

TÜRKİYE CUMHURİYETİ

TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MULTİPL MYELOMALI HASTALARDA NKT HÜCRE SAYILARININ
VİTAMİN D RESEPTÖR POLİMORFİZMİ İLE İLİŞKİSİ

GÖKÇEN OZAN

1178209153

TÜMÖR BİYOLOJİSİ VE İMMÜNOLOJİSİ ANABİLİM DALI YÜKSEK
LİSANS TEZİ

DANIŞMAN DOÇ.DR. Mustafa DOĞAN

Tez No:2021/102

2021-TEKİRDAĞ

TÜRKİYE CUMHURİYETİ

TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MULTİPL MYELOMALI HASTALARDA NKT HÜCRE SAYILARININ
VİTAMİN D RESEPTÖR POLİMORFİZMİ İLE İLİŞKİSİ

Gökçen OZAN

1178209153

TÜMÖR BİYOLOJİSİ VE İMMÜNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN DOÇ.DR. Mustafa DOĞAN

Tez No:2021/102

2021-TEKİRDAĞ



Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde eksiksiz biçimde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

GÖKÇEN OZAN

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince her zaman yanımda olan, desteğini esirgemeyen, güvendiğim, danıştığım, akademik duruşu ve karakteri açısından örnek olarak aldığım, tez çalışmamın gerçekleşmesinde bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mustafa DOĞAN'a, Yüksek lisans tezimi gerçekleştirmem de bilimsel ve klinik olarak bana destek veren, Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Burhan TURGUT'a, İç Hastalıkları anabilim dalı öğretim üyesi Mustafa ORAN'a, Bahadır BATAR'a ve tez çalışmama ait verilerin analizinde emeği geçen, değerli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Birol TOPÇU'ya Çalışmanın çeşitli analizlerini yapmamda destek ve yardımcı olan Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi personeli Sinem BULUŞ'a ve Elif SERDAL'a,

Ayrıca bütün bu yorucu ve güçlüklerle dolu lisansüstü eğitimim de beni daima destekleyen, manevi olarak bana güç veren, annem başta olmak üzere tüm sevgili aileme, her zaman yanımda olan Ekrem Kızılaslan'a, değerli arkadaşlarım Çiğdem Kırış, Nurtaç Karakuş'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Multipl myelom (MM), kemik iliğinde malign plazma hücrelerinin çoğalması ile karakterize hematolojik bir neoplazmlardır. MM tüm hematolojik neoplazmların yaklaşık %10 unun ve tüm kanser ölümlerinin %2 sini oluşturan neoplastik bir hücre bozukluğudur. Patolojik şartların NKT hücrelerinin in vivo şartlarda tümör büyümesinin kontrolündeki rolleri gösterilmiştir. Vitamin D3 ün son yıllarda immünoregülatuar rolünün de olduğu gösterilmiştir. Mutasyonlar bir nükleotidin başka bir nükleotidle değişimi sonucu olabileceği gibi (tek nükleotid değişimi-SNP), DNA dizisine bir nükleotidin eklenmesi ya da çıkması sonucu da oluşabilirler. D vitamininin biyolojik etkilerinin çoğunu bir hücre içi reseptör (VDR)ile gerçekleştirir. Bu reseptör geninde nükleotid gen polimorfizmleri tanımlanmıştır. Tanımlanan bu polimorfizmler arasında rs1544410 (BsmI) intron 8'de, rs731236 (TaqI) ekson 9'da bulunmaktadır.

Çalışmamızın amacı MM 'da kansere karşı immünitede önemi olan NKT hücre sayısını belirleyerek, MM' da NKT hücre sayılarının VDR polimorfizminin (TaqI, BSML) ile ilişkisini belirlemektir. Çalışma grubu yirmi erkek ve on kadın olmak üzere otuz hastadan, kontrol grubu beş erkek ve beş kadın olmak üzere on hastadan oluşturulmuştur. Bu kişilerden saflaştırılmış DNA izolasyonu ile vitamin D reseptör geni üzerinde Real time PCR ile BSML, TaqI gen polimorfizmleri çalışıldı. Ayrıca olguların tamamından elde edilen kan örneklerinde akım sitometri yöntemi ile total lenfosit, total T lenfosit, T hepler, T Sitotoksik, NK hücre, NKT hücreler tespit edildi. Çalışma ve kontrol grubu karşılaştırıldığında, total T lenfosit, T hepler ve sitotoksik lenfositlerde istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı. Çalışma grubunda BSML ve TaqI polimorfizmi açısından homozigot GG aleli %53,3 ve TT aleli %63,3 oranı ile kontrol grubundan daha yüksek bulunurken mutant aleller AA %16,6 ve CC %13,3 kontrol grubundan daha düşük düzeyde bulundu. Elde edilen sonuçlar MM ve VDR polimorfizmi arasında bir ilişki ortaya koymuş olsa bile bu ilişkinin varlığından bahsedebilmek için daha geniş olgu serileriyle ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

ANAHTAR KELİMELER:1.Multipl miyeloma 2.Vitamin D reseptör polimorfizm 3. BSML 4. TaqI 5. CD3

ABSTRACT

Multiple myeloma (MM) are hematological neoplasms with proliferation of malignant plasma cells in the bone marrow (13). MM is a neoplastic cell disorder in approximately 10% of all hematological neoplasms and 2% of all cancer deaths. Role of pathological conditions in controlling NKT cells in tumor growth in vivo. As in the immunoregulatory role of vitamin D3 in the probe. Mutations may occur as a result of a nucleotide change from one nucleotide to another (single nucleotide change - SNP), or as a result of the addition or deletion of a nucleotide to the DNA sequence. Most of the biological effects of vitamin D are fraught with an intracellular receptor (VDR). Among the identified polymorphisms, rs1544410 (BsmI) is located in intron 8, rs731236 (TaqI) in exon 9. Nucleotide gene polymorphisms in these sites or gene.

The purpose of our study is to determine the number of NKT cells, which is important in immunity against cancer in MM, and the relationship between the number of NKT cells and VDR polymorphism (TaqI, BSMI) in MM. The study group consists of 30 patients, including twenty men and ten women. It was composed of ten patients, including women. BSMI and TaqI gene polymorphisms were studied by Real-time PCR on the vitamin D receptor gene by isolation of purified DNA from these individuals. In addition, in blood samples obtained from all cases, by flow cytometry method, total lymphocytes, Total T lymphocyte, T helper, T cytotoxic, NK, NKT cells were detected. When the study and control groups were compared, there was a significant difference in total T lymphocyte, T helper and cytotoxic lymphocytes. In the study group, the homozygous GG allele was found to be higher than the control group with a rate of 53.3% and the TT allele with a rate of 63.3% in terms of BSMI and Taq I polymorphism, while AA 16.6% and CC 13.3% mutant alleles were lower than the control group. Even though the results obtained reveal a relationship between MM and VDR polymorphism, further studies with larger case series are needed to talk about the existence of this relationship.

KEYWORD: 1-Multiple myeloma 2-Vitamin D receptor polymorphism 3-BSMI 4-TaqI 5-CD3

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
Özet	iv
Abstract	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLO DİZİNİ	vii
ŞEKİL DİZİNİ	viii
KISALTMALAR	ix
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1 İMMÜN SİSTEM	3
2.2 NKT HÜCRE	5
2.3 MULTİPL MİYELOM	7
2.3.1 MM Klinik Bulguları:	9
2.3.2 MM Tanısı ve Tedavisi:	10
2.3.3 MM 'da NKT HÜCRELERİ	10
2.4 D VİTAMİNİ	11
2.5 AKIM SİTOMETRİ	14
2.6 POLİMORFİZM	15
3.GEREÇ VE YÖNTEM;	16
3.1 Kullanılan araç ve gereçler:	16
3.2 Örneklerin Hazırlanması	17
3.3 UYGULANAN YÖNTEMLER	18
3.3.1 AKIM SİTOMETRİ YÖNTEMİ	18
3.3.2 DNA İZOLASYON YÖNTEMİ	19
3.3.3 Real Time PCR Yöntemi:	20
3.3.4 İSTATİSTİKSEL ANALİZ:	21
4.BULGULAR	22
5. SONUÇ VE TARTIŞMA:	37
6. ÖNERİLER	43
7. KAYNAKÇA	44

TABLO DİZİNİ

Tablo 1 Araştırmada kullanılan cihazlar ve markaları; kullanılan sarf ve diğer malzemeler	17
Tablo 2 MM Hastası ve kontrol grubunun yaş ve cinsiyet dağılımı	22
Tablo 3 Araştırma sonucunda hasta ve kontrol grubundan elde edilen verilerin istatistik sonuçları.....	23
Tablo 4 Akım sitometri sonuçları ile klinik durum arasındaki ilişki	24
Tablo 5 Hasta ve kontrol gruplarının VDR polimorfizm istatistik sonuçları.....	25
Tablo 6 Miyelom Tiplerinde Taq1 ve BSML Polimorfizmi Görülme Sıklığı İstatistiksel Sonuçları	25
Tablo 7 Hastaların remisyon durumuna göre TaqI görülme sıklığı.....	26
Tablo 8 Akım sitometri sonuçlarının BSML polimorfizmi ile ilişkisi.....	27
Tablo 9 Akım sitometri sonuçlarının Taq1 polimorfizmi ile ilişkisi	27
Tablo 10 Hasta grup akım sitometri sonucu	28
Tablo 11 Kontrol Grubu Akım Sitometri Sonucu.....	29
Tablo 12 MM Hastası Bireylerin DNA İzolasyonu Sonuçlar	30
Tablo 13 Kontrol Grubunun DNA İzolasyon Sonuçları	31
Tablo 14 MM Hastası Bireylerin Real time PCR Sonuçları	32
Tablo 15 Kontrol Grubu Real time PCR Sonuçları	33
Tablo 16 Çalışmadaki MM hastalarının klinik veriler	34
Tablo 17 Hasta Bireylerin Klinik Veri İstatistik Sonuçları.....	36

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1 Doğal ve kazanılmış immün sistem elemanları	3
Şekil 2 Doğal ve Kazanılmış İmmün Sistemin Aktivasyonu.....	4
Şekil 3 İmmün sistem hücreleri	6
Şekil 4 MM ‘da anormal plazma hücreleri	8
Şekil 5 MM patogenezinin şematik gösterimi	9
Şekil 6 D3 vitamini metabolizması(36)	11
Şekil 7 Ergosterol ve 7-dehidrokolesterolün,ergokalsiferol ve kolekalsiferole çevrilmeleri (Üstdal ve ark., 2003).....	13
Şekil 8 Flow sitometri çalışma prensibi	14
Şekil 9 Flow sitometri cihazı	15

KISALTMALAR

CD	:Cluster of differentiation
DNA	:Deoksiribonükleik Asit
EDTA	:Etilendiamin-Tetra asetik asit
IFN	:İnterferon gama
IL-2	:İnterlökin-2
IL-4	:İnterlökin-4
IL-6	:İnterlökin-6
MM	:MultiplMiyeloma
M proteini	:Monoklonal M proteini
NK	:Doğal katil hücreler
NKT	:Doğal katil T hücreler
PAMP	:Patojen İlişkili Moleküler
Real -Time PCR	:Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
UV	:UltraViyole
VDR	:D Vitamin reseptörü

THR :T hücre reseptörü

TNF- :Tümör Nekroz Faktör alfa

VDR : D Vitamin Reseptör



1.GİRİŞ

İmmünoloji bilimi, immün sistemin patojenlere ve zedelenmiş dokulara karşı verdiği immün yanıtları araştırır. İmmün sistem tümör hücrelerinin yok edilmesinde rol oynamaktadır. Bu nedenle tümör hücrelerine karşı immün yanıtı uyularak kanseri tedavi etmek üzere çeşitli yöntemler geliştirmektedir. Normal durumların dışında gelişen immün yanıt ciddi morbidite ve mortalite ile sonuçlanabilen birçok enflamatuvar hastalığın nedenidir (1).

MM monoklonal immunoglobulin (M proteini) salgılayan plazma hücrelerinin neoplastik bir proliferasyonudur. Bu neoplazm en sık görülen hematolojik kanserlerdendir ve genellikle ileri yaşlarda ortaya çıkmaktadır (2) Genellikle kemiklerde litik lezyonlar, immün yetersizlik, renal, nörolojik bulgular ile karakterizedir. MM nin etiyolojisinde; radyasyon, t(11; 14), t(14; 18), t(8; 14); 13q delesyon gibi genetik bozukluklar, ailevi yatkınlık, IL 6, IL1- β gibi sitokinlerdeki değişiklikler rol oynamaktadır (3).

Doğal öldürücü T (NKT) hücreleri, CD1d moleküllerin sunduğu glikolipid ligandlarını tanıyan, doğal öldürücü (NK) hücre markerleri taşıyan, T lenfositlerdir. NKT hücreleri, tümör ve patojenlere karşı korunmada ve immün düzenlemede önemli bir rol oynamaktadır. Bu hücreler, güçlü sitokin üretimi, antianjiyogenez ve diğer hücrelerin, özellikle NK hücrelerinin ve dendritik hücrelerin aktivasyonu gibi çeşitli mekanizmalarla antitümör etkilere aracılık eder (22). MM' da NKT hücrelerinde fonksiyon bozukluğu olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (61). MM ilerlemesinin NKT hücreleri tarafından salgılanan IFN- γ 'nın yetersizliği ile ilişkilendirilmiştir (62,63).

