

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

İNSAN MULTİPLE MYELOMA VAKALARI, NS<sub>1</sub> ve SP<sub>2</sub> FARE MYELOMA  
HÜCRE DİZİLERİNDE METİLPREDNİSOLONUN DOZA BAĞLI ETKİLERİ

Uzmanlık Tezi

Dr. Mehmet SÖNMEZ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ercüment OVALI

Trabzon - 1996

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
3. MATERYAL ve METOT.....	17
4. BULGULAR.....	23
5. TARTIŞMA.....	40
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	45
7. ÖZET.....	46
8. SUMMARY.....	48
9. KAYNAKLAR.....	50

## GİRİŞ

Multiple myeloma (MM) monoklonal protein sekrete eden plazma hücrelerinin neoplazmidir (1,2).

Tüm malignensilerin %1'ini, hematolojik malignensilerin %10'unu oluşturan bu neoplazmın, son yıllarda tanı amaçlı tıbbi tekniklerin gelişmesi ile insidensinin arttığı bilinen bir gerçektir (1,2).

MM tanısı konulduğunda tedavi edilmediği takdirde hastaların ortalama 6 aylık bir yaşam süresi söz konusu iken, günümüzde bu süre radyoterapi ve kemoterapi ile evresine bağlı olarak 2-5 yıla kadar uzatılabilmektedir (3,4). Multiple myeloma tedavisinde son derece önemli olan glukokortikoidler (GK), bir çok hematolojik malignenside olduğu gibi hücre lizisini ve apoptozisi indüklemek, hücre çoğalmasını azaltmak amacıyla kullanılmaktadır. Özellikle MM'nin patogeneğinde rol oynayan interleukin-6(IL-6), interleukin-1beta(IL-1 $\beta$ )'yi inhibe edici özelliklerinin bulunması, M protein sekresyonunu azaltmaları ve kemik rezorpsiyonunu engelleyici özelliklerinden dolayı GK'ların MM tedavisinde özel bir yeri vardır (5,6).

GK'ların son yıllarda yüksek dozlarda, şiddetli kemik iliği depresyonu olan veya diğer ajanlara cevap alınamayan dirençli olgularda faydalı olduğu görülmüş ve tedavilerde yüksek doz GK kullanımı yerini bulmaya başlamıştır (7-9). GK'ların değişik hücrelerde farklı etkiler oluşturduğu, hatta aynı hücre dizilerinde doza bağımlı etkilerin olduğu gözlenmiştir. Bu farklılıkların bir kısmında GK reseptör veya postreseptör defektlerin neden olduğu bilinmektedir (10-12).

Bu nedenle son 10 yıllık sürede, GK'ların hematolojik malignensilerde artan dozlarda kullanımı önem kazanmıştır. Bundan dolayı şimdiki çalışmada değişik myelom hücre dizilerinde GK'ların artan dozlarda etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## GENEL BİLGİLER

### MULTIPLE MYELOMA

#### *Tanım*

Multiple myeloma (MM) matür ve immatür plazma hücrelerinin bir neoplazmidir. Monoklonal immunglobulin üreten plazma hücrelerinin tek bir klonunun kontrolsüz çoğalması söz konusudur(1,2). Myeloma tümör hücrelerinin yavaş çoğalması matür B hücre bulgularını göstermesine karşın, bir çok myeloma hücresinde myeloid ve plazma hücre antijeninin birlikte bulunması, aneuploid plazma hücrelerinde ortak akut lenfoblastik lösemi antijeni (CALLA), megakaryositik, myelomonositik ve eritroid yüzey antijeni bulunması, olayın B hücre oluşumundan önce, hatta hematopoietik kök hücre seviyesinde olduğunu düşündürmektedir(13,14). Plazma hücrelerinin kontrolsüz üremesi, sonuçta kemik iliğini infiltre etmesi, hücrelerden M-proteini ve tümör nekrozis faktör alfa (TNF-a), interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) gibi sitokinlerin aşırı üretimi sonucu klinik ve laboratuvar bulgular ortaya çıkmaktadır.

#### *Epidemiyoloji*

MM tüm malignensilerin %1'ini, hematolojik malignensilerin %10-15'ini içermektedir. Son yıllarda kemik iliği incelemesi ve protein elektroforezi gibi tekniklerin sık kullanılmasıyla görülme sıklığının arttığı bildirilmektedir. Erkeklerde kadınlardan daha sık görülür, genelde ileri yaş hastalığıdır ve tanı esnasında ortalama yaş 70 civarındadır, ancak vakaların %2'sinde 40 yaşından önce görülür (1,3,15).

MM için çeşitli risk faktörleri belirtilmiştir. Bunlar arasında en iyi saptananı iyonize radyasyondur. Nükleer silah endüstrisinde çalışanlarda insidensin belirgin olarak arttığı gözlenmiştir. Genetik yatkınlık ve kronik antijenik stimülasyon etkili faktörler arasındadır. Organik kimyasallara maruz kalmada risk daha azdır (3,15).

### ***Sitogenetik***

Myelom hücreleri yavaş çoğalma hızına sahip olduğundan kromozom çalışmaları yapmak zordur. Bununla birlikte birçok kromozom anomalisi tespit edilmiştir, ancak hiçbiri spesifik değildir. En sık rastlanan kromozom 2 ve 14'e aittir. Daha az olmakla birlikte kromozom 6 anomalisi artmış osteolitik kemik lezyonu, 7 anomalisi ise primer ilaç resistansı ile birlikte (3,16,17). FLOVİSİTOMETRE (Flowcytometry) ile yapılan DNA kontent analizinde %80 aneuploidi tesbit edilebilir. Bunun %70'i hiperdiploidi, %20'si diploidi ve %10'u hipodiploidi şeklindedir. Hipodiploidi tespit edilenlerde hafif zincir üretimi gözlenirken, hipodiploidide daha belirgin olmak üzere gerek hipodiploidi gerekse hiperdiploidi primer ilaç resistansı ve kısa yaşam süresiyle birlikte (16,18,19).

### ***Hücre Kinetiği ve İlaç Direnci***

Yavaş çoğalma hızına sahip olan myeloma hücrelerinde, programlanmış hücre ölümünü inhibe eden bcl-2 gen üretiminde ve aktif DNA sentezinin göstergesi c-myc nükleer proteininde artış mevcuttur (3,16,20,21). Ayrıca N ve K ras onkogeninde mutasyonlar gözlenir. Bu durum da, kısa yaşam süresiyle birlikte (22). Membran MDR-1 (Multidrug Resistans) geni bilgilerini içeren p-glikoproteini primer veya sekonder ilaç rezistansının göstergesidir (23,24).

### ***Sitokinlerin Rolü***

İnterleukin-6 (IL-6): B-hücreleri interleukin-4 (IL-4)'le aktive olduktan sonra, interleukin-5 (IL-5)'le büyür ve IL-6'yla immunglobulin sekrete eden plazma hücrelerine farklılaşır. İn vivo ve invitro çalışmalarda IL-6'nın MM'da başlıca myelom hücre büyütücü faktör olduğu gözlenmiştir. Bunu parakrin veya otokrin etkiyle meydana getirebilir. IL-6 seviyesi hastalığın şiddeti ve prognozuyla ilişkilidir (25-29).

İnterleukin-1 (IL-1): IL-4, IL-5, IL-6 üretimine etkili olan IL-1, plazma hücreleri için direkt mitojen etkili olup, osteoklast aktivasyonu ile kemik resorpsiyonunu sağlar (30).

Tümör Nekrozis Faktör (TNF): B hücre değişiminde rolü olan TNF myelom hücrelerinin proliferasyonunu sağlar, tek başına veya IL-1'le kemik resorpsiyonuna neden olur (31).

İnhibitör Sitokinler: Plazma hücrelerinin büyümesini inhibe eden en önemli sitokin olan interferon gamma (INF- $\delta$ ), B hücre proliferasyonunu ve immunglobulin üretimini inhibe eder (32,33). İnterferon alfa (INF-a) düşük dozlarda büyüme sağlarken, yüksek dozlarda IL-6'ya cevabı antagonize ederek inhibitör etki gösterir

(4,34). IL-2 myelom hücrelerindeki büyümeyi inhibe eder ve IL-2 seviyelerdeki artış iyi prognozla birlikte. IL-1, TNF, IL-8 ve IL-6'yı inhibe ederek etkili olur (3,4,35). Tumor growth faktör beta (TGF  $\beta$ ) ve interleukin-10 (IL-10) daha az potent inhibitörlerdir (3,36).

Sonuç olarak fazla miktarda  $G_1/G_0$  fazı içeren myelom hücreleri çeşitli sitokin'ler üreterek; hücrelerin çoğalmasına ve protein üretimine, normal antikor düzeyinin baskılanmasına, osteolize, renal hasara, hiperkalsemiye, hiperviskoziteye neden olurlar.

### ***Klinik Bulgular***

Değişik süreli asemptomatik periyodu takiben hastalığın klinik bulguları ortaya çıkar ve hastalığın süresine bağlı olarak değişik klinik belirtiler ortaya çıkar.

İskelet lezyonları başlıca, kırmızı kemik iliği içeren kemiklerde olmak üzere gelişen birden çok miyelomatöz tümör oluşumuna bağlıdır. Klinik belirtiler; hassasiyet, şişlik gibi lokal bulgulardan, yaygın, geçici, şiddetli ağrılar ve patolojik kırıklara kadar değişebilir. Radyolojik olarak kafa kemiklerinde yuvarlak, zımba deliği, kaburgalarda ise benek tarzında osteolitik, intervertebral diskin dejenerasyonu, vertebraların kısalıp içiçe girmesi tarzında değişik lezyonlar görülebilir. Periost reaksiyonu ve yeni kemik oluşumu nadirdir. Kemik rezorbsiyonunun mekanizması kesin anlaşılamamıştır, ancak IL-1 $\beta$ , TNF, lenfotoksin, IL-6, IL-3, GM-CSF gibi osteoklast oluşumu ve aktivasyonunu sağlayan faktörler patogeneizde önemli yer tutarlar. Ayrıca MM'un erken döneminde osteoblastik aktivitede artış izlenir. Hastaların %2-10'unda soliter plazmositom bulunur ve nadiren osteoskleroz görülür.

MM'de normal immunglobulin seviyelerinin azalması, immun cevabın baskılanması, IgM üretim süresinin uzaması, antikor titrelerinin azalması mevcuttur. Bunun yanında T ve B hücrelerinde kalitatif ve kantitatif anormallikler sonucu CD4/CD8 oranında azalma, antijene duyarlı T ve B hücrelerinin kaybı, pre T ve pre B hücrelerinin olgun formlarına farklılaşmasında defektler bulunur. Bunların yanında daha az önemli olarak, immunglobulin katabolizmasının artması, kompleman fonksiyonlarının ve opsonizasyonun bozulması söz konusudur. Tüm bu faktörlere bağlı olarak MM'de enfeksiyona eğilim artar. Gram (+) veya (-) bakterilere bağlı olarak solunum, üriner sistem enfeksiyonlarından sepsise kadar değişen, tekrarlayıcı ve ölümcül enfeksiyonlar görülmektedir.

Plazma hücreli tümörlerin spinal cord ve sinir köklerine basısı, amiloid birikimiyle veya birikimi olmaksızın sensori-motor polinöropati, hiperkalsemik ensefalopati, lökoensefalopati çeşitli nörolojik bozuklukların başlıca sebepleridir.

Bunun yanında daha az sıklıkla menenjal invazyon ve osteosklerotik kemik lezyonlarına bağlı bulgular gözlenir.

Böbrek hasarı oldukça sık görülür ve kronik böbrek yetmezliği hastalığın belirgin bulgusudur. Burada etkili başlıca faktörler hafif zincir silendirlerinin oluşması, monoklonal proteinlerin diffüz çökmesi, Bence-Jones proteinürisine bağlı tubuler hasar, hiperkalsemidir. Diğer katkıda bulunan faktörler, hiperürisemi, piyelonefrit, dehidratasyon, hiperviskozite, amiloidoz, sepsis, nefrotoksik antibiyotik ve non-steroidal anti-inflamatuar ilaç kullanımınıdır.

Hastalığın şiddeti ve süresinin sonucu olarak kardiyovasküler komplikasyonlar görülebilir. Miyokardial amiloid ve mukopolisakkarit infiltrasyonu, kardiomiopati, hiperviskozite başlıca sebeplerdir. Bunların yanında arterio-venöz şant, tümör hücrelerinden salınan humoral faktörler sonucu kalp yetmezliği ve vaskülit diğer etkili faktörlerdir.

Monoklonal protein ve hafif zincir birikimine, kriyoglobulinemiye, amiloid ve vaskülitte bağlı olarak çeşitli cilt bulguları görülebilir.

Dalak, karaciğer, lenf nodları ve böbrekler daha sık olmak üzere, tiroid, adrenal glandlar, akciğer, barsaklar gibi bir çok organda mikroskopik veya makroskopik tümör hücre birikimi ve buna bağlı çeşitli klinik tablolar ortaya çıkabilir.

Kriyoglobulin'lere bağlı olarak Raynaud's fenomeni, akrosiyanoz, ürtiker gibi bulgular, viskozitesi artmış proteinlerin varlığına bağlı olarak gelişen hiperviskozite sendromuna ait belirtiler görülebilir. M proteini çeşitli koagülasyon faktörlerini etkileyerek hemorajik diateze neden olur. Faktör V, VII, VIII, protrombin, fibrinojen başlıca etkilenen faktörlerdir. Ayrıca dolaşan antikoagülan ve edinsel Von Willebrand hastalığı gözlenir (1,2).

### ***Laboratuvar Bulguları***

Hastalığın başlangıcında hastaların üçte ikisinde, ilerleyen dönemlerde tüm hastalarda normokrom normositer anemiye rastlanır. Ancak makrositer, demir eksikliğine bağlı mikrositer anemiye de rastlanabilir. Eritrositler rulo formasyonu gösterir. Eritrosit sedimentasyon hızı (ESR) yükselmiştir, bu olaya başlıca eritrositlerin rulo oluşturması ve yüksek gammaglobulin seviyesi sebep olur. Kriyoglobulin'lerin varlığında ESR düşük hatta sıfır olabilir. Lökosit sayısı genellikle normaldir. Hastaların %50'sinde hafif nötropeni, nispi lenfositoz, plazma hücreleri görülebilir. Plazma hücreleri çok fazla ise plazma hücreli lösemi düşünülür.

Plazma hücreleri genellikle kemik iliğinin %10'undan fazlasını işgal eder. Ancak %5-%100 arasında değişim olabilir. Plazma hücre sayısı %15-20'yi aştığında

tanı kesinleşir. Kemik iliği tutulumu diffuz veya lokal olabilir. Plazma hücrelerinin sitoplazmalarındaki monoklonal immunglobulinlerin immunperoksidaz boyamayla gösterilmesi, infeksiyon, karaciğer hastalığı, metastatik kanser gibi reaktif plazmasitoz'dan ayırırda önemlidir.

Hastalarda M proteini ve/veya Bence - Jones proteinürisi gözlenir. Nadiren M proteini inkomplet veya yarım moleküllu immunglobulinlerdir. Monoklonal protein araştırılmasında kullanılan elektroforezde, hastaların %80'inde lokalize band, %10'unda hipogammaglobulinemi, kalanlarında ise herhangi bir anormalite olmadığı gözlenir. Myelom proteinlerinin immunglobulin sınıflarına dağılımı, onların serum konsantrasyonlarıyla orantılı bulunmaktadır. Monoklonal protein %50 IgG, %20 IgA, %17 sadece hafif zincir (lambda, kappa), %2 IgD, %1 biklonal gammopati, şeklinde bulunur. %10 vakada serum M-proteini yoktur. IgE myeloma oldukça nadirdir. Vakaların %80'inden fazlasında hafif zincir üretilir. Ağır zincir azdır. İki veya daha fazla monoklonal protein bulunduğunda, en sık birliktelik IgG + IgA, IgM + IgG, IgG + IgG, IgM + IgA ve IgM + IgM şeklindedir. Nadir olarak immunglobulin ve ağır zincir veya ayrı bir hafif zincir bulunabilir.

$\beta_2$ -mikroglobulin klas I HLA'nın komponenti bir peptid olup, plazma hücreleri dahil tüm hücrelerde bulunur, glomerüllerden süzülüp, tubuluslardan absorbe olur. MM, esansiyel monoklonal gammopati (MGUS), lenfoproliferatif hastalık gibi birçok durumda serum seviyesi yüksek bulunur. Renal fonksiyonlara bağlı olarak idrar düzeyleri de değişebilir. Bu nedenle  $\beta_2$ -mikroglobulin hastalığının tanısında değil, prognozunu değerlendirilmesinde önemlidir.

Ayrıca renal hasarın sonucu olarak azotemi, yüksek serum kreatinini, düşük kreatinin klirensi, idrarda protein, albumin, kristal ve renal epitel gözlenebilir. Fanconi sendromu benzeri idrarda aminoasit, şeker ve fosfat görülebilir. Hiperürisemi, hiperfosfatemi, yüksek alkali ve asid fosfataz, anyon açığı, hiponatremi oluşabilir. LDH hastalarda belirgin olarak artabilir (1-3).

Klinik olarak MM başlıca, IgG, IgA, IgD, hafif zincir hastalığı, nonsekretuar, biklonal gammopati tarzında görülebilir. Ayrıca smoldering myeloma, plazma hücreli lösemi, osteosklerotik myeloma, soliter plazmositom, ekstremitaller plazmositoma şeklinde daha nadir değişik türleri de mevcuttur (2,3).



## Tanı Kriterleri

### 1- Major Kriterler.

- Doku biyopsisinde plazmositomun gösterilmesi.
- Kemik iliğinde %30'dan fazla plazma hücresi bulunması.
- Serum elektroforezinde monoklonal globulin piki (M-proteini).
  - \* IgG için %5 gr'dan.
  - \* IgA için %2 gr'dan fazla olması.
  - \* Amiloidozis'in yokluğunda idrar elektroforezinde lampda veya kappa hafif zincir atılımının 24 saatte 1 gr'dan fazla olması.

### 2- Minor Kriterleri.

- Kemik iliğinde %10-30 arasında plazma hücresi bulunması.
- Monoklonal globulin piki mevcuttur, fakat yukarıdaki değerlerden azdır.
- Litik kemik lezyonları.
- Normal IgG % 600 mg'dan, IgA %100 mg'dan, IgM %50 mg'da azdır.

Tanı için 1 major + 1 minör veya 3 minor kriter gerekir.

Ayrıca yeni başlayan anemi, hiperkalsemi, azotemi, demineralizasyon ve kompresyon kırığı, hipoalbuminemi gibi nonspesifik hastalık belirtilerinin mevcudiyeti tanıyı destekler (37).

Ayrıcı tanı; MGUS, kronik lenfosit lösemi (KLL), nonhodgkin lenfoma, kollagen doku hastalığı, immun kompleks hastalığı, siroz, Waldenström's makroglobulinemisi, ağır zincir hastalığı, hipertiroidi, metastatik karsinomlarla yapılmalıdır.

## Evreleme (37)

	EVRE I (Düşük)	EVRE II (Orta)	EVRE III (Yüksek)
Myeloma hücre sayısı	$<0,6 \times 10^{12} m^2$	$0,6-1,2 \times 10^{12} m^2$	$>1,2 \times 10^{12} m^2$
Hemoglobin (gr%)	$> 10,5$	$\geq 8,5-10,5$	$< 8,5$
Serum Kalsiyum (mg%)	Normal	$\leq 12$	$> 12$
M-Protein	IgG $< 5$ gr %	$\leq 7$	$> 7$
	IgA $< 3$ gr %	$\leq 5$	$> 5$
	BJ $< 4$ gr/gün	$\leq 12$	$> 12$
Kemik Lezyonlar	Lezyon yok veya sadece osteoporoz	$\leq 3$ litik lezyon veya osteoporoz	$> 3$ litik lezyon

BJ: Bence - Jones proteinürisi

Alt Gruplar:

A: Nispeten normal renal fonksiyonlar (Serum kreatinini  $< 2,0$  mg/dl)

B: Anormal renal fonksiyon (Serum kreatinini  $\geq 2,0$  mg/dl)

## **Prognoz**

Myelom hücre kitlesi ve klinik bulgular kemoterapiye cevap ve prognozla koreleredir. Tedavi altında, hastalığın I. evresinde ortalama sürvi 60 ay, II. evrede 41 ay, III. evrede 23 ay, ortalama 36 aydır. Tedavi olmayan hastalarda ise ortalama sürvi 6 aydır. Renal fonksiyon bozukluğu, kemik iliği plazma hücre labeling indeksi ve yaş prognozu etkileyen faktörlerdir (3,4). Prognozu yansıtan parametreler mevcuttur. Son zamanlarda sık kullanılan b<sub>2</sub> mikroglobulin düzeyi, MM harici hastalıklarda da yükselebildiğinden ve renal bozuklukla etkilendiğinden diğerlerinden daha az güvenilirdir (38,39).

IL-6 hastalığın şiddetini yansıtır ve prognostik gösterge olabilir. CRP, IL-6 etkisiyle karaciğerde üretilir ve IL-6 düzeyiyle koreleredir. Bu nedenle IL-6 seviyesi hakkında bilgi veren çok önemli bir kriterdir (29,40).

