

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**DIFFÜZ BÜYÜK B HÜCRELİ LENFOMA
HASTALARINDA PD-1 VE CTLA-4 GEN
VARYASYONLARI İLE EKSPRESYON SEVİYELERİNİN
İLİŞKİSİ**

Habibe Sema ARSLAN

DOKTORA TEZİ

2021-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DİFFÜZ BÜYÜK B HÜCRELİ LENFOMA
HASTALARINDA PD-1 VE CTLA-4 GEN
VARYASYONLARI İLE EKSPRESYON SEVİYELERİNİN
İLİŞKİSİ

Habibe Sema ARSLAN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Fahri UÇAR

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından **4792** proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2021-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 15/11/2021

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Fahri UÇAR
Akdeniz Üniversitesi

.....

Üye : Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM
Akdeniz Üniversitesi

.....

Üye : Prof. Dr. Elif SEVİM
Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi

.....

Üye : Doç Dr. Ozan SALİM
Akdeniz Üniversitesi

.....

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Burcu YÜCEL
İstanbul Medeniyet Üniversitesi

.....

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

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

Habibe Sema ARSLAN

İmza

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Fahri UÇAR

İmza

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince değerli bilgi ve tecrübelerini aktaran hem Ana bilim Dalı başkanımız hem danışman hocam Sayın Prof. Dr. Fahri UÇAR’a

Doktora eğitimim sürecinde, destek ve bilgileri ile bana büyük katkıları olan, değerli zamanını ayıran bölümümüzün tüm kıymetli hocalarına ve birlikte çalışma fırsatı bulduğum asistan arkadaşlarıma,

Tez çalışmalarım boyunca yardımını hiç esirgemeyen Utku KUTUOĞLU’na ve Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Doku Tipleme Laboratuvarı çalışma arkadaşlarıma,

Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Erişkin Hematoloji Polikliniği’ndeki hastalara ve hasta verilerine ulaşmamı sağlayan Sayın Doç. Dr. Ozan SALİM ve Dr. Ünal ATAŞ’a,

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürüne, sekreterine ve tüm çalışanlarına,

Bugünüme kadar yaşamayı ve iyi bir insan olmayı öğrenmeye çalışırken varlıklarıyla ve zamansız mekânsız sevgileriyle herdem yanımda hissettiğim kıymetlilerim; anneme, babama ve kardeşlerime,

Pandemi sürecinde dünyaya gelen ve bir şekilde yollarımızın kesiştiği, “pembe patileri arasında sivri bıçakları olan” hayatımdaki müthiş katkıların sahibi 3 (Luci, Maize ve Mırmır) küçük ninjama,

sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım...

Habibe Sema ARSLAN

ÖZET

Amaç: Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma (DBBHL) klinik, morfolojik ve sitogenetik özellikler bakımından heterojendir. Non-Hodgkin lenfomaların en sık karşılaşılan agresif seyirli tipidir. Lenfomanın tedavi stratejilerinden biri olan immünoterapi, immün kontrol noktası inhibitörlerini hedef alır. Birçok hastalıklara ilişkin *PD-1*, *PD-L1*, *CTLA-4* ve *CD80* genlerinin araştırılması fenomen haline gelmiştir. Bu tezin amaçları DBBHL’de i) çeşitli kanser türleriyle önemli ilişkileri olan bu dört genin polimorfizmleri incelemek, ii) gözlenen genetik varyantların mRNA ekspresyon ve protein seviyeleriyle korelasyonunu değerlendirmek, iii) bulgular doğrultusunda hastalığın patogeneze katkıda bulunmaktır.

Yöntem: Bu araştırmada, 20 kişilik hasta grubuyla aynı yaş ve cinsiyette olan 20 kişilik kontrol gruplarına ait periferik kan örneklerinden DNA dizileme yöntemi kullanılarak *PD-1*, *PD-L1*, *CTLA-4* ve *CD80* genlerindeki ilgilenilen polimorfizmler saptandı. Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR yöntemi kullanılarak hedef genlerin ifade seviyeleri belirlendi. Akış Sitometri yöntemiyle hedef hücrelerin ekspresyon (%) düzeyleri değerlendirildi. Verilerin değerlendirilmesinde IBM SPSS Statistics for Windows Version 22 ve R.3.3.2 yazılımlarından yararlanıldı.

Bulgular: Hastalarda *PD-1*, *PD-L1* ve *CTLA-4* ekspresyon seviyesi, kontrol grubuna göre daha yüksekti. *PD-1* (rs2227981), *PD-L1* (rs4143815) ve *CTLA-4* (rs231775) polimorfizmleri, bu genlerin ekspresyon seviyeleriyle ilişkili olabilir. Akış Sitometri sonuçlarına göre hastalarda kontrol grubuna kıyasla sadece CD4⁺PD-1⁺ ve CD4⁺PD-L1⁺ hücre ekspresyon (%) düzeyleri anlamlı bulundu.

Sonuç: DBBHL’de *PD-1*, *PD-L1* ve *CTLA-4* gen polimorfizmleri ve buna bağlı *PD-1*, *PD-L1* ve *CTLA-4* ifadelerinin tespiti önemlidir. Elde ettiğimiz bulgular ışığında, bu genlerin DBBHL patogenezinin ve prognozunun anlaşılmasına katkı sağlayabileceğine inanmaktayız.

Anahtar Kelimeler: Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma, PD-1, PD-L1, CTLA-4, CD80

ABSTRACT

Objective: Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL) is heterogeneous in terms of clinical, morphological and cytogenetic features. DLBCL is the most common type of non-Hodgkin lymphoma with an aggressive course. As one of the treatment strategies for lymphoma, immunotherapy targets immune checkpoint inhibitors. The recent scholarship popularized the investigation of correlation of *PD-1*, *PD-L1*, *CTLA-4* and *CD80* genes to many diseases. Thus, the aims of this dissertation are i) examining the polymorphisms of these four genes that evidently are significant in relation to various cancer types, ii) evaluating the correlation of observed genetic variants with mRNA expression and protein levels, iii) contributing the pathogenesis of DLBCL.

Methods: In the present research, the DNA sequencing method from peripheral blood samples of 20 patients were used to determine polymorphisms of *PD-1*, *PD-L1*, *CTLA-4* and *CD80* genes, a control group of 20 from the same age and gender as the samples was also considered. Expression levels of target genes were determined using the Real Time Quantitative PCR method. Expression (%) levels of target cells were then evaluated by flow cytometry method. IBM SPSS Statistics for Windows Version 22 and R.3.3.2 software were used to evaluate the obtained data.

Results: It is observed that *PD-1*, *PD-L1* and *CTLA-4* expression levels were higher in the patients compared to the control group. The *PD-1* (rs2227981), *PD-L1* (rs4143815) and *CTLA-4* (rs231775) polymorphisms can be associated with these gene expression levels. According to the Flow Cytometry results, only CD4⁺PD-1⁺ and CD4⁺PD-L1⁺ cell expression levels (%) were significant compared to the control group.

Conclusion: It is important to detect *PD-1*, *PD-L1* and *CTLA-4* gene polymorphisms and related *PD-1*, *PD-L1* and *CTLA-4* expressions in DLBCL. In the light of our findings, we believe that these genes may contribute to the understanding of DLBCL pathogenesis and prognosis.

Keywords: Diffuse Large B Cell Lymphoma, *PD-1*, *PD-L1*, *CTLA-4*, *CD80*

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1.	Büyük B Hücreli Lenfomaların Sınıflaması (WHO 2016)	6
Tablo 2.2.	Güncellenmiş Ann-Arbor Evreleme Sistemi (Lugano Sınıflaması)	7
Tablo 2.3.	DBBHL’de Prognostik Göstergeler	8
Tablo 2.4.	DBBHL’nin Moleküler Alt Tiplerinde En Sık Görülen Gen Mutasyonları	23
Tablo 2.5.	miRNA ve LncRNA’ların PD-1/PD-L1 Yolağına Etkileri	32
Tablo 2.6.	PD-1, PD-L1, CTLA-4 ve CD80 Moleküllerinin Kemoterapik Ajanları	37
Tablo 3.1.	DNA Dizilemede Kullanılan Primerler	47
Tablo 3.2.	Standart PZR Kimyasal Protokolü	47
Tablo 3.3.	PZR Reaksiyon Koşulları	48
Tablo 3.4.	DNA Dizileme Kimyasal Protokolü	50
Tablo 3.5.	DNA Dizileme Reaksiyon Koşulları	50
Tablo 3.6.	cDNA Sentezi Kimyasal Protokolü	53
Tablo 3.7.	Kantitatif PZR’de Kullanılan Primerler	54
Tablo 3.8.	Kantitatif PZR Kimyasal Protokolü	54
Tablo 3.9.	Kantitatif PZR Reaksiyon Koşulları	54
Tablo 4.1.	Hasta ve Kontrol Gruplarının Demografik Özelliklerinin Dağılımı	60

Tablo 4.2.	Hastaların Demografik Özelliklerinin Hastalığın Alt Tiplerinde Dağılımı	60
Tablo 4.3.	Hastaların Klinik Özelliklerinin Hastalığın Alt Tiplerinde Dağılımı	61
Tablo 4.4.	Hastaların Laboratuvar Verilerinin Hastalığın Alt Tiplerinde Dağılımı	61
Tablo 4.5.	Hastaların Prognostik Verilerinin Hastalığın Alt Tiplerinde Dağılımı	62
Tablo 4.6.	PD-1, PD-L1, CTLA-4 ve CD80 Genotiplerinin Hasta ve Kontrol Gruplarında Dağılımı	63
Tablo 4.7.	PD-1, PD-L1, CTLA-4 ve CD80 Genotiplerinin Hastalığın Alt Tiplerinde Dağılımı	64
Tablo 4.8.	Hasta ve Kontrol Gruplarında PD-1 Gen Ekspresyon Ölçümleri	65
Tablo 4.9.	Hasta ve Kontrol Gruplarında PD-L1 Gen Ekspresyon Ölçümleri	65
Tablo 4.10.	Hasta ve Kontrol Gruplarında CTLA-4 Gen Ekspresyon Ölçümleri	66
Tablo 4.11.	Hasta ve Kontrol Gruplarında CD80 Gen Ekspresyon Ölçümleri	67
Tablo 4.12.	Hasta ve Kontrol Gruplarında Akış Sitometri Sonuçlarının (%) Düzeyleri	70
Tablo 4.13.	Hastalığın Alt Tiplerinde Akış Sitometri Sonuçlarının (%) Düzeyleri	71

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Reed-Sternberg Hücresi	3
Şekil 2.2.	DBBHL’de Morfolojik Varyantlar	10
Şekil 2.3.	DBBHL’de Reseptör-Ligand Etkileşimleri	12
Şekil 2.4.	DBBHL’nin Hücresel Orijini, Genetik ve Epigenetik Değişiklikler	24
Şekil 2.5.	Kanser Bağışıklık Döngüsünün Uyarıcı ve İnhibitör Faktörleri	26
Şekil 2.6.	PD-1 ve PD-L1 Protein Yapıları	29
Şekil 2.7.	PD-1/PD-L1 Sinyal Yolağı	30
Şekil 2.8.	CTLA-4 Protein Yapısı	34
Şekil 2.9.	CTLA-4 Yüzey Ekspresyonu ve İnternalizasyonu	36
Şekil 2.10.	CTLA-4 Polimorfizmleri	41
Şekil 3.1.	Örnek Amplifikasyon Eğrileri	55
Şekil 4.1.	Hasta ve Kontrol Gruplarında PD-1 Gen Ekspresyon Ölçümleri	65
Şekil 4.2.	Hasta ve Kontrol Gruplarında PD-L1 Gen Ekspresyon Ölçümleri	65
Şekil 4.3.	Hasta ve Kontrol Gruplarında CTLA-4 Gen Ekspresyon Ölçümleri	66
Şekil 4.4.	Hasta ve Kontrol Gruplarında CD80 Gen Ekspresyon Ölçümleri	67

SİMGELER ve KISALTMALAR

ABC	: Aktive B Hücreli
AIDS	: Acquired Immune Deficiency Syndrome
ALL	: Akut Lenfoblastik Lösemi
ASH	: Antijen Sunan Hücre
ASHM	: Anormal Somatik Hipermutasyon
bç	: Baz çifti
CAR-T	: Kimerik Antijen Reseptörü-T
CNA	: Kopya Sayısı Değişiklikleri
CSR	: Sınıf-Switch Rekombinasyon
CTLA-4	: Sitotoksik T Lenfosit İlişkili Antijen-4
DBBHL	: Diffüz Büyük B hücreli Lenfoma
DC	: Dendritik Hücre
EBV	: Epstein-Barr Virus
ECOG	: Eastern Cooperative Oncology Group
FDA	: Food and Drug Administration
FISH	: Florosans in Situ Hibridizasyon
FL	: Foliküler Lenfoma
GCB	: Germinal Merkez B Hücreli
GEP	: Gen Ekspresyon Profili
GM	: Germinal Merkez
HCC	: Hepatosellüler Karsinom
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
IFN	: İnterferon

Ig	: İmmünoglobulin
IL	: İnterlökin
IPI	: International Prognostic Index
ITIM	: İmmünreseptor Tirozin Bazlı İnhibitör Motif
ITSM	: İmmünreseptor Tirozin Bazlı Anahtar Motif
KHDAK	: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
KLL	: Kronik Lenfositik Lösemi
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
LCK	: Lökosit-Spesifik Tirozin Kinaz
MFI	: Ortalama Floresan Yoğunluğu
MHC	: Majör Histokompatibilite Kompleksi
mTOR	: Rapamisin Protein Kompleksinin Memeli Hedefi
NCCN-IPI	: National Comprehensive Cancer Network- International Prognostic Index
NHL	: Non-Hodgkin Lenfoma
NK	: Natural Killer
NOS	: Spesifiye Edilemeyen
PD-1	: Programlanmış Hücre Ölümü-1
PD-L1	: Programlı Hücre Ölüm Ligandı-1
PD-L2	: Programlı Hücre Ölüm Ligandı-2
PET/BT	: Pozitron Emisyon Tomografi/Bilgisayarlı Tomografi
PI3/AKT	: Fosfoinositid 3 kinaz/Akt
PKMH	: Periferik Kan Mononükleer Hücreleri
RA	: Romatoid Artrit
R-CHOP	: Rituksimab - Siklofosamid, Doksorubisin, Vinkristin, Prednizon

R-IPI	: Rituksimab - International Prognostic Index
SHM	: Somatik Hipermutasyon
SLE	: Sistemik Lupus Eritematozus
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizmi
TCR	: T hücre reseptörü
TNF	: Tümör Nekrotizan Faktör
ZAP-70	: Zeta Zincir İlişkili Protein Kinaz-70
WHO	: World Health Organization

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TABLolar DİZİNİ	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
SİMGELER ve KISALTMALAR	vi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Non-Hodgkin Lenfomalar	3
2.1.1. Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma (DBBHL)	4
2.1.2. Tanım	4
2.1.3. Epidemiyoloji	4
2.1.4. Tanı	4
2.1.5. Etiyoloji	5
2.1.6. Sınıflandırma, Evrelendirme ve Risk Değerlendirmesi	5
2.1.7. Klinik ve Morfolojik özellikleri	9
2.1.8. Tedavi	11
2.2. DBBHL'nin Hücresel Orijini, Genetik ve Epigenetik Profili	13
2.2.1. GCB-DBBHL ve ABC-DBBHL İlişkili Genetik ve Epigenetik Değişiklikler	15
2.2.2. GCB-DBBHL İlişkili Genetik ve Epigenetik Değişiklikler	18
2.2.3. ABC-DBBHL İlişkili Genetik ve Epigenetik Değişiklikler	21
2.3. Tümör İmmünolojisi ve İmmünoterapi	24
2.3.1. Programlanmış Hücre Ölümü-1 (PD-1)/Programlanmış Hücre Ölüm Ligandı 1-2 (PD-L1-2) Yolağı	27
2.3.2. Sitotoksik T Lenfosit İlişkili Protein-4 (CTLA-4)/ CD80 Yolağı	34
2.3.3. PD-1/PD-L1 ve CTLA-4/CD80 Gen Polimorfizmleri	38
	ix

3. GEREÇ ve YÖNTEM	44
3.1. Hasta Seçimi	44
3.2. Etik Kurul Onayı	45
3.3. Numunelerin Alınışı ve Hazırlanışı	46
3.4. DNA Dizileme Çalışmaları	46
3.4.1. Periferik Kandan Genomik DNA Eldesi	46
3.4.2. DNA Örneklerinin Konsantrasyonlarının ve Saflık Derecelerinin Belirlenmesi	46
3.4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	46
3.4.4. Agaroz Jel Elektroforezi	48
3.4.5. PZR Ürünlerini Saflaştırma	49
3.4.6. DNA Dizileme Reaksiyonu	49
3.4.7. DNA Dizi Analizi Yapılacak Amplikonları Saflaştırma	50
3.4.8. DNA Dizi Analizi İşlemi ve Sonuçların Yorumlanması	51
3.5. Gerçek Zamanlı PZR Optimizasyon Çalışmaları	51
3.5.1. RNA İzolasyonu	51
3.5.2. RNA'dan cDNA Sentezi	53
3.5.3. Kantitatif PZR	53
3.6. Akış Sitometri Çalışmaları	56
3.7. İstatistiksel Analiz/Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi	59
4. BULGULAR	60
5. TARTIŞMA	71
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	84
KAYNAKLAR	88
EKLER	106
ÖZGEÇMİŞ	116

1. GİRİŞ

En yaygın görülen hematolojik kanserlerden olan Non-Hodgkin Lenfoma (NHL) birçok değişik alt tipe sahiptir. Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma (DBBHL), yetişkin Non-Hodgkin lenfomalar arasında en sık görülen, agresif seyirli histolojik alt tipidir. Yeni tanı alan NHL vakalarının yaklaşık %30-%40'ını oluşturmaktadır (2021, Siegel ve ark., 2021, Swerdlow ve ark., 2017). Her yaş grubunda ortaya çıkabilmesine karşın 65 yaş ve üstü hastalarda ve cinsiyet bakımından erkeklerde daha yüksek oranda görülmektedir (<http://www.cancer.org>, Erişim tarihi: 21 Mart 2021).

Klinik heterojeniteye sahip DBBHL'nin etiyolojisi kesin olmamakla birlikte hastalığın gelişiminde bulaşıcı ajanlar, çevresel faktörler, otoimmün hastalıklar, genetik ve epigenetik aberasyonlar rol oynamaktadır. DBBHL vakalarının çoğu *de novo* ortaya çıkabileceği gibi düşük dereceli lenfomaların transformasyonu ile de oluşabilmektedir (Castillo ve ark., 2018, Swerdlow ve ark., 2017). İmmünohistokimyasal (Hans ve Tally yöntemleri) algoritmalar ve hücre orijinine dayalı gen ekspresyon profil (GEP) analizleriyle Germinal Merkez B Hücreli (GCB) ve Aktive B Hücreli (ABC) gibi moleküler alt tiplere ayrılmıştır. Hastalığın prognozunu daha öngörülebilir hale getirmek için yapılan bu sınıflandırmalar neticesinde tedavi yanıtları ve sağkalım süreleri farklılık göstermektedir (Alizadeh ve ark., 2000, Swerdlow ve ark., 2017).

DBBHL'nin evresini değerlendirmek için güncellenmiş Ann-Arbor evreleme sisteminden (Lugano sınıflaması), prognostik skorlama için IPI, R-IPI veya NCCN-IPI gibi göstergelerden faydalanılmaktadır. CD20'ye karşı geliştirilen rituksimab monoklonal antikoruna ile standart hale gelen R-CHOP rejimi tedavi seçeneklerindendir (Cheson ve ark., 2014, Öztürk ve ark., 2016, Shipp, 1993, Swerdlow ve ark., 2016, Zhou ve ark., 2014).

İmmün sistem, tümör hücrelerini kontrol altına alma ve yok etmede merkezi bir rol oynar. Ancak immün sistemin kontrol mekanizmalarını manipüle etmeyi başaran kanser hücreleri çoğalıp yayılmaya devam eder. Kanser tedavisine yön verebilecek stratejilerden immünoterapi, immün kontrol noktası inhibitörlerini hedef alır. İmmün

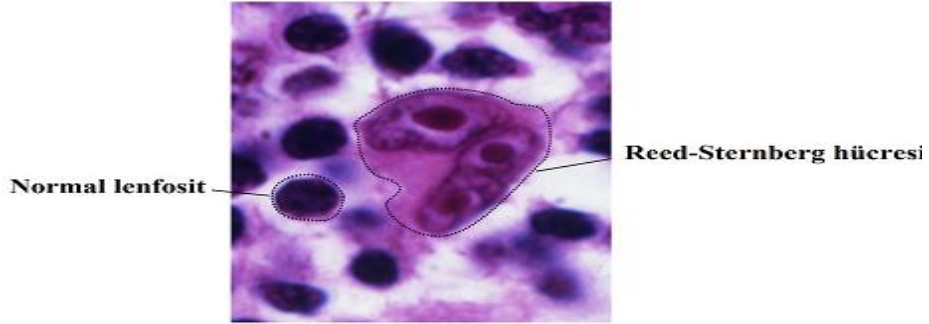
kontrol noktası inhibitörleri, immün yanıtın regülasyonundan sorumlu uyarıcı yollarıdır. İnhibitör immün kontrol noktası blokajı, T hücre inhibitör sinyallerini bloke eden monoklonal antikorlar olup kanser hücresinin proliferasyonunda ve klinik progresyonunda son derece önemlidir. Bu antikorlar kanser hücrelerinin aktivasyonundan ziyade immün yanıtı inhibe eden fren mekanizmalarına odaklanmıştır. Bu sebeple pek çok kanser türünün tedavisinde ortak kullanılmaktadır (Abbas A.K., 2015, Janeway, 2001). Agresif tümör gelişiminin immüno-regülasyonunda rol oynayan Programlanmış Hücre Ölümü-1 (PD-1) ve Sitotoksik T Lenfosit İlişkili Antijen-4 (CTLA-4) kontrol noktalarının ve ligandlarının önemi gün geçtikçe dikkat çekici hal almaktadır. 2018 Nobel fizyoloji ve tıp ödülü, James Allison’a “CTLA-4”, Tasuku Honjo’ya ise “PD-1” immün kontrol noktası proteinlerini hedef alan çalışmaları nedeniyle verilmiştir. CTLA-4 proteinine yönelik ilaçlar melanom ve malign mezotelyoma tedavisinde kullanılmaktadır. Anti-PD1 ve anti-PD-L1 ilaçlar ise melanom, küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK), renal karsinom, hepatoselüler karsinom, DBBHL, baş ve boyun karsinomu, kutanöz skuamöz hücreli karsinom gibi pek çok kanserin tedavisinde kullanılmaktadır (Twomey ve Zhang, 2021, Vaddepally ve ark., 2020) (<http://www.fda.gov>, Erişim Tarihi: 1 Nisan 2021, <http://clinicaltrials.gov>, Erişim Tarihi: 1 Nisan 2021).

Otoimmün hastalıklardan kansere kadar pek çok hastalıkla ilişkili olduğu kanıtlanan PD-1, PD-L1, CTLA-4 ve CD80 moleküllerine, DBBHL patogenezinin ve prognozunun anlaşılmasına katkı sağlamak için odaklandık. Türkiye’de yapılan çalışmalarda yeni tanı DBBHL hastalarında bu genlerdeki varyasyonların, gen regülasyonu üzerine etkileri daha önce bütünüyle ele alınmamıştır. Çalışmamıza dahil edilen olgularda, çeşitli kanser türleriyle sıkı ilişkileri olan *PD-1*, *PD-L1*, *CTLA-4* ve *CD80* gen polimorfizmlerinin incelenmesi ve gözlenen genetik varyantların *PD-1*, *PD-L1*, *CTLA-4* ve *CD80* mRNA ekspresyonu ile protein seviyelerinin ilişkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu sebeple elde edilen veriler ışığında yeni tanı DBBHL’nin tedavi seçiminde ilgili genlerin varyasyonlarının katkısının olup olmayacağının da araştırılması hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Non-Hodgkin Lenfomalar

Genel olarak lenf düğümleri ve lenfatik dokulardan oluşan lenfatik sistem, kardiyovasküler sistemden bağımsız çalışan ikinci bir dolaşım sistemidir. İmmün yanıt için oldukça önemli olan bu sistemin elemanlarından T lenfosit, B lenfosit ve nadiren Doğal Öldürücü (Natural Killer) hücrelerin klonal proliferasyonundan kaynaklanan değişik klinik, patolojik ve genetik özellikler sergileyen neoplaziler “lenfoma” olarak adlandırılır. Malign lenfoid hücreler de normal lenfositlere benzer şekilde lenf bezleri, dalak, kemik iliği ve diğer organlar tarafından üretilir. Lenfoma, ilk kez 1832 yılında patolog Thomas Hodgkin tarafından lenfadenopatili bir hastada tanımlanmıştır. Lenfoma; Hodgkin lenfoma (HL) ve Non-Hodgkin lenfoma (NHL) şeklinde iki ana gruba ayrılmaktadır. Reed-Sternberg hücresi adı verilen anormal bir lenfositin çoğalmasıyla oluşan Hodgkin Lenfoma vücudun herhangi bölgesinde görülebilir (Şekil 2.1.) (Jamil ve Mukkamalla, 2021, Reed, 1902) (<https://thd.org.tr>, Erişim Tarihi: 10 Şubat 2021).



Şekil 2.1. Reed-Sternberg Hücresi

NHL hastalık grubuna, lenf düğümleri, kemik iliği, dalak, karaciğer ve gastrointestinal sistemdeki lenfoid dokuların kötü huylu ve monoklonal proliferasyonu sonucu oluşan lenfomaların hepsi dâhil edilir. Hastalıklar arasındaki fark morfolojik, sitogenetik, immünogenetik özellikleri ve doku örneklerinin histopatolojik değerlendirilmesi neticesinde belirlenir (Yiallourous, 2018) (<https://thd.org.tr>, Erişim Tarihi: 10 Şubat 2021).

2.1.1. Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma (DBBHL)

2.1.2.Tanım

Diffüz büyük B hücreli lenfoma, normal bir makrofajın boyutuna eş veya daha geniş boyutta bir nukleusa sahip ve normal lenfositlerin de iki katından daha büyük B lenfositlerin diffüz büyüme paterni gösterdiği neoplazilerdir (Swerdlow ve ark., 2017) .

2.1.3. Epidemiyoloji

Hodgkin lenfomalarından 6 kat daha fazla prevalansa sahip NHL tüm insan kanserlerinin %4'ünü oluşturmaktadır (Swerdlow ve ark., 2017). Amerikan Kanser Derneği 2021 yılı verilerine göre en yaygın hematolojik malignite olan NHL tanılı tahmini vaka sayısı, yetişkin ve çocukların dahil olduğu 45.630 erkek ve 35.930 kadın toplamda 81.560'tır. Yaklaşık 20.720 kişinin bu hastalık nedeniyle ölmesi beklenmektedir (12.170 erkek ve 8.550 kadın). NHL gelişme riski yaşam boyunca artar ve her yaşta ortaya çıkabilmesine rağmen hastaların yarısından fazlası tanı anında 65 yaş ve üzerindedir. Ayrıca erkeklerde, kadınlardan daha fazla görülür ve diğer ırklara göre beyaz ırkta görülme sıklığı daha yüksektir (<http://www.cancer.org>, Erişim tarihi: 21 Mart 2021).

NHL'nin en sık görülen alt tipi olan DBBHL, vakaların %30-%40'ını oluşturur. Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Kanser Enstitüsü'nün SEER veri tabanına göre 2014-2018 yılları arasında DBBHL'nin yıllık insidansı yaklaşık 100.000'de 5.6 ve ölüm oranı 1.8'dir (Siegel ve ark., 2021) (<https://www.seercancer.gov>, Erişim tarihi: 24 Mart 2021).

Avrupa Birliği'nde de NHL'nin en sık karşılaşılan tipi olan DBBHL, yeni tanıların yaklaşık %3-4'ünü kapsamaktadır. Yılda 3-4/100.000 yeni olgu teşhis edilmekte ve insidansı yaşla artmaktadır (Morgan ve ark., 1997) (<https://thd.org.tr>, Erişim Tarihi: 04 Şubat 2021). Türkiye'de de en sık görülen lenfoma türü ise DBBHL'dir. Türkiye'nin en büyük referans merkezlerinden Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde 2000-2017 yılları arasında tanı alan 4239 lenfoma vakasından %24,6 (1042 vaka) DBBHL hastalığına aittir (Sağlam ve ark., 2018).

2.1.4. Tanı

DBBHL, genelde sistemik semptomlarla ilişkili hızla büyüyen nodal veya ektranodal kitle şeklinde gelişip ortaya çıkmaktadır. Tanısında ekzisyonel lenf düğümünün veya ektranodal dokuların biyopsi örnekleri tercih edilmektedir. Tedavisine acil başlanması gereken hastalarda kor biyopsi materyalleri de değerlendirilip tanı konulabilir. CD3, CD20 ve CD45 boyamalar ise immünohistokimyasal açıdan gereklidir (Swerdlow ve ark., 2016).

2.1.5. Etiyoloji

Hastalığın etiyolojisi henüz net olarak anlaşılabilmiş değildir. DBBHL; klinik, morfolojik ve sitogenetik özellikler açısından heterojendir. DBBHL, *de novo* (primer) ortaya çıkabileceği gibi nodüler lenfositik baskın Hodgkin lenfoma, marjinal zon lenfoma ve kronik lenfositik lösemi (KLL)/küçük lenfositik lenfoma gibi indolent lenfomaların dönüşümüyle de (sekonder) oluşabilmektedir.

Hastalığın gelişimi için önemli bir diğer risk faktörü ise altta yatan immün yetmezliğidir. Epstein-Barr virüsü (EBV), Kaposi sarkomu ile ilişkili herpes virüsü, insan immün yetmezlik virüsü (HIV) ve *Helicobacter pylori* bakterisi gibi bulaşıcı ajanlar DBBHL'nin belirli alt tiplerinin gelişiminde rol oynar (Castillo ve ark., 2018, Swerdlow ve ark., 2017).

Hastalığın diğer nedenleri arasında çevresel etkenler (endüstriyel toksinler, tarım ilaçları, radyasyon, kemoterapötikler, ultraviyole ışın, pestisitler ve saç boyları), romatoid artrit (RA), Sjögren sendromu, sistemik lupus eritematozus (SLE) gibi otoimmün hastalıklar, bağışıklığın baskılanmasına neden olan durumlar (transplantasyon ve tedavileri vb.) ve bazı genetik değişiklikler yer almaktadır (De Roos ve ark., 2010, Ekström-Smedby, 2006, Swerdlow ve ark., 2017).

2.1.6. Sınıflandırma, Evrelendirme ve Risk Değerlendirmesi

İlk kez 1966 yılında Rappaport tarafından düzenlenen sınıflandırma uzun yıllar boyunca kabul görüp kullanılmıştır. 1982 yılında ise hastalığın histopatolojik ve sitolojik özelliklerine göre Working Formulation (Uluslararası sınıflandırma) adında yeni bir sınıflandırma oluşturulmuştur. WHO'nun 2016 yılındaki sınıflaması DBBHL'yi

morfolojik değişkenlere, moleküler ve immünofenotipik alt gruplara ayırmıştır. Buna karşın vakaların büyük bir kısmı biyolojik açıdan heterojen olup ayırım kriterlerini karşılamamakta ve “DBBHL, Spesifiye Edilemeyen (NOS)” olarak adlandırılmaktadır (Tablo 2.1.) (Li ve ark., 2018, Swerdlow ve ark., 2017).

