

**T.C.**  
**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ**  
**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**MULTİPL MİYELOMALI HASTALARDA PATOLOJİK  
KIRIK İLE OSTEOPROTEGERİN GEN MUTASYONU VE  
POLİMORFİZM İLİŞKİSİ**

**THE RELATION BETWEEN OSTEOPROTEGERIN GEN  
MUTATION/POLYMORPHISM AND PATHOLOGIC  
FRACTURES IN MULTIPLE MYELOMA PATIENTS**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Seher Nazlı KAZAZ**

**TRABZON 2012**

**T.C.**  
**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ**  
**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**MULTİPL MİYELOMALI HASTALARDA PATOLOJİK  
KIRIK İLE OSTEOPROTEGERİN GEN MUTASYONU VE  
POLİMORFİZM İLİŞKİSİ**

**THE RELATION BETWEEN OSTEOPROTEGERIN GEN  
MUTATION/POLYMORPHISM AND PATHOLOGIC  
FRACTURES IN MULTIPLE MYELOMA PATIENTS**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Seher Nazlı KAZAZ**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet SÖNMEZ**

**TRABZON 2012**

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İÇİNDEKİLER .....	ii
TABLolar LİSTESİ .....	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	iv
KISALTMALAR .....	v
1. GİRİŞ ve AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	2
2.1 Multipl Miyelom.....	2
2.1.1 Tanım.....	2
2.1.2 Epidemiyoloji .....	2
2.1.3 Etiyoloji .....	2
2.1.4 Patogenez.....	3
2.1.5 Klinik Bulgular .....	4
2.1.6 Multipl Miyelom Tanısı ve Tanı Kriterleri.....	6
2.1.7 Evreleme ve Risk Sınıflaması.....	9
2.1.8 Tedavi .....	11
2.2. MM’de Kemik Hastalığı ve Patogenez.....	13
2.2.1. Miyelom Kemik Hastalığında Osteolitik Kemik hasarı, OPG/RANK ve RANKL Sinyal Sistemi .....	13
2.2.2 Miyelom Kemik Hastalığında Osteoblast Etkisi .....	18
2.2.3 Multipl Miyelomda OPG/RANK/RANKL Sinyal Sisteminin Etkisi .....	19
3. MATERYAL VE METOT .....	20
3.1. Genomik DNA izolasyonu .....	21
3.2. TNSFR11B geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile amplifikasyonu .....	22
3.3. DNA Dizi Analizi .....	23
3.4. İstatistiksel Analiz .....	23
4. BULGULAR .....	24
5. TARTIŞMA .....	25
6. SONUÇ .....	34
7. ÖZET .....	35
8. SUMMARY.....	36
9. KAYNAKLAR .....	37

## TABLolar LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> Durie-Salmon Tanı Kriterleri .....	7
<b>Tablo 2.</b> Sistemik Tedavi Gerektiren Aktif Multiple Miyelom Tanı Kriterleri (32) .....	8
<b>Tablo 3.</b> Multipl Miyelom tanısında laboratuvar .....	8
<b>Tablo 4.</b> Durie-Salmon Evreleme Sistemi (33) .....	9
<b>Tablo 5.</b> Uluslararası Evreleme Sistemi (International Staging System) (34) .....	10
<b>Tablo 6.</b> MAYO Yeni Tanı Miyelomlu Hastalarda Risk Sınıflaması: mSMART: Aktif Miyelom Sınıflaması (35) .....	10
<b>Tablo 7.</b> International Miyeloma Working Group Yanıt Kriterleri (39) .....	12
<b>Tablo 8.</b> Hasta özellikleri .....	20
<b>Tablo 9</b> Patolojik kırık ve/veya destrüktif kemik lezyonu olan ve olmayan MM hastalarının cinsiyet ve M-proteinine göre dağılımı .....	21
<b>Tablo 10.</b> PCR koşulları .....	22
<b>Tablo 11.</b> Primerler .....	22
<b>Tablo 12.</b> DTCS Reaksiyonu Koşulları .....	23
<b>Tablo 13.</b> DNA dizi analizi ile bulunan TNP'ler .....	24
<b>Tablo 14.</b> DNA dizi analizi ile bulunan TNP'lerin kontrol grubu ve hasta gruplarındaki dağılım .....	26
<b>Tablo 15.</b> Genotip Frekansları .....	27
<b>Tablo 16.</b> Allel Frekansları .....	27
<b>Tablo 17.</b> Ekzon 1'de saptanan TNP'lerin patolojik kırık ve/veya destrüktif kemik lezyonu olan ve olmayan hastalar ile kontrol grubunun karşılaştırılması, TNP'lerin MM'da kemik lezyonlarına etkisi .....	28

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. TNFRSF11B geni düzeni.....	21
Şekil 2. rs2073617 C:T (Ekzon 1).....	24
Şekil 3. rs2073617 T:T (Ekzon 1).....	25
Şekil 4. rs11575929 C:T (Ekzon 1).....	25
Şekil 5. rs2073618 G:G (Ekzon 1).....	25
Şekil 6. Homozigot rs2073617 ve rs2073618 TNP birlikteliğinin sağkalıma etkisi.....	29

## KISALTMALAR

AD	: Anlamalı Deęil
ALP	: Alkalen Fosfataz
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
CRAB	: Calcium, Renal, Anemia, Bone
ÇİPY	: Çok İyi Parsiyel Yanıt
DTCS	: Dye Terminator Cycle Sequencing
FISH	: Floresan İnsitu Hibridizasyon
GEP	: Gen Ekspresyon Profili
GRC	: Genom Referans Konsorsiyumu
IGF-1	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
IgH	: Ig Ağır Zincir
IL	: İnterlökin
İMİDs	: İmmünmodülatuar İlaçlar
INF-B	: İnterferon-B
ISS	: International Staging System
JNK	: Jun N-Terminal Kinaz
LDH:	Laktat Dehidrogenaz
MGUS	: Önemi Bilinmeyen Monoklonal Gammopati
MIP-1 $\alpha$	: İnflamatuar Makrofaj Protein-1 $\alpha$
MM	: Multipl Miyelom
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
NF-K $\beta$	: Nükleer Faktör Kappa B
OKHN	: Otolog Kök Hücre Nakli
OPG	: Osteoprotegerin
PCLI	: Plazma Hücre Proliferatif İndeksi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PH	: Progresif Hastalık

PKB	: Akt/Protein Kinaz B
PTH	: Paratiroid Hormon
PY	: Parsiyel Yanıt
RANK	: Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B
RANKL	: Nükleer Faktör Kappa B Ligand Reseptör Aktivatörü
Runx2/Cbfa	: Runtrelated Transcription Factor 2/ Core Binding Factor A
SH	: Stabil Hastalık
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism
TNFR	: Tümör Nekroz Faktörü Reseptörleri
TNFRSF11B	: Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily 11B
TNF-A	: Tümör Nekroz Faktör-A
TNP	: Tek Nükleotid Polimorfizm
TRAF	: Tümör Nekroz Faktörü Reseptörleri İlişkili Faktör
TRAIL	: TNF İlişkili Apoptozisi İndükleyen Ligand
TY	: Tam Yanıt
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
YDM	: Yüksek Doz Melfalan
B <sub>2</sub> -MG	: B <sub>2</sub> -Mikroglobulin

## 1.GİRİŞ ve AMAÇ

Multipl Miyelom (MM) kemik iliğinde tek bir klondan köken alan ve monoklonal immunglobulin üreten malin bir plazma hücre hastalığıdır. Hastalık seyrinde osteopeni, kemik destrüksiyonu ve/veya patolojik kırık gelişimi sıklıkla izlenmektedir. İnterlökin (IL)-6, nükleer faktör kappa B ligand reseptör aktivatörü (RANKL), inflamatuvar makrofaj protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) ve IL-3 gibi sitokinler osteoblast fonksiyonunu azaltıp, osteoklast aktivasyonunu artırarak kemik lezyonlarının oluşmasına neden olurlar (1).

Osteoklast öncüllerinin üzerinde bulunan RANKL reseptörü, reseptör aktivatör nükleer kappa B'yi (RANK) uyararak, osteoklast öncülü hücrelerin osteoklastlara dönüşmesini sağlamakta ve böylece oluşan osteoklastlar kemik yıkımına yol açmaktadır. Buna karşılık RANKL için yalancı reseptör görevi gören Osteoprotegerin (OPG) kemik yıkımını inhibe eder. MM'de kemik iliğinde RANKL düzeyinde belirgin artış izlenirken OPG düzeylerinde azalma gözlenir. RANKL düzeyinde izlenen bu artış beraberinde osteoklast aktivasyonunu artırarak, MM'de saptanan kemik lezyonlarının oluşmasına yol açmaktadır (2,3). Ancak, MM'de izlenen azalmış OPG düzeylerinin RANK düzeyinden bağımsız olarak tek başına kemik lezyonlarının gelişimine yol açabileceği konusunda henüz kesin bir bilgi mevcut değildir.

Bu çalışmada OPG proteinini kodlayan gen (TNFRSF11B: Tumor necrosis factor receptor superfamily 11B) mutasyonlarının, MM'de saptanan kemik lezyonlarının oluşmasındaki etkisinin araştırılması amaçlandı.



## **2.GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Multipl Miyelom**

#### **2.1.1. Tanım**

Multipl miyelom (MM) kemik iliğinde tek bir klondan köken alan ve monoklonal immunglobulin üreten malin bir plazma hücre hastalığıdır. Sıklıkla osteolitik lezyonların eşlik ettiği yaygın iskelet destrüksiyonu, osteopeni ve/veya patolojik kırıklarla sonuçlanmaktadır. MM hastalarında infeksiyonlar ve böbrek yetmezliği hayatı tehdit eden en önemli komplikasyonlar iken, anemi ve kemik lezyonları bu hastalarda yaşam kalitesini bozmakta ve mortaliteye neden olabilmektedir (4).

#### **2.1.2. Epidemiyoloji**

MM, tüm kanserlerin %1'ini, hematolojik malignansilerin ise %13'ünü oluşturmaktadır (5). Görülme sıklığı 1-4/100.000 olup, erkeklerde kadınlara oranla 1,4 kat daha fazla görülür. (6,7). Ortalama tanı yaşı 66 ve tanı anında hastaların sadece %2'si 40 yaşın altındadır (8,9). MM hastalarının bir kısmı ailevi geçişlidir. Birinci dereceden yakınlarında MM görülenlerde hastalık gelişim riski 3,7 kat artmaktadır (10).

#### **2.1.3. Etiyoloji**

MM'nin nedeni kesin olarak bilinmemektedir, ancak radyasyon, benzen ve diğer organik çözücülere maruziyetin veya böcek ilaçlarının etkin olabileceğine dair veriler çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Az sayıda vaka olmasına rağmen, atom bombası nedeniyle 50 raddan fazla radyasyona maruz kalan kişilerde, uzun süreli yüksek doz radyasyona maruz kalan radyologlarda, nükleer santrallerde çalışanlarda ve böcek ilacı kullanan çiftçilerde MM gelişim riskinde artış gözlenmiştir (11,12). Genetik faktörlerin rolü kesin olmamakla birlikte, aynı monoklonal paterne sahip MM tanısı olan aileler bildirilmiştir (13).

#### 2.1.4. Patogenez

B hücreli bir neoplazi olan MM, kemik iliği postgerminal merkez plazmablast veya plazma hücrelerinden kaynaklanmaktadır. Patogenezde bir çok onkojenik olay tanımlanmıştır. İmmatür B lenfositlerin matür plazma hücrelerine dönüşmesi için birçok DNA kırılması gerekli olduğundan B hücreleri genetik olarak değişkenlik göstermektedir. DNA kırıkları ile somatik mutasyonlar ve izotip değişikliği oluşmakta ve sıklıkla Ig ağır zincir bölgesinde (IgH) 14q32'de genetik değişiklikler meydana gelmektedir. MM hastalarının yaklaşık %75'inde bu bölgede anormallikler saptanmıştır (14). Spesifik IgH translokasyonları; t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16.3;q32.3), t(6;14)(p25;q32), t(8;14)(q24;q32) ve t(14;16)(q32.3;q23) olmakla birlikte (15), en sık görülen t(11;14)(q13;q32) olup siklin D1 artışı ile sonuçlanmaktadır. t(4;14), t(14;16), t(14;20), del17p13 ve p53 delesyonu hastalarda yüksek risk ile birliktelik göstermektedir. Yapılan çalışmalarda p53 mutasyonunun daha çok akut/lösemik MM ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir (16). Ayrıca kromozom 13 anomalileri ve hipodiploidi varlığı sağkalım oranını azaltırken (17,18), trizomiler, hiperdiploidi ve IgH translokasyonları ise standart risk oluşturmaktadır (19). Hastalarda saptanan N-RAS ve daha az oranda da K-RAS onkogen aktivasyonu daha çok tedavi sonrası relaps ile ilişkilendirilmiştir (20).

Kemik iliği stromal hücreleri, ekstrasellüler matriks proteinleri, vasküler endotelial hücreler, osteoklastlar, osteoblastlar ve lenfositlerden oluşan kemik iliği mikroçevresi, miyelom hücrelerinin kemik iliği stromal hücreleri ve ekstrasellüler matriks proteinleri ile etkileşimi, ilik mikroçevresine ait sitokinler ve anjiogenez gibi faktörler birlikte miyelom patogenezinde önemli rol oynamaktadırlar (21,22). Miyelom hücrelerinin fibronektine adezyonu apoptozdan korunma sağlarken, kemik iliği stromal hücrelerine bağlanması ise İnterlökin-6 (IL-6), insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), tümör nekroz faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ve stroma kökenli faktör-1 gibi sitokinlerin yapım ve sekresyonunu artırmaktadır.

Miyelom hücrelerinin büyüme ve sağkalımında IL-6 ana rol oynamaktadır. IL-6 miyelom hücrelerinin çoğalmasını tetiklerken, Bcl-xL, Mcl-1 ve c-Myc gibi anti-apoptotik molekülleri artırarak miyelom hücrelerinin yaşam süresini uzatır. Ayrıca IL-6, VEGF ekspresyon ve sekresyonunu da uyarmakta ve artmış VEGF salınımı kemik iliği stromal hücrelerinden IL-6 üretiminin artışına ve kemik iliğinde anjiogenezin oluşumuna yol

açmaktadır. Aynı zamanda artmış IL-6 düzeyi miyelom hücrelerinin migrasyonunu uyarmaktadır. Benzer tarzda kemik iliği stromal hücrelerinden salgılanan IGF-1 de miyelom hücrelerinde büyüme, sağkalım ve ilaç direncinde etkin rol oynamaktadır (21).