LDH ve bioprotein metaboliti olan neopterin düzeyinin artması, plazma hücresi asit fosfataz düzeyinin düşüklüğü kötü prognozu yansıtır. Buna karşılık hidrolaz düzeyinin artması aktif apoptozisi ve dolayısıyla iyi prognozu yansıtır. Plazma hücrelerinin morfolojisinin bozukluğu ve periferik kanda plazma hücresi bulunmasında kötü prognozla birliktedir (41-44).

## **Tedavi**

MM'de hastalığın evresine, klinik bulguların şiddetine bağlı olarak radyoterapi ve kemoterapi uygulanabilir. Ayrıca ağrı, anemi, hiperkalsemi gibi eşlik eden bulgular için semptomatik tedaviler uygulanır.

**Radyoterapi:** Kemoterapiye cevap vermeyen ağrılı kemik lezyonları, patolojik kırıklar için değişik doz ve sürede radyoterapi uygulanabilir. Tüm vücut radyoterapisi şeklinde uygulanabileceği gibi, myelotoksik etkilerden korunmak için, kısmi radyoterapi şeklinde de uygulanabilir (45).

**Kemoterapi:** MM bir çok sistemi tutan generalize bir hastalık olduğundan sistemik kemoterapi uygulanır. Kemoterapiye cevap alındığını gösteren ağrının azalması, hastanın performansının düzelmesi gibi subjektif kriterlerin yanında, objektif kriterlerde mevcuttur. Bunlar; M proteininde %50'den fazla azalma, myelom hücre kitlesinde azalma, yumuşak doku kitlesinin büyüklüğünde azalma, osteolitik lezyonların düzelmesi, hemoglobun seviyesinde yükselme, transfüzyon ihtiyacının azalması, hiperkalsemi ve üremide azalmadır (1,3).

Tedavide melfalan, siklofosfamid, karmustin (BCNU), prokarbazin gibi alkali ajanlar ve steroidler tek başlarına veya kombine kullanılabilirler. Hastalığın evresine ve klinik durumuna göre bir kaç alkali ajan ve alkali ajan, vinkristin, prednison veya adriamisin içeren kombinasyon tedavileri uygulanabilir. Bunların yanında

deoksikoformisin, interferon alfa, retinoik asid, sitokin inhibitörleri ve allogenik veya otolog kemik iliği transplantasyonu tedavide kullanılan diğer yöntem ve ajanlardır.

Tedavide ilk aşama; Melfalan ve prednison komplikasyonsuz evre II-III MM'de ilk seçenek olup, %50-60 objektif cevap alınır. Benzer sonuçlar siklofosfamid ile de sağlanır. Melfalan'a prednisonun ilavesi cevabı artırır. Ancak bu kombinasyonda prednisonun yararı gösterilememiştir. Steroidlerin, alkali ajanlardan daha fazla iyileştirici etkisi gözlenmiş, hatta yüksek doz steroidlerin çok yoğun kemoterapi programlarıyla karşılaştırılabilecek sonuçları görülmüştür. (Steroidlerin tedavideki yerinden ayrı bir bölüm olarak bahsedilecektir.) (1,3,4,16,18,46).

Kombinasyon Kemoterapi; Melfalan, siklofosfamid, BCNU, vinkristin ve prednisondan oluşan M<sub>2</sub> protokolünde komplet remisyon hızı %70-80 iken, yaşam süresi açısından melfalan ve prednison kombinasyonundan istatistiksel fark bulunamamıştır (3,4,16).

Kötü prognostik faktörlere sahip hastalarda, kombine kemoterapinin faydası mevcuttur. Adriamisin, BCNU, siklofosfamid ve melfalan içeren ABCM protokolünde yaşam süresinde uzama görülür (4,13,46). Yine vinkristin, adriamisin ve deksametazon içeren VAD protokolünde dirençli vakaların %50'sinde cevap alınır. Kısaca, adriamisin içeren kombinasyonlar yaşam süresini uzatır ve alkali ajanlarla kombinasyon kötü prognozlu hastalarda başarıyla kullanılır (8,9,47).

Yüksek doz siklofosfamid, melfalan ve steroid ile %70-80'lere ulaşan remisyon hızı gözlenmiştir. Yüksek doz kemoterapiyi takiben otolog veya allogenik kemik iliği transplantasyonunda %30-40 oranında tam remisyon gözlenmiştir (3,16,48).

Relaps görülen hastalarda M<sub>2</sub> protokolü faydalıdır, ancak etkisi kısa sürelidir. Deoksikoformisin, 2-korodeoksiadenozin, karboplatin refrakter vakalarda kullanılabilir. Yine refrakter olgularda sisplatin (CDDP) içerikli, örneğin etapozid, yüksek doz deksametazon, sitozinarabinozid, sisplatin içeren EDAP protokolü kullanılabilir, ancak belirgin miyelotoksisite mevcuttur (3,4,8,9,16,46,47,48).

İnterferon alfa MM'de tek başına veya kombine kemoterapiyle birlikte kullanılır. Özellikle remisyon süresinin uzaması ve yaşam kalitesinin düzelmesinde etkilidir (4,49).

IL-6 monoklonal antikoru, IL-1 reseptör antagonisti, TNF antagonisti pentoksifilin, IL-6 R'ünü düzenleyen retinoik asid, üzerinde çalışılan ve gelecek tedavide ümit verici ajanlardır (1,3,4,50).

Ayrıca hiperkalsemi, renal yetmezlik, infeksiyon, kemik lezyonları için uygun destek tedavileri uygulanır.

## GLUKOKORTİKÖİD (GK)'LER ve ETKİLERİ

GK'lar adrenal korteks'ten sentezlenen bir çok fizyolojik olayın düzenlenmesinde önemli rolü olan steroid yapıda hormonlardır. Dört halkalı yapıya sahip olan siklopentanoperhidrofenantren iskeletinden türeyen maddeler için steroid deyimi kullanılır. Bu halkalar A, B, C ve D diye adlandırılır. Steroid halka sisteminin çeşitli yerlerine metil veya etil grubu getirilmek suretiyle kortikosteroidler, androjenler gibi doğal hormonların veya sentetik analoglarının ana yapısını oluşturan temel steroid türevleri elde edilir. Bunlar pregnan, androstan ve estrandır. Doğal kortikosteroid ve progesteron 21 karbonlu, testesteron 19 karbonlu ve doğal estrojenler 18 karbonlu steroidlerdir. Kortikosteroidler genellikle C-17 karbonunda iskelete bağlanmış iki karbonlu bir radikal vardır. İskelete ve yan zincire en az üç oksijen atomu (hidroksil ve keto şeklinde) bağlanmıştır. Hepsinde 3 ve 4 numaralı karbonlar arasında bir çift bağ bulunur. Farklı yapıda olan yeni steroidler doğal GK'ların su ve tuz tutucu etkilerini minimum dereceye indirmek amacıyla sentez edilmişlerdir. Sentetik GK'ların çoğunda A halkasında ikinci bir çift bağ bulunur. Bazılarında ilave hidroksil ve metil grupları vardır (51).

GK'ların etki göstermesi için spesifik reseptörü ile birleşmesi gerekir. Glukokortikoid reseptör (GKR) aktif olmayan şekli 310.000 daltonluk kitleye sahip heteromer kompleks şeklinde sitozolde bulunur. Bu heteromer kompleks iki adet 90.000 dalton ağırlığa sahip Heat Shock Protein (HSP-90) ve 59.000 dalton ağırlığa sahip olan P 59 proteini içerir. Reseptör hormonun bağlandığı alan (HBA), DNA'nın bağlandığı alan (DBA) ve antijenik-immunojenik alan olmak üzere 3 bölgeden meydana gelir.

GKR'de merkezi olarak DNA bağlayan alan yerleşmiştir. Hormon bağlayıcı alan karboksi son grubu bulunan bölgeye, antikor tanınmasının gerçekleştiği immunojenik alan amino son grubunun bulunduğu bölgeye yerleşmiştir. GKR'de nükleer translokasyon, fosforilasyon ve diğer proteinlerle etkileşim gibi özellikleri belirleyen, reseptörün değişen aktivasyon fonksiyonuna cevaplı alanlar tanımlanmıştır.

GK'lar hücre membranındaki lipidler arasından basit diffüzyonla hücre içine girer. Sitoplazmada heteromer komplekse bağlanır. Bu kompleks çözülerek 2 tane HSP-90 ve 1 tane P 59 proteini kompleksten ayrılırken, aktive hormon GKR'ne bağlanır. Hormonun bağlandığı iki ayrı GKR homodimer şeklini alır. Bu homodimer kompleksi nükleer membrana geçerek nükleustaki kromatine transloke olarak transkripsiyon sistemi ile ilişkiye girer. Reseptör proteini spesifik genlerin meydana getirdiği etkiyi uyarı veya inhibe tarzında etkilerken, DNA molekülü üzerindeki bağlanma yerleri tespit edilmiş ve bunlara glukokortikoid cevap elemanları (GRE) adı verilmiştir. Kromatin üzerinde yer alan akseptör denilen bağlanma yerleriyle birleşen reseptör aktive olarak kendine özgü GRE segmenti ile birleşerek belirli genlerin ekspresyonunu

(transkripsiyonunu) artırır. Sonuçta o genlere özgü mRNA yapımı artar ve hücrenin ribozomlarında belirli proteinlerin (bir kısım enzim) sentezi hızlandırılır. Ancak bazı dokularda (lenfotik doku gibi) glukokortikoidler protein sentezini, gen düzeyinde regresyon veya ribozomlarda protein yapımını inhibe eden özel proteinlerin sentezini artırarak, azaltırlar. Nükleer proteinlerden c-myc ve c-myb protoonkogenlerinin düzenlenmesi de bu yolla olmaktadır. İn vitro deneylerde, ortama steroid hormon ilave edildiğinde, hormona özgü reseptörlerin sitoplazmada azaldığı, nükleusta ise arttığı gösterilmiştir (6,51,53).

GK'lar glukoneojenezisi artırıcı, glukoz ütilizasyonunu azaltıcı etkisiyle hiperglisemiye yol olarak, karbonhidrat metabolizmasında etkili olurlar. Protein sentezini inhibe edip (antianabolik etki), protein yıkımını artırarak (katabolik etki) protein metabolizmasını etkilerler. Yağ metabolizmasına ise yağ hücrelerine glukoz girişini azaltarak ve yüksek dozda lipolizi hızlandırarak etki yaparlar (51).

GK'lar suprafizyolojik konsantrasyonda akut ve özellikle kronik iltihap olayını inhibe ederler. Fizyolojik konsantrasyonlarda IgG ve IgE gibi humoral immuniteden sorumlu faktörlerin yapımını ve kandaki düzeyini etkilemezler. Kanda dolaşan immun lenfositlerin sayısını azaltırlar ve bu hücrelerin antijenle aktivasyonu sonucu meydana gelen ikincil olayları inhibe ederler. Rodentlerde lenfolitik etki yaparlar. Yüksek dozda ise, antikor oluşumunu azalttığından immunosupressif olarak, otoimmun hastalıkların tedavisinde ve organ transplantasyonunda transplatın reddini önlemek için kullanılırlar.

GK'lar fizyolojik dozlarda hematopoietik sistemde hemoglobin sentezini artırarak, eritrosit sayısını yükseltirler. Farmakolojik dozlarda ise lökosit migrasyonunu ve antikor sentezini inhibe ederek, immün cevapları supresse ederken, kandaki polimorfonükleer lökosit ve trombosit sayısını artırırılar. GK'ların arttığı durumlarda lenfopeni, eozinofil ve bazofil lökosit ve monositlerin sayısında azalma meydana gelir (51). GK'lar T lenfositlerde, ribozomal RNA sentezinde, DNA'da timidin birleşiminde ve glukoz alımında azalma, buna karşılık protein yıkımı ve DNA fragmentasyonunda artış meydana getirirler. GK tedavi, T lenfositlerin hücre siklusunu G<sub>1</sub> fazında bloke ederek sonuçta hücre ölümüne neden olmaktadır (54,55).

Organizmanın yaşamsal devamlığı için ölen ve yenilenen hücrelerin bir düzen içinde bulunması gerekmektedir. Hücre ölümünün belli bir düzende olmasına, programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apopitozis denilmektedir. Apopitozis çeşitli faktörlerin etkisi altında gelişir, Tablo 1'de gösterildiği gibi bu olayı uyaran ve baskılayan faktörler mevcuttur. GK'lar apopitozisi uyaran faktörlerdendir. Sekonder messenger'ları veya bunlara bağlı olarak gen transkripsiyonunu etkileyerek sitozolik Ca<sup>++</sup> yükselmesine neden olurlar. Sitozolik Ca<sup>++</sup> yükselmesi Ca<sup>++</sup>'a bağımlı endonükleaz, proteaz, transglutaminaz enzimlerinin aktivasyonunu sağlar. Sonuçta

DNA ve kromatinde fragmentasyon, hücre yapısında bozulma ve sitoplazmik proteinlerde değişim sonucu hücre ölümü ortaya çıkar. Bunun yanında gen transkripsiyonu sonucu yeni hücre yüzey belirleyicileri oluşmakta ve inflamasyon olmaksızın fagositoz oluşumuna neden olmaktadır (56-59).

Ayrıca GK'lar apoptotik aktiviteyi azaltan sitokinlerin etkilerini azaltarak, supressif veya uyaran protoonkogenlerin etkilerini düzenleyerek apoptozisi indirekt olarak uyaramaktadır (6,60-62). SB. Eastman-Reks ve WV Vedeckis GK'ların fare lenfoma hücrelerinde c-myc, c-myb, c-ki ras protoonkogenlerinin mRNA'sını, dolayısıyla bu protoonkogenleri inhibe etkilerini göstermişlerdir (63).

GK'lar malign hastalıkları içeren bir çok hastalığın tedavisinde kullanılır. İnvitro ve invivo çalışmalarda GKR bulunan insan malign hücre dizilerinde GK'ların etkisi Tablo 2'de görülmektedir. Tablo 3'de ise GKR bakılmaksızın GK etkileri görülmektedir.

GK'lar hematolojik hastalıklardan; lenfoblastik ve nonlenfoblastik lösemi, akut ve kronik otoimmün trombositopenik purpura, aplastik anemi, multiple myeloma gibi bir çok hastalığın tedavisinde tek başına veya kombine olarak değişik etkilerinden yararlanılarak kullanılabilirler (64). Hematolojik malign hastalıklarda, başlıca hücre lizisi etkisinden yararlanır. Bu etkide başlıca, apoptozisi uyarması ve hücre siklusunu bloke etmesi önemli rol oynar. Sonuçta hücre büyümesi durup, tümör kitlesi küçülebilir (6,11,12,54,55,57-59,63).

Ayrıca lösemide hücre differansiasyonunu sağladığı (65,66) ve granülosit makrofaj koloni stimulan faktör (GM-CSF) düzeyini artırdığı bildirilmektedir (67,68). Bu etkilerin artan dozlarda daha belirgin olduğu gözlenmiştir (7,9,65-69).

## MULTIPLE MYELOMA'DA GLUKOKORTİKÖİD TEDAVİ

GK'ların; IL-6 messenger RNA (mRNA) ve dolayısıyla IL-6 üretimini azaltarak, IL-6'yla meydana gelen otokrin büyümeyi baskıladığı, sekretuar tip Ig mRNA seviyelerini azaltarak M protein sekresyonunu ve başlıca osteoklast aktivatör faktör (OAF) olan IL-1 $\beta$ 'nın mRNA'sını azaltarak kemik resorpsiyonunu inhibe ettikleri bildirilmiştir (5). Beraberinde apoptozisi uyarak ve hücre siklusunu bloke ederek hücre ölümüne neden olup, dolayısıyla büyümeyi inhibe ettikleri gösterilmiştir (6,12,58). Ayrıca plasminojen aktivatörlerini de inhibe ettikleri belirtilmektedir (6).

GK'lar tek başlarına veya kombine olarak MM tedavisinde kullanılırlar. Şiddetli kemik iliği supresyonu veya alkali ajanlar gibi diğer ajanlara cevap alınmadığından dolayı tedavi şansı zayıf olanlarda prednisonun, özellikle yüksek dozda faydalı olduğu ve tümör kitlesinde %50'den fazla azalma sağladığı gözlenmiştir. Pansitopenili hastalarda hemoglobin, granülosit ve trombosit seviyelerini yükseltir, transfüzyon ihtiyacını azaltır ve hayat kalitesini yükseltir. Hiperkalsemi ve renal yetmezlik gibi

komplasyonları çabucak düzeltir. Alkali ajanlarda görülen sekonder lösemi, kemik iliği supresyonu gibi etkiler görülmez (7,69).

Diğer ajanlara cevap vermeyen ve relapstaki hastaların %40'ında , ilk tedavi olarak yüksek dozda deksametazon ile hastaların %70'inden fazlasında remisyon sağlandığı bildirilmektedir (1,3).

GK'lara hassas MM'da GKR ve GKR mRNA seviyelerinin yüksek buna karşılık, dirençli olanlarda her ikisinin'de düşük seviyede olduğu bildirilmiştir (1,6,10-12,70). GK tedavi ile GKR seviyelerinde doku türüne bağlı olarak değişiklikler tespit edilmiştir (6). Normal lenfositlerde, insan lösemi ve lenfoma hücrelerinde, He La ve Im-9 hücrelerinde glukokortikoid tedavi ile GKR down regülasyonu sonucu, GKR düzeyi azalırken, insan lösemik T hücre serilerinde (CEM-C7) up-regulasyon sonucu GKR ve GKR m-RNA 'sının arttığı gösterilmiştir (71,72). MM'de ise GK tedavi ile GKR ve GKR mRNA seviyelerinin arttığı bildirilmiştir (12). Donel-Morre ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, GKR'lerinin insan myelom hücrelerinde doksurobisin ile baskılandığı ancak deksametazon tedavisi sonrası GKR ve GKR mRNA seviyelerinin düzelenerek, sensitivitenin arttığı gözlenmiştir (73). Refrakter myelomada yüksek dozda prednison ile resistansın düzeldiği ve tümör kitlesinin küçüldüğü bildirilmektedir (1,79).

Hastaların hepsi başlangıçta steroid tedaviye cevap vermez veya tedavi esnasında direnç gelişebilir. Bu durumda hücre sitoplazmasında bulunan GKR sayısında azalma ve/veya yokluğu, GKR'ün hormon bağlayan alanında defektler söz konusu olabilir. Yapılan çalışmalarda GKR eksikliği ve defekti olmaksızın glukokortikoidlere yanıtızsızlık olduğu gözlenmiştir. Bu durumda GKR mRNA'sında değişiklikler bulunmuştur. Sonuçta direnç gelişiminde reseptör sonrası mekanizmaların rol oynadığı bildirilmiştir (1,6,10-12,74).

Ayrıca başlıca mitokondrial enerji metabolizmasına etkili bcl-2 onkogeni ve MDR-1 gen kodlarını içerip ilaçların hücre dışına çıkmasını sağlayan P- glikoprotein, GKR'ların normal olmasına rağmen GK'ların etkilerini azaltarak apoptotik aktiviteyi azalttığı gözlenmiştir (23,24,75,76). Myelom hücrelerinin bir kısmında GK'ların etkilerinin transforming growth faktör beta-1 (TGF  $\beta_1$ ) seviyeleriyle ilişkili olduğu ve TGF  $\beta_1$  seviyelerindeki azalmanın deksametazonun büyümeyi inhibe edici etkisini bloke edebildiği bildirilmiştir (77).

J. Hardin ve arkadaşları yaptığı bir çalışmada, deksametazonun düşük konsantrasyonda IL-6'yı bloke ettiğini ancak IL-6 reseptörünü ( IL-6R) bloke etmediğini, yüksek konsantrasyonlarda ise her ikisini de bloke ettiğini, bundan dolayı düşük konsantrasyonda tümör etrafındaki dokulardan çıkan IL-6'nın parakrin etkiyle deksametazonun meydana getirdiği myelom hücre ölümünü engellediği, yüksek konsantrasyonda ise bu durumun çok az gerçekleştiğini gözlemişlerdir (78).