Tablo 2.1. Büyük B Hücreli Lenfomaların Sınıflaması (WHO 2016)

Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma, NOS
Moleküler Alt tipler
-Germinal Merkez B Hücreli (GCB)
-Aktive B Hücreli (ABC)
Morfolojik Varyantlar
-Sentroblastik
-İmmünoblastik
-Anaplastik
-Diğer nadir varyantlar
Diğer Büyük B Hücreli Lenfomalar
-T Hücresi/Histiyosit Zengin Büyük B Hücreli Lenfoma
-Santral Sinir Sisteminin Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoması
-Primer Kutanöz Büyük B Hücreli Lenfoma, Bacak Tipi
-EBV-Pozitif Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma, NOS
-Kronik İnflamasyonla İlişkili Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma
-Lenfomatoid Granülomatozis
-IRF4 rearanjmanı İçeren Büyük B Hücreli Lenfoma
-Primer Mediastinal (Timik) Büyük B Hücreli Lenfoma
-İntravasküler Büyük B Hücreli Lenfoma
-ALK-pozitif Büyük B Hücreli Lenfoma
-Plazmablastik Lenfoma
-HHV8-Pozitif Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma
-Primer Efüzyon Lenfoması
Yüksek Dereceli Büyük B hücreli Lenfoma
-Yüksek Dereceli Büyük B hücreli Lenfoma, BCL2 ve/veya BCL6 ve MYC rearrangementi içeren
-Yüksek Dereceli Büyük B hücreli Lenfoma, NOS
B hücreli Lenfoma, Sınıflandırılmayan
-B hücreli Lenfoma, Sınıflandırılmayan, Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma ve Hodgkin Lenfoma arasında özellikler içeren

Güncellenmiş Ann-Arbor evreleme sistemine göre değerlendirme yapılmaktadır (Tablo 2.2.) (Cheson ve ark., 2014). Hastalığı evrelendirmek için pozitron emisyon tomografi/bilgisayarlı tomografi (PET/BT) gibi görüntüleme yöntemleri ile kontrastlı toraks ve abdominopelvik BT ve kemik iliği biyopsisi uygulanmaktadır (Shipp, 1993).

Tablo 2.2. Güncellenmiş Ann-Arbor Evreleme Sistemi (Lugano Sınıflaması)

Evre	Tutulum	Ekstranodal (E) tutulum
Erken evre		
1	Tek lenf bezi veya komşu lenf bezi grubu	Nodal tutulum olmadan tek ekstranodal lezyon
2	Diyaframın aynı tarafında 2 veya daha fazla tutulu lenf nodu grubu	Evre I veya II nodal yayılımı sınırlı ekstranodal tutulum
2 kitlesel*	Yukarıdaki gibi kitlesel lezyonla evre 2 hastalık	Uygulanamaz
İleri evre		
3	Diyaframın her iki tarafında nodal tutulum veya dalak tutulumuyla diyafram üstü nodal tutulum	Uygulanamaz
4	Komşu olmayan ekstra lenfatik tutulum	Uygulanamaz
Not: Hastalık yayılımı, florodeoksiglukoz tutulumu olan lenfomalar için pozitron emisyon tomografi/bilgisayarlı tomografi ile olmayan lenfomalar için ise bilgisayarlı tomografi ile belirlenir. Tonsiller, Waldeyer halkası ve dalak nodal doku olarak kabul edilir. Evre II kitlesel* hastalık sınırlı veya ileri evre hastalık olarak tedavi edilse de histoloji ve prognostik faktörlerin sayısına göre karar verilmelidir. Kitlesel* (<i>Bulky</i>) hastalık: Büyük çapı 10 cm'nin üzerinde olan kitle ya da ön/arka akciğer grafisinde torakal 5-6 vertebral disk düzeyinde hesaplanan en uzun transvers transtorasik çapın 1/3'ünü aşan mediastinal kitle.		

Bkz:Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma Kılavuzu, 2020 (<http://www.thd.org.tr>, Erişim Tarihi: 1 Nisan 2021).

DBBHL'de, prognoz göstergesi sayılan skarlama sistemlerinden ilki Uluslararası Prognostik İndeks [International Prognostic Index (IPI)] skorudur (Tablo 2.3.) (Shipp, 1993). Rituksimab sonrası geliştirilen R-IPI ve kötü prognoza sahip kanser hastalarında daha başarılı olduğu düşünülen Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı [National Comprehensive Cancer Network (NCCN)]-IPI'da prognostik değerlendirmeler ve sınıflama için kullanılmaktadır (Tablo 2.3.) (Öztürk ve ark., 2016, Zhou ve ark., 2014).

Tablo 2.3. DBBHL’de Prognostik Göstergeler

Prognostik göstergeler			
	IPI	R-IPI	NCCN-IPI
Parametreler			
Yaş			
>40-≤60			1
>60-≤75	1	1	2
>75			3
LDH (oran)			
>1-≤3	1	1	1
>3			2
Ann-Arbor evre III-V	1	1	1
Performans (ECOG ≥2)	1	1	1
Ekstranodal hastalık			
>1 bölge tutulumu	1	1	
Kİ, MSS, karaciğer, Gİ kanal veya akciğerden herhangi biri			1
Skor			
Düşük risk	0-1	0	0-1
Düşük-orta risk	2	1-2	2-3
Yüksek-orta risk	3		4-5
Yüksek risk	4-5	≥3	≥6
Kİ: Kemik iliği, MSS: Merkezi sinir sistemi, Gİ: Gastrointestinal, IPI: Uluslararası Prognostik İndeks, R-IPI: Rituksimab-Uluslararası Prognostik İndeks, NCCN: Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı, LDH: Laktat dehidrogenaz, ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group			

Bkz:Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma Kılavuzu,2020 (<http://www.thd.org.tr>, Erişim Tarihi: 1 Nisan 2021).

Prognostik göstergelerden ilki olan IPI skorlamasında her bir faktör 0 veya 1 puan ile değerlendirilir. Toplam skoru 0-1 olan düşük riskli, 2 puan düşük-orta riskli, 3 puan yüksek-orta riskli, 4-5 puan ise yüksek risk grubunda sınıflandırılmaktadır.

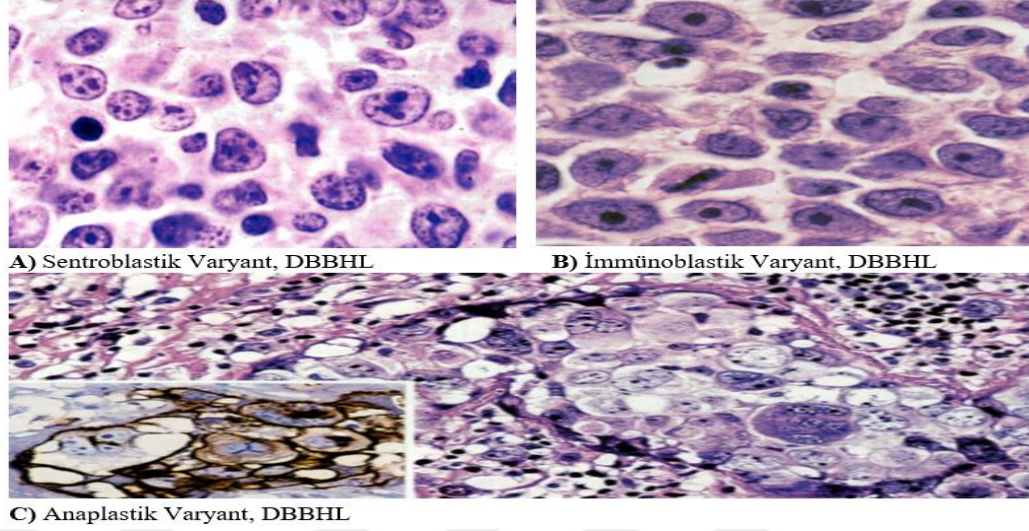
R-IPI skorlamasında ise toplam skoru 0 olan düşük riskli, 1-2 puan düşük-orta riskli, 3 puan ve üzeri yüksek risk grubunda sınıflandırılmaktadır. NCCN-IPI’ya göre toplam skoru 0-1 olan düşük riskli, 2-3 puan düşük-orta riskli, 4-5 puan ve üzeri yüksek-orta riskli, 6 puan ve üzeri yüksek risk grubuna göre değerlendirilir.

IPI skorlama sistemi dışında hastalığın kötü prognostik faktörlerine; Ann-Arbor evrelemesine göre ileri evre hastalık, yüksek Ki-67 proliferasyon indeksi, *BCL2* ekspresyon varlığı, *p53* overekspresyonu, immünoblastik ve plasmablastik morfoloji, *BCL6*, *MYC* gibi genlerin rearanjmanı ve kemik iliği tutulumu gibi örnekler verilebilir (Akasaka ve ark., 2000, Kramer ve ark., 1998).

2.1.7. Klinik ve Morfolojik özellikleri

Çoğu vaka, primer lenf nodundaki veya ektranodal bölgelerdeki hızlı büyüyen tümöral kitle şikayetine sahipken asemptomatik de olabilmektedir. Ateş, kilo kaybı ve gece terlemesi (B semptomları) gibi bulgular vakaların %30'unda görülmektedir (Swerdlow ve ark., 2017). Lenf nodu haricinde diğer bölgelerde oluşan “primer ektranodal lenfoma” ile lenf nodunda oluşan fakat diğer ektranodal bölgelere de sıçrayan “sekonder ektranodal lenfoma”nın ayrımı PET-CT yöntemi ile yapılmaktadır (Das ve ark., 2014). Olguların yaklaşık yarısı Ann-Arbor evreleme sistemine (Lugano sınıflaması) göre erken evre hastalık döneminde (Evre I ya da Evre II) tanı almaktadır. Hastaların çoğunda primer şekilde lenf nodu tutulumu görülmesine karşın %40'ında ektranodal bölgelerde de tutulum izlenebilmektedir. En sık tutulum gösteren ektranodal bölgeleri; gastrointestinal sistem, kemik, dalak, Waldeyer halkası, tükürük bezleri, tiroid, santral sinir sistemi, testis, adrenal bezler ve karaciğer şeklinde sıralayabiliriz. Ek olarak santral sinir sistemi ve testis gibi dokuların tutulumu hastalığın prognozunu kötüleştirir (Hatem ve Bogusz, 2016, Singh ve ark., 2018).

DBBHL'nin morfolojik bulgu yelpazesi oldukça geniştir. Sentroblastik, immünoblastik ve anaplastik morfolojik varyantlar, WHO'nun sınıflandırmasında tanımlanacak kadar yaygındır (Şekil 2.2A, 2.2B. ve 2.2C.) (Orazi ve ark., 2013) (<http://www.hemepathreview.com>, Erişim Tarihi: 2 Nisan 2021).



Şekil 2.2. DBBHL’de Morfolojik Varyantlar **A)** Sentroblastik Varyant, **B)** İmmünoblastik Varyant, **C)** Anaplastik Varyant Görünümleri

En sık karşılaşılan tipi sentroblastik varyanttır. Yuvarlak veya oval, merkezi olarak yerleşmiş nükleus, veziküler kromatine sahip büyük bölünmemiş hücrelerdir. Bu hücreler 2-4 nükleoluslu ve yetersiz bazofilik sitoplazması vardır (Şekil 2.2A.) (Engelhard ve ark., 1997, Swerdlow ve ark., 2017). Sentroblastik tipteki hücrelerin %90 ve üzerinde olduğu vakalar monomorfik, %90’ın altında olup diğer varyant hücrelerinde bulunduğu vakalar ise polimorfik tip olarak adlandırılmaktadır. Sentroblastik varyanta sahip DBBHL’nin, immünoblastik ve anaplastik varyantları ile karşılaştırıldığında daha iyi prognoz ve genel sağkalıma sahip GCB alt tipinde olduğu belirlenmiştir (Li ve ark., 2018, Orazi ve ark., 2013, Swerdlow ve ark., 2017).

İmmünoblastik varyant, genelde orta seviyede bazofilik sitoplazmalı ve nükleer zara bağlanmış ince kromatin ipliklere sahip tek nükleuslu B hücresinden türemiş lenfoid hücrelerdir. İmmünoblastik varyantta sıklıkla CD10 pozitifliği ve *MYC* translokasyonu görülür (Şekil 2.2B.) (Li ve ark., 2018, Orazi ve ark., 2013, Swerdlow ve ark., 2017).

Anaplastik varyant, çok iri boyutlu, çok nükleuslu veya nükleusları çok loblu, hiper kromatinli hücrelerdir (Sukswai ve ark., 2020). Bu varyant Reed-Sternberg hücrelerini ya da anaplastik büyük T hücreli lenfoma hücrelerini anımsatmasına rağmen anaplastik büyük T hücreli lenfoma ile ilişkili olmadığı için ayrımı önemlidir (Şekil 2.2C.) (Orazi ve ark., 2013, Rosai, 2015). Vakaların %80’i sentroblastik varyant, %8-10’u

immünoblastik varyant ve %9'u ise anaplastik varyant taşımaktadır (Sukswai ve ark., 2020).

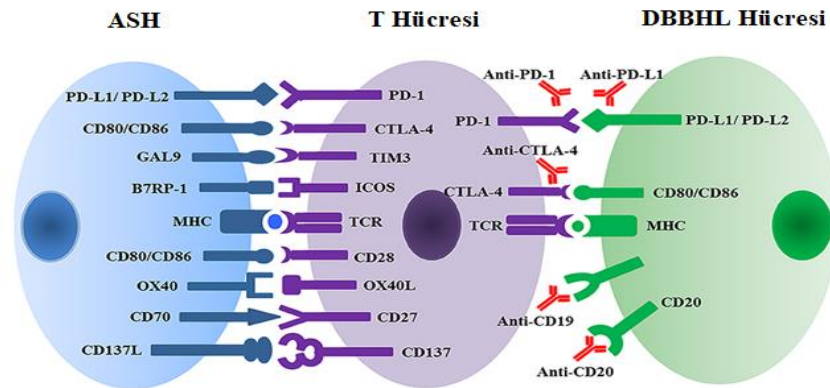
DBBHL, NOS'un; berrak hücre özellikli lenfoma hücrelerinden, miksoid tümör ve sarkomatoid görünümlü iğsi hücrelerden oluşan neoplaziler gibi çok nadir başka morfolojik örnekleri de vardır. Ancak bu varyantlar, klinikopatolojik bulgulara dayalı olarak birbirlerinden yeterince farklı değildir (Sukswai ve ark., 2020).

2.1.8. Tedavi

Hastalığın tedavisinde, hastanın fizyolojik durumu, yaşı, yaşa bağlı IPI skoru, klinik evre ve prognozda etkili diğer faktörler dikkate alınarak kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapi seçenekleri uygulanmaktadır. DBBHL, hızlı seyreden fakat tedavi edilebilir bir hastalık iken tedavisiz bırakılan hastalar 1 yıldan az yaşam süresine sahiptir (Swerdlow ve ark., 2016). DBBHL'nin tedavisinde uzun yıllar boyunca altın standart olarak kullanılan siklofosfamid, doksorubisin, vinkristin ve prednizon (CHOP) tedavisine, B lenfosit yüzey antijeni CD20'ye karşı geliştirilen rituksimab monoklonal antikorunun 1997 yılında eklenmesiyle (R-CHOP) klinik açıdan daha başarılı (%60-70 tam kür) sonuçlar elde edilmiştir. Rituksimab, antikor-bağımlı hücre aracılı sitotoksite, kompleman-aracılı lizis veya direkt apoptoz indüksiyonu gibi etki mekanizmalarına sahiptir. R-CHOP kombine tedavi yöntemiyle pek çok hasta tedavi edebilmesine karşın bazı hastaların (%30-40 olguda) tedaviye yanıt vermemesi veya tedavi sonrası hastalığın yeniden ortaya çıkması gibi durumlar da söz konusu olabilmektedir (Li ve ark., 2018, Singh ve ark., 2018).

Relaps durumundaki hastalar için otolog kök hücre nakli gibi sekonder tedavi seçenekleri değerlendirilebilir (Friedberg, 2011, Vellenga, 2008). GCB-DBBHL hastalarının çoğu tedaviye yanıt verirken ABC alt tipinde tedaviye yanıt düşük seviyededir. Ayrıca ABC-DBBHL'de tedavi başarısını arttırmak amaçlı ibrutinib ve lenalidomid gibi yeni ajanların kullanıldığı çalışmalar devam etmektedir (Griner ve ark., 2014, Nowakowski ve ark., 2011).

Temelleri 19. yüzyıla dayanan kanser immünoterapisi, immün sistemin tümör hücrelerine karşı başarısını hedefler. 1891 yılında Amerikalı cerrah ve kanser araştırmacısı William B. Coley, ameliyat edilemeyen kanserli bir hastaya streptokokal organizmalar enjekte ederek oluşan enfeksiyonun tümörü küçültme etkisini kanıtlamıştır. İmmünoterapinin ilk örneklerinden bu yaklaşıma “Coley toksini” denilmektedir (McCarthy, 2006). Günümüzde kanserde immünoterapik stratejiler genelde anti-tümöral rol oynayan immün kontrol noktaları üzerinedir. Şekil 2.3.’te Antijen sunan hücreler (ASH), T hücresi ve DBBHL hücresi arasındaki bağışıklık kontrol noktalarının ligand-reseptör etkileşimleri gösterilmiştir. Bu etkileşimler, T hücresi aktivasyonda ve anti-tümör aktivitesinin düzenlenmesinde kritik role sahiptir (Zhang ve ark., 2018). Bir başka tedavi rejimi ise kimerik antijen reseptörü (CAR) T hücresi tedavisidir. CAR-T hücre tedavisi, kişiselleştirilmiş bir tedavidir. Hastadan elde edilen T hücrelerine, spesifik bir tümör hücrelerini tanıması için gen transferi yapılır. Genetik olarak tümör hedefli reseptörü eksprese edecek şekilde tasarlanan otolog, poliklonal T lenfositler halini gelen CAR-T hücreleri hem antijen bağlama hem de T hücrelerini aktive etme işlemini tek bir reseptörde birleştirir. Tasarlanmış bu reseptör proteinler hastaya geri verilir ve kanser hücreleriyle savaşır. CAR-T hücresi tedavileri en çok B hücreli akut lenfoblastik lösemi (ALL) hastalarında etkili olmuştur. DBBHL hastaları için daha az veri mevcuttur. Fakat kümülatif verilere göre CAR-T hücrelerinin kullanıldığı immünoterapinin, relaps/refrakter DBBHL veya foliküler lenfoma (FL) hastalarına uzun vadeli sağkalım sunduğu gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2018).



Şekil 2.3. DBBHL’de Reseptör-Ligand Etkileşimleri

2.2. DBBHL'nin Hücresel Orijini, Genetik ve Epigenetik Profili

Diffüz büyük B hücreli lenfoma, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki en yaygın NHL türüdür ve her yıl yeni NHL vakalarının yaklaşık %24'ünü temsil eder. 1993'ten beri klinisyenler, agresif NHL'deki prognozu; yaş, evre, ektranodal bölgelerin tutulum sayısı, ECOG performans durumu ve LDH olmak üzere beş klinik faktöre göre karakterize etmek için Uluslararası Prognostik İndeks'i (IPI) kullandılar. Bununla birlikte geçtiğimiz yirmi yılda, yüksek riskli hastaları tanımlamak için IPI'dan bağımsız, hücre orijini ve moleküler özelliklerine göre DBBHL alt tiplerinin belirlenmesi hususunda büyük çaba harcanmıştır (Liu ve Barta, 2019). Alizadeh ve arkadaşları, B hücre malignitelerinde gen ekspresyonunun sistematik karakterizasyonunu belirlemek amacıyla DBBHL biyopsi örneklerinden hücre orijinine dayalı gen ekspresyon profil (GEP) çalışmaları yapmışlardır. Çalışmanın neticesinde GCB-DBBHL ve ABC-DBBHL alt tipleri ve kalan %10-15'i sınıflandırılmayan hastalık grubu şeklinde üçe ayrılmıştır. GCB-DBBHL ve ABC-DBBHL alt tiplerinin moleküler patogenezi, klinik açıdan prognozu ve tedaviye yanıtı birtakım farklılıklara sahip olduğu için bu gruplandırma önemlidir (Alizadeh ve ark., 2000). Klinik uygulamalarda kullanılan Hans ve Tally yöntemleri gibi immünohistokimya algoritmaları da hücre orijini için bu sınıflandırmadan yararlanır (Susanibar-Adaniya ve Barta, 2021). Ek olarak Lymph2Cx gibi yeni platformlar sayesinde formalinle sabitlenmiş parafine gömülü doku biyopsilerinde dijital GEP ile hücre kökenini belirleyen araştırmalar yapılmaktadır (Scott ve ark., 2015).

DBBHL, germinal merkez (GM) kaynaklı olgun B hücrelerin malign dönüşümünden kaynaklanır. GM'ler, B hücrelerin yabancı bir antijenle uyarıldığında klonal çoğalma ve antikor afinitesinin olgunlaşmasını sağlayan sekonder lenfoid organların mikroanatomik yapılarıdır. Yüksek derecede hücre bölünmeleriyle karakterize bu yapılar, B hücrelerinin sürekli ve çift yönlü dönüştüğü aydınlık ve karanlık bölgeden oluşur. Karanlık bölgede antijenle-aktive olan B hücreleri, sentroblastlara farklılaşırlar ve sentroblastlar germinal merkezin karanlık bölgesinde klonal olarak çoğalır. Çoğalma esnasında, immünoglobulin (Ig) değişken (V) bölgelerini kodlayan genlerde antijen-kökenli somatik hipermutasyonlar (SHM) görülür. Sentroblastlar daha sonra sentrositlere farklılaşırlar ve

germinal merkezin aydınlık bölgesine göç eder. Burada antijen reseptörleri modifiye olur ve uygun olmayan antikoru üreten hücreler apoptoza uğrar. Bir grup sentrositte ise Ig sınıf-switch rekombinasyon (CSR) gerçekleşir. Antijenle seçilen sentrositler, daha sonra plazma hücresi veya bellek hücresi olmak üzere farklılaşırlar (Şekil 2.4.) (Klein ve Dalla-Favera, 2008, Pasqualucci ve Dalla-Favera, 2018).

Çoğu insan tümörüne benzer şekilde DBBHL'nin patogenezi, proto-onkogenlerin, tümör baskılayıcı genlerin ve patojenik önemi olan diğer moleküllerin yapısını ve ekspresyon modelini değiştiren çoklu genetik değişikliklerin birikimini gerektiren çok aşamalı bir süreci temsil eder. DBBHL'deki malign transformasyonun hedef yapısı olan GM'nin genetik değişikliğinde iki ana mekanizma rol oynar. Bunlardan ilki VDJ rekombinasyonu, CSR ve SHM esnasında meydana gelen kromozomal translokasyonlardır. Örneğin DBBHL'de karakteristik olan *Ig-MYC* ve *Ig-BCL6* translokasyonları neticesinde serbest DNA uçları oluşur. Akut lösemilerde yaygın olarak gözlenenden farklı, DBBHL ile ilişkili kromozomal translokasyonlar, resiprokal ve dengeli translokasyonlar olduğu için birkaç istisna dışında tipik olarak füzyon proteinleri oluşturmaz. Daha ziyade heterolog regülatör bölgelerle (promotor veya enhansırlar) proto-onkogenlerin onkogenik aktivasyon kazanmasına neden olurlar (Dalla-Favera ve Pasqualucci, 2003, Pasqualucci ve Dalla-Favera, 2018).

İkincisi, aktivasyonla indüklenen sitidin deaminaz aracılı SHM sürecindeki anormal somatik hipermutasyonlardır (ASHM). SHM'nin aşırı aktivesinden kaynaklanan bu anormal somatik hipermutasyonlar, pek çok onkogenin 5' ucundaki dizilerinde ya da kodlama yapan bölgelerinde gerçekleşir. Örneğin, *MYC* ve *PIM1* genlerinin transkripsiyon başlama bölgesinin 2 kb downstream'indeki nükleotid değişimine neden olur. Moleküler alt tiplerine bakılmaksızın, yeni tanı DBBHL örneklerinin yarısından fazlasında, *Ig* lokusları dışında *PIM1* ve *MYC* gibi proto-onkogenlerin de dahil olduğu 20'den fazla gende ASHM belirlenmiştir (Longerich ve ark., 2006, Pasqualucci ve Dalla-Favera, 2018).

Bu mutasyonlar hedef genin genomik konfigürasyonuna bağlı olarak yalnızca genlerin 5' regülatör bölgelerinde değil, kodlayan dizilerinde de gerçekleşebilir. *MYC* geninin kodlayan bölgelerinde görülen mutasyonlar aminoasit değişikliğine neden olur. Böylece genin, onkogenik etkisinin artması bu duruma örnek sayılabilir. Bununla birlikte hipermutasyonlar, birinci mekanizma olan kromozomal translokasyonların oluşmasında da rol oynar. Bu nedenle ASHM, çok sayıda onkogenin veya tümör baskılayıcı genin yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin değiştirmesinin yanı sıra gen ekspresyonunda bozulmalara neden olabilen güçlü bir dönüşüm mekanizması olarak kabul edilir. Sonuç olarak hem kromozomal translokasyonlar hem de anormal somatik hipermutasyonlar DBBHL patogenezinde oldukça önemli iki genetik değişikliktir (Pasqualucci ve Dalla-Favera, 2018).

2.2.1. GCB-DBBHL ve ABC-DBBHL İlişkili Genetik ve Epigenetik Değişiklikler

- **Histon/Kromatin Modifiye Edici Enzimlerdeki Genetik ve Epigenetik Değişiklikler**

DBBHL'nin genomik analizlerinde, metiltransferazlar, asetiltransferazlar ve histonların kendileri de dahil olmak üzere birçok kromatin modifiye edici enzimi kodlayan gende mutasyonlar tanımlanmıştır. Bu genlerden en az birindeki değişiklikler, tüm DBBHL vakalarının %85'inde (en sık GCB alt tipinde) bulunabilir (Pasqualucci ve Dalla-Favera, 2018).

Metiltransferaz *KMT2D (MLL2)*'nin inaktivasyonu

Histon H3'ü (H3K4) metile ederek kromatin konformasyonunda görev alan bu genin monoallelik ve biallelik somatik mutasyonları, proteinin enzimatik fonksiyonunu bozar. DBBHL vakalarının %30'unda bulunur ve bu hastalıkla ilişkili en sık görülen genetik aberasyondur (Pasqualucci ve Dalla-Favera, 2018).

CREBBP ve *EP300* Asetiltransferaz genlerinin inaktivasyonu

Epigenetik açıdan oldukça önemli olan *CREBBP* (%25) ve *EP300* (%5) genlerini etkileyen somatik mutasyon veya delesyonlar, DBBHL örneklerinin üçte birinde görülür. Özellikle GCB alt tipinde önemli prevelansa sahiptir (Pasqualucci ve ark.,

2011). Pek çok sinyal yolağında rol oynayan bu enzimler, asetil gruplarının histon ve non-histon proteinlere eklenmesini sağlayan, gen ekspresyonunun pleiotropik düzenleyicileridir. *CREBBP* aracılı asetilasyon, kendisi de *BCL6* geninin bir hedefi olan *p53*'ün aktivasyonu için de gereklidir. Hücrelerdeki *CREBBP* miktarının sınırlı olduğu düşünüldüğünde bu transkripsiyonel ko-aktivatörün inaktivasyonu sonucu *BCL6* ve *p53* asetilasyonu gerçekleşemez ve transkripsiyon baskılanır (Brooks ve Gu, 2011, Pasqualucci ve Dalla-Favera, 2018).

- **BCL6**

Kromozom 3q27 üzerinde bulunan *BCL6* geni, BTB/Zinc parmak transkripsiyon faktörleri ailesine ait bir transkripsiyon baskılayıcıdır. B hücre maturasyonu esnasında *BCL6*, karanlık bölge ve çoğu aydınlık bölge B hücreleri dahil olmak üzere yalnızca GM'de eksprese edilirken plazma ve bellek hücreleri gibi farklılaşmış hücrelerde eksprese edilmez. Bu protein B hücrelerinin çoğalmasında ve germinal merkez formasyonunda görevlidir. Tüm vakaların yaklaşık %30'unu kapsar ve ABC-DBBHL'de daha sık gözlenir. Öte yandan B hücrelerinin immünglobülin afinitesi için *ATR* gibi DNA hasarına duyarlı genlerin ve *CDKN1a*, *PTEN* gibi hücre kontrol noktaları ile ilgili genlerin baskılanmasını sağlar (Li ve ark., 2018, Swerdlow ve ark., 2017). *BCL6* geninin aşırı ekspresyonu, hücrelerin DNA hasarına yanıt olarak apoptoza geçmesini engeller. Genin 5' kodlanmayan bölgesinde %70 oranında mutasyon görülür (Kramer ve ark., 1998, Migliazza ve ark., 1995).

BCL6 proto-onkogeninin dahil olduğu 20'den fazla translokasyon tanımlanmıştır. Translokasyonlar, en sık *IgH* lokusuyla t(3;14)(q27;q32), daha seyrek *IgL* lokusuyla t(3;22)(q27;q11) ve *IgK* lokusuyla t(3;2)(q27;p12) gerçekleşir (Lu ve ark., 2013). Normal germinal merkez hücrelerinde 5' kodlamayan bölge mutasyonları ve immünoglobulin gen değişken bölgelerinin mutasyonları görülmektedir. Bu mutasyonlara sahip DBBHL vakaları, germinal merkez veya post-germinal merkez farklılaşma aşaması ile uyumludur. 5' kodlamayan bölgedeki mutasyonlar, *BCL6* ile ekspresyonun negatif regülasyonunu bozar. Gerçekleşen translokasyonlar neticesinde farklı genlerden türetilen güçlü ve aktif promotorlar ile *BCL6*'nın promotoru değişir.

Gerek mutasyonlar gerek translokasyonlar genin aşırı ekspresyonuna neden olmaktadır (Peng ve ark., 1999, Shen ve ark., 1998).

- **Bağışıklık Sisteminin Kontrolünden Kaçış**

DBBHL örneklerinin yaklaşık %60'ı Majör Histokompatibilite Kompleksi (MHC) sınıf I'in ifadesini gerçekleştiremez ve bu nedenle çeşitli genetik ve epigenetik mekanizmalarla sitotoksik T lenfositlerin aracılık ettiği immün gözetimden kaçması beklenir. Bu mekanizmalardan bazıları şunlardır: (i) β 2-mikroglobulin alt birimini kodlayan *B2M* geninin biallelik inaktivasyonu veya homozigot delesyonu (GCB-DBBHL'nin %29'u ve ABC-DBBHL'nin %15'i), (ii) HLA lokusunun genomik kaybı ve nokta mutasyonları (iii) B2M/HLA-I proteinlerinin ekspresyon eksikliği veya anormal sitoplazmik lokalizasyonu.

T hücreleri ve NK üzerinde eksprese edilen CD2 reseptörünün ligandı *CD58* geninin inaktivasyonuna neden olan genetik değişiklikler, GCB-DBBHL'nin %12'si ve ABC-DBBHL vakalarının %23'ünde görülmektedir. MHC-II trans-aktivatörü olan *CIITA* geninin inaktivasyonu sonucunda azalmış MHC sınıf-II ekspresyonu DBBHL'nin %40-50'sinde rapor edilmiştir (Pasqualucci ve Dalla-Favera, 2018).

Programlanmış ölüm ligandlarını (*PD-L1* ve *PD-L2*) kodlayan genlerdeki kazanımlar, amplifikasyonlar ve yapısal yeniden düzenlemeler, T-hücre aracılı immün yanıtın kaçışa neden olur. DBBHL'nin %3-4'ünde tespit edilmiştir. Bu genetik değişiklikler özellikle *PD-L1* ekspresyonuyla ilişkili olup DBBHL'nin ABC alt tipinde daha sık gözlenmiştir (Georgiou ve ark., 2016, Pasqualucci ve Dalla-Favera, 2018).

- **FOXO1 Mutasyonları**

B hücre farklılaşmasında görevli FOXO1 proteini, Fosfoinositid 3 kinaz/Akt (PI3/AKT) ve Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (mTOR) kaskadını negatif olarak düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. *FOXO1* mutasyonları, tüm DBBHL vakalarının %8-10'unda tanımlanmıştır. Mutasyonlar sonucu, AKT aracılı nükleer sitoplazmik translokasyon için gerekli bir fosforilasyon bölgesi etrafında kümelenen

amino asit değişiklikleri gerçekleşir (Pasqualucci ve Dalla-Favera, 2018, Trinh ve ark., 2013).

2.2.2. GCB-DBBHL İlişkili Genetik ve Epigenetik Değişiklikler

- **BCL2 Genetik Aberasyonları**

BCL2, çoğu dokuda ifade edilen ancak transkripsiyonunun *BCL6* aracılı baskılanması nedeniyle GM'de bulunmayan anahtar bir anti-apoptotik moleküldür. Kromozom 18q21 üzerinde bulunan *BCL2* genine ait protein mitokondrinin iç membranında yer alır. Heterodimerik bir kompleksin parçası olan *BCL2*, apoptoz inhibisyonu ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol oynar. Bazı çalışmalarda kemoterapiye direncin nedeni olduğu ileri sürölmektedir (Hockenbery ve ark., 1990, Zhang ve ark., 2019).