Vitamin D'nin immün hücrelerde de sentezlendiği ve aktif D vitamininin immün modülatör etkileri olduğu gösterilmiştir (56,57). İn vitro çalışmalarda D vitamininin aktif formu proinflamatuvar yardımcı T hücreleri olan Th1 ve Th17'nin

cevaplarını baskıladığı, IL-4, IL-5 ve IL-10 üretimini arttırarak Th2 ve düzenleyici T hücre fenotipini desteklediği gösterilmiştir (56-57).

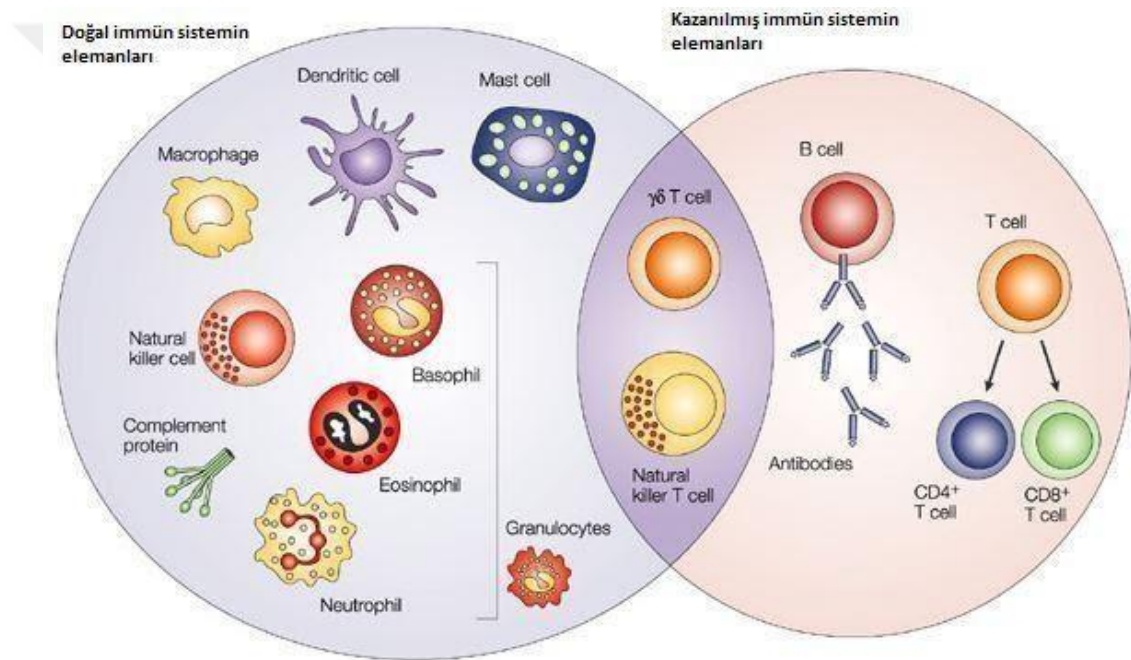
Yapılan çalışmalarda vitamin D düzeyinin kansere bağlı mortaliteyi azalttığı ve kanser tedavisinde olumlu etkiler sağladığı ile ilgili bulgular mevcuttur (58). Vitamin D reseptörü (VDR) ilk kez 1969 yılında tanımlanan nükleer hormon reseptör gen ailesinin bir elemanıdır. VDR' yi kodlayan gen 12q13.11'de lokalizedir, uzunluğu 100 kb olup üzerinde 100'den fazla polimorfizm tanımlanmıştır (54-55). Yapılan çalışmalarda MM' lı hastalarda rs1544410 (BSML) ve (rs731236) TaqI polimorfizm görülme sıklıkları önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir (53).

Bu bilgilerden yola çıkarak bu çalışmamızda MM' lu hastalarda BSML ve TaqI polimorfizmlerinin MM' da immün yanıtın önemli bir belirleyicisi olan NKT, NK ve diğer T lenfosit alt tipleri üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 İMMÜN SİSTEM

İmmün sistem işlevleri için yapılan ilk çalışmalar 1883 yılında mikroorganizmaları ve diğer yabancı maddeleri fagosite etme özelliğinde immün sisteminin bir parçası olarak düşünülen bazı lökositlerin tespitiyle başlamıştır (4).



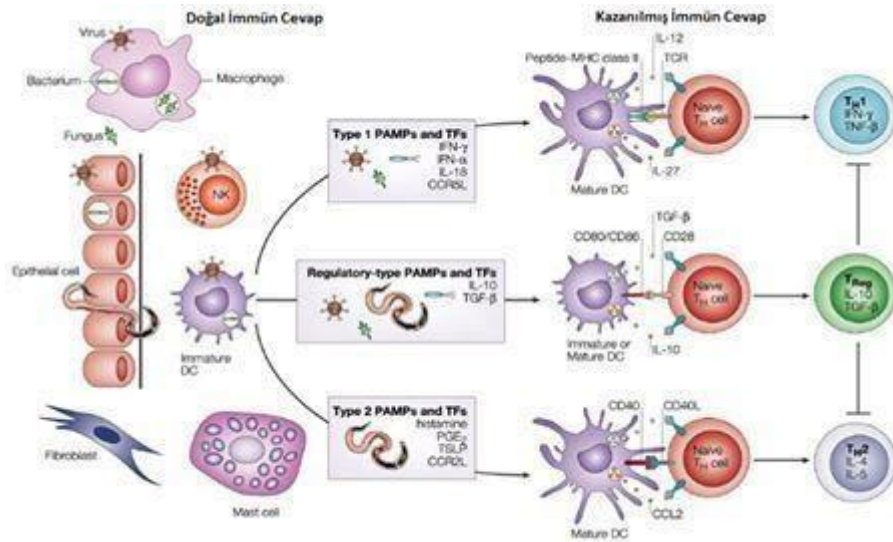
Şekil 1 Doğal ve kazanılmış immün sistem elemanları

1900'lü yıllardan sonra ise aşı çalışmaları ile birlikte immünolojide önemli bilgiler olaylar ortaya çıkmaya başlamıştır. Pfeiffer; kompleman varlığını göstermiştir. Metchnikoff; fagositoz olayını incelemiştir, Ricket ve Portier; alerji olayını ortaya çıkardılar ve immün cevabın her zaman koruma sağlamadığını, bazen canlıya zarar veren alerjik reaksiyonların meydana gelmesine neden olabileceğini göstermişlerdir. 1950'li yıllardan sonra ise doku grupları, immünite bozuklukları, tümör ve

transplantasyon immünolojisi, immünojenetik konularında büyük ilerlemeler sayesinde immünoloji biliminde gelişmeler kaydedilmiştir (5).

İmmün sistem organizmaya yabancı olan antijenleri doğal ve kazanılmış komponentleri arasındaki çok yönlü ve karmaşık işleyiş ve denge sayesinde tanıyıp yok edebilme özelliğine sahiptir. Temel immünoloji biyolojik bilimin ana konuları arasında bulunmakta olup ; araştırma ,inceleme ve gelişmeye açık bir bilim dalıdır (6).

Vücudumuza giren mikroorganizmalara karşı, ilk korumayı fiziksel, kimyasal ve biyolojik bariyerler oluşturur. Eğer mikroorganizma engelleri aşılıp vücuda enfekte olursa, vücudumuzda doğuştan gelen, mikroorganizmayı karşılayıp tanıyan ‘doğal immün sistem’ çok kısa sürede harekete geçer. Bu sistemin hücreleri olan nötrofil, makrofaj, NK hücreler ve protein yapısındaki kompleman sisteminin yapı taşları ve hücreler arası iletişim sağlayan sitokinler vücuda giriş bölgesinde birikir, yabancı mikroorganizmalara saldırır ve yok ederler. NK hücreler, hücre zarında hasara neden olarak hücrenin ölümüne yol açarlar.



Şekil 2 Doğal ve Kazanılmış İmmün Sistemin Aktivasyonu

İmmünite özellikle vücudumuza dışarıdan giren yabancı organizmalara karşı gösterilen direnç olarak tanımlanabilir. Enfeksiyonlara karşı savunmayı sağlayan hücreler, dokular ve moleküllerin toplamına immün sistem denir. Bu hücrelerin ve moleküllerin enfeksiyona yol açan mikroorganizmalara karşı belirli aralıklarla verdikleri tepkiye de immün yanıt adı verilir.

Enfeksiyöz etkenlere karşı savunmada özellikle insanlar için patojen ve doğal immüniteye karşı dirençli olabilen mikroorganizmalara karşı edinsel immün yanıtın oluşması gerekir. Edinsel immün sistem, lenfositler ve onların antikorlarından oluşur (1).

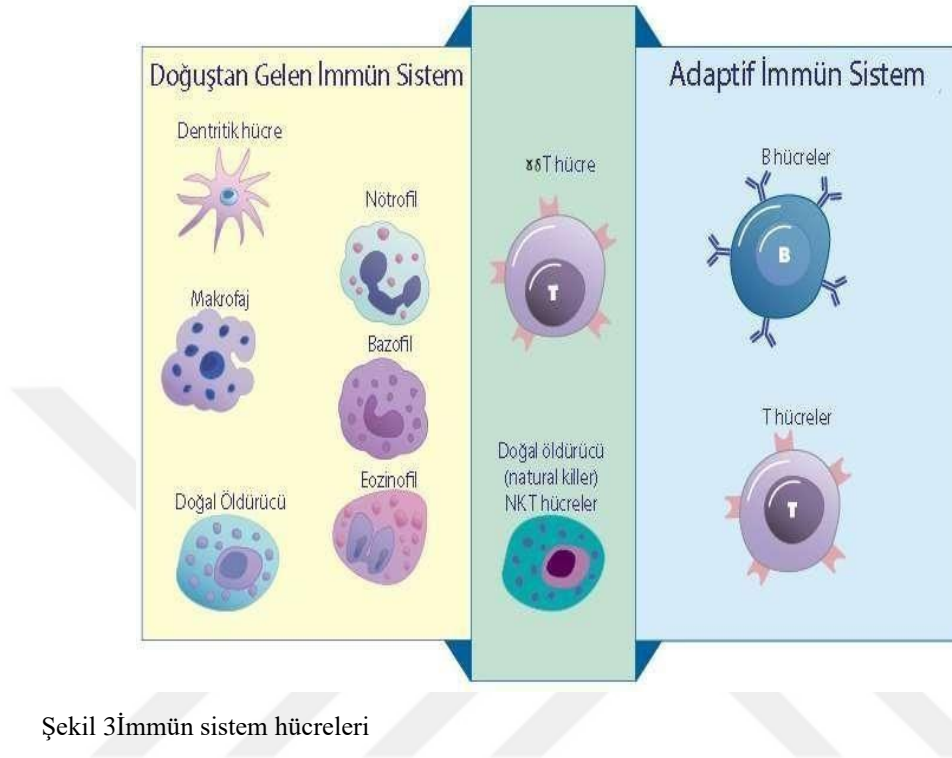
Spesifik veya edinsel immünite, bireyin yaşam süresi boyunca gelişir; organizmaya ait olan ile olmayanı ayırt eder ve farklı patojenlere ve yabancı moleküllere spesifik biçimde yanıt verir. Hücresel immünite, antijen taşıyan hücreleri yok etme yeteneğine sahip T hücrelerinin üretilmesini kapsar. Humoral immünite, B hücrelerinin antijen-spesifik aktiviteye sahip immunoglobulinleri salgılayan plazmaya hücrelerine dönüşümü ile karakterizedir (50).

2.2 NKT HÜCRE

İmmün sistemin bilinen hücrelerinden farklı olarak 1974-1977 yılları arasında büyük granülositik lenfositler tanımlanmış. Bu lenfositlerin T ve B hücrelerinin sahip olduğu antijen reseptörlerini kullanmadıkları bildirilmiştir. Bildirilen bu lenfositler NK hücreler olarak adlandırılmışlardır (7).

Doğal immüntenin elemanı olan NK hücreler, kemik iliği kökenli, büyük granüllü lenfositlerdir. NKT hücreleri, NK hücreleri ve konvansiyonel T hücrelerinin özelliklerini paylaşan T hücre alt grubudur. Bu hücrelerin hızlı immün yanıt, tümör rejeksiyonu, immün denetim ve otoimmün hastalıkların kontrolünde etkin olduğu gösterilmiştir. Çoğu patolojik durumda etki gösteren NKT hücrelerinin in vivo şartlarda tümör büyümesinin kontrolündeki rolleri gösterilmiştir (8).

Başlıca özellikleri; T hücre reseptör gen kullanımının, CD1d bağımlı olması ve başta IFN- ve IL-4 olmak üzere yüksek miktarda sitokin salgılamalarıdır (9).