**TABLO 1: APOPİTOZİSİ UYARAN ve İNHİBE EDEN FAKTÖRLER (58)**

UYARANLAR		İNHİBE EDENLER
- Glukokortikoidler		- Yaşamsal faktörler
-Yaşamsal faktörlerin yetersizliği		CSF s
- Negatif düzenleyiciler (TNF, TGF $\beta_1$ )		interleukinler (I,II,III,IV,VI)
- Tümör supressör gen ( Wild- type p53)	PROGRAMLI	- Hücre ölümünü suprese eden genler
- Diğer genler ( regüle olmayan c-myc Adenovirus E1A C. elegans ced 3,ced 4)	HÜCRE ÖLÜMÜ ( APOPİTOZİS)	bcl - 2
- Hücre yüzey antijenlerine karşı olan antikorlar ( Apo-1 (=Fos),CD3)		EBV-LMP 1
- Sitotoksik antikanser ajanlar		Mutant p 53
- Topoisomerez I inhibitörü CPT		Adenovirus E1B 19 kd
- Topoisomerez II inhibitörü Novobiocin		Adenovirus E3 14.7 kd
		Herpesvirus
		Gamma 1 34,5
		Boculovirus p 35
		C.elegans ced 9
		Tümör promotörleri TPA
		- Cyloheximide
		- D Actinomycin
		- Çinko iyonları

TNF : Tümör nekrozis faktör

TGF  $\beta_1$  : Transforming growth- factor  $\beta_1$

CSF s : Colony - stimulating factors

TPA : Tümör promoting phorbol ester 12-0-tetra-decanoly- phorpol 13- acetate

bcl-2 : B cell lösemi veya lenfoma genleri

C. elegans Ced 3, Ced 4: Caenorhabditis elegans ced 3, ced 4.



**TABLO 2: GLUKOKORTİKÖİD RESEPTÖR BULUNAN HÜCRE DİZİLERİNDE GK ETKİLERİ (6)**

<u>Doku Tipi</u>	<u>GK Etkisi</u>
Meme	: Timidine birleşiminin ve proliferasyonun inhibisyonu, hücre çeşitliliğinin azalması. EGF-EGF bağlanmasının uyarılması
Akciğer Adenokarsinom	: Tümör büyüklüğünde azalma.
Akciğer Alveolar karsinom	: Büyümenin ve timidine birleşiminin inhibisyonu.
Kolon	: Proliferasyonun ve Tyhimidine birleşiminin inhibisyonu.
Tükürük bezi	: Büyümenin inhibisyonu
Melanoma	: Tümör büyüklüğünde azalma, büyümenin inhibisyonu, G <sub>1</sub> ve G <sub>2</sub> /M fazında durma. 4 saatlik inkübasyonda DNA sentezinin uyarılması, 18 saatlik inkübasyonda DNA sentezinin inhibisyonu, melanogenesis'n, tiroisine aktivitesinin ve L-Dopa birleşiminin uyarılması.
Santral Sinir Sist. Tümörü	: Yüksek doz deksametazon ile büyümenin inhibisyonu, düşük doz dexamethazonla büyümenin uyarılması.
Leiomyosarcoma	: İn vivo büyüme inhibisyonu, invitro büyümenin uyarılması.
Fibrosarcoma	: Yüksek dozda invivo ve invitro büyümenin inhibisyonu, düşük dozda invivo büyümenin uyarılması. fibronectin sentezinin uyarılması.
Cerviks uteri	: Büyüme inhibisyonu veya uyarılması, G <sub>1</sub> fazında durma, GKR'de down regulasyon, HPV 16 gene üretimi, ras onkogen'i belirmesi, EGF-r seviyelerinde artış.
ALL	: Hücre lizisi, proliferasyonun inhibisyonu, G <sub>1</sub> fazında durma, kolesterol sentezinin, nükleoside ve glukoz alımının, protein sentezinin ve IL-2 üretiminin inhibisyonu, glutamin sentezinin belirginleşmesi, GKR-mRNA seviyesinde artma veya azalma, GKR up veya down regulasyonu, c-myc ve c-myb m-RNA 'sının baskılanması.
NALL	: Koloni oluşumunun inhibisyonu, glukoz transportunun stimülasyon veya inhibisyonu, aminoasit birleşiminin inhibisyon veya stimülasyonu, hücrelerin yaşama yeteneği (ömrü) artar veya azalır.
Lenfoma	: Hücre lizisi, nükleosid alımının inhibisyonu, EBV 'ın meydana çıkması, IL-1'in inhibisyonu.
Myeloma	: Hücre ölümü, büyümenin, plasminojen aktivatörlerinin, immunglobulin sekresyonunun inhibisyonu, GKR mRNA seviyesinde artma.

ALL : Akut lenfoblastik lösemi

EGF : Epidermal growth faktör

ANLL : Akut nonlenfoblastik lösemi.

EGF-r : Epidermal growth faktör reseptör

GKR : Glukokortikoid reseptör

EBV : Ebstein-Barr virus

HPV : Human papiloma virus.

**TABLO 3 : GLUKOKORTİKÖİD RESEPTÖR BAKILMAKSIZIN İNSAN MALİGN HÜCRELERİNDE GK ETKİLERİ (6)**

<u>Doku Tipi</u>	<u>GK etkileri</u>
AL	: Mitokondrial dejenerasyon
ALL	: DNA fragmantasyonu
KLL	: Hücre lizisi, DNA fragmantasyonu, NAD ve APT azalması
KML	: DNA fragmantasyon
Sarkom	: Hücrelerin çekirdek ve mitokondri büyüklüğünde artma, mitokondri sayısında azalma.
Astrocytoma	: Büyümenin durması, fragmantasyonun artması, hücre yüzeyinin değişimi
Cerviks uteri	: HPV 18 gen üretiminin ortaya çıkması ras onkogeni malign dönüşümünün artması.
Hepatoma	: Sitokrom P 450 gen oluşumunda artma.
Kolon	: Ras onkogeniyle malign dönüşümünün artması.

AL: Akut undifferansiye lösemi.

ALL: Akut lenfoblastik lösemi

KLL: Kronik lenfositer lösemi

KML: Kronik miyelositer lösemi

## MATERYAL VE METOT

### MATERYAL ve GEREÇLER

Bu tez çalışması, KTÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları kliniğinde yatan MM'li hastalardan elde edilen plazma hücreleri ve NS<sub>1</sub>, SP<sub>2</sub> fare myeloma hücre dizileriyle hematoloji laboratuvarındaki sistemlerden faydalanarak yapıldı.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesi sırasında Multiple myelomalı insan kemik iliği hücreleri, SP<sub>2</sub> myeloma hücre dizileri (non-secreting myeloma, mouse, G. Kohler and C.Milstein medikal research council laboratory of molecüler biology, Cambridge, England . No: ATCC CRL 1581), NS<sub>1</sub> myeloma hücre dizileri (myeloma non-secreting, mouse, G. Kohler Basal institute for immunology Basel, Switzerland. No: ATCC TIP18) kullanıldı.

Hastalardan elde edilen plazma hücreleri ve NS<sub>1</sub>, SP<sub>2</sub> fare myeloma hücre dizilerinde metilprednisolonun doza bağlı etkilerini araştırmak üzere planlanan bu çalışma için; ilk olarak Temmuz 1993 ile Ağustos 1995 yılları arasında iç hastalıkları kliniğinde MM tanısı konarak, henüz tedavi görmemiş 15 hasta alındı. Tablo 4'de diğer özellikleri belirtilen hastaların yaşları 55-75 arasında olup 8'i kadın, 7'si erkekti. 8 hasta IgG tipi, 5 hasta IgA tipi, 2 hasta ise kappa hafif zincir tipi MM idi. İkinci bir grup olarak da, özellikleri belli olan Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji bölümünden alınıp sıvı nitrojen içinde bekletilen NS<sub>1</sub> ve SP<sub>2</sub> fare myeloma hücre dizileri çalışma için kullanıldı.

Ayrıca; sıvı kimyasallar olarak da Ficoll-Hypague (Lymphocyte separation medium 13010-012, Gibco BRL.), RPMI medium 1640 (041-01875 M Gibco), Fetal Calf Serum (011-06290 H Gibco), Penicilin-Streptomisin (061-5140 Gibco), Metilprednisolon (prednol-L, Mustafa Nevzat ilaç sanayi), Heparin (Liquemine, Roche), DNA prep reagents (Coulter PN 6604452: 3x70ml DNA-prep stain, 1x22ml DNA-prep LPR, 1x0,5ml DNA-prep reference), Serum fizyolojik (SF) %0.9, PBS (Phosphate buffer saline: 0.8 gr NaCl, 0.144 gr Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>, 0.02 gr KCl, 0.02 gr KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>, 80 ml distile su), TBE solusyonu: Tris base 54 gr, Boric acid 27.5 gr, 0.5 m EDTA 20 ml, Monidet (NP 40 Sigma N-6507), RNaz A (Sigma R 4875),

Proteinaz K (Sigma P 4914), Loading buffer: %0.25 bromfenol blue, %0.25 Xylene cyanol, %30 glycerol, Agarose jel (Sigma A-9539), Ethidium bromide (Sigma E-8751) den faydalanıldı.

Bunlara ilave olarak; Laminer air flow (Heareus ELB 2448), Zaman ayarlı santrifüj (Heareus Medifuje), PCO<sub>2</sub> inkübatör (Thermolyne Compact CO<sub>2</sub> Series 5000), Kan sayım cihazı (System 9000 Hematology Analyzer), Otoanalizör (Technican RA-X Serono), Epics Elite-ESP Flowcytometry (Coulter), DNA prep workstation (Epics Leucoyte Prepration Workstation, Coulter), Multicycle DNA analiz programı (Phonenix Flow Systems), Corning Cell Wells (24 Well 25820), Corning Cell Flask, Pastör pipeti, Steril disposable farklı büyüklükte enjektörler, Steril santrifüj tüpü (Nunc 348232 mm vida kapaklı), Steril 15ml'lik konik tüp, Cama yazar kalem, Beher, Elektroforez tankı (Hoefer - HE 33), Ultraviole lambası (Haefer Nighty Bright UVTM-19), Binoküler araştırma mikroskopu (Olympus CHS No 7E0133), Invert Mikroskop (SOIF XSZ-D2) dan da yararlanıldı.

Gerek MM'li hastalardan, gerekse NS<sub>1</sub> ve SP<sub>2</sub> fare myeloma hücre dizilerinden metot kısmında detaylı olarak belirtildiği gibi elde edilen plazma hücreleri, çoğaltılmak üzere hücre kültür ortamına alındı. Plazma hücreleri yeterli sayıya ulaştığında, içerisinde değişik dozlarda metilprednisolon bulunan hücre kültür ortamına ilave edildi. 72 saatlik inkübasyon periyodundan sonra metilprednisolonun değişik dozlardaki konsantrasyonunun hücre siklusu, apoptosiz, hücre sayısı, LDH üzerine olan etkileri araştırıldı.

Tablo 4: MM'li vakaların özellikleri

Hasta Adı	Protokol No	Yaş	Cins	MM. Tipi	Hb (gr/dl)	Ca (mg/dl)	PKreatini (mg/dl)	BJ	Litik Lezyon
E.G.	301518	60	K	IgG	8.7	9.0	4	+	≤3
İ.A.	265625	65	E	IgG	7.8	8.8	2.4	+	≤3
M.P.	319660	70	E	IgG	9.9	9.3	1.4	+	≤3
F.Ö.	305146	66	K	IgG	10	11.2	2.8	-	≤3
M.G.	325091	75	E	IgG	8.8	9.5	1	+	-
N.A.	243361	65	K	IgG	9.7	9.1	1	-	≤3
E.K.	04430	63	K	IgG	9.8	9.3	2.8	+	≤3
K.D.	302918	69	K	IgG	10.8	9.0	1.7	-	-
S.A.	330950	60	K	IgA	8.1	9.4	1.6	-	-
A.S.	224241	69	E	IgA	8.0	9.7	2.9	-	-
O.K.	276226	65	E	IgA	8.5	9.9	1.5	+	≤3
H.Y.	335272	55	E	IgA	10.1	9.2	1	+	≤3
H.B.	253363	74	E	IgA	7.9	9.3	1.1	+	≤3
H.B.	327668	55	K	Kappa hafif zincir	7.9	9	3.6	+	-
F.N.	318154	60	K	Kappa hafif zincir	8.7	9.2	1.8	+	≤3

## METOT

### *Kemik İliğinden Plazma Hücresi İzolasyon Yöntemi*

Hastalardan plazma hücresi elde etmek için, spina iliaca posterior superior'dan steril heparinize (50 $\mu$ /ml) enjektör ile kemik iliği alındı. Ficoll dansite gradyent yöntemi ile mononükleer hücreler ayrıldı ve elde edilen hücreler ortalama her bir kuyucuğa 1 hücre düşecek şekilde, her hasta için 96'lı plaklara ekildi (Medium içeriği: RPMI-1640+%10 Fetal calf serum+100'ü kristalize penisilin/ml+100 $\mu$ gr. Streptomisin/ml). Ve 72 saat %5 CO<sub>2</sub> basıncı altında 37°C de inkübe edildi. Plazma hücresi saptanan (ışık mikroskopu ile) kuyucuklardaki hücreler pastör pipeti ile aspire edilerek çoğalmaları için 10 gün süre ile %5 CO<sub>2</sub> basıncı altında 37°C de inkübe edildi. Bu sürenin sonunda 1 cc'de 5.000.000 olacak şekilde süspansiyon hazırlandı (79). Bu süspansiyondan yapılan yaymalarda plazma hücre oranlarının % 95'in üzerinde olup olmadığı kontrol edildi.

### *NS<sub>1</sub> ve SP<sub>2</sub> Fare Myeloma Hücre Dizilerinin Hazırlanışı*

Sıvı nitrojen içinde bekletilen NS<sub>1</sub> ve SP<sub>2</sub> fare myeloma hücre dizileri, çözüldükten sonra RPMI ilave edilip, 500g'de santrifüj edilerek, üstte kalan dimetilsülfoksit içeren kısmı atıldı. Çökertilen hücreler, kültür tüplerine hazırlanan RPMI, %10 Fetal calf serum, 100 ünite/ml penisilin kristalize, 100 $\mu$ gr/ml streptomisin içeren kültür ortamında, 37°C ve %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda çoğalmaya alındılar. 72 saat'lik inkübasyon sonucunda yeterli çoğalma gözlenen hücreler, çalışma için hazırlandı (79).

### *Kültür Ortamı ve Gruplarının Oluşturulması*

Çalışmamızda RPMI 1640 ana vasat olarak kullanılarak ortama %10 oranında fetal calf serumu ve 100 ünite/ml kristalize penisilin, 100 $\mu$ gr/ml streptomisin ilave edildi. Hazırlanan bu kültür ortamı, 24'lük kültür plağının, her plağına son volümü 2 cc olacak şekilde dağıtıldı. Bu kültür ortamını beş gruba ayrılarak herbirine değişik dozlarda metilprednisolon eklendi:

- 1-Grup A: Kontrol grubu (serum fizyolojik steroid miktarında eklendi.)
- 2-Grup B: 25 $\mu$ gr/ml metilprednisolon
- 3-Grup C: 2,5 $\mu$ gr/ml metilprednisolon
- 4-Grup D: 0,5 $\mu$ gr/ml metilprednisolon
- 5-Grup E: 0,125  $\mu$ gr/ml metilprednisolon

Her bir plakta ml'de 5x10<sup>4</sup> hücre olacak şekilde yukarıda tariflenen grupların her birinden, bir insan myeloma olgusu için 4, bir hücre dizisi (NS<sub>1</sub> veya SP<sub>2</sub>) için

12'şer örnek hazırlandı. Kültür ortamı 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> içeren nemli ortamda 72 saat inkübe edildi.

### ***Sonuçların Değerlendirilme Yöntemi***

#### **Hücre Sayısı**

72 saat inkübasyon sonrasında hücrelerin sayısı kan sayımı cihazı ile ölçülüp, toma lamıyla doğruluğu kontrol edildi.

#### **LDH Düzeyinin Saptanması**

72 saat inkübasyon sonrası LDH düzeylerini technicon RA-X otoanalizer ile ölçüldü. LDH düzeyi hücre viabilitesi ve metabolik aktivitesinin bir göstergesi olarak analiz edilmiştir (41,80).

#### **DNA Elektroferez'i ile apopitozisin saptanması**

500g'de 5 dk santrifüjle çökertilerek elde edilen hücrelere, 1ml PBS ilave edilerek, tekrar 5 dk santrifüj edildi. Üste kalan PBS döküldü. Alta kalan hücrelere 0.5 ml yarı yarıya saf su ile sulandırılmış TBE solusyonu, 1.25µl nonidet 170 (% 0.25), 5µl RNaz A ilave edilerek 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Sonra 100µl proteinaz K(5 mg/ml) ilave edilerek 37°C'de tekrar 30 dk inkübe edildi. Takiben 100 µl Loading buffer ilave edilerek hücreler elektroforeze hazır hale getirildi. Bu hazırlanan materyal hazırlanmış %1.5 agaroze jel üzerindeki her bir kuyucuğa 25µl olacak şekilde konuldu. 20 voltta 6 saat DNA elektroforezi yapıldı ve takiben 30 dk Ethidium bromidle (5µg/ml) ile boyanmaya alındı. 30 dk beklendikten sonra ultraviyola altında DNA özellikleri izlendi. Elektrofrezde gözlenen DNA fragmentasyonu apopitozis olarak değerlendirildi (81).

#### **Flovsitometre ile DNA indeksleri ve apopitozisin saptanması**

Hücrelerin G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>/M ve sentez safhasındaki yüzdeleri saptanarak, apopitotik pik yüzdesi ölçüldü. Flovsitometre ile çalışma için inkübasyon sonrası elde edilen hücreler, PBS ile yıkandı ve hücre sayıları en az 1x10<sup>6</sup>/ml olacak şekilde ayarlandı. Hücreler daha sonra "DNA-prep work station" da işleme tabi tutuldu. Bu işlem sırasında otomatize olarak 1. solusyon olan LPR solusyonu ile hücre membran permeabilitesi artırılarak, 2. solusyon olan DNA-prep stain ilave edildi. Bu solusyonda kırmızı floresan içeren promidium iodide (PI) ve ribonükleaz bulunmakta olup, LPR solusyon ile membranında porlar açılmış hücrelerin DNA ve RNA'sının PI'le boyanması sağlandı. Ribonükleaz vasıtasıyla boyanmış olan RNA'ların ortadan kaldırılması sağlandı. Böylece DNA içeriğinin PI'le işaretlenmesi amaçlandı. 15 dk'lık PI ile inkübasyondan sonra flovsitometre'de X ekseninde PmT-4 peak ve Y ekseninde PmT-4 integral kullanılarak çalışmaya alınacak hücre grupları

kapıyla belirlendi. Böylece doubled (çift) hücreler elimine edildikten sonra PmT-4 integral X ekseninde, hücre sayısı Y ekseninde yer alacak şekilde grafiklendirildi. Çıkan sonuçların değerlendirilmesi multi-cycle DNA analiz programıyla yapıldı (82).

Pİ ile daha az boyanan hücrelerin yaptığı hipodiploidik pik, apoptotik pik olarak belirlendi ve ölçümü multi-cycle DNA analiz programıyla yapıldı. Yapılan çalışmalar Pİ ile yapılan ölçümlerin apoptozisin saptanmasında en az diğer yöntemler kadar hassas olduğunu belirtmekle birlikte (83), biz DNA elektroforeziyle apoptozis saptadığımız olgularda apoptotik pik yüzdesini flovsitometre ile ölçmeyi yeğledik.

### *İstatistiksel Değerlendirme*

Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma (SD) olarak verilmiş olup gruplar arası karşılaştırmada iki eş arasındaki farkın önemlilik testi (paired-T) kullanıldı ve  $P < 0.05$  anlamlı olarak kabul edildi.



## BULGULAR

Çalışmaya alınan hastalardan elde edilen plazma hücrelerinin flovsitometre ile yapılan DNA analizi sonucunda, 8 hastada (6 hasta IgG, 2 hasta IgA) DNA indeksi  $1,4\pm 0,2$  olan aneuploidi tespit edildi, 7 hastada (2 hasta IgG, 3 hasta IgA, 2 hasta kappa hafif zincir) aneuploidi mevcut değildi. Ayrıca NS<sub>1</sub> ve SP<sub>2</sub> fare myeloma hücre dizilerinden sadece SP<sub>2</sub> fare myeloma hücre dizilerinde spontan apopitozis mevcuttu. Sonucta dört değişik özellikteki myelom hücre dizilerinde metilprednisolonun ayrı ayrı hücre sayısı, LDH, hücre siklusu, apopitozis ve aneuploidi üzerine etkileri tespit edildi.

Tablo 5,6,7,8 ve grafik 1,2,3,4'de elde edilen sonuçlar ve anlamlılıkları özetlenmiştir.