BCL2, lenfomalarda tanımlanmış ilk translokasyon ilişkili proteindir. Foliküler lenfoma olgularının yaklaşık dörtte üçünde, DBBHL olgularının da yaklaşık %30'unda tipik t(14;18)(q32;q21) görölmektedir. *BCL2* geni ile *Ig* ağır zincir geninin promotorunun kontrolü altına almasıyla gerçekleşen bu translokasyonda *BCL2* onkogeninin ektopik aşırı ekspresyonu göröölür. Yapılan çalışmalarda nodal tümörlerin ektranodal tümörlere göre daha fazla *BCL2* eksprese ettiği görölmüştür (Hill ve ark., 1996). GCB-DBBHL alt tipinde daha sık (%40) gözlenir ve kötü prognoza sahiptir. ABC-DBBHL'de ise %5 civarındadır. *BCL2* geninin kodlama bölgelerindeki mutasyonlar ve *BCL2* promotor bölgelerindeki ASHM nedeniyle GCB alt tipinde *BCL2* ve *BCL6*'nın birlikte ekspresyonu da gözlenmiştir. *BCL2* translokasyonuna sahip olgularda *BCL2* ve *CD10* immünohistokimyasal olarak ekspresyonu yakın ilişkili olmakla birlikte net bir korelasyon tespit edilememiştir. Ancak foliküler lenfomanın histolojik dönüşümlerini ya da DBBHL'nin GCB alt tipine ait gen ekspresyon profilini gösterdiği düşünölmektedir (Hill ve ark., 1996, Li ve ark., 2018, Swerdlow ve ark., 2017).

- **MYC Genetik Aberasyonları**

Klonlandıkları költürlere ve elde edilme şartlarına göre *MYC* proto-onkogen ailesi *C-MYC* (*MYC*), *N-MYC* (*MYCN*), *L-MYC* (*MYCL*)'den oluşur ve DNA'ya bağlanan üç nükleer fosfoproteini kodlayan transkripsiyon faktörleridir. *MYC* gen ailesi,

proliferasyon, apoptoz ve farklılaşma dahil birçok hücreyel süreç için hayati öneme sahiptir. Sıklıkla amplifikasyon ve transkripsiyonal disregülasyon neticesinde onkogen halini alırlar. Bilhassa kromozom 8q24 bölgesinde yer alan *C-MYC* (*MYC*), lenfomagenezde çok önemli role sahiptir (Karube ve Campo, 2015). *MYC* proteininin aşırı ekspresyonuyla hem GM'deki B hücrelerinin aydınlık bölgeden karanlık bölgeye tekrar geçişinin arttığı hem de somatik hipermutasyonlarla tümöre zemin hazırladığı düşünülmektedir (Nguyen ve ark., 2017). En sık translokasyon yaptığı partneri *IgH* lokusu olup *t*(8;14)(q24;q32) şeklindedir. Seyrek olarak *IgK*, *IgL*, *PAX5*, *BCL6*, *BCL11A*, *IKZF1* (*KAROS*) ve *BTG* lokusları ile translokasyon yapmaktadır. Kemik iliğindeki erken evre B hücrelerinin ürettiği *MYC* ekspresyonu ise DBBHL'in %30-50'sini kapsar ve pozitif vaka olarak kabul edilmesi için genelde %40 ve üzeri ekspresyon seviyesi aranmaktadır (Karube ve Campo, 2015, Li ve ark., 2018, Swerdlow ve ark., 2017).

İmmünohistokimyasal açıdan ekspresyonu her zaman translokasyon ile tutarlı olmamasına karşın her iki koşulda da kötü prognoz anlamına gelmektedir. ABC ve GCB alt tiplerinde eşit oranda gözlenmektedir. Ayrıca *MYC* translokasyonu görülen vakaların yarısının, *BCL2* ve/veya *BCL6* translokasyonlarının da eşlik ettiği kompleks karyotipe sahip olduğu bildirilmektedir. 2016 WHO sınıflamasında bu translokasyonlara sahip vakalar “yüksek gradeli B hücreli lenfoma” diğer adıyla “double/triple hit” lenfoma sınıfında değerlendirilmektedir. Hastalarda %65'i *MYC* ve *BCL2*, %14'ü *MYC* ve *BCL6*, %21'i ise *MYC*, *BCL2* ve *BCL6* translokasyonları görülmektedir (Nguyen ve ark., 2017, Swerdlow ve ark., 2017). Double hit lenfoma tanısında Floresan in situ hibridizasyon (FISH) altın standart olmasına karşın *Ig* haricindeki diğer translokasyon partnerlerinin belirlenmesinde FISH yöntemi daha kritiktir. Çünkü ayrı bir tip olarak kabul edilmeyen ancak prognozun belirlenmesinde önemli olan *MYC* translokasyonlu DBBHL NOS olgularının çoğu “double” ekspresördür (örneğin immünohistokimyasal yöntemle *MYC* ve *BCL2* koekspresyonu pozitif olgular) (Green ve ark., 2012, Johnson ve ark., 2012, Scott ve ark., 2015).

MYC geni kopya sayısı kazanımları ve amplifikasyonları ile alakalı çalışmalara göz atarsak 2017 yılında Ennishi ve arkadaşlarının 347 *de novo* DBBHL vakasında yeni

nesil dizileme ve yüksek çözünürlüklü Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP) analizinde *MYC* ve *BCL2* kopya sayısı değişikliklerinin sırasıyla %20 ve %25 sıklıkta, özellikle ABC tipte görüldüğü, *MYC* ve *BCL2* translokasyonlarının ise sırasıyla %15 ve %30 oranında olduğu tespit edilmiştir (Ennishi ve ark., 2017). Başka bir çalışmada hem double hit lenfoma hem de *MYC* ve *BCL2* abnormalitesine sahip ‘Atipik Double Hit’ olarak değerlendirilen 76 hasta, *MYC* ve *BCL2* abnormalitesi olmayan tipik DBBHL’li 35 hasta ile kıyaslandığında klinikopatolojik özelliklerin ve tedavilerin her iki grup için benzer ancak sağkalım sürelerinin Atipik Double Hit lenfomalı hastalarda daha az olduğu saptanmıştır (Li ve ark., 2015).

Benzer şekilde Huang ve ekibi 2019 yılında DBBHL-NOS’a sahip 130 vakada FISH ve immünohistokimya metodlarını uygulamışlardır. *MYC*, *BCL2* ve *BCL6* lokuslarının ikisinde kopya sayısı değişikliğini veya translokasyona eşlik eden kopya sayısı değişikliğini ‘Atipik Double Hit’, her üç lokusta da kopya sayısı değişikliğini veya translokasyona eşlik eden kopya sayısı değişikliğini ‘Atipik Triple Hit’ lenfoma olarak tanımlamışlardır. Dahası, *MYC* ve *BCL2* ve/veya *BCL6* genlerine ait ekstra kopyaları olan hastalar, kötü prognoza daha yatkın oldukları için *MYC*, *BCL2* ve *BCL6*’nın ekstra kopyalarının tespitinin daha fazla ilgiyi hak ettiğini savunmuşlardır (Huang ve ark., 2019).

- **EZH2 Metiltransferaz Mutasyonları**

EZH2 metiltransferaz, histon H3 (H3K27me3) lizin 27 rezidüsünün trimetile edilmesinden sorumludur. Bir polikomb baskılayıcı kompleks-2 bileşeni olarak germinal merkezlerin oluşumu için gereklidir. Bu genin somatik mutasyonları, DBBHL’nin GCB alt tipinde daha sık (yaklaşık %22) görülmektedir. Mutant *EZH2* allelinin ekspresyonu farelerde GM hiperplazisini indükler ve *BCL2* deregülasyonu ile bir araya geldiğinde B hücresi lenfomalarının gelişimini hızlandırır (Caganova ve ark., 2013, Pasqualucci ve Dalla-Favera, 2018).

- **B Hücre Göçünü Etkileyen Mutasyonlar**

B hücrelerinin B hücresi folikülü içinde kalmasını P2RY8 ve S1PR2 koreseptörleri modüle eder. Bu genlerdeki inaktive edici mutasyonlar sebebiyle pAKT sinyali ve B

hücre göçü baskılanır. GCB alt tipinde (genel vakaların yaklaşık %30'u) daha fazla görülmektedir. Farelerde bu genlerin delesyonu sonucu GM yapısı bozulur ve B hücreleri periferik kan ve kemik iliğine yayılır. Böylece GCB alt tipini sergileyen lenfomaların gelişmesine yol açar (Green ve Cyster, 2012, Pasqualucci ve Dalla-Favera, 2018).

- **TNFRSF14 Mutasyonları**

Bu gen hem T hem de B hücrelerinde ifade edilen TNF (tümör nekroz faktörü) reseptör süper ailesinin bir üyesini kodlar. Kodlanmış protein, enflamatuvar ve inhibe edici T hücresi immün tepkisini aktive eden sinyal iletim yollarında işlev görür. *TNFRSF14* geninde görülen delesyon ve mutasyonlar, bu genin tümör baskılayıcı özelliğinin ortadan kalkmasına ve GM kökenli lenfomaların gelişimine neden olur (Boice ve ark., 2016, Pasqualucci ve Dalla-Favera, 2018).

2.2.3. ABC-DBBHL İlişkili Genetik ve Epigenetik Değişiklikler

ABC-DBBHL ilişkili genetik değişiklikler temelde BCR ve Toll-benzeri reseptörlerinin (TLR) sinyal yollarında görev alan molekülleri kodlayan genlerdeki değişikliklerdir. Özellikle NF- κ B sinyal yolağının bileşenlerindeki değişiklikler, terminal B-hücre farklılaşmasını bloke eden ve malign dönüşümü besleyen çoklu genetik değişikliklerle tanımlanır. Dahası *BCL2* lokusunun tekrarlayan amplifikasyonları (vakaların ~%30'u), homozigot *CDKN2A/B* kaybı (vakaların ~%50'si) ve 19q kromozomu üzerindeki *SPIB* lokusunu kapsayan bölgenin kazanımları veya amplifikasyonları (vakaların %27'si) ABC-DBBHL için karakteristiktir (Pasqualucci ve Dalla-Favera, 2018).

- **NF- κ B'nin Yapısal Aktivasyonuna Yol Açan Değişiklikler**

ABC-DBBHL patogenezinde NF- κ B kompleksinin aktivasyonunun sürekliliği olduğu düşünülmektedir.

BCR sinyal yolağındaki mutasyonlar

ABC-DBBHL'de, BCR'nin proksimal üyelerini etkileyen genetik değişiklikler “kronik aktif” BCR sinyal iletimine neden olur. Ig süper-aile üyesi olan tirozin bazlı aktivasyon

motifleri olan *CD79A* ve *CD79B* mutasyonlarına, ABC-DBBHL vakalarının yaklaşık %21'sinde rastlanılır (Davis ve ark., 2010). Ayrıca bu mutasyonların kronik aktif BCR sinyalizasyonunun yanı sıra *NF-κB*, *PI3K* ve *MAP-kinaz* aktivasyonunun sürekliliğinde de rol oynadıkları düşünülmektedir. Vakaların yaklaşık %9'undaki mutasyonlar, *CARD11* geninde görülmektedir. *CARD11*, *NF-κB*'nin BCR ile uyarılan aktivasyonu için gerekli kompleksin yapısal proteinlerinden biridir. Bu mutasyonlar, *NF-κB*'nin sürekli aktivasyonuna neden olur (Pasqualucci ve Dalla-Favera, 2018). ABC-DBBHL vakaların tedavisinde onkogenik BCR sinyalini inhibe edici ibrutinib gibi ajanların başarılı sonuçlarını bildiren klinik çalışmalar mevcuttur (Wilson ve ark., 2015).

MYD88 mutasyonları

BCR dışında Toll-benzeri reseptörler aracılığıyla da *NF-κB* gen aktivasyonu gerçekleşmektedir. TLR aracılı sinyal yolağının adaptör molekülü *MYD88*'nin hidrofobik bölgesindeki mutasyon (L265P), ABC-DBBHL olgularının yaklaşık %30'unda tespit edilmiştir (Ngo ve ark., 2011). *MYD88* L265P'nin onkogenik etkisi, *NF-κB* sinyal yolağının yanı sıra JAK-STAT yolağını da aktive eder. Farelerde bu mutasyonun onkogenik potansiyelinin, klonal lenfomaların bir kısmı dahil olmak üzere lenfoproliferatif hastalıkların gelişimine yol açtığı kanıtlanmıştır (Pasqualucci ve Dalla-Favera, 2018).

TNFAIP3 mutasyonları

ABC-DBBHL vakalarının yaklaşık %30'unu, *NF-κB*'nin negatif regülasyonunda görev alan dual-fonksiyonlu bir ubiquitin modifiye edici enzimini kodlayan *TNFAIP3* (*A20*) genindeki mutasyon ve/veya delesyonlar oluşturmaktadır. Bu genetik değişiklikler sonucu *A20* geni inaktif hale gelir. DBBHL hücre hatlarında fonksiyonel *A20* geninin yeniden ekspresyonuyla, *NF-κB*'nin sitoplazmik lokalizasyonu yeniden sağlanır. Ek olarak apoptozun gerçekleşmesine katkıda bulunan bu genin tümör baskılayıcı rolünü destekleyen araştırmalar vardır. GCB-DBBHL'de bu mutasyonlar nadiren görülmektedir (Compagno ve ark., 2009, Kato ve ark., 2009, Pasqualucci ve Dalla-Favera, 2018).

- **Terminal Farklılaşmayı Engelleyen Genetik Değişiklikler**

ABC-DBBHL'de genetik aberasyonlar neticesinde gerçekleşen NF- κ B'nin yapısal aktivasyonu terminal B-hücre farklılaşması bloke edilir. Özellikle vakaların %25'i *PRDM1/BLIMP1*'in biallelik fonksiyon kaybına neden olan mutasyon ve delesyonlardan kaynaklanmaktadır (Pasqualucci ve ark., 2006). Transkripsiyonel bir represör olan bu proteinin inaktivasyonu sonucu, GM'in aydınlık alanında bulunan B hücrelerinin plazma hücrelerine farklılaşmasında sorun oluşur. *BLIMP1*, doğrudan hedefleri *PAX5* ve *BCL6* dahil olmak üzere GM'in ana genlerinin ekspresyonunu baskılayarak çalışır. Ayrıca ABC-DBBHL vakalarında çeşitli epigenetik mekanizmalarla *BLIMP1* fonksiyonunun baskılandığı gözlenmiştir (Pasqualucci ve Dalla-Favera, 2018).

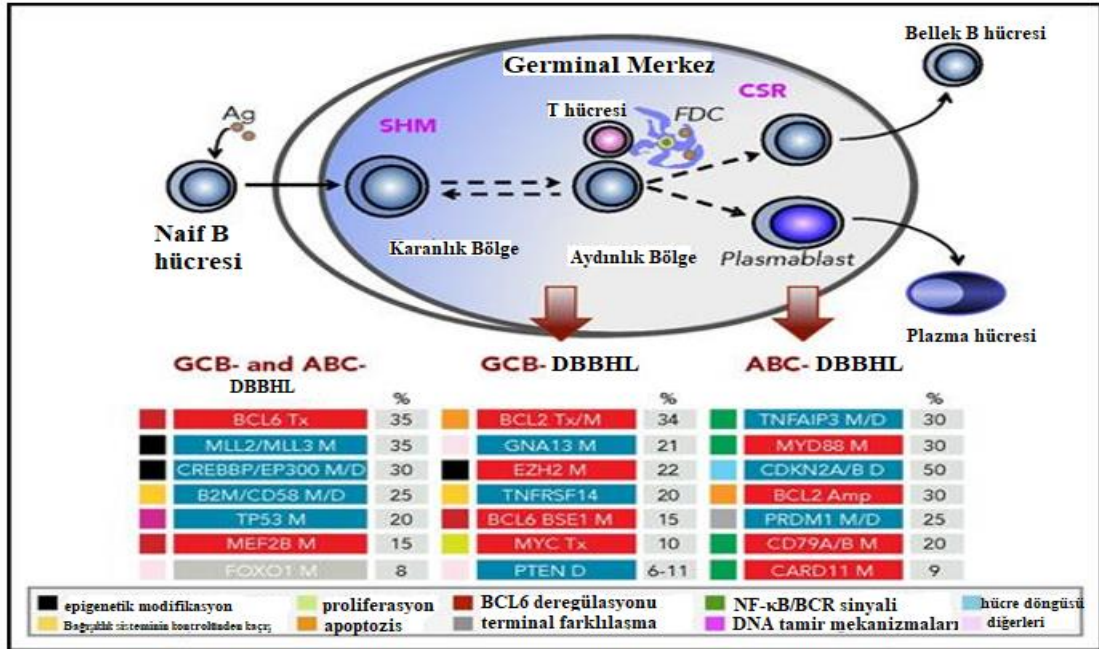
Öte yandan Diffüz büyük B hücreli lenfoma olgularında ek sık görülen kromozomal kayıplar sırasıyla 8p22-pter, 1p34-pter, 6q23-qter, 17p12-pter ve 9p23-pter iken kromozomal kazanımlar sırasıyla Xq25–26, 13q22, 12cen-q14, 3q24–25 ve 18q12–21'dir (Berglund ve ark., 2002).

Başka bir çalışmada ise 2p16, 9p24, kromozomlarında kazanımlar ve 1p36, 6q21, 9p21 kromozomlarında kayıpların daha sık görüldüğü rapor edilmiştir (Swerdlow ve ark., 2017). DBBHL'nin moleküler alt tiplerinde hastaların %10'undan daha fazlasında en sık görülen mutasyonlarının prevalansı Tablo 2.4.'de özetlenmiştir (Bolen ve ark., 2020).

Tablo 2.4. DBBHL'nin Moleküler Alt Tiplerinde En Sık Görülen Gen Mutasyonları

	GCB n=272 (%)	NOS n=78 (%)	ABC n=132 (%)
BCL2	32,40	5,10	4,50
KMT2D	30,10	21,80	28,80
CREBBP	22,10	7,70	3,80
TP53	19,50	17,90	15,20
BCL6	18,80	35,90	22,00
B2M	17,60	12,80	12,90
TNFRSF14	17,30	1,30	0,00
EZH2	16,20	6,40	0,80
TNFAIP3	15,40	11,50	9,10
REL	13,20	5,10	0,80

BCL7A	10,70	2,60	2,30
CDKN2A	10,30	21,80	48,50
MYD88	8,80	15,40	34,10
CD58	8,50	10,30	6,80
TMEM30A	8,10	11,50	8,30
CD70	7,70	17,90	6,10
PIM1	7,00	5,10	24,20
CDKN2B	5,10	11,50	30,30
NOTCH2	4,00	10,30	6,80
CD79B	2,20	9,00	25,00
PRDM1	1,50	3,80	19,70
ETV6	0,70	5,10	10,60



Şekil 2.4. DBBHL'nin Hücresel Orijini, Genetik ve Epigenetik Değişiklikler

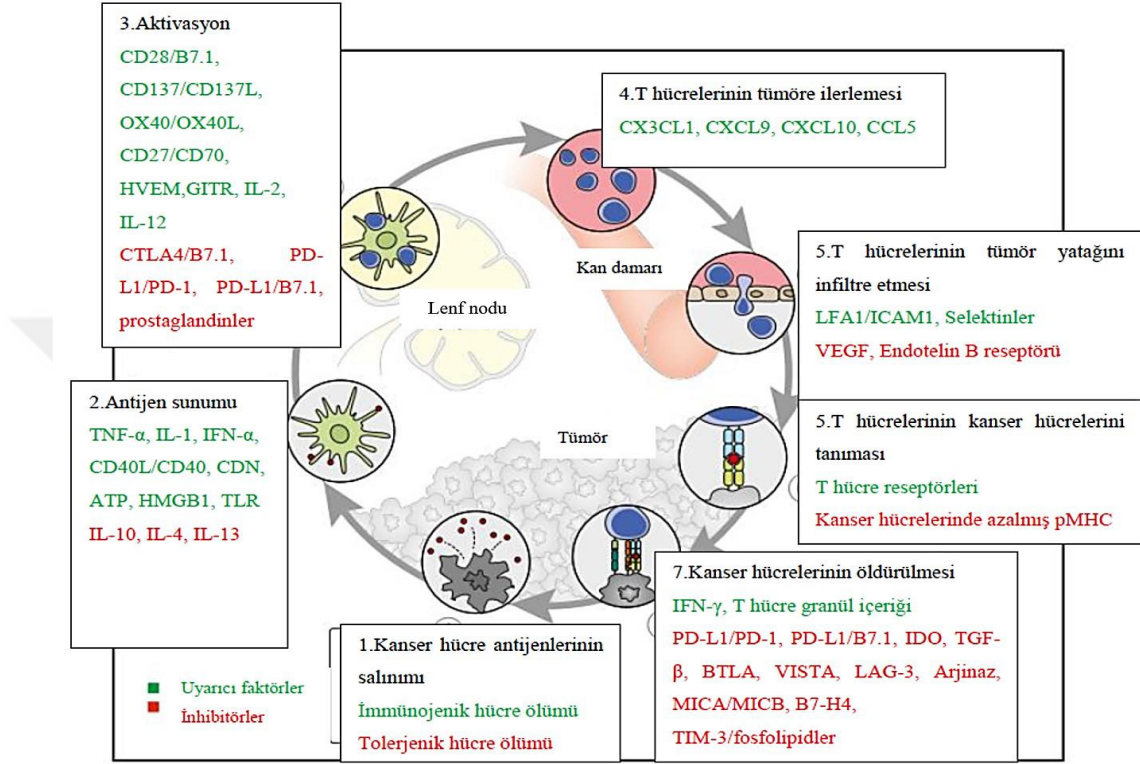
2.3. Tümör İmmünolojisi ve İmmünoterapi

Vücudumuzu patojenlere karşı savunan bağışıklık sistemimiz doğuştan gelen (genel savunma) ve sonradan kazanılmış (Edinsel, spesifik patojenlere özgü) bağışıklık sistemi olmak üzere ikiye ayrılır. Doğuştan gelen immün sistem elemanlarından makrofajlar, nötrofiller, eozinofiller, bazofiller, NK, dentritik hücreler ve kompleman sistemi

sayesinde patojenlere karşı anlık ve ilk tepki gerçekleşir. Epitelyal bariyerler ilk koruyucu engelleri oluşturup enfeksiyonları engellerken fagositler, NK hücreleri ve kompleman sistemi mikropları yok eder. Bu tepki vücuda giren her patojen için ortak bir savunmadır. Bu sayede akut inflamatuvar bir yanıt oluşur. Anlık tepkinin ardından devreye giren edinsel immün sistem yanıtı lenfositler ve onların ürünleri aracılığıyla gelişir. T hücre aracılı (baskılayıcı T hücreler, yardımcı T hücreler, sitotoksik T hücreler) ve B hücre aracılı (hüморal) savunma hücrelerin yardımıyla doğuştan gelen immün sistemin aksine daha uzun süreli ve etkin bir cevap oluşturur (Abbas A.K., 2015, Janeway, 2001).

İntrinsik ve/veya ekstrinsik faktörlerden kaynaklanan bir takım genetik ve epigenetik değişiklikler sebebiyle sağlıklı hücrelerde yapısal farklılıklar görülür. Transform olmuş bu anormal hücrelerin hızlı, kontrolsüz proliferasyonu ve metastazı ile tümör gelişir (Barbaros ve Dikmen, 2015). İmmün sistem hücrelerinin tümör hücrelerine verdiği yanıt temel olarak yedi basamakta değerlendirilebilir. Antijen salınımıyla başlayan döngüde, işlemde geçirilmek üzere dendritik hücreler tümör hücrelerine ait neoantijeni yakalar. Ayrıca bu basamak pro-enflamatuvar sitokinleri, ölmekte olan kanser hücreleri veya barsak mikrobiyotası tarafından salınan faktörler ve ek immünojenik sinyallerle desteklenmelidir. İkinci basamakta, dendritik hücreler MHC I ve MHC II molekülleri ile yakalanan antijenleri T hücrelerine sunar. Prosesin bir sonraki basamağı hazırlık ve aktivasyondur. Sunulan antijenlere karşı sitotoksik T hücrelerinin yanıtı başlar. Buradaki immün yanıtın çeşidini, efektör T hücrelerinin düzenleyici T hücrelerine oranı belirler. Ardından 4. ve 5. basamakta tümöre infiltrasyon yer alır. Aktif anti-tümör T hücreleri kan dolaşıma katılır ve tümör yatağına gelerek tümöre nüfuz eder. 6. basamakta, tümör mikroçevresinde bulunan T hücreleri, T hücre reseptörü (TCR) ile MHC I'e bağlı kendisine uygun antijen arasındaki etkileşim yoluyla spesifik olarak kanser hücrelerini tanır ve bağlanır. Son basamakta ise hedeflenen kanser hücresine bağlı aktive olmuş efektör T hücreleri, sitotoksinler yayar; bu durum kanser hücrelerinde apoptoza neden olur. Ölen kanser hücrelerinin ardından tümörle ilişkili ilave antijenler salınır. Böylece siklus tekrar birinci basamağa döner ve döngünün sonraki devirlerinde immün yanıtın büyüklüğü ve derinliği artmış olur. “Kanser bağışıklık döngüsü”nün basamakları aşağıda

yer alan Şekil 2.5.'teki gibi ilerlemektedir (Chen ve Mellman, 2013, Kim ve Chen, 2016).



Şekil 2.5. Kanser Bağışıklık Döngüsünün Uyarıcı ve İnhibitör Faktörleri

Diğer taraftan bir takım yapısal ve fizyolojik değişimlere uğrayan immün sistem hücrelerinin normal vücut hücrelerine saldırımları sonucu multipl skleroz, SLE gibi otoimmün hastalıklar meydana gelir. Madalyonun diğer yüzündeki örnek ise kanserdir. Kanser hücrelerinin immün sistemin kontrolünden kaçmasında *MHC* genlerinde gerçekleşen mutasyonlar, Şekil 2.5'te bahsi geçen aktive ve inhibe edici farklı kontrol noktalarındaki hatalar ve tümör ilişkili makrofajlar gibi pek çok etken rol oynamaktadır (Chen ve Mellman, 2013, Gonzalez ve ark., 2018).

İmmün sistemi ile kanser gelişimi arasındaki bu karmaşık ilişki, yıllarca araştırma konusu olmuştur. Son yıllarda cerrahi, kemoterapi, radyasyon tedavisi ve hedefe yönelik tedaviler ışığında bu alanda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu ilerlemeler, teknolojik

gelişmelerle birleşince kanser tedavisi için yeni immünoterapilerin geliştirilmesini sağlamıştır. Lenfoid malignitelerde, bu yeni immünoterapilerden; immün kontrol noktası inhibitörleri, T hücresi angajman antikorumları ve CAR-T hücreleri oldukça umut vericidir. İmmün kontrol noktası inhibitörleri, T hücre inhibitör sinyallerini bloke eden monoklonal antikorumlardır. Bu terapiler benzersizdir. Çünkü bu antikorumlar doğrudan tümör hücreleri yerine bağışıklık sistemini hedef alıp bağışıklık sisteminin etkisini durduran fren mekanizmalarını bozarlar. Bu, aynı immün kontrol noktası inhibitörlerin çeşitli kanserlerin tedavisinde neden kullanılabileceğini de açıklar. Bugüne kadar immün kontrol noktası inhibitörlerine yönelik altı ilaç FDA tarafından kanser tedavisi için onaylanmıştır. Bunlardan ilki 2011 yılında melanom tedavisinde kullanılan bir anti-CTLA-4 Ab “ipilimumab (Yervoy)” isimli ilaçtır. Diğerleri ise iki anti-PD1 (nivolumab, pembrolizumab) ve üç anti-PD-L1 (atezolizumab, avelumab ve durvalumab) antikorumlarıdır (Manson ve Houot, 2018). Ek olarak, B lenfosit yüzey antijenlerinden CD20’ye karşı geliştirilen rituksimab isimli monoklonal antikorum (FDA onay tarihi: 19 Nisan 2011), DBBHL tedavisine eklenmesiyle tedaviye yanıt ve sağkalımlarda başarı sağlanmıştır. 18 Ekim 2017’de FDA tarafından DBBHL tedavisi için CAR-T immünoterapilerinden axicabtagene ciloleucel (Yescarta) onaylanarak tedavideki yerini almıştır (Manson ve Houot, 2018) (<http://www.fda.gov>, Erişim Tarihi: 19 Mayıs 2019).

Son olarak James P. Allison “CTLA-4”, Tasuku Honjo ise “PD-1/PD-L1” inhıbe edici immün kontrol noktaları üzerine yaptıkları çalışmalardan ötürü 2018 Nobel Tıp ve Fizyoloji ödölünü almışlardır.

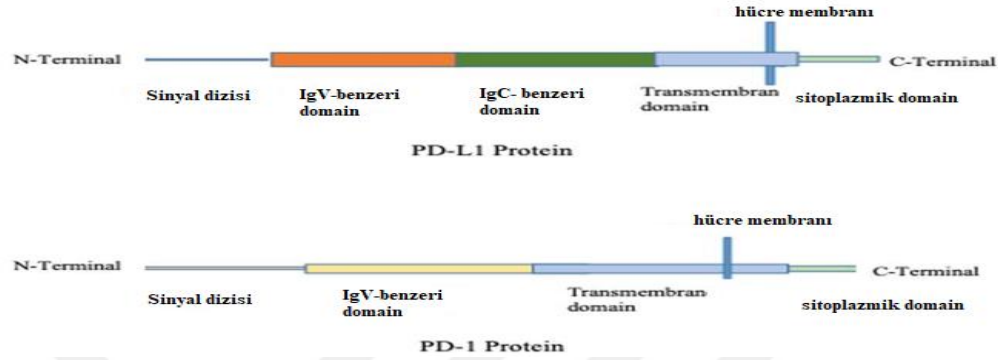
2.3.1. Programlanmış Hücre Ölümü-1 (PD-1)/Programlanmış Hücre Ölüm Ligandı 1-2 (PD-L1-2) Yolağı

PD-1 (Programlanmış Hücre Ölümü-1, PDCD, CD279; Gen ID: 5133, MIM numarası: 600244) kromozom 2q37.3 üzerindeki bir gen tarafından kodlanır. B7-CD28 süper ailesine ait olan bu gen, 9028 baz çifti (bc) uzunluğundadır ve beş ekzondan oluşur. Bu genin ürünü 288 amino asitlik, 31.647 Da moleküler ağırlığına sahip immünoglobulin süper ailesinden tip I transmembran proteindir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Erişim Tarihi: 23 Nisan 2021). Bu protein ekstraselüler bir N-terminal IgV (variable) domaininden, transmembran kısım ve sitoplazmik intraselüler domaininden meydana

gelmektedir. Sitoplazmik kısmında iki adet fosforillenebilen yapısal tirozin motifi vardır. Bunlar; ITIM (immünreseptör tirozin bazlı inhibitör motif) ve ITSM'dir (immünreseptör tirozin bazlı anahtar motif). PD-L1'in inhibe edici kontrol noktası molekülü PD-1'e bağlanması, bu motifler aracılığıyla Scr homolog fosfataz-1 (SHP-1) ve SHP-2 üzerinden T hücre reseptör sinyallerini bloke ederek inhibitör bir sinyal iletir. *ITIM* motifindeki mutasyonlar, *PD-1* üzerinde daha etkilidir (Chemnitz ve ark., 2004, Song ve ark., 2019). *PD-1*, aktive CD4⁺T hücreler, CD8⁺T hücreler, B hücreler, NK ve monositler üzerinden eksprese olur. PD-1, antijenle karşılaşan T hücrelerin oluşturacağı yanıtları düzenleyen bir dizi koreseptörden biridir. İlk kez 1992 yılında Ishida ve arkadaşları apoptotik T hücresi hibridomalarından izole edip tanımlanmıştır (Ishida ve ark., 1992). 1999 yılında yine aynı araştırmacı grubundan ifade edilen bir diğer durum ise *PD-1*'in nakavt edildiği farelerin, otoimmün hastalıklara yatkınlık gösterdiği, dolayısıyla *PD-1* geninin immün yanıtlar için negatif bir regülatör olduğudur (Nishimura ve ark., 2001).