Şekil 3 İmmün sistem hücreleri

NKT hücreleri hem NK hücrelerinin hem de T lenfositlerin reseptörlerini ve özelliklerini taşıyan lenfositlerdir. NKT hücreleri CD4+ veya çift negatif (CD4- CD8-) fenotipi gösteren, tümör immunitesinde ve otoimmün hastalıklarda düzenleyici işlev gören hücrelerdir. NKT hücreleri sınırlı TH1R ekspresyonu göstermekte ve insanda CD1d ile sunulan glikolipid antijenleri tanıyan T hücre reseptörünü taşımaktadır (10).

Son zamanlarda otoimmün hastalığı bulunan bireylerin periferik kan NK hücre sayısındaki azalmaya benzer şekilde NKT hücrelerin fonksiyonların da azalma saptanmıştır. NKT hücreleri, otoimmüntenin regulasyonundan sorumlu hücreler olup hem NK hem de T hücreleri ile ortak özellik taşıyan T hücrelerinin bir alt grubudur (11).

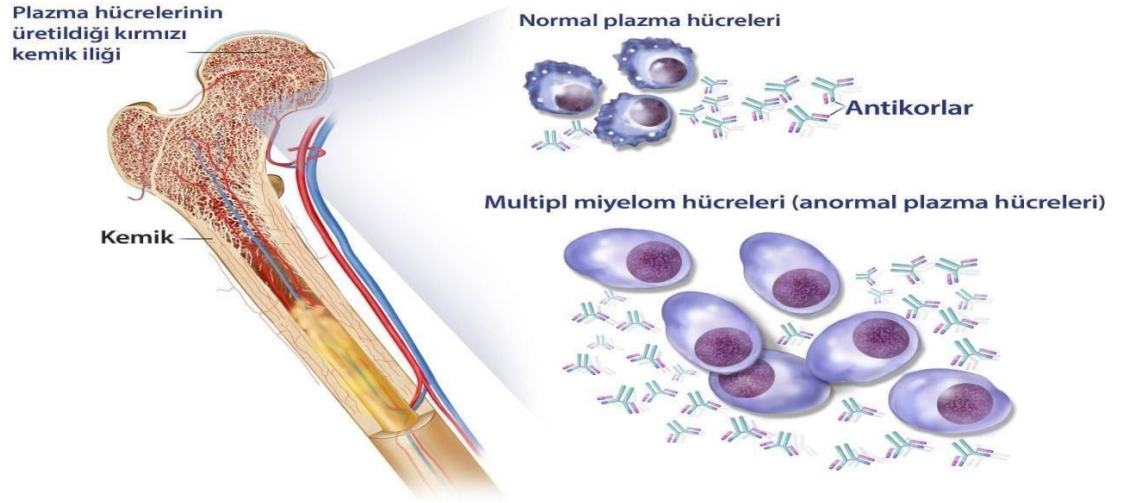
Periferik kan T hücrelerinin %0.2ni oluşturan ve NK hücresine eşlik eden NH1.1 (CD161) belirtecini taşıyan NKT hücreleri aktive olduklarında yüksek miktarda IL-4, IFN- γ , granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) ile IL-2 ve TNF- α gibi pek çok sitokin ve kemokin üretebilmektedir. CD1d bağımlı NKT hücrelerinin en iyi tanımlanan alt grubu değişmez THR- α eksprese etmekte ve Tip1 veya değişmeyen NKT hücreleri (iNKT) olarak adlandırılmaktadır. NKT hücrelerinin bozukluğu veya yetersizliğinin diyabet gibi otoimmün hastalıklar ve kanser patogenezinde rol oynayabileceği bildirilmiştir (10).

2.3 MULTİPL MİYELOM

MM, kemik iliğinde neoplastik plazma hücrelerinin büyümesi ile karakterize hematolojik bir malignitedir (12). Neoplastik plazma hücreleri tarafından salgılanan monoklonal M proteini kanda ve idrarda artarak semptomlara yol açar. Anemi, hiperkalsemi, böbrek fonksiyon bozukluğu ve patolojik kırıkların eşlik ettiği kemik ağrıları MM 'da sıklıkla gözlenir (13,14).

MM erkeklerde daha sık görülmekte olup (yaklaşık 1.4/1) tanı anında ortalama yaş erkeklerde 69 kadınlarda 72'dir (2). En sık görülen 2. hematolojik neoplazmdir (16). MM tüm hematolojik neoplazmların yaklaşık %10' unu ve tüm kanser ölümlerinin %2' sini oluşturan neoplastik bir plazma hücre bozukluğudur (16-17).

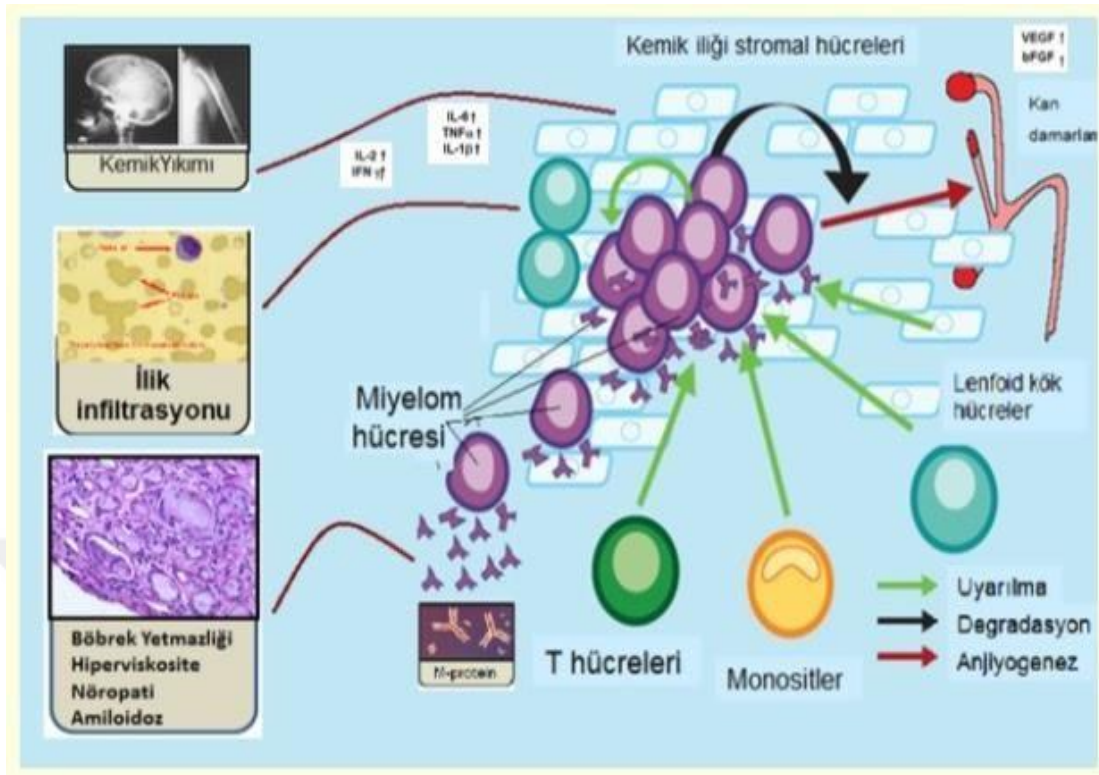
MULTİPL MİYELOM



Şekil 4 MM 'da anormal plazma hücresi

MM, hastalarının %80-%90' ında litik kemik lezyonları geliştiren kemiğe yerleşen şiddetli kemik ağrısı hiperkalsemi, patolojik kırıklar ve omurilik kompresyon sendromları ile ilişkilidir (18). Öne çıkan bu iskelet komplikasyonları, MM morbidite ve mortalitenin başlıca nedenlerindedir (19).

MM'nin biyolojik yapısının daha iyi anlaşılmasına başlanmasıyla hastalığın patogenezi önemli bir rol oynayan kemiik iliği mikroçevresini ve myelom hücrelerini hedefleyen talidomid, lenalidomid ve bortezomib gibi güncel tedavilerin geliştirilmesinin önü açılmıştır (52).



Şekil 5 MM patogenezinin şematik gösterimi

Çalışmalarda, MM da morbiditenin önemli bir nedeni olan iskelet komplikasyonlarına düşük serum D vitamini düzeylerinin katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür (20-21).

2.3.1 MM Klinik Bulguları:

Kemik sorunları (özellikle sırtta, kalçada ve kafatasında ağrılar), anemi, hiperkalsemi (kalsiyum seviyesinde yükselme), hiper viskosite (kan akışkanlığın azalması), hafif zincir atılımına bağlı böbrek yetmezliği, amiloidozun belirtileri, humoral ve hücreli immünite bozukluğuna bağlı tekrarlayan enfeksiyonlar MM' de gözlenen klinik bulgulardır (22).

2.3.2 MM Tanısı ve Tedavisi:

MM teşhisi koyarken genellikle güçlüklerle karşılaşmaktadır. Bu nedenle, MM tanısı kemik iliği aspirasyonu, kemik iliği biyopsisinin immünohistokimyasal incelemenin yanı sıra klinik ve laboratuvar bulgular ışığında konulur (23).

Tanı yöntemleri şunlardır;

1) Laboratuvar testleri; kan sayımı, kantitatif immüno globulin ölçümleri, serum protein elektroforezi ve immünelektroforez yöntemleri, serumda serbest hafif zincir ölçümü, kan biyokimyası testleri, kemik iliği biyopsisi ve immünohistokimyasal incelemesi, akım sitometrisi, prognostik değerlendirmede beta 2 mikroglobulin, konvansiyonal, floresan in situ hibridizasyon (FISH) ile yapılan sitogenetik değerlendirme

2) Amiloidoz tanısı için biyopsi,

3) Diğer biyopsi testleri (ince uçlu iğne aspirasyonu biyopsisi, çekirdek iğne biyopsisi)

4) Radyolojik görüntüleme; PET-CT taraması, manyetik rezonans ile görüntüleme (MRI) ve bilgisayarlı tomografi

Tedavi:

MM 'da kemoterapi gibi, radyoterapi ve kök hücre nakli halen kullanılmaktadır. Ancak proteozom inhibitörleri, lenalidomid, talidomid gibi immunomodülatuar ilaçlar ve plazma hücrelerinin taşıdığı antijenlere karşı geliştirilen antikor tedavileri son yıllarda tedavi seçenekleri arasına girmiştir (24).

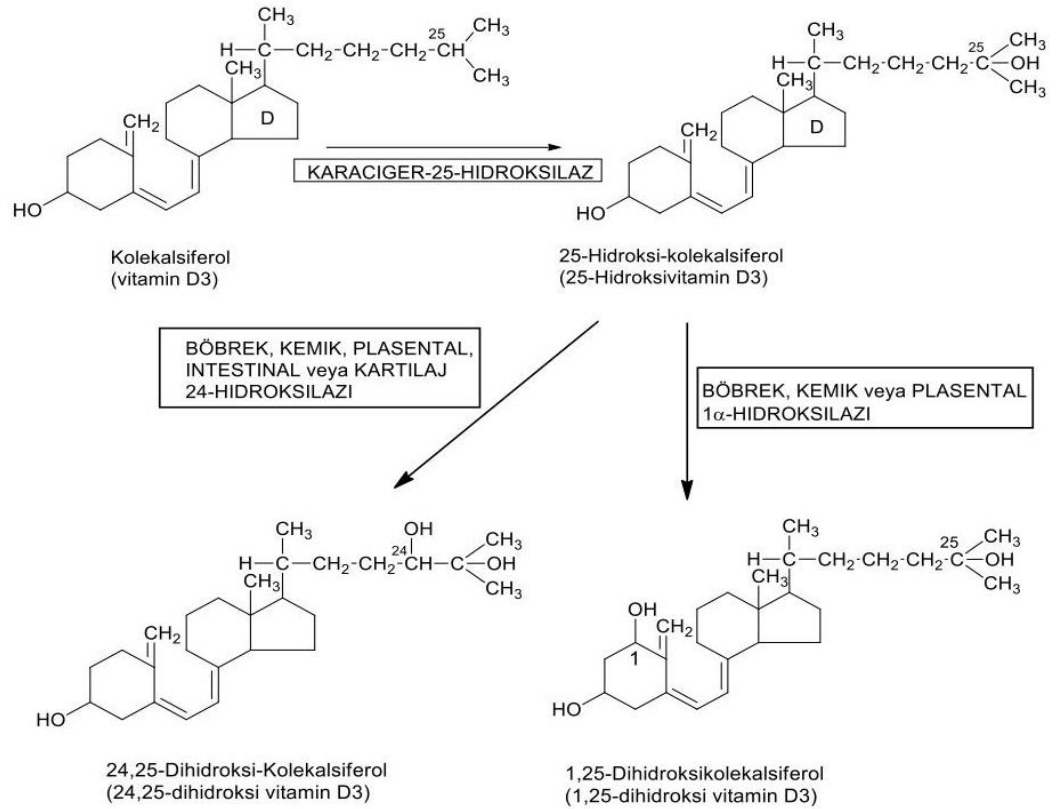
2.3.3 MM 'da NKT HÜCRELERİ

Doğal öldürücü T (NKT) hücreleri, CD1d moleküllerin sunduğu glikolipidligandlarını tanıyan NK markerlerini taşıyan T lenfositlerdir. NKT hücreleri, tümör ve patojenlere karşı korunmada ve immün düzenlemede önemli bir rol

oyunmaktadır. Bu hücreler, güçlü sitokin üretimi, antianjiyogenez ve diğer hücrelerin, özellikle NK hücrelerinin ve dendritik hücrelerin aktivasyonu gibi çeşitli mekanizmalarla antitümör etkilere aracılık eder. (22)

2.4 D VİTAMİNİ

Vitaminler vücutta gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonları düzenleme rolünü üstlenen önemli organik bileşiklerdir. Enzimlerin yapısına katılarak koenzim olarak adlandırılmasını sağlar. Vitaminler vücuda yeterli düzeyde alınmalıdır. Eksikliği ya da fazlalığı vücut için risk oluşturur. D vitamini tekrarlayan alerji, kanseri tetikleyen genlerin faaliyete geçmemesi için ihtiyaç duyulan bir vitamindir.