Kemik iliği stromal hücreleri ve miyelom hücrelerinden salgılanan TNF- $\alpha$  düzeyi MM kemik hastalığı olanlarda daha fazla olarak izlenmektedir. TNF- $\alpha$ , nükleer faktör kappa B (NF- $\kappa$ B)'yi uyararak miyelom hücrelerindeki bazı adezyon molekülleri ve ligandların ekspresyonunu artırmaktadır. Bu durum miyelom hücrelerinin kemik iliği stromal hücrelerine bağlanmasını artırmakta ve miyelom hücrelerini apoptotik uyarılara karşı koruyarak daha uzun yaşamasına neden olmaktadır (21,22).

Başlıca miyelom hücrelerinin çoğalmasını ve migrasyonunu uyaran stroma-kökenli faktör-1, aynı zamanda kemik iliği stromal hücrelerinde IL-6 ve VEGF salınımını artırarak, miyelom hücrelerinin ilik mikroçevresinde tutulmasını sağlar (21). Hastalığın erken evrelerinde miyelom hücreleri sağkalım ve çoğalma için kemik iliği mikroçevresine bağımlı olduğundan, bu durum miyelomda kemoterapiye dirence neden olmaktadır (epigenetik rezistans). Miyelom hücrelerindeki başlıca genetik değişiklikler kemik iliği mikroçevresinde olduğundan, stromadan bağımsız (ekstramedüller hastalık) kemoterapiye direnç (genetik rezistans) gelişerek, hastalığın transformasyonu oluşabilmektedir (23).

Antiapoptotik mekanizmalar mikroçevredeki sitokinler ve ligandlar tarafından uyarılabilmektedir. Antiapoptotik faktörlerle (bcl-XL, mcl-1, bcl-2) birlikte apoptoz inhibitörlerinin artışının yanında, FAS ve TNF aracılı miyelom hücreleri apoptozdan korunmaktadır (24,25).

### **2.1.5. Klinik Bulgular**

MM'de genellikle plazma hücrelerinin kemik ve diğer organları infiltre etmesine bağlı çeşitli semptom ve bulgular veya hafif zincir nefropatisi izlenmektedir. Hastalarda anemi, kemik ağrısı, artmış kreatinin düzeyleri, halsizlik ve güçsüzlük, hiperkalsemi, kilo kaybı, parestezi, hepatomegali, splenomegali, lenfadenopati ve ateş izlenebilmektedir. Plazma hücre infiltrasyonuna bağlı plevral effüzyon ve diffüz pulmoner tutulum çok nadir görülür (8).

Hastalarda kemik iliği infiltrasyonu, böbrek yetmezliği, artmış sitokinlere bağlı hematopoezin inhibisyonu ve/veya geniş M-proteinlerinin dilüsyona bağlı olarak sıklıkla normokrom normositik anemi, daha nadiren makrositer anemi izlenmektedir (8,26).

MM'de sıklıkla kemik oluşumu ve rezorpsiyonu arasındaki normal dengenin bozulmasına bağlı olarak kemik kaybıyla sonuçlanan iskelet lezyonları gelişebilmektedir (27). Bu durum osteopeni, fokal litik lezyonlar, patolojik kırıklar, hiperkalsemi ve kemik ağrısı gibi klinik bulgularla sonuçlanmaktadır. Tanıda konvansiyonel grafiler hastaların büyük çoğunluğunda patognomiktir. Kemik ağrıları çoğunlukla gündüzleri, genellikle göğüs, sırt ve belde, nadiren ekstremitelerde saptanır ve hareketle şiddeti artmaktadır (8). Osteoporoz, patolojik kırıklar veya vertebral kompresyon kırıkları görülebilir ve bu duruma hiperkalsemi eşlik edebilir (8,28). Bu komplikasyonlar, MM'deki morbidite ve mortalitenin ana nedenlerini oluşturmaktadır (28).

Hastaların yaklaşık yarısında tanı anında serum kreatinin düzeyleri yüksek saptanır. Bazen böbrek yetmezliği miyelomun başlangıç bulgusu olabilmektedir (8,29). Böbrek yetmezliği gelişiminin en önemli iki nedeni miyelom böbreği ve hiperkalsemidir. Miyelom böbreği, distal ve toplayıcı tübüllerde biriken monoklonal hafif zincirlerden oluşan geniş, mumsu, katmanlı silendir (cast)'lerin varlığı ile karakterizedir. Hafif zincir sekrete etmeyen hastalar genellikle miyeloma böbreği için risk oluşturmazlar. Ayrıca amiloidoz, hafif zincir depolanma hastalığı, ilaçlara bağlı renal hasarlar, kontras nefropatisi ve hafif zincirlerin proksimal tübül disfonksiyonu sonucu oluşan Fanconi sendromu böbrek yetmezliğine yol açabilmektedir (8,29). MM'de diğer önemli renal yetmezlik nedeni olan hiperkalsemi ise tanı anında hastaların yaklaşık 1/3'ünde mevcut olup, daha az oranda hastada ise serum kalsiyum seviyesi 11 mg/dL'nin üzerindedir. Hiperkalsemiye bağlı olarak hastalarda anoreksi, bulantı, kusma, poliüri, polidipsi, konstipasyon, halsizlik, konfüzyon ve koma gibi semptomlar gelişebilmektedir.

Radikülopati hastalarda en sık saptanan nörolojik komplikasyondur. Ekstramedüller plazmositom veya kompresyon kırığı nedeniyle spinal kord basısı görülebilmektedir. Ciddi bel ağrısı, üst ekstremitede kuvvet kaybı veya parestezisi, inkontinas veya mesane disfonksiyonu olan hastalar kalıcı hasar gelişmeden acil kemoterapi, radyoterapi veya nöroşirurjik müdahale gerekliliği açısından manyetik rezonans görüntüleme veya bilgisayarlı tomografi ile spinal kord basısı yönünden değerlendirilmelidir. Genellikle

amiloidoza bağlı olarak gelişen periferik nöropati MM'de daha nadir görülmektedir. İntrakranial plazmositomlar ve leptomeningeal miyelomatosıs görülmeye sıklığı az olmakla birlikte, saptandığında tedaviye rağmen kötü prognoza neden olmaktadır (8,30).

MM'da %10 oranında izlenen erken ölüm riski çoğunlukla immün sistem fonksiyonlarındaki bozukluğa bağlı bakteriyel enfeksiyonlarla ilişkilidir (31). İmmün yetmezlik normal plazma hücre fonksiyonunun baskılanmasına bağlı olarak antikor oluşumunun bozulması, hipogammaglobulinemi ve azalmış lenfosit fonksiyonu sonucu oluşmaktadır. Kosta ve spinal vertebralarda oluşan patolojik kırıklara ve ağrılara bağlı hipoventilasyon gelişmesi enfeksiyon gelişimi için uygun bir ortam sağlar. Ayrıca tedaviye bağlı nötropeni veya kullanılan steroid tedavide enfeksiyonlara yatkınlığı artırır.

### **2.1.6. Multipl Miyelom Tanısı ve Tanı Kriterleri**

Serum proteini artışı, idrar ve serumda monoklonal protein varlığı, açıklanamayan anemi, grafilerde saptanan litik lezyonlar, hiperkalsemi ve akut böbrek yetmezliği gibi bulguların varlığında MM düşünülerek tanısız değerlendirilme yapılmalıdır (Tablo 1-3).

**Tablo 1. Durie-Salmon Tanı Kriterleri**

**Önemi Bilinmeyen Monoklonal Gammopati (MGUS)**

M proteini var, ancak MM'den daha düşük düzeyde  
İlikte plazma hücre oranı < % 10  
Litik kemik lezyonları yok  
Miyelom semptomları yok

**“Smoldering” (Sessiz) Miyelom** (Aşağıdakiler hariç MGUS gibi)

“İndolent” miyelom kriterlerine ek olarak aşağıdaki kısıtlamalar:

- 1-İlikte plazma hücre oranı %10-30
- 2-Kemik lezyonu yok

**“İndolent” (Yavaş Sevirli) Miyelom**

Miyelom tanı kriterleri mevcut, ancak aşağıdaki koşullar var:

- 1-Litik lezyonlar <4 adet, kompresyon kırığı yok
- 2-Monoklonal bant Ig G < 7, Ig A < 5 g/dL
- 3-Karnofsky > % 70, Hb > 10 g/dL, kalsiyum normal, kreatinin < 3 mg/dL, infeksiyon yok

**Multipl Miyelom**

*Major Kriterler:*

- İlikte plazmositoz (> % 30)  
Biyopside plazmositom  
M komponenti:  
1-Serum Ig G > 3,5 g/dL, Ig A > 2 g/dL veya  
2-İdrar : > 1 g/24 saat Bence-Jones proteini

*Minör Kriterler:*

- İlikte plazmositoz (% 10-30)  
M komponenti var, ancak daha düşük düzeyde  
Litik kemik lezyonları  
Azalmış normal Ig düzeyleri (normalin < % 50'si)  
-Ig G < 600 mg/dL YA DA  
-Ig A < 100 mg/dL YA DA  
-Ig M < 50 mg/dL

**Tanı için 1 majör + 1 minör ya da 3 minör kriter (ilk ikisi şart) gerekli**

**Tablo 2.** Sistemik Tedavi Gerektiren Aktif Multiple Miyelom Tanı Kriterleri (32)

(IMWG-Uluslar arası Miyeloma Çalışma Grubu Kriterleri esas alınmıştır.)

**Serum ve/veya idrarda M proteini<sup>a</sup> ve İlikte klonal plazma hücreleri ve/veya dökümente edilmiş klonal plazmasitom**

**ve**

**Aşağıdakilerden bir ya da fazlası<sup>b</sup>**

Hiperkalsemi (>11,5 mg/dL-> 2,65 mmol/L)

Renal Yetersizlik (Kreatinin> 2 mg/dL-> 177 mmol/L)

Anemi (Hemoglobin < 10 g/dL ya da normalden 2 g/dl düşük)

Kemik hastalığı (litik lezyonlar ya da osteopeni)

<sup>a</sup> Ölçülebilir M komponenti olmayan hastalarda anormal serum serbest hafif zincir oranı bu kriterin yerine kullanılabilir. Serum ya da idrar M komponenti olmayan ve serum serbest hafif zincir oranı normal olan hastalarda bazal kemik iliği  $\geq$  %10 klonal plazma hücresi içermelidir. Bu hastalar non-sekretuar miyelom olarak adlandırılır.

<sup>b</sup> Aktif MM tanısı için bir eşik plazma hücresi ya da paraprotein düzeyi belirlenmiştir. Buna karşılık “smoldering” (asemptomatik) multipl miyelom ilikte  $\geq$  %10 plazma hücresi ve/veya  $\geq$  3 g/dL serum paraprotein düzeyi olması ve yukarıda belirtilen CRAB (Calcium, Renal, Anemia, Bone) bulgularının olmaması olarak tanımlanmıştır. MGUS‘nin ilikte < %10 plazma hücresi (ve biyopside düşük düzeyde infiltrasyon), serumda <3 g/dLparaprotein, başka bir B lenfoproliferatif hastalık olmaması ve bulgu/organ bozukluğu olmaması gerekli görülmüştür.

**Tablo 3.** Multipl Miyelom tanısında laboratuvar

**M Proteini Saptanan Hastalarda Değerlenme**

- 1.Şüpheli semptom sorgulama-Fizik inceleme
- 2.Serum-İdrar protein çalışmaları (Serum protein elektroforezi ve immunfiksasyonu, serum hafif zincir oranı, idrar protein elektroforezi ve immunfiksasyonu)
- 3.Tam kan sayımı
- 4.Kreatinin
- 5.Kalsiyum
- 6.Albumin
- 7.İskelet tarama
- 8.Kemik iliği aspirasyon ve biyopsisi

**Diğer Radyolojik/Histolojik Değerlendirmeler (Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG), Bilgisayarlı Tomografi (BT), Amiloid Boyama, vb.) gereken durumlar**

MM olma olasılığı bekleniyorsa Ig G, A, M,  $\beta_2$ -mikroglobulin ( $\beta_2$ -MG) ve Laktat dehidrogenaz (LDH)

Lenfoproliferatif hastalık şüphesi gösteren semptom/muayene bulguları ya da >1 g/dL Ig M paraprotein varsa BT

Amiloidoz şüphesi varlığında kalp yetmezliği, nefrotik sendrom, nöropati gibi hallerde doku biyopsileri-özel boyamalar

Omurga ağrıları/nörolojik bası semptomları varsa MRG

### 2.1.7. Evreleme ve Risk Sınıflaması

Durie-Salmon evreleme sistemi tümör yükünün tespiti için pratik bir yöntem olup uzun süredir standart evreleme sistemi olarak kullanılmaktadır (Tablo 4) (33). Ancak litik kemik lezyonlarının belirlenmesi objektif değildir. Bu nedenle  $\beta_2$ -mikroglobulin ve albüminin parametre olarak kullanıldığı daha basit bir prognostik sistem olan Uluslararası Evreleme Sistemi (International Staging System/ISS) önerilmiştir (Tablo 5) (34). Bu evreleme sistemleri prognoz açısından bilgi vermekle birlikte, tedavi için risk belirleyici olması açısından yeterli değildir. Genetik özelliklere ve plazma hücresi proliferasyon hızına göre Mayo Clinic Grubu miyeloma risk gruplarını tanımlamıştır (35). Burada plazma hücre floresan insitu hibridizasyon (FISH), metafaz sitogenetiği ve plazma hücre proliferasyon indeksi (plazma cell labeling index / PCLI) sonuçları ile risk grupları belirlenmektedir (Tablo 6).