PD-1'in insanda beş isoformu ve iki ligandı vardır. Birincisi: Kromozom 9p24.1 üzerindeki *PD-L1* geni (B7-H1, CD274, Gen ID: 29126, MIM numarası: 605402), 290 amino asitlik, 33 kDa ağırlığında tip I transmembran proteini kodlar. *PD-L1*, hematopoetik, endotelial ve epitelyal birçok dokuda eksprese edilir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Erişim Tarihi: 23 Nisan 2020). İkincisi: Kromozom 9p24.1 üzerindeki *PD-L2* genidir (B7-DC, CD273, Gen ID: 80380, MIM numarası: 605723) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Erişim Tarihi: 23 Nisan 2020). *PD-L2* esas olarak dendritik hücreler ve makrofajlar tarafından eksprese edilirken daha sık görülen *PD-L1*, *PD-L2*'ye göre T ve B lenfositler, makrofajlar, dentritik hücreler, kemik iliği kökenli mast hücreleri, kalp, iskelet kası, plasenta ve akciğer, timus, dalak, böbrek, karaciğer, keratinositler, pankreas adacık hücreleri, tümör hücreleri ve tümörü infiltre eden bağışıklık hücrelerinde de bulunur (Freeman ve ark., 2000, Zheng ve ark., 2019a). PD-L1 proteini yapısal olarak sitoplazmik alan, transmembran alan ve IgV (variable) ve IgC (constant) iki ekstraselüler alan içerir. PD-L1 ile benzer yapısal özelliği olan PD-L2, bir N-terminal IgV alanı ve bir membran-proksimal IgC domaininden oluşur (Şekil

2.6.). PD-1'in PD-L1'e bağlanma afinitesi ~3 kat daha fazladır (Akinleye ve Rasool, 2019).



Şekil 2.6. PD-1 ve PD-L1 Protein Yapıları

IL-2 üretiminin inhibisyonu gibi PD-1 tarafından indüklenebilen inhibitör etkiler, sitoplazmik sinyalizasyon motiflerinden ITIM tirozinin, fenilalanin (Y223F) ile değiştirilmesiyle korunur. Ancak ITSM bölgesinin tirozin aminoasiti, fenilalanin (Y248F) ile değiştirildiğinde bu inhibe edici etki kaybolur. B hücrelerinde ITSM tirozinin SHP-2 ile reaksiyona girmesi, kalsiyum iyonlarının B hücresi reseptör aracılı mobilizasyonunu inhibe eder ve IgB, SyK, PLC- γ 2, ERK1 ve ERK2'nin fosforilasyonunu engeller. T hücresi aktivitesi sırasında PD-1, TCR yakınındaki c-SMAC'da birikir ve ardından SHP-2, PD-1'in sitozolik alanına alınır. Böylece proksimal TCR sinyal moleküllerinin defosforilasyonuna yol açar. PD-1, TCR sinyallemesini bazı sinyal yollarını kullanarak yapar (Şekil 2.7.) (Salmaninejad ve ark., 2019).

i) Fosfoinositid 3 kinaz/Akt (PI3/AKT) yolağı üzerinden

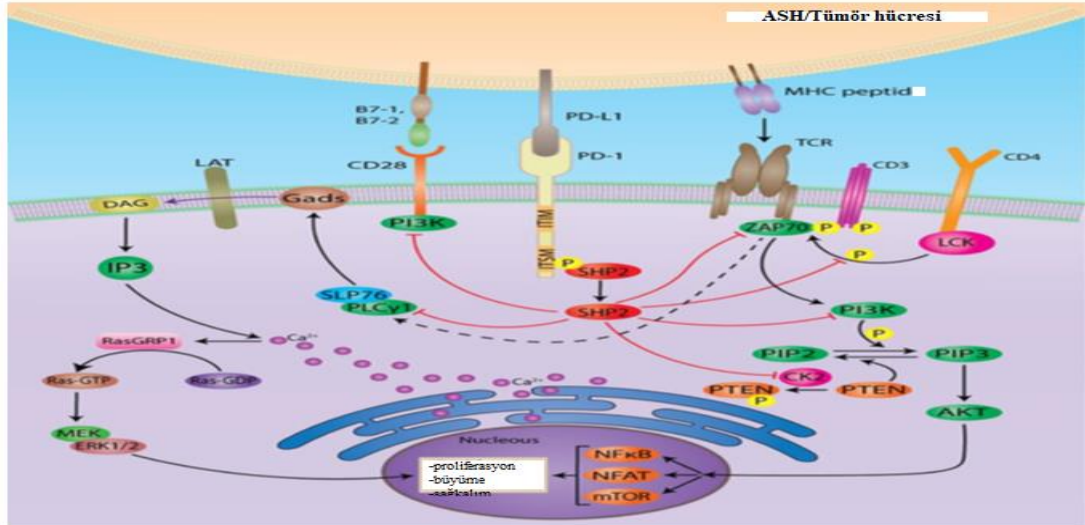
TCR sinyalizasyonunun ana mekanizmalarından biri PI3/AKT yolağıdır. *PI3K* inhibisyonu olan PD-1 bu yolağı bloke eder. İlâveten normalde ZAP70, CD3 ζ ve PKC θ gibi önemli moleküller, lökosit-spesifik tirozin kinaz (LCK) tarafından fosforile edilmesiyle T hücrelerinin aktivasyonu devam eder. Ancak PD-1'in LCK fonksiyonunu inhibe etmesiyle TCR sinyalizasyonu durur. Diğer taraftan CTLA-4 molekülü de PI3K/AKT sinyal yolunu hedefler ama bu yoldaki hedef molekülü, PD-1'den farklıdır. CTLA-4, SHP2 ve protein fosfataz 2A'yı sitozolik alanına dahil ederek AKT'nin doğrudan aktivitesini inhibe eder (Şekil 2.7.) (Salmaninejad ve ark., 2019).

ii) CK2 molekülü ile fosfataz ve tensin homolog (PTEN) üzerinden

PD-1'in TCR sinyalizasyonunu bloke ettiği diğer bir mekanizma, CK2 üzerinden PTEN molekülünün fosforilasyonudur. PTEN'in sitoplazmik alanının CK2 tarafından fosforilasyonu bu molekülün stabilitesine yol açar ve fosfataz aktivitesini inhibe eder. PTEN'in serin-treonin fosfataz olarak işlevi, PI3K işlevinin tersidir ve PIP3'ü fosfataz aktivitesi yoluyla PIP3'ü, inaktif PIP2'ye dönüştürür. PIP3, AKT fosforilasyonuna neden olur ve nükleusa sinyaller gönderir. PD-1, CK2'nin fonksiyonunu inhibe eder. Böylece defosforillenmiş ve aktive edilmiş PTEN, fosfataz aktivitesini sürdürür ve TCR aktivasyon sinyallerini inhibe eder (Şekil 2.7.) (Salmaninejad ve ark., 2019).

iii) PLC γ 1'in inhibisyonu ile Ras/MEK/ERK yolağını üzerinden

Bir diğer mekanizma ise Ras/MEK/ERK sinyal yolağıdır. Bu yolak, PI2P'yi, DAG ve IP3 molekülüne hidrolize eden PLC γ 1 aktivitesiyle başlar. DAG ve kalsiyum, Ras/MEK/ERK sinyal yolundaki kilit nokta olan RasGRP1'i aktive eder. PD-1, PLC γ 1 aktivitesini inhibe ettiği için bu sinyal yolağı da bloke olur (Şekil 2.7.) (Salmaninejad ve ark., 2019).



Şekil 2.7. PD-1/PD-L1 Sinyal Yolağı

Bu iki ligand sadece antijen sunan hücrelerde değil tümör hücrelerinde de bulunabilmektedir. PD-L1'in sentezi özellikle IFN- γ ile PD-L2'nin sentezi IL-4 ile uyarılır. PD-1, PD-L1 veya PD-L2'ye bağlanarak T hücre proliferasyonunu, IFN- γ , TNF α ve IL-2 üretimini inhibe eder. Böylece T hücre sağkalımını azaltır. Tümör hücrelerindeki PD-L1'in aktive T hücrelerdeki PD-1'e bağlanması sonucu tümör hücreleri farklı sinyal yollarını kullanarak immün sistemden kaçabilmektedir (Şekil 2.7.) (Freeman ve ark., 2000).

PD-L1'in, meme kanseri (Ghebeh ve ark., 2006), renal karsinom (Thompson ve ark., 2007), pankreatik kanser (Nomi ve ark., 2007), yumurtalık kanseri (Hamanishi ve ark., 2007), mide kanseri (Wu ve ark., 2006), özofageal kanser (Ohigashi ve ark., 2005) ve hepatosellüler karsinom (HCC) hücreleri (Gao ve ark., 2009) tarafından eksprese edildiği ispatlanmıştır.

Ayrıca malign hematolojik hastalıklarda rol oynayan bazı mikroRNA'ların (miRNA) (miR-155, miR-34, miR-33a, miR-21, miR-873, miR-146a) ve uzun kodlanmayan RNA'ların (lncRNA) (AFAP1-AS1, NKX2-1-AS1, UCA1, SNHG20, MALAT1) PD-1/PD-L1 yolağıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Han ve ark., 2020). Örneğin Zheng ve arkadaşları, miR155'in immün hücre/B lenfoma hücre kültüründe CD8⁺T hücrelerinde Fas aracılı apoptozu indükleyebileceğini ve anti-PD-1 ve anti-PD-L1 antikorlarını hedefleyebileceğini savunmaktadır (Zheng ve ark., 2019b). Yapılan bir başka çalışmada miR-155'in, lenfoma hücrelerinde *PD-L1* ekspresyonunu arttırdığı; PD-1/PD-L1 etkileşimiyle, AKT ve ERK'i fosforile ederek CD8⁺T hücre fonksiyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir (Boussiotis, 2016). KHDAC üzerine miR-34 ile yapılan bir çalışmada ise miR-34b veya miR34c'nin aşırı ekspresyonunun, *PD-L1* ekspresyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir (Cortez ve ark., 2016).

Kanser tedavisinde uzun süredir ilaç hedefi olarak bilinen lncRNA MALAT1'in ve *PD-L1*'in DBBHL dokularında daha yüksek oranda eksprese edildiği buna karşılık miR-195 ekspresyon seviyesinin daha düşük olduğu tespit edilmiştir. miR-195 ile negatif ilişkili MALAT1'in, miR-195 üzerinden DBBHL tümörogenesizi düzenleyebileceği düşünülmektedir (Wang ve ark., 2019). Tablo 2.5'te bazı miRNA ve lncRNA'ların

çeşitli kanser tipleri üzerindeki fonksiyon ve mekanizması gösterilmiştir (Han ve ark., 2020).

Tablo 2.5. miRNA ve LncRNA'ların PD-1/PD-L1 Yolağına Etkileri

miRNA	Fonksiyon	Kanser tipi	Mekanizma
miR-155	Bağışıklık sisteminin aktivasyonu	lenfoma	PD-L1'in indüklenmesi
miR-34	tümöral yanıtının indüklenmesi	KHDAK	PD-L1'in baskılanması
miR-33a	bağışıklık belirteçlerinin ifadesinin düzenlenmesi	akciğer adenokarsinomu	PD-1/PD-L1'in baskılanması
miR-21	bağışıklık tepkisinin düzenlenmesi	mide kanseri	PD-1'in baskılanması
miR-146a	bağışıklık hücrelerinin düzenlenmesi	melanoma	PD-L1'in indüklenmesi
miR-873	bağışıklık belirteçlerinin ifadesinin düzenlenmesi	meme kanseri	PD-L1'in baskılanması
LncRNA			
AFAP1-AS1	bağışıklık tepkisinin düzenlenmesi	nazofarenks karsinomu	PD-L1'in indüklenmesi
NKX2-1-AS1	bağışıklık belirteçlerinin ifadesinin düzenlenmesi	akciğer kanseri	PD-L1'in baskılanması
UCA1	bağışıklık belirteçlerinin ifadesinin düzenlenmesi	mesane kanseri	PD-L1'in indüklenmesi
SNHG20	bağışıklık belirteçlerinin ifadesinin düzenlenmesi	özofagus skuamöz hücreli karsinom	PD-L1'in indüklenmesi
MALAT1	bağışıklık belirteçlerinin ifadesinin düzenlenmesi	DBBHL	PD-L1'in baskılanması

PD-L1 ekspresyonu, DBBHL'de neoplastik B hücrelerinin yanı sıra tümör yatağında bulunan makrofajlar tarafından da yapılır. *PD-L1* ekspresyonu DBBHL vakalarının yaklaşık %20-30'unda bildirilmiştir. Ancak bu rakam, uygulanan eşik değerine (%5-%30 arasında değişir) ve analiz edilen hücre oranına (tümör hücreleri/tümör mikroçevresindeki diğer hücreler) bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. DBBHL'de *PD-L1* seviyelerini araştıran çalışmaların genelinde, GCB dışı DBBHL alt tiplerinde daha yüksek ekspresyon oranları tespit edilmiştir. Bunun tersine, çoğu NHL'de *PD-*

L2'nin ekspresyonu saptanmamıştır (Andorsky ve ark., 2011b). Ancak bir araştırma, alt tipler arasında önemli bir fark olmaksızın DBBHL hücrelerinde düşük *PD-L2* ekspresyonu saptamıştır. DBBHL tümör hücrelerinin düşük seviyede yüzey *PD-1* eksprese ettiği ve bazen hem *PD-1* hem de *PD-L1*'i birlikte eksprese ettiği bulunmuştur (Laurent ve ark., 2015).

Kiyasu ve ekibi, *PD-1* ve *PD-L1/ PD-L2* ekspresyonu ile DBBHL'nin prognozunu konu edinen 1200 DBBHL vakasını incelemiştir. Çalışmada *PD-L1* ekspresyonu görülen hastalarda, *PD-L1* ekspresyonu görülmeyenlere göre daha düşük genel sağkalım oranı belirlenmiştir. Dahası *PD-L1* eksprese eden tümör hücreleri ve düşük seviyede *PD-1* pozitif TIL'e sahip vakaların, *PD-L1* eksprese etmeyen tümör hücreleri ve yüksek seviyede *PD-1* pozitif TIL'e sahip vakalardan daha kötü prognoz sergilemiştir (Kiyasu ve ark., 2015a).

Öte yandan başka çalışmalar ise daha yüksek seviyede *PD-1* pozitif TIL'e sahip DBBHL hastalarının daha uzun sağkalım sergilediğini savunmuşlardır (Ahearne ve ark., 2014, Kwon ve ark., 2016, Muenst ve ark., 2010).

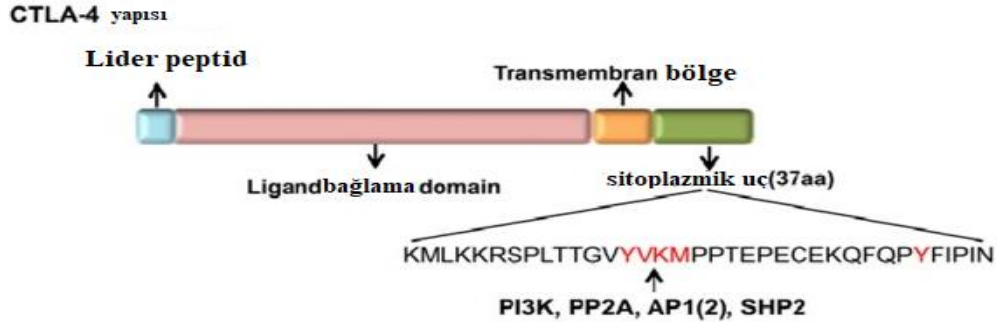
DBBHL'nin moleküler alt tipleri ve *PD-L1* ekspresyon çalışmalarının tamamına yakını, GCB dışı DBBHL'nin diğer alt tiplere göre daha kötü prognoza sahip olduğu belirtilmiştir (Andorsky ve ark., 2011b, Kiyasu ve ark., 2015a, Laurent ve ark., 2015).

Çin, İsveç ve Amerika'dan alınan DBBHL örnekleriyle yapılan bir kohort çalışmasında *PD-L1/PD-L2* lokusunu etkileyen genetik değişiklikler araştırılmıştır. Bu sitogenetik değişikliklerin *PD-L2* ile ilgili olmayıp artan *PD-L1* ekspresyonu ile ilişkili olduğu ve vakaların %12'sinde kazanım, %3'ünde amplifikasyon ve %4'ünde translokasyonlardan etkilendiği saptanmıştır. *PD-L1/PD-L2* lokusundaki genetik değişikliklerin esasen GCB dışı DBBHL ile ilişkili olduğu ve ek genetik değişiklikler olmadan da *PD-L1* ekspresyonu gözlenebileceği düşünülmektedir (Georgiou ve ark., 2016).

Sonuç olarak bu araştırmaların bütünü *PD-1* ve *PD-L1* ekspresyonunun, DBBHL'de prognostik bir değere sahip olduğu paydasında buluşmaktadır.

2.3.2. Sitotoksik T Lenfosit İlişkili Protein-4 (CTLA-4)/ CD80 Yolağı

1987 yılında Pierre Golstein ve arkadaşları tarafından tanımlanan *CTLA-4* (Sitotoksik T Lenfosit İlişkili Antijen 4, CD152); Gen ID: 1493, MIM numarası: 123890) kromozom 2q33.2 üzerindeki bir gen tarafından kodlanır (Brunet ve ark., 1987) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Erişim Tarihi: 29 Ekim 2020). İmmünoglobulin süper ailesinin üyesi olan CTLA-4 önemli bir inhibitör bağışıklık kontrol noktası molekülüdür. Bu gen 6173 bç uzunluğunda olup dört ekzon ve bir lider peptid dizisinden oluşur. Ekstraselüler alanı ekzon 1 ve 2, hidrofobik transmembran alanı ekzon 3, sitoplazmik alanı ekzon 4 kodlar. CTLA-4'ün sitoplazmik kuyruğu iki tirozin bazlı motif içerir. YVKM motifi, PI3K, PP2A, SHP2 ve klatrin adaptör proteini (AP-1 ve AP-2) için bağlanma alanları oluşturur (Şekil 2.8.) (Zhao ve ark., 2018). CTLA-4 prekürsör proteini, 223 aminositli, 24.656 Da moleküler ağırlığında glikoprotein yapıda tip I transmembran proteindir. T hücrelerin çoğalması ve farklılaşması için gerekli moleküllerden biri olan *CTLA-4*, naif T hücrelerinin yüzeyinde bulunmayıp aktif T ve B lenfositler, plasental fibroblastlar, iskelet kası hücreleri ve monositlerde ifade edilmektedir (Alatrash ve ark., 2016) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Erişim Tarihi: 29 Ekim 2020).



Şekil 2.8. CTLA-4 Protein Yapısı

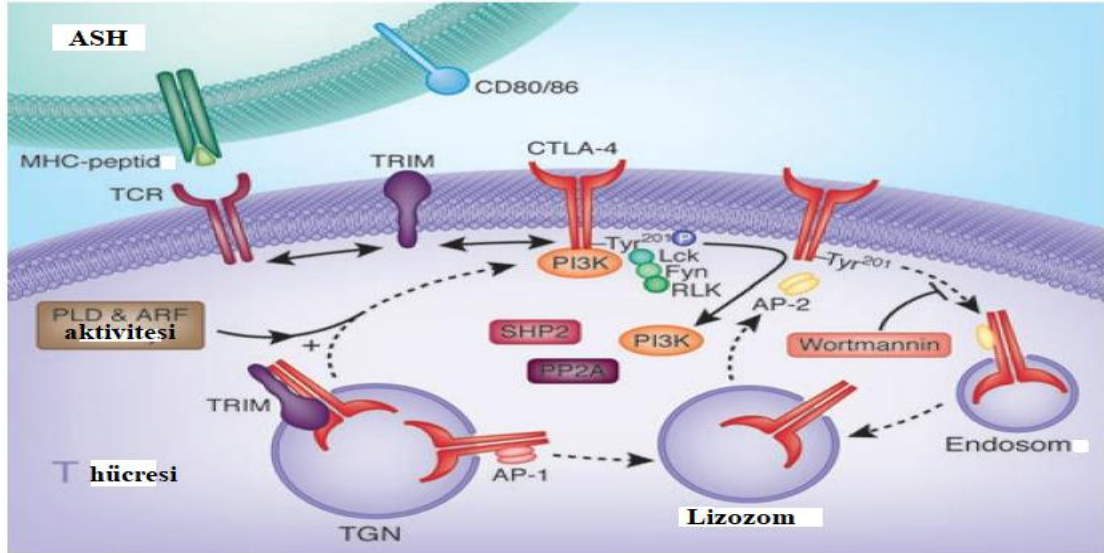
Bu protein, B7 (dendritik hücrelerde bulunan periferel hücre zarı proteini) molekülüne bağlanarak T hücre aktivasyonunu azaltan bir kostimulatördür. Alternatif transkripsiyonel sprints sonucu insanda iki ana isoform vardır: 4 ekzon içeren ve tam uzunluktaki (Full-length) membran bağlı *flCTLA-4* isoformu, bir disülfid bağıyla birbirine bağı olan bir homodimer işlevi görür. Çözünebilir (solubl) *CTLA-4* (*sCTLA-4*)

isoformu ise monomer olarak fonksiyon görür ve bağışıklık tepkisini dengede tutmak için bu süreci antagonize eder. Hem *f*CTLA-4 hem de *s*CTLA-4 regülatör T hücre fonksiyonunda görev alır (Teft ve ark., 2006, Zhang ve ark., 2016a).

T hücre yüzey reseptörlerinden CD28'in homoloğu olan CTLA-4'ün CD80 (B7.1) ve CD86 (B7.2) isimli iki ligandı tanımlanmıştır. Kromozom 3q13.33 bandında bulunan, 8 ekzonlu *CD80* (Gen ID: 941, MIM numarası: 112203), CD28 veya CTLA-4'ün bağlanmasıyla aktive edilen bir membran reseptörüdür. B hücreleri, monositler ve dendritik hücreler gibi antijen sunan hücreler dahil olmak üzere çeşitli bağışıklık hücrelerinin yüzeyinde bulunan *CD80*, aynı kromozom bandında (3q13.33) bulunan *CD86* (Gen ID: 942, MIM numarası: 601020) ile hem adaptif hem de doğuştan gelen bağışıklık sisteminin aktivasyonunda oldukça önemli bir rol oynar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Erişim Tarihi: 29 Ekim 2020). Bu aktivasyon, sitokin üretimini ve hücre proliferasyonunu artırabilen ve apoptozu engelleyen CD28 ile etkileşimi neticesinde gerçekleşir (Brunet ve ark., 1987, Runte ve ark., 2019). CD28 ile CD80 etkileşimi ayrıca dendritik hücreleri daha da uyararak sitokin üretimini, özellikle de proinflamatuvar bir molekül olan IL-6'yı artırır. Bunun yanı sıra nötrofillerin bu etkileşimle makrofajları aktive edebildiği düşünülmektedir (Orabona ve ark., 2004). Aktive edilmiş B hücrelerindeki CD80 sinyali, enfeksiyon sırasında antikor sekresyonunu düzenleyebilmektedir (Rau ve ark., 2009). CD28 ile uyarıcı etkileşimin aksine CD80, CTLA-4 ile negatif sinyalizasyon yapar. Böylece T hücresi aktivasyonu inhibe ederek immün yanıtı azaltır (Gough ve ark., 2005).

CD86 molekülü 329 amino asitten oluşan 70 kDa'lık bir glikoproteindir. CD86, ekstraselüler bir N-terminal IgV domaininden, transmembran bölge ve CD80'den daha uzun olan sitoplazmik intraselüler domaininden oluşur. Protein düzeyinde CD86, CD80 ile %25 özdeşdir (Mir, 2015, Sharpe ve Freeman, 2002). Dendritik hücreler, Langerhans hücreleri, makrofajlar, B hücreleri ve diğer antijen sunan hücreler tarafından ifade edilen *CD86*'nın CTLA-4 proteinine bağlanması tıpkı CD80 gibi T hücresi aktivasyonunu negatif olarak düzenler ve bağışıklık tepkisini azaltır. Alternatif splayı, farklı isoformları kodlayan iki transkript varyantı ile sonuçlanır (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Erişim Tarihi: 10 Kasım 2020).

CTLA-4 yüzey ifadesinin regülasyonu ve internalizasyonunu kontrol eden tüm faktörler açıkça anlaşılmasa da genel aksiyon mekanizması Şekil 2.9.'daki gibi kabul edilir (Rudd ve ark., 2009). T hücrelerinde ve NK hücrelerde eksprese edilen T hücre reseptör-interakt molekülü (TRIM), CTLA-4 içeren veziküllerin oluşumunu ve hücre yüzeyine taşınmasını sağlayan trans-Golgi ağındaki (TGN) tip III transmembran adaptör molekülüdür. Sentezlenen CTLA-4, 30 kDa ağırlığındaki bu moleküle bağlanır. Sonraki basamaklarda CTLA-4'e ARF-1 (Adenozin difosfat ribozilasyon faktör), GTPaz ve PLD (Fosfolipaz D) gibi moleküller yardım eder. CTLA-4 GYV201VKM motifine AP-1'in bağlanmasıyla, TNG'den lizozomal kompartmana geçiş yapar. Hücre yüzeyinde CTLA-4, Y201VKM alanından Lck, Fyn ve Rlk kinazları ile fosforile hale gelir. Bu sayede PI3K ve diğer proteinlerle birleşir. Bu fosforilasyonla internalizasyonu gecikir. Defosforilasyon olayında ise AP-2, GYV201VKM motifine bağlanır. Böylece endozomlara ve lizozomlara hızlı internalizasyon gerçekleşir. Bu süreç, Wortmannin duyarlı lipid kinazları içerir ama PI3K'yı kapsamaz (Rudd ve ark., 2009).



Şekil 2.9. CTLA-4 Yüzey Ekspresyonu ve İnternalizasyonu

CTLA-4 ve PD-1 yolaklarının, bağışıklık yanıtının farklı aşamalarında çalıştığı varsayılmaktadır. CTLA-4, tipik olarak lenf düğümlerinde naif T hücre aktivasyonunun ilk aşamasında özellikle lenfoid dokularda potansiyel olarak otoreaktif T hücrelerini durdurduğundan bağışıklık kontrol noktası inhibitörlerinin "lideri" olarak kabul edilir.

CTLA-4 ligasyonu, erken T hücre aktivasyonunu antagonize ederek IL-2 üretiminin azalmasına, hücre döngüsünün durdurulmasına, siklin ekspresyonunun azalmasına ve TCR sinyalizasyonun modülasyonuna yol açar (Buchbinder ve Desai, 2016, Fife ve Bluestone, 2008). PD-1 yolağı ise bağışıklık yanıtının daha sonraki aşamalarında, özellikle periferik dokularda önceden aktive edilmiş T hücrelerini düzenler. Sonuçta B7 reseptör aile üyesi olan her iki reseptörün ifade düzeyleri TCR sinyalinin gücü ve/veya süresinden etkilenir (Buchbinder ve Desai, 2016).

PD-1, PD-L1, CTLA-4 ve CD80 moleküllerini hedef alan hem monoterapi hem de kombinasyon denemelerini içeren gelişmeler Tablo 2.6'da listelenmiştir (Twomey ve Zhang, 2021, Vaddepally ve ark., 2020) (<http://www.fda.gov>, Erişim Tarihi: 1 Nisan 2021, <http://clinicaltrials.gov>, Erişim Tarihi: 1 Nisan 2021).

Tablo 2.6. PD-1, PD-L1, CTLA-4 ve CD80 Moleküllerinin Kemoterapik Ajanları

Hedef	İsim/Onay Tarihi	Durumu
PD-1	Pembrolizumab (04.09.2014)	Metastatik melanom, KHDAK, metastatik skuamöz hücreli baş ve boyun karsinomu, mikrosatellit dengesizliği (MSI-H), mediastinal büyük B hücreli lenfoma, hepatoselüler karsinom, Merkel hücreli karsinom, renal hücreli karsinom, metastatik kutanöz skuamöz hücreli karsinom Faz III: mide /gastroözofageal bağlantılı kanser, akciğer kanseri ve ürotelyal kanser Faz II: kolorektal kanser, glioblastom, Merkel hücreli karsinom, pankreas kanseri ve hematolojik maligniteler
PD-1	Nivolumab (22.12.2014)	Metastatik melanom, KHDAK, renal karsinoma, klasik Hodgkin lenfoma, metastatik skuamöz hücreli baş ve boyun karsinomu, ürotelyal karsinoma, HCC, kolorektal kanser Faz III: mide kanseri, glioblastom, baş ve boyun kanseri, böbrek kanseri ve akciğer kanseri Faz II: rahim ağzı kanseri, kolorektal kanser, pankreas kanseri ve hematolojik maligniteler
PD-1	Pidilizumab	Faz II: böbrek kanseri ve hematolojik maligniteler (DBBHL)
PD-1	Cemiplimab (28.09.2018)	Kutanöz skuamöz hücreli karsinoma

PD-L1	Durvalumab (17.02.2016)	Metastatik ürotelyal karsinoma, KHDAK Faz III: baş ve boyun kanseri ve akciğer kanseri Faz II: kolorektal kanser ve glioblastoma
PD-L1	Atezolimumab (18.05.2016)	KHDAK, küçük hücreli akciğer kanseri, metastatik ürotelyal karsinoma Faz III: mesane kanseri ve akciğer kanseri, ürotelyal kanser Faz II: böbrek kanseri
PD-L1	Avelumab (18.11.2015)	Merkel hücreli karsinom, ürotelyal kanser, renal kanser
CTLA-4	Ipilimumab (28.03.2011)	Metastatik melanom Faz III: akciğer kanseri, kolorektal kanser, mide kanseri ve prostat kanseri Faz II: rahim ağzı kanseri, kolorektal kanser, mide kanseri, pankreas kanseri, yumurtalık kanseri ve ürotelyal kanser
CTLA-4	Tremelimumab (15.04.2015)	Malign mezotelyoma Faz II: Akciğer kanseri
CD80	Galiximab (24.09.2009)	Relaps/refrakter Hodgkin lenfoma, Non-Hodgkin lenfoma (Evre II/III/IV)

2.3.3. PD-1/PD-L1 ve CTLA-4/CD80 Gen Polimorfizmleri

Gen polimorfizmleri, birey için olumsuz bir etkisi olmayan ve popülasyon genelinde oldukça yüksek sıklıkta meydana gelen DNA dizisindeki doğal varyasyonlardır. Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP), en yaygın genetik varyasyon türüdür. Ortalama olarak her 300 nükleotitte bir meydana gelirler ve bu da insan genomunda yaklaşık 10 milyon SNP olduğu anlamına gelmektedir. SNP'ler, hastalıklarla ilişkili genlerin tanımlanmasına yardımcı olan biyolojik belirteçler olarak da düşünülebilir. SNP'ler, bir gen içinde veya bir genin yakınındaki düzenleyici bir bölgede meydana geldiğinde gen fonksiyonunu değiştirerek hastalıkta doğrudan bir rol oynayabilirler. Çoğu SNP zararsızdır ve sağlık veya gelişim üzerinde herhangi bir etkisi yoktur. Öte yandan bazı SNP'lerin, ilaç tepkisinde, toksinler gibi çevresel faktörlere karşı savunmada, belirli hastalıklara yakalanma riskinin artmasında ve kanser gibi karmaşık hastalıklarda rolü olduğu bildirilmiştir (Salmaninejad ve ark., 2018).

PD-1'in immünosupresif ve anti-tümör fonksiyonları, bazı malignitelerde dikkat çekici bir genetik risk adayı varsayılmasına neden olmuştur. Araştırmalar, *PD-1*

polimorfizmlerinin kolon, mide, yemek borusu, meme ve karaciğer kanserleri dahil olmak üzere çok sayıda kanser türüyle ilişkili olduğunu doğrulamıştır (Hashemi ve ark., 2019, Salmaninejad ve ark., 2018). Farklı kanserlerde en güncel ve sık görülen SNP'leri; *PD-1.1* (rs36084323), *PD-1.3* (rs11568821), *PD-1.5* (rs2227981), *PD-1.9* (rs2227982) ve *PD-1* rs7421861 şeklinde sıralayabiliriz.

PD-1.1 (rs36084323) polimorfizmi, promotor bölgesinde (-606A/G) bulunur ve bu bölgedeki transkripsiyon faktörü bağlama bölgeleri ve motifleri ile ilgili olabileceği için genin transkripsiyonunu ve aktivasyonunu da etkileyebilmektedir. Çin'de yapılan bir çalışmada G/G genotipi taşıyan RA hastalarında *PD-1* ekspresyonunu daha yüksek bulunmuştur (Liu ve ark., 2014). Meme kanseri üzerine olan bir araştırmada G/G genotipi sıklığının, sağlıklı bireylere göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Hua ve ark., 2011). Bir diğer araştırmada skuamöz hücreli karsinomlarda G/G genotipinin kötü prognoz ile ilişkili olduğu gözlenmiştir (Sasaki ve ark., 2014).