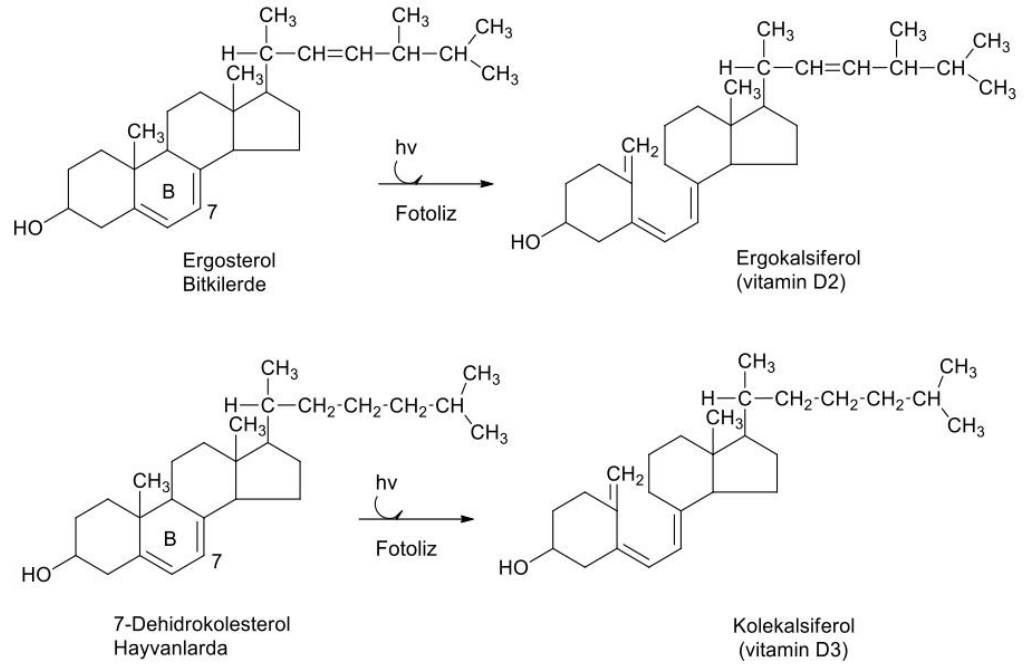
Şekil 6 D3 vitamini metabolizması(36)

1,25 -dihidroksi vitamin D (1,25(OH)₂ D) metabolik olarak aktif form,kalsiyum ve fosfat homeostazisinin önemli bir düzenleyicisidir.Bu nedenle kemik mineralizasyonunda önemli rol oynar(25,26). Bunun yanı sıra 1,25-dihidroksi

vitamin D3 [1,25(OH)₂ D₃] ün son yıllarda immünregülatuar rolünün de olduğu gösterilmiştir (6).

D vitamininin antimikrobiyal etkisi PAMPs diye bilinen bakteriyel ürünlerin toll-like reseptörler tarafından tanınması ile başlar. Makrofaj ekstraselüler sıvıdaki 25 hidroksi vitamin D'yi endositozla hücrenin içine alır. 1,25 dihidroksi D vitamini hücrenin içinde sentezlenir ve kendi reseptörüne (VDR) yapışacak duruma gelir. Vitamin D reseptörünün uyarılması, endojen defensin genleri ve cathelicidin üretimini artırır. Bu ürünler bakterilerde öldürücü etkiye sahiptir (27)

D vitamini kalsiferol olarak adlandırılır. D vitamininin temel iki formu vardır. Bunlar ; vitamin D2 (ergokalsiferol), D3 vitamin. D2 ergosterolün ultraviyole B ışını ürünü olarak bitkilerde bulunur. Vitamin D3 ise dehidro kolesterolden kaynaklanır ve previtamin D3 içinden ultraviyole B ışını geçtikten sonra oluşan üründür. Vitamin D3 ya ciltte sentezlenmiştir, ya da yağlı balıklar (uskumru, somon, sardalya), süt ve süt ürünleri, mantar, yumurta sarısı gibi ürünlerden alınabilir. Ancak vücutta D vitamininin aktifleşmesi için yeterli düzeyde güneş ışığı almalıyız (28).



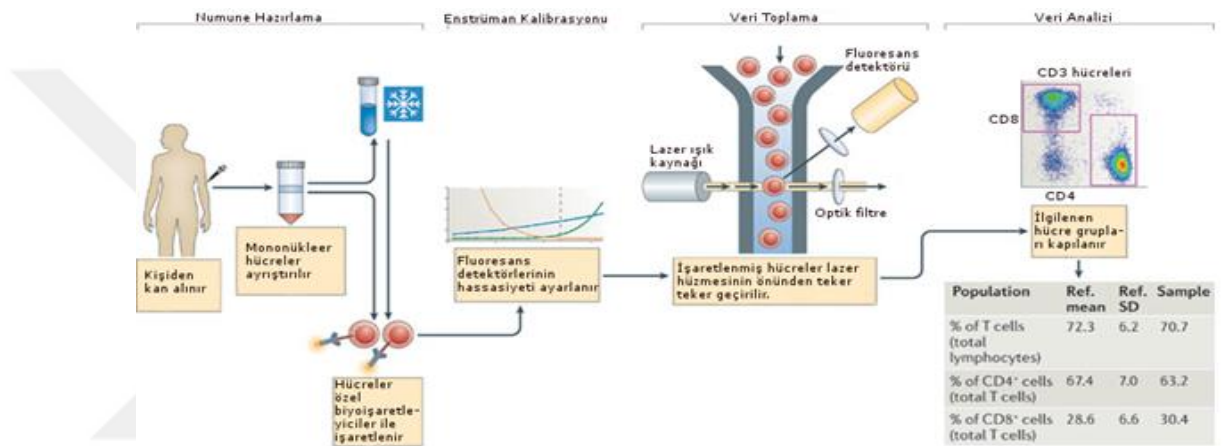
Şekil 7 Ergosterol ve 7-dehidrokolesterolün, ergokalsiferol ve kolekalsiferole çevrilmeleri (Üstdal ve ark., 2003).

D vitamini provitamin olarak vücutta bulunur. güneş ışınları sayesinde aktifleşir. D2 ve D3 vitaminleri bağırsak hücresi tarafından emilir daha sonra karaciğerde 25-(OH) D3'e çevrilir, ardından böbreğe geçerek D vitaminin aktif formu olan 1,25-(OH)₂ D3'e dönüştürülürler.

D vitamininin biyolojik olarak aktif formu, steroid yapıları hormon reseptör ailesinin bir üyesi olan VDR proteinine bağlanarak etkisini gösterir (29). Bu hormon reseptör kompleksi, hedef genlerin promotör bölgesinde lokalize olan vitamin D ye yanıt veren elemanları ile çok sayıda geni bağlar ve transkripsiyonel olarak aktive eder (30). D vitamini reseptör kompleksi tarafından düzenlene bu genler; büyüme, kemik mineralizasyonu hücre farklılaşma, hücre döngüsü, apoptoz ve immün yanıt dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik süreçlere aracılık eder (31).

2.5 AKIM SİTOMETRİ

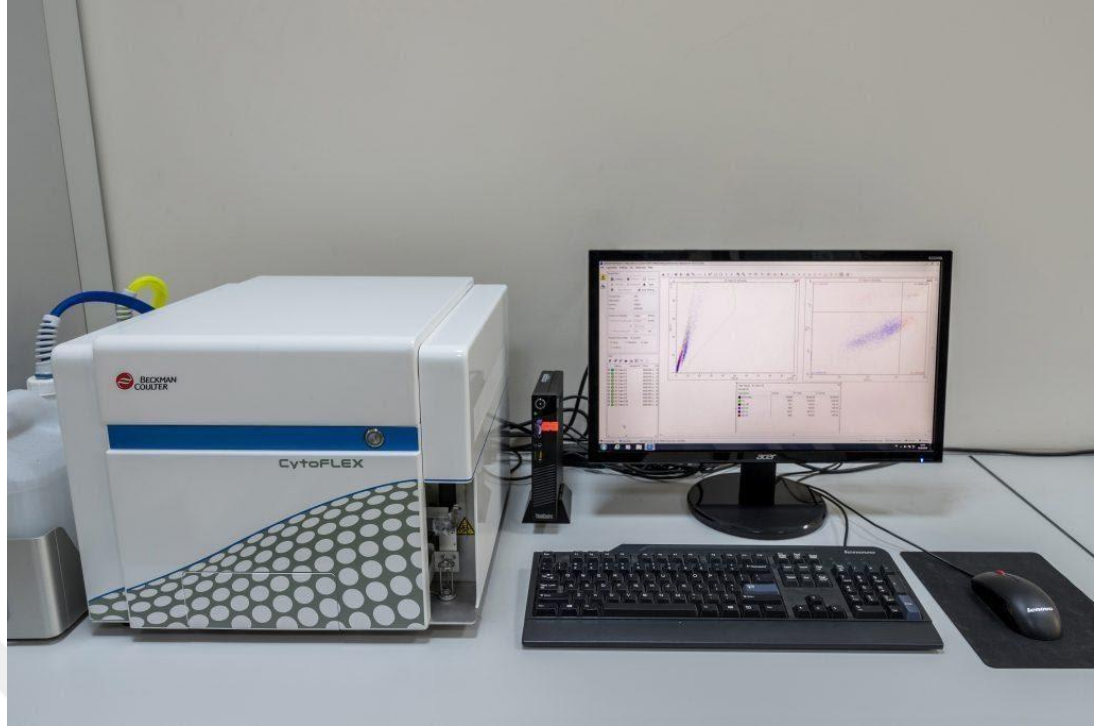
Akım sitometrisi ile bir süspansiyon halindeki hücre ya da partiküller, lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilir; hücrelerin lazer ışığının önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir. Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrenin büyüklük, granülarite gibi morfolojik özellikleri olabildiği gibi; hücreye bağlanan çeşitli fluorokromlar da olabilir. Böylece hücre ya da partikülün immünfenotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi edinilebilir (32).



Şekil 8 Flowsitometri çalışma prensibi

Klinik ve araştırma laboratuvarlarında immünoloji, hematoloji, onkoloji, moleküler biyoloji, mikrobiyoloji, parazitoloji, enfeksiyon, yardımcı üreme teknikleri, patoloji, radyasyon onkolojisi, enfeksiyon hastalıklarında, HIV, tüberküloz, paroksimal nokturnal hemoglobinüri, malaria, bitki biyolojisi ve deniz biyolojisi alanlarında kullanılmaktadır. "Flow" sitometri ile hücrelerin eksprese ettikleri antijenlere monoklonal antikörler kullanılarak kan ya da kemik iliği gibi karışık populasyonda belli bir hücrenin belirlenmesi ve ayrılması yapılabilir (33).

Flowsitometride T hücreler uygun protokole uygun okunur ve bu esnada hücreler lazer dedektörden geçerler. Boyut, granül yapısı ve boyaları dalga boyuna göre eksprese edilir.



Şekil 9 Flowsitometri cihazı

2.6 POLİMORFİZM

Polimorfizm, Latince poli (çoklu) ve morfizmos (form) kelimelerinden oluşmuştur ve çok şekillilik anlamını taşıyan bir kelimedir. Genetik polimorfizm ise aynı popülasyonda bir bölgedeki (lokusta) bulunan genin iki veya daha fazla alelinin belli frekansta görülmesidir. Polimorfizmler, mutasyon sonucu oluşurlar. Mutasyonlar bir nükleotidin başka bir nükleotidle değişimi sonucu olabileceği gibi (tek nükleotid değişimi-SNP), DNA dizisine bir nükleotidin eklenmesi ya da çıkması sonucu da olabilirler (34).

VDR geninde bazı polimorfizmler gösterilmiştir. Bunlardan; rs1544410 (BsmI), rs7975232 (ApaI) intron 8'de, rs731236 (TaqI) ekson 9'da bulunmaktadır (35).