**Tablo 4.** Durie-Salmon Evreleme Sistemi (33)

<b>EVRE</b>	<b>KRİTERLER</b>
<b>I</b>	Aşağıdakilerin hepsi Hb>10 g/dL Serum kalsiyum normal Normal kemik tarama (osteoporoz dahil) M-komponenti düzeyi düşük Ig G < 5 g/dL Ig A < 3 g/dL İdrar hafif zinciri < 4 g/24 saat
<b>II</b>	I ve III'e uymayanlar
<b>III</b>	Aşağıdakilerin 1 veya daha fazlası Hb< 8,5 g/dL Serum kalsiyum artmış Yaygın iskelet hasarı (>3 litik lezyon) veya kırık M-komponenti düzeyi yüksek Ig G > 7 g/dL Ig A > 5 g/dL İdrar hafif zinciri > 12 g/24 saat
A: Serum kreatinin< 2 mg/dL                      B: Serum Kreatinin $\geq$ 2 mg/dL	



**Tablo 5.** Uluslararası Evreleme Sistemi (International Staging System) (34)

<b>Evre</b>	<b>B<sub>2</sub>-MG (mg/dL)</b>	<b>Albumin (g/dL)</b>	<b>Sağkalım (ay)</b>
<b>Evre 1</b>	< 3,5	> 3,5	62
<b>Evre 2</b>	< 3,5 veya 3,5-5,5	< 3,5 -----	44
<b>Evre 3</b>	>5,5		29

**Tablo 6.** MAYO Yeni Tanı Miyelomlu Hastalarda Risk Sınıflaması: mSMART:  
Aktif Miyelom Sınıflaması (35)

<b>Yüksek risk</b>	<b>Orta risk<sup>1</sup></b>	<b>Standart risk<sup>1,2</sup></b>
<b>-FISH</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Del 17p</li><li>▪ t(14;16)</li><li>▪ t(14;20)</li></ul> <b>-Gen Ekspresyon Profili (GEP)</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Yüksek Risk</li></ul> <b>Belirteçleri</b>	<b>-FISH</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ t(14;13)<sup>3</sup></li></ul> <b>-Sitogenetik delesyon 13 veya hipodiploidi</b> <b>-PCLI ≥ 3 %</b>	<b>-Aşağıdakilerin tümü:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Hiperdiploidi</li><li>▪ t(11;14)<sup>4</sup></li><li>▪ t(6;14)</li></ul>

<sup>1</sup> Bu grupta bazı hastalar yüksek risk belirteçleri taşıyan GEP mevcutsa yüksek risk grubunda sınıflandırılabilir.  
<sup>2</sup> LDH normalin üstünde ve B<sub>2</sub>-MG ≥ 5,5 mg/dL ise kötü prognozu işaret eder.  
<sup>3</sup> Anemi ve yüksek B<sub>2</sub>-MG seviyeleri eşlik ediyorsa prognoz kötüdür.  
<sup>4</sup> Plazma hücreli lösemi ile ilişkili olabilir.

Miyelom tanısı konan bütün hastalarda metafaz sitogenetik, FISH ve mümkünse PCLI ile risk sınıflaması yapılmalıdır. Standart risk grubunda ek risk değerlendirmede β2-MG, LDH ve albümin (ISS için) gibi diğer laboratuvar parametreleri de katkıda bulunmaktadır (35).

### 2.1.8. Tedavi

MM tedaviye rağmen hızlı progresyon izlenebilen veya hiç tedavi edilmeden yıllarca stabil seyredabilen oldukça heterojen bir hastalıktır. Dolayısıyla da tedavi endikasyonu ve seçimi için çeşitli parametreler kullanılmaktadır. Hastalara tanı konulduğunda öncelikli olarak evreleme yapılmalıdır. Ancak evreleme prognoz hakkında bilgi vermekle beraber tedavi seçimleri hakkında yeterli olamamaktadır. Aktif MM tanı kriterlerini (Tablo 2) karşılayan hastalara tedavi başlanmalıdır. Ayrıca tedavi planlanırken konvansiyonel sitogenetik ve FISH yöntemleri ile risk değerlendirilmesi yapılmalıdır (mSMART Aktif miyelomda risk sınıflaması-Tablo 6). Otolog kök hücre destekli yüksek doz melfalan (YDM) tedavisi, indüksiyon tedavisi sonrası 65 yaşın altında ve 65 yaş üzerindeki performansı iyi olan bazı hastalar için standart tedavi yaklaşımıdır. Son yıllarda otolog kök hücre nakline uygun hastaların başlangıç tedavisinde immünmodülatuar ilaçların (IMiDs) ve proteozom inhibitörlerinin (bortezomib) kullanılmasıyla MM'li hastaların yaşam süresinde belirgin olarak uzama izlenmiştir (36,37). Tedavide 65 yaş altı uygun hastalara bortezomib-lenalidomid-deksametazon içeren tedavi rejimleri sonrası otolog kök hücre nakli (OKHN) önerilmekte olup, OKHN sonrası hastalığın remisyon durumuna veya riskine bağlı olarak bortezomib veya lenalidomid içeren rejimler ile idame tedaviler etkin bir remisyon sağlayabilmektedir (38). OKHN için uygun olmayan veya 65 yaş üstü hastalarda ise tedavi hastalığın klinik bulguları ve tedaviyle sağlanan remisyon durumuyla uyumlu olarak düzenlenmelidir. Hastalık tedavi yanıt kriterleri Tablo 7'de tanımlanmıştır.

**Tablo 7.** International Miyeloma Working Group Yanıt Kriterleri (39)

Tam Yanıt (TY)	İmmünoфикsasyon yöntemi ile serum ve idrarda M protein olmamalı Plazmasitom olmamalı Kemik iliğinde plazma hücre oranı $\leq$ % 5 olmalı
Çok iyi parsiyel yanıt (ÇİPY)	İmmünoфикsasyon yöntemi ile serum ve idrarda M protein görülebilir fakat Elektroforez yöntemi ile serum M proteini olmamalı ya da $>$ % 90 azalma olmalı 24 saatlik idrar M protein seviyesi $<$ 100 mg olmalı
Parsiyel Yanıt (PY)	Serumda M protein düzeyi % 50'den fazla azalmalı ve 24 saatlik idrar M proteini % 90'dan fazla azalmalı ya da 24 saatlik idrar M proteini $<$ 200 mg olmalı Serum ya da idrarda M protein ölçülemiyorsa, hafif zincir seviyesinde % 50'den fazla azalma olmalı Serum ya da idrarda M protein ve hafif zincir seviyesi ölçülemiyorsa, kemik iliğinde plazma hücre oranında % 50'den fazla azalma olmalı Yukarıdakilere ek olarak eğer bazal değeri mevcutsa plazmasitom çapında % 50'den fazla azalma olmalı
Stabil hastalık (SH)	Tam yanıt, parsiyel yanıt ve progresif hastalık kriterleri olmamalı
Progresif hastalık (PH)	Aşağıda belirtilen kriterlerden bir veya daha fazlası olmalı Serum M protein bazal değerinden % 25'den fazla artış olmalı ve/veya 0.5 g/dl'den fazla artış olmalı İdrar M protein bazal değerinden % 25'den fazla artış olmalı ve/veya 24 saatlik idrarda 200 mg'dan fazla artış olmalı Serum ve idrar M protein seviyesi ölçülemiyorsa, hafif zincir seviyesinde 100 mg'dan fazla artış olmalı Kemik iliği plazma hücre oranında % 10'dan fazla artış olmalı Yeni kemik lezyonu, plazmasitom varlığı ya da mevcut kemik lezyonu, plazmasitomda artış olmalı Hiperkalsemi varlığı

## 2.2. MM'de Kemik Hastalığı ve Patogenez

### 2.2.1 Miyelom Kemik Hastalığında Osteolitik Kemik hasarı, OPG/RANK ve RANKL Sinyal Sistemi

Normal şartlar altında kemikte osteoklastlar aracılığıyla oluşan kemik rezorpsiyonuna karşın osteoblastlar tarafından kemik yapımıyla sürekli olarak yeni bir yapılanma olmaktadır. Monosit/makrofaj seri öncülü hücrelerden gelişen osteoklastlar kemik rezorpsiyonunu sağlamak için aktif hale dönüşürler, takiben apoptozis ile ortamdan kaldırılırlar (40).

Osteoklast oluşumu ve aktivitesi hem lokal salınan sitokinler hem de sistemik hormonlar tarafından düzenlenmektedir. MM'de miyelom hücreleri, kemik iliği stroma hücreleri ve ilik mikroçevresinde bulunan T lenfositler gibi farklı hücre etkileşimleri kemik yıkımının oluşumunu etkilemektedir. Aynı zamanda kemik yıkım süreciyle salınan bazı büyüme faktörleri miyelom hücrelerinin büyüme ve çoğalmasını artırmaktadır (41). Bu durum ise miyelom tümör yükü artışı ile artmış kemik yıkımı arasında kısır bir döngü oluşturmaktadır.

Son yıllarda myeloma hücreleri tarafından üretilen RANK ve RANKL, MIP-1 $\alpha$ , IL-3 ve IL-6'nın kemik rezorpsiyonun gelişiminde oldukça önemli olduğu saptanmıştır (42-45).

RANK/RANKL sinyal yolağı kemik yapılanma sürecinde önemli bir yer almaktadır. RANK, hücre dışı kısmı 28 amino asitlik sinyal peptid, 21 amino asitlik kısa transmembran ve geniş sitoplazmik kısımları ile toplam 616 amino asitlik, tümör nekroz faktör ligand ailesi üyesi olan bir transmembran sinyal reseptörüdür (46). RANKL'ın osteoklast öncüllerine bağlanmasını sağlayan tek reseptördür. RANK, osteoklastogenez ve kalsiyum metabolizmasını kontrol etmekte ve bu sinyal reseptörü makrofaj/monositik hücreler, T ve B lenfositler, fibroblastlar, dendritik hücreler ile öncül ve olgun osteoklastların yüzeyinde bulunur (46-50). RANK protein sentezi normal meme bezi, kemik metastazı potansiyeli yüksek olan meme ve prostat kanseri gibi bazı kanser hücrelerinde de gösterilmiştir (51-53). Günümüze kadar RANKL geninde konjenital hastalığa sebep olan ve RANK delesyonu veya inhibisyonuna yol açan mutasyonlar insanlarda belirlenememiştir (48,54). Fakat RANK geninde mutasyon ile RANK'ın

aktivasyonu sonucu RANK sinyalinin artmasıyla ailesel ekspansil osteoliz (55) veya OPG genindeki mutasyonlar ile OPG'nin baskılanması sonucu RANK sinyalinin artmasıyla ailesel Paget hastalığı bildirilmiştir (56). Ayrıca, bazı ailesel Paget hastalarında RANK geninde saptanan aktive edici mutasyon, RANK aracılığıyla NF- $\kappa$ B sinyalinde artışa ve sonuç olarak da osteolize yol açabilmektedir (55).

RANKL, 40-45 kDa'luk membran bağlı hücresel ve 32 kDa'luk biyolojik olarak aktif, çözümlenir iki formdan oluşan toplam 317 amino asitlik bir peptiddir. TNF ligand ailesinin bir üyesidir. Normal ve patolojik durumlarda kemik rezorpsiyonunun oluşumunda anahtar role sahiptirler. Timus, lenf nodları ve akciğerde daha fazla olmak üzere dalak, kemik iliği ve osteoblastlarda sentezlenir. RANKL sentezi hormonlar (1,25-dihidroksi vitamin D3 gibi), büyüme faktörleri ve peptidler (TGF- $\beta$ 1, fibroblast büyüme faktörü-2 ve Paratiroid hormon ilişkili protein gibi), sitokinler (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-11 ve TNF $\alpha$  gibi) ve glukokortikoidler gibi pek çok faktör tarafından transkripsiyonel, translasyonel ve posttranslasyonel seviyelerde düzenlenmektedir. Ayrıca RANKL sentezi osteoblast/stromal hücrelerini, osteoklast oluşumu ve aktivasyonunu uyaran pek çok faktörlerle de uyarılmaktadır (49,54,57-59). RANKL preosteoklastların üzerindeki reseptörü RANK'e bağlanır ve onların osteoklastlara dönüşmesini uyarak kemik rezorpsiyonu oluşumunu sağlarken, aynı zamanda T lenfositler ve dendritik hücrelerin yüzeyinde bulunan reseptörleri aracılığıyla bu hücreleride uyarmaktadır (47,48,54,57-60). RANK'ın RANKL tarafından uyarılması ile c jun (Jun N-terminal kinaz=JNK), NF- $\kappa$ B ve serin/treonin kinaz Akt/protein kinaz B (PKB) yollarını içeren hücre içi sinyal uyarısı başlar. Bunun sonucunda öncül osteoklastlar olgun osteoklastlara farklılaşır, aktive olur ve canlılıklarını sürdürürler (54,57,61). RANKL'ın kemikteki temel görevi osteoklastların oluşumunu artırırken apoptoza gidişini engellemek ve bunun sonucunda kemik kaybı ve rezorpsiyonunu artırmaktır. T hücrelerinden de RANKL salgılanabilmektedir. Ancak T hücrelerinden salgılanan RANKL, uyarılmış osteoklastlardan c-fos yolu ile interferon- $\beta$  (INF- $\beta$ ) üretimini artırmaktadır. Bu durumda artan INF- $\beta$  ise, RANKL salınımını negatif yönde etkilemektedir (62,63).

RANKL, RANK'a bağlandıktan sonra oluşacak ilk sinyal tümör nekroz faktörü reseptörleri (TNFR) ilişkili faktör (TRAF)'lerin RANK'ın sitoplazmik kısmındaki kendine özgü bölüme bağlanmasıdır (64,65). TRAF2, TRAF5 ve TRAF6, RANK'a bağlanmasına rağmen sadece TRAF6 osteoklast aktivasyonu için gereklidir. Yapılan çalışmalarda sadece

TRAF6 eksik farede osteopetrozis geliştiği saptanmıştır (66). Pek çok adaptör molekül RANK'a bağlanarak TRAF'lar aracılığıyla uyarı iletebilmektedir. Adaptör moleküller ailesinin bir üyesi olan Grb-2 ilişkili bağlayıcı protein-2 de bunların arasında yer almaktadır. Bu protein, tirozin kalıntılarından fosforlanarak Src homolog-2 bölgelerini de içeren pek çok sinyal molekülünü uyarmaktadır. Yokluğunda osteoklast farklılaşmasında, kemik rezorpsiyonunda azalma ve sonuçta ciddi osteopetrozis meydana gelebilmektedir. Bu durum, RANKL ile uyarılan osteoklastojenezde Grb-2 ilişkili bağlayıcı protein-2'nin önemli bir rol oynadığını göstermektedir (67). RANKL/RANK kompleksi hücre içine alınarak lizozomlarda yıkılır (54). RANKL immun sistemi de etkilemektedir (57,59). Bazı malin tümörlerde tümör hücreleri tarafından RANKL ile beraber RANK da sentezlenebilmektedir (52). Ayrıca RANKL kemik metastazlarının patogenezinde de farklı mekanizmalarla etki göstermektedir. RANKL seviyelerindeki artış kemik yıkımında da artışa ve buna bağlı olarak tümör hücrelerinin yaşam sürelerini ve bölünmelerini hızlandıran büyüme faktörlerinin sentezlenmesine neden olmaktadır (68). Aynı zamanda kemik metastazının sık görüldüğü kanserlerde RANKL'ın kemoatraktan görevi gördüğü ve vaskülarizasyonu arttırdığı düşünülmektedir (68,69).