PD-1.3 (rs11568821) polimorfizmi intron 4'te (+7146A/G) bulunur. Bu SNP, *RUNX1* transkripsiyon faktörü için intronik enhansır benzeri yapıların bağlanma bölgelerinde gerçekleşerek transkripsiyonel düzenlemeyi etkilemektedir. Dikkat çeken ilginç bir durum da A allelinin varlığının, *RUNX1*'in bağlanma bölgesini bozduğu için *PD-1*'in inhibitör etkisini etkilemesi ve daha fazla lenfosit aktivitesine yol açmasıdır. Dolayısıyla bu durum, immün yanıtların anti-tümör kapasitesini artırabilir (Dong ve ark., 2016). 2012 yılında Türkiye'de, 236 HCC hastasında, *PD-1.3* (rs11568821) polimorfizmi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamışken aynı SNP'nin İran popülasyonunda meme kanseri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Bayram ve ark., 2012, Haghsheenas ve ark., 2011).

Genin ekzon 5'inde (+7785 C/T) bulunan *PD-1.5* (rs2227981) polimorfizmi, proteinin nihai amino asit yapısını değiştirmeyen sessiz bir değişikliktir. PD-1 molekülü üzerinde doğrudan veya dolaylı etkili etkisi olabilir. Polimorfizm çalışmaları, bu lokusun Çin'de KHDAK (Yin ve ark., 2014), Çin ve İsveç'te serviks kanseri (Ivansson ve ark., 2010, Li ve ark., 2016), Çin'de meme kanseri (Hua ve ark., 2011), İran'da kolon

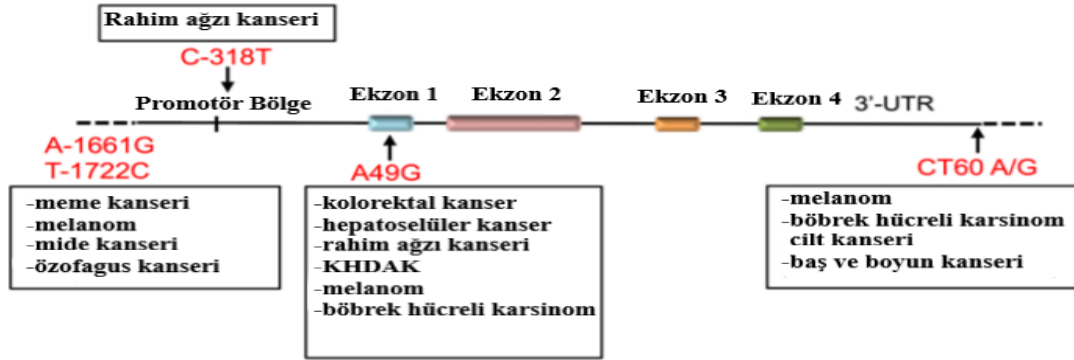
kanseri (Mojtahedi ve ark., 2012b) gibi çeşitli kanser türleri ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur.

PD-1.9 (rs2227982) polimorfizmi ekzon 5'te (+7625 G/A) bulunur ve bu nedenle gen transkriptinin splayzında bir rolü olduğu varsayılmaktadır. Bu fonksiyonel SNP, protein sentezi sırasında valin amino asitinin, alanin amino asidine dönüşmesine neden olur. Böylece PD-1'in muhtemel yapısını değiştirir. Zhou ve ekibi, *PD-1.9* (C/T) ile mide ve sindirim sistemi kanserleriyle önemli bir ilişki olduğunu düşünmektedir (Zhou ve ark., 2016).

PD-L1 genindeki bazı SNP'ler, çeşitli kanserlerin gelişme riskini ve hastalığın seyrini etkilemektedir. En sık görülen SNP'lerden biri *PD-L1* geninin 3'-UTR bölgesinde rs4143815 (C/G)'dir. Wang ve meslektaşları, C/C genotipinin genin 3'-UTR'sindeki miR-570'in aktivitesini ve ekspresyonunu artırarak anti-tümoral yanıtların kısıtlanmasına müdahale ettiğini ve bu sebeple artan mide kanseri riski ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (Wang ve ark., 2013). *PD-L1* (rs4143815) ile kanser duyarlılığının ilişkisini araştırmak için bir dizi vaka kontrol çalışması yapılmış ancak tartışmalı sonuçlar ortaya çıkmıştır. Bazı çalışmalar *PD-L1* (rs4143815) SNP'sinin yumurtalık kanseri riskini artırdığını (Tan ve ark., 2018), mide kanseri riski ile ciddi ilişkisi olduğunu savunurken (Tao ve ark., 2017); diğer araştırmacılar bu SNP ile kolorektal kanserin (Catalano ve ark., 2018) ve KHDAK ile ilişkisinin olmadığını bildirmiştir (Du ve ark., 2017).

Organ nakli üzerine araştırma yürüten bir başka ekip, *PD-L1* (rs4143815) C/C genotipine sahip donörlerden karaciğer nakli yapılan hastalarda geç akut bağışıklık tepkisi ve organ reddi geliştirme riskinin azaldığını, GG genotipli donörlerden yapılan nakillerde geç akut rejeksiyon riskinin daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir (Shi ve ark., 2016). Son olarak İran'da 134 NHL hastasının incelendiği bir araştırmada, *PD-L1* rs2890685 (A/C) SNP'si ile NHL arasında ciddi bir ilişki yakalanırken *PD-L1* rs4143815 SNP'si ile bir bağlantı saptanmamıştır (Hoseini ve ark., 2020).

CTLA-4, 4 ekzonlu oldukça polimorfik bir gendir. Bu gene dair polimorfizmler çeşitli kanser türleri ve otoimmün hastalıklarla ilişkili bulunmuştur. Kanser türlerinde en sık gözlenen *CTLA-4* polimorfizmleri Şekil 2.10'da verilmiştir (Zhao ve ark., 2018). Başlıca polimorfizmlerden birisi, ekzon 1'de +49 pozisyonundaki *CTLA-4* rs231775 (A/G)'dir. *CTLA-4* proteininin lider peptit sekansında bir amino asit değişimine (treonin-alanin) neden olur. *CTLA-4* (rs231775) polimorfizminin incelendiği bir çalışmada, A alleli ve A/A genotip sıklığının, Behçet hastalarında daha fazla olduğu ve A/A genotipli hastaların daha düşük bir s*CTLA-4* protein ekspresyonuna sahip olduğu gösterilmiştir (Abdel Galil ve Hagrass, 2014).



Şekil 2.10. *CTLA-4* Polimorfizmleri

CTLA-4 rs231775 polimorfizmi ile Grave hastalığı ve tip 1 diyabet (Donner ve ark., 1997), Hashimoto tiroiditi'nde (Ramgopal ve ark., 2018) G allelinin yüksek prevelansa sahip olduğu vurgularken A alleli ve A/A homozigotluğu ise Çölyak hastalarında daha fazla bulunmuştur (Djilali-Saiah ve ark., 1998, Mora ve ark., 2003, Torinsson Naluai ve ark., 2000).

Başka bir açıdan *CTLA-4* rs231775 polimorfizminde otoimmün hastalıklara yatkınlık gösteren allellerin, kanser hastalarının iyi prognozunu sağladığı ifade edilmektedir. Örneğin, primer meme kanserine sahip hastalarda G/G homozigotluğu, sağlıklı bireylerdekine göre daha az görülmüştür. Ek olarak tümör boyutu ve lenf nodu tutulumu ile A/A genotipinin pozitif bir korelasyonuna işaret edilmiştir. Bu sebeple meme kanseri hastalarında G/G genotip sıklığında gözlenen azalmanın otoimmün hastalıklarda sıkça bildirilen G/G genotipi artışına aykırı olduğu belirtilmiştir (Ghaderi ve ark., 2004).

Fakat 2011 yılında, KHDAK hastası 338 kişide *CTLA-4* rs231775 polimorfizminin patolojik özellikleri bakımından anlamlı ilişki bulunamamışken A/A genotipine sahip hastaların 9.8 ay, G/G genotipine sahip olanların 12.5 ay, G/A genotipine sahip olanların 12 ay sağkalım süresine sahip olduğu dolayısıyla bu polimorfizminin KHDAK için prognostik bir gösterge olabileceği ifade edilmiştir (Song ve ark., 2011).

Bir başka önemli polimorfizm ise *CTLA-4* promotor bölgesinin -318. pozisyonundaki C-T transisyonuna neden olan rs5742909'dur. Wegener granülomatoz hastalığına sahip 32 bireyde, -318T allelinin -318C allelinden daha yüksek bir promotor aktivitesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Wang ve ark., 2002).

2004 yılında bir grup araştırmacı, *CTLA-4* rs5742909 (-318C/T), rs231775 (+49 A/G) ve 3' UTR bölgesindeki dinükleotid (AT) tekrar polimorfizmlerinin genotipik dağılımlarını 76 kişilik kontrol grubunda ve 44 Non-Hodgkin lenfoma vakasında araştırmışlardır. NHL klinik alt tipleri; 14 küçük lenfositik lenfoma olgusu, 1 MALT, 2 foliküler lenfoma, 7 Manto hücre lenfoması, 13 büyük hücreli lenfoma, 3 Burkitt benzeri lenfoma ve 4 T hücreli lenfoma şeklindedir. *CTLA-4* rs5742909 SNP'sine ilişkin C/C genotipi hem NHL'lerde hem de kontrolde en sık görülen genotip olduğu için anlamlı sonuç teşkil etmemiştir. Ancak *CTLA-4* rs231775 polimorfizminde A/A genotip sıklığı, NHL hastalarında daha fazla gözlenmiştir. NHL hastalarında daha yüksek bir *CTLA-4* (AT)₈ homozigotluğu söz konusuysa genotip dağılımlarında anlamlı bir farklılık rapor edilmemiştir. Sonuç olarak *CTLA-4* rs231775 polimorfizminin NHL'ye yatkınlıkla ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Monne ve ark., 2004).

CTLA-4 (rs3087243) 60G/A ve *CTLA-4* (rs4553808) -1661A/G polimorfizmleri ile ilgili 31 vaka-kontrol çalışmasının sonuçlarını bir araya getiren bir meta-analize göre *CTLA-4* (rs3087243) polimorfizminin artan cilt kanseri riski ile *CTLA-4* (rs4553808) polimorfizminin de özellikle mide kanseri, meme kanseri ile önemli ölçüde ilişkili olduğu vurgulanmıştır (Yan ve ark., 2013).

CTLA-4 molekülünün ligandı olan *CD80* geninde görülen SNP'ler, ekzon 3'te (+452) G/A polimorfizmi, ekzon 4'te (864) A/G polimorfizmi ve intron 4'te (+1018) T/G

polimorfizmidir. *CD80* geninin üçüncü ekzonundaki (rs2228017, 452G/A) SNP, valinin valine değişimini sergileyen sessiz bir değişikliktir. Yapılan bir çalışmada *CD80* gen polimorfizmleri ile sarkoidoz hastalığının anlamlı bir ilişkisi bulunamamıştır (Handa ve ark., 2005). Benzer şekilde iki farklı çalışmada da multipl sklerozlu hastalarda *CD80* gen polimorfizmlerinin belirgin bir fonksiyonel önemi tespit edilememiştir (Teutsch ve ark., 2004, Weinshenker ve ark., 2000). *CD80* gen polimorfizmleri ile RA ve SLE hastalıklarının anlamlı ilişkilerinin olmadığı gözlenmiştir (Matsushita ve ark., 2000b). Fakat *CD80* geninin birinci intronundaki rs2222631 (C/T) SNP'sinin incelendiği SLE hastalarında C allelinin sıklığının epey düşük olduğu bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2016b).

Şiddetli Hashimoto hastalığı olan hastalarda *CD80* (rs1599795) T alleli, hafif şiddetli hastalara göre daha sık görüldüğü için bu SNP'nin, hastalığın duyarlılığı ve şiddeti ile ilişkili olduğu varsayılmaktadır (Watanabe ve ark., 2020). Bir başka çalışmada rs1599795 (A/T) SNP'sinin T alleleline sahip mide kanseri hastalarında miR-361; A allelini taşıyanlarda ise miR-132 ve miR-212'nin, genin 3'-UTR bölgesine bağlanarak *CD80* ekspresyonunun azalmasına neden olabileceği düşünülmektedir. Aynı araştırma ekibine göre *CD80* rs7628626 (C/A) varyantları ise bölgesel lenf nodu metastazı ve agresif tümör ilerlemesi ile yakından ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir (Wu ve ark., 2014). Çin'de yapılan bir çalışmada ise *CD80* rs7628626 SNP'sinin HCC riski ile ilişkisinin olmadığı belirtilmiştir (Yang ve ark., 2019).

Literatür özetinde çeşitli hastalıklarda hem *PD-1*, *PD-L1*, *CTLA-4* ve *CD80* gen varyasyonlarına hem de bu genlerin ekspresyon seviyelerine ilişkin araştırmalara yer verilmiştir. Fakat DBBHL'de bu gen varyasyonların, gen ekspresyonu üzerine etkilerinin birlikte incelendiği bir çalışmaya rastlanamadığı için literatürdeki bu boşluğu tamamlamayı amaçladık.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hasta Seçimi

Çalışmamıza, Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Erişkin Hematoloji Polikliniği'nde Aralık 2019 - Kasım 2020 yılları arasında yeni tanı konulmuş (daha önce tedavi almamış) yirmi Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma olgusu ve rutin biyokimyasal tetkikleri incelenen sağlıklı yirmi olgu olmak üzere toplam 40 olgu alınmıştır.

Hasta grubunda yer alan olguların dosya analizlerinde; yaş, cinsiyet, tedaviye başlamadan önce hastalığın evresi, B semptomu varlığı, R-IPI skoru, kemik iliği tutulumu, *Bulky* hastalık durumu (10 cm üzeri var olarak değerlendirildi), hastalığın alt tipi, ECOG performans durumu, ektranodal tutulu alan sayısı, serum LDH, nötrofil, trombosit, beta-2 mikroglobulin, albümin, hemogloblin ve lenfosit düzeyleri ve hasta numunelerinde yapılan moleküler tetkiklerdeki t(8;14)(q24;q32) (MYC;IGH), t(14;18)(q32;q21) (IGH;MALT1), t(14;18)(q32;q21) (IGH;BCL2) ve t(11;14)(q13;q32) (IGH;CCND1) translokasyonları ele alınmıştır.

Hastaların klinik ve laboratuvar bulgularına, komorbiditelerine, patoloji sonuçlarına, progresyon, takip ve sağkalım durumlarına hastanemizin arşivinde bulunan yazılı veya elektronik hasta dosyalarının taranmasıyla ulaşıldı.

Hastalarının evrelendirilmesinde, tümör FDG-PET-CT kullanılmış ve evreleme güncellenmiş Ann-Arbor evreleme sistemine (Lugano sınıflaması) göre yapılmıştır. Prognostik değerlendirmede ise Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı [National Comprehensive Cancer Network (NCCN)] kılavuzunda rituksimab'ın tedaviye eklenmesinden sonra geliştirilen R-IPI (International Prognostic Index) skorlaması kullanılmıştır. Tedavi sürecindeki ara değerlendirme ve tedavi sonu yanıt değerlendirme tümör FDG-PET-CT ile Uluslararası Çalışma Grubu'nun (IWG) önerilerine göre yapılmıştır (Van Heertum ve ark., 2017).

Çalışmaya alınma ölçütleri:

- a. 18 yaş üstü,
- b. Lenf bezi, kemik iliği vb. doku örneklerinin patolojik incelemesiyle DBBHL tanısı almış,
- c. Daha önce DBBHL tedavisi almamış,
- d. Çalışmaya sözlü ve yazılı onay vermiş,
- e. Tedavi ve poliklinik takipleri düzenli şekilde Erişkin Hematoloji Polikliniği'nde yapılmış hastalar çalışmaya alınmıştır.

Çalışmadan dışlanma ölçütleri:

- a. Daha önce malignite öyküsü ve buna yönelik tedavi öyküsü olan,
- b. Organ nakli ve romatolojik hastalık nedeni ile aldığı tedavilere veya edinsel immün yetmezliğe (AIDS) bağlı immün supresif durumuna sahip DBBHL tanısı almış,
- c. Çalışmaya sözlü ve yazılı onay vermemiş hastalar çalışma dışı bırakılmıştır.

Hastalar 3-6 ay aralıklarla kontrole çağırılarak değerlendirildi. Hastaların genel ve hastalıksız sağkalım süreleri tespit edildi. Hastalıksız sağkalım; tanı tarihinden, hastalık progresyonuna veya herhangi bir nedenden ölüme kadar geçen süre olarak tanımlanmıştır. Genel sağkalım ise; tanı tarihinden, herhangi bir nedenden ölüm veya son vizit tarihine kadar geçen süre olarak tanımlanmıştır.

3.2. Etik Kurul Onayı

Tüm hasta ve kontrol olguları ve/veya aileleri, araştırmanın amacı, özellikleri ve yöntemi konusunda bilgilendirilip sözlü ve yazılı onayları alınmıştır. Çalışma protokolü Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 23.01.2019 tarih ve 70904504/11 sayılı kurul toplantısı gereğince kabul edilmiştir. Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimi tarafından TDK-2019-4792 proje numarası ile kabul edilerek çalışmadaki tüm finansal giderler BAP tarafından karşılanmıştır.

3.3. Numunelerin Alınışı ve Hazırlanışı

Çalışmaya katılan hasta (DBBHL tanısı aldıktan hemen sonra-tedaviye başlamadan önce) ve kontrol olgularından kan örnekleri kolun median kübital bölgesindeki uygun bir damara intravenöz olarak girişten sonra yaklaşık 10 ml olacak şekilde tek kullanımlık 10 ml'lik plastik enjektör ile birer adet 0.5M EDTA içeren K3 EDTA'lı (Venoject) ve heparinli (Venoject) steril tüplere 5'er ml alındı. Alınan kan örnekleri aynı gün Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Doku Tipleme Laboratuvarı ortamına getirildi.

Projemizde çalıştığımız yöntemler, Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalının laboratuvarında ve Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Doku Tipleme Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Ankara menşeli özel bir firma ile çalışmaların teyidi için iş birliği yapıldı.

3.4. DNA Dizileme Çalışmaları

3.4.1. Periferik Kandan Genomik DNA Eldesi

EZ1 DNA Blood 200 µl DNA izolasyon cihazı (QIAGEN) kullanılarak periferik venöz kan örneklerinin bulunduğu EDTA'lı tüplerden 200'er mikrolitre genomik DNA (gDNA) elde edildi.

3.4.2. DNA Örneklerinin Konsantrasyonlarının ve Saflık Derecelerinin Belirlenmesi

Toplam 40 olgudan izole edilen gDNA örneklerinin konsantrasyonlarını ve saflıklarını belirlemek için 260nm/280nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümler yapıldı. Ölçüm için her bir olguya ait DNA örneğinden 1µl alınarak spektrofotometre cihazına (Denovix DS-11) yüklendi ve örneklerle ait konsantrasyon A260, A280, A260/280 değerlerinde ölçüldü.

3.4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PD-1 geninin beşinci ekzonundaki PD-1.5 polimorfizmi için 333 bp'lik (rs2227981, +7785 C/T), *PD-L1* geninin 3'UTR bölgesindeki (rs4143815, C/G) polimorfizmi için 636 bp'lik, *CTLA-4* geninin birinci ekzonundaki (rs231775, +49 A/G) polimorfizmi için 162 bp'lik, *CD80* geninin üçüncü ekzonundaki (rs2228017, 452G/A) polimorfizmi için

218 bç'lik belirleyebilmek için PZR işlemleri gerçekleştirildi. Kullanılan ileri ve geri primer dizileri Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. DNA Dizilemede Kullanılan Primerler

Gen	PZR ürün boyutu	Kullanılan primerler	Referans
PD-1	333 bç	İleri: 5'-AGACGGAGTATGCCACCATT-3' Geri: 5'-CACTGTGGGCATTGAGACAT-3'	(Yang ve ark., 2011)
PD-L1	636 bç	İleri: 5'-GATACACATTTGGAGGAGACG-3' Geri: 5'-CAAATACTCCATGTTTTACTAG-3'	(Xie ve ark., 2018)
CTLA-4	162 bç	İleri: 5'-GCTCTACTTCCTGAAGACCT-3' Geri: 5'-AGTCTCACTCACCTTTCAG-3'	(Rocha ve ark., 2012)
CD80	218 bç	İleri: 5'-CTGACCATCGAGGAATCTGT-3' Geri: 5'-CGGGCCATATATTCATGTCC-3'	(Matsushita ve ark., 2000a)

Tablo 3.2.'de PZR amplifikasyonu için kullanılan kimyasallar ve miktarları verilmiştir.

Tablo 3.2. Standart PZR Kimyasal Protokolü

PZR Reaksiyon Karışımı	Reaksiyon Hacmi /1 Rxn
10X PZR Reaksiyon Tamponu	2,5 µl
dNTP Karışımı (0.2mM)	2 µl
Örnek gDNA (5 ng/µl)	4 µl
Magnezyum klorür (2mM)	2µl
İleri Primer (10 pmol)	1 µl
Geri Primer (10 pmol)	1 µl
1 U Taq DNA Polimeraz	0,5 µl
PZR distile su	12 µl
TOPLAM	25 µl

PZR Programı, Longgene marka A300 Thermal Cycler cihazında bütün örnekler yukarıdaki hacimde hazırlanarak çalıştırıldı. Tablo 3.3'te DNA amplifikasyonu için spesifik PZR termal döngü koşulları verildi.

Tablo 3.3. PZR Reaksiyon Koşulları

Gen	Denatürasyon		Bağlanma		Uzama		Döngü sayısı
	Süre	Sıcaklık	Süre	Sıcaklık	Süre	Sıcaklık	
PD-1	3 dakika	95°C	1 dakika	62°C	1 dakika	72°C	35
PD-L1	4 dakika	94°C	30 saniye	60°C	40 saniye	72°C	35
CTLA-4	30 saniye	94°C	30 saniye	60°C	1 dakika	72°C	38
CD80	30 saniye	96°C	30 saniye	62°C	1 dakika	72°C	35

3.4.4. Agaroz Jel Elektroforezi

PZR reaksiyonu sonucunda ilgili bölgelerin amplifikasyonlarının tespiti ve genotiplemesi için agaroz jel elektroforezi yapıldı. *PD-1* ve *PD-L1* genlerindeki polimorfik bölgeler için %2'lik agaroz jelde DNA belirteci (Biotium 100 bp Dna Ladder Katalog no: 31032), *CTLA-4* ve *CD80* genlerindeki polimorfik bölgeler için %2'lik agaroz jelde DNA belirteci (GeneDireX, 50 bp DNA Ladder RTU Katalog no:SD012-R500) boyutuna bakılarak bant büyüklüklerine göre ayrıldı.

Agaroz Jelin Hazırlanması ve Görüntülenmesi

Agaroz Jelin Hazırlanmasında Kullanılan Solüsyonlar

10 X Tris-Borat-EDTA (TBE) Tamponu:

0.089 M Trizma (Sigma)

0.089 M Borik Asit (Sigma)

0.002 M EDTA (Sigma)

10X TBE tamponu hazırlamak için, 54 g Tris-baz, 27.5 g borik asit ve 0.5 M EDTA (pH 7.4), son hacim 500 ml olacak şekilde bidistile suda çözüldü.

Gelred Solüsyonu:

Kullanıma hazır olan Gelred solüsyonu (Biotium, Katalog no: 41003) 5 µl eklenerek oda sıcaklığında kullanıldı.

Agaroz Jelin Hazırlanması

%2'lik agaroz jelin hazırlanması için 10X TBE solüsyonu 1X TBE olacak şekilde distile su ile seyreltilti. 2 g toz agaroz (Sigma) 100ml 1X TBE üzerine eklenerek mikrodalga fırında eritildi. Jelin sıcaklığı 50-55°C'ye indiğinde Gelred solüsyonu (Biotium) eklendi. Elektroforez küvetine taraklar yerleştirildi. Çeker ocak içerisinde 100 ml agaroz jel elektroforez küvetine dökülerek 20 dakika polimerize olması için bekletildi. Jel donduktan sonra taraklar jelden alındı. İçerisinde jel bulunan elektroforez küveti jelin üzerini kapatacak kadar 1X TBE bulunan elektroforez tankına (Hoefer marka, Subht Model) yerleştirildi.

Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme Sistemi

8 µl PZR ürünü örnek jelin kuyularına yüklendi. Bant büyüklüklerini ölçebilmek amacı ile DNA belirteçleri (Biotium 100 bp Dna Ladder Katalog no: 31032) ve (GeneDireX, 50bp DNA Ladder RTU Katalog no:SD012-R500) kullanıldı. Elektroforez tankına bağlı güç kaynağı ile örnekler, 100V'de 50 dakika yürütülerek ultraviyole ışık veren transilluminatör ile görüntülendi. Erbiyotek marka FX model Jel Görüntüleme cihazına bağlı olan monitörlü sistem kullanılarak fotoğraf alındı. (Ek 1.)

3.4.5. PZR Ürünlerini Saflaştırma

PZR reaksiyonundan sonra DNA dizi analizinde kullanılacak amplifikasyon ürünlerini, bağlanmayan primer ve dNTP artıklarından uzaklaştırmak için temizleme aşamasına geçilmiştir. Bu aşamada ExoSAP-IT Express PCR Cleanup Reagents (Thermo, Katalog no: 75001.200.UL) kiti üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde kullanıldı.

3.4.6. DNA Dizileme Reaksiyonu

Temizlenen PZR ampikonları, agaroz jel görüntülemesiyle tespit edilen genotiplemenin doğrulanması amacıyla Sanger Dizileme metoduyla ileri ve geri primerler kullanılarak çift yönlü okuma gerçekleştirildi. Dizileme reaksiyonu için kullanılan mastermix bilgileri aşağıdaki Tablo 3.4.'de belirtilmiştir.

Tablo 3.4. DNA Dizileme Kimyasal Protokolü

MasterMix Bileşenleri	Hacim
PZR Ürünü	5 µl
Primer (İleri veya Geri) (3.2 pmol)	1 µl
Florasana işaretli Dye Terminatör	1 µl
5X Sekans Buffer	4 µl
Su	2 µl
TOPLAM	13 µl

Dizileme reaksiyonunda PZR reaksiyonunda kullanılan primerler kullanıldı. Mastermix hazırlandıktan sonra dizileme reaksiyonuna geçildi. Dizileme için kullanılan reaksiyon koşulları Tablo 3.5.'te belirtilmiştir. Dizileme reaksiyonu LongGene A300 termalcycler cihazında gerçekleştirildi.

Tablo 3.5. DNA Dizileme Reaksiyon Koşulları

	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	95	30 saniye	1
Denatürasyon	95	10 saniye	30
Bağlanma	50	5 saniye	
Uzama	60	4 dakika	
Bekleme	4	-	1

3.4.7. Dizi Analizi Yapılacak Amplikonları Saflaştırma

DNA dizileme reaksiyonu bittikten sonra dizileme ürünleri dizileme cihazına konmadan önce pürifiye edildi. Saflaştırma işlemi sefadeks ile jel filtreleme metodu kullanılarak gerçekleştirildi. Bu aşamada 6 g sefadeks tartıldı ve üzerine 80 ml saf su eklenerek vortekslendi. Kolonlara 850 – 900 µl hazırlanılan sefadeks solüsyonundan eklendi. 4600 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Böylece kolon hazırlanmış oldu. Dizileme PZR ürününün hepsi kolona yüklendi. 4800 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Toplama tüplerinde kalan sıvı saflaştırılmış dizileme ürünü olarak saklandı.

3.4.8. DNA Dizi Analizi İşlemi ve Sonuçların Yorumlanması

Dizi analizi yapılacak ampliconları saflaştırma işleminden sonra DNA dizi analizi işlemine geçildi. Bu işlem kapiller elektroforez yöntemi kullanılarak ABI 3130XL cihazında gerçekleştirildi. 20 µl saflaştırılan dizileme ürünü 96 well plate kuyucuklarına eklendikten sonra üzerine 5 µl formamid konularak kapiller elektroforez işlemi başlatıldı. Sonuçlar cihazdan elde edilen elektroferogramlara göre değerlendirildi. Bu sonuçlarda Adenin piki yeşil, Guanin piki siyah, Sitozin piki mavi ve Timin piki kırmızı renkle gösterildi. Dizileme sonuçları NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) ve FinchTV versiyon 1.4.0 programları kullanılarak bilgisayar ortamında analiz edildi (Ek 2., Ek 3., Ek 4. ve Ek 5.).

Dizi analizi sonucunda saptanan değişimlerin tanımlanmış SNP olup olmadıkları NCBI Entrez SNP (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP) ve ENSEMBL GeneSNPView (www.ensembl.org/genesnpview) veri tabanları kullanılarak değerlendirildi.

3.5. Gerçek Zamanlı PZR Optimizasyon Çalışmaları

Periferik venöz kan örneklerinden total RNA kalıbı kullanılarak random hexamer primerleri aracılığıyla cDNA sentezlendi. Hedef *PD-1*, *PD-L1*, *CTLA-4* ve *CD80* genlerinin mRNA ifadesi seviyesini belirlemek için bu genlere özgü primerler kullanıldı (Tablo 3.7.). cDNA kalıbı ve primerler varlığında, prob içeren polimeraz enzimi kullanılarak kantitatif PZR gerçekleştirildi.

3.5.1. RNA İzolasyonu

Periferik kan örnekleri santrifüj edilerek çöktürüldü. Eritrositler, lizis solüsyonu kullanarak uzaklaştırıldı ve kalan çekirdekli hücrelerden silika kolon yöntemi ile üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde total RNA eldesi gerçekleştirildi (NucleoSpin® RNA Blood Midi (MN-740200.50, Germany)). RNA kalitesi ve miktarı nanodrop spektrofotometre (BioDrop) ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. 260nm/280nm dalga boyunda elde edilen RNA'nın saflığı ve miktarı belirlenip saflık oranları 1,8 civarı olan RNA örnekleri cDNA sentezi için -20°C'de saklandı.

RNA izolasyonu basamakları;

1. 15 ml'lik bir falkon tüpün içine EDTA'lı tüpten 1,3 ml'lik kan alındı.
2. Üzerine 1,3 ml'lik Liziz Buffer DL eklendi ve el yardımıyla hafifçe alt-üst yapıldı.
3. Ardından 33 µl Proteinaz K eklenir ve oda sıcaklığında 3-15 dk. tüp çalkalayıcıda inkübe edildi.
4. Tüpe 1,3 ml %70 etanol eklendi ve güçlü bir şekilde karıştırıldı.
5. Lizat (~ 4000 µl) 15 ml toplama tüpüne yerleştirilmiş bir NucleoSpin® RNA Blood Midi Columb içine aktarıldı.
6. Kolonun üzerine 1,2 ml MDB (membranı tuzdan arındırma) tamponu eklendi ve 4,500xg'de 3 dakika santrifüj edildi.
7. Kolona 240 µl rDNase eklenir ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
8. Birinci yıkama işlemi için NucleoSpin® RNA Kan Midi kolonuna 1 ml RB2 tamponu eklendi ve 4,500xg'de 3 dakika santrifüj edildi. Sıvı kısmı içeren tüp sıvıyla birlikte atıldı ve filtreli kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
9. İkinci yıkama işlemi için NucleoSpin® RNA Kan Midi kolonuna 3 ml RB3 tamponu eklendi ve 4,500xg'de 3 dakika santrifüj edildi. Sıvı kısmı içeren tüp sıvıyla birlikte atıldı ve filtreli kolon (nükleaz içermeyen) yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
10. 10 µl elüsyon yapılmış RNA başına 0,5 µl rDNase eklendi ve orta derecede karıştırıldı.
11. Tüpün alt kısmındaki tüm sıvıyı toplamak için kısa süre (~2.000xg'de ~1saniye) santrifüj edildi ve 37 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
12. Kolona 200 µl RNaz içermeyen H₂O eklendi. 4,500xg'de 3 dakika santrifüj edildi. RNA, 1.5 ml toplama tüpüne ayrılmış oldu.
13. İşlem tekrarlandı ve aynı örnekten ikinci bir elüsyon elde edilerek -20°C'de saklandı.

3.5.2. RNA'dan cDNA Sentezi

AccuPower RT PreMiks (Katalog No:2043) kiti kullanılarak Tablo 3.6.'da gösterildiği gibi bir steril tüp içinde şablon RNA ve primeri karıştırıldı. Kullanılan primerlerin sentezi Sentebiolab Biyoteknoloji (Türkiye) firmasına yaptırılmıştır.