Aneuploidi tespit edilen hastalarda, kontrol grubu olan A grubuna göre, B grubunda (25 µgr/ml metilprednisolon) hücre sayısı ( $\times 10^3$  ml)  $507.5\pm 190.5$ 'den  $350\pm 159.3$ 'e ( $P<0.001$ ), LDH düzeyi (U/L)  $21.5\pm 9.4$ 'den  $17.8\pm 13.3$ 'e ( $P<0.05$ ), G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> hücre yüzdesi  $94\pm 1.9$ 'dan  $92\pm 1.4$ 'e ( $P<0.05$ ), G<sub>2</sub>/M hücre yüzdesi  $2.3\pm 1.2$ 'den  $1.8\pm 1.7$ 'ye ( $P<0.05$ ), aneuploidili hücre yüzdesi  $24.9\pm 14.3$ 'den  $18.5\pm 12.8$ 'e ( $P<0.05$ ) azalma gösterirken, S hücre yüzdesi  $3.6\pm 1.9$ 'dan  $5.7\pm 0.8$ 'e ( $P<0.05$ ) yükselmiş olup, apopitotik hücre yüzdesinde değişiklik tespit edilemedi. Kontrol grubuyla (A), C grubu (0,5 µgr/ml metilprednisolon) karşılaştırıldığında, kontrol grubuna göre hücre sayısı  $382.5\pm 189$ 'a ( $P<0.01$ ), LDH düzeyi  $15.7\pm 11.4$ 'e ( $P<0.05$ ), G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> hücre yüzdesi  $92.4\pm 1.3$ 'e ( $P<0.05$ ), G<sub>2</sub>/M hücre yüzdesi  $1.7\pm 0.8$ 'e ( $P<0.05$ ) azalırken, aneuploidik ve apopitotik hücre yüzdesinde anlamlı değişiklik tespit edilemedi. Kontrol grubuyla (A), D grubu (0,5 µgr/ml metil prednisolon) karşılaştırıldığında, hücre sayısı  $385.5\pm 183$ 'e ( $P<0.01$ ), LDH düzeyi  $17.1\pm 10.8$ 'e ( $P<0.05$ ), G<sub>2</sub>/M hücre yüzdesi  $1.9\pm 0.8$ 'e ( $P<0.05$ ) azalırken, S hücre yüzdesi  $4.9\pm 1.9$ 'a ( $P<0.05$ ) yükselmiş olarak saptandı. G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> aneuploidi ve apopitotik hücre yüzdesinde anlamlı değişiklik tespit edilemedi. E grubunda (0,125 µgr/ml metilprednisolon) ise hücre sayısı  $382.5\pm 162.7$ 'ye ( $P<0.01$ ), LDH düzeyi  $16.3\pm 10.9$ 'a ( $P<0.05$ ) azalmış olup, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>/M, S, aneuploidili ve apopitotik hücre yüzdesinde anlamlı değişiklik tespit edilemedi.

Gruplar arası karşılaştırmada ise, hücre sayısı, LDH düzeyi ve apopitotik hücre yüzdesi arasında gruplar arasında istatistiksel fark yoktu. G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> hücre

yüzdesinde B ve C grubunda, D ve E grubuna göre,  $G_2/M$  hücre yüzdesinde ise B, C ve D gruplarında E grubuna göre azalma mevcuttu ( $P<0.05$ ). S hücre yüzdesinde ise B ve C gruplarında E grubuna göre artma mevcuttu ( $P<0.05$ ). Aneuploidi hücre yüzdesinde ise sadece B grubunda C, D ve E gruplarına göre azalma tespit edildi ( $P<0.05$ ). C, D ve E grupları arasında ise fark yoktu. Apoptotik hücre yüzdesi, gruplar arasında farklı değildi.

Aneuploidi tespit edilemeyen hastalarda kontrol grubunu oluşturan A grubuna göre, B grubunda, hücre sayısı  $781.8\pm112.4$ 'den  $514.5\pm42.9$ 'a ( $P<0.01$ ), LDH düzeyi  $21.1\pm1.1$ 'den  $18\pm6.9$ 'a ( $P<0.05$ ),  $G_0/G_1$  hücre yüzdesi  $88\pm2.4$ 'den  $84.4\pm9.7$ 'ye ( $P<0.05$ ),  $G_2/M$  hücre yüzdesi  $4.7\pm1.5$ 'den  $2.3\pm1.8$ 'e ( $P<0.05$ ) azalırken, S hücre yüzdesi  $6.6\pm2.6$ 'dan  $13.2\pm11$ 'e ( $P<0.05$ ) yükselmiş ve apoptotik hücre yüzdesi anlamlı olarak değişmemişti. Kontrol (A) grubuyla, C grubu, D grubu, E grubu arasında ise hücre sayısı C grubunda  $502.7\pm16.7$ 'ye ( $P<0.01$ ), D grubunda  $532\pm43.6$ 'ya ( $P<0.01$ ), E grubunda  $500.9\pm28.7$ 'ye ( $P<0.01$ ), LDH düzeyi C grubunda  $18.5\pm9$ 'a ( $P<0.05$ ), D grubunda  $17\pm10$ 'a ( $P<0.05$ ), E grubunda  $18\pm8$ 'e ( $P<0.05$ ) azalırken,  $G_0/G_1$ ,  $G_2/M$ , S, apoptotik hücre yüzdesinde anlamlı değişiklikler tespit edilemedi.

Gruplar arası karşılaştırmada ise, hücre sayısı, LDH düzeyi ve apoptotik hücre yüzdesinde, gruplar arasında anlamlı değişiklik tespit edilemedi.  $G_0/G_1$  hücre yüzdesinde B grubunda, C, D ve E grubuna göre azalma gözlenirken ( $P<0.05$ ), C, D ve E grupları arasında farklılık saptanmadı.  $G_2/M$  hücre yüzdesinde ise sadece B grubu E grubuna göre azalmıştı ( $P<0.05$ ). S hücre yüzdesinde ise B grubunun C, D ve E grubuna göre daha yüksek olduğu tespit edilirken ( $P<0.05$ ), C, D ve E grupları arasında farklılık gözlenmedi.

NS<sub>1</sub> fare myeloma hücre dizilerinde kontrol (A) grubuna göre B grubunda hücre sayısı  $739\pm61.9$ 'dan  $475\pm135.5$ 'e ( $P<0.01$ ), LDH düzeyi  $52\pm24.2$ 'den  $45.5\pm19.5$ 'e ( $P<0.01$ ),  $G_0/G_1$  hücre yüzdesi  $38.9\pm10.3$ 'den  $32.5\pm5.1$ 'e ( $P<0.05$ ),  $G_2/M$  hücre yüzdesi  $5.5\pm5.9$ 'dan  $2.4\pm2.5$ 'e ( $P<0.05$ ) azalırken, S hücre yüzdesinin  $54.4\pm8.2$ 'den  $67.6\pm3.7$ 'ye ( $P<0.05$ ) yükseldiği ve apoptotik hücre yüzdesinin anlamlı olarak değişmediği saptandı. C grubunda da benzer şekilde hücre sayısı  $409.2\pm49.9$ 'a ( $P<0.05$ ), LDH düzeyi  $46\pm20.8$ 'e ( $P<0.01$ ),  $G_0/G_1$  hücre yüzdesi  $33\pm4.2$ 'ye ( $P<0.05$ ),  $G_2/M$  hücre yüzdesi  $2.3\pm3$ 'e ( $P<0.05$ ) azalırken, S hücre yüzdesinin  $60.9\pm6.3$ 'e ( $P<0.05$ ) yükseldiği ve apoptotik hücre yüzdesinin anlamlı değişmediği saptandı. D ve E gruplarında ise kontrol (A) grubuna göre, D grubunda hücre sayısının  $378.5\pm80.1$ 'e ( $P<0.05$ ), LDH düzeyinin  $50.5\pm24.2$ 'ye ( $P<0.05$ ) E grubu hücre sayısının  $453\pm45.8$ 'e ( $P<0.05$ ), LDH düzeyinin  $50.3\pm25.6$ 'ya ( $P<0.05$ )

azaldığı saptandı. D ve E grubunun her ikisinde de  $G_0/G_1$ ,  $G_2/M$ , S ve apoptotik hücre yüzdesinde anlamlı değişiklikler tespit edilemedi.

Gruplar arası karşılaştırmada ise  $G_0/G_1$  hücre yüzdesinde D ve E grubuna göre B ve C grubunda,  $G_2/M$  hücre yüzdesinde ise E grubuna göre B ve C grubunda azalma tespit edildi ( $P < 0.05$ ). S hücre yüzdesinde ise sadece B grubunda D ve E grubuna göre yükselme saptandı ( $P < 0.05$ ). Apoptotik hücre yüzdesi, hücre sayısı ve LDH düzeyinde anlamlı değişiklik tespit edilemedi.

SP<sub>2</sub> fare myeloma hücre dizilerinde kontrol grubuna (A) göre. B grubunda hücre sayısı  $1328.8 \pm 168.2$ 'den  $1048.8 \pm 103$ 'e ( $P < 0.001$ ), LDH düzeyi  $82.7 \pm 18.6$ 'dan  $71.4 \pm 17.8$ 'e ( $P < 0.05$ ),  $G_0/G_1$  hücre yüzdesi  $36.2 \pm 3.4$ 'den  $33 \pm 7.4$ 'e ( $P < 0.05$ ) azalırken, apoptotik hücre yüzdesinin  $8.4 \pm 7$ 'den  $14.5 \pm 7.6$ 'ya ( $P < 0.05$ ) yükseldiği tespit edildi.  $G_2/M$  ve S yüzdesinde anlamlı değişiklik mevcut değildi. Benzer şekilde C grubunda hücre sayısı  $1023 \pm 186$ 'ya ( $P < 0.001$ ), LDH düzeyi  $70.6 \pm 16.1$ 'e ( $P < 0.05$ ),  $G_0/G_1$  hücre yüzdesi  $32 \pm 6.2$ 'ye ( $P < 0.05$ ) azalırken, apoptotik hücre yüzdesinin  $13.4 \pm 6.3$ 'e ( $P < 0.05$ ) yükseldiği saptandı.  $G_2/M$  ve S hücre yüzdesinde anlamlı değişiklik mevcut değildi. D grubunda hücre sayısı  $1135 \pm 155$ 'e ( $P < 0.05$ ), LDH düzeyi  $70.6 \pm 16$ 'ya ( $P < 0.05$ ), E grubunda da benzer şekilde hücre sayısı  $1161.8 \pm 106$ 'ya ( $P < 0.05$ ), LDH düzeyi  $71.8 \pm 15.6$ 'ya ( $P < 0.05$ ) azalırken,  $G_0/G_1$ , S,  $G_2/M$ , apoptotik hücre yüzdesinde her 2 grupta da anlamlı değişiklik tespit edilemedi.

Gruplar arası karşılaştırmada ise, hücre sayısı ve  $G_0/G_1$  hücre yüzdesinin B ve C grubunda D ve E grubuna göre azaldığı ( $P < 0.05$ ), buna karşılık diğer gruplar arasında fark olmadığı saptandı.  $G_2/M$ , S ve apoptotik hücre yüzdesinde ise gruplar arasında istatistiksel fark tespit edilemedi.

İnsan ve NS<sub>1</sub>, SP<sub>2</sub> fare myeloma hücre dizilerinde yapılan DNA elektroforezinde, NS<sub>1</sub> fare myeloma hücre dizilerinde ve insan myeloma örneklerinde apoptozis gözlenmezken, SP<sub>2</sub> fare myeloma hücre dizilerinde kontrol grubunda spontan apoptozis saptanmış ve üste özetlendiği gibi flovisitometre ile yapılan analizde spontan apoptozisin B ve C gruplarında indüklendiği gözlenmiştir.

Tablo 5: Aneuploidi tespit edilemeyen vakalarda metil prednisolon'un hücre siklusu, apoptozis, hücre sayısı, LDH düzeyi üzerine etkileri.

Gruplar	G0/G1 (%)	G2/M (%)	S (%)	Apoptotik Pik (%)	Hücre Sayısı (x10 <sup>2</sup> /ml)	LDH (U/L)
A Kontrol	88±2.4	4.7±1.5	6.6±2.6	0.3±0.6	781.8±112.4	21.1±1.1
B (25µgr/ml)	84.4±9.7	2.3±1.8	13.2±11	0.7±1.6	514.5±42.9	18±6.9
C (2.5µgr/ml)	88.5±2.9	3.5±2.7	7.5±3.6	0.2±0.3	502.7±16.7	18.5±9
D (0.5µgr/ml)	89.6±3.5	3.8±2.4	6.4±3.8	0.4±0.2	532±43.6	17±10
E (0.125µgr/ml)	88.5±2.3	4.8±2.2	6.6±1.3	0.2±0.3	500.9±28.7	18.4±8
Grupların istatistiksek karşılaştırılması						
A-B	P<0.05	P<0.05	P<0.05	AD	P<0.01	P<0.05
A-C	AD	AD	AD	AD	P<0.01	P<0.05
A-D	AD	AD	AD	AD	P<0.01	P<0.05
A-E	AD	AD	AD	AD	P<0.01	P<0.05
B-C	P<0.05	AD	P<0.05	AD	AD	AD
B-D	P<0.05	AD	P<0.05	AD	AD	AD
B-E	P<0.05	P<0.05	P<0.05	AD	AD	AD
C-D	AD	AD	AD	AD	AD	AD
C-E	AD	AD	AD	AD	AD	AD
D-E	AD	AD	AD	AD	AD	AD

AD: Anlamlı Değil.

Tablo 6: Aneuploidi tespit edilen vakalarda metilprednisolon'un hücre siklusu, apoptozis, hücre sayısı, LDH düzeyi üzerine etkileri.

Gruplar	G0/G1 (%)	G2/M (%)	S (%)	Apopitotik Pik (%)	Aneuploidi (%)	Hücre Sayısı (x10 <sup>2</sup> /ml)	LDH (U/L)
A Kontrol	94±2.9	2.3±1.2	3.6±1.9	1.5±1.8	24.9±14.3	507.5±190.5	21.5±9.4
B (25µgr/ml)	92±1.4	1.8±1	5.7±0.8	1.4±2.5	18.5±12.8	350±159.3	17.8±13.3
C (2.5µgr/ml)	92.4±1.3	1.7±0.8	5.7±2.1	1.2±1.6	25.8±24	382.5±189	15.7±11.4
D (0.5µgr/ml)	93.3±1.8	1.9±0.8	4.9±1.9	1.2±1.8	24.1±20.5	385.5±183	17.1±10.6
E (0.125µgr/ml)	93.5±1.9	2.6±1.4	4±4.3	1±1.8	23.6±17	382±162.7	16.3±10.9
Grupların istatistiksek karşılaştırılması							
A-B	P<0.05	P<0.05	P<0.05	AD	P<0.01	P<0.001	P<0.05
A-C	P<0.05	P<0.05	P<0.05	AD	AD	P<0.01	P<0.05
A-D	AD	P<0.05	P<0.05	AD	AD	P<0.01	P<0.05
A-E	AD	AD	AD	AD	AD	P<0.01	P<0.05
B-C	AD	AD	AD	AD	P<0.01	AD	AD
B-D	P<0.05	AD	AD	AD	P<0.01	AD	AD
B-E	P<0.05	P<0.05	P<0.05	AD	P<0.01	AD	AD
C-D	P<0.05	AD	AD	AD	AD	AD	AD
C-E	P<0.05	P<0.05	P<0.05	AD	AD	AD	AD
D-E	AD	P<0.05	AD	AD	AD	AD	AD

AD: Anlamlı Değil.

Tablo 7: NS1 Fare myeloma hücre dizilerinde metilprednisolon'un hücre siklusu, apoptozis, hücre sayısı, LDH düzeyi üzerine etkileri.

Gruplar	G0/G1 (%)	G2/M (%)	S (%)	Apoptotik Pik (%)	Hücre Sayısı (x10 <sup>2</sup> /ml)	LDH (U/L)
A Kontrol	38.9±10.3	5.5±5.9	54.4±8	1.7±1.5	739±161.9	52±24.2
B (25µgr/ml)	32.5±5.1	2.4±2.5	67.6±3.7	1.9±1.6	475±135.5	45.5±19.5
C (2.5µgr/ml)	33±4.2	2.3±3	60.9±6.3	1.4±1.2	409.2±129.9	46±20.8
D (0.5µgr/ml)	38.3±4.1	4.8±4.1	55.1±3.7	1.5±1.1	378.5±180.1	50.5±24.2
E (0.125µgr/ml)	38.1±5.1	5.8±4.9	56.3±14.4	1.2±1.4	453±145.8	50.3±25.6
Grupların istatistiksek karşılaştırılması						
A-B	P<0.05	P<0.05	P<0.05	AD	P<0.01	P<0.01
A-C	P<0.05	P<0.05	P<0.05	AD	P<0.01	P<0.01
A-D	AD	AD	AD	AD	P<0.01	P<0.05
A-E	AD	AD	AD	AD	P<0.01	P<0.05
B-C	AD	AD	AD	AD	AD	AD
B-D	P<0.05	AD	P<0.05	AD	AD	AD
B-E	P<0.05	P<0.05	P<0.05	AD	AD	AD
C-D	P<0.05	AD	AD	AD	AD	AD
C-E	P<0.05	P<0.05	AD	AD	AD	AD
D-E	AD	AD	AD	AD	AD	AD

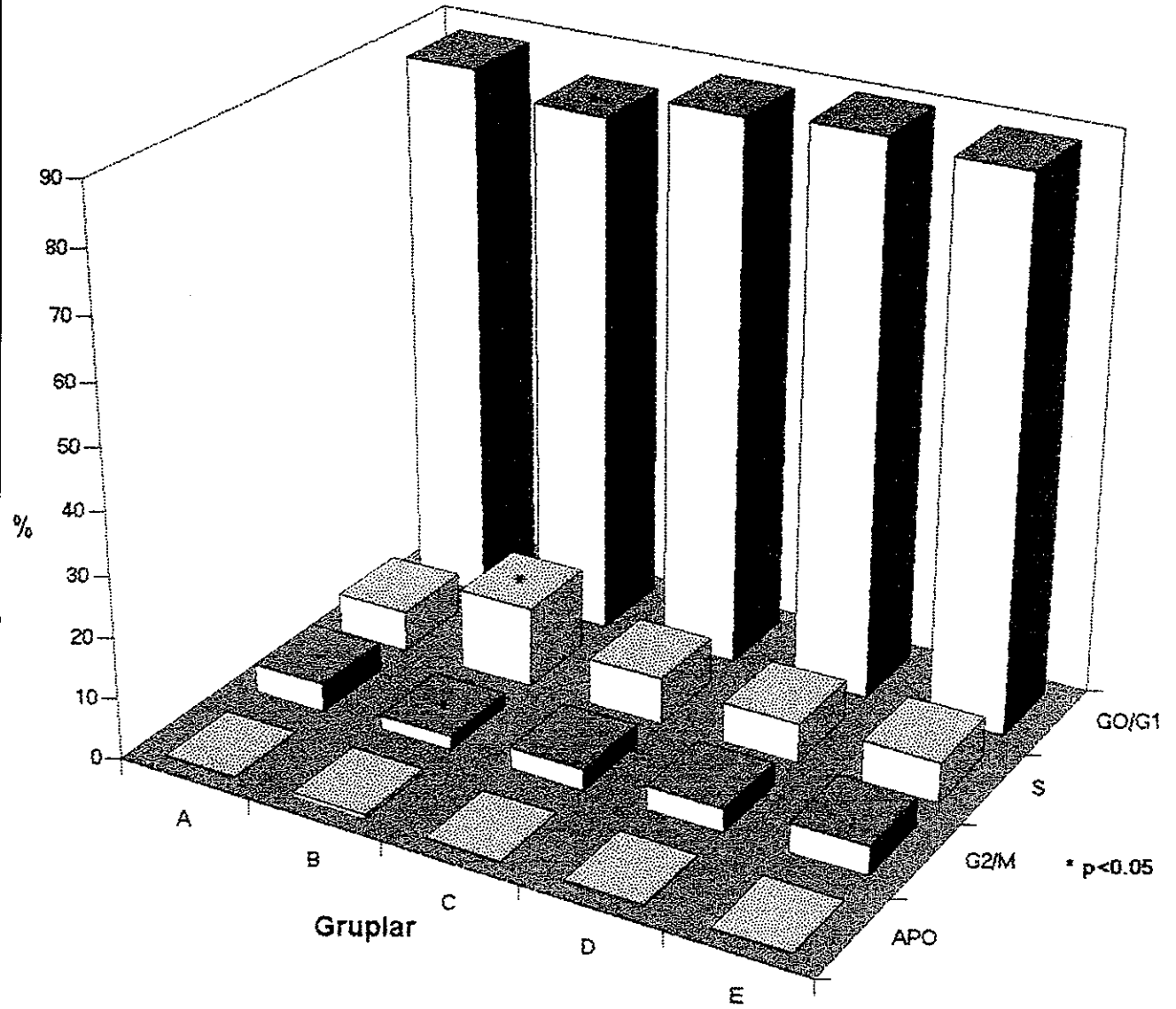
AD: Anlamlı Değil.

Tablo 8: SP2 Fare myeloma hücre dizilerinde metilprednisolon'un hücre siklusu, apoptozis, hücre sayısı, LDH düzeyi üzerine etkileri.