3.GEREÇ VE YÖNTEM;

Bu prospektif çalışma Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Uygulama Hastanesinde Hematoloji Ana Bilim dalında Nisan 2020- Temmuz 2020 tarihleri arasında yürütüldü. Çalışma Helsinki Deklarasyonu Kararlarına, Hasta Hakları Yönetmeliğine ve etik kurallarına uygun olarak yapılmış olup TNKÜ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan onay aldı (Ek 1). Çalışmaya başlamadan önce çalışma grupları sözlü ve yazılı olarak bilgilendirildi ve yazılı onayları alındı (Ek 2). Hematoloji Bilim Dalında takip edilen, 18-85 yaş arası, MM tanısı konmuş hastası çalışmaya alındı. Çalışmada kullanılan araç ve gereçler tablo 3.1 de verilmiştir.

Çalışmaya dahil edilme kriterleri;

-18 yaşından büyük

-Histolojik olarak doğrulanmış MM tanılı olmak

Çalışmaya alınmama kriterleri;

MM dışında aktif malign hastalığı olması

Aktif enfeksiyonu veya enflamatuvar hastalığı olması

3.1 Kullanılan araç ve gereçler:

Çalışma süresince kullanılan cihazlar, markaları Tablo 1' de verilmiştir. Kullanılan sarf ve diğer malzemelerin markaları Tablo 1' de sunulmuştur.

Tablo 1 Araştırmada kullanılan cihazlar ve markaları; kullanılan sarf ve diğer malzemeler

Santrifüj	Mikro 200 R Hettich Zentrifugen
Vortex	Isolab
Buhar banyosu	Nüve bath
Çeşitli hacimlerde pipet seti	Eppendorf Researchplus
Akım sitometri Cihazı	Beckman Coulter Navios,USA
Real Time PCR kitleri	Lightsnip Assay
Real Time PCR cihazı	Light Cyler 2.0 Roche
Buzdolabı(+4,-20)	Arçelik
DNA izolasyon kitleri	High Pure PCR Template Preparation Kit , Roche

3.2 Örneklerin Hazırlanması

Hasta ve kontrol grubunu oluşturan sağlıklı gönüllülerden akım sitometrik analiz için kan örnekleri sabah saat 08.00-10.00 arasında, aç karnına, sağ antekubital brakial venden 2 ml %7,5 EDTA içeren vacutainer tüplere (BD Vacutainer K3E) 7 ml olarak alındı. Kan örnekleri alındıktan sonra 2 saat içinde çalışıldı. Lenfosit alt tiplerini belirlemeye yönelik akım sitometrik çalışmada, farklı floresan maddelerle işaretli, anti-CD3, anti-CD16, anti-CD4, anti-CD56, anti-CD8 monoklonal antikorları kullanılmıştır.

3.3 UYGULANAN YÖNTEMLER

3.3.1 AKIM SİTOMETRİ YÖNTEMİ

AKIM SİTOMETRİ ÇALIŞMASI İÇİN NUMUNE HAZIRLAMA PROTOKOLÜ;

1. Numaralandırılmış tüplere antikorlar (10 µl) anti-CD3-FITC/ anti-CD16-PE / anti-CD4-ECD / anti-CD56-PC5 ve anti-CD8-PC7 sırasıyla pipetlendi.
2. Üzerine 100 µl hücre süspansiyonu pipetlendi. Vortekslendi.
3. 15 dk sonra oda sıcaklığında karanlıkta inkübasyona bırakıldı.
4. Tüplere 500 µl Optilyse C eklenip vortekslendi.
5. 10 dk oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi.
6. Tüplere 500 µl PBS(Isoflow)konulup vortekslendi.
7. 10 dk oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi.
8. 300 xg'de 5 dk santrifüj edildi.
9. Tüpler yavaşça dökülerek süzülüp, ağız kısmı kurulandı.
10. Üzerlerine 2 ml Isoflow eklenip. Vortekslendi.
11. 300 xg' de 5 dk santrifüj edildi.
12. Süpernatant atıldı.
13. Tüplere 500 µl PBS/Formaldehit konarak +4 C de, okumaya kadar saklandı.
14. Örnekler Beckman Coulter Navius akım sitometri cihazında çalışıldı ve Kaluza programında analiz edildi.

3.3.2 DNA İZOLASYON YÖNTEMİ

MM hastalardan EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerinden DNA izole edildi.Elde edilen DNA konsantrasyonlarını ölçerken 1 µl numune yeterli olmuştur(DNA elution bufferda çözdüldü.) . Spektrofotometrede nükleik asit ölçümü yapıldı.Konsantrasyon ölçümü nano dropla ölçüldü.Saflık değeri için en ideal ölçüm sonucu 1.80 idi.

DNA izolasyonu için numune hazırlama protokolü;

1. Ependorf tüpleri numaralandırılarak üstüne ve yanına hasta ismi yazıldı.
2. Homojen olması için kan tüpte karıştırıldı.
3. Pipeti 200 µl ye ayarlandı.
4. Tüplere 200 µl binding buffer eklendi.Bu işlem hücrelerin fosfolipid tabakalarını parçalamak için yapıldı.
5. Proteinleri inhibe etmek için de 40 µl proteinaz K katıldı
6. Eppendorf tüpler ortalama 20 saniye vortekslendi.
7. Ependorf tüpleri parafilmlendi.
8. Ependorf tüpleri santrifüj kutusuna koyup folyo ile kapatılıp bantlandı ve su banyosuna konuldu.
9. Eppendorf tüpler 70 santigratta 10 dakika su banyosunda bekletildi.
- 10.O esnada High Pure Spn filtreli tüpleri hazırlandı.
- 11.Ependorf tüpleri su banyosundan çıkarılıp üzerine izopropanol alkol konuldu.
- 12.Alkolün tüm hücrelere girmesi için 10 saniye vortekslendi.

13.Ependorf ları high pure filtre kabına, 500-600 µl geçirildi. Tüplerin tam ortasına bırakmaya dikkat edildi.

14.Tüpler santrifüj cihazında 8.000 rcf 'de 1 dakika 15 saniye döndürüldü.

15.Cihazdan çıkınca tüplerin toplama kabını atıp yenisiyle değiştirildi.

16.Çıkarılan tüpleri 500 µl inhibitor removal buffer konuldu.

17.Tüpler 8.000 rcf de santrifüj edildi.

18.Tüplere 500 µl wash buffer konuldu.

19.8f de 1.15 saniye santrifüj edildi.

20.Tekrar 500 µl e wash buffer konuldu.

21.8F' de 1.15 saniye santrifüj edildi.

22.Elution buffer su banyosuna koyup erimesi sağlandı

23.Tüpleri santrifüjden çıkarıp 100 µl elution buffer konuldu.

24.8f de 1.15 saniye santrifüj edildi.

25.Filtreli tüpler atıldı.

26.Ependorflar numaralandırılır ve +5'e kaldırıldı.

27.Ortalama birkaç saat +5 te daha sonra -20'de saklandı.

3.3.3 Real Time PCR Yöntemi:

İzole ettiğimiz DNA'ları polimorfizmlerini bakmak amacıyla Real time PCR yöntemi uygulandı.VDR genindeki rs1544410 (BsmI) ve rs731236 (TaqI) polimorfizmine çalışıldı.

Yapılan Real time PCR sonuçlarında raporun 2 pik vermesi hastanın heterozigot olduğunu tek pik mutant ya da normal genotipli olduğunu gösterir

Çalışmaya başlamadan önce soğuk kurşun akü üzerinde kit hazırlığı yapıldı.Vitamin D reseptör geni,rs731236 ve rs1544410 tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) , real-time PCR yöntemi ile genotiplendi . Real-Time PCR

reaksiyonu ve erime eğrisi ,20 µl'lik bir hacimde gerçekleştirildi. Genotipleme için erime eğrisi analizi yapıldı.

Real time PCR protokolü;

Karışım hazırlanırken H₂O dan 67 µl, MgCl 8 µl, DNA master (fast enzim) 10 µl, reagent mix 5 µl, 1 µl DNA kullanıldı

Çalışma için kullanılacak kapiller çıkartıldı.Malzemeler santrifüjde5-10 sn karıştırılıp vortekslendi. Kapillere9'ar mikrolitre karışım 1 mikrolitre çalışmada elde edilen DNA'lardan konuldu. Toplamda 10 mikrolitre numune ile çalışıldı.

3.3.4 İSTATİSTİKSEL ANALİZ:

İstatiksel analizler, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Bilgi İşlem Daire Başkanlığından sağlanan SPSS PASW STATİSTİCS 24.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Nicel veriler için iki grup ortalamasının karşılaştırılması normal dağılım gösterenler student t testi ile normal dağılım göstermeyenler Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Bütün analizlerde $p \leq 0,05$ değer anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

Çalışmaya 30 MM hastası ve 10 sağlıklı gönüllü alındı. Hastaların demografik özellikleri tablo 2 de gösterildi. Çalışmada cinsiyet dağılımı hasta grubunda 10 kadın, 30 erkek. Kontrol grubunda ise 5 erkek ve 5 kadındır. Hastaların yaş ortalaması 62,13 iken kontrol grubunun 56,60 tır. Çalışmaya katılan MM hastalarının klinik verileri tablo 16 ve tablo 17 de verilmiştir

Tablo 2 MM Hastası ve kontrol grubunun yaş ve cinsiyet dağılımı

	HASTA	KONTROL	P değeri (P≤0,05)
Cinsiyet(kadın/erkek)	10/20	5/5	0,3
Yaş,yıl(ort+-std)	62	56	0,01

Akım sitometri sonuçları hasta bireylerin Tablo 10 de kontrol grubunun tablo 11'de gösterilmiştir. Araştırmamız sonucunda hasta ve kontrol grubundan elde ettiğimiz istatistik değerler tablo 3 de verilmiştir.Bu sonuçlara göre CD3+(total T lenfosit) ve CD3+/CD4+ (T helper) hücreler hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur. CD3+/CD8(T sitotoksik) hasta grupta kontrol grubuna göre daha yüksek çıkmıştır.

Tablo 3 Araştırma sonucunda hasta ve kontrol grubundan elde edilen verilerin istatistik sonuçları

	GRUP	N	MEAN (ORT)	STD(STD)	P≤0,05
TOTAL LENFOSİT	HASTA	30	33,9353	13,55535	0,584
	KONTROL	10	36,395	5,88192	
CD3+	HASTA	30	67,2247	14,18581	0,05
	KONTROL	10	76,54	4,60226	
CD3+CD4+	HASTA	30	43,7947	15,28057	0,008
	KONTROL	10	57,992	7,28141	
CD3+CD8+	HASTA	30	50,0537	12,80959	0,001
	KONTROL	10	35,443	5,94563	
CD3- /CD56+(NK)	HASTA	30	6,473	4,44946	0,769
	KONTROL	10	6,917	2,75666	
CD3+/CD56+(NKT)	HASTA	30	1,3343	1,0215	0,09
	KONTROL	10	0,7	0,91815	

Tablo 4 Akım sitometri sonuçları ile klinik durum arasındaki ilişki

Hücre tipi	Tam remisyon n:18	Parsiyelremisyon n:3	Çok iyi PR n:7	P≤0,05
Total lenfosit	38,67	19,95	28,37	0,4
Total T lenfosit	65,87	58,87	65,78	0,1
T hepler	43,86	55,26	43,18	0,8
T sitotoksik	52,11	42,01	48,34	0,5
NK	7,33	3,89	4,80	0,8
CD3+ /CD56+(NKT)	1,44	1,06	1,22	0,1

Akım sitometri sonuçları ile klinik durumları arasındaki ilişki tablo 4 de gösterilmiştir. Tam remisyon durumunda olan hastalar; parsiyel ve çok iyi remisyon durumundaki hastalara göre NK hücre ve NKT hücre sayısı yüksek çıkmıştır ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Tablo 5 Hasta ve kontrol gruplarının VDR polimorfizm istatistik sonuçları

	BSML			P değeri	TaqI			P≤0,05
	GG	GA	AA		TT	TC	CC	
HASTA	16 (%53,3)	9 (%30)	5 (%16,6)	0,7	19 (%63,3)	7 (%23,3)	4 (%13,3)	0,6
KONTROL	4 (%40)	4 (%40)	2 (%20)		4 (%40)	4 (%40)	2 (%20)	

Tablo 6 Miyelom Tiplerinde TaqI ve BSML Polimorfizmi Görülme Sıklığı İstatistiksel Sonuçları

	TaqI		BSML	
	TT	TC/CC	GG	GA/AA
IGG	13	5	12	6
IGA	2	2	2	2
HAFİF ZİNCİR	1	4	1	4
NS	1	2	1	2
P≤0,05	0,1		0,2	

Tablo 7 Hastaların remisyon durumuna göre TaqI görülme sıklığı

	TT	TC/CC
TAM REMİSYON	10	7
ÇOK İYİ REMİSYON	4	3
PARÇALI REMİSYON	2	2
NR(Aktif Hasta)	1	1
P≤0,05	0,9	

Miyelom tiplerinde TaqI polimorfizmin görülme sıklığı ve BSML polimorfizminin görülme sıklığı tablo .6’da verilmiştir. Myelom tipleri arasında bu her iki polimorfizm görülme sıklığı açısından fark bulunmamıştır.

Hastaların remisyon durumuna göre TaqI görülme sıklığı tablo .7’ de verilmiştir.Tedavi başarısı ile Taq I genin homozigot yada heterozigot ve mutatalellerin varlığı tedavi başarısı açısından anlamlı değildir. Hastaların remisyon tipine göre yapılan karşılaştırmada T lenfositlerin tüm alt tipleri yanıt açısından NKT ile bir fark yoktur.