OPG, 8. kromozomun kısa kolunun 24.bölgesinde yer alan (8q24) "Tümör nekroz faktör reseptör süperfamily 11b" (TNFRSF11B) adı verilen ve diğer adı "osteoklastojenez inhibitör faktör" olan 5 ekzon bölgesinden oluşan gen tarafından kodlanmaktadır. Başlangıçta 401 amino asit olarak sentezlenen bir polipeptid olup 21 amino asitlik propeptid kısmı ayrıldıktan sonra 380 amino asitlik olgun protein oluşur. 60 kDa'luk monomerik ve 120 kDa'luk disülfid bağı içeren homodimerik, çözünür bir glikoprotein olarak hücre dışına salgılanır. OPG, TNFR süper ailesinin bir üyesi olup bu grubun diğer reseptörlerinden farklı olarak transmembran ve sitoplazmik kısımlar içermemektedir. OPG yedi yapısal bölgeden oluşmaktadır. N terminalinde TNFR-2 ve CD40 ile yakından ilişkili olan ve diğer TNFR ailesinin üyelerinin hücre dışındaki kısımlarının özelliklerine benzer özellik gösteren dört adet sisteinden zengin bölge vardır. OPG'nin 1. ve 4. bölgeleri osteoklastojenezi inhibe edici aktiviteye sahiptir. Proteinin 5. ve 6. bölgelerinin bulunduğu C-terminalinde ölüm bölgeleri bulunmaktadır. Bu tip ölüm bölgeleri TNFR-1, DR3, CD95/Fas ve TNF ilişkili apoptozisi indükleyen ligand (TRAIL) gibi apoptozis mediyatörlerinin sitoplazmik bölgesinde bulunurlar. OPG'nin 4., 5. ve 6. bölgelerinin apoptotik sinyalin iletimi ile ilişkili olduğu ve OPG'nin TRAIL'e bağlanarak TRAIL'le

indüklenen apoptozisi inhibe edebileceği belirtilmiştir. TRAIL de OPG'nin osteoklastojenezis üzerine olan inhibitor etkisini engelleyebilmektedir. Proteinin 7. bölgesinde heparin bağlayan bir kısım bulunmaktadır. OPG bir transmembran proteoglikanı olan sindekan-1'e heparin bağlayan bölgesi aracılığıyla heparin sülfat yan zincirleri ile bağlanarak hücre içine alınmakta ve en azından bir kısmı lizozomlar aracılığıyla yıkılmaktadır. OPG'nin heparin bağlayan bölgesi, RANKL bağlayan bölgesinden uzaktadır ve RANKL bağlanması veya kemik yıkımını inhibe edici etkisi ile ilişkili değildir. RANKL/OPG kompleksinin yıkımının da sindekan-1'e bağlanması aracılığıyla olabileceği belirtilmektedir (47,54,59,61,70). OPG, RANKL için yalancı reseptör görevi görmektedir. OPG osteoklastların yaptığı kemik yıkımını inhibe ederek, kemik resorpsiyonu azaltmakta ve kalsiyum düzeylerini düşürmektedir. Kemik dokuda RANK/RANKL'nin etkisinin tam karşısı etki göstermektedir. OPG, RANKL'a bağlanıp bir tuzak reseptör gibi fonksiyon görerek RANK'a bağlanmasını engellemektedir. Sonuç olarak osteoklast farklılaşması ve aktivasyonu inhibe olmakta ve RANKL ilişkili kemik rezorpsiyonu oluşturulamamaktadır (47,48,57,59-61,70).

OPG osteoblastlar haricinde kardiyovasküler sistem (kalp, arter ve venler), karaciğer, böbrek, beyin, dalak, akciğer ve kemik iliği gibi bir çok doku ile hematopoetik ve immün hücreler tarafından sentezlenebilmektedir (47,48,57,59). Transforme edici büyüme faktörü (TGF)- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-18, kemik morfojenetik proteinleri ve OPG mRNA seviyelerini artıran 17 $\beta$ -östradiol gibi pek çok peptid, hormon, sitokin ve ilaç tarafından OPG salgılanması düzenlenmektedir (60,61,70,71). Kemik yıkımında artışa neden olan glukokortikoidler, vasküler hastalık ve osteoporoza yatkınlık oluşturan siklosporin A, paratiroid hormon (PTH), prostaglandin E2 ve fibroblast büyüme faktörü-2 ise OPG sentezini inhibe etmektedir (60,61,70-73). OPG'nin sentezi aynı zamanda osteoblastlarda osteoblastik kemik oluşumunu da düzenleyen Wnt/ $\beta$ -katenin sinyali ile de düzenlenir (74).

Kemik iliği hücrelerinin sentezlediği OPG yaş ilerledikçe azalmaktadır (75). Kemik yüzeyine uygulanan gerilme kuvveti ise OPG mRNA sentezini artırmaktadır (76). Bu durumlar senil osteoporoz ve immobilizasyona bağlı kemik kaybı durumunda OPG'nin önemli bir mediyatör olduğunu göstermektedir. Renal osteodistrofi, romatoid artrit, primer bilier siroz, Cushing, HIV hastaları ve kemik metastazı olan prostat kanserlerinde OPG seviyelerinde artma, litik kemik lezyonu olan multipl miyelom hastalarında ise OPG

seviyelerinde azalma izlenmektedir (60,61,77).

MIP-1 $\alpha$ , MM'de osteoklast oluşumunun artışında rol oynayan diğer bir faktördür. MM hastalarının yaklaşık %70'inde artış izlenen bir kemokin olup, osteoklast oluşumunu ve dolayısıyla kemik yıkımını artırmaktadır. MIP-1 $\alpha$ , osteoklast oluşumunu RANKL'den bağımsız olarak artırırken aynı zamanda RANK ve IL-6 etkisini de artırmaktadır (78). Magrangeas ve arkadaşları yaptıkları çalışmada MIP-1 $\alpha$  geninin MM'deki kemik destrüksiyonu ile ilişkili en önemli gen profili olduğunu bildirmişlerdir. Abe ve arkadaşları da yüksek MIP-1 $\alpha$  seviyelerini MM'de kötü prognoz ile ilişkilendirmişlerdir (79). MIP-1 $\alpha$  ekspresyonu engellenmiş MM hücreleri immun yetmezlikli farelere enjekte edildiğinde veya MIP-1 $\alpha$  nötralizan antikorlarla tedavi edilen hayvanlarda tümör yükü ve kemik yıkımının azaldığı tespit edilmiştir (80,81). MIP-1 $\alpha$  aynı zamanda MM hücrelerinin kemik iliğinde yerleşmesinde de önemli bir rol oynamaktadır. MIP-1 $\alpha$  aynı zamanda MM hücrelerindeki  $\beta_1$  integrin ekspresyonunu uyararak MM hücreleri ve kemik iliği stromal hücreleri arasındaki adeziv etkileşimleri artırmaktadır.

RANKL ve MIP-1 $\alpha$ 'ya ek olarak IL-3 seviyeleri de MM hastalarının kemik iliği plazmasında normal popülasyona göre daha yüksek bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda IL-3 insan kemik iliği kültürlerinde osteoklast oluşumunu artırırken IL-3'e karşı blokan antikor varlığında bu etkinin engellendiği gösterilmiştir. Aynı zamanda IL-3, RANKL ve MIP-1 $\alpha$ 'nın osteoklast gelişimi ve büyümesindeki etkilerini arttırarak MM hücre büyümesine katkı sağlamaktadır (45).

MM hücreleri ve stromal hücreler arasında bağlantıların MM hücrelerinin kemik iliğinde yerleşerek büyümesinde ve kemik yıkımının oluşmasında önemli rolü olduğu yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir. NF- $\kappa$ B ve p38MAP-kinaz aktivasyonunun artması bu bağlantıların oluşmasını sağlamaktadır. p38MAP-kinaz inhibisyonu ile IL-6 ve VEGF üretiminde azalma olmakta ve MM hücreleri ile kemik iliği stromal hücreleri arasındaki adezyon azalmaktadır (82).

MM'deki intrensek değişikliklerde önemli rolü olan p62, bir çeşit bağdaştırıcı proteindir. p62'nin kendine özgü enzimatik aktivitesi olmamakla birlikte NF- $\kappa$ B sinyal yolağında önemli bir rol oynamaktadır. MM hücre büyümesi ve osteoklast oluşumuna etki eden multipl sinyal komplekslerinin (NF- $\kappa$ B, p38 MAPK ve JNK) oluşumu için ortam oluşturmaktadır. Ayrıca p62 proteini, hücre sinyal oluşumunda protein-protein



etkileşimlerinde de gereklidir (83). p62'nin MM'daki en önemli rolü stromal hücrelerden IL-6 üretimini artırarak, stromal hücreler tarafından sağlanan MM hücre büyümesini uyarmasıdır (84). TNF- $\alpha$  ve IL-6 ile artan RANKL ekspresyonu insan kemik iliği stromal hücrelerindeki p62 siRNA varlığında azalırken, normal osteoklast kültürlerinde p62<sup>-/-</sup> stromal hücreleri ile TNF- $\alpha$  ve IL-6'ya karşı osteoklastogenez cevabında bozulma görülmüş ve bu durumun miyeloma kemik hastalığı ile ilişkili olduğu düşünülmüştür.

### **2.2.2. Miyelom Kemik Hastalığında Osteoblast Etkisi**

MM'da osteoklastik aktivite artarken osteoblastik aktivitede belirgin olarak azalma olmaktadır. MM'de kemik yapım ile yıkımı arasındaki dengesinde kemik yıkımı lehine bozulma izlenmektedir. Miyelom hücreleri ile osteoblastlar arasındaki etkileşim ve TNF- $\alpha$  gibi çözünür sitokinlerin artmış serum seviyeleri nedeniyle osteoblastlarda apoptozis artışı olmaktadır (85). Bundan dolayı MM hastalarında alkalen fosfataz (ALP) ve osteokalsin gibi kemik yapımı belirteçlerinin serum seviyeleri düşük saptanmaktadır (86). Ayrıca MM'de kemik iliği stromal hücrelerinin osteoblastik farklılaşma kapasitesi de bozulmuştur.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda osteoblastik farklılaşmada rol alan sinyal yollarının tanımlanmasıyla MM'de osteoblastik aktivitenin azalması daha iyi anlaşılmıştır. Mezenkimal hücrelerden osteoblast farklılaşma ve oluşumu, Runx2 (runtrelated transcription factor 2)/Cbfa1 (core binding factor  $\alpha$ 1) adlı transkripsiyon faktörünün aktivitesi ve fonksiyonuna gereksinim duymaktadır (87). Osteoblast farklılaşmasında artmış Runx2/Cbfa1 aktivitesi önemli olmakla birlikte, hastalarda serum Runx2 protein seviyelerinin değişmediği ve aynı zamanda aşırı Runx2/Cbfa1 artışının ise kemik oluşumunu azalttığı gözlenmiştir (88).

MM'de Runx2/Cbfa1 aktivitesinde azalma izlenmektedir. Miyelom hücreleri ve osteoprogenitör hücreler birlikte kültüre edildiklerinde, MM hücreleri Runx2/Cbfa1 aktivitesini azaltarak osteoblast farklılaşmasını engellemekte ve erken osteoblast öncülleriyle farklılaşmış öncüllerde azalmaya yol açmaktadırlar (89). RANKL'in tuzak reseptörü olan OPG sekresyonunu arttırarak osteoblastogenezini arttıran Runx2/Cbfa1 yolağı, MM'de baskılanmakta ve dolayısıyla osteoklast oluşumunu engelleyen bir proteini olan OPG'nin de azalmasına neden olmaktadır (90).

MM'de osteoblast fonksiyonlarının bozulmasında IL-3, IL-7 ve TNF- $\alpha$  gibi sitokinlerin de etkisinin olduğu bilinmektedir. IL-3 miyeloma kemik hastalığında osteoklastların oluşumu ve aktivasyonu sağlarken aynı zamanda osteoblastların oluşumunu da indirekt olarak engellemektedir (91). Benzer şekilde MM hastalarının kemik iliği plazmasında artmış IL-7 düzeyi, RunX2 aktivitesinin de etkilendiği farklı yollarla osteoblast oluşumunda azalmaya yol açmaktadır (89,92,93). İnflamatuvar bir sitokin olan TNF- $\alpha$  MM hastalarında kemik iliği mikroçevresinde artmakta ve apoptotik yolları uyarmaktadır (94,95). Ayrıca TNF- $\alpha$ , matriks protein genlerinin ekspresyonunu engelleyerek, RANKL gibi osteoklast oluşumunu arttıran genlerin ekspresyonunu artırarak öncül hücrelerden osteoblast oluşumunu da engeller (96). Bunlarla birlikte, TNF- $\alpha$ , osteoblast farklılaşmasında Runx2, TAZ (bir çeşit Runx2 koaktivatörü) ve Osx gibi önemli farklılaşma faktörlerinin salgılanmasını da azaltır (95,97,98).

Bir diğer sinyal sistemi olan Wnt sinyal yolağı kemik yapımı dışında B lenfositlerin ve plazma hücrelerinin aktivitesinde oldukça önemlidir (99). İmmatür osteoblastik hücrelerin ve öncüllerinin çoğalma, büyüme ve farklılaşmasında etkilidir (100). Ayrıca osteoblastlarda artmış Wnt sinyali OPG salgılanmasını artırırken RANKL ekspresyonunu azaltmaktadır (101,102).

### **2.2.3. Multipl Miyelomda OPG/RANK/RANKL Sinyal Sisteminin Etkisi**

Miyeloma hücrelerinin RANKL ekspresyonunu artırdığı, OPG ekspresyonunu ise azalttığı hücre kültür çalışmalarında gösterilmiştir (103). MM hastalarından alınan kemik iliği biyopsilerinde de RANKL ekspresyonun da arttığı ve bu artışın miyelom hücreleriyle etkilenen stromal hücreler, osteoblastlar ve aktive T-lenfositler tarafından sağlandığı izlenmiştir (104). Ancak bazı çalışmalarda miyelom hücrelerinde RANKL ekspresyonu olduğu belirtilmiştir (105). Buna karşılık miyeloma hücreleri ile kemik iliği stromal hücreleri arasındaki etkileşim hem transkripsiyonel hem de post-translasyonel aşamalarda OPG mRNA ve protein seviyelerini azaltmakta ve sonuç olarak OPG düzeyi belirgin olarak azalmaktadır (103). Ayrıca miyelom hücreleri Sindekan-1'i lizozomal kompartmanda azaltarak OPG seviyelerinin düşmesine neden olmaktadır (106). Sonuç olarak RANKL/OPG dengesi miyelom kemik hastalığının oluşumunda ve yaygınlığında oldukça önemli olup, patogeneizde etkin rol oynamaktadır (107).

### 3. MATERYAL ve METOD

Çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalında yapıldı ve Bilimsel Araştırmalar Değerlendirme Komisyonu Etik Kurulu tarafından onaylandı (21.02.2011 tarih ve 2011/19 sayılı dosya numaralı).