Tablo 3.6. cDNA Sentezi Kimyasal Protokolü

	Reaksiyon Karışımı	20 ml reaksiyon	50 ml reaksiyon
Şablon RNA	Total RNA	0.5~1 mg	1~2 mg
	Poly(A) RNA	0.05~0.1 mg	0.1~0.2 mg
Primer (İleri ya da Geri)	Oligo dT ₁₈	0.5mg (100 pmol)	1 mg (200 pmol)
	Spesifik sekans	10~30 pmol	20~50 pmol

RNA'dan cDNA sentezi basamakları;

1. Spesifik primer ileri ya da geri olmak üzere tek bir primer 10-30 pmol olarak hazırlandı.
2. 10 ml total RNA ve 3 ml ileri primer (10 pmol) karışım hazırlandı.
3. 70°C'de 5 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı ve ardından buz kalıbında ya da soğutulmuş blokta bekletildi.
4. Karışım kiti içinden çıkarılan test tüplerine aktarıldı ve 37 ml distile su ilave edildi.
5. 45°C'de 1 saat (cDNA sentezi), 94°C'de 5 dakika (RTaz inaktivasyonu) olmak üzere sırayla inkübe edildi.
6. PZR için karışımdan 5 ml alındı.

Elde edilen cDNA'ların saflık ve miktar tayinleri (Denovix Marka DS-11+ Model Mikro Hacimli Nanodrop) spektrofotometre ile yapıldı.

3.5.3. Kantitatif PZR

Kullanmış olduğumuz GreenStar qPCR Master Mix protokolü, 20 µl'lik reaksiyon hacmi hazırlamak için 1-100 ng arasında cDNA eklenmesini önermektedir. Çalışmalarımızda BIONEER Marka AccuPower GreenStar qPCR PreMix (Katalog no: K-6210) kullanıldı. Bu miksler, PZR koşulları için gerekli tüm materyali içerisinde

bulundurduğu için sadece primer ve örnek cDNA'sı eklenerek kullanıldı. Reaksiyonda kullanılan primerler Tablo 3.7.'de verilmiştir.

Tablo 3.7. Kantitatif PZR'de Kullanılan Primerler

Gen	Kullanılan primerler	Referans
PD-1	İleri: 5'-CCCTGGTGGTTGGTGTCTG-3' Geri: 5'-GCCTGGCTCCTATTGTCCCTC-3'	(Wang ve ark., 2017)
PD-L1	İleri: 5'-GGTGCCGACTACAAGCGAAT-3' Geri: 5'-ATGGTCACTGCTTGTCCAGATG-3'	(Wang ve ark., 2017)
CTLA-4	İleri: 5'-AGCCAGGTGACTGAAGTCTG-3' Geri: 5'-CATAAATCTGGGTCCGTTG-3'	(Mo ve ark., 2018)
CD80	İleri: 5'-CTCACTTCTGTTTCAGGTGTTATCCA-3' Geri: 5'-TCCTTTTGCCAGTAGATGCCA-3'	(Scarpa ve ark., 2016)
GAPDH	İleri: 5'-CTTTGTCAAGCTCATTTCCTGG-3' Geri: 5'-TCTTCCTCTTGTGCTCTTGC-3'	(Mo ve ark., 2018)

Tablo 3.8.'de belirtildiği gibi hazır reaksiyon tüplerine eklenen primerler ve örnek cDNA'nın (veya negatif kontrol için PZR Grade su) üzerine PZR Grade su ile son örnek hacmi 20 µl'ye tamamlanarak Tablo 3.9'da gösterilen protokole göre çalışıldı.

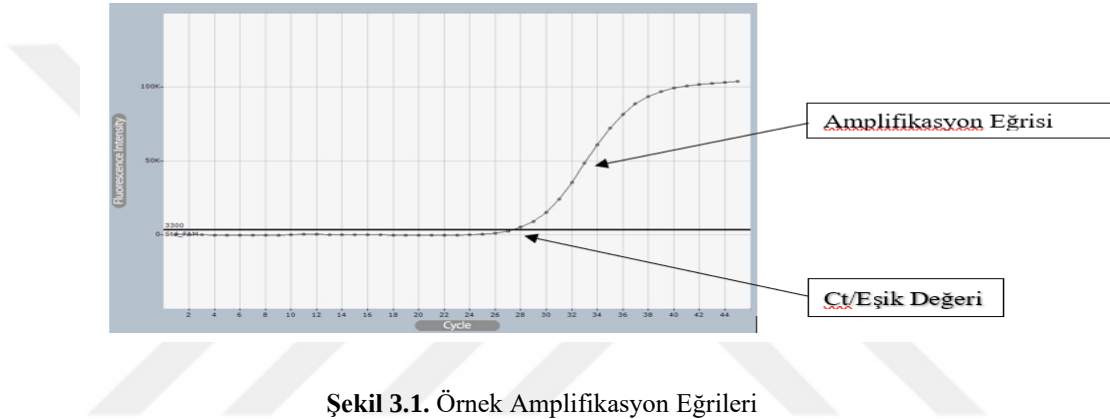
Tablo 3.8. Kantitatif PZR Kimyasal Protokolü

PZR Reaksiyon Karışımı	1 Reaksiyon için Hacmi
qPCR Master (SYBR)	10 µl
İleri Primer	1 µl
Geri Primer	1 µl
Örnek cDNA	5 µl
PZR Grade su	3 µl
Toplam	20 µl

Tablo 3.9. Kantitatif PZR Reaksiyon Koşulları

	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	95	5 dakika	1
Denatürasyon	95	20 saniye	38
Bağlanma	55	40 saniye	
Uzama	60	45 saniye	

Hazırlanan miksler, optik şeffaf filme kaplı 0,2ml'lik PZR tüpleri içerisinde (BIONEER Marka ExiSpin Model Vortex-Mixer cihazı ile homojenliği sağlandıktan sonra) BIONEER Marka ExiCycler96 Model Q-PCR cihazına yerleştirildi. Tablo 3.9.'da gösterilen deneylerin amplifikasyon koşulları, (SyberGreen Master Mix için gerekli sıcaklık, süre ve döngü sayıları) zaten BIONEER (Cihazları, Master Mix'leri ve Primer-Prob'ların üreticisi) tarafından optimize edildiği için çalışmalardan olumlu sonuçlar alındı.



Şekil 3.1. Örnek Amplifikasyon Eğrileri

SYBR Green yöntemiyle yapılan kantitatif PZR'nin başlangıcında ortamda tek zincirli cDNA molekülü, primerler ve reaksiyon tampon çözeltisi içinde SYBR Green boyası bulunmaktadır. Bağlı olmayan serbest cDNA molekülü tek zincirli olduğu için çok az bir floresan ışıma yapmaktadır. Primerler bağlanıp uzama başladığında ise SYBR Green, çift zincirli cDNA'nın arasına girerek floresan yayılımı başlatmaktadır. Başlangıçtaki döngülerde zayıf olan floresan sinyal; oluşan ekspresyona bağlı olarak belirli sayıda çoğaltım sonrasında ilerleyen döngülerde hızla artmaya başlamaktadır. Bu artış miktarı Q-PCR cihazının 2D-CCD kamerasının algılayabildiği miktara ulaştığında Ct (Cycle Threshold: İlk algılanma, Eşik değeri) olarak algılanmakta ve analiz yazılımı bu değerleri kullanarak sonuç vermektedir (Şekil 3.1. ve Ek 6.) (Monis ve ark., 2005).

Gerçek zamanlı kantitatif PZR'den elde edilen veriler, aşağıdaki formüle dayalı olarak hastalardaki mRNA ekspresyon seviyelerinin değerini hesaplamak için 'kat-değişimi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)' kullanılır. Göreceli gen ekspresyon seviyesini hesaplamak için şu şekilde uygulanır:

1) Hedef genin Ct değeri, ekspresyon seviyesi bir hücrede her zaman aynı olan house-keeping (referans/gardiyan) genin Ct değerinden çıkartılır. Bu değere, “delta Ct” denir.

$$\Delta Ct = Ct (\text{hedef}) - Ct (\text{referans})$$

2) Hasta grubunun delta Ct değerleri, kontrol grubunun delta Ct değerlerinden sırasıyla çıkartılarak “delta delta Ct” değerleri bulunur.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{hedef}) - \Delta Ct (\text{kontrol})$$

3) Hesaplanan değerlerin her bir replikasyon döngüsündeki artan veya azalan kat sayısını bulmak için ise 2 üzeri negatif kuvveti alınır. Bu yöntemin nihai sonucunda hedef gen ekspresyonunun kat değişimi elde edilir.

$$\text{Kat değişimi} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$, hasta bireylerdeki gen ekspresyonunun sağlıklı bireylerden daha yüksek olduğu anlamına gelir.

$2^{-\Delta\Delta Ct} < 1$, hasta bireylerdeki gen ekspresyonunun sağlıklı bireylerden daha düşük olduğu anlamına gelir.

$2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$, hasta bireylerdeki gen ekspresyonunun sağlıklı bireylerdekine eşit olduğu anlamına gelir.

Çalışmalar, iki tekrarlı deney seti halinde gerçekleştirildi. Gen ifadesi analizi için tüm örneklerin Ct değerleri, referans (house-keeping) gen olarak kullanılan GAPDH’ye Livak (kat-değişimi, $2^{-\Delta\Delta Ct}$) yöntemiyle Microsoft Excel 2010 Bilgisayar programı aracılığıyla oranlanarak yaklaşık kat değişimi bulundu (Livak ve Schmittgen, 2001).

3.6. Akış Sitometri Çalışmaları

Periferik kan mononükleer hücreleri (PKMH) “gradyan yöntemi” kullanılarak izole edildi. T lenfosit profilinin belirlenmesi için PD-1, PD-L1 ve CTLA-4 proteinlerine karşı antikor varlığı ve düzeyleri değerlendirildi. Çalışmaya dahil edilen toplam 40 vakanın sodyum-heparinli plazma tüplerine alınmış periferik kan örneklerinden LMS (Sigma-Aldrich) uygulamasıyla mononükleer hücreler elde edildi. CD3, CD4, CD8, PD-1, PD-L1 ve CTLA-4 proteinlerine özgül floresan işaretli monoklonal antikorlarla boyandı.

Örneklerden elde edilen floresan işaretli hücrelerin ekspresyon seviyelerinin yüzde oranları 8 renkli akım sitometri cihazı (FACSCanto II, Becton Dickinson, San Jose, CA.) ile değerlendirildi ve FACS Diva yazılımı ile analiz edildi. En geç 4 saat içinde veri toplama işlemi tamamlandı. (Tüm örneklerde veriler aynı gün toplandı.)

Periferik kan mononükleer hücre izolasyonu aşamaları;

1. Sodyum-heparinli tüplere her olgu için 4 ml kan alınır oda sıcaklığında laboratuvara ulaştırıldı.
2. 15 ml'lik bir falkon tüpüne alınan 4 ml kan aynı hacimde fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi olan PBS ile seyreltildi.
3. Oluşturulan karışım, 3 ml oranında Ficoll (Lympho-paque) bulunan yeni bir falkon tüpün içine yavaşça eklendi.
4. 1600 rpm'de +4°C'de 30 dk santrifüj (Gyrozen 1580R santrifüj cihazı kullanıldı) edildi.
5. Santrifüj sonrası fazlarına ayrılan örneğin periferik kan mononükleer hücre tabakası yeni bir falkon tüpüne toplandı. Toplanan hacim kadar PBS eklenerek 1800 rpm'de 10 dakika, +4°C'de santrifüj edildi.
6. Ardından pelletin (hücreler) üstünde kalan süpernatant uzaklaştırıldı. PBS ile yıkama işlemi ikinci kez tekrar edildi.
7. Becton Dickinson (BD) Pharmingen Stain Buffer ile (FBS) ml'de 1 milyon hücre olacak şekilde seyreltip hücre sayımı yapıldı.

Değerlendirme öncesi polistren çalışma tüpleri hazırlandı ve üretici firmaların (FC Biolegend ve Becton Dickinson) belirtilen tavsiyeleri doğrultusunda tüm örnekler için aşağıdaki boyama prosedürü gerçekleştirildi.

Boyama Prosedürü:

1. Çalışma tüplerine olguların bilgileri, kurulacak panel ve kullanılacak antikorlar yazıldı.
2. +4°C'de saklanan floresan işaretli antikorlar oda sıcaklığına getirilir ve 30 saniye vortekslendi.

3. Çalışma tüplerinin en dibine koyulacak şekilde antikorlar ve izotipleri yerleştirilerek dağıtıldı.
4. FBS ile seyreltilen hücreler çalışma tüplerine eklendi. (Hedeflenen her tüpe $\sim 1 \times 10^6$ hücre dağıtılmasıdır ancak bu rakama ulaşamayabilir.)
5. Antikor (Hücre içi boyama için CTLA-4 antikoru sonraki basamaklarda eklendi) ve örnek eklenmiş çalışma tüpleri $+4^{\circ}\text{C}$ 'de, 20 dakika karanlıkta bekletildi.
6. Yıkama işlemi için çalışma tüplerine 500 μl FBS ilave edildi, vortekslendi. Çalışma tüpleri 300g hızda 5 dakika santrifüj edildi. Tüpler tek hamlede ters döndürülerek (hücre kaybı olmadan) süpernatant atıldı. Bu basamak iki kez tekrarlandı.
7. Çalışma tüplerindeki hücrelerin fiksasyonu için 1/10 oranında Permeabilizing Solüsyonu/ distile su (BD FACS Permeabilizing Solüsyonu 2 (Katalog no: 347692)) hazırlanmış 1000 μl 'lik karışımdan çalışma tüplerine 500'er μl eklendi. Karanlık ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
8. İnkübasyon sonrasında çalışma tüpleri 300g hızda 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı.
9. FBS ile yıkama işlemi iki kez tekrarlandı.
10. Çalışma tüplerine CTLA-4 (CD152) floresan antikoru ve izotipinden eklendi. $+4^{\circ}\text{C}$ 'de, 20 dakika karanlıkta bekletildi.
11. Çalışma tüpleri 300g hızda 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı.
12. FBS ile yıkama işlemi iki kez tekrarlandı.
13. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra tüplerde kalan hücre pelleti wash buffer ile kaldırıldı ve en kısa sürede cihazda okutuldu.

Floresan işaretli antikorlar; CD3 (APC/Cyanine7-B265232-Katalog No: 300317) ve izotipi (Katalog No: 300318), CD4 (Pacific Blue™-B258543-Katalog No: 300524) ve izotipi (Katalog No: 400131), CD8 (PE/Cyanine7-B276276-Katalog No: 344750) ve izotipi (Katalog No: 400125), CD279 (PD-1) (PE-B252642-Katalog No:329905) ve izotipi (IgG1-B273447-Katalog No: 400111), CD274 (B7-H1, PD-L1) (FITC-B273337-Katalog No: 393605) ve izotipi (IgG1-B206036-Katalog No: 400109), CD152 (CTLA-

4) (APC-B264772-Katalog No: 369611) ve izotipi (IgG1-B228262-Katalog No: 400221) olarak seçildi. (FC BIOLEGEND)

Yardımcı T lenfosit profilinin belirlenmesi için CD3CD4 kapısı alınarak CD3⁺CD4⁺PD-1⁺, CD3⁺CD4⁺PD-L1⁺, CD3⁺CD4⁺CTLA-4⁺ hücreler seçildi. Sitotoksik T lenfosit profilinin belirlenmesi için CD3CD8 kapısı alınarak CD3⁺CD8⁺PD-1⁺, CD3⁺CD8⁺PD-L1⁺, CD3⁺CD8⁺CTLA-4⁺ hücreler seçildi. Pozitif ve negatif hücreler izotip kontrolü ile boyama yapılırken belirlendi. Bu veriler kullanılarak hücre oranları hesaplandı (Ek 7. ve Ek 8.).

3.7. İstatistiksel Analiz/Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Verilerin değerlendirilmesinde IBM SPSS Statistics for Windows Version 22 ve R.3.3.2 yazılımlarından yararlanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Normal dağılım göstermeyen değişkenlerin iki grup karşılaştırmaları Mann-Whitney u testi, üç grup karşılaştırmaları Kruskal Wallis H testi ile gerçekleştirildi. İkili karşılaştırmalar için post-hoc testlerinden Dunn testi kullanıldı. Normal dağılım gösteren değişkenlerde iki grup karşılaştırmaları için Independent samples t testi, üç grup karşılaştırmaları Anova testi ile gerçekleştirildi. Kategorik değişkenler için gruplar arasındaki dağılımsal ilişki Chi-Square testi ve Fisher-Freeman-Halton Exact testi ile değerlendirildi. İstatistik parametreleri Mean±Standard Deviation, Median (Quartile %25 (Q1)-Quartile %75 (Q3)) ve n (%) ile ifade edildi. İstatistiksel anlamlılık p<0.05 olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 20 kişilik DBBHL hasta grubunun 9 tanesi Germinal Merkez B Hücreli (GCB) ve 11 tanesi GCB dışı alt tiplerini ve hasta grubuyla aynı yaş ve cinsiyette olan 20 kişilik kontrol grubunu kapsamaktadır (Tablo 4.1.). Hastaların demografik özelliklerinin hastalığın alt tiplerine göre dağılımı Tablo 4.2.'de verilmiştir. Hastaların yaşları 24 ile 83 arasında değişmekte olup yaş ortalaması $59,95 \pm 15,78$ idi. Olgular yaş dağılımına göre değerlendirildiğinde; 60 yaş ve altındaki vaka sayısı 9 (%45), 60 yaş üzerindeki hasta sayısı 11 (%55)'di.

Tablo 4.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Demografik Özelliklerinin Dağılımı

		Hasta	Kontrol
Yaş	Ortalama $\pm$ sd	59,95 $\pm$ 15,78	59,95 $\pm$ 15,78
Cinsiyet	Erkek n (%)	10 (50,0)	10 (50,0)
	Kadın n (%)	10 (50,0)	10 (50,0)

sd: Standart Sapma

Tablo 4.2. Hastaların Demografik Özelliklerinin Hastalığın Alt Tiplerinde Dağılımı

		GCB	GCB dışı	Kontrol	P değeri
Yaş	Ortalama $\pm$ sd	58,67 $\pm$ 19,56	61,00 $\pm$ 12,81	59,95 $\pm$ 15,78	0.949
Cinsiyet	Erkek n (%)	5 (55,6)	5 (45,5)	10 (50,0)	0.904
	Kadın n (%)	4 (44,4)	6 (54,5)	10 (50,0)	

sd: Standart Sapma, Anova; Fisher-Freeman-Halton Exact test;a:0.05

Hasta grubundaki iki hasta primer santral sinir sistemi lenfomasına sahip olduğu için bu hastaların hastalık evresi ve R-IPI skorlaması değerlendirilmedi. Hastaların klinik özelliklerinin hastalığın alt tiplerine göre dağılımı Tablo 4.3.'te gösterilmiştir. Hastaların klinik özellikleri ile hastalığın alt tiplerinin istatistiksel bir anlamı bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 4.3. Hastaların Klinik Özelliklerinin Hastalığın Alt Tiplerinde Dağılımı

		GCB n (%)	GCB dışı n (%)	p değeri
B semptomu	var	6 (66,7)	2 (18,2)	0.065
	yok	3 (33,3)	9 (81,8)	
Kemik iliği tutulumu	var	1 (11,1)	1 (9,1)	1.00
	yok	8 (88,9)	10 (90,9)	
Bulky hastalık durumu	var	2 (22,2)	1 (9,1)	0.566
	yok	7 (77,8)	10 (90,9)	
Ekstranodal tutulu alan sayısı	0	3 (33,3)	6 (54,5)	0.820
	1	3 (33,3)	2 (18,2)	
	2	2 (22,2)	1 (9,1)	
	3	1 (11,1)	1 (9,1)	
	4	0 (0,0)	1 (9,1)	
Ann-Arbor evresi	2	2 (22,2)	1 (11,1)	1.00
	3	4 (44,4)	5 (55,6)	
	4	3 (33,3)	3 (33,3)	
R-IPI Skorlama	1	1 (11,1)	1 (11,1)	0.863
	2	3 (33,3)	3 (33,3)	
	3	4 (44,4)	3 (33,3)	
	4	1 (11,1)	2 (22,2)	
ECOG performans durumu	0	1 (11,1)	3 (27,3)	0.619
	1	4 (44,4)	4 (36,4)	
	2	2 (22,2)	1 (9,1)	
	3	1 (11,1)	3 (27,3)	
	4	1 (11,1)	0 (0,0)	

Chi-Square test; Fisher-Freeman-Halton Exact test;a:0.05

DBBHL'nin moleküler alt tiplerine göre hastaların tanı aldıkları dönemde ölçülen laboratuvar verileri Tablo 4.4.'de verilmiştir. Hastaların laboratuvar verileri ile hastalık alt tiplerinin anlamlı farklılıkları yoktu ($p>0,05$).

Tablo 4.4. Hastaların Laboratuvar Verilerinin Hastalığın Alt Tiplerinde Dağılımı

Parametreler	GCB Ortalama±sd	GCB dışı Ortalama±sd	p değeri
Serum LDH U/L	323,78±76,94	352,64±154,05	0.616
Nötrofil BIN/mm ³	5,19±2,65	5,26±3,20	0.959
Trombosit BIN/mm ³	263,56±81,67	262,09±99,29	0.972
Beta-2 mikroglobulin mg/L	3,27±1,22	2,97±1,46	0.666

Albumin g/dL	3,69±0,62	3,52±0,62	0.582
Hemoglobin g/dL	10,41±2,28	10,88±2,52	0.670
Lenfosit BIN/mm³	1,60±0,90	1,19±0,54	0.223

Independent samples t test; Mann Whitney U test; Chi Square test; Fisher-Freeman-Halton Exact test; a:0.05

Olguların tamamı (%100) rituksimab içeren tedavi aldı. 20 olgunun 13'ü (%65) R-CHOP (Rituksimab-siklofosfamid, doksorubisin, vinkristin, prednizon), 5'i (%25) R-miniCHOP, 1'i (%5) R-HDCM (Rituksimab-yüksek doz sitarabin, ARA-C, metotreksat), 1'i (%5) R-MPV (Rituksimab-metotreksat, prokarbazin, vinkristin) tedavisi aldı.

Hastaların interim PET takibinde 15 olgu (%93,7) yanıtlıydı ama 4 olgunun takibi dış merkezli olduğu için yapılamadı. Tedavi sonrası 12 olgu (%85,7) komplet yanıt gösterdi. 3'ünde (%21,4) refrakter ya da stabil hastalık, 5'inde (%35,7) nüks hastalık saptandı.

Hastalardan 5'i (%29,4) hayatını kaybetti. 12'si (%70,5) ise hayattaydı ve 3'ünün takibi yapılamadı. Hayatını kaybeden olgulardan 4'ünün (2 erkek, 2 kadın) aktif tedavi süresinde, 1'inin (kadın) hastalığın remisyon döneminde başka nedenlerden ötürü eksitus olduğu tespit edildi. DBBHL'nin moleküler alt tiplerine göre olguların tedavi rejimi, interim PET takibi, tedavi sonu yanıtı, nüks durumu, aktif tedavi durumu ve sağkalım durumları Tablo 4.5.'te gösterilmiştir. Hastaların prognostik verileri ile hastalık alt tiplerinin istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisi yoktu (p>0.05).

Tablo 4.5. Hastaların Prognostik Verilerinin Hastalığın Alt Tiplerinde Dağılımı

		GCB n (%)	GCB dışı n (%)	p değeri
Tedavi Rejimi	R-CHOP	6 (6,7)	7 (63,6)	1.00
	R-MiniCHOP	3 (33,3)	2 (18,2)	
	R-HDCM	0 (0,0)	1 (9,1)	
	R-MPV	0 (0,0)	1 (9,1)	
İnterim PET yanıtı	Yanıtlı	5 (83,3)	10 (100,0)	0.375
	Yanıtsız	1 (16,7)	0 (0,0)	
Tedavi sonu yanıtı	Tam yanıt	5 (100,0)	7 (77,8)	0.505
	Yanıtsız	0 (0,0)	2 (22,2)	

Nüks	Var	1 (20,0)	4 (44,4)	0.775
	Yok	3 (60,0)	3 (33,3)	
	Primer refrakter	1 (20,0)	2 (22,2)	
Aktif tedavi	Alıyor	1 (20,0)	5 (55,6)	0.301
	Almıyor	4 (80,0)	4 (44,4)	
Sağkalım	Sağ	5 (71,4)	7 (70,0)	1.00
	Eksitus	2 (28,6)	3 (30,0)	

Independent samples t test; ki-kare (χ^2) testi; Fisher-Freeman-Halton Exact test;a:0.05

Hasta ve kontrol gruplarına ait numunelerden yapılan DNA dizileme çalışmasında *PD-1* (rs2227981), *PD-L1* (rs4143815), *CTLA-4* (rs231775) ve *CD80* (rs2228017) polimorfizmlerinin sıklığı Tablo 4.6.'da verilmiştir. Hasta ve kontrol gruplarının *PD-1*, *PD-L1*, *CTLA-4* ve *CD80* genotiplerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değer bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 4.6. PD-1, PD-L1, CTLA-4 ve CD80 Genotiplerinin Hasta ve Kontrol Gruplarında Dağılımı

		Hasta Grubu	Kontrol Grubu	p değeri
		n (%)	n (%)	
PD-1 Genotipi	T/T	5 (25)	6 (30)	0.723
	C/T	15 (75)	14 (70)	
PD-L1 Genotipi	G/G	7 (35)	8 (40)	0.086
	C/G	10 (50)	4 (20)	
	C/C	3 (15)	8 (40)	
CTLA-4 Genotipi	G/G	2 (10)	4 (20)	0.563
	G/A	13 (65)	10 (50)	
	A/A	5 (25)	6 (30)	
CD80 Genotipi	G/G	16 (80)	16 (80)	1.00
	G/A	4 (40)	4 (20)	

Independent samples t test; Mann-Whitney u test; a:0.05 n: katılımcı sayısı

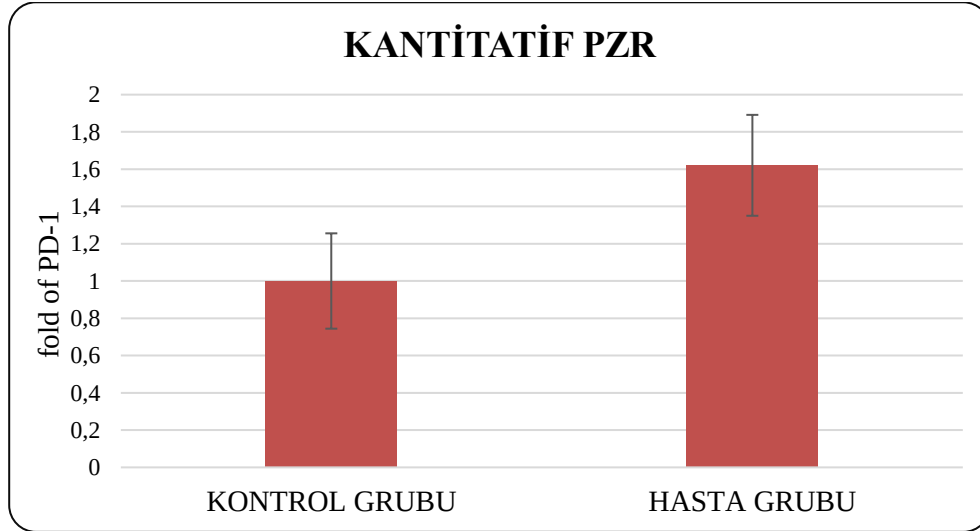
Hasta ve kontrol grubuna ait numunelerden yapılan DNA dizileme çalışmasında *PD-1* (rs2227981), *PD-L1* (rs4143815), *CTLA-4* (rs231775) ve *CD80* (rs2228017) polimorfizmleri, hastalığın alt tiplerine göre analiz edilip Tablo 4.7.'de gösterilmiştir. Hastalığın alt tiplerine göre bu genotipler arasında istatistiki bir fark yoktu ($p>0,05$).

Tablo 4.7. PD-1, PD-L1, CTLA-4 ve CD80 Genotiplerinin Hastalığın Alt Tiplerinde Dağılımı

		GCB n (%)	GCB dışı n (%)	p değeri
PD-1 Genotipi	T/T	2 (40)	3 (60)	1.000
	C/T	7 (46,7)	8 (53,3)	
PD-L1 Genotipi	G/G	4 (57,1)	3 (42,9)	0.711
	C/G	4 (40)	6 (60)	
	C/C	1 (33,3)	2 (66,7)	
CTLA-4 Genotipi	G/G	1 (50)	1 (50)	0.962
	G/A	6 (46,2)	7 (53,8)	
	A/A	2 (40)	3 (60)	
CD80 Genotipi	G/G	6 (37,5)	10 (62,5)	0.285
	G/A	3 (75)	1 (25)	

Fisher-Freeman-Halton Exact test; test;a:0.05

Gen ifadesi analizi için tüm örneklerin Ct değerlerinin (Eşik değeri), “kat-değişimi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)” yöntemiyle yaklaşık kat değişimi bulundu. Çalışmalar, iki tekrarlı deney seti halinde gerçekleştirilmiş ve esas alınan değer iki tekrarın ortalamasıdır. Buna göre *PD-1* gen ekspresyonu analizinde kontrol grubunun kat sayısının 1, hasta grubunun kat sayısının 1,62 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.1.). Hasta ve kontrol gruplarının *PD-1* genine ait ortalama Ct değerleri Tablo 4.8.’de verilmiştir. *PD-1* gen ekspresyonunun hasta grubunda daha yüksek olduğu bulunmuştur (Şekil 4.1. ve Tablo 4.8.).

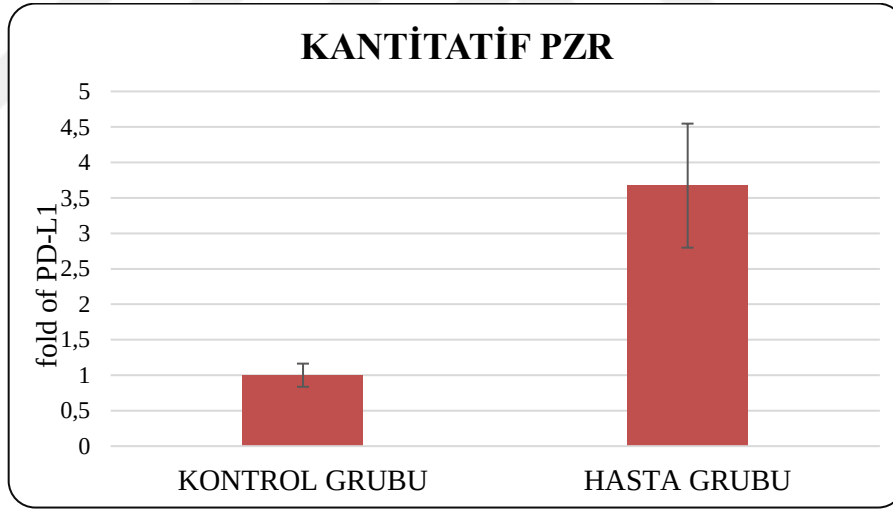
**Şekil 4.1.** Hasta ve Kontrol Gruplarında PD-1 Gen Ekspresyon Ölçümleri

Tablo 4.8. Hasta ve Kontrol Gruplarında PD-1 Gen Ekspresyon Ölçümleri

		N	Ortalama±Sd (Ct değerleri)	p değeri
PD-1	Hasta	20	21,74±3,04	0.001
	Kontrol	20	24,46±1,59	
	Toplam	40	23,10±2,77	

Anova, Welch test; n: katılımcı sayısı, sd: Standart Sapma, Ct değerleri: Eşik Değerleri

PD-L1 gen ekspresyonu incelendiğinde, kontrol grubunun kat sayısının 1, hasta grubunun kat sayısının 3,67 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.2.). Hasta ve kontrol gruplarının *PD-L1* genine ait ortalama Ct değerleri Tablo 4.9.'da verilmiştir. *PD-L1* gen ekspresyonunun hasta grubunda daha yüksek olduğu bulunmuştur (Şekil 4.2. ve Tablo 4.9.).