Gruplar	G0/G1 (%)	G2/M (%)	S (%)	Apoptotik Pık (%)	Hücre Sayısı (x10 <sup>2</sup> /ml)	LDH (U/L)
A Kontrol	36.2±3.4	7.7±3.6	55.9±3.6	8.4±7	1328.8±168.2	82.7±18.6
B (25µgr/ml)	33±7.4	7.1±8	53±10.8	14.5±7.6	1048.8±103	71.4±17.8
C (2.5µgr/ml)	32±6.2	6.8±5.1	57.6±6.3	13.4±6.3	1023.3±186	70.6±16.1
D (0.5µgr/ml)	36.8±9.8	7.6±5.9	12.7±8.6	12.7±8.6	1135±155	70.6±16
E (0.125µgr/ml)	35.9±9.5	6.9±6.1	11.8±6.2	11.8±6.2	1161.8±15.6	71.8±15.6
Grupların istatistiksek karşılaştırılması						
A-B	P<0.05	AD	AD	P<0.05	P<0.001	P<0.05
A-C	P<0.05	AD	AD	P<0.05	P<0.001	P<0.05
A-D	AD	AD	AD	AD	P<0.05	P<0.05
A-E	AD	AD	AD	AD	P<0.05	P<0.05
B-C	AD	AD	AD	AD	AD	AD
B-D	P<0.05	AD	AD	AD	P<0.05	AD
B-E	P<0.05	AD	AD	AD	P<0.05	AD
C-D	P<0.05	AD	AD	AD	P<0.05	AD
C-E	P<0.05	AD	AD	AD	P<0.05	AD
D-E	AD	AD	AD	AD	AD	AD

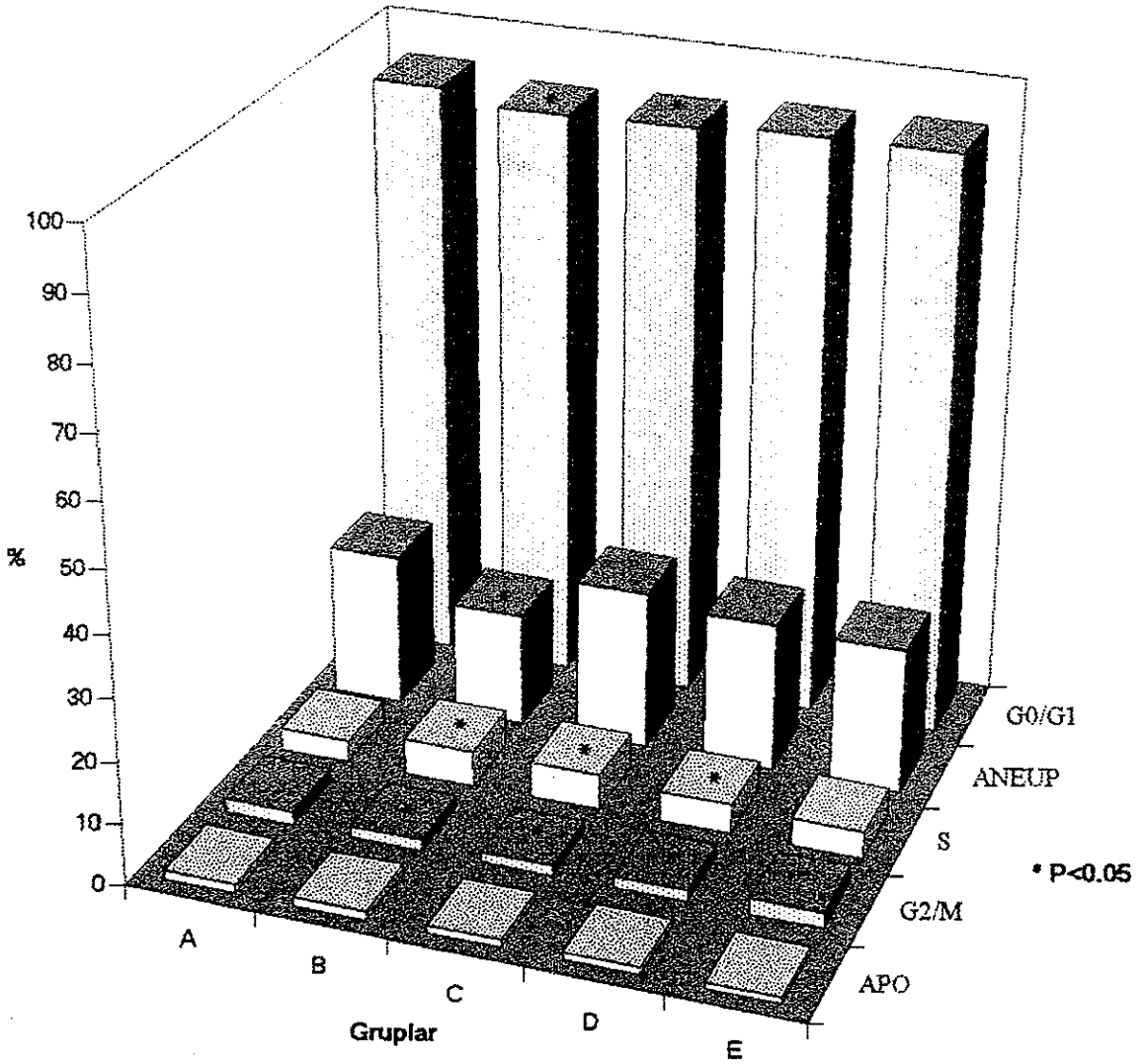
AD: Anlamlı Değil.

Grafik 1: Aneuploidi tespit edilemeyen vakalarda metilprednisolon'un hücre siklusu ve apoptotik pik üzerine etkileri

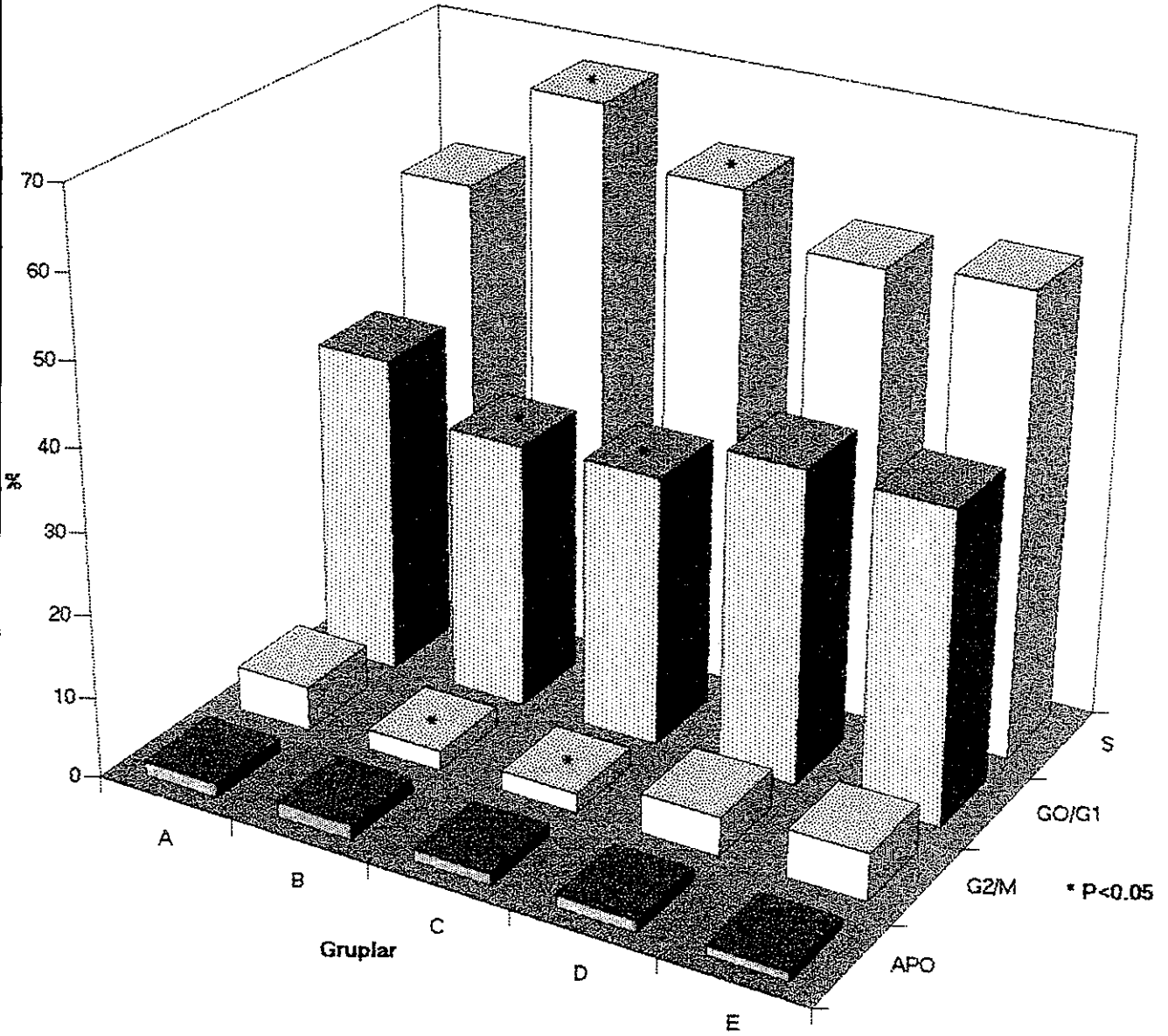




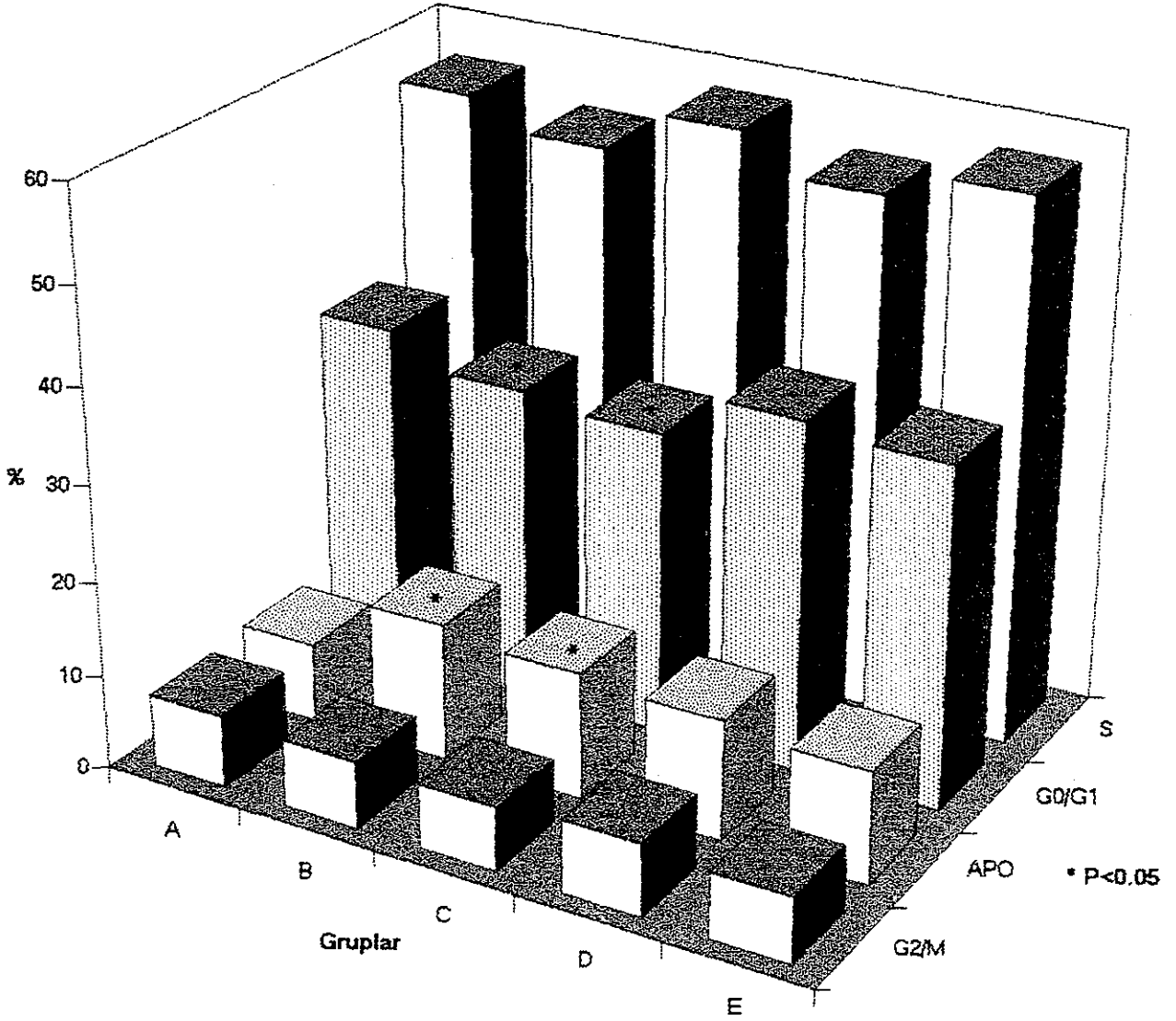
Grafik 2: Aneuploidi tespit edilen vakalarda metilprednisolon'un hücre siklusu ve apoptotik pik üzerine etkileri

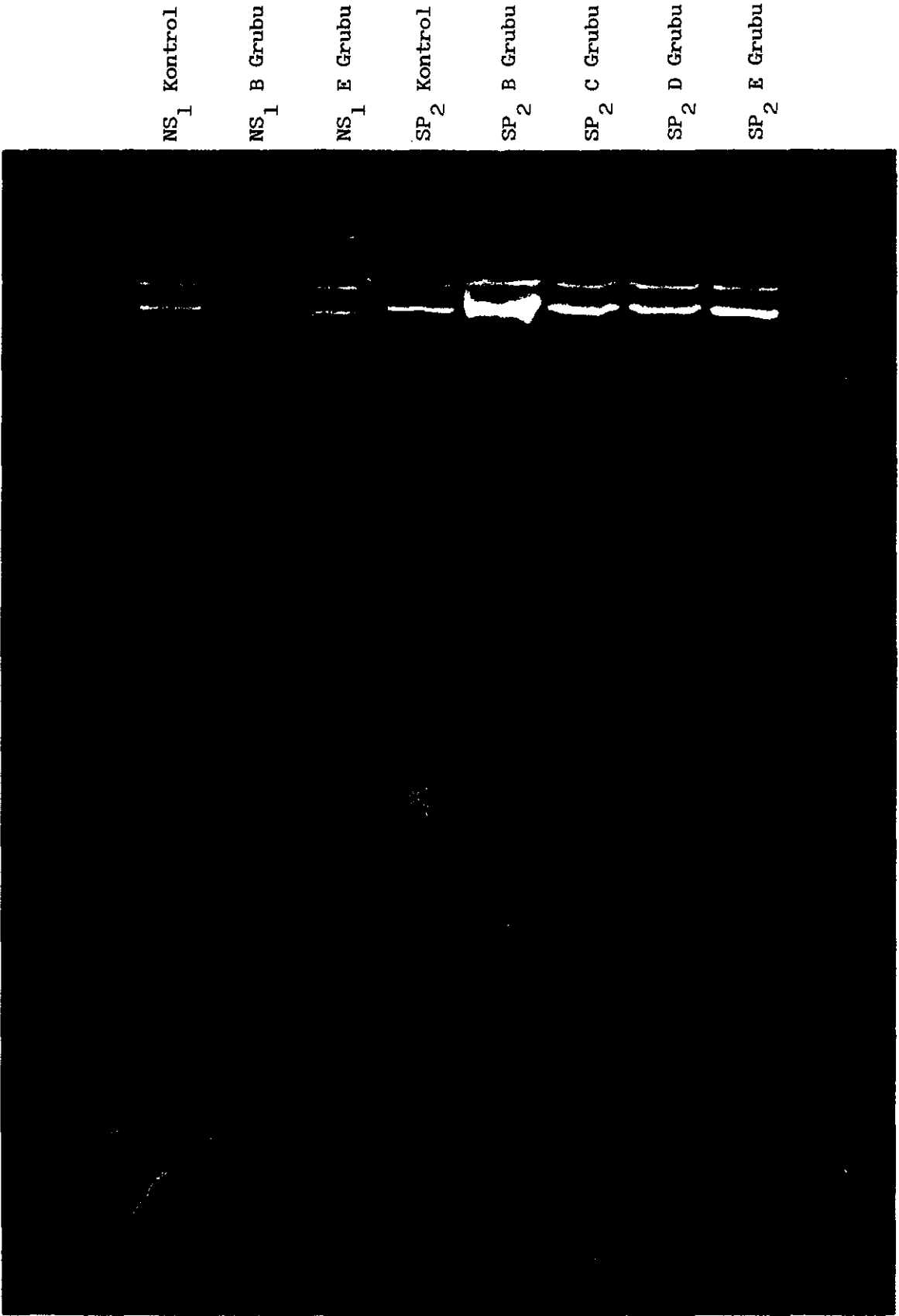


Grafik 3: NS1Fare myeloma hücre dizilerinde metilprenisolon'un hücre siklusu ve apoptotik pik üzerine etkileri



Grafik 4: SP2 Fare myeloma hücre dizilerinde metilprednisolon'un hücre siklusu ve apoptotik pik üzerine etkileri





Şekil 1: Apoptozis tespit edilemeyen NS<sub>1</sub> ve apoptozis tespit edilen SP<sub>2</sub> fare myeloma hücre dizilerinin DNA jel elektroforezindeki görünümü.