Çalışmaya, Ocak 2010-Ocak 2012 tarihleri arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji bilim dalına başvuran 52 MM hastası alındı. 36 hastada direkt grafi, bilgisayarlı tomografi veya manyetik rezonans görüntüleme ile saptanan patolojik kırık ve/veya destrüktif kemik lezyonu mevcuttu. 16 hastada ise kemik lezyonu saptanmadı. Patolojik kırık ve/veya destrüktif kemik lezyonu olan hastaların 14'ü kadın, 22'si erkek, patolojik kırık ve/veya destrüktif kemik lezyon saptanmayan hastaların 6'sı kadın, 10'u erkek idi. Hastaların yaş ortalaması  $62\pm 9$  olup, patolojik kırık ve/veya destrüktif kemik lezyonu olan erkek hastaların  $62\pm 8$ , kadın hastaların  $58\pm 10$ , patolojik kırık ve/veya destrüktif kemik lezyonu olmayan erkek hastaların  $62\pm 9$ , kadın hastaların ise  $66\pm 10$  idi. Kontrol grubu olarak benzer yaş ve cinsiyette 20 sağlıklı kişi çalışmaya alındı (Tablo 8).

**Tablo 8.** Hasta özellikleri

	Patolojik kırık ve/veya destrüktif kemik lezyonu olanlar	Patolojik kırık ve/veya destrüktif kemik lezyonu olmayanlar	Kontrol
Hasta sayısı	36 (%)	16 (%)	20 (%)
Cinsiyet E/K	21 (58.3)/15 (41.6)	9 (56.2)/7 (43.7)	10 (50)/10 (50)
Yaş E/K	$62\pm 8/58\pm 10$	$62\pm 9/66\pm 10$	$55\pm 10/57\pm 8$

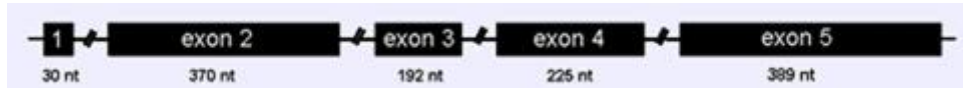
Patolojik kırık ve/veya destrüktif kemik lezyonu olan hastaların 16'sı Ig G kappa, 6'sı Ig G lambda, 5'i lambda hafif zincir, 2'si Ig A kappa, 2'si kappa hafif zincir, 2'si nonsekretuar, 1'i Ig M kappa ve 1'i Ig A lambda MM idi. Patolojik kırık ve/veya destrüktif kemik lezyonu saptanmayan hastaların 4'ü Ig G lambda, 3'ü Ig G kappa, 3'ü Ig A kapa, 3'ü kappa hafif zincir, 2'si Ig A lambda ve 1'i nonsekretuar MM idi (Tablo 9).

**Tablo 9** Patolojik kırık ve/veya destrüktif kemik lezyonu olan ve olmayan MM hastalarının cinsiyet ve M-proteinine göre dağılımı

	Patolojik kırık ve/veya destrüktif kemik lezyonu olan		Patolojik kırık ve/veya destrüktif kemik lezyonu olmayan		Toplam
	Kadın	Erkek	Kadın	Erkek	
Ig G Kappa	5	11	1	2	19
Ig G Lambda	2	4	2	2	10
Ig A kapa	2	0	1	2	5
Ig A Lambda	0	1	1	1	3
Ig M Kappa	1	0	0	0	1
Lambda hafif zincir	3	2	0	0	5
Kappa hafif zincir	1	1	1	2	5
Nonsekretuar	1	2	1	0	4
Toplam	21	15	9	7	52

### 3.1. Genomik DNA izolasyonu

Hastalardan aydınlatılmış onam formları alındıktan sonra, ETDA'lı periferik kan örneklerinden genomik DNA'ları (Qiagen Biorobot EZ1,USA, Seri No: 0510F1022) elde edildi. Elde edilen DNA'lar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. 8. kromozomun q kolu 24. bölgesinde yer alan ve 5 ekzon bölgesinden oluşan Osteoprotegerin geninin (TNFRSF11B)(Şekil 1) 5 ekzon bölgesinin de taranması planladı. Hastaların tümünün DNA'larının toplanmasından sonra TNFRSF11B geni dizi analizleri gerçekleştirildi. Hastaların yarısında gerçekleştirilen dizi analizlerinin ön sonuçlarında, 5 ekzondan sadece ekzon 1'de belirgin polimorfizm saptanması nedeniyle, kalan hastalarda ve kontrol grubunda aşağıda belirtilen yöntemle ekzon 1 analiz edildi ve istatistiksel değerlendirme yapıldı.



**Şekil 1.** TNFRSF11B geni düzeni

### 3.2. TNSFR11B geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile amplifikasyonu

TNSFR11B geni 2, 3, 4 ve 5 numaralı ekzonları Chong B. 2003’de verilen primerler ile çoğaltıldı. Primerlerin genin üzerindeki lokasyonları Human Genome Browser’den elde edilen dizide kontrol edildi. Ekzon 1 için ilgili yayında verilen primer çifti ekzonu tümüyle amplifiye etmediğinden, tüm ekzonun iki uçtan intronik diziler içerecek şekilde amplifiye olabilmesi için Primer3 programı (frodo.wi.mit.edu) kullanılarak bir çift primer yeniden dizayn edildi. Tüm ekzonlar primer çifti ile 5U/μl *Taq* polimeraz (Promega GoTaq Flexi, USA, Lot No: 27464705) enzimi, 25mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM dNTP (Promega, USA, Lot No:325473), su ve 30ng/ μl DNA içeren 5X enzim buffer solüsyonu içerisinde tablo 10’da verilen koşullarda 34 döngüde termal döngü cihazında (Corbett Research, Seri No: C030410) çoğaltıldı. Tüm primerlerin listesi tablo 11’de verildi.

**Tablo 10.** PCR koşulları

Başlangıç Denatürasyonu	94°C	6’
Denatürasyon	94°C	30’’
Bağlanma	56°C	1’
Uzama	72°C	1’
Son uzama	72°C	6’
Bekleme	4°C	∞

**Tablo 11.** Primerler

Ekzon	Primer	Amplikon
1	F GTT TCA GAA CCC GAA GTG AAG	839
	R AAC TTT GCA GCG TAA AAG GAC	
2	F TTC ATG CTA AGA TGA TGC CAC	561
	R TCC AGA CAC ATA GTA CCT ACC	
3	F AAC GAT TTG AGG AGA AGG TAC	300
	R TCA ACT CAG AGA GAG AGA TG	
4	F TAA GAC CAG CCA ACA GAA GCT TG	471
	R CAT ACA TGC AGT CTT GTT CCT GG	
5	F GGT GTC ACT TAA CTC CCT CTC	751
	R GAT AAC GAT CCA GAT CTG ACA G	

### 3.3. DNA Dizi Analizi

PCR reaksiyonu ile elde edilen ürünler Vivantis GF-1 nucleic acid extraction kiti (Vivantis, USA, Lot No:12144C) ile üretici firmanın önerdiği şekilde saflaştırıldı. Saflaştırılan ürünler agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kontrol edildi. Temizlenen PCR ürünleri sekans reaksiyonuna alındı (Beckman Coulter CEQ 8000, Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS), USA, Lot No: S410102). DTCS reaksiyonu 11 µl premix, temizlenmiş PCR ürünü 1µl primer (forward veya reverse) ve distile su içeren total 20 µl hacim için aşağıda belirtilen koşullarda gerçekleştirildi (Tablo 12).

**Tablo 12.** DTCS Reaksiyonu Koşulları

Başlangıç Denatürasyonu	94°C	2" (dk)	
Denatürasyon	96°C	20' (sn)	} 30 döngü
Bağlanma	55°C	20' (sn)	
Uzama	60°C	4" (dk)	
Bekleme	10°C	∞	

Sekans reaksiyonunu takiben ürünler, Sephadex G50 (Sigma, USA Lot No: 061M1277V) kolon temizleme sistemi kullanılarak arındırıldı ve cihaza yüklendi.

Cihazda kapiller elektroforez yöntemi için firmanın önerdiği protokollerden LFR-a kullanıldı. Sekans sonuçları cihazın kendi yazılımı ile analiz edilip, gözlenen değişiklikler Human Genome Browser'da kontrol edildi ( <http://genome.ucsc.edu/>).

### 3.4. İstatistiksel Analiz

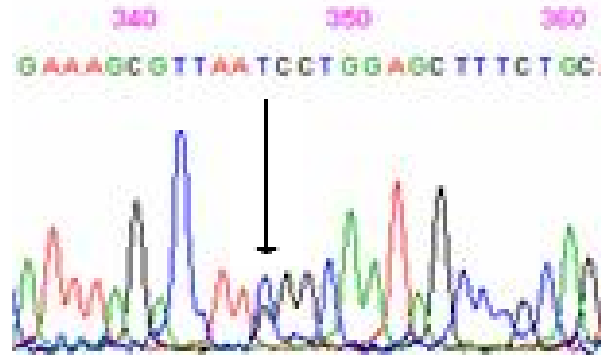
MM'li hastalarda destrüktif kemik lezyonları ve/veya patolojik kırıkların TNFRSF11B geni ekzon 1'de saptanan tek nükleotid polimorfizmler (TNP) ile ilişkisinin karşılaştırılmasında  $\chi^2$  testi kullanıldı. Ekzon 1'de saptanan TNP'lerin MM hastalarında sağkalıma etkisini değerlendirmesi ise Kaplan-Meier testi ile yapıldı. İstatistiksel karşılaştırmalarda Log Rank testi kullanıldı ve kantitatif veriler  $\chi^2$  testi ile analiz edildi. p değeri <0,05 olması anlamlı kabul edildi.

#### 4. BULGULAR

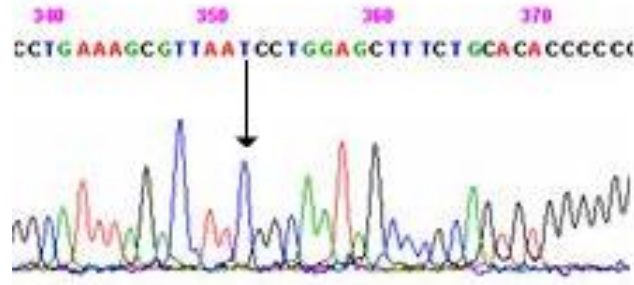
MM'li hastalarda DNA dizi analizi ile OPG gen mutasyonu izlenmezken, hastalarda tek nükleotid polimorfizmi (TNP) saptandı. Saptanan TNP'ler Şubat 2009 Genom Referans Konsorsiyumu (GRC) insan referans dizisine (GRCh37) göre <http://genome.cse.ucsc.edu> adresindeki veri bankasından kontrol edildi. Bulunan TNP'lerden Ekzon 1'de görülen değişimler, hasta ve kontrol grubunun DNA dizi analiziyle kontrol edilerek istatistiksel analiz yapıldı (Tablo 13). Ekzon 1'de izlenen değişimlerin kromatogramları tanımlandı (Şekil 2-5).

**Tablo 13.** DNA dizi analizi ile bulunan TNP'ler

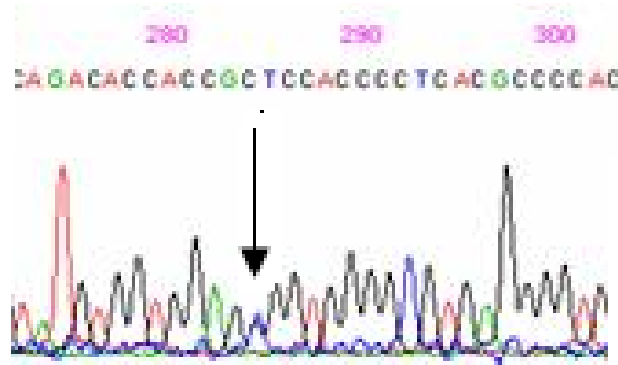
Gen Bölgesi	Referans TNP	Nükleotid Pozisyonu	Referans Nükleotid	Bulunan Nükleotid
Ekzon 1	rs11575929	119964344	C/G	T/A
Ekzon 1	rs2073618	119964052	C/G	G/C
Ekzon 1	rs2073617	119964283	C/G	T/A
Ekzon 2	rs14220380	119945384	A/T	G/C
Ekzon 4	rs2228568	119938782	A/T	G/C



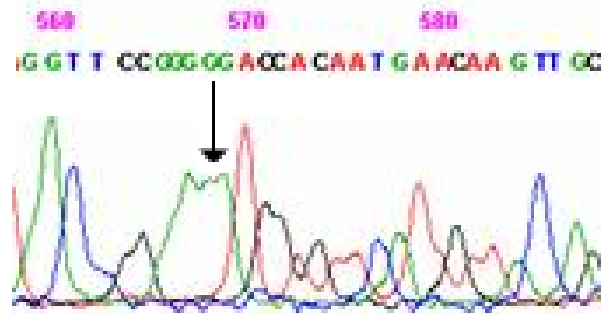
**Şekil 2.** rs2073617 C:T (Ekzon 1)



**Şekil 3.** rs2073617 T:T (Ekzon 1)



**Şekil 4.** rs11575929 C:T (Ekzon 1)



**Şekil 5.** rs2073618 G:G (Ekzon 1)

Hastalarda ve kontrol grubunda en sık izlenen TNP homozigot ve heterozigot rs2073617 C/T ve rs2073618 C/G olarak saptandı. rs2073617 TNP patolojik kırık ve/veya destrüktif kemik lezyonu olan 36 hastanın 13'ünde heterozigot, 20'sinde homozigot, patolojik kırık ve/veya destrüktif kemik lezyonu olmayan 20 hastanın 8'inde heterozigot, 4'ünde homozigot idi. rs2073618 TNP patolojik kırık ve/veya destrüktif kemik lezyonu



olan 1 hastada heterozigot, 17 hastada homozigot, patolojik kırık ve/veya destrüktif kemik lezyonu olmayan 4 hastada homozigot izlendi. rs11575929 TNP sadece patolojik kırık ve/veya destrüktif kemik lezyonu olan 1 hastada heterozigot olarak saptandı. Kontrol grubunda rs2073617 TNP 20 hastanın 9'unda heterozigot, 7'sinde homozigot, rs2073618 TNP'i ise 20 hastanın 5'inde homozigot bulundu. Kontrol grubunda rs11575929 TNP gözlenmedi. Homozigot rs2073617 C/T ve rs2073618 C/G TNP birlikteliği en fazla patolojik kırık ve/veya destrüktif kemik lezyonu olan hastalarda olduğu gözlemlendi (Tablo 14-16).