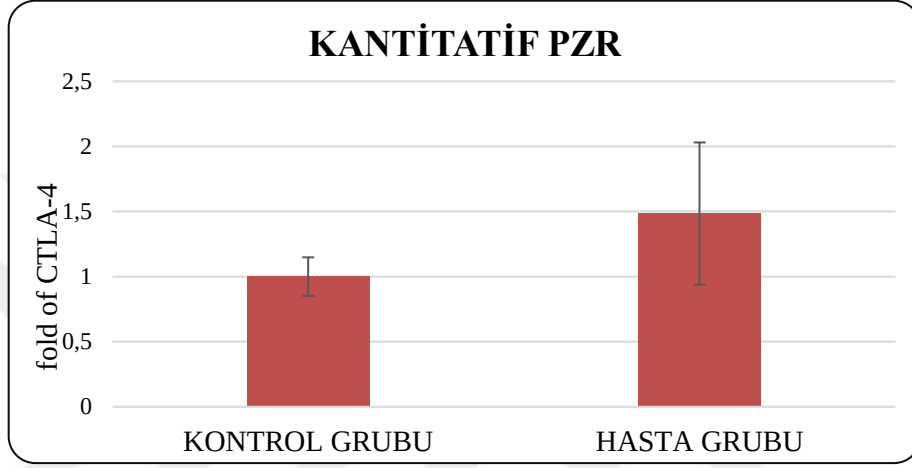
Şekil 4.2. Hasta ve Kontrol Gruplarında PD-L1 Gen Ekspresyon Ölçümleri

Tablo 4.9. Hasta ve Kontrol Gruplarında PD-L1 Gen Ekspresyon Ölçümleri

		N	Ortalama±Sd (CT değerleri)	p değeri
PD-L1	Hasta	20	13,99±0,61	0.001
	Kontrol	20	16,76±1,09	
	Toplam	40	15,38±1,65	

Anova, Welch test; n: katılımcı sayısı, sd: Standart Sapma, CT değerleri: Eşik Değerleri

CTLA-4 gen ekspresyonu incelendiğinde, kontrol grubunun kat sayısının 1, hasta grubunun kat sayısının 1,48 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.3.). Hasta ve kontrol gruplarının *CTLA-4* genine ait ortalama Ct değerleri Tablo 4.10.'da verilmiştir. *CTLA-4* gen ekspresyonunun hasta grubunda daha yüksek olduğu bulunmuştur (Şekil 4.3. ve Tablo 4.10.).



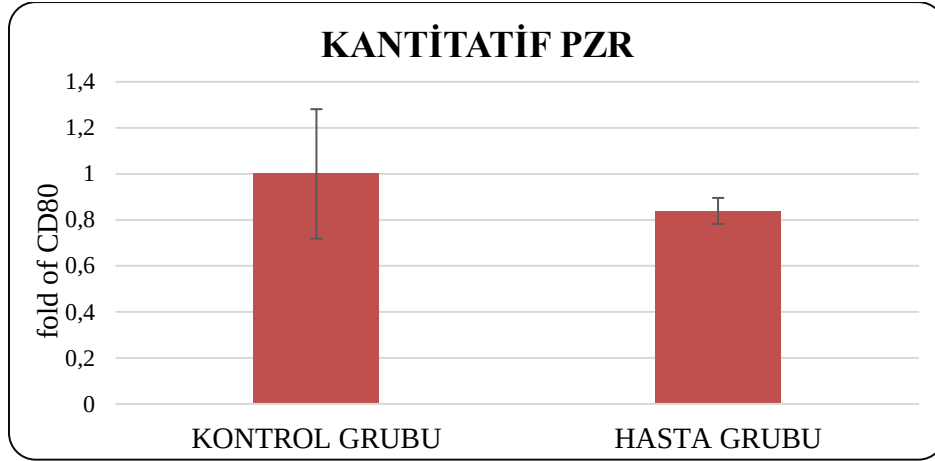
Şekil 4.3. Hasta ve Kontrol Gruplarında CTLA-4 Gen Ekspresyon Ölçümleri

Tablo 4.10. Hasta ve Kontrol Gruplarında CTLA-4 Gen Ekspresyon Ölçümleri

		N	Ortalama±Sd (CT değerleri)	p değeri
CTLA-4	Hasta	20	16,01±1,12	0.001
	Kontrol	20	17,45±1,21	
	Toplam	40	16,73±1,36	

Anova, Welch test; n: katılımcı sayısı, sd: Standart Sapma, CT değerleri: Eşik Değerleri

CD80 gen ekspresyonu incelendiğinde, kontrol grubunun kat sayısının 1, hasta grubunun kat sayısının 0,83 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.4.). Hasta ve kontrol gruplarının *CD80* genine ait ortalama Ct değerleri Tablo 4.11.'de verilmiştir. *CD80* gen ekspresyonunun kontrol grubunda daha yüksek olduğu bulunmuştur (Şekil 4.4. ve Tablo 4.11.).



Şekil 4.4. Hasta ve Kontrol Gruplarında CD80 Gen Ekspresyon Ölçümleri

Tablo 4.11. Hasta ve Kontrol Gruplarında CD80 Gen Ekspresyon Ölçümleri

		N	Ortalama±Sd (CT değerleri)	p değeri
CD80	Hasta	20	24,23±0,84	0.110
	Kontrol	20	23,78±0,87	
	Toplam	40	24,01±0,87	

Anova, Welch test; n: katılımcı sayısı, sd: Standart Sapma, CT değerleri: Eşik Değerleri

Hasta ve kontrol gruplarında *PD-1* (rs2227981) polimorfizminin *PD-1* ekspresyon seviyelerine etkisine bakıldığında C/T genotipine sahip hastaların, C/T genotipine sahip sağlıklı bireylere kıyasla *PD-1* ekspresyon seviyesi yüksekti ($p=0.012$). T/T genotipi için hasta ve kontrol grubunda anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$). Hastalardaki yüksek *PD-1* ifade düzeyi ile bu SNP'nin ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Hasta ve kontrol gruplarında *PD-L1* (rs4143815) polimorfizminin *PD-L1* ekspresyon seviyelerine etkisi incelendiğinde en yüksek ekspresyon seviyeleri sırasıyla C/G, G/G ve C/C genotipidir. C/G genotipine sahip hastaların, C/G genotipine sahip sağlıklı bireylere göre *PD-L1* ifadesi daha yüksekti ($p=0.007$). G/G genotipine sahip hastalarda kontrollere göre yüksekti ($p=0.003$). C/C genotipi için her iki grupta anlamlı bir fark yoktu ($p>0.05$). Sonuç olarak hastalarda yüksek *PD-L1* ifade düzeyi ile bu SNP'nin ilişkili olabileceği söylenebilir.

Hasta ve kontrol gruplarında *CTLA-4* (rs231775) polimorfizminin *CTLA-4* ekspresyon seviyelerine etkisi incelendiğinde en yüksek ekspresyon seviyeleri sırasıyla G/A, A/A ve G/G genotipidir. G/A genotipine sahip hastalarda, G/A genotipli kontrollere göre *CTLA-4* ifadesi daha yüksekti ($p=0.006$). Diğer genotipler için her iki grupta da anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$). Hastalarda yüksek *CTLA-4* ifade düzeyi ile bu SNP'nin ilişkili olabileceği tahmin edilmektedir.

Hasta ve kontrol gruplarında *CD80* (rs2228017) polimorfizminin *CD80* ekspresyon seviyelerine etkisinin istatistiksel anlamı bulunamadı ($p>0.05$).

Hastalığın alt tiplerine göre bu genotipler arasında istatistiki bir fark yoktu ($p>0.05$).

Tablo 4.12.'de hasta ve kontrol gruplarının Akış Sitometri verilerine göre $CD4^+PD-1^+$ ve $CD4^+PD-L1^+$ hücrelerinin ekspresyon (%) düzeylerinin istatistiksel açıdan anlamlı olduğu tespit edilmiştir (sırasıyla $p=0.010$, $p=0.002$). Diğer veriler için elde edilen p değerleri 0,05 değerinden büyük olduğundan anlamlı fark yoktur. Buna göre $CD4^+PD-1^+$ ve $CD4^+PD-L1^+$ hücre ekspresyon (%) düzeyleri, hasta grubunda daha yüksek bulunmuştur.

Tablo 4.12. Hasta ve Kontrol Gruplarında Akış Sitometri Sonuçlarının (%) Düzeyleri

		Hasta Grubu (n:20)	Kontrol Grubu (n:20)	p değeri
Lenfosit^a	Ortalama±SD	65,10±19,19	65,04±19,62	0.992
(CD4⁺)^b	Medyan (Q1-Q3)	36,85(14,85-43,65)	36,05(16,65-40,50)	0.602
(CD4⁺PD-1⁺)^b	Medyan (Q1-Q3)	30,20(16,10-40,05)	13,60(6,80-25,65)	0.010*
(CD4⁺PD-L1⁺)^b	Medyan (Q1-Q3)	32,00(23,40-34,75)	12,25(4,30-19,10)	0.002*
(CD4⁺CTLA-4⁺)^b	Medyan(Q1-Q3)	21,65(8,60-41,55)	14,95(5,90-23,60)	0.121
(CD8⁺)^a	Ortalama±SD	25,60±9,80	25,25±12,37	0.920
(CD8⁺PD-1⁺)^a	Ortalama±SD	34,6±17,01	32,62±20,18	0.738
(CD8⁺PD-L1⁺)^b	Medyan (Q1-Q3)	30,80(27,30-39,85)	30,55(22,20-34,70)	0.602
(CD8⁺CTLA-4⁺)^b	Medyan (Q1-Q3)	33,45(21,65-53,90)	22,35(8,00-44,00)	0.201
(CD3⁺CD4⁺PD-1⁺PD-L1⁺)^b	Medyan (Q1-Q3)	3,25(0,60-5,95)	2,10(0,35-4,40)	0.461
(CD3⁺CD8⁺PD-1⁺PD-L1⁺)^b	Medyan (Q1-Q3)	1,55(0,30-4,65)	4,50(0,40-8,85)	0.341

^aIndependent samples t test; ^bMann-Whitney U test; a:0.05; *gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı

Olgulardan edilen Akış Sitometri verilerine göre GCB ve GCB dışı gruplar arasında anlamlı farklılıklar saptanmıştır. Tablo 4.13.'te göre hastalığın alt tipleri arasında anlamlı bir fark yoktur ($p>0.005$). Ancak $CD4^+PD-1^+$ hücrelerinin ekspresyon (%) düzeyleri açısından GCB dışı grup ile kontrol grubu arasında, $CD4^+PD-L1^+$ hücre ekspresyon (%) düzeyleri, GCB grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir (sırasıyla $p=0.034$ ve $p=0.005$).

Tablo 4.13. Hastalığın Alt Tiplerinde Akış Sitometri Sonuçlarının (%) Düzeyleri

		GCB	GCB dışı	Kontrol	p değeri
(Lenfosit)**	Ortalama±SD	62,38±21,69	67,33±17,64	65,04±19,62	0,854
CD4⁺	Medyan (Q1-Q3)	39,20 (12,50-41,50)	34,50 (16,00-48,70)	36,05 (16,65-40,50)	0.740
CD4⁺PD-1⁺	Medyan (Q1-Q3)	24,70 (16,70-38,00)	34,60 (15,50-56,00) ^c	13,60 (6,80-25,65) ^b	0.034*
CD4⁺PD-L1⁺	Medyan (Q1-Q3)	33,80 (33,00-51,70) ^c	30,10 (13,40-32,00)	12,25 (4,30-19,10) ^a	0.005*
CD4⁺CTLA-4⁺	Medyan (Q1-Q3)	23,50 (15,20-31,50)	20,10 (8,60-41,70)	14,95 (5,90-23,60)	0.297
(CD8⁺)**	Ortalama±SD	29,31±9,96	22,56±8,99	25,25±12,37	0.404
(CD8⁺PD-1)^{***}	Ortalama±SD	43,40±18,25	27,40±12,50	32,62±20,18	0.147
CD8⁺PD-L1⁺	Medyan (Q1-Q3)	29,90 (25,00-38,70)	31,10 (29,60-41,00)	30,55 (22,20-34,70)	0.777
CD8⁺CTLA-4⁺	Medyan (Q1-Q3)	33,20 (19,80-41,00)	33,70 (23,50-83,00)	22,35 (8,00-44,00)	0.188
CD3⁺CD4⁺PD-1⁺PD-L1⁺	Medyan (Q1-Q3)	4,50 (2,50-13,00)	2,50 (,30-4,50)	2,10 (,35-4,40)	0.404
CD3⁺CD8⁺PD-1⁺PD-L1⁺	Medyan (Q1-Q3)	4,20 (,60-9,60)	1,20 (,10-2,50)	4,50 (,40-8,85)	0.132

Kruskal Wallis H test; Post-hoc:Dunn test; **Anova; a:0.05; * gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı; ^a GCB grubu ile farklılık anlamlı; ^b GCB dışı grubu ile farklılık anlamlı; ^c Kontrol grubu ile farklılık anlamlı

5. TARTIŞMA

Non-Hodgkin lenfoma (NHL) tiplerinden biri olan Diffüz büyük B hücreli lenfoma (DBBHL), NHL vakalarının yaklaşık %30-%40 oluşturan agresif seyirli bir neoplazmdir. Çocuk ve genç erişkinlerde dahil olmak üzere her yaşta görülebilmesine karşın ortalama görülme yaşı altıncı ve yedinci dekadattır. Erkeklerde kadınlara kıyasla daha sık tespit edilmektedir (Siegel ve ark., 2021) (<https://www.seercancer.gov>, Erişim tarihi: 24 Mart 2021).

Türkiye’de yapılan bir çalışmada 369 DBBHL hastasının medyan yaşı 61 (16-81 arası), kadın hasta sayısı 178 (%48,2) ve erkek hasta sayısı 191 (%51,8) olarak belirlenmiştir (BAKIRTAŞ ve ark.). Çalışmamıza dahil edilen 20 olgunun 10’u kadın (%50), 10’u erkektir (%50). Olguların yaş aralığı 24 ile 83 arasında değişmekte olup ortalama yaş $59,95 \pm 15,78$ ’dir. Literatür ile uyum göstermeme nedeninin hasta sayısından kaynaklandığı düşünülmektedir.

WHO’nun 2016 yılındaki büyük B hücreli lenfomaların sınıflamasında DBBHL, moleküler alt tiplerine göre Germinal Merkez B Hücreli (GCB) ve GCB dışı (Aktive B Hücreli (ABC)) şeklinde değerlendirilmektedir (Swerdlow ve ark., 2017). Gen ekspresyon profili çalışmaları, B hücresi malignitelerinin gen ekspresyonundaki benzerliklerine göre alt tiplere ayırmıştır. Bu çalışmalardan birinde Alizadeh ve ekibi, hastalığı GCB-DBBHL ve ABC-DBBHL alt tipleri ve kalan %10-15’i sınıflandırılmayan hastalık grubu şeklinde üçe ayırmıştır. Bu alt tipler, B hücresi farklılaşmasının farklı aşamalarından kaynaklanır ve tümör proliferasyonunu ve hayatta kalmasını destekleyen farklı onkogenik anormallikler kazanır. Hastalığın moleküler patogenezinde, prognozunda ve tedaviye yanıtında birtakım farklılıklara sahip olduğu için önemlidir (Alizadeh ve ark., 2000). Çalışmamızdaki olguları, hastalığın moleküler alt tiplerine göre değerlendirmemizin temelini de bu farklılıkları tespit edebilme düşüncesi oluşturmaktadır.

DBBHL’nin moleküler alt tiplerine göre sınıflandırdığımız 9 tane GCB, 11 tane GCB dışı hastaların klinik bulgularında (B semptomu, ECOG performans durumu, kemik iliği

tutulumu, *Bulky* hastalık durumu, ektranodal tutulu alan sayısı, Ann-Arbor evresi, R-IPI Skorlama ve ECOG performans durumu) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Vakalarımızın tanı aldıkları dönemde ölçülen laboratuvar verileri (serum LDH, nötrofil, trombosit, lenfosit, beta-2 mikroglobulin, albumin, hemogloblin düzeyleri) ve prognostik verileri (tedavi rejimi, interim PET takibi, tedavi sonu yanıtı, nüks durumu, aktif tedavi durumu ve sağkalım) değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$).

İmmün sistemimiz, kanser hücrelerini algılamada, kontrol altına almada ve yok etmede merkezi bir rol oynar. Fakat immün sistemin kontrol mekanizmalarını manipüle ederek immün gözetiminden kaçmayı başaran kanser hücreleri çoğalıp yayılmaya devam eder. T hücre fonksiyonunu bloke eden immün kontrol noktalarının baskılanması bir anti-kanser stratejisidir ve kanser hücrelerinin klinik progresyonunda dramatik biçimde önemlidir. Bu sebeple immün kontrol noktası inhibitörlerini hedef alan immünoterapi, kanser tedavisi üzerine yapılan çalışmalarla yerini sağlamlaştıran oldukça başarılı bir stratejidir (Hirata ve Sahai, 2017).

PD-1/PD-L1 sinyal yolağı, tümör mikroçevresinde immün toleransın indüklenmesini ve sürdürülmesini kontrol eder. PD-1 ve ligandları PD-L1 veya PD-L2'nin aktivitesi, kanserde T hücresi aktivasyonundan, proliferasyonundan, sitotoksik sekresyondan ve dejenere edici anti-tümör immün tepkilerinden sorumludur. PD-1/PD-L1 yolağı; PI3K/AKT, MAPK, JAK-STAT, WNT, NF- κ B ve Hedgehog gibi karsinogeneizde kritik rol oynayan sinyallerle modüle edilebilir. Ayrıca malign hematolojik hastalıklarda rol oynayan bazı mikroRNA'ların (miR-155, miR-34, miR-33a, miR-21, miR-873, miR-146a) ve uzun kodlanmayan RNA'ların (AFAP1-AS1, NKX2-1-AS1, UCA1, SNHG20, MALAT1) PD-1/PD-L1 yolağıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Han ve ark., 2020).

Klinik bakış açısı göz önüne alındığında PD1/PD-L1 yolağının önemi, yumurtalık kanseri (Hamanishi ve ark., 2007), meme kanseri (Haghshenas ve ark., 2011), kolorektal kanser (Catalano ve ark., 2018), mide kanseri (Wu ve ark., 2006), baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu (Hsieh ve ark., 2019), küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (Yin ve ark., 2014), Hodgkin lenfoma (Ansell ve ark., 2015), diffüz büyük B hücreli lenfoma da (Armand ve ark., 2013) dahil olmak üzere çok çeşitli tümör tiplerinde incelenmiştir.

PD-1 ekspresyonuna yönelik bir çalışmada, anjiyoimmünoblastik T-hücre lenfomasında *PD-1* ifadesinin, anaplastik büyük hücreli lenfoma ve primer kütanöz T hücre lenfoma türlerine göre daha fazla olduğu bildirilmiştir (de Leval ve ark., 2007). Yapılan bir başka çalışmada ise hem DBBHL tümör hücrelerinde hem de tümör mikroçevresindeki *PD-1/PD-L1* ekspresyon seviyesinin yüksekliğinin kötü prognostik etkiye neden olabileceği gösterilmiştir (Rosenwald ve ark., 2003).

PD-L1, hem DBBHL tümör B hücreleri tarafından hem de makrofajlar gibi immün mikro-ortamlarından malign olmayan hücreler tarafından eksprese edilir. DBBHL vakalarının yaklaşık %20-30'unda *PD-L1* ekspresyonu rapor edilmiştir. DBBHL'deki *PD-L1* seviyelerini araştıran çalışmaların geneli GCB dışı DBBHL alt tiplerinde daha yüksek ekspresyon oranları bildirmiştir (Gravelle ve ark., 2017). Buna karşılık Andorsky ve arkadaşlarının çeşitli NHL hücre hatları üzerinde yaptıkları araştırmada, anaplastik büyük hücreli lenfomada *PD-L1* fazla eksprese edilirken B-hücresi NHL'de daha az eksprese edildiğini tespit etmişlerdir. Ek olarak PD-L1 blokajının IFN- γ , GM-CSF, IL-1, IL-6, IL-8, IL-13, TNF- α ve MIP-1 α salgılanmasını arttırdığını ve PD-L1 molekülünün lenfoma immünoterapisi için önemli bir hedef olabileceğini vurgulamışlardır (Andorsky ve ark., 2011a). Bir başka çalışmaya göre ABC-DBBHL'de numune başına PD-L1⁺ tümör hücrelerinin yüzdesi, GCB-DBBHL'den 8 kat daha yüksek olduğu ancak DBBHL'nin her iki alt tipinde de *PD-L2* ekspresyonu açısından anlamlı bir ilişki bulunmadığı belirtilmiştir (Laurent ve ark., 2015). *PD-L1*'in aksine DBBHL tümör hücrelerinin, düşük seviyede hücre yüzeyi *PD-1* eksprese ettiği düşünülmektedir. Ancak Kiyasu ve arkadaşlarına ait bir çalışmada PD-1⁺ tümör infiltre edici lenfosit (TIL) sayısının GCB-DBBHL'de daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Kiyasu ve ark., 2015b).

Diffüz büyük B hücreli lenfomada, tümör infiltre edici lenfositlerin PD1/PDL1 durumunu araştıran bir çalışmaya göre PD1'in ortalama floresan yoğunluğunun (MFI), DBBHL örneklerinin TIL-T ve CD8⁺TIL'lerinde sağlıklı bireylerin CD3⁺T ve CD8⁺T hücrelerinininkinden önemli ölçüde daha yüksek bulunduğu ve hastalığın prognozunu olumsuz etkilediği belirtilmiştir (Chen ve ark., 2021).

Bizim çalışmamızdaki kantitatif PZR yönteminin sonuçlarına göre hastaların *PD-1* ve *PD-L1* mRNA ekspresyon seviyeleri, kontrol grubuna göre daha yüksekti (sırasıyla $p=0.001$, $p=0.001$). Hastalığın alt tiplerinde *PD-1* ve *PD-L1* ekspresyon seviyeleri bakımından anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.05$). *PD-1* ve *PD-L1* ekspresyonlarındaki bu değişimin DBBHL progresyonunda önemli rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızdaki bir diğer yöntem olan Akış Sitometri sonuçlarına göre hasta ve kontrol grupları arasında sadece CD4⁺PD-1⁺ ve CD4⁺PD-L1⁺ hücre ekspresyon (%) düzeylerinin istatistiki önemi olup hastalarda daha fazla olduğu belirlendi (sırasıyla $p=0.010$, $p=0.002$). Bulgumuz literatürle uyumludur (Nagasaki ve ark., 2020, Vetsika ve ark., 2017, Xu ve ark., 2001)

İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olmamasına karşın CD4⁺, CD4⁺CTLA-4⁺, CD8⁺, CD8⁺PD-1⁺, CD8⁺PD-L1⁺, CD8⁺CTLA-4⁺ ve CD3⁺CD4⁺PD-1⁺PD-L1⁺ eksprese eden hücre yüzdeleri hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla daha yüksek bulunmuştur ($p>0.005$). Benzer bir şekilde hastalığın alt tiplerinde de bu hücre gruplarının ekspresyon yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p>0.05$). Fakat GCB alt tipinde; CD4⁺, CD4⁺PD-L1⁺, CD4⁺CTLA-4⁺, CD8⁺, CD8⁺PD-1⁺, CD3⁺CD4⁺PD-1⁺PD-L1⁺, CD3⁺CD8⁺PD-1⁺PD-L1⁺ hücre ekspresyon (%) düzeyleri, GCB dışı gruba göre daha yüksek bulunmuştur ($p>0.005$). GCB dışı alt tipinde ise CD4⁺PD-1⁺, CD8⁺PD-L1⁺ ve CD8⁺CTLA-4⁺ eksprese eden hücre yüzdeleri, GCB grubunda göre daha yüksektir ($p>0.005$). Bu sonuç daha önce yapılan çalışmalarla benzer çıkmıştır (Kotsakis ve ark., 2019, Kotsakis ve ark., 2016, Vetsika ve ark., 2017, Xu ve ark., 2001).

GCB-DBBHL alt tipi daha sık olarak *BCL2* translokasyonları, *PTEN* veya *ING1* delesyonları, *MDM2* kazançları veya amplifikasyonları ve *p53* mutasyonları gibi genetik değişikliklerle kendini gösterir. Buna karşılık ABC-DBBHL, *BCR* aktivasyonu (*CD79A/B* mutasyonları nedeniyle) sergiler ve *BCL2* amplifikasyonları veya *INK4-ARF* delesyonları gibi diğer genetik değişikliklerle birlikte bulunur (Gravelle ve ark., 2017). *PD-L1/PD-L2* gen lokuslarının genetik anormallikleri hem solid hem de hematolojik tümörlerde *PD-L1* ekspresyonunun anahtar mekanizmasını temsil eder. *PDL-1* kopya sayısı değişikliklerinin (CNA) en yüksek frekansları, vulva ve serviks skuamöz hücreli karsinomlarında ve meme kanserinde, klasik Hodgkin lenfomada ve primer mediastinal B hücreli lenfomada görülmüştür. Öte yandan KHDAK ve DBBHL’de CNA’ların düşük olduğu veya bulunmadığı bildirilmiştir (Han ve ark., 2020).

Bireysel çalışmalar dışında Kanser Genom Atlas veri setleri (22 kanser türü, 9771 tümör) kullanılarak *PD-L1*’deki genetik değişikliklerin geniş yelpazeli in siliko analizi yapılmıştır. İlginç bir şekilde, *PDL-1*’in delesyonları, kazanımlardan daha yaygın bulunmuştur. Kopya sayısı kazanımları ise en sık yumurtalık kanseri, baş ve boyun kanseri, mesane kanseri, servikal ve endoservikal kanser, sarkomlar ve kolorektal kanserlerde gözlenmiştir. *PD-L1* CNA’larının, birçok kanser türünde *PD-L1* mRNA ekspresyonu değişiklikleri ile önemli ölçüde ilişkili olduğu ve *PD-L1* kazanımlarına sahip tümörlerin yüksek mutasyon yükü barındırdıkları vurgulanmıştır. Ayrıca hem *PD-L1* amplifikasyonlarının hem de delesyonlarının kötü prognoz ile ilişkili olduğu iddia edilmektedir (Budczies ve ark., 2016).

Hastalıklara yatkınlık ile yakından ilişkili olan bir başka genetik değişiklikler polimorfizm (SNP)’lerdir. Konu bu açıdan ele alındığında, *PD-1* polimorfizmlerinin meme kanseri (Hua ve ark., 2011), kolon kanseri (Mojtahedi ve ark., 2012a), serviks kanseri (Li ve ark., 2016), gastrik kanser (Savabkar ve ark., 2013), hepatosellüler karsinom (Bayram ve ark., 2012), gastrik kardial adenokarsinoma (Tang ve ark., 2015),

özofagus kanseri (Qiu ve ark., 2014) ve diğer pek çok kanser tipine yatkınlık ile ilişkili olduğunu göstermiştir.

Çin’de, *PD-1* polimorfizmleri ve meme kanseri ilişkisinin araştırılması için sporadik meme kanserine sahip 490 olgu ve sağlıklı 512 kişiden oluşan bir vaka kontrol çalışması yapılmıştır. İncelenen polimorfizmler; *PD-1.1* (rs36084323), *PD-1.5* (rs2227981) *PD-1.9* (rs2227982) ve rs7421861’dir. Rs36084323 polimorfizmi genin promotor bölgesinde, rs7421861 polimorfizmi İntron I’de, *PD-1.9* (rs2227982) ve rs2227981 polimorfizmleri ise ekzon 5’te bulunmaktadır. Rs36084323 (G/G) ve rs2227981 (C/T) genotiplerinin sıklığı hastalarda daha düşük bulunmuştur. Sonuç olarak *PD-1* (rs36084323) ve *PD-1* (rs2227981) polimorfizmi ile hastalığın güçlü bir ilişkisi olduğu gösterilmiştir (Hua ve ark., 2011).

PD-1 (rs2227981) polimorfizminin kolorektal kanser üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, C/T genotip sıklığı hastalarda kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur (Mojtahedi ve ark., 2012a). 324 KHDAK hastasıyla yapılan başka bir çalışmada ise C/T genotip sıklığı hastalarda yüksek bulunmuş ve bu genotipin ileri KHDAK riskini önemli ölçüde artırdığı düşünülmüştür (Yin ve ark., 2014)

Mide kanseri ile *PD-1* (rs2227981) polimorfizminin araştırıldığı bir çalışmada ise C/C genotipinin, kontrol grubunda hastalardan daha sık gözlendiği ancak istatistiki bir ilişkinin olmadığı, C/T genotip sıklığının hastalarda daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Savabkar ve ark., 2013). Gastrik kardial adenokarsinoma hastalarında, *PD-1* (rs10204525), *PD-1* (rs7421861), *PD-1.9* (rs2227982) polimorfizmlerinden sadece rs2227982 polimorfizminin gastrik kardial adenokarsinoma riskiyle ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (Tang ve ark., 2015). Özofagus kanseri ve *PD-1* (rs10204525), *PD-1* (rs7421861), *PD-1.9* (rs2227982) polimorfizmlerinin incelendiğinde bir başka çalışmada *PD-1* rs10204525 polimorfizminin özofagus kanseriyle ilişkili olabileceği belirtilmiştir (Qiu ve ark., 2014).

Hoseini ve arkadaşlarının 2020 yılındaki çalışmasında *PD-1* gen polimorfizmleri (*PD-1* rs11568821 ve *PD-1* rs2227981) ile NHL riski arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Hoseini ve ark., 2020). Bununla birlikte literatürde *PD-1* polimorfizmleri ile DBBHL'nin ilişkisine dair çalışmalara rastlanamadı.

Çalışmamıza dahil edilen toplam 40 olguda *PD-1* rs2227981 (C/T) SNP'sinin 2 genotipi (C/T ve T/T) tespit edildi. Genotip sıklığı açısından hasta ve kontrol grubunda istatistiksel bir fark yoktu ($p>0.05$). Ancak C/T genotipine sahip hastaların, C/T genotipine sahip sağlıklı bireylere kıyasla *PD-1* ekspresyon seviyesi yüksekti ($p=0.012$). T/T genotipi için hasta ve kontrol grubunda anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$). Hastalardaki yüksek *PD-1* ifade düzeyi ile bu SNP'nin ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Hastalığın alt tiplerine göre bu genotipler arasında istatistiki bir fark yoktu ($p>0.05$).

PD-L1 genindeki bazı SNP'ler, birtakım kanserlerin gelişme riskinde ve hastalığın prognozunda rol oynamaktadır. Akciğer adenokarsinomu ve skuamöz hücreli karsinomda *PD-L1* ekspresyonu ve *PD-L1* genindeki üç SNP'nin (rs4143815, rs822336 ve rs822337) araştırıldığı bir çalışmada, *PD-L1* rs4143815 (C/C) genotipinin KHDAK hastalarında daha fazla gözlemlendiği, *PD-L1* rs4143815 (G/G) genotipine sahip hastaların sağkalım süresinin daha kısa olduğu, *PD-L1* ekspresyonunun da skuamöz hücreli karsinomda daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Yeo ve ark., 2017). C/C genotipinin, miR-570 aktivitesini ve ifadesini artırarak anti-tümoral yanıtların inhibe edilmesine yardımcı olduğu rapor edilmiştir (Wang ve ark., 2013).

2018'de Tan ve ekibinin *PD-L1* rs4143815 (C/G) ve yumurtalık kanserinin ilişkisini aydınlatmak için yaptıkları çalışmada G alleli olan hastalarda ve özellikle GG genotipli bireylerde hastalık riskinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Tan ve ark., 2018). *PD-L1* polimorfizmlerinin hepatosellüler karsinom duyarlılığı üzerine yapılan bir çalışmada, *PD-L1* rs2297136 (C/T), *PD-L1* rs4143815 (C/G), *PD-L1* rs2890658 (A/C) ve *PD-L1* rs17718883 (C/G) SNP'leri incelenmiştir. *PD-L1* rs2297136 (T/T) genotipi ile *PD-L1* rs4143815 (G/G) genotipinin artan HCC riskleri ile önemli ölçüde ilişkili olduğu

ifade edilmiştir (Xie ve ark., 2018). Öte yandan *PD-L1* rs2890685 SNP'sinin NHL hastaları için önemli, *PD-L1* rs4143815 SNP'sinin önemsiz olduğu rapor edilmiştir (Hoseini ve ark., 2020).

Çalışmamıza dahil edilen toplam 40 olguda *PD-L1* rs4143815 (C/G) SNP'sinin 3 genotipi (G/G, C/G ve C/C) belirlendi. Genotip sıklığı açısından hasta ve kontrol grubunda istatistiksel bir fark yoktu ($p>0.05$). Fakat hasta ve kontrol gruplarında *PD-L1* (rs4143815) polimorfizminin *PD-L1* ekspresyon seviyelerine etkisi incelendiğinde en yüksek ekspresyon seviyeleri sırasıyla C/G, G/G ve C/C genotipidir. C/G genotipine sahip hastaların, C/G genotipine sahip sağlıklı bireylere göre *PD-L1* ifadesi daha yüksekti ($p=0.007$). G/G genotipine sahip hastalarda kontrollere göre yüksekti ($p=0.003$). C/C genotipi için her iki grupta anlamlı bir fark yoktu ($p>0.05$). Sonuç olarak hastalarda yüksek *PD-L1* ifade düzeyi ile bu SNP'nin ilişkili olduğu söylenebilir. Hastalığın alt tiplerine göre bu genotipler arasında istatistiki bir fark yoktu ($p>0.05$).