IgG Kontrol

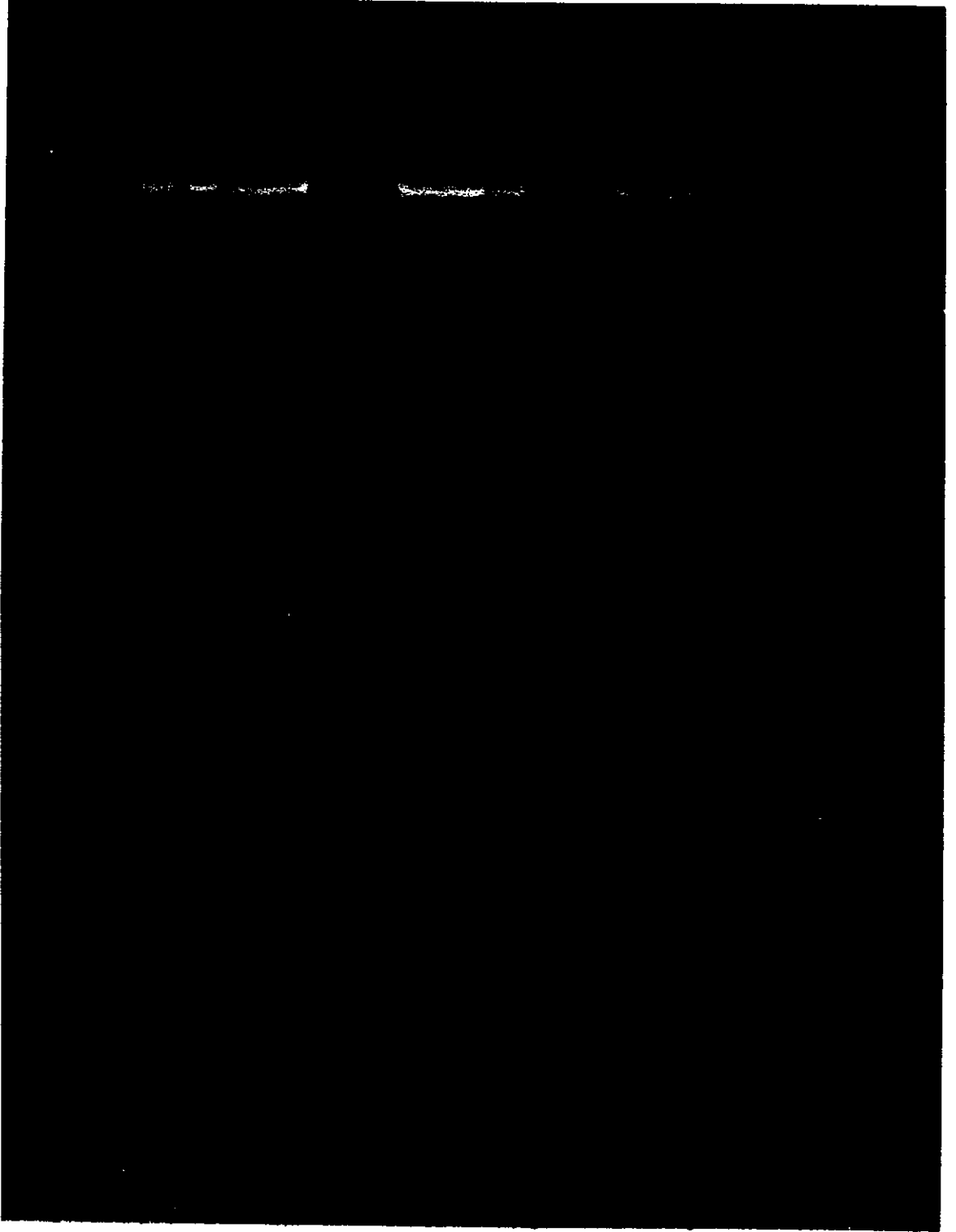
IgG B Grubu

IgA Kontrol

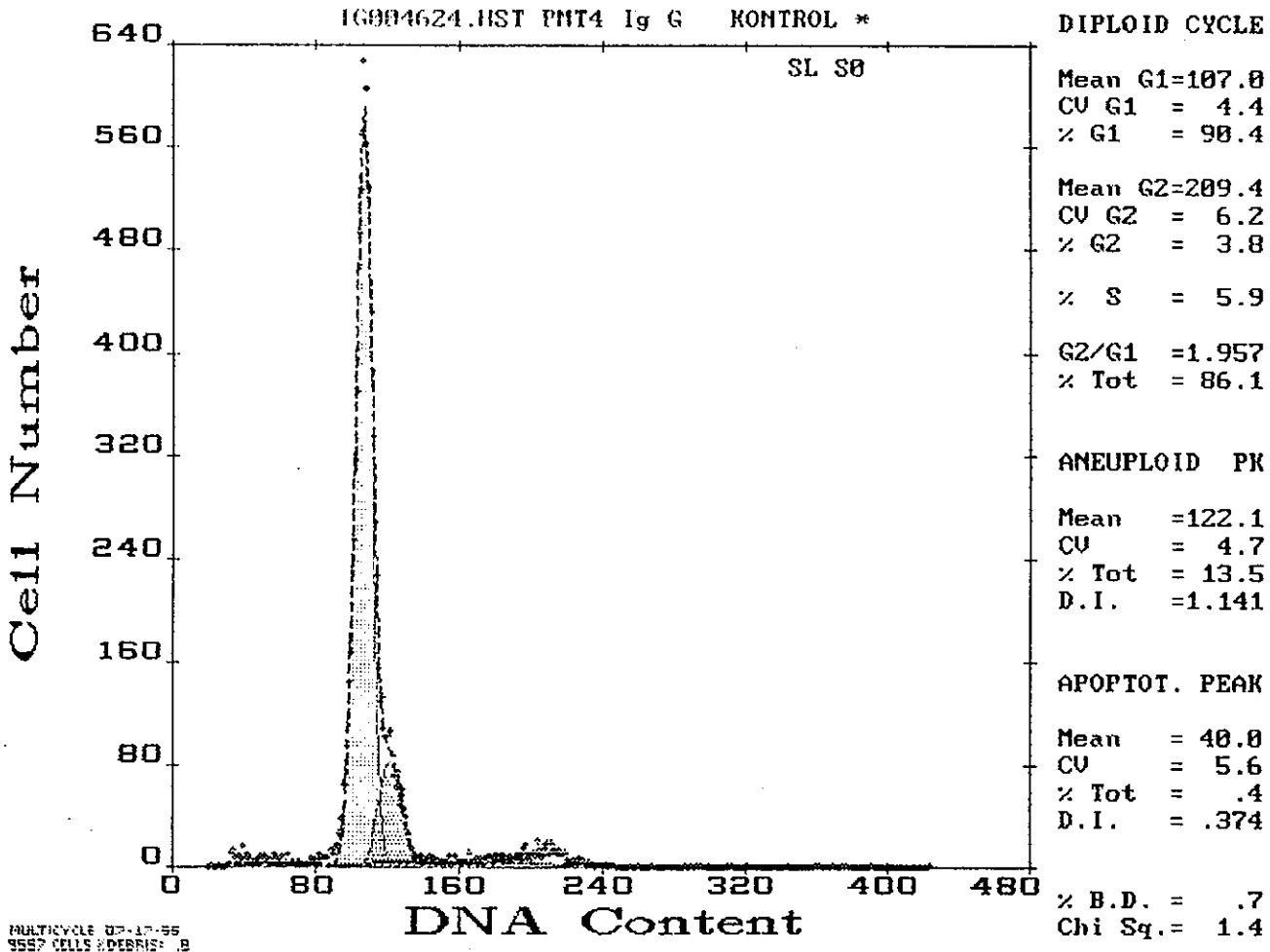
IgA B Grubu

Kappa H.Z. Kontrol

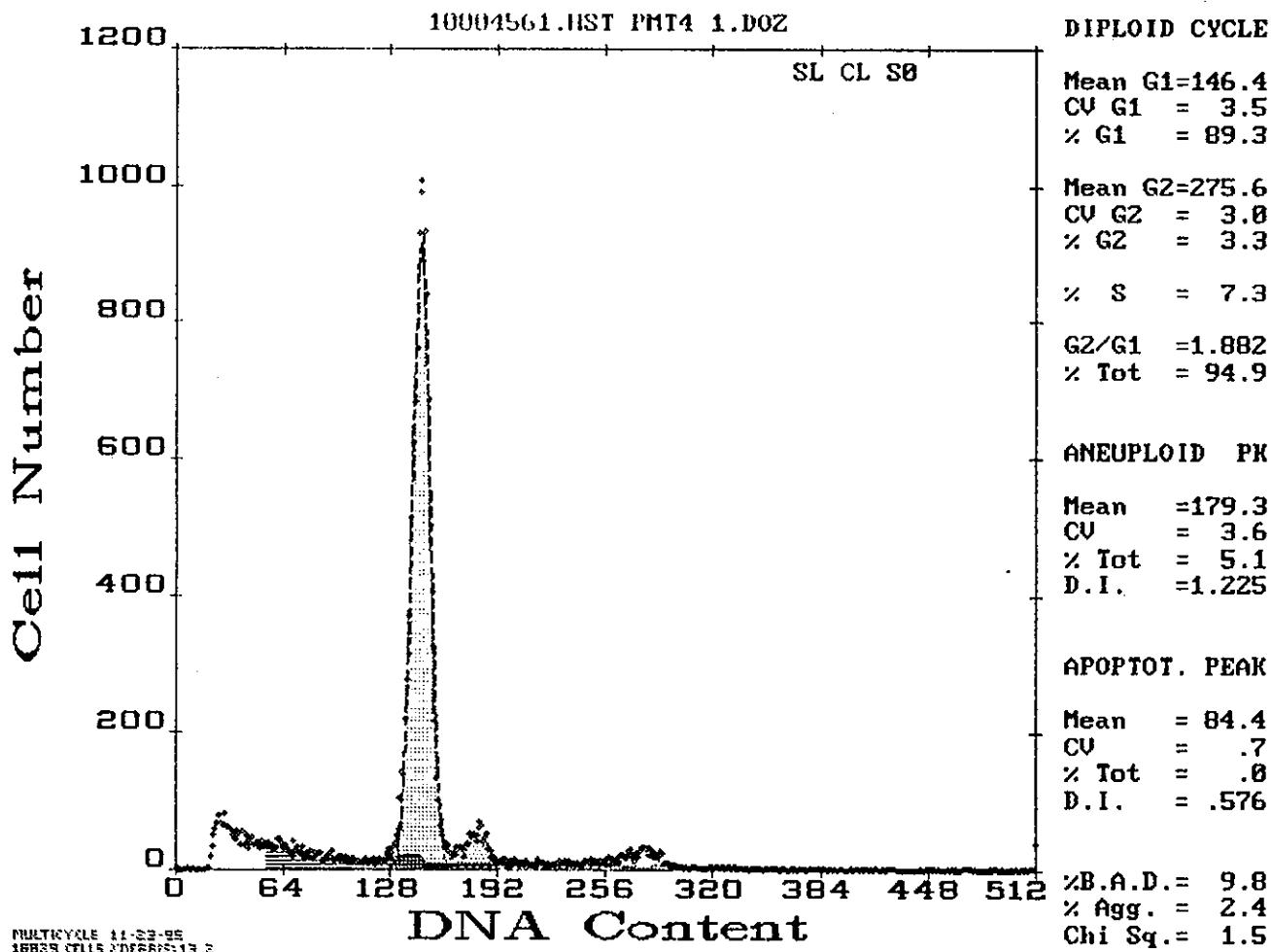
Kappa H.Z. B Grubu



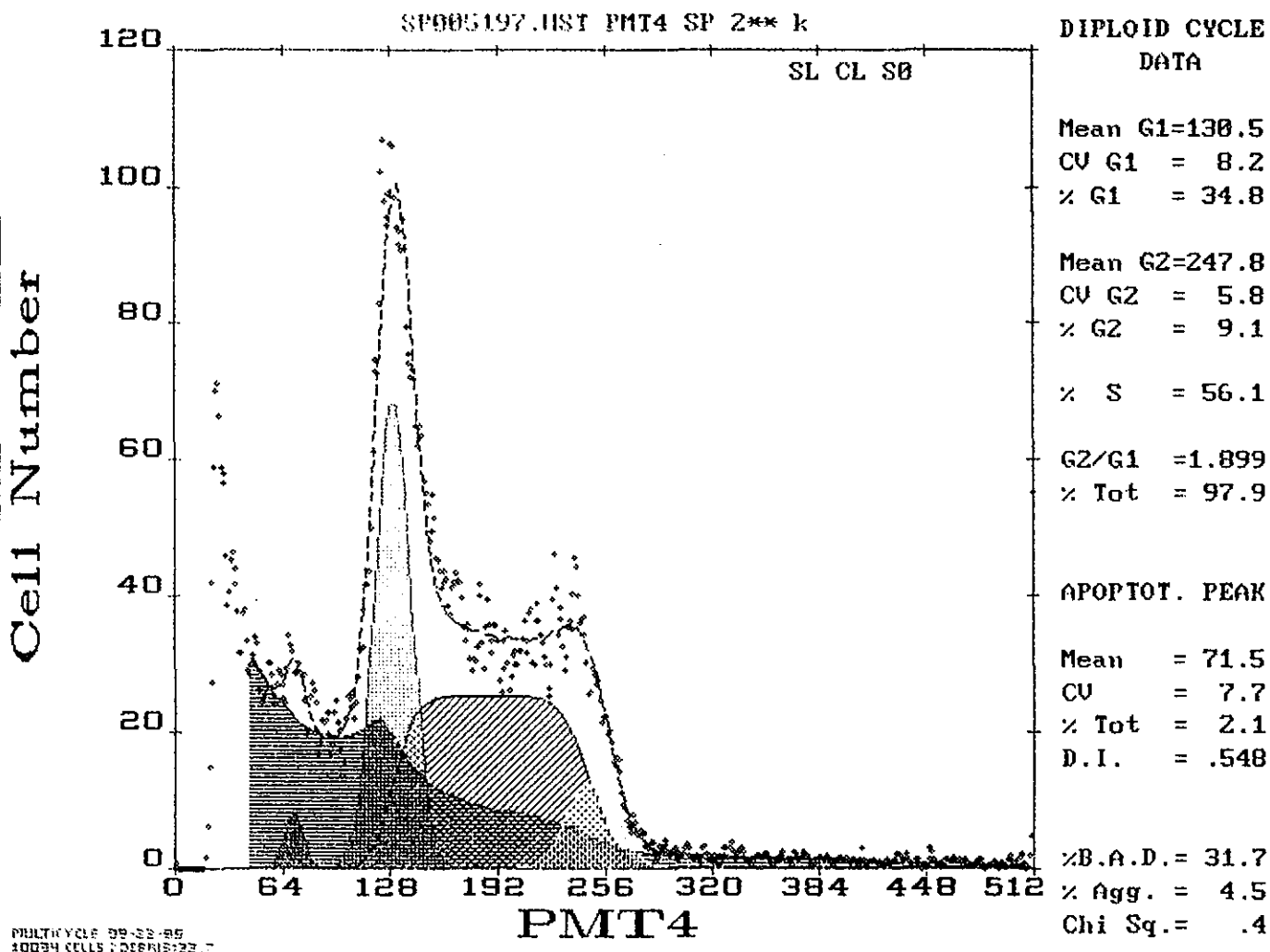
Şekil 2: Apoptozis tespit edilemeyen IgA, IgG, ve kappa hafif zincir vakalarının DNA jel elektroforezindeki görünümü.



Şekil 3: Aneuploidi tespit edilen vakalarda kontrol grubunda aneuploidik pik yüzdesinin flositometre görüntüsü.

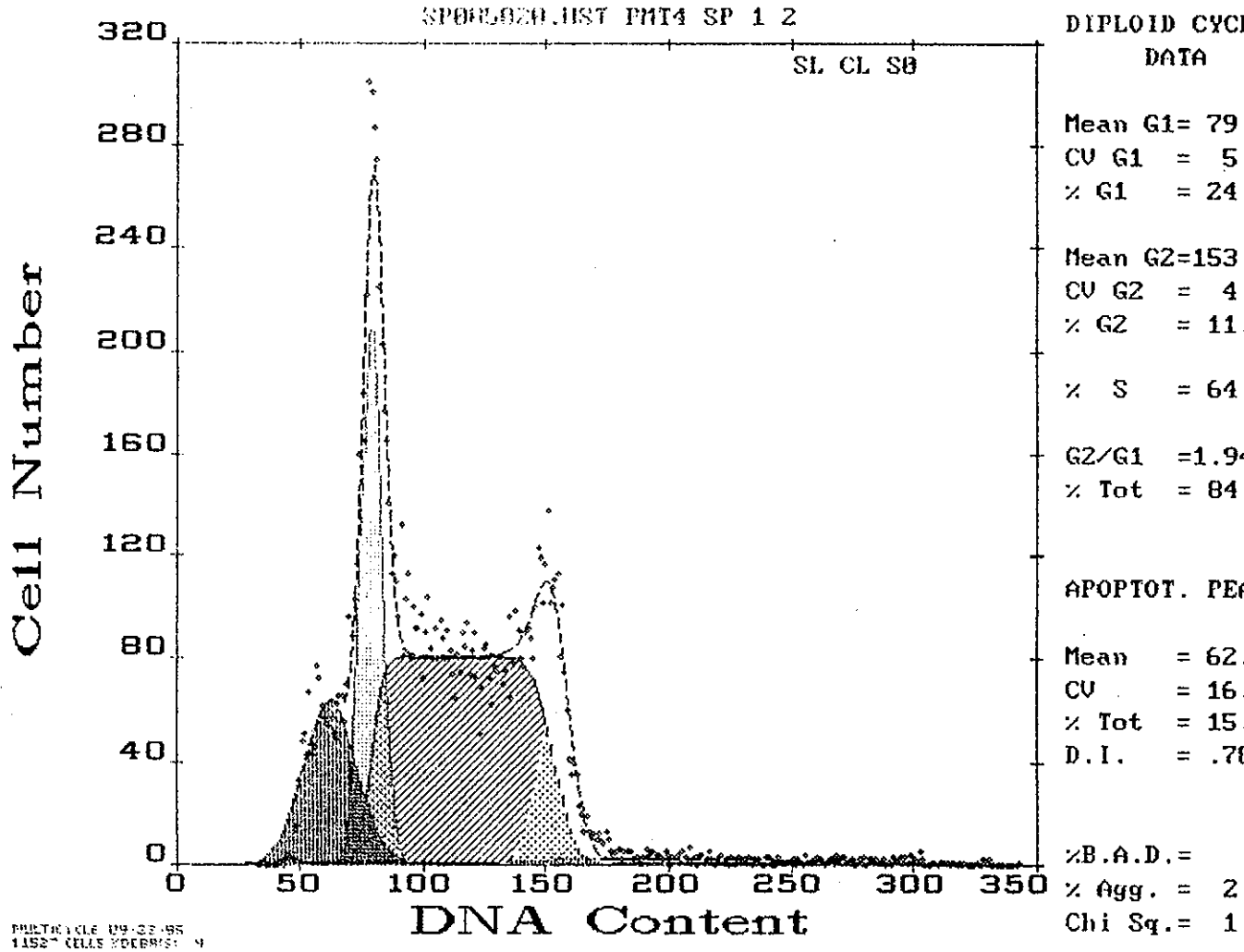


Şekil 4: Aneuploidi tespit edilen vakalarda B grubunda (25 µgr/ml MP) aneuploidik pik yüzdesinin flovsitometre görüntüsü.



Şekil 5: Spontan apoptozis gözlenen SP<sub>2</sub> fare myeloma hücre dizilerinde kontrol grubunda apoptotik pik yüzdesinin görünümü.





Şekil 6: Spontan apoptozis gözlenen SP<sub>2</sub> fare myeloma hücre dizilerinde B grubunda (25 µgr/ml MP) apoptotik pikin flovsitometre görüntüsü.

## TARTIŞMA

15 MM'lı hasta ve NS<sub>1</sub>, SP<sub>2</sub> fare myeloma hücre dizileriyle yaptığımız çalışmalar sonucunda; metilprednisolon (MP)'un kullanılan dozların tamamında tüm hücre dizilerinde benzer olarak hücre sayısında ve LDH düzeyinde azalmaya neden olduğu gözlemlendi. Hücre sayısındaki azalmanın, hücre aktivitesi ve viabilitesinin göstergesi olan LDH düzeylerindeki azalmayla birlikte (80), hücre siklusu ve apoptozisten bağımsız olarak geliştiği saptandı. Bu bulgu MP'un dozdan bağımsız olarak nonapoptotik hücre ölümünü (hücre lizis) indükleyebileceğini telkin etmekteydi. Buna karşılık hücre dizilerinin özelliklerine bağlı olarak MP'un artan dozlarının flovsitometre ile tespit edilen hücre siklusu, aneuploidi ve apoptozis üzerine etkilerinde farklılıklar mevcuttu.

Aneuploidi tespit edilemeyen insan myeloma vakalarında, sadece 25 µgr/ml MP dozunda G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub>/M hücre yüzdesinde azalma, S hücre yüzdesinde artma gözlemlendi (P<0.05). Aneuploidi tespit edilen vakalarda ise G<sub>2</sub>/M hücre yüzdesinde azalma, S hücre yüzdesindeki artma 0.5 µgr/ml gibi daha düşük MP dozunda gözlenirken, 2.5 ve 25 µgr/ml dozlarında ise buna G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> hücre yüzdesindeki azalmanın eklendiği, G<sub>2</sub>/M hücre yüzdesindeki azalmanın ve S hücre yüzdesindeki artmanın devam ettiği gözlemlendi (P<0.05). Aneuploidik pik yüzdesinin ise sadece 25 µgr/ml MP dozunda baskılandığı gözlemlendi (P<0.05). NS<sub>1</sub> fare myeloma hücre dizilerinde MP etkisi incelendiğinde; aneuploidili ve aneuploidisiz insan myeloma vakalarına benzer olarak 2.5 ve 25 µgr/ml MP dozlarında G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>/M hücre yüzdesi azalırken, S hücre yüzdesinin arttığı (P<0.05), başka bir deyişle hücrelerin S fazında bloke olduğu saptandı. Sonuçta her üç grupta da hücrelerin doza bağımlı olarak sentez safhasında birikip, mitozaya geçemedikleri gözlemlendi. Tüm bunların dışında MP'un insan myeloma hücrelerinde ve NS<sub>1</sub> fare myeloma hücre dizilerinde apoptozisi artan dozlarda dahi indüklediği gözlemlendi. Buna karşılık SP<sub>2</sub> fare myeloma hücre dizilerinde 2.5 ve 25 µgr/ml MP dozlarında G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> hücre yüzdesi azalırken, yine aynı dozlarda kontrolde var olan DNA jel elektroforez ile de tespit edebildiğimiz spontan apoptotik hücre yüzdesinin flovsitometre ile yapılan ölçümlerinin arttığı, diğer bir deyişle G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fazındaki hücrelerin artan apoptozisin

etkisiyle azaldığı ve apoptozisin arttığı dozlarda total hücre sayısındaki azalmanın daha da belirginleştiği gözlemlendi ( $P < 0.05$ ).

Çalışmamızda MP'un dozla değişmeyen ölçülerle tüm hücre dizilerinde benzer olarak, hücre siklusu ve apoptozis yüzdelerini etkilemeksizin hücre sayı ve canlılığında azalmaya neden olduğu saptanmıştır. Hücre mitozunu bloke etmeden ve apoptotik hücre ölümünü oluşturmadan hücre sayısının ve canlılığının azalması MP'a maruz kalan hücrelerde nonapoptotik hücre ölümünün (lisis) meydana geldiğini düşündürmektedir. Gerçekten de yapılan çalışmalarda GK'ların nonapoptotik mekanizmalarla hücre canlılığını ve metabolizmasını olumsuz yönde etkileyebileceği gösterilmiştir. Mitokondrial dejenerasyon, hücreye glikoz alımının azalması, protein parçalanmasının artması, hücre içi ATP ve NAD düzeylerinin azalması, hücre membran akışkanlığının bozulması, kolesterol sentezinin inhibisyonunun bu olayda etkili olabilecekleri rapor edilmiştir (84-88). Bir çalışmada insan kronik lenfositik lösemi hücrelerinde, kortisol ile mitokondrinin şiştiği, sitoplazmanın bütünlüğünün bozulduğu, daha sonra hücre membranının da deliklerin oluşumuyla yüzey mikrovillilerinin kaybolduğu ve takibinde kromatinin kondanse olarak fragmentasyona gittiği gözlenmiştir (84). GK'lara hassas S 49.1 lenfoma hücrelerinde deksametazon tedavi ile polipolimeraz (ADP-riboz) enziminin aktivasyonu ile ATP ve NAD'de doza bağımlı azalma olduğu rapor edilmiştir (85). Sıçan timus hücreleri ve insan periferik lenfositlerinde, GK'ların glikoz transportunu inhibe eden messenger RNA oluşumunu sağladığı, protein ve RNA metabolizmasının yavaş inhibisyonu ile sonuçta hücre ölümü yaptığı saptandı (86). Lösemi hücrelerinde deksametazon ile hücrelerin membran akışkanlığının azaldığı, bununla hücre ölümünü kolaylaştırdığı gösterildi (87). Akut lenfoblastik lösemi hücrelerinde yapılan çeşitli çalışmalarda da GK'ların kolesterol sentezini inhibe ettikleri gösterilmiştir (88).

Ancak yapılan çalışmalar, lösemi ve lenfomada gözlenen GK'ların indüklediği belirgin hücre lizisinin myelom hücre dizilerinde bunlar kadar belirgin olmadığını ortaya koymaktadır (11). M.Gomi ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda 3 ayrı myeloma hücre dizisinden birinde GK'lara bağlı olarak hücre lizisi çok hafifçe oluşurken diğerlerinde bu olaya relatif bir rezistansın olduğunu tespit etmişler ve bu rezistansın altında postreseptör mekanizmalarının rol oynadığını rapor etmişlerdir (12). Benzeri sonuçlar P.Moalli ve arkadaşlarınca da yayınlanmıştır (11). Bizim çalışmamızda ise nonapoptotik hücre lizisinin tüm gruplarda benzer oranlarda ancak düşük miktarlarda indüklendiği gözlenmiştir.

GK'ların hücre dizileri üzerine direkt sitotoksik etkileri dışında GKR aktivasyonunu takiben endolükleaz aktivasyonuna ve sonucunda DNA

fragmentasyonuna sebep olarak apoptozisi indükledikleri ve hücre ölümüne neden oldukları rapor edilmiştir (57,58,78). GK'ların sitotoksik etkilerini meydana getiren bu ikinci yol yani apoptozisin uyarılması son 10 yıldır popülarite kazanmış ve incelenmeye alınmıştır. Çalışmamızda ise spontan apoptozis gözlenen SP<sub>2</sub> fare myeloma hücre dizileri dışında, insan myelom hücreleri ve NS<sub>1</sub> fare myeloma hücre dizilerinde artan dozlarda dahi apoptozisin indüklenemediği DNA jel elektroforezi ve flovsitometre ile yapılan ölçümlerle gösterilmiştir. Spontan apoptozis gösteren SP<sub>2</sub> fare myeloma hücre dizilerinde ise ancak 2,5 ve 25 µgr/ml MP dozlarında spontan apoptozisin indüklendiği gözlenmiştir.

GK'ların GKR aktivasyonu oluşturduktan sonra, cAMP düzeyini artırarak hücre ölümüne yol açan proteinlerin sentezini kontrol ettikleri düşünülmektedir (89,90). Bunlar arasında yer alan protoonkogenler ve transkriptör faktörler üzerine farklı etkilerle, hücre siklusunu etkileyerek apoptotik hücre ölümüne neden olabilmektedirler (91,92). Malign lenfoid ve lösemik hücrelerde yapılan çalışmalarda, c-myc protoonkogeninin azalmasının hücre lizisi oluşturduğu gözlenmiştir (91,92). SB. Eastman-Reks ve WV Vedeckis fare S 49 lenfoma hücrelerinde, GK'ların c-myc, c-myb ve c ki ras mRNA' larını azalttıklarını gözlemişlerdir(63). Rat hepatoma hücrelerinde ise GK tedavi ile c-jun mRNA artarken, transkriptör c-fos düşük düzeylerde tespit edilmiş olup, GK tedavinin kesilmesi ile c-jun mRNA'sının tekrar azaldığı tespit edilmiştir (93). PR. Walker ve arkadaşları da lenfositlerde yaptıkları çalışmalarda transkriptör AP 1 aktivasyonu ile hücre ölümü arasında korelasyon olduğunu gözlemişlerdir (94).

GK'ların myeloma hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerini inceleyen çalışmalar ise bugün için hala kısıtlı sayıda olup, bu çalışmalarda myeloma hücrelerinde apoptozisin GK'larla diğer hücre dizilerinin aksine çok daha az indüklenebildiğini ve bununda GK'ya hassas hücre dizilerinde olduğunu göstermektedir (6,78).

GK'larla myeloma hücrelerinde apoptozisin indüklenmesinin altında yatan farklı mekanizmalardan biri olarak, IL-6'nın ve ayrıca IL-1'in inhibe edilmesi olduğu gösterilmiştir (5). J.Hardin ve arkadaşları, deksametazonun düşük konsantrasyonda IL-6 salgısını inhibe ettiğini, ancak yüksek konsantrasyonda hem IL-6 salgısını hemde IL-6 reseptör (IL-6R) sentezini bloke ettiğini göstermişlerdir. Bundan dolayı parakrin etkiyle oluşan IL-6 'nın apoptozisi engelleyici etkisi deksametazonun artan dozlarında bloke edilebilmekte ve sonuçta apoptozisin indüklenebileceği rapor edilmektedir (78).

Çalışmamızda MP'un nonapoptotik hücre lizis'ini azda olsa tüm hücre dizilerinde en düşük dozlarda dahi uyarılabilmesi ve yüksek dozlarda hücre

siklusuna etki yaparak mitozu durdurabilmesine karşılık, SP<sub>2</sub> fare myeloma hücre dizileri dışındaki hücre dizilerimizde apoptozisi uyaramaması altta yatan nedenin GKR sonrası bir defekten ve/veya GK'lara rezistanslıktan kaynaklandığını düşündürmektedir. Bir başka deyişle myeloma hücre dizilerimizde MP'un apoptozisi indükleyememesinin nedeni reseptör sonrası (postreseptör) dirençten kaynaklanıyor olabilir. Nitekim, yapılan çalışmalarda OPM-1 myeloma hücre dizileri ve GK'lara rezistans gösteren bazı vakalarda GK'lara cevapsızlığın postreseptör seviyede olduğu gözlenmiştir (10-12).

Ayrıca yapılan çalışmalarda artan GKR aktivasyonunun belirginleşebildiği (12), yine IL-6'ya etkisinin yüksek dozlarda çok daha belirginleşerek apoptotik ve nonapoptotik hücre ölümünün indüklenebildiği gösterilmiştir (78).

MP'un hücre siklusu üzerine etkileri açısından incelendiğinde, SP<sub>2</sub> fare myeloma hücre dizileri haricindeki tüm hücre dizilerimizde doza bağımlı olarak hücre siklusunu etkilediği ve mitozda bir azalmaya neden olduğu gözlemlendi.

Aneuploidi gözlenmeyen insan myeloma hücrelerinde hücre siklusuna etki yüksek dozda gözlenirken, aneuploidili hücreler ve NS<sub>1</sub> fare myeloma hücre dizilerinde hücre siklusuna etki daha düşük dozda gerçekleşiyordu. Ancak her üç hücre dizisinde de doza bağlı olarak, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>/M hücre yüzdesinde azalma, S hücre yüzdesinde artma gözlemlendi. Bir başka deyişle hücreler S safhasında bloke olup mitoz safhasına geçemiyorlardı.

Yapılan çalışmalarda GK'ların doza, etkileşim süresine bağlı olarak farklı hücrelerde, hücre siklusları üzerine değişik etkilerin olduğu gösterilmiştir. Melanoma hücrelerinde GK'ların ilk 4 saatte DNA sentezini yani S fazındaki hücreleri artırırken, 18. saatin sonunda DNA sentezini inhibe ettiği rapor edilmiştir (6). İnsan lenfositlerinde yapılan çalışmalarda ise GK'ların hücre siklusunu genellikle G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fazında bloke ettiği rapor edilmiştir (95). Myeloma hücre dizilerinde ise GK'ların hücre siklusu üzerine olan etkilerini inceleyen çalışmalar kısıtlı sayıda olup, JO. Fernberg ve arkadaşları deksametazonun siklus süresini uzatmakla birlikte, sikluslar arası hücre yüzdesinde fark olmadığını gözlemişlerdir (96). Buna karşılık YH. Chen ve arkadaşları değişik myelom hücre dizilerinde G<sub>1</sub>'de hafif inhibisyonla G<sub>1</sub>'deki hücre yüzdesinin bir miktar arttığını rapor etmişlerdir. Bizim hücre dizilerimizde ise hücreler G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub>/M'deki azalmayla birlikte, S fazında ancak yüksek dozlarda hafifce bloke edilebilmiştir. SP<sub>2</sub> fare myeloma hücre dizilerinde ise G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> deki azalma apoptozisde artışla birlikte oluşmuş ve diğer sikluslarda değişiklik saptanmamıştır. Bizim sonuçlarımızla YH. Chen ve arkadaşlarının yaptığı çalışma arasındaki en belirgin fark, hücre siklusu bloğunun S'e girişte değil de mitoz girişte gözlenmesidir. Bu durumun farklı myelom hücre

dizilerinden veya GK reseptör sonrası defeklerden kaynaklanıyor olması muhtemeldir.

Çalışmamızda aneuploidi saptanan hücre dizilerinde MP'un hücre siklusunu etkileyen dozlarından daha yüksek dozlarda aneuploidik hücre sayısında azalma yapıldığı gözlenmiştir. Aneuploidik hücre sayısı azalırken apoptozisin gözlenmemesi, aneuploidik hücrelerde MP'un yüksek dozda nonapoptotik hücre ölümüne neden olabileceğini tetkin etmektedir. İn vitro koşullarda GK'ların aneuploidik pik üzerine etkisini inceleyen bir yayına rastlanmamakla birlikte, in vitro olarak DNA indeksi (DI) 1,15'in üzerinde olan hiperdiploidik aneuploidi vakalarının kötü prognostik karaktere sahip olduğu rapor edilmiştir (98). Çalışmamızın bu bulguları yüksek doz GK'ların bu kötü prognostik faktörü ortadan kaldırmada rol oynayabileceğini telkin etmekte olup, daha kapsamlı çalışmalara gereksinim olacağı da açıktır.

Çalışmamız sonucunda kullandığımız tüm hücre dizilerinde MP'un dozdan bağımsız olarak nonapoptotik hücre ölümü (lisis) oluşturabileceğini, ancak artan dozlarda; hücre siklusunu etkileyip hücreleri S fazında bloke ederek hücre çoğalmasını yavaşlatabileceğini, yine artan dozlarda var olan spontan apoptozisi indükleyerek hücre ölümünü artırabileceğini ve kötü prognostik faktör olarak kabul edilen aneuploidik pik varlığında bu hücrelerin nonapoptotik hücre ölümünü indükleyebileceğini düşünüyoruz ve GK'ların artan dozlarda ortaya çıkan bu etkilerinin daha kapsamlı araştırmalarla incelenmesi gerektiğine inanıyoruz.

## SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmamız da flovsitometre ile 8 aneuploidi tespit edilen (6 vaka IgG tipi, 2 vaka IgA tipi), 7 aneuploidi tespit edilemeyen (2 vaka IgG tipi, 3 vaka IgA tipi, 2 vaka kappa hafif zincir) toplam 15 MM'lı hastada ve SP<sub>2</sub>, NS<sub>1</sub> fare myeloma hücre dizilerinde, değişik dozda MP'un hücre sayısı, hücre aktivitesi ve viabilitesinin göstergesi LDH düzeyi, DNA indeksi ve apoptozis üzerine etkilerini değerlendirdik.

Çalıştığımız tüm hücrelerde MP'un dozdan bağımsız olarak hücre sayısında, hücre aktivitesi ve viabilitesinin göstergesi olan LDH düzeyinde azalmaya neden olduğunu tespit ettik.

İnsan (aneuploidili ve aneuploidisiz) myeloma vakaları ve NS<sub>1</sub> fare myeloma hücre dizilerinde MP'un artan dozlarda hücre siklusunu etkileyerek, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>/M hücre yüzdesinde azalmaya, S hücre yüzdesinde ise artışa neden olduğunu tespit ettik. Bir başka deyişle MP dozu artırıldıkça hücreler S fazında bloke olup, mitoz geçiş azalıyordu. Aneuploidi tespit edilen insan myeloma vakalarında ayrıca hücre siklusunu etkileyen dozların en yükseğinde aneuploidik pikin azaldığını saptadık. DNA elektroforezi ve flovsitometre ile spontan apoptozis saptanan SP<sub>2</sub> fare myeloma hücre dizilerinde ise MP dozu arttıkça spontan apoptozisin indüklendiğini ve buna bağlı olarak G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fazındaki hücrelerin azaldığını saptadık.

Çalışmamız bir bütün olarak değerlendirildiğinde: bu bulgular MM'de nonapoptotik hücre ölümü (lisis) meydana getirmede yüksek doz steroid kullanımının ek bir yarar sağlamadığı, ancak var olan spontan apoptozisin indüklenmesinde, tespit edilen aneuploidik pik'in baskılanmasında ve hücre siklusunun etkilenmesinde yüksek doz steroid kullanımının yararlı olacağına dair bilgiler telkin etmektedir.

## ÖZET

Bu tez çalışmamız da flovsitometre ile 8 aneuploidi tespit edilen (6 vaka IgG tipi, 2 vaka IgA tipi), 7 aneuploidi tespit edilemeyen (2 vaka IgG tipi, 3 vaka IgA tipi, 2 vaka kappa hafif zincir) toplam 15 MM'lı hastanın kemik iliğinden elde edilen plazma hücreleri ve NS<sub>1</sub>, SP<sub>2</sub> fare myeloma hücre dizileri kültür için kullanıldı. Ve oluşturulan kültür ortamına değişik dozlarda MP (0,125-0,5-2,5-25 µgr/ml) ekleyerek, DNA indeksine, apopitotik pik yüzdesine, hücre sayısına ve metabolik aktivitenin göstergesi LDH düzeylerine etkilerini değerlendirdik.

Çalışmamızdaki tüm hücre dizilerinde, kontrol grubuna göre kullanılan tüm MP dozlarında hücre sayısında ve LDH düzeyinde azalma tespit edildi. Buna karşılık hücre dizilerinin özelliklerine bağlı olarak MP'un artan dozlarını flovsitometre ile tespit edilen hücre siklusu, aneuploidi ve apoptozis üzerine etkilerinde farklılıklar mevcuttu.

Aneuploidi tespit edilemeyen insan myeloma vakalarında, sadece 25 µ gr/ml MP dozunda G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub>/M hücre yüzdesinde azalma, S hücre yüzdesinde artma gözlemlendi (p<0.05). Aneuploidi tespit edilen vakalarda ise G<sub>2</sub>/M hücre yüzdesinde azalma, S hücre yüzdesinde artma 0,5 µgr/ml gibi daha düşük MP dozunda gözlenirken 2,5 ve 25 µgr/ml dozlarında ise buna G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> hücre yüzdesindeki azalmanın eklendiği, G<sub>2</sub>/M hücre yüzdesindeki azalmanın ve S hücre yüzdesindeki artmanın ise devam ettiği gözlemlendi (p<0.05). Aneuploidik pik yüzdesinin ise sadece 25 µgr/ml MP dozunda baskılandığı gözlemlendi (p<0.05). NS<sub>1</sub> fare myeloma hücre dizilerinde MP etkisi incelendiğinde; aneuploidili ve aneuploidisiz insan myeloma vakalarına benzer olarak 2,5 ve 25 µgr/ml MP dozlarında G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>/M hücre yüzdesi azalırken, S hücre yüzdesinin arttığı (p<0.05) bir başka deyişle hücrelerin S fazında bloke olduğu saptandı. Sonuçta her üç grupta da hücrelerin doza bağlı olarak sentez safhasında birikip, mitozu geçemedikleri gözlemlendi. Tüm bunların dışında MP'un insan myeloma hücrelerinde ve NS<sub>1</sub> fare myeloma hücre dizilerinde apoptozisi artan dozlarda dahi indüklediği gözlemlendi. Buna karşılık SP<sub>2</sub> fare myeloma hücre dizilerinde 2,5 ve 25 µgr/ml MP dozlarında G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> hücre yüzdesi azalırken, yine aynı dozlarda kontrolde var olan DNA jel elektroforez ile de tespit edebildiğimiz spontan apopitotik hücre yüzdesinin flovsitometre ölçümlerinin arttığı, diğer bir deyişle G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fazındaki hücrelerin artan apoptozisin etkisiyle azaldığı ve apoptozisin



arttığı dozlarda total hücre sayısındaki azalmanın daha da belirginleştiği gözlemlendi ( $p < 0.05$ ).

Çalışmamız sonucunda kullandığımız tüm hücre dizilerinde MP'un dozdan bağımsız olarak nonapoptotik hücre ölümü (lisis) oluşturabileceğini, ancak artan dozlarda; hücre siklusunu etkileyip hücreleri S fazında bloke ederek hücre çoğalmasını yavaşlatabileceğini, yine artan dozlarda var olan spontan apoptozisi indükleyerek hücre ölümünü artırabileceğini ve kötü prognostik faktör olarak kabul edilen aneuploidik pik varlığında bu hücrelerin nonapoptotik hücre ölümünü indükleyebileceğini düşünüyoruz ve GK'ların artan dozlarda ortaya çıkan bu etkilerinin daha kapsamlı araştırmalarla incelenmesi gerektiğine inanıyoruz.

## SUMMARY

This thesis reports on the effects of MP as an additive to the cell cultures of bone marrow derived plasma cells and NS<sub>1</sub> or SP<sub>2</sub> mouse myeloma cell lines. The cell culture experiments were carried out using plasma cells of bone marrow aspirates obtained from 15 MM patients of whom 8 (6 cases with IgG, 2 with IgA type) were found to have aneuploidy and 7 (2 cases with IgG type, 3 with IgA type and 2 with kappa light chain) were without aneuploidy as determined through flowcytometric studies. MP was added to the culture medium at various dosages (0.125, 0.5, 2.5 and 25 µgr/ml) and its effects on the DNA index, apoptotic peak levels, cell counts and LDH levels as a marker for the metabolic activity were determined.

The all ranges of MP added to the culture medial led to an increased LDH production and mitotic activity as compared to the control cell cultures. Depending on the cell properties, however, increasing dosages of MP different effects on the cell cycles, aneuploidy and apoptosis as determined by flowcytometry. Human myeloma cells with no aneuploidy showed lower percentages of G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub>/M cells while higher percentages of cells in S phase at the highest MP concentration (P<0.05). On the other hand 0.5 µgr/ml concentration of MP in the cell cultures from patients with aneuploidy caused a decrease in the number of cells at G<sub>2</sub>/M phase and conversely an increase in the number of cells at S phase. Interestingly, however, the cells subjected to 2.5 µgr/ml and 25 µgr/ml concentrations of MP showed a decrease in the number of cells at G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> while the number of cells at G<sub>2</sub>/M phase contineud to decrease accompanying conversely with an elevation in the number of cells at S (P<0.05). The peak levels of aneuploidy was sinnificantly suppressed (P<0.05) only at 25 µgr/ml concentrations of MP. The experiments with NS<sub>1</sub> mouse myeloma cells grown similarly in the presence of MP at the above concentration ranges showed comparable changes in the cell as such that the percentages of cells at G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub>/M phase were greaty reduced at 2.5 and 25 µgr/ml MP concentrations while significantly higher number of cells at S phase were induced (P<0.05) suggesting that these cells were blocked at the S phase. As a result these experiments indicated that the growth cycles of all cell types studies in the presence of MP were blocked dose dependently at the S phase, and thus prevented to proceed to mitotic state. Furhermore MP was unable to induce apoptosis, even at the highest concentration, of both the

human and NS<sub>1</sub> mouse myeloma cell lines. When the SP<sub>2</sub> mouse myeloma cell lines were grown in the presence of 2.5 and 25 µgr/ml of MP, the number of cells at the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase significantly decreased (P<0.05) as a result of increased apoptosis which was also detectable, albeit at low levels, in the control samples similarly subjected to DNA electrophoresis as well as flowcytometric analysis. At the increased dosages low cell counts were prominent.

We concluded that in all cell lines studied MP induces nonapoptotic cell lysis independently of the dosages, but in increased doses cells are blocked in S phase thereby slowing cell division as well as stimulating the present apoptosis state to a level at which cell lysis occur more readily. High doses of MP induces nonapoptotic cell lysis in the presence of aneuploidic peak that is a bad prognostic factor. We think that the use of GC in high doses for the treatment of MM needs further investigations.

## KAYNAKLAR

- 1- Foerster J: Multiple Myeloma. In Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Ethens J, Lukens JN (eds.): Wintrobe's Clinical Haematology. Lee Febiger, Philadelphia London, 1993, Vol:2, chap: 84, pp: 2219-2249.
- 2- Kyle RA: Plasma cell disorders. In Wyngaarden JB, Smith LH, Bennett JC (eds.): Cecil Textbook of medicine. WB Saunders Company, Philadelphia, 1992 Vol.:1, Chap: 151, pp: 967-978.
- 3- Niesvizky R, Siegel D, Michaeli J: Biology and treatment of multiple myeloma. Blood, 7: 24-33, 1993.
- 4- Österborg A, Mellstedt H: Multipl myeloma. The role of interferons. Consultant series (3), Gradiner-Coldwell Co. Ltd., 1993, pp 1-41.
- 5- Ishikawa H, Tanaka H, Iwato K, Tanabe O, Asaoku H, Nobuyoshi M, Yamamoto I, Kawano M, Kuramoto A: Effects of glucocorticoids on the biologic activities of myeloma cells: Inhibition of interleukin-1 $\beta$  osteoklast activating factor-induced bone resorption. Blood, 75 (3): 715-720, 1990.
- 6- Norgaard P, Poulsen HS: Glucocorticoid receptors in human malignancies:A review. Annals of Oncology, 2: 542-557, 1991.
- 7- Alexanian R, Yap BS, Bodey GP: Prednisone pulse therapy for refractory myeloma. Blood, 62(3): 572-577, 1983.
- 8- Alexanian R, Dimopoulos MA, Delasalle K, Barlogiee B: Primary dexamethasone treatment of multiple myeloma. Blood, 80(4): 887-890, 1992.
- 9- Alexanian R, Barlogie B, Dixon D; High dose glucocorticoid treatment of resistant myeloma. Annals of Internal Medicine; 105: 8-11, 1986.
- 10- Moalli PA, Pillay S, Krett NL, Rosen ST: Alternatively spliced glucocorticoid receptor messenger RNAs in glucocorticoid resistant human multiple myeloma cells. Cancer Research, 53: 3877-3879, 1993.

- 11- Moalli PA, Pillay S, Weiner D, Leikin R, Rosen ST: A mechanism of resistance to glucocorticoids in multiple myeloma: Transient expression of a truncated glucocorticoid receptor mRNA. *Blood*, 79 (1): 231-222, 1992.
- 12- Gomi M, Moriwaki K, Katagiri S, Kurata Y, Thompson EB: Glucocorticoid effects on myeloma cells in culture: Correlation of growth inhibition with induction of glucocorticoid receptor messenger RNA. *Cancer Research*, 50: 1873-1878, 1990.
- 13- Epstein J, Xiao H, He XY: Markers of multiple hematopoietic-cell lineages in multiple myeloma. *The New England Journal of Medicine*, 322: 664-668, 1990.
- 14- Epstein J, Barlogie B, Katzmann J, Alexanian R: Phenotypic Heterogeneity in aneuploid multiple myeloma indicates pre-B cell involvement. *Blood*, 71 (4): 861-865, 1988.
- 15- Riedel DA, Pottern LM: The epidemiology of multiple myeloma. *Haematol. Oncol. Clin. North America*, 6: 225-247, 1992.
- 16- Mandelli F, Avvisati G, Tribalto M: Biology and treatment of multiple myeloma. *Current Opinion in Oncology*, 4 (1): 73-86, 1992.
- 17- Mugneret F, Sidaner I, Favre B, Manone L, Maynadie M, Caillot D, Solary E: Der (16) t (1;16) (q10;p10) in multiple myeloma: a new non-random abnormality that is frequently associated with Burkitt's-type translocations. *Leukemia*, 9(2): 277-281, 1995.
- 18- Barlogie B, Epstein J, Selvanayagam P, Alexanian R: Plasma cell myeloma new biological insights and advances in therapy. *Blood*, 73 (4): 865-879, 1989.
- 19- Facon T, Lai JL, Nataf E, Preudhomme C, Zandecki M, Hammad M, Wattel E, Jouet JP, Bauters F: Improved cytogenetic analysis of bone marrow plasma cells after cytokine stimulation in multiple myeloma: a report on 46 patients. *British Journal Haematology*, 84 (4): 743-745, 1993.
- 20- Skopelitou A, Hadjiyannakis M, Tsenga A, Theocharis S, Alexopoulou V, Kittas C, Agnantis N: Expression of c-myc p 62 oncoprotein in multiple myeloma: an immunohistochemical study of 180 cases. *Anticancer Research*, 13 (4): 1091-1095, 1993.
- 21- Pettersson M, Jernberg-Wiklund H, Larsson LG, Sundstrom C, Givol I, Tsujimoto Y, Nilsson K: Expression of the bcl-2 gene in human multiple myeloma cell lines and normal plasma cells. *Blood*, 79 (2): 495-502, 1992.

- 22- Corradini P, Ladetto M, Voena C, Palumbo A, Ighirami G, Knowles DM, Boccadoro M, Pileri A: Mutational activation of N-and K-ras oncogenes in plasma cell dyscrasis. *Blood*, 81 (10): 2708-2713, 1993.
- 23- Pilarski LM, Belch AR: Circulating monoclonal B cells expressing P glycoprotein may be a reservoir of multidrug resistant disease in multiple myeloma. *Blood*, 83(3): 724-736, 1994.
- 24- Grogan TM, Spier CM, Salmon SE, Matzner M, Rybski J, Weinstein RS, Scheper RJ, Dalton WS: P-Glycoprotein expression in human plasma cell myeloma: Correlation with primer chemotherapy. *Blood*, 81 (2): 490-495, 1993.
- 25- Zhang XG, Bataille R, Jourdan M, Saeland S, Banchereau J, Mannnoni P, Klein B: Granulocyte-macrophage colony stimulating factor synergizes with interleukin-6 in supporting the proliferation of human myeloma cells. *Blood*, 76 (12): 2599-2605, 1990.
- 26- Merico F, Bergui L, Gregoretti MG, Ghia P, Aimò G, Lindley IJD, Caligaris-Cappio F: Cytokines involved in the progression of multiple myeloma. *Clin. Exp. Immunol.*, 92: 27-31, 1993.
- 27- Schwab G, Siegall CB, Aarden LA, Neckers LM, Nordan RP: Characterization of an interleukin-6 mediated autocrine growth loop in the human multiple myeloma cell line, U266. *Blood*, 77 (3): 587-593, 1991.
- 28- Klein B, Zhang XG, Jourdan M, Content J, Houssiau F, Aarden L, Piechaczyk M, Bataille R: Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma cell growth and differentiation by interleukin-6. *Blood*, 73 (2): 517-526, 1989.
- 29- Nachbaur DM, Herold M, Maneschg A, Huber H: Serum levels of interleukin-6 in multiple myeloma and other hematological disorders: Correlation with disease activity and other prognostic parameters. *Annual Haematology*, 62: 54-58, 1991.
- 30- Kawano M, Tanaka H, Ishikawa H, Nobuyoshi M, Iwoto K, Asaoku H, Tanabe O, Kuramoto A: Interleukin-1 accelerates autocrine growth of myeloma cells through interleukin-6 in human myeloma. *Blood*, 73 (8): 2145-2148, 1989.
- 31- Sawamura M, Murakami H, Tamura J, Matsushima T, Sato S, Naruse T, Tsuchiya J: Tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin 4 promote the differentiation of myeloma cell precursors in multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 88: 17-23, 1994.

- 32- Portier M, Zhang XG, Caron E, Lu ZY, Bataille R, Klein B:  $\delta$ -interferon in multiple myeloma: Inhibition of interleukin-6 (IL-6) dependent myeloma cell growth and down regulation of IL-6 receptor expression in vitro. *Blood*, 81 (11): 3076-3082, 1993.
- 33- Palumbo A, Battaglio S, Napoli P, Omede P, Fusaro A, Bruno B, Boccadoro M, Pileri A: Recombinant interferon- $\delta$  inhibits the in vitro proliferation of human myeloma cells. *British Journal of Haematology*, 86: 726-732, 1994.
- 34- Jourdan M, Zhang XG, Portier M, Boiron JM, Bataille R, Klein B: IFN-alpha induces autocrine production of IL-6 in myeloma cell lines. *Journal Immunology*, 147 (12): 4402-4407, 1991.
- 35- Cimino G, Avvisati G, Amadari et al: High serum IL-2 levels are predictive of prolonged survival in multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 75: 373-377, 1990.
- 36- Lu ZY, Zhang XG, Rodriguez L, Wijdenes J, Gu ZJ, Morel-Fournier B, Harousseau JL, Batgille R, Rossi JF, Klein B: Interleukin 10 is a proliferation factor but not a differentiation factor for human myeloma cells. *Blood*, 85 (9): 2521-2527, 1995.
- 37- Durie BGM, Salmon SE: A clinical staging system for multiple myeloma. *Cancer*, 36: 842-854, 1975.
- 38- Greipp PR, Lust JA, O'Fallon WM, Katzmann JA, Witzig TE, Kyle RA: Plasma cell labeling index and  $\beta_2$  microglobulin predict survival independent of thymidine kinase and C-reactive protein in multiple myeloma. *Blood*, 81 (12): 3382-3387, 1993.
- 39- Kyle RA: Newer approaches to the management of multiple myeloma. *Cancer*, 72 (11): 3489-3494, 1993.
- 40- Tienhaara A, Pulkki K, Mattila K, Irjala K, Pelliniemi TT: Serum immunoreactive interleukin-6 and C-reactive protein levels in patients with multiple myeloma at diagnosis. *British Journal of Haematology*, 86: 391-393, 1994.
- 41- Dimopoulos MA, Barlogie B, Smith TL, Alexanian R: High serum lactate dehydrogenase level as a marker for drug resistance and short survival in multiple myeloma. *Annals of Internal Medicine*, 115: 931-935, 1991.

- 42-Boccadero M, Baltaglio S, Omede P et al: Increased serum neopterin concentration as indicate of disease severity and poor survival in multiple myeloma. *Eur. J. Haematology*, 47: 305-309, 1991.
- 43- Merlini G, Perfetti V, Gobbi PG, Quaglini S, Franciotte DM, Marinone G, Ascari E: Acute phase proteins and prognosis in multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 83: 595-601, 1993.
- 44- Tsuchiya J, Murakami T, Kanoh T, Kosaka M, Sezaki T, Mikuni C, Kawato M, Takagi T, Togawa A, Isobe T, Suzuki K, Imamura Y, Takatsuki K: Ten year survival and prognostic factors in multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 87: 832-834, 1994.
- 45- Rowell NP, Tabia JS: The role of radiotherapy in the management of multiple myeloma. *Blood Review*, 5: 84, 1991.
- 46- Blade J, Lopez-Guillermo A, Bosch F, Cervantes F, Reverter JC, Montserrat E, Rozman C: Impact of response to treatment on survival in multiple myeloma: results in a series of 243 patients. *British Journal of Haematology*, 88: 117-121, 1994.
- 47- Alexanian R, Dimopoulos M, Smith T, Delasalle K, Barlogie B, Champlin R: Limited value of myeloablative therapy for late multiple myeloma. *Blood*, 83 (2): 512-516, 1994.
- 48-Dimopoulos MA, Hester J, Huh Y, Champlin R, Alexanian R: Intensive chemotherapy with blood progenitor transplantation for primary resistans multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 87: 730-734, 1994.
- 49- Österborg A, Björkholm M, Björemann M, Brenning G, Carlson K, Celsing F, Gahrton G, Grimfors G, Gyllenhammar H, Hast R, Johansson B, Juliusson G, Jarnmark M, Kimby E, Lerner R, Linder O, Merk K, Nilsson B, Ohrling M, Paul C, Simonsson B, Smedmyr B, Svedmyr E, Stalfelt AN, Strander H, Uden AM, Ösby E, Mellstedt H: Natural interferon- $\alpha$  in combination with melphalan prednisone versus melphalan/prednisone in the treatment of multiple myeloma stages II and III: A randomized study from the myeloma group of central Sweden. *Blood*, 81 (6): 1428-1434, 1993.
- 50- Van Ders MH, Van Zaanen HC, Lokhorst HM: Interleukin 6, a new target for therapy in multiple myeloma? *Annals of Hematology*, 66 (5): 219-223, 1993.
- 51- Kayaalp SO: *Tibbi Farmakoloji*. Dördüncü baskı. Feryal Matbaacılık, Ankara, 3. cilt, 1989, s.2421-2421.



- 52- Muller M, Renkawitz R: The glucocorticoid reseptör. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1088: 171-182, 1991.
- 53- Beato M: Gene regulation by steroid hormoenes. *Cell*, 56: 335-344, 1989.
- 54- Gillis S, Crabtree GR, Smith KA: Glucocorticoid induced inhibition of T cell growth factor production. *The Journal of Immunology*, 123 (4): 1624-1631, 1979.
- 55- Migliorati G, Nicoletti I, D'adamio R, Spreca A, Pagliacci C, Riccardi C: Dexamethasone induces apoptosis in muose natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes. *Immunology*, 81: 21-26, 1994.
- 56- Williams GT: Programmed cell death: Apoptosis and oncogenesis. *Cell*, 65: 1097-1098, 1991.
- 57- Carson AD, Ribeiro JM: Apoptosis and disease. *Lancet*, 341 (8855): 1251-1254, 1993.
- 58- Sachs L, Lotem J: Control of programmed cell death in normal and leukemic cells: New implications for therapy. *Blood*, 82 (1): 15-21, 1993.
- 59- Schwartzman RA, Cidlowski JA: Mechanism of tissue-specific induction of internucleosomal deoxyribonucleic acid cleavage activity and apoptosis by glucocorticoids. *Endocrinology*, 133 (2): 591-599, 1993.
- 60- Smets LA, Vanden Berg TJ, Acton D, Top B, Van Rooij H, Verwijs-Janssen M: BCL-2 experession and mitochondrial activity in leukemic cells with different sensitivity to glucocorticoid-induced apoptosis. *Blood*, 84 (5): 1613-1619, 1994.
- 61- Lichtenstein A, Tu Y, Fady C, Vescio R, Berenson J: Interleukin-6 inhibits apoptosis of malignant plasma cells. *Cell-Immunology*, 162 (2): 248-255, 1995.
- 62- Moroder M, Morkinotti S, Vacca A, et all: Post-transcriptional control of c-myc pro-oncogene expression by glucocorticoid hormones in human T lymphoblastic leukemic cells. *Nuclear Asids Research*, 18: 1153-1157, 1990.
- 63- Eastman-Reks SB, Vedeckis WV: Glucocorticoid inhibition of c-myc, c-myb, and c-ki-ras experission in a mouse lymphoma cell line. *Cancer Research*, 46: 2457-2462, 1986.
- 64- Özsoylu Ş: High dose intravenous methylprednisolone (HIMMA) in haematologic disorders. *Hematology*, 44: 197-207, 1990.

- 65- Hiçsönmez G, Onat N, Albayrak D, Yetgin S, Özsoylu Ş: Acceleration of leukocyte recovery by administration of short-course high-dose methylprednisolone in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Hematology and Oncology*, 8: 193-197, 1991.
- 66- Hiçsönmez G, Özsoylu Ş, Tuncer AM: Differentiation of myeloid leukemic cells induced by high-dose methylprednisolone in patients with acute myeloblastic leukemia and its therapeutic potential. *Leukemia Research*, 15 (7): 537-541, 1991.
- 67- Tuncer AM, Hiçsönmez G, Ertürk G, Gümrük F, Albayrak D, Oğuz H: The effect of high-dose methylprednisolone treatment on GM-CSF level in children with acute leukemia: A pilot study. *Leukemia Research*, 16 (6/7): 615-619, 1992.
- 68- Hiçsönmez G, Tuncer AM, Güler E, Tan E, Tekelioğlu M: The potential role of high-dose methylprednisone on the maturation of leukemic cells in children with acute promyelocytic leukemia (APL). *Experimental Hematology*, 21: 00-00, 1993.
- 69- Patel PM, Selby PJ, Graham MA, Viner C, Newell DR, McElwain TJ: Pharmacokinetics of high-dose methylprednisolone and use in hematological malignancies. *Hematological Oncology*, 11 (2): 89-96, 1993.
- 70- Murakami T, Togawa A, Satch H, Katoh M, Imamura Y, Ohsawa N, Takaku F: Glucocorticoid receptor in multiple myeloma. *Eur Hematol*, 39: 54-59, 1987.
- 71- Eisen LP, Esasser MS, Harmon JM: Positive regulation of the glucocorticoid receptor in human T cells sensitive to the cytolytic effects of glucocorticoids *Journal Biol. Chem*, 263: 12044-12048, 1988.
- 72- Rosewicz S, Mc Donald AR, Maddux BA et al: Mechanism of glucocorticoid receptor down-regulation by glucocorticoids. *J. Biol. Chem*, 263: 2581-2584, 1988.
- 73- Danel-Moore L, Bronnegard M, Gustafsson JA: Dexamethasone reverses glucocorticoid receptor RNA depression in multidrug resistant (MDR) myeloma cell lines. *Med Oncol Tumor Pharmacother*, 9 (4): 199-204, 1992.
- 74- Chrousos GP, Datera-Wadleigh SD, Karl M: Syndromes of glucocorticoid resistance. *Ann. Intern. Med.*, 119 (11): 1113-1124, 1993.
- 75- Joshua DE: Multiple Myelom: Why does the disease escape from plateau phase?. *British Journal of Hematology*, 88: 667-671, 1994.

- 76- Miyashita T, Reed JC: Bcl-2 Oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood*, 81 (1): 151-157, 1993.
- 77- Johnson BH, Gomi M, Jakowlew SB, Moriwaki K, Thompson ES: Actions and interactions of glucocorticoids and transforming growth factor beta on two related human myeloma cell line. *Cell Growth Differ*, 4 (1): 25-30, 1993.
- 78- Hardin J, Maceod S, Grigorieva J, Chang R, Barlogie B, Xiao H, Epstein J: Interleukin-6 prevents dexamethasone induced myeloma cell death. *Blood*, 84 (9): 3063-3070, 1994.
- 79- Liss AR: A manual basic technique, in Freshney RI (eds.): *Culture of animal cells*, second edition, Inc., New York, 1988, p 137-152.
- 80- Pan L, Beverley PC, Isaacson PG: Lactate dehydrogenase (LDH) isoenzymes and proliferative activity of lymphoid cells-an immunocytochemical study. *Clin-Exp Immunol*, 86 (2): 240-245, 1991.
- 81- Hotz MA, Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z: Flowcytometric detection of apoptosis: Comparison of the assays of in situ DNA degradation and chromatin changes. *Cytometry*, 15: 237-244, 1994.
- 82- Robinson JP: *Hand Book of Flow Cytometry Methods*. Wiley-Uss, New York, 1993, p: 112.
- 83- Bonnefoy-Berard N, Genestier L, Flacher M, Rouault JP, Lizard G, Mutin M, Revillard JP: Apoptosis induced by polyclonal antilymphocyte globulins in human B-cell lines. *Blood*, 83 (4): 1051-1059, 1994.
- 84- Galili U, Leizerowitz R, Moreb J, Gamliel H, Gurfel D, Polliack A: Metabolic and ultrastructural aspects of the in vitro lysis of chronic lymphocytic leukemia cells by glucocorticoids. *Cancer Research*, 42 (4): 1433-1440, 1982.
- 85- Berger NA, Berger SJ, Sudar DC, Distelhorst CW: Role of nicotinamide adenine dinucleotide and adenosine triphosphate in glucocorticoid-induced cytotoxicity in susceptible lymphoid cells. *J. Clin. Invest*, 79 (6): 1558-1563, 1987.
- 86- Munck A, Crabtree GR, Smith KA: Effects and receptors of glucocorticoids in rat thymus cells and human peripheral lymphocytes. *J. Toxicol - Environ - Health*, 4 (2-3): 409-425, 1978.
- 87- Kiss C, Balazs M, Keri - Fulop I: Dexamethasone decreases membrane fluidity of leukemia cells. *Leuk. Res.* 14 (3): 221-225, 1990.

- 88- Cutts JL, Melnykovych G: Defective utilization of cholesterol esters from low - density lipoprotein in a human acute lymphoblastic leukemia T cell line. *Biochim - Biophys Acta*, 961 (1): 65-72, 1988.
- 89- Dowd DR, Miesfeld RL: Evidence that glucocorticoid and cyclic AMP induced apoptotic pathways in lymphocytes share distal events. *Mol. Cell Bio.*, 12 (8): 3600-3608, 1992.
- 90- Yuh YS, Thompson EB: Glucocorticoid effect on oncogene growth gene expression in human T lymphoblastic leukemic cell line CCRF-CEM. Specific c-myc RNA supression by dexamethasone. *J. Biol Chem*, 264 (18): 10904-10910, 1989.
- 91- Thompson EB, Nazareth LV, Thulasi R, Ashraf J, Harbour D, Johnson BH: Glucocorticoids in malignant lymphoid cells: gene regulation and the minimum receptor fragment for lysis. *J. Steroid Biochem Mol Biol*, 41 (3-8), 273-282, 1992.
- 92- Thulasi R, Harbour DV, Thompson EB: Supression of c-myc is a critical step in glucocorticoid-induced human leukemic cell lysis. *J. Biol Chem*, 268 (24): 18306-18312, 1993.
- 93- Sanchez I, Goya L, Vallergera AK, Firestone GL: Glucocorticoids reversibly arrest rat hepatoma cell growth by inducing an early G<sub>1</sub> block in cell cycle progression. *Cell Growth Differ*, 4 (3): 215-225, 1993.
- 94- Walker PR, Kwast Welfeld J, Gourdeau H, Leblanc J, Neugebauer W, Sikorska M: Relationship between apoptosis and the cell cycle in lymphocytes: roles of protein kinase C, tyrosine phosphorylation and AP1. *Experimental Cell Research*, 207 (1): 142-151, 1993.
- 95- Tuosto L, Cundari E, Montani MSG, Piccolella E: Analysis of susceptibility of mature human T lymphocytes to dexamethasone-induced apoptosis. *Eur J Immunol*, 24: 1061-1065, 1994.
- 96- Fernberg JO, Lewensohn R, Skog S: Interaction of melphalan and dexamethasone in a human myeloma cell line. *Anticancer-Drugs*, 2 (6): 565-570, 1991.
- 97- Chen YH, Feng XX, Schilder L: Effect of vincristine, Adriamycin and Glucocorticoids on Myeloma Cells in vitro. *Acta Haematol*, 89: 61-69, 1993.
- 98- Tafuri A, Meyers J, Lee BJ, Andreeff M: DNA and RNA flow cytometric study in multipl myeloma Clinical correlations, *Cancer*, 67 (2): 449-454, 1991.