Tablo 8 Akım sitometri sonuçlarının BSML polimorfizmi ile ilişkisi

	GG	GA	AA	P≤0,05
TOTAL LENFOSİT	32,8	34,5	39,4	0,1
CD3+	66,8	70,6	75,3	0,5
T Helper	46,4	48,7	47,2	0,2
T sitotoksik	47,6	45,3	44,8	0,2
NK hücre	6,6	6,4	6,4	0,1
NKT hücre	1,2	1,1	0,8	0,3

Tablo 9 Akım sitometri sonuçlarının Taq1 polimorfizmi ile ilişkisi

	TT	TC	CC	P≤0,05
TOTAL LENFOSİT	32,9	34,1	41,1	0,4
CD3+	66,7	72,1	73,9	0,3
T Helper	47,0	47,5	48,0	0,9
T sitotoksik	47,1	45,7	45,2	0,7
NK hücre	6,7	6,0	7,1	0,8
NKT hücre	1,3	0,9	0,9	0,3

Tablo 10 Hasta grup akım sitometri sonucu

Hasta	total lenfosit	CD3+(Total T lenfosit)	CD3 +/CD4+(T hepler)	CD3+/CD8(Tsitot oksik)	CD3-/CD56+ (NK)	CD3+CD56+ (NKT)
1.	10,86	57,55	47,59	44,86	3,67	0,17
2.	55,45	73,49	34,35	51,48	3,29	2,37
3.	44,44	73,49	13,02	56,59	17,19	2,52
4.	44,44	72,49	29,99	66,07	4,88	0,50
5.	40,30	61,03	41,98	47,94	11,74	0,41
6.	33,65	49,92	64,30	30,01	13,59	2,24
7.	51,57	60,84	42,88	47,62	13,06	1,64
8.	14,41	74,80	50,67	43,43	0,87	0,85
9.	32,77	73,20	77,59	72,24	4,54	0,15
10.	16,53	88,42	43,69	51,69	0,47	0,53
11.	43,60	72,21	28,95	65,79	4,30	1,44
12.	38,38	53,36	47,19	47,58	12,62	1,75
13.	53,45	84,23	21,45	73,29	5,64	2,16
14.	47,56	68,47	37,38	54,58	7,84	1,25
15.	28,95	50,80	58,69	36,79	8,88	2,02
16.	33,98	56,33	41,77	54,26	10,86	0,35
17.	34,83	47,53	32,98	65,6	9,71	0,21
18.	29,33	83,72	42,71	42,75	2,42	1,63
19.	48,48	75,67	38,54	52,63	3,93	3,06
20.	34,10	64,94	58,77	37,10	7,76	0,21
21.	20,51	40,20	27,65	62,16	7,44	3,28
22.	13,45	59,84	63,33	33,62	3,30	1,74
23.	38,76	72,38	40,52	51,03	6,29	0,62
24.	21,73	70,50	66,91	23,76	1,74	1,27
25.	13,13	69,03	50,99	48,87	1,91	0,13
26.	12,64	42,66	56,03	40,07	2,02	0,01
27.	29,37	79,23	62,76	33,12	0,35	0,24
28.	35,92	55,53	43,47	41,81	11,79	2,65
29.	53,79	84,87	22,57	70,52	5,57	3,28
30.	41,68	73,75	25,12	54,35	6,52	0,92

Tablo 11 Kontrol Grubu Akım Sitometri Sonucu

kontr ol grub u	total lenfosit	CD3+(Tota l Lenfosit)	CD3+/CD 4+(T Helper)	CD3+/C D8(T sitotoks ik)	CD3- /CD56+ (NK)	CD3+ /CD56+ (NKT)
1.	27,67	73,69	67,99	28,35	9,13	0,14
2.	39,69	77,66	52,60	43,73	4,26	0,31
3.	44,21	86,44	48,76	42,74	4,46	3,21
4.	31,11	74,04	60,36	32,13	9,59	0,44
5.	26,98	77,13	72,87	24,25	5,84	0,21
6.	41,06	71,98	54,71	35,87	10,39	0,41
7.	39,87	79,70	56,10	37,54	4,07	0,33
8.	36,16	69,95	54,76	36,44	10,63	0,68
9.	39,85	78,09	56,95	37,39	4,07	0,10
10	37,35	76,72	54,82	35,99	6,73	0,79

Çalışmamızda DNA izolasyon yöntemi ile hasta ve kontrol grubunda konsantrasyon ve saflık değerleri için hasta bireylerden elde edilen veriler tablo 14 de, kontrol grubundan elde edilen veriler tablo 15 de gösterilmiştir. Real time PCR çalışması için belirli konsantrasyon aralığında olması gereklidir. Bizim çalışmamız uygun konsantrasyon sonuçlarında yapılmıştır.

Tablo 12 MM Hastası Bireylerin DNA İzolasyonu Sonuçlar

hasta numarası	konsantrasyon	Safılık
1	15,06	1,57
2	10,03	1,49
3	10,12	1,36
4	10,49	1,36
5	8,2	1,44
6	16,48	1,67
7	10,35	1,57
8	27,78	1,74
9	12,60	1,49
10	19,21	1,64
11	6,10	1,39
12	8,92	1,47
13	18,70	1,59
14	23,50	1,49
15	13,70	1,67
16	19,46	1,57
17	19,11	1,66
18	17,90	1,49
19	11,30	1,52
20	20,10	1,60
21	15,5	1,62
22	4,9	1,52
23	6,4	1,25
24	21,3	1,48
25	29,9	1,56
26	36,0	1,60
27	22,60	1,56
28	12,12	1,34
29	33,3	1,67

30	6,0	1,32
----	-----	------

Tablo 13 Kontrol Grubunun DNA İzolasyon Sonuçları

kontrol grubu	konsantrasyon	Safılık
1.	8,5	1,66
2.	10,2	1,66
3.	16,0	1,58
4.	28,5	1,07
5.	8,1	1,45
6.	16,0	1,49
7.	12,7	1,53
8.	21,7	1,59
9.	17,9	1,62
10.	16,0	1,57

Tablo 14 MM Hastası Bireylerin Real time PCR Sonuçları

Hasta	BSML	TaqI
1	GG	TT
2	GG	TT
3	GG	TT
4	GA	TC
5	GG	TT
6	GA	TC
7	AA	CC
8	GG	TT
9	GG	TT
10	GA	TC
11	GG	TT
12	GG	TT
13	AA	CC
14	GA	TC
15	GG	TT
16	GG	TT
17	GA	TC
18	AA	TC
19	AA	CC
20	GA	TT
21	GG	TT
22	GG	TT
21	GG	TT
24	GA	TT
25	GA	TT
26	GG	TT
27	AA	CC
28	GG	TT
29	GA	TC
30	GG	TT

Tablo 15 Kontrol Grubu Real time PCR Sonuçları

kontrol grubu	BSM	TaqI
1.	AA	CC
2.	GG	TT
3.	GG	TT
4.	GA	TC
5.	GG	TT
6.	GA	TC
7.	GA	TC
8.	AA	CC
9.	GG	TT
10.	GA	TC

Hasta bireylerin Real time PCR sonuçları tablo 14 da kontrol grubunun Real time PCR sonuçları tablo 15 de gösterilmiştir. BSML polimorfizminde G-A baz değişimi söz konusudur. GG normal GA heterozigot ve AA mutant birey olduğunu gösterir.

Taq I polimorfizminde T-C baz değişimi söz konusudur. TT normal, TC heterozigot ve CC mutant birey olduğunu gösterir.

Hasta ve kontrol gruplarının VDR polimorfizm istatistik sonuçları tablo 5 da verilmiştir. Bu sonuçlarda BSML polimorfizmi ve TaqI polimorfizmi hasta bireylerde kontrol grupları arasında benzer sıklıkta gözlenmiştir.

Tablo 16 Çalışmadaki MM hastalarının klinik veriler

Sıra no	Myelom tipi	Aldığı tedavi	Remisyon durumu
1	IgG λ	Lenalidomide	Tam remisyon
2	IgG λ	Lenalidomide	Tam remisyon
3	λ hafif zincir	Otolog nakil	Çok iyi parsiyel remisyon
4	IgG λ	Otolog nakil	Çok iyi parsiyel remisyon
5	IgG k	Lenalidomide	Tam remisyon
6	NS	Lenalidomide	Tam remisyon
7	Kappa hafif zincir	Lenalidomide	Tam remisyon
8	IgG k	Bortezomib, siklofosamid, deksametazon	Çok iyi parsiyel remisyon
9	IgG k	Lenalidomide	Tam remisyon
10	IgG k	Bortezomib, siklofosamid, deksametazon	Çok iyi parsiyel remisyon
11	IgG k	Lenalidomide	Tam remisyon
12	IgG k	Lenalidomide	Tam remisyon
13	λ hafif zincir	Lenalidomide	Tam remisyon
14	IgG k	Lenalidomide	Tam remisyon
15	IgG λ	Lenalidomide	Çok iyi parsiyel remisyon
16	IgG k	Lenalidomide	Tam remisyon
17	NS	Lenalidomide	Tam remisyon

18	IgA	Lenalidomide	Çok iyi parsiyel remisyon
19	IgGλ	Lenalidomide	Tam remisyon
20	IgGλ	Bortezomib, siklofosfamid, deksametazon	Parsiyel remisyon
21	IgAkappa	Lenalidomide	Çok iyi parsiyel remisyon
22	IgGkappa	Bortezomib, siklofosfamid, deksametazon	Tam remisyon
23	IgGk	Lenalidomide	Tam remisyon
24	IgGλ	No	Monoclonalgammopathy of undetermined significance (MGUS)
25	IgAk	Lenalidomide	Parsiyel remisyon
26	NS	Bortezomib, siklofosfamid, deksametazon	Parsiyel remisyon
27	Kappa	IRD	Tam remisyon
28	IgG λ	Lenalidomide	Tam remisyon
29	λ	Lenalidomide	Tam remisyon
30	IgA λ	KRd	NR (aktif hast)

Tablo 17 Hasta Bireylerin Klinik Veri İstatistik Sonuçları

	GRUP	N	MEAN(ORT)	STD
BETA MİKROGLOBULİN	HASTA	30	4,30	3,76
ALBUMİN	HASTA	30	4,27	0,48
MYELOM ÇAPI	HASTA	30	8,58	3,66
KALSİYUM	HASTA	30	8,94	0,54

5. SONUÇ VE TARTIŞMA:

Bu çalışmada MM tanılı hastalarda VDR polimorfizmi ve akım sitometrisi sonuçları sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldı. BSML genotipleri hasta grubunda GG %53,3, GA %30, AA %16,6, kontrol grubunda GG%40, GA%40, AA%20 idi. TaqI genotipleri hasta grubunda TT %63,3, TC %23,3, CC %13,3, kontrol grubunda TT %40, TC %40, CC %20 olarak saptandı. Olguların tamamından elde edilen kan örneklerinde akım sitometri yöntemiyle total lenfosit, T lenfosit, T helper, T sitotoksik, NK ve NKT hücreleri yüzdeleri belirlendi. T lenfosit ve T helper lenfositler hastalarda kontrol grubuna göre düşüktü. T sitotoksik hücreleri ise hasta grubunda daha yüksekti. NK ve NKT hücreler iki grup arasında farklı bulunmadı. Uygulanmış olan tedavi sonrası tam remisyona elde edilen hastalarda parsiyel remisyona elde edilen hastalar arasında lenfosit alt grupları açısından bir fark bulunmadı.

Han W ve ark. yaptıkları çalışmada, 13 MM hastasının ve 30 sağlıklı kontrolün CD3-CD56 + NK hücresi üzerinde inhibe edici reseptörlerin (CD158a ve CD158b) ve aktivasyon reseptörlerinin NKG2D ve NCR'lerinin (NKp30, NKp44 ve NKp46) ekspresyonu akış sitometrisi ile analiz edilmiştir. Çalışmalarında, serumdaki çözünen NKG2D ligandlarının (MICA, MICB, ULBP 1, ULBP2 ve ULBP3) konsantrasyonu enzime bağlı immüno-sorbent analizi (ELISA) ile ve NK hücresinin MM hücre hattına karşı sitotoksitesisi akış sitometrisi ile tespit edilmiştir. Araştırmacılar, MM hastaları ve sağlıklı bireyler arasında NK hücrelerinin yüzdesi ve mutlak sayısı ile CD158a ve CD158b ekspresyon düzeyi açısından önemli bir fark bulmamışlardır (60).

Birçok çalışmada VDR polimorfizmi, 25(OH)D seviyeleri ve kanser gelişimi arasında ilişki araştırıldı. Birçok çalışmada, MM hastalarında VDR gen polimorfik varyantlarının genotip ve alel frekanslarını belirlemiş ve 25(OH) D seviyeleri ilişkisi araştırılmıştır(17-19). Hint ırkı üzerinde yapılan çalışmada kontrollere kıyasla MM hastalarında BSML(Bb,bb) mutant genotip sıklığının

arttırıldığını göstermiştir. Birkaç çalışmada MM' de 25(OH) D düzeyinin daha düşük olduğunu ve hastalık şiddeti ile ilişkili olduğu saptanmıştır (10,32). BSML VDR geninin intron 8'inde lokalizedir. Bu genetik varyantın, protein yapısı üzerinde doğrudan etkisi yoktur.