**Tablo 14.** DNA dizi analizi ile bulunan TNP'lerin kontrol grubu ve hasta gruplarındaki dağılım

	Patolojik kırık ve/veya destrüktif kemik lezyonu olanlar	Patolojik kırık ve/veya destrüktif kemik lezyonu olmayanlar	Kontrol
rs2073617 C/T homozigot (T:T) rs2073618 C/G homozigot (G:G)	13	2	3
rs2073617 C/T heterozigot (C:T)	8	6	7
rs2073617 C/T homozigot (T:T)	6	2	4
rs2073617 C/T heterozigot (C:T) rs2073618 C/G homozigot (G:G)	4	2	2
rs2073617 C/T homozigot (T:T) rs2073618 C/G heterozigot (C:G)	1	0	0
rs2073617 C/T heterozigot (C:T) rs11575929 C/T heterozigot(C:T)	1	0	0
rs2073617 C:C(normal) rs2073618 C:C(normal)	3	4	4
rs11575929 C:C (normal)			
<b>Toplam</b>	<b>36</b>	<b>16</b>	<b>20</b>

**Tablo 15.** Genotip Frekansları

	Patolojik kırık ve/veya destrüktif kemik lezyonu olanlar (36) (2xhasta sayısı *)	Patolojik kırık ve/veya destrüktif kemik lezyonu olmayanlar (16) (2xhasta sayısı *)	Kontrol (20) (2xhasta sayısı *)
rs2073617 C/T	C:13	C:8	C:9
	T:53	T:16	T:23
rs2073618 C/G	C:1	C:0	C:0
	G:35	G:8	G:10
rs11575929 C/T	C:1	C:0	C:0
	T:1	T:0	T:0

\* 2 Allel sayıldığı için hasta sayısının iki katıdır.

**Tablo 16.** Allel Frekansları

Tablo 16’da OPG geni 1. ekzonda yer alan TNP’leri taşıyan hastalardaki polimorfik allel ve normal allel frekansları verilmiştir.

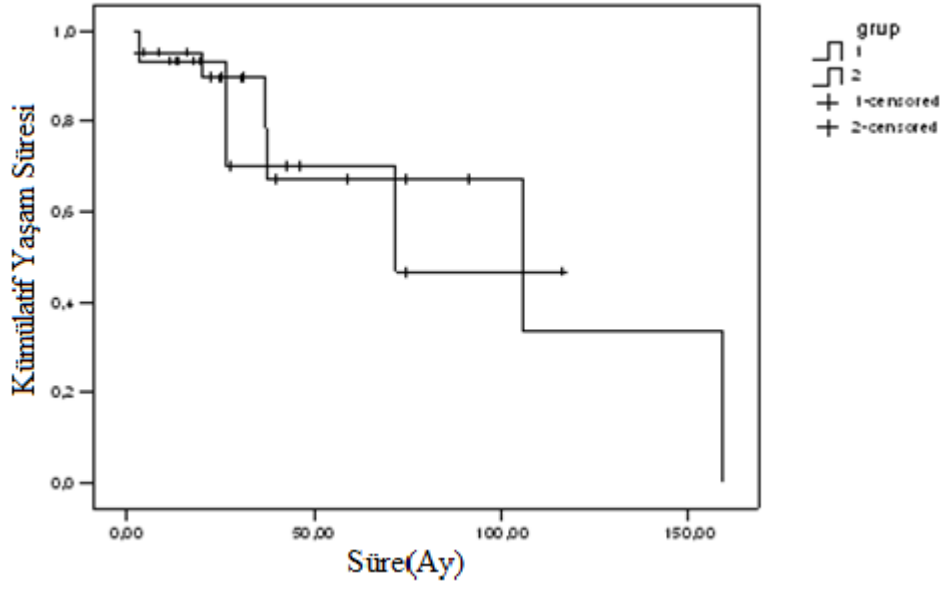
Referans TNP	Allel	Patolojik kırık ve/veya destrüktif kemik lezyonu olanlar	Patolojik kırık ve/veya destrüktif kemik lezyonu olmayanlar	Kontrol
rs2073617	C:C	3	4	4
	C:T	13	8	9
	T:T	20	4	7
rs2073618	C:C	18	12	15
	C:G	1	0	0
	G:G	17	4	5
rs11575929	C:C	35	16	20
	C:T	1	0	0
	T:T	0	0	0

Hasta ve kontrol grubunda ekzon 1’de saptanan TNP değerlendirildiğinde, en sık saptanan homozigot ve/veya heterozigot rs2073617 ve rs2073618 TNP’nin gerek hasta ile kontrol grubu arasında gerekse kemik lezyonu olan ve olmayan hastalar arasında farklı olmadığı saptandı. Buna karşılık homozigot rs2073617 ve rs2073618 TNP birlikteliğinin

kemik lezyonu olan hastalarda anlamlı olarak fazla olduğu izlendi ( $p<0,05$ ) (Tablo 17). Ancak homozigot rs2073617 ve rs2073618 TNP birlikteliğinin sağkalıma etkisine bakıldığında, homozigot her iki TNP olan hastaların yaşam süresi daha kısa olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 6).

**Tablo 17.** Ekzon 1’de saptanan TNP’lerin patolojik kırık ve/veya destrüktif kemik lezyonu olan ve olmayan hastalar ile kontrol grubunun karşılaştırılması, TNP’lerin MM’da kemik lezyonlarına etkisi

Referans TNP	Patolojik kırık ve/veya destrüktif kemik lezyonu olanlar (36)		Patolojik kırık ve/veya destrüktif kemik lezyonu olmayanlar (16)		Kontrol (20)		p
	Hasta sayısı	%	Hasta sayısı	%	Hasta sayısı	%	
	rs2073617 homozigot	20	55.6	4	25	7	
rs2073617 heterozigot	13	36.1	8	50	9	45	AD
rs2073618 homozigot	17	47.2	4	25	4	20	AD
rs2073618 heterozigot	1	2.8	0	0	0	0	AD
rs11575929 heterozigot	1	2.8	0	0	0	0	AD
rs2073617 homozigot	13	36.1	2	12.5	3	15	0.048
rs2073618 homozigot							
rs2073617 heterozigot	4	11.1	2	12.5	2	10	AD
rs2073618 homozigot							
rs2073617 homozigot	1	2.7	0	0	0	0	AD
rs2073618 heterozigot							
rs2073617 heterozigot	1	2.7	0	0	0	0	AD
rs11575929 heterozigot							



Şekil 6. Homozigot rs2073617 ve rs2073618 TNP birlikteliğinin sağkalıma etkisi.

## 5. TARTIŞMA

Monoklonal immunglobulin üreten malin bir plazma hücre hastalığı olan MM, en sık görülen hematolojik malin hastalıklardan biridir. MM’de artmış osteoklastik aktivite ve azalmış osteoblastik aktiviteye bağlı olarak morbidite ve mortaliteye neden olan kemik kaybıyla sonuçlanan iskelet lezyonları gelişebilmektedir (1,4).

Myeloma hücreleri tarafından üretilen RANK ve RANKL, MIP-1 $\alpha$ , IL-3 ve IL-6 kemik lezyonlarının oluşumunda oldukça önemlidir (1,2,3). RANKL’in osteoklast öncüllerine bağlanmasını sağlayan reseptör olan RANK’nin uyarılması sonucu osteoklastların aktive olmasını sağlayan RANK/RANKL sinyal yolağı kemik yapılanma sürecinde etkin rol almaktadır (46). RANK’ın RANKL tarafından uyarılması ile c jun, NF- $\kappa$ B ve serin/treonin kinaz Akt/protein kinaz B yolaklarını içeren hücre içi sinyal uyarısının başlaması, öncül osteoklastların olgun osteoklastlara farklılaşmasına, aktive olmasına ve canlılıklarını sürdürmesine yol açmaktadır (54,57,61). Wong ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, RANKL’nin RANK’a bağlandıktan sonra tümör nekroz faktörü reseptörleri ilişkili faktörleri (TRAF) uyarıldığı ve özellikle TRAF6’nın osteoklastların aktif hale gelmesinde etkin olduğu gösterilmiştir (64). Takip eden çalışmalarda TRAF6 eksik farelerde osteopetrozis gelişiminin gösterilmesi bu bulguları desteklemekteydi (66). Ayrıca RANK’a bağlanarak TRAF’lar aracılığıyla uyarı iletebilen Grb-2 ilişkili bağlayıcı protein-2, Src homolog-2 bölgelerini de içeren pek çok sinyal molekülünü uyarabilmektedir. Yokluğunda ise osteoklast farklılaşmasında, kemik rezorpsiyonunda azalma ve sonuçta ciddi osteopetrozis meydana gelebilmektedir (67). Günümüze kadar RANKL geninde konjenital hastalığa sebep olan ve RANK delesyonu veya inhibisyonuna yol açan mutasyonlar insanlarda bildirilmemiştir (48,54). Fakat Hughes AE. ve arkadaşları RANK’ın aktivasyonuna yol açan RANK genindeki mutasyon sonucu RANK sinyalinin artmasıyla ailesel ekspansil osteoliz vakası bildirmişlerdir (55). Ayrıca, bazı ailesel Paget hastalarında, RANK geninde saptanan aktive edici mutasyonun RANK aracılığıyla NF- $\kappa$ B sinyalinde artışa ve sonuç olarak osteolize yol açabileceği saptanmıştır (55).

OPG, RANKL’a bağlanıp onun RANK’a bağlanmasını engelleyerek osteoklastlarda RANK/RANKL sinyalinin oluşmamasına bağlı olarak kemik yıkımının azalmasını sağlarken, litik kemik lezyonu olan MM hastalarında serum OPG seviyeleri

düşük olarak izlenmektedir (60,61). Ancak, OPG'nin 4., 5. ve 6. bölgelerinin apoptotik sinyalin iletimi ile ilişkili olduğu ve OPG'nin TRAIL'e bağlanarak TRAIL'le indüklenen apoptozisi inhibe edebileceği ve TRAIL'in de OPG'nin osteoklastojenezis üzerine olan inhibitor etkisini engelleyebileceği de belirtilmektedir (59,61,70). Yapılan çalışmalarda, OPG'nin yaş ilerledikçe azaldığı, buna karşın kemik yüzeyine uygulanan gerilme kuvvetiyle OPG mRNA sentezinin arttığı gözlenmiş ve sonuçta OPG'nin senil osteoporoz ve immobilizasyona bağlı kemik kaybı durumunda önemli olduğu bildirilmiştir (75,76). Whyte MP. ve arkadaşları OPG genindeki mutasyon sonucu OPG sentezinin baskılanmasına bağlı olarak RANK sinyalinin artışına bağlı ailesel Paget hastalığı tanımlamışlardır (56).

Osteoklast farklılaşmasının engellenmesinde önemli rolü olan OPG'yi kodlayan gendeki transkript faktörlerin bağlanma bölgesinde gelişen polimorfizm kemikteki yapılanmayı etkileyerek kemik yoğunluğunda azalma veya osteoporoz gelişimine neden olabilmektedir (108). Ayrıca OPG gen polimorfizmlerinin kardiovasküler hastalık riskini artırdığı, prostat kanserli hastalarda progresyonu hızlandırdığı ve bisposfonat kullanan hastalarda çene nekrozonu kolaylaştırdığı da belirtilmektedir (109-113). Erkek hastalarda RANKL/RANK/OPG sinyal yolağındaki genetik değişimlerin kemik döngüsü ve kemik mineral yoğunluğuna etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, rs2073618 polimorfizminin kemik yıkım belirteçlerinde artışa, lomber vertebral kemik yoğunluğunda azalmaya yol açtığı saptanmıştır (114). Soufi M. ve arkadaşları rs2073617 ve rs2073618 OPG gen polimorfizminin destrüktif kemik lezyonları ve/veya patolojik kırıklara yatkınlık oluşturmasının yanında erkek hastalarda koroner arter hastalığı gelişimine de neden olabileceğini belirtmişlerdir (115). Geniş kapsamlı bir meta-analizde (GWAS) rs10505348, rs2073617 ve rs2073618 içeren OPG TNP'nin kemik yoğunluğunda azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (108). Cundy T. ve arkadaşları ise yakın akraba olan ve OPG'yi kodlayan TNFRSF11B geni 3.ekzon bölgesinde heterozigot mutasyonlu anne ve babanın üç çocuğunda homozigot mutasyon izlendiğini ve çocukların hepsinde uzun kemiklerde deformite, kifoz, asetebular protrüzyon ile seyreden idiyopatik hiperfosfatazya geliştiğini bildirmişlerdir (116). Prostat kanserli hastalarda rs2073617 polimorfizminin, CC genotipinin erken evre hastalarda TT ve TC genotipinin ise ileri evre hastalarda daha fazla olduğu saptanmış ve bu durum hastalık progresyonu ile ilişkilendirilmiştir (110). Huang H. ve arkadaşları da OPG rs2073618 TNP'i GG genotipinin GC ve CC genotipine göre

ankilozan spondilitin daha erken yaşta ortaya çıkması ile ilişkili olduğunu saptamışlardır (117).

Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak çalışmaya alınan hastalarda OPG (TNFRSF11B) gen mutasyonu izlenmezken, özellikle ekzon 1’de TNP saptandı. rs11575929 C/T TNP saptanan bir hasta dışında, hastalarda OPG gen TNP olarak homozigot ve/veya heterozigot rs 2073617 ve rs 2073618 varlığı izlendi. Tek başına homozigot ve/veya heterozigot rs 2073617 ve rs 2073618 TNP varlığı veya rs 2073617 ve rs 2073618 TNP’nin heterozigot ve homozigot birlikteliğinin MM’li hastalarda destrüktif kemik lezyonu ve/veya patolojik kırık gelişimine etkisi olmadığı gözlemlendi. Buna karşılık OPG gen homozigot rs 2073617 ve rs 2073618 TNP birlikteliğinin destrüktif kemik lezyonu ve/veya patolojik kırığı olan hastalarda anlamlı olarak fazla saptanması bize homozigot rs 2073617 ve rs 2073618 TNP birlikteliğinin destrüktif kemik lezyonu ve/veya patolojik kırık gelişiminde rol oynadığını göstermekteydi.

Patolojik kırık gelişimi, gerek kırığa bağlı olarak gerekse tedavi sırasında oluşabilen komplikasyonlardan dolayı MM hastalarının yaşam süresini hastalıktan bağımsız olarak kısaltabilmektedir (4,118). Kliniğimizde yapılan bir çalışmada da patolojik kırık gelişen MM hastalarının yaşam sürelerinin hastalıktan ilişkisiz olarak belirgin olarak kısa olduğu saptanmıştı (118). Çalışmamızda ise homozigot rs2073617 ve rs2073618 TNP birlikteliğinin izlendiği destrüktif kemik lezyonu ve/veya patolojik kırıklı hastaların yaşam sürelerinin daha kısa olduğunu, fakat istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gözledik. Ancak çalışmada destrüktif kemik lezyonu ve/veya patolojik kırığı olan hastalar birlikte değerlendirildiğinden, sadece patolojik kırığı olan hastaların değerlendirilmeye alınması durumunda homozigot rs2073617 ve rs2073618 TNP birlikteliğinin hastaların yaşam süresine etkisi anlamlı saptanabilirdi.

