET KAYNAKLARI	%2 YAYINLAR	%4 ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
--------------------------------	----------------------------------	-----------------------	-------------------------------

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%3
2	biotek.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
3	onlinelibrary.wiley.com İnternet Kaynağı	<%1
4	www.bitebo.com İnternet Kaynağı	<%1
5	Alfons Navarro, Tania Díaz, Natalia Tovar, Fabiola Pedrosa et al. "A serum microRNA signature associated with complete remission and progression after autologous stem-cell transplantation in patients with multiple myeloma", Oncotarget, 2015 Yayın	<%1
6	www.ncbi.nlm.nih.gov İnternet Kaynağı	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	HANI	Soyadı	ALSAADONI
Doğ.Yeri	FİLİSTİN	Doğ.Tar.	05-09-1978
Uyruğu	FİLİSTİN	TC Kim No	
Email	Hani_alsadoni@hotmail.com	Tel	05388546986

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi	2018
Yük.Lis.	Gazze İslam Üniversitesi	2010
Lisans	Gazze İslam Üniversitesi	2000
Lise	Haroun Al - Rashid Lise	1996

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi		
Türkçe	iyi	iyi	iyi		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

1. The First International Conference on Basic and Applied Sciences (ICBAS) Gaza-Palestine, October 10-12, 2010. Oral presentation.

2. Yaylım İ, Toptaş B, Ağaçhan B, Alsaadoni H, Sarı H, Eraltan E, Ergen H. “Examination of critical gene polymorphisms in Lomber hernia”. 16 -17 May 2013 held in Izmir Dokuz Eylul University Faculty of Medicine. İzmir (Poster Bildirisi).
3. Hani Alsaadoni, Burcu Çaykara, Sadrettin Pençe, Saffet Tüzgen “Analysis of Clusterin and BACE1 Gene Expression Levels in Alzheimer’s Disease” VI. International Congress of Molecular Medicine, 22-25 May 2017 Istanbul University (Poster Bildirisi).
4. Hani Alsaadoni, Burcu Çaykara, Sadrettin Pençe, Emin Özbek, Alper Ötünçtemur “Determination of the effect of IGF1 and FBLN5 promoter variants on the formation of urinary incontinence in pre-and postmenopausal women” VI. International Congress of Molecular Medicine, 22-25 May 2017 Istanbul University (Poster Bildirisi).
5. Burcu Çaykara, Hani Alsaadoni, Fatemeh Azhari Zarnag, Alper Ötünçtemur, Sadrettin Pençe “Investigation of MTHFR C677T and A1298C gene polymorphism in human kidney cancer tissues” VI. International Congress of Molecular Medicine, 22-25 May 2017 Istanbul University (Poster Bildirisi).
6. Burcu Çaykara, Hani Alsaadoni, Alper Ötünçtemur, Sadrettin Pençe “Evaluation of the role of MMP-9 gene rs3918242 and TIMP-2 gene rs8179090 variations in renal cell carcinoma” VI. International Congress of Molecular Medicine, 22-25 May 2017 Istanbul University (Poster Bildirisi).

Ulusal Bildiriler

1. Alsaadoni H., Çaykara B., Pençe S., Ötünçtemur A. “IGF1 GENİ PROMOTER BÖLGESİNİN ÜRİNER İNKONTİNANS HASTALIĞINDA DİZİLENMESİ” VIII.DETAE GÜNLERİ 15-16 Aralık 2016, İstanbul (Poster Bildirisi).
 2. Çaykara B., Alsaadoni H., Ötünçtemur A. Pençe S., “Böbrek Kanserinde TIMP-2 Geni rs8179090 Varyasyonunun Değerlendirilmesi” VIII.DETAE GÜNLERİ 15-16 Aralık 2016, İstanbul (Poster Bildirisi).
 3. Filizfidan M., Çaykara B., Alsaadoni H., Marakoğlu k., Pençe S., Kargın N., “Investigation of SR-BI rs4238001 and rs5888 genetic variants in relation to susceptibility to metabolic syndrome” VIII.DETAE GÜNLERİ 15-16 Aralık 2016, İstanbul (Poster Bildirisi).
 4. Özdemir H., Çaykara B., Alsaadoni H., Yanartaş M., Çoşkunpınar E., Pençe S., ” “Torasik aort anevrizmalı hastalarda risk faktörü olarak Fibrilin-1 (FBN-1) Gen ekspresyonunun değerlendirilmesi” VIII.DETAE GÜNLERİ 15-16 Aralık 2016, İstanbul (Poster Bildirisi).
 5. Burcu Çaykara, Güler Öztürk, Hani Alsaadoni, Alper Ötünçtemur, Sadrettin Pençe ” “MiR-124 Expression Levels in Human Renal Cell Carcinoma” 43.Ulusal Fizyoloji Kongresi-Pamukkale Üniversitesi Eylül 2017 (sözlü sunum).
- II. Moleküler Tıpta Kullanılan Teknikler Kursu İ.Ü. DETAE 18-27/12/2014

IV. Moleküler Tıpta Kullanılan Teknikler Kursu İ.Ü. DETAE 2. 19-26/10/2015

Özel İlgil Alanları (Hobileri): Bilim Kurgu