Bir çalışmada myelom hastalarında BB genotipine kıyasla Bb&bb genotiplerinin görülme sıklıklarının önemli ölçüde artmış olduğu tespit edilmiş, böylece myelom gelişimi ile ilişkisi olabileceği ileri sürülmüştür (35). Diğer çalışmalar da BSML SNP ile MM, meme kanseri, kolorektal kanser ve renal hücreli karsinom gibi hastalık oluşumu arasında önemli bir ilişki olabileceği ileri sürülmüştür (37-39).

MM'daki neoplastik plazma hücreleri lenfoid kökenlidir ve monoklonal antikorlar üreten bu hücreler ile NK hücreleri arasında güçlü bir ilişki olabileceği ileri sürülmüştür. NK hücrelerinin MM'deki rolü tam olarak anlaşılmadığından (49), monoklonalimmunoglobulin seviyesi ve bu hastalarda sağkalım dahil olmak üzere farklı klinik parametreler açısından doğuştan gelen bağışıklık arasındaki ilişki çok sayıda çalışma ile araştırılmıştır. Etnik Keşmir popülasyonunda MM hastalarında VDR polimorfizmleri ApaI, BsmI ve FokI, MM için bir risk faktörü olarak, patogenezindeki rolleri değerlendirilmiştir. Keşmir nüfusunda FokI ile MM riski arasında önemli bir ilişki saptanmış, ayrıca FokI ff varyantı ile çeşitli klinik patolojik değişkenler arasında önemli bir korelasyon gözlemlenmiştir (49).

Dimitriadou ve ark. yaptıkları çalışmada, VDR geninin Fok-I polimorfizminin, beta-talasemi majörlü Yunan çocukları ve genç yetişkinler arasındaki dağılımını değerlendirmiş, 25(OH)D(3) ve 1,25(OH)(2D3) serum seviyeleri ile ilişkisini araştırmışlardır. Çalışmaya ortalama yaşları 23.05 ± 6.07 yıl olan 69 talasemili hasta (35 kadın ve 34 erkek) katılmış. Fok-I' in genotip frekansları, diğer popülasyonlar için daha önce bildirilenlere benzer bulunmuştur. Hastaların% 44.9'u F aleli için homozigot, % 43.5'i heterozigot ve % 11.6'sı f alleli için homozigot olarak saptanmıştır. Hastalar 25 (OH) D3 durumlarına göre sınıflandırıldığında, Fok-I genotiplerine göre anlamlı bir farklılık gözlenmemiş, 1,25 (OH) 2 D3 durumlarına

göre sınıflandırıldığında, eksiklik grubunda daha yüksek f allel prevalansı gözlenmiştir. Nitekim 1,25 (OH) 2 D3 eksikliği olan hastalarda f allel heterozigotluğu (Ff) %52,9 ve homozigotluğu(ff) % 14,7 iken normal 1,25 (OH) 2 olan hastalarda D3 seviyeleri, yüzdeler Ff ve ff için sırasıyla %22,7 ve %9,1 olarak bulunmuştur.

Dimitriadou ve arka, MM hastaları ile kontrol grubu arasında periferik kan lenfositindeki ve yardımcı / indüklenmiş T hücrelerinde (CD3 + CD4 + T hücresi) toplam T hücreleri (CD3 +) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bir fark görülmemiştir. Sitotoksik T hücreleri (CD3 + CD8 + T hücresi) artmış olarak saptanmış (p < 0.05). CD4 + CD25 + T hücreleri ve CD4 + CD25 + CD127^{low} Treg'ler, sağlıklı grupta önemli ölçüde daha yüksek bulunmuş. Evre III MM hastalarının seviyeleri, negatif korelasyona doğru bir eğilim gösterilmiştir (50).

Bağışıklık fonksiyonundaki değişikliklerin düzenli olarak hastalık aktivitesi ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Kemik ve bağışıklık sağlığı için önemli bir hormon olan D vitamini, MM hastalarında genellikle eksiktir. Ancak genel popülasyonda D vitamini eksikliği de yaygındır (38) MM hastalarında kemik kırığı riski göz önüne alındığında, çok sayıda çalışma bu popülasyonlardaki D vitamini düzeylerini değerlendirmiştir. Hastaların sadece% 13'ünde D vitamini seviyeleri > 30 ng / ml iken,% 32'si < 10 ng / ml seviyelerine sahiptir. < 10 ng / ml D vitamini seviyeleri, kemik iliğinde daha yüksek sayıda plazma hücresi ile ilişkilendirilmiştir. 148 MM hastasında, D vitamini eksikliği prevalansı MM evresine paralel olarak arttığı tespit edilmiş. Yüksek riski gösteren ISS-III'e sahip hastalarının % 37 sinde, düşük riskli ISS-I hastalarının ise yüzde 16'sında D vitamini eksikliği (düzeyler < 20 ng / ml) saptanmıştır. 675 MM hastasından oluşan geniş bir kohortta, hastaların% 51'inin seviyeleri < 30 ng / ml ye sahipken, düşük D vitamini seviyeleri genel sağ kalımın kötüleşmesi ile ilişkili bulunmamıştır (39).

D vitamini, kalsiyum homeostazındaki rolü dışında, immüno modülatör bir ajan olarak önemli bir role sahiptir. D vitamini, tip 1 yardımcı hücrelerin aracılık ettiği bağışıklık yanıtını baskılar, düzenleyici T hücrelerini indükler ve IL-17 üreten T hücrelerini (Th17 hücreleri) inhibe eder. D vitamini, doğal öldürücü (NK) hücre gelişimini ve fonksiyonunu inhibe eder ve dendritik hücrelerin olgunlaşmasını ve T hücresi uyarıcı fonksiyonlarını inhibe eder (40).

D vitamini ayrıca antimikrobiyal proteinlerin üretimi de dahil olmak üzere makrofajların kemotaktik ve fagositik yanıtlarını artırır. İlginç bir şekilde, D vitamininin aktif B hücrelerinin çoğalmasını ve plazma hücrelerinin oluşumunu inhibe ettiği bulunmuştur. Aktif B hücreleri üzerindeki CD38 ekspresyonu, D vitamini maruziyeti ile önemli ölçüde artmasına rağmen; bu, CD27 ekspresyonu ile ilişkili değildir ve D vitamini varlığında daha az (CD38 yüksek, CD27 yüksek) plazma hücresi üretilir. Tersine, plazma hücre oluşumundan sonra D vitamini verildiğinde hiçbir etki görülmez ve plazma hücresi bakımı üzerinde hiçbir görünür etki oluşmamıştır. D vitamini ayrıca, doğal baskılayıcı aktiviteye sahip olgunlaşmamış kemik iliğinden türetilen CD34 hücrelerinin sayısını azaltarak ve adaptif immünitinin etkinliğini artırarak bağışıklık tepkilerini artırabileceği saptanmış (41).

Bağışıklık sistemi MM gelişiminde önemli bir rol oynar. Özellikle, Treg/Th17 hücrelerinin oranı MM hastalarında normal kontrollere kıyasla önemli ölçüde artmıştır, ancak önemi bilinmeyen monoklonalgammopati (MGUS)" hastalarında artmamaktadır ve genel sağkalım da azalma ile ilişkilidir. Ek olarak, MM hastalarında uzun süreli sağkalım, olumlu bir Treg / Th17 dengesi (uzun süreli sağ kalanlarda önemli ölçüde daha yüksek Th17 hücreleri) ve sitotoksik T hücre klonlarının genişlemesi ile ilişkilidir. NK hücreleri de MGUS'ta işlevsel kalır, ancak MM 'de azalmış aktiviteye sahiptir (42). MM 'de aktivitesi olan çeşitli ilaçlar, kısmen, tümör hücrelerine karşı NK hücre aktivitesini artırarak etki gösterir (43). Doğuştan gelen ve adaptif immün yanıtları baskılama yeteneğine sahip olan miyeloid türevi baskılayıcı hücreler (MDSC'ler) de MM hastalarında artmıştır ve MM progresyonunu tetiklediği bulunmuştur.

Ayrıca, NK aktivitesinin baskılanması ve Treg hücrelerinin indüklenmesi ve Th17 hücrelerinin bastırılması dahil olmak üzere D vitamini fonksiyonunun belirli yönleri, MM'de istenen immünolojik profil ile çelişkili görünmektedir. Bununla birlikte, D vitamininin hastalığın ilerlemesini önlemede de yararlı etkileri olabilir. Örneğin, Th17 hücreleri tarafından üretilen yüksek seviyelerde IL-17'nin MM büyümesini desteklediği ve litik kemik hastalığını tetiklediği bulunmuştur (44) Ek olarak, D vitamininin miyeloid türevi baskılayıcı hücreleri

baskılama üzerindeki etkisi ve D vitamininin immünoterapi stratejilerini artırma yeteneği (45) göz önüne alındığında, potansiyel bir fayda sağlayabilir.

Doğuştan gelen bağışıklık sisteminin hücrelerinin önemli bir alt popülasyonu olan doğal öldürücü hücreler, kanserin ilerleme ve yayılmasının önlenmesinde önemli bir role sahiptir. Bu hücrelerin fenotipi CD3-(CD16 + CD56 +)dir ve fonksiyonel olarak tümör hücrelerini parçalama yetenekleriyle tanımlanırlar. NK hücre aktivitesindeki azalmanın ileri klinik evre, artmış laktatdehidrogenaz (LDH), plazma hücreleri ile kemik iliğinin infiltrasyon yüzdesi ve β -2 mikroglobulin ile önemli ölçüde ilişkili olduğu gösterilmiştir. Vincristine, Adriamycin, Dexamethasone (VAD) protokolünü aldıktan sonra başvuru sırasında daha yüksek NK hücre aktivitesine sahip hastalar, düşük NK hücre aktivitesine sahip olanlara kıyasla daha iyi kümülatif sağkalıma sahip olduğu görülmüştür (46). Hastalığın ileri evresindeki NK hücre aktivitesi, erken klinik evrede NK hücre aktivitesine kıyasla ve sağlıklı kontrollere kıyasla önemli ölçüde azalmış olarak tespit edilmiştir(46).

Bir çalışmada MM hastalarının periferik kan T hücresi alt kümelerini ve düzenleyici T hücreleri incelenmiş; 48 MM hastası ve 24 sağlıklı kontrol çalışmaya dahil edilmiştir. Periferik kan T hücresi alt kümelerindeki CD4 + CD25 + T hücreleri ve CD4 + CD25 + CD127^{düşük}+kontrol grubuna göre önemli ölçüde daha düşüktür bulunmuştur. Stabil ve progresif aşamalarda MM hastalarının CD4 + CD25 + T hücreleri ve CD4 + CD25 + CD127^{low} Tregleri, kontrol grubundaki MM hastalarınınkinden önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur. Periferik kan T hücresi alt kümesinin anormalliği, CD4 + CD25 + CD127^{düşük} Treg'lerin artmış ekspresyonu ve MM hastalarının düşük hücresele bağışıklığı, hastalığın klinik evrelemesi ve ilerlemesi ile ilgili bulunmuştur (51).

CD161 eksprese eden hücrelerin ölçümünün, olog kök hücre transplantasyonu geçiren MM hastalarında mukoziti ve enfeksiyonları tahmin edemeyeceği araştırılmış. CD161 eksprese eden hücrelerin erken komplikasyonları, yani mukozit (\geq grade 3), enfeksiyonlar ve sitomegalo virüs (CMV) reaktivasyonunu tahmin etme olasılığının olup olmadığını belirlemek için, olog kök hücre transplantasyonu geçiren 108 MM hastasının periferik kan örneklerinde ileriye dönük olarak CD161 eksprese eden hücreleri (CD3 + CD4 + CD161 + ve CD3 + CD8 +)

incelenmiş. Periferik kandaki CD3 + CD4 + CD161 + hücrelerinin düşük oranının, mukozit, enfeksiyonlar ve CMV reaktivasyonu açısından bağımsız bir prediktör olduğu ortaya çıkarılmıştır. (59)

Sonuç olarak çalışmamızda, MM hastalarında T helper hücrelerinin arttığı, Sitotoksik T hücrelerinin azaldığı gösterilmiş, TaqI ve BsmI polimorfizmlerinin myelomda normalden farklı bir frekans göstermediği ve myelomdaki immün hücresel değişiklikler ile ilişkili olmadığı görülmüştür.



6. ÖNERİLER

Sonuç olarak bu çalışmanın zayıf yönü çalışma grubunun kontrol grubunda 3 kat fazla olmasıdır. Ancak benzer nitelikteki çalışma sayısının literatürde çok sınırlı sayıda olması nedeniyle yeni veriler ortaya konmuştur. Sonuçları itibariyle literatüre katkı sunacağı açıktır.