Miyelom hücrelerinin osteoblastları inhibe etmesi ve TNF- $\alpha$  gibi sitokinlerin osteoblastlarda apoptozizi uyarması sonucu, MM’de osteoklastik aktivite artarken osteoblastik aktivitede belirgin olarak azalma izlenmektedir (85). Miyelom hücreleri ve OPG aracılığıyla mezenkimal hücrelerden osteoblast oluşumunu artıran Runx2/Cbfa1 yoluyla MM’de baskılanır. Bu durum osteoblast üretimini azaltırken, aynı zamanda azalmış osteoblast üretimine bağlı olarak artan osteoklast oluşumunu engelleyen bir protein olan OPG’de de azalmaya neden olmaktadır (89,90). TNF- $\alpha$ , RANKL gibi osteoklast

oluşumunu arttıran genlerin ekspresyonunu artırarak öncül hücrelerden osteoblast oluşumunu engellerken, aynı zamanda TRAIL'e bağlanan OPG'de TRAIL'le indüklenen osteoklast apoptozisini inhibe etmektedir. Goranova V. ve arkadaşları yeni tanı MM hastalarında kemik lezyonu varlığında RANKL-RANKL/OPG oranının RANKL ve RANKL düzeylerindeki artış ve OPG düzeyindeki azalmaya bağlı olarak arttığını saptamışlardır (119). Bizim çalışmamızda, OPG geninde saptanan TNP'lerin hastalarda OPG aktivitesini azaltıp RANKL-RANKL/OPG yolağını etkileyerek destrüktif kemik lezyonu ve/veya patolojik kırığa neden olabileceğini göstermekteydi.

Sonuç olarak, RANKL-RANK bağlanmasını engelleyerek osteoklast farklılaşması ve aktivasyonunu inhibe eden OPG geninde saptanan homozigot rs 2073617 ve rs 2073618 TNP birlikteliğinin OPG fonksiyonunu azaltıp RANKL-RANK yolağını aktif hale getirerek destrüktif kemik lezyonu ve/veya patolojik kırık gelişimine yol açabileceği kanaatine varıldı.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji bilim dalına Ocak 2010-Ocak 2012 tarihleri arasında başvuran 36 patolojik kırık ve/veya destrüktif kemik lezyonu olan, 16 patolojik kırık ve/veya destrüktif kemik lezyonu olmayan toplam 52 MM hastası ve 20 sağlıklı kontrol çalışmaya alındı.
- Hastalarda DNA izolasyonunu takiben TNFRSF11B (OPG) geni dizi analizleri yapıldı.
- Çalışmaya alınan MM'li hastalarda OPG (TNFRSF11B) gen mutasyonu izlenmedi.
- MM'li hastalarda OPG (TNFRSF11B) gen ekzon 1'de homozigot ve/veya heterozigot rs 2073617 ve rs 2073618 TNP saptandı.
- Tek başına OPG gen homozigot ve/veya heterozigot rs 2073617 ve rs 2073618 TNP varlığı veya rs 2073617 ve rs 2073618 TNP'nin heterozigot ve homozigot birlikteliğinin MM'li hastalarda destrüktif kemik lezyonu ve/veya patolojik kırık gelişimine etkisi olmadığı gözlemlendi.
- OPG gen homozigot rs 2073617 ve rs 2073618 TNP birlikteliği destrüktif kemik lezyonu ve/veya patolojik kırığı olan hastalarda anlamlı olarak fazla saptandı ve dolayısıyla homozigot rs 2073617 ve rs 2073618 TNP birlikteliğinin destrüktif kemik lezyonu ve/veya patolojik kırık gelişiminde rol oynadığı izlendi.
- OPG gen homozigot rs2073617 ve rs2073618 TNP birlikteliği olan destrüktif kemik lezyonu ve/veya patolojik kırıklı hastaların yaşam süreleri daha kısa olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildi.
- OPG geninde saptanan homozigot rs 2073617 ve rs 2073618 TNP birlikteliği OPG aktivitesini azaltıp RANKL-RANK yolağını aktif hale getirerek destrüktif kemik lezyonu ve/veya patolojik kırık gelişimine yol açmaktaydı.

## 7. ÖZET

Multipl miyelom (MM) kemik iliğinde tek bir klondan köken alan ve monoklonal immunglobulin üreten malin bir plazma hücre hastalığıdır. Hastalık seyrinde osteoblast aktivitesi azalırken osteoklast aktivitesinin artmasına bağlı olarak osteopeni, kemik destrüksiyonu ve/veya patolojik kırık gelişimi sıklıkla izlenmektedir. MM’de kemik iliğinde osteoklast öncülü hücrelerin osteoklastlara dönüşmesini sağlayan reseptör aktivatör nükleer faktör  $\kappa$ B ligand (RANKL) düzeyi artarken, RANKL için yalancı reseptör görevi gören Osteoprotegerin (OPG) düzeylerinde azalma izlenmektedir. Ancak, azalmış OPG düzeylerinin RANKL’den bağımsız olarak kemik lezyonlarının gelişimine yol açabileceği henüz bilinmemektedir. Bu çalışmada OPG gen (TNFRSF11B) mutasyonlarının ve/veya tek nükleotid polimorfizminin (TNP) MM’de kemik lezyonları gelişimine etkisi araştırıldı.

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji bilim dalına Ocak 2010-Ocak 2012 tarihleri arasında başvuran 36 patolojik kırık ve/veya destrüktif kemik lezyonu olan, 16 patolojik kırık ve/veya destrüktif kemik lezyonu olmayan toplam 52 MM hastası ve 20 sağlıklı kontrol çalışmaya alındı. Hastalarda DNA izolasyonunu takiben OPG geni dizi analizleri yapıldı. Çalışmaya alınan hastalarda DNA dizi analizinde OPG gen mutasyonu izlenmezken TNP saptandı. Hastalarda en sık izlenen TNP, ekzon 1’de homozigot ve heterozigot rs2073617 C/T ve rs2073618 C/G idi. Tek başına OPG gen homozigot ve/veya heterozigot rs 2073617 ve rs 2073618 TNP varlığı veya rs 2073617 ve rs 2073618 TNP’nin heterozigot ve homozigot birlikteliğinin MM’li hastalarda destrüktif kemik lezyonu ve/veya patolojik kırık gelişimine etkisi olmadığı gözlemlendi. Buna karşın, OPG gen homozigot rs 2073617 ve rs 2073618 TNP birlikteliği destrüktif kemik lezyonu ve/veya patolojik kırığı olan hastalarda anlamlı olarak fazla saptandı ve dolayısıyla homozigot rs 2073617 ve rs 2073618 TNP birlikteliğinin destrüktif kemik lezyonu ve/veya patolojik kırık gelişiminde rol oynadığı izlendi.

Sonuç olarak, OPG geninde saptanan homozigot rs 2073617 ve rs 2073618 TNP birlikteliğinin OPG fonksiyonunu azaltıp RANKL-RANK yolağını aktif hale getirerek destrüktif kemik lezyonu ve/veya patolojik kırık gelişimine yol açabileceği kanaatine varıldı.

## 8. SUMMARY

Multiple Myeloma is a malignant plasma cell disorder which derived from single clone of plasma cells in the bone marrow and produces monoclonal immunoglobulins. Osteopenia, bone destruction and pathological fractures are often observed in the course of disease due to increased activity of osteoclasts and decreased activity of osteoblasts. The Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand (RANKL) transforms precursor cells to osteoclasts in the bone marrow and Osteoprotegerin (OPG) acts as a decoy receptor for RANKL. The levels of RANKL increase while OPG levels decrease in MM. However, decreased levels of OPG may lead to the development of bone lesions regardless of RANKL, is not yet known. In this study, the effects of OPG gene (TNFRSF11B) mutations and/or single nucleotide polymorphism (SNP) on the development of bone lesions in MM were investigated.

Fifty-two MM patients, 36 cases with pathological fractures and/or destructive bone lesion, 16 cases with no pathological fractures and/or destructive bone lesion) were enrolled into the study (admitted to Black Sea Technical University Hospital between January 2010-January 2012). After DNA isolation, OPG gene was sequenced. No OPG gene mutations were observed, but SNPs were detected in the DNA sequence analysis. The most common SNPs were homozygous and heterozygous rs2073617 C/T and rs2073618 C/G in exon 1. OPG gene homozygous and/or heterozygous rs 2073617 and rs 2073618 SNPs or association of heterozygous and homozygous rs 2073618 and rs 2073617 SNPs were found to have no effect on the development of pathological fractures and/or destructive bone lesions in patients with MM. However, association of homozygous rs2073617 and rs2073618 SNPs were found to be significantly higher in patients with pathological fractures and/or destructive bone lesion. Therefore, it was shown that the association of homozygous rs 2073617 and rs 2073618 SNPs may play a role in the development of destructive bone lesions and/or pathological fractures. It was concluded that, association of homozygous rs 2073617 and rs 2073618 SNPs in the OPG gene may lead to pathological fractures and/or destructive bone lesions, due to the reduced function of OPG and the activated RANKL-RANK pathway.

## 9. KAYNAKLAR

1. Terpos E, Dimopoulos MA, et al. Myeloma bone disease: pathophysiology and management. *Ann Oncol*. 2005;16(8):1223-31.
2. Seidel C, Hjertner Q, Abildgaard N, et al. Serum osteoprotegerin levels are reduced in patients with multiple myeloma with lytic bone disease. *Blood* 2001;98:2269-71
3. Sezer O, Heider U, Zavrski I, et al. RANK ligand and osteoprotegerin in myeloma bone disease *Blood* 2003;101: 2094-2098
4. Wisloff F, Eika S, Hippe E, et al. Measurement of health-related quality of life in multiple myeloma. Nordic Myeloma Study Group. *Br J Haematol* 1996;92:604-13.
5. Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, et al. "Multiple myeloma". *Lancet* (July 2009);374 (9686): 324–39.
6. Waxman AJ, Mink PJ, Devesa SS, et al. Racial disparities in incidence and outcome in multiple myeloma: a population based study. *Blood* 2010; 116:5501
7. Huang SY, Yao M, Tang JL, et al. Epidemiology of multiple myeloma in Taiwan: increasing incidence for the past 25 years and higher prevalence of extramedullary myeloma in patients younger than 55 years. *Cancer* 2007; 110:896
8. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc* 2003; 78:21-29
9. Bladé J, Kyle RA. Multiple myeloma in young patients: clinical presentation and treatment approach. *Leuk Lymphoma* 1998; 30:493.
10. Lynch HT, Sanger WG, Pirruccello S, et al. Familial multiple myeloma: a family study and review of the literature. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:1479.
11. Ichimaru M, Ishimaru T, Mikami M, et al. Multiple myeloma among atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki, 1950-76: Relationship to radiation dose absorbed by marrow. *J Natl Cancer Inst* 1982; 69: 323.
12. Riedel DA, Pottern LM. The epidemiology of multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am* 1992; 6: 225-247
13. Grosbois B, Jegou P, Attal M, et al. Familial multiple myeloma: Report of fifteen families. *Br J Haematol* 1999; 105:768-774

14. Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions, *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 175–187.
15. Keats JJ, Reiman T, Maxwell CA, et al. In multiple myeloma, t(4;14)(q13;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression. *Blood* 2003; 101:1520.
16. Neri A , Baldini L, Trecca D, et al. p53 Gene Mutations in Multiple Myeloma Are Associated With Advanced Forms of Malignancy. *Blood* 1993; 81: 128-135.
17. Facon T, Avet-Loiseau H, Guillermin G, et al. Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum beta(2)-microglobulin produce a powerful myeloma staging system for patients receiving high-dose therapy. *Blood* 2001; 97: 1566-1571.
18. Fonseca R, Blood E, Rue M, et al. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood* 2003; 101: 4569-4575.
19. 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.
20. Neri A, Murphy JP, Cro L, et al. Ras oncogene mutation in multiple myeloma. *J Exp Med.* 1989; 170:1715-25.
21. Hayashi T, Hideshima T, Anderson KC . Novel therapies for multiple myeloma, *Br J Haematol* 2003; 120: 10–17.
22. Teoh G, Anderson KC. Interaction of tumor and host cells with adhesion and extracellular matrix molecules in the development of multiple myeloma, *Hematol Oncol Clin North Am* 1997; 11: 27–42.
23. Hallek M, Bergsagel PF, Anderson KC. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process, *Blood* 1998; 91: 3–21.
24. Spets H , Stromberg T, Georgii-Hemming P, et al. Expression of the bcl-2 family of pro-and anti-apoptotic genes in multiple myeloma and normal plasma cells: regulation during interleukin-6(IL6)-induced growth and survival, *Eur J Haematol* 2002; 69: 76–89.
25. Mitsiades CS, Treon SP, Mitsiades N, et al. TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: therapeutic applications, *Blood* 2001; 98: 795–804.
26. Baz R, Alemany C, Green R, et al. Prevalence of vitamin B12 deficiency in patients with plasma cell dyscrasias: a retrospective review. *Cancer* 2004; 101:90.
27. Mundy GR, Bertoline DR. Bone destruction and hypercalcemia in plasma cell myeloma. *Semin Oncol* 1986;13:291-9.

28. Kyle RA. Multiple myeloma: review of 869 cases. *Mayo Clin Proc* 1975;50:29-40.
29. Winearls CG. Acute myeloma kidney. *Kidney Int* 1995; 48:1347.
30. Chamberlaine MC, Glantz M. Myelomatous meningitis. *Cancer* 2008; 112:1562.
31. Augustson BM, Begum G, Dunn JA, et al. Early mortality after diagnosis of multiple myeloma: analysis of patients entered onto the United Kingdom Medical Research Council trials between 1980 and 2002--Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. *J Clin Oncol* 2005; 23:9219.
32. The 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.
33. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology version 1. 2011, 10/15/10. National Comprehensive Cancer Network , Inc 2010.
34. Greipp PR, San Miguel JF, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Blade J, et al. International Staging System for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005;23:3412-3420.
35. Kumar SK, Mikhael JR, Buadi FK, et al. Management of Newly Diagnosed Symptomatic Myeloma: Updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted therapy (MSMART) Guidelines. *Mayo Clin Proc* 2009; 84: 1095-1110.
36. Rajkumar SV, Hayman SR, Lacy MQ, et al. Combination therapy with lenalidomide plus dexamethasone (Rev/Dex) for newly diagnosed myeloma. *Blood* 2005; 106:4050-4053.
37. Richardson PG, Blood E, Mitsiades CS, et al. A Randomised phase 2 study of lenalidomide therapy for patients with relapsed or relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood* 2006; 108:3458-3464.
38. Kumar SK, Mikhael JR, Buadi FK, Dingli D, et al. Management of Newly Diagnosed Symptomatic Myeloma: Updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted therapy (MSMART) Guidelines. *Mayo Clin Proc* 2009; 84:1095-1110.
39. Durie BGM, Harousseau J-L, Miguel JS, et al International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 2006;20:1467–1473.
40. Roodman GD. Cell Biology of the osteoclast. *Experimental Hematology* 1999; 27: 1229–1241.
41. Roodman GD. Treatment strategies for bone disease. *Bone Marrow Transplantation* 2007 Aug 6.