Projemizde araştırdığımız bir başka sinyal yolağı ise CTLA-4/CD80'dir. İmmün sisteminin diğer inhibitör reseptörü CTLA-4'ün ana rolü TCR'nin antijenik uyarımıyla T hücrelerinin aktivasyonunu regüle etmektir. CTLA-4'ün bu fonksiyonu, antijen sunan hücrelerde eksprese edilen *CD80* ve *CD86* molekülleri dahil olmak üzere B7 ligandlarına bağlandığında gerçekleşir. Ayrıca *CD80*'in çözünür bir formunun *PD-L1*'e bağlandığı gösterilmiştir. Bu bağlanmayla immünosupresif *PD-1/PD-L1* ve CTLA-4/CD80 yolakları engellenir. *PD-L1* bloke edici antikolar, tümörle ilişkili dendritik hücreler (DC'ler) üzerinde *CD80/PD-L1* etkileşimini önler ve böylece *CD80* aracılı anti-tümör immün tepkisi desteklenir. Önceki çalışmalarda *CD80* ekspresyon seviyesinin *CD80*'in tümör hücreleri üzerindeki pro-/anti-onkogenik rolünü düzenlenmesinde etkili olduğunu gösterilmiştir. Bir araştırmada, *CD80*'in aşırı ekspresyonunun T hücresi aktivasyonunu desteklediği, başka bir çalışmada ise düşük *CD80* yüzey ekspresyonunun kanser hücrelerinin bağışıklık sistemine karşı bir avantaj sağladığı iddia edilmiştir (Vackova ve ark., 2021).

Mide kanseri üzerine yapılan bir çalışmada, *CD80*'in ekspresyonunun, normal dokulara kıyasla tümör dokularında daha az ifade edildiği ve bu durumun tümörün farklılaşma

derecesi ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Azalmış *CD80* ekspresyonunun, mide kanseri hastalarında kötü bir prognoza işaret ettiği vurgulanmıştır (Feng ve ark., 2019). Benzer şekilde hepatosellüler kanserde, kolon kanserinde ve ALL’de *CD80* ifadesi düşük bulunmuştur (Fujiwara ve ark., 2004, Luczynski ve ark., 2006, Tirapu ve ark., 2006). Akut miyeloid lösemili fare modelinde çalışan bir araştırma grubu ise aksini kanıtlamıştır. Yüksek *PD-L1* ve *CD80* ekspresyonuna sahip fare lösemik hücrelerinin, sitotoksik T hücre aracılı yıkıma karşı daha dirençli olduğu ve bu nedenle *PD-L1* ve *CD80*’in aşırı ekspresyonuyla lösemik hücrelerin tümör bağışıklığından kaçıştığı, akut lösemide yeni bir tümör dormansi mekanizmasını temsil edebileceğini savunmuştur (Saudemont ve Quesnel, 2004).

Kanser hücreleri salgıladıkları TGF- β sayesinde *CTLA-4*’ün anormal ekspresyonuna neden olur. Böylece immünsüpresyonun mekanizmalarından biri olan “T hücre tükenmesi” gerçekleşir (Buchbinder ve Desai, 2016, Rowshanravan ve ark., 2018).

Kanser hastalarından alınan neoplastik hücrelerde *CTLA-4* ekspresyonunun hem hematolojik malignitelerin hem de solid tümörlerin ilerlemesine katkı sağladığını göstermiştir. Farklı tümör tiplerindeki farklı *CTLA-4* ekspresyon seviyeleri klinik sonucu etkileyebilmektedir (Zhao ve ark., 2018). Örneğin 2016 yılında Ciszak ve meslektaşları, düşük ve yüksek *CTLA-4* ekspresyonu olan kronik lenfositik lösemi (KLL) hastalarında *CTLA-4* blokajının KLL hücrelerindeki proliferasyon aktivitesi ve apoptoz üzerindeki etkisini araştırmıştır. Yüksek miktarda *CTLA-4* eksprese eden KLL grubunda, KLL hücre yüzeyindeki *CTLA-4* blokajının, Ki67(+) hücre yüzdelerinde önemli bir artışa ve apoptotik hücrelerin oranında azalma eğilimine yol açtığı bulunmuştur. Aynı çalışmada *CTLA-4* blokajının, yüksek *CTLA-4* ekspresyonu sergileyen KLL hastalarından alınan lösemik hücrelerde hayatta kalma yanlısı sinyalleri indüklediği ilk kez rapor edilmiştir. Sonuç olarak yüksek *CTLA-4* mRNA seviyeleri, B-hücreli kronik lenfositik lösemide iyi klinik sonuç ve tedaviye başlama süresinin daha uzun olmasıyla ilişkilendirilmiştir (Ciszak ve ark., 2016). Bunun aksine bir başka çalışmada meme kanserine sahip hastaların tümör hücrelerinde hem protein hem de mRNA düzeyinde yüksek *CTLA-4* ekspresyonu gösterdiği, yüksek *CTLA-4* mRNA düzeyi olan hastalarda bariz aksiller lenf nodu metastazlarının, daha yüksek klinik

evrenin ve daha kötü prognozun olduğu vurgulanmıştır (Mao ve ark., 2010). Ayrıca mezotelyoma, KHDAK, nazofaringeal karsinom ve melanomada yüksek *CTLA-4* ekspresyonu olan hastaların, düşük ekspresyonu olanlara göre daha kötü prognoza sahip olduğu belirtilmiştir (Zhao ve ark., 2018).

Çalışmamızdaki kantitatif PZR yönteminin sonuçlarına göre hastaların *CTLA-4* ekspresyon seviyesinin, kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu söyleyebiliriz ($p=0.001$). Bununla birlikte *CD80* gen ekspresyonu kontrol grubunda daha yüksekti ($p=0.110$). Bu durum, immün yanıt için T hücrelerinin uyarılamamasından ve kanser hücrelerinin bağışıklık gözetiminden kaçışını kolaylaştırmadaki potansiyel rolünden kaynaklanabilir. Hastalığın alt tiplerinde *CTLA-4* ve *CD80* ekspresyon seviyeleri bakımından anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.05$). *CTLA-4* gen ekspresyonundaki bu değişiminin DBBHL progresyonunda ve prognozunda önemli olabileceğine inanıyoruz. Akış Sitometri sonuçlarına göre hem hasta ve kontrol gruplarında hem de hastalığın alt tiplerinde *CTLA-4* hücre ekspresyon (%) düzeylerinde istatistiki bir anlam bulunmadı ($p>0.05$).

CTLA-4 geninde 100'den fazla tek nükleotid polimorfizmi tanımlanmıştır. *CTLA-4* rs231775 (G/A), *CTLA-4* rs3087243 (G/A), *CTLA-4* rs4553808 (A/G), *CTLA-4* rs5742909 (C/T), *CTLA-4* rs733618 (A/G), *CTLA-4* rs16840252 (C/T) polimorfizmleri, bazı otoimmün hastalıklarda ve kanserlerde önemli bir rol oynar (Zhao ve ark., 2018).

Birkaç araştırma, bazı *CTLA-4* gen polimorfizmlerinin kanser gelişimi veya ilerlemesi ile bağlantılı olduğunu ileri sürmüştür (Dai ve ark., 2017). Ancak bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar çelişkili kalmıştır. Örneğin yapılan bir çalışmada, *CTLA-4* rs733618 (A/G) ve rs4553808 (A/G) polimorfizmlerinin meme kanseri riskini arttırdığı, rs231775 (G/A) ve rs3087243 (G/A) polimorfizmlerinin ise meme kanseri riski ile anlamlı ilişkilerinin olmadığı gösterilmiştir (Li ve ark., 2012). Fakat diğer çalışmalarda ise rs3087243 ve rs231775 polimorfizmlerinin meme kanseri riskini azalttığı, rs733618 (A/G) SNP'sinin meme kanseri riski ile ilişkili olmadığı bulunmuştur (Sun ve ark., 2008, Wang ve ark., 2007).

2012 yılında Kilfoy ve arkadaşlarının, 496 NHL hastasının verileriyle analizini yaptıkları retrospektif bir çalışmada DBBHL hastalarının genel sağkalımı ile *CTLA-4* rs231775 (A/G) SNP'sinin bir ilişkisi olabileceği belirtilmiştir (Aschebrook-Kilfoy ve ark., 2012).

Çalışmamıza dahil edilen toplam 40 olguda *CTLA-4* rs231775 (A/G) SNP'sinin 3 genotipi (A/G, G/G ve A/A) saptandı. Genotip sıklığı açısından hasta ve kontrol grubunda istatistiksel bir fark yoktu ($p>0.05$). Fakat hasta ve kontrol gruplarında *CTLA-4* (rs231775) polimorfizminin *CTLA-4* ekspresyon seviyelerine etkisi incelendiğinde en yüksek ekspresyon seviyeleri sırasıyla G/A, A/A ve G/G genotipidir. G/A genotipine sahip hastalarda, G/A genotipli kontrollere göre *CTLA-4* ifadesi daha yüksekti ($p=0.006$). Diğer genotipler için her iki grupta da anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$). Hastalarda yüksek *CTLA-4* ifade düzeyi ile bu SNP'nin ilişkili olabileceğini tahmin etmekteyiz. Hastalığın alt tiplerine göre bu genotipler arasında istatistiki bir fark yoktu ($p>0,05$).

CD80 geninin üçüncü ekzonundaki (rs2228017, 452G/A) SNP, valinin valine değişimini sergileyen sessiz bir değişikliktir. Yapılan araştırmalar bu SNP ile Sarkoidoz hastalığında (Handa ve ark., 2005), multipl skleroz hastalığında (Teutsch ve ark., 2004, Weinshenker ve ark., 2000), RA ve SLE hastalıklarında (Matsushita ve ark., 2000b) anlamlı bir ilişkinin olmadığını ortaya koymuştur. Ancak başka bir çalışmada *CD80* geninin 3'-UTR bölgesinde gözlenen rs1599795 (A/T) SNP'sine ait A allelinin kolorektal kanser riskini arttırdığını rapor edilmiştir (Wu ve ark., 2015).

Çalışmamıza dahil edilen toplam 40 olguda *CD80* rs2228017 (G/A) SNP'sinin 2 genotipi (G/G ve G/A) tespit edildi. Genotip sıklığı açısından hasta ve kontrol grubunda istatistiksel bir fark yoktu ($p>0.05$). Ek olarak hasta ve kontrol gruplarında *CD80* (rs2228017) polimorfizminin *CD80* ekspresyon seviyelerine etkisinin istatistiksel anlamı bulunamadı ($p>0,05$). Hastalığın alt tiplerine göre bu genotipler arasında istatistiki bir fark yoktu ($p>0,05$).

BCL2 ve *BCL-xL* gibi anti-apoptotik genlerde ve *BCL6* ve *MYC* gibi proto-onkogenlerde görülen genetik aberasyonlar DBBHL oluşumu ve progresyonunda kritik konuma sahiptir. DBBHL olgularının yaklaşık %30'unda *BCL2* geni ile *Ig* ağır zincir genlerine ait karakteristik t(14;18)(q32;q21) görülmektedir (Hill ve ark., 1996).

BCL6 geninde ise translokasyonlar, en sık *IgH* lokusuyla t(3;14)(q27;q32), daha seyrek *IgL* lokusuyla t(3;22)(q27;q11) ve *IgK* lokusuyla t(3;2)(q27;p12) gerçekleşir (Lu ve ark., 2013). Nogai ve ekibinin çalışmasında hastalığın alt tiplerine göre *BCL2* translokasyonu: t(14;18); GCB-DBBHL (%45), ABC-DBBHL (%0), *BCL2* amplifikasyonu (18q21); GCB-DBBHL (%10), ABC-DBBHL (%34), *BCL6* translokasyonu GCB-DBBHL (%10), ABC-DBBHL (%24) dağılım göstermektedir (Nogai ve ark., 2011). 1997 ve 2008 yılları arasında takibi yapılan 242 DBBHL hastasının incelendiği retrospektif bir çalışma göre 5 yıllık progresyonsuz sağkalım ve genel sağkalım açısından *BCL6*(+) DBBHL, *BCL6*(-) DBBHL'den daha üstün olduğu belirlenmiştir. Ayrıca *BCL2*(+) DBBHL'de *BCL6* ifadesi, *BCL2*(+)/*BCL6*(-) DBBHL'den daha uzun progresyonsuz sağkalım ve genel sağkalım ile ilişkilendirilmiş olmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Advani ve ark., 2010). Yüksek riskli 73 DBBHL vakasında *BCL2* ekspresyon profilinin incelendiği bir çalışmada vakaların %37'sinde (hastalığın alt tipleri arasında bir fark olmaksızın) *BCL2* ekspresyonu gözlenmiştir (Hallack Neto ve ark., 2010). *BCL6* gen translokasyonunu barındıran NHL örneklerinin araştırıldığı bir başka çalışmada, *BCL6* mRNA seviyelerinde anlamlı bir artış tespit edilememiştir (Lossos ve ark., 2003).

MYC geninin en sık translokasyon yaptığı partneri *IgH* lokusu olup t(8;14)(q24;q32) şeklindedir. Öte yandan *MYC* translokasyonuna sahip olguların yarısında *BCL2* ve/veya *BCL6* translokasyonları da eşlik eder. WHO'nun 2016 yılındaki sınıflamasında bu kompleks karyotipe sahip olgular "yüksek gradeli B hücreli lenfoma veya double/triple hit" lenfoma sınıfında değerlendirilmektedir (Nguyen ve ark., 2017, Swerdlow ve ark., 2017).

Çalışmamıza alınan hastaların moleküler tetkiklerinde, hastaların hiçbirinde t(8;14)(q24;q32) (MYC;IGH), t(14;18)(q32;q21) (IGH;MALT1), t(14;18)(q32;q21) (IGH;BCL2) ve t(11;14)(q13;q32) (IGH;CCND1) translokasyonları gözlenmedi.

Literatürdeki diğer çalışmalara benzer şekilde, bizim çalışmamızda da *PD-1*, *PD-L1* ve *CTLA-4* bağışıklık kontrol noktası reseptör ekspresyon ifadeleri, yeni tanı DBBHL hastalarında sağlıklı bireylere göre yüksek bulunmuştur. Diğer kanserlerde de olduğu gibi DBBHL’de bu hücrelerdeki artışın görülmesi beklenen bir sonuçtur; çünkü bağışıklık kontrol noktası reseptörlerinin ifadelerindeki artış kanser hücrelerinin yayılımı için zemin oluşturmaktadır. Literatür incelendiğinde bağışık kontrol noktası reseptörleri ifadesindeki azalma otoimmün hastalıklara eğilim gösterirken bu reseptörlerin ifadesindeki artış ise kanser hastalıklarına eğilim yönündedir. Bu durum, bağışıklık kontrol noktalarının, immün homeostazı ve toleransı için son derece önemli olduğunu göstermektedir. Özellikle T hücreleri üzerinde bulunan immün kontrol noktası moleküllerinin tümör hücreleri tarafından aşırı ifadesi, tümör mikroçevresinde tümöre özgü T hücre bağışıklığı için kritiktir. Bu sebeple bahsi geçen genlerdeki genetik değişikliklerin, genin ifadesini etkileyebileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca bu genlerin araştırılmasının DBBHL’nin patogenezi ve prognozunun daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacağına inanmaktayız.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Erişkin Hematoloji Polikliniği'nde Aralık 2019 - Kasım 2020 yılları arasında yeni tanı konulmuş (daha önce tedavi almamış) yirmi Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma olgusu ve rutin biyokimyasal tetkikleri incelenen sağlıklı yirmi olgu olmak üzere toplam 40 olgu ile yapıldı.

Literatür taramalarımıza göre DBBHL'de *PD-1*, *PD-L1*, *CTLA-4* ve *CD80* gen varyasyonlarının, söz konusu genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkilerinin birlikte ele alındığı bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamız bu konuyu araştıran ilk çalışmadır. Literatürdeki bu boşluğu doldurmak amacıyla planlanan çalışmamızın ana sonuçları aşağıda belirtilen maddeler halinde özetlenebilir:

1. Olguların yaş aralığı 24 ile 83 arasında değişmekte olup tanı aldığı dönemdeki medyan yaşı 59,95 idi. Olguların 10'u (%50) kadın, 10'u (%50) erkek cinsiyettedir. Literatürde DBBHL, erkek cinsiyetinde daha fazla görülürken çalışmamızda hasta erkek ve kadın sayısı eşittir. Literatür ile uyumsuzluğun nedeninin hasta örneklem sayısı olduğunu düşünülmektedir. Bu açıdan daha geniş serilerde çalışma yapılması gerekmektedir.
2. Çalışmaya dahil edilen 20 kişilik DBBHL hasta grubunun 9 tanesi Germinal Merkez B Hücreli (GCB) ve 11 tanesi GCB dışı alt tiplerini kapsamaktadır.
3. GCB ve GCB dışı alt tiplere göre sınıflandırdığımız hastaların klinik bulgularında (B semptomu, ECOG performans durumu, kemik iliği tutulumu, *Bulky* hastalık durumu, ektranodal tutulu alan sayısı, Ann-Arbor evresi, R-IPI Skorlama ve ECOG performans durumu) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

4. Olgularımızın tanı aldıkları dönemde ölçülen laboratuvar verilerinde (serum LDH, nötrofil, trombosit, lenfosit, beta-2 mikroglobulin, albumin, hemoglobin düzeyleri) anlamlı bir değer saptanmadı.

Olgularımızın prognostik verileri (tedavi rejimi, interim PET takibi, tedavi sonu yanıtı, nüks durumu, aktif tedavi durumu ve sağkalım) değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Olgularımızın klinik bulguları, laboratuvar verileri ve prognostik değerlendirmeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmayışının hasta sayısındaki azlığa da bağlı olabileceğini düşündürdü. Daha geniş katılımlı çalışmalar bu konudaki soru işaretlerine ışık tutacaktır.

5. Hasta ve kontrol gruplarının *PD-1*, *PD-L1*, *CTLA-4* ve *CD80* genotiplerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

6. Gen ifadesi analizi için tüm örneklerin Ct değerlerinin, “kat-değişimi ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)” yöntemiyle yaklaşık kat değişimi bulundu. Buna göre *PD-1* gen ekspresyonu analizinde kontrol grubunun kat sayısının 1, hasta grubunun kat sayısının 1,62 olduğu tespit edildi. *PD-1* gen ekspresyonunun hasta grubunda daha fazla olduğu söylenebilir ($p=0.001$).

7. *PD-L1* gen ekspresyonu incelendiğinde, kontrol grubunun kat sayısının 1, hasta grubunun kat sayısının 3,67 olduğu belirlendi. *PD-L1* gen ekspresyonu hasta grubunda daha yüksekti ($p=0.001$). Bulgularımız literatür ile uyum göstermektedir.

8. *CTLA-4* gen ekspresyonunda ise kontrol grubunun kat sayısının 1, hasta grubunun kat sayısının 1,48 olduğu saptandı ($p=0.001$). *CTLA-4* gen ekspresyonunun hasta grubunda daha fazla olduğu söylenebilir.

9. *CD80* gen ekspresyonu incelendiğinde, kontrol grubunun kat sayısının 1, hasta grubunun kat sayısının 0,83 olduğu tespit edildi. *CD80* gen ekspresyonu kontrol grubunda daha yüksekti ($p=0.110$). Bu durumun, immün yanıt için T hücrelerinin uyarılamamasından ve kanser hücrelerinin bağışıklık gözetiminden kaçışını kolaylaştırmadaki potansiyel rolünden kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

10. Hastalığın alt tiplerinde bu dört genin ekspresyon seviyeleri için anlamlı bir fark görülmedi. Bu durum, hasta örneklem sayısının azlığından kaynaklanabilir. Dolayısıyla geniş hasta gruplarında test edilmesi faydalı olacaktır.

11. Hasta ve kontrol gruplarında *PD-1* (rs2227981) polimorfizminin *PD-1* ekspresyon seviyelerine etkisine bakıldığında C/T genotipine sahip hastaların, C/T genotipine sahip sağlıklı bireylere kıyasla *PD-1* ekspresyon seviyesi yüksekti ($p=0.012$). T/T genotipi için hasta ve kontrol grubunda anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$). Hastalardaki yüksek *PD-1* ifade düzeyi ile bu SNP'nin ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

12. Hasta ve kontrol gruplarında *PD-L1* (rs4143815) polimorfizminin *PD-L1* ekspresyon seviyelerine etkisi incelendiğinde en yüksek ekspresyon seviyeleri sırasıyla C/G, G/G ve C/C genotipidir. C/G genotipine sahip hastaların, C/G genotipine sahip sağlıklı bireylere göre *PD-L1* ifadesi daha yüksekti ($p=0.007$). G/G genotipine sahip hastalarda kontrollere göre yüksekti ($p=0.003$). C/C genotipi için her iki grupta anlamlı bir fark yoktu ($p>0.05$). Sonuç olarak hastalarda yüksek *PD-L1* ifade düzeyi ile bu SNP'nin ilişkili olabileceği söylenebilir. Bu konudaki bulgularımız, *PD-L1* genindeki değişikliklerin gen regülasyonuna olan etkisinin ülkemizde Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma hastalarında araştırılması gereken bir parametre olabileceğine işaret etmektedir. Bu veriyi desteklemek için daha geniş çaplı çalışmalara ihtiyaç vardır.

13. Hasta ve kontrol gruplarında *CTLA-4* (rs231775) polimorfizminin *CTLA-4* ekspresyon seviyelerine etkisi incelendiğinde en yüksek ekspresyon seviyeleri sırasıyla G/A, A/A ve G/G genotipidir. G/A genotipine sahip hastalarda, G/A genotipli kontrollere göre *CTLA-4* ifadesi daha yüksekti ($p=0.006$). Diğer genotipler için her iki grupta da anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$). Hastalarda yüksek *CTLA-4* ifade düzeyi ile bu SNP'nin ilişkili olabileceği tahmin edilmektedir.

14. Hasta ve kontrol gruplarında *CD80* (rs2228017) polimorfizminin *CD80* ekspresyon seviyelerine etkisinin istatistiksel anlamı bulunamadı ($p>0,05$).

15. Hastalığın alt tiplerine göre *PD-1*, *PD-L1*, *CTLA-4* ve *CD80* polimorfizimleri arasında istatistiki bir fark yoktu ($p>0,05$).

16. Hasta ve kontrol gruplarından elde edilen Akış Sitometri verilerine göre sadece $CD4^+PD-1^+$ ve $CD4^+PD-L1^+$ hücrelerinin ekspresyon (%) düzeylerinin istatistiksel açıdan anlamlı olduğu tespit edilmiştir (sırasıyla $p=0.010$, $p=0.002$). Buna göre $CD4^+PD-1^+$ ve $CD4^+PD-L1^+$ hücrelerinin ekspresyon (%) düzeylerinin, hasta grubunda daha yüksek olduğunu söyleyebiliriz. Ancak hastalığın alt tiplerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p>0.05$).

17. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olmamasına karşın $CD4^+$, $CD4^+CTLA-4^+$, $CD8^+$, $CD8^+PD-1^+$, $CD8^+PD-L1^+$, $CD8^+CTLA-4^+$ ve $CD3^+CD4^+PD-1^+PD-L1^+$ eksprese eden hücre yüzdeleri hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Benzer bir şekilde hastalığın alt tiplerinde de bu hücre gruplarının ekspresyon yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p>0.05$).

18. Çalışmamıza dahil edilen hasta numunelerinde yapılan moleküler tetkikler neticesinde hastaların hiçbirinde $t(8;14)(q24;q32)$ (*MYC*;*IGH*) translokasyonu, $t(14;18)(q32;q21)$ (*IGH*;*MALT1*) translokasyonu, $t(14;18)(q32;q21)$ (*IGH*;*BCL2*) translokasyonu ve $t(11;14)(q13;q32)$ (*IGH*;*CCND1*) translokasyonları gözlenmedi.

Biz bu çalışmada zaman kısalığı ve mali olanaksızlıklar nedeniyle hasta sayısını artıramadığımız gibi tedavi sonrasındaki hasta takiplerini uzun soluklu yapamadık. Fakat elde ettiğimiz sonuçların, bu konuda yapılacak ileriki çalışmalara zemin hazırlayacağı kanısındayız.

KAYNAKLAR

Abbas A.K. LAH, Pillai S. Temel İmmünoloji: İmmün Sistemin İşlevleri ve Bozuklukları4: ELSEVIER; 2015, p: 320.

Abdel Galil SM, Hagrass HA. The role of CTLA-4 exon-1 49 A/G polymorphism and soluble CTLA-4 protein level in egyptian patients with Behcet's disease. Biomed Res Int. 2014;2014: 513915.

Advani P, Ngamphaiboon N, Pukiat S, Chavez J, Deeb G, Elefante A, et al. The Expression of Bcl-6 In Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL) Is Associated with Improved Progression Free Survival and Overall Survival Following Front-Line Rituximab-Chemotherapy. Blood. 2010;116 (21): 5073.

Ahearne MJ, Bhuller K, Hew R, Ibrahim H, Naresh K, Wagner SD. Expression of PD-1 (CD279) and FoxP3 in diffuse large B-cell lymphoma. Virchows Archiv. 2014;465 (3): 351-358.

Akasaka T, Akasaka H, Ueda C, Yonetani N, Maesako Y, Shimizu A, et al. Molecular and clinical features of non-Burkitt's, diffuse large-cell lymphoma of B-cell type associated with the c-MYC/immunoglobulin heavy-chain fusion gene. Journal of Clinical Oncology. 2000;18 (3): 510-510.

Akinleye A, Rasool Z. Immune checkpoint inhibitors of PD-L1 as cancer therapeutics. Journal of hematology & oncology. 2019;12 (1): 1-13.

Alatrash G, Daver N, Mittendorf EA. Targeting Immune Checkpoints in Hematologic Malignancies. Pharmacol Rev. 2016;68 (4): 1014-1025.

Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. Nature. 2000;403 (6769): 503-511.

Andorsky DJ, Yamada RE, Said J, Pinkus GS, Betting DJ, Timmerman JM. Programmed death ligand 1 is expressed by non-hodgkin lymphomas and inhibits the activity of tumor-associated T cells. Clin Cancer Res. 2011a;17 (13): 4232-4244.

Andorsky DJ, Yamada RE, Said J, Pinkus GS, Betting DJ, Timmerman JM. Programmed death ligand 1 is expressed by non-Hodgkin lymphomas and inhibits the activity of tumor-associated T cells. Clinical cancer research. 2011b;17 (13): 4232-4244.

Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, Halwani A, Scott EC, Gutierrez M, et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. New England Journal of Medicine. 2015;372 (4): 311-319.

Armand P, Welch S, Kim HT, LaCasce AS, Jacobsen ED, Davids MS, et al. Prognostic factors for patients with diffuse large B cell lymphoma and transformed indolent lymphoma undergoing autologous stem cell transplantation in the positron emission tomography era. *British journal of haematology*. 2013;160 (5): 608-617.

Aschebrook-Kilfoy B, Zheng T, Foss F, Ma S, Han X, Lan Q, et al. Polymorphisms in immune function genes and non-Hodgkin lymphoma survival. *Journal of Cancer Survivorship*. 2012;6 (1): 102-114.

BAKIRTAŞ M, Bahar U, BAŞCI S, DARÇIN T, ŞAHİN D, YILDIZ J, et al. Evaluation of seasonality in the diagnosis of diffuse large B cell lymphoma in Turkey. *Journal of Health Sciences and Medicine*. 4 (2): 123-126.

Barbaros MB, Dikmen M. Kanser immünoterapisi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*. 2015;31 (4): 177-182.

Bayram S, Akkiz H, Ulger Y, Bekar A, Akgollu E, Yildirim S. Lack of an association of programmed cell death-1 PD1.3 polymorphism with risk of hepatocellular carcinoma susceptibility in Turkish population: a case-control study. *Gene*. 2012;511 (2): 308-313.

Berglund M, Enblad G, Flordal E, Lui W-O, Backlin C, Thunberg U, et al. Chromosomal imbalances in diffuse large B-cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. *Modern Pathology*. 2002;15 (8): 807-816.

Boice M, Salloum D, Mourcin F, Sanghvi V, Amin R, Oricchio E, et al. Loss of the HVEM tumor suppressor in lymphoma and restoration by modified CAR-T cells. *Cell*. 2016;167 (2): 405-418. e413.

Bolen CR, Klanova M, Trneny M, Sehn LH, He J, Tong J, et al. Prognostic impact of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma and relationship to cell-of-origin: data from the phase III GOYA study. *haematologica*. 2020;105 (9).

Boussiotis VA. Molecular and biochemical aspects of the PD-1 checkpoint pathway. *New England Journal of Medicine*. 2016;375 (18): 1767-1778.

Brooks CL, Gu W. The impact of acetylation and deacetylation on the p53 pathway. *Protein & cell*. 2011;2 (6): 456-462.

Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei MG, et al. A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature*. 1987;328 (6127): 267-270.

Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 pathways: similarities, differences, and implications of their inhibition. *American journal of clinical oncology*. 2016;39 (1): 98.

Budezies J, Bockmayr M, Denkert C, Klauschen F, Gröschel S, Darb-Esfahani S, et al. Pan-cancer analysis of copy number changes in programmed death-ligand 1 (PD-L1,

CD274)—associations with gene expression, mutational load, and survival. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2016;55 (8): 626-639.

Caganova M, Carrisi C, Varano G, Mainoldi F, Zanardi F, Germain P-L, et al. Germinal center dysregulation by histone methyltransferase EZH2 promotes lymphomagenesis. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123 (12): 5009-5022.

Castillo JJ, Beltran BE, Miranda RN, Young KH, Chavez JC, Sotomayor EM. EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified: 2018 update on diagnosis, risk-stratification and management. 2018.

Catalano C, da Silva Filho MI, Frank C, Jiraskova K, Vymetalkova V, Levy M, et al. Investigation of single and synergic effects of NLRC5 and PD-L1 variants on the risk of colorectal cancer. *PloS one*. 2018;13 (2): e0192385.

Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, June CH, Riley JL. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *The Journal of Immunology*. 2004;173 (2): 945-954.

Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *immunity*. 2013;39 (1): 1-10.

Chen Z, Deng X, Ye Y, Zhang W, Liu W, Zhao S. Flow Cytometry-Assessed PD1/PDL1 Status in Tumor-Infiltrating Lymphocytes: A Link With the Prognosis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Frontiers in Oncology*. 2021;11.

Cheson B, Fisher R, Barrington S, Cavalli F, Schwartz L, Zucca E, et al. Lymphoma Group; Eastern Cooperative Oncology Group; European Mantle Cell Lymphoma Consortium; et al. Recommendations for Initial Evaluation, Staging, and Response Assessment of Hodgkin and Non-Hodgkin Lymphoma: The Lugano Classification. *J Clin Oncol*. 2014;32: 3059-3068.

Ciszak L, Frydecka I, Wolowiec D, Szteblich A, Kosmaczewska A. Patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL) differ in the pattern of CTLA-4 expression on CLL cells: the possible implications for immunotherapy with CTLA-4 blocking antibody. *Tumour Biol*. 2016;37 (3): 4143-4157.

Compagno M, Lim WK, Grunn A, Nandula SV, Brahmachary M, Shen Q, et al. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF- κ B in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2009;459 (7247): 717-721.

Cortez MA, Ivan C, Valdecanas D, Wang X, Peltier HJ, Ye Y, et al. PDL1 Regulation by p53 via miR-34. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2016;108 (1).

Dai Z, Tian T, Wang M, Liu X, Lin S, Yang P, et al. CTLA-4 polymorphisms associate with breast cancer susceptibility in Asians: a meta-analysis. *PeerJ*. 2017;5: e2815.

Dalla-Favera R, Pasqualucci L. Molecular genetics of lymphoma. Non-Hodgkin's lymphomas PM Mauch, JO Armitage, B Coiffier, R Dalla-Favera, NL Harris, editors Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2003: 825-843.

Das J, Ray S, Sen S, Chandy M. Extranodal involvement in lymphoma—A Pictorial Essay and Retrospective Analysis of 281 PET/CT studies. *Asia Oceania Journal of Nuclear Medicine and Biology*. 2014;2 (1): 42.

Davis RE, Ngo VN, Lenz G, Tolar P, Young RM, Romesser PB, et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2010;463 (7277): 88-92.

de Leval L, Rickman DS, Thielen C, Reynies A, Huang YL, Delsol G, et al. The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells. *Blood*. 2007;109 (11): 4952-4963.

De Roos A, Davis S, Colt J, Blair A, Airola M, Severson R, et al. Residential proximity to industrial facilities and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Environmental Research*. 2010;110 (1): 70-78.

Djilali-Saiah I, Schmitz J, Harfouch-Hammoud E