7. KAYNAKÇA

- 1) K.Abbas,A.H. Lichtman ,S. Pıllai, Temel İmmünoloji Kitabı ;4.baskı
- 2)Barlogie B, Shaughnessy J, Epstein J, et al. Williams Hematology. 7th ed. USA: McGraw Hill Companies;2006.
- 3)Mustafa ÇETİN -Multiple Myeloma ve Plasma Hücreli Hastalıkları ders notları-Kayseri 2013-2014
- 4)<https://www.klimik.org.tr/wpcontent/uploads/2015/10/%C4%B0nfeksiyon-Hastal%C4%B1klar%C4%B1nda-%C4%B0mm%C3%BCnoloji-%C5%9E%C3%BCkran-K%C3%96SE.pdf>
- 5) https://personel.omu.edu.tr/docs/ders_dokumanlari/1329_18829_305.pdf
- 6)Prof. Dr. Günnur Deniz İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü • immünoloji Anabilim Dalı, 30 Aralık 2011
- 7)*ankemderg2010;24*
- 8) Günnur Deniz İmmünoloji ABD, İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İSTANBUL, **Türkiye Klinikleri J IntMedSci. 2007;3(43):18-25)**
- 9)SharifS,ArreazaG,ZucherP,Mi Q, Delovitch T .Regulation of autoimmune disease by natural killer T cells .J MolMed 2002 ;80:290-300.

10)Prof. Dr. Günnur Deniz İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Bağıışıklık Sistemi ve Yetersizlikleri Sempozyum Dizisi No: 80 • 6-7 Mayıs 2013; s. 25 – 28 Doğal İmmün Sistemin Hücresel Elemanları

11)S ErşahinG , Bilgiç S , Aktaş E , Salman F , Deniz G Tip 1 Diyabette NKT hücrelerinin rolü . İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE), İmmünoloji AnabilimDalı, İstanbul, TÜRKİYE

12)Harnessing natural killer T (NKT) cells in human myeloma: Progressand challenges Madhav V. Dhodapkar ,Joshua Richter Section of Hematology, Yale University, New Haven, CT 06510, USA Received 2 November 2010; accepted with revision 15 December 2010 Available online 12 January 2011

13)R.A. Kyle, S.V. Rajkumar, Multiplemyeloma, N. Engl. J. Med. 351 (2004) 1860–1873.

14)Kyle RA, Rajkumar SV. Multiplemyeloma. N Engl J Med 2004;351(18):1860- 73

15) G.D. Roodman, Mechanisms of bone metastasis, N. Engl. J. Med. 350 (16) (2004)1655–1664.

16)R. Aggarwal, I.M. Ghobrial, G.D. Roodman, Chemokines in multiplemyeloma, Exp. Hematol. 34 (2006) 1289–1295.

17) A. Jemal, T. Murray, E. Ward, et al., Cancerstatistics, 2005, CA Cancer J. Clin. 55 (2005) 10–30

18) G.D. Roodman, Mechanisms of bone metastasis, N. Engl. J. Med. 350 (2004) 1655–1664

19)R.A. Kyle, Multiplemyeloma, review of 869 cases, Mayo Clin. Proc. 50 (1975) 29–40

20)T. Diamond, T. Golombick, A. Manoharan, Vitamin D statusmay affecttheskeletal complications of multiple myeloma, Am. J. Hematol. 85 (2010) 302–303.

21)A. Badros, O. Goloubeva, E. Terpos, T. Milliron, M.R. Baer, E. Streeten, Prevalence and significance of vitamin D deficiency in multiple myeloma patients, Br. J. Haematol. 142 (2008) 492–494

22) R.B.Akalın ,MultiplMyelomalı Hastalarda Lenfosit ve alt gruplarının immünofenotipik analizleri,Tez No: 2019/74

23)Ekuklu, Z. 1998. Multiplmyelom olgularında klinik, histopatolojik, immünohistokimyasal değerlendirme ve prognoz (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi

24)drozdogan.com/multipl-myelom-nedir-belirtileri-nelerdir-nasil-tedavi-edilir/

25)B. Lauter, I.G. Schmidt-Wolf, Prevalence, supplementation, and impact of vitamin D deficiency in multiple myeloma patients, Cancer Invest. 33 (10) (2015) 505-509.

26)G.S. Maier, K. Horas, A.A. Kurth, D. Lazovic, J.B. Seeger, U. Maus, Prevalence of vitamin D deficiency in patients with bone metastases and multiple myeloma, Anticancer Res. 35 (11) (2015) 6281–6285.

27) Adams JS. Vitamin D as a defensin. J Musculoskelet Neuronal Interact OctDec;6(4):344-6, 2006.

28)Whayne TF. Vitamin D. Popular Cardiovascular Supplement But Benefit Must Be Evaluated, International Journal of Angiology, 2011;20:63-71.)

29)J.W. Pike, Vitamin D3 receptors: structureand function in transcription, Annu. Rev.Nutr. 11 (1) (1991) 189–216.

30) Farrow S. Allelic variationand the vitamin D receptor. Lancet 343:1242, 1994.

31)M.R. Haussler, G.K. Whitfield, I. Kaneko, C.A. Haussler, D. Hsieh, J.C. Hsieh,P.W.Jurutka, Molecular mechanisms of vitamin D action, Calcif. TissueInt. 92 (2)(2013) 77–98.

32)www.mikrobiyoloji.org/pdf/702080201.pdf

33)Türk Klinik Biyokimya Derg 2007; 5(2): 75-82)

34)https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/67474/mod_resource/content/0/Genotipleme%20genel%20bilgi.pdf

35) Morrison NA, Qi JC, Tokita A, et al. Prediction of bone densityfrom vitamin D receptoralleles. Nature 1994;367:284-7

36)Murray RK., Granner DK., Mayes PA., Rodwell VW., 2004. Harper Biyokimya. Nobel Tıp Kitabevleri, 25. Baskı.

37) Nath K, Ganeshalingam V, Ewart B, Heyer E, Watt K, Birchley A, Casey J, Lai HC, Morris E, Hodges G. Support Care Cancer [Are trospective analysis of the prevalence and clinical out comes of vitaminD deficiency in myeloma patients in tropical Australia.](#) 2020 Mar;28(3):1249-1254. doi: 10.1007/s00520-019-04942-7. Epub 2019 Jun 21. PMID: 31227990

38) Nicholas Burwick. Vitamin D and plasma cell dyscrasias: reviewing the significance. *Ann Hematol.* 2017 Aug;96(8):1271-1277. doi: 10.1007/s00277-017-3016-8. Epub 2017 May

39) Ng AC, Kumar SK, Rajkumar SV, Drake MT (2009) Impact of vitamin D deficiency on the clinical presentation an dprognosis of patients with new lydiagnosed multiple myeloma. *Am J Hematol* 84(7):397–400.

40) Weeres MA, Robien K, Ahn YO, Neulen ML, Bergerson R, Miller JS et al (2014) The effects of 1, 25-dihydroxy vitamin D3 on in vitro human NK cell development from hematopoietic stem cells. *J Immunol* 193(7):3456–3462.

41) Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Chen S, Lipsky PE (2007) Modulatory effects of 1, 25-dihydroxy vitamin D3 on human B cell differentiation. *J Immunol* 179(3):1634–1647.

42) Bryant C, Suen H, Brown R, Yang S, Favaloro J, Aklilu E et al (2013) Long-term survival in multiple myeloma is associated with a distinct immunological profile, which in cludes proliferative cytotoxic T-cell clones and a favourable Treg/Th17 balance. *Blood Cancer J* 3:e148

43) Jurisic V, Srdic T, Konjevic G, Markovic O, Colovic M (2007) Clinical stage-depending decrease of NK cell activity in multiple myeloma patients. *Med Oncol* 24(3):312–317.

44) Noonan K, Marchionni L, Anderson J, Pardoll D, Roodman GD, Borrello I (2010) A novel role of IL-17-producing lymphocytes in mediating lytic bone disease in multiple myeloma. *Blood* 116(18):3554–3563

45) Wiers KM, Lathers DM, Wright MA, Young MR (2000) Vitamin D3 treatment to diminish the levels of immune suppressive CD34+ cells increases the effectiveness of adoptive immunotherapy. *J Immunother* 23(1):115–124.

46) Konjevic G, Jurisic V, Banicević B, Spuzic I. Difference in NK cell activity between patients with non-Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's disease. *Br J Haematol* 1999;104:144–51.

47) Konjevic G, Jurisic V, Spuzic I. Association of NK cell dysfunction with changes in LDH characteristics of peripheral blood lymphocytes (PBL) in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2001;66:255–63.

48) Greipp PR, Kyle RA. Staging, kinetics, and prognosis of multiple myeloma. In: Wiernik P, Canelos G, Ducher J, Kyle R, editors. *Neoplastic disease of the blood*. New York: Churchill Livingstone; 1996. p. 537–59.

49) Costello RT, Fauriat C, Sivory S, Marcenaro E, Olive D. NK cells: innate immunity against hematological malignancies? *Trends Immunol* 2004;25:328–33.

50) Dimitriadou M, Christoforidis A, Fidani L, Economou M, Perifanis V, Tsatra I, Katzos G, Athanassiou-Metaxa M. Fok-I gene polymorphism of vitamin D receptor in patients with beta-thalassemia major and its effect on vitamin D status. *Hematology*. 2011 Jan;16(1):54-8. doi: 10.1179/102453311X12902908411878. PMID: 21269569

51) Huang LQ, Wang JX, He K, Jiang YZ, Wei ZL, Huang DP, Chu LL. Analysis of peripheral blood T-cell subset and regulatory T-cells in multiple myeloma patients. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2018 Apr 30;64(5):113-117. PMID: 29729703

52) Catley, L., Tai, Y., Chauhan, D., Anderson, K.C. 2005. Perspectives for combination the rapyto over come drug resistant multiple myeloma. *Drug Resist Up dat.*8:205–218

53) A. Shahabi, M. Alipour, H. Safiri, P. Tavakol, M. Alizadeh, S.M Hashemi, M. Shahabi, M. Halimi, Vitamin D receptor gene polymorphism : association with susceptibility to early – on set breast cancer in Iranian, BRCA1/2-mutation carrier and non-carrier patients, *Pathol, Oncol, Res.*24(3)2018)601-607

54) Norman AW. Vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology.* 2006;147:5542-5548. doi: 10.1210/en.2006-0946.

55) Eken BF, Sercan C, Gezmiş H, et al. D Vitamini Reseptörü rs1544410 polimorfizminin diş çürüğü oluşumuna etkisi. *European Journal of Research in Dentistry.* 2018;2(1):1-5. doi: 10.12990/MDJ.2018.13.

56) Adorini L, Penna G. Dendritic cell tolerogenicity: a key mechanism in immuno modulation by vitamin D receptor agonists. *Human immunology.* 2009 May;70(5):345-52. PubMed PMID: 19405173.

57) Jeffery LE, Burke F, Mura M, Zheng Y, Qureshi OS, Hewison M, et al. 1,25-Dihydroxy vitamin D3 and IL-2 combineto inhibit T cell production of inflammatory cytokine sand promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *Journal of immunology.* 2009;183(9):5458-67. PubMed PMID: 19843932.

58) Krishnan AV, Peehl DM, Feldman D. Inhibition of prostate cancer growth by vitamin D: regulation of targeted gene expression. *Journal of Cellular Biochemistry.* 2003;88: 363-371.

59) Lee SE, Lim JY, Ryu DB, Kim TW, Jeon YW, Yoon JH, Cho BS, Eom KS, Kim YJ, Kim HJ, Lee S, Cho SG, Kim DW, Lee JW, Min WS, Min CK. Circulating CD3(+)CD4(+)CD161(+) Cells Are Associated with Early Complications after Autologous Stem Cell Transplantation in Multiple Myeloma. *Biomed Res Int.*

2018 Jan 1;2018:5097325. doi: 10.1155/2018/5097325. eCollection 2018. PMID: 29511683)

60) Han W, Zhang X, Jia Z, He J, Chao H, Yang J, Xiao R, Lu X. Study of NK cells dysfunction in multiple myeloma patients. *ZhonghuaXue Ye Xue Za Zhi*. 2015 Nov;36(11):922-5. doi: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.11.007. PMID: 26632464

61) S.M. Tahir, O. Cheng, A. Shaulov, Y. Koezuka, G.J. Bublek, S.B. Wilson, S.P. Balk, M.A. Exley, Loss of IFN-gamma production by invariant NK T cells in advanced cancer, *J. Immunol*. 167 (2001)4046–4050.

62) D.H. Chang, H. Deng, P. Matthews, J. Krasovsky, G. Ragupathi, R. Spisek, A. Mazumder, D.H. Vesole, S. Jagannath, M.V. Dhodapkar, Inflammation-associated lysophospholipids as ligands for CD1d restricted T cells in human cancer, *Blood* 112 (2008) 1308–1316.

63) M.V. Dhodapkar, M.D. Geller, D.H. Chang, K. Shimizu, S. Fujii, K.M. Dhodapkar, J. Krasovsky, A reversible effect in natural killer T cell function characterizes the progression of premalignant to malignant multiple myeloma, *J. Exp. Med*. 197 (2003)1667–1676.