42. Gunn WG, Conley A, Deininger L et al. A crosstalk between myeloma cells and marrow stromal cells stimulates production of DKK1 and interleukin-6: a potential role in the development of lytic bone disease and tumor progression in multiple myeloma. *Stem Cells* 2006; 24: 986–991.
43. Giuliani N, Colla S & Rizzoli V. New insight in the mechanism of osteoclast activation and formation in multiple myeloma: focus on the receptor activator NF-Kappa-B ligand (RANKL). *Experimental Hematology* 2004; 32: 685–691.
44. 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.
45. Lee JW, Chung HY, Ehrlich LA, et al. IL-3 expression by myeloma cells increases both osteoclast formation and growth of myeloma cells. *Blood* 2004; 103: 2308–2315.
46. Anderson MA, Maraskovsky E, Billingsley WL, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*. 1997; 390: 175–9.
47. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*. 2001;142: 5050-5.
48. Stejskal D, Bartek J, Pastorkova R, et al. Osteoprotegerin, RANK, RANKL. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2001; 145: 61-4.
49. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, et al. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med*. 2006; 12: 17-25.
50. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; 96: 3540–3545.
51. Fata JE, Kong YY, Li J, et al. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell*. 2000; 103: 41–50.
52. Kim NS, Kim HJ, Koo BK, et al. Receptor activator of NFkappaB ligand regulates the proliferation of mammary epithelial cells via Id2. *Mol Cell Biol*. 2006; 26: 1002-13.
53. Chen G, Sircar K, Aprikian A, et al. Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation. *Cancer*. 2006; 107: 289-98.
54. Blair JM, Zheng Y, Dunstan CR. RANK ligand. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; 39: 1077-81.

55. Hughes AE, Ralston SH, Marken J et al. Mutations in TNFRSF11A, affecting the signal peptide of RANK, cause familial expansile osteolysis, *Nat Genet.* 2000; 24: 45–8.
56. Whyte MP, Obrecht SE, Finnegan PM, et al. Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease. *N Engl J Med.* 2002; 347: 175-84.
57. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther.* 2007; 9:1.
58. Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93: 165–176.
59. Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22: 549-53.
60. Hofbauer LC, Neubauer A, Heufelder AE. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin: potential implications for the pathogenesis and treatment of malignant bone diseases. *Cancer.* 2001; 92: 460-70.
61. Hofbauer LC. Osteoprotegerin ligand and osteoprotegerin: novel implications for osteoclast biology and bone metabolism. *Eur J Endocrinol* 1999; 141: 195–210.
62. Takayanagi H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *J Periodont Res.* 2005; 40: 287–93.
63. Takayanagi H, Kim S, Matsuo K, et al. RANKL maintains bone homeostasis through c-Fosdependent induction of interferon-beta. *Nature.* 2002; 416: 744-9.
64. Wong BR, Josien R, Young Lee S, et al. The TRAF family of signal transducers mediates NF-kB activation by the TRANCE receptor. *J Biol Chem.* 1998; 273: 28355–9.
65. Galibert L, Tometsko ME, Anderson DM, et al. The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors in the signaling mechanism of receptor activator of NF-kB, a member of the TNFR superfamily. *J Biol Chem.* 1998; 273: 34120–7.
66. Lomaga MA, Yeh WC, Sarosi I, et al. TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev.* 1999; 13:1015-24.
67. Wada T, Nakashima T, Oliveira-dos-Santos AJ, et al. The molecular scaffold Gab2 is a crucial component of RANK signaling and osteoclastogenesis. *Nat Med.* 2005; 11: 394-9.



68. Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, et al. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature*. 2006; 440: 692–6.
69. Kim HH, Shin HS, Kwak HJ, et al. RANKL regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3' kinase/Akt signal transduction pathway, *FASEB J*. 2003; 17: 2163–5.
70. Kostenuik PJ, Shalhoub V. Osteoprotegerin: A Physiological and Pharmacological Inhibitor of Bone Resorption. *Curr Pharm Des*. 2001; 7: 613-35.
71. Brandstrom H, Bjorkmann T, Ljunggren O. Regulation of osteoprotegerin secretion from primary cultures of human bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 280: 831–35.
72. Onyia JE, Miles RR, Yang X, et al. In vivo demonstration that human parathyroid hormone 1-38 inhibits the expression of osteoprotegerin in bone with the kinetics of an immediate early gene. *J Bone Miner Res*. 2000; 15 :863– 71.
73. Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, et al. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology*. 1999; 140: 4382–9.
74. Boyce BF, Xing L, Chen D. Osteoprotegerin, the bone protector, is a surprising target for beta-catenin signaling. *Cell Metab*. 2005; 2: 344-5.
75. Makhluf HA, Mueller SM, Mizuno S, et al. Agerelated decline in osteoprotegerin expression by human bone marrow cells cultured inthree-dimensional collagen sponges. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 268: 669–7.
76. Kobayashi Y, Hashimoto F, Miyamoto H, et al. Force-induced osteoclast apoptosis in vivo is accompanied by elevation in transforming growth factor- and osteoprotegerin expression. *J Bone Miner Res*. 2000;15: 1924–34.
77. Szalay F, Hegedus D, Lakatos PL, et al. High serum osteoprotegerin and low RANKL in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol*. 2003; 38: 395-400.
78. Han JH, Choi SJ, Kurihara N, et al. Macrophage inflammatory protein-1alpha is an osteoclastogenic factor in myeloma that is independent of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand. *Blood* 2001; 97:3349–3353.
79. Hashimoto T, Abe M, Oshima T, et al. Ability of myeloma cells to secrete macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta correlates with lytic bone lesions in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol* 2004; 125:38–41.
80. Alsina M, Boyce B, Devlin RD, et al. Development of an in vivo model of human multiple myeloma bone disease. *Blood* 1996; 87:1495–1501.

81. Choi SJ, Oba Y, Gazitt Y, et al. Antisense inhibition of macrophage inflammatory protein 1-alpha blocks bone destruction in a model of myeloma bone disease. *J Clin Invest* 2001; 108:1833–1841.
82. Nguyen AN, Stebbins EG, Henson M, et al. Normalizing the bone marrow microenvironment with p38 inhibitor reduces multiple myeloma cell proliferation and adhesion and suppresses osteoclast formation. *Exp Cell Res* 2006; 312:1909–1923.
83. Geetha T, Wooten MW. Structure and functional properties of the ubiquitin binding protein p62. *FEBS Lett* 2002; 512:19–24.
84. Hiruma Y, Honjo T, Jelinek D, et al. Increased signaling through p62 in the marrow microenvironment increases myeloma cell growth and osteoclast formation. *Blood* 2009; 113:4894–4902.
85. Silvestris F, Cafforio P, Calvani N, et al. Impaired osteoblastogenesis in myeloma bone disease: Role of upregulated apoptosis by cytokines and malignant plasma cells. *Br J Haematol* 2004; 126:475–486.
86. Hjorth-Hansen H, Seifert MF, Borset M, et al. Marked osteoblastopenia and reduced bone formation in a model of multiple myeloma bone disease in severe combined immunodeficiency mice. *J Bone Miner Res* 1999; 14:256–263.
87. Kobayashi T, Kronenberg H. Minireview: Transcriptional regulation in development of bone. *Endocrinology* 2005; 146:1012–1017.
88. Franceschi RT, Xiao G. Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: Responsiveness to multiple signal transduction pathways. *J Cell Biochem* 2003; 88:446–454.
89. Giuliani N, Colla S, Morandi F, et al. Myeloma cells block RUNX2/CBFA1 activity in human bone marrow osteoblast progenitors and inhibit osteoblast formation and differentiation. *Blood* 2005; 106:2472–2483.
90. Thirunavukkarasu K, Halladay DL, Miles RR, et al. The osteoblast specific transcription factor Cbfa1 contributes to the expression of osteoprotegerin, a potent inhibitor of osteoclast differentiation and function. *J Biol Chem* 2000; 275: 25163–25172.
91. Ehrlich LA, Chung HY, Ghobrial I, et al. IL-3 is a potential inhibitor of osteoblast differentiation in multiple myeloma. *Blood* 2005; 106:1407–1414.
92. Toraldo G, Roggia C, Qian WP, et al. IL-7 induces bone loss in vivo by induction of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and tumor necrosis factor alpha from T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:125–130.

93. Lee SK, Kalinowski JF, Jacquin C, et al. Interleukin-7 influences osteoclast function in vivo but is not a critical factor in ovariectomy-induced bone loss. *J Bone Miner Res* 2006; 21:695–702.
94. Tan SD, Kuijpers-Jagtman AM, Semeins CM, et al. Fluid shear stress inhibits TNF $\alpha$ -induced osteocyte apoptosis. *J Dent Res* 2006; 85:905–909.
95. Li B, Shi M, Li J, et al. Elevated tumor necrosis factor- $\alpha$  suppresses TAZ expression and impairs osteogenic potential of Flk-1 $\zeta$  mesenchymal stem cells in patients with multiple myeloma. *Stem Cells Dev* 2007; 16:921–930.
96. Mukai T, Otsuka F, Otani H, et al. TNF- $\alpha$  inhibits BMP-induced osteoblast differentiation through activating SAPK/JNK signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 356:1004–1010.
97. Gilbert L, He X, Farmer P, et al. Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pebp2 $\alpha$  A) is inhibited by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Biol Chem* 2002; 277:2695–2701.
98. Lu X, Gilbert L, He X, et al. Transcriptional regulation of the osterix (Osx, Sp7) promoter by tumor necrosis factor identifies disparate effects of mitogen-activated protein kinase and NF kappa B pathways. *J Biol Chem* 2006; 281:6297–6306.
99. Qiang Y-W, Endo Y, Rubin JS et al. Wnt signaling in B cell neoplasia. *Oncogene* 2003; 22: 1536–1545.
100. Westerndorf JJ, Kahler RA & Schroeder TM. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene* 2004;341: 19–39.
101. Glass DA, Bialek P, Ahn JD, et al. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Developmental Cell* 2005; 8: 751–764.
102. Spencer GJ, Utting JC, Etheridge SL, et al. Wnt signaling in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of NF $\kappa$ B ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Journal of Cell Science* 2006;119: 1283–1296.
103. Giuliani N, Bataille R, Mancini C, et al. Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment. *Blood* 2001; 98: 3527–3533.
104. Giuliani N, Colla S, Sala R, et al. Human myeloma cells stimulate the receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL) in T lymphocytes: a potential role in multiple myeloma bone disease. *Blood* 2002; 100: 4615–4621.

105. Heider U, Langelotz C, Jakob C, et al. Expression of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand on bone marrow plasma cells correlates with osteolytic bone disease in patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1436–1440.
106. Standal T, Seidel C, Hjertner O, et al. Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells. *Blood* 2002; 100:3002–3007.
107. Terpos E, Szydlo R, Apperley JF, et al. Soluble receptor activator of nuclear factor {kappa}B ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio predicts survival in multiple myeloma. Proposal for a novel prognostic index. *Blood* 2003; 102: 1064–1069.
108. Lee YH, Woo JH, Choi SJ, et al. Associations between osteoprotegerin polymorphisms and bone mineral density: a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2010; 37:227–234.
109. Celczyńska Bajew L, Horst Sikorska W, Bychowiec B, et al. The effects of osteoprotegerin (OPG) gene polymorphism in patients with ischaemic heart disease on the morphology of coronary arteries and bone mineral density. *Kardiol Pol.* 2011; 69(6):573-8.
110. Narita N, Yuasa T, Tsuchiya N, et al. A genetic polymorphism of the osteoprotegerin gene is associated with an increased risk of advanced prostate cancer *BMC Cancer.* 2008 Aug 6;8:224.
111. Katz J, Gong Y, Salmasinia D, et al. Genetic polymorphisms and other risk factors associated with bisphosphonate induced osteonecrosis of the jaw. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2011 Jun;40(6):605-11.
112. Ohmori H, Makita Y, Funamizu M, et al. Linkage and association analyses of the osteoprotegerin gene locus with human osteoporosis. *J Hum Genet.* 2002;47:400–406.
113. Garcia-Unzueta MT, Riancho JA, Zarrabeitia MT, et al. Association of the 163A/G and 1181G/C osteoprotegerin polymorphism with bone mineral density. *Horm Metab Res.* 2008;40:219–224.
114. Roshandel D, Holliday K, Pye SR, et al. Genetic Variation in the RANKL/RANK/OPG Signaling Pathway Is Associated With Bone Turnover and Bone Mineral Density in Men. *Journal of Bone and Mineral Research,* Vol. 25, No. 8, August 2010, 1830–1838.
115. Soufi M, Schoppet M, Sattler AM, et al. Osteoprotegerin Gene Polymorphisms in Men with Coronary Artery Disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004; 89(8):3764–3768.
116. Cundy T, Hegde M, Naot D. A mutation in the gene TNFRSF11B encoding osteoprotegerin causes an idiopathic hyperphosphatasia phenotype. *Human Molecular Genetics,* 2002; Vol. 11, No. 18: 2119–2127.

117. Huang CH, Chung Wei JC, Hung PS, et al. Osteoprotegerin genetic polymorphisms and age of symptom onset in ankylosing spondylitis. *Rheumatology* 2011;50:359–365.
118. Sonmez M, Akagun T, Topbas M, et al. Effect of pathologic fractures on survival in multiple myeloma patients: a case control study. *J Exp Clin Cancer Res.* 2008 Jun 10;27:11.
119. Goranova-Marinova V, Goranov S, Pavlov P, et al. Serum levels of OPG, RANKL and RANKL/OPG ratios in newly-diagnosed patients with multiple myeloma. Clinical correlations. *Haematologica* 2007; 92:1000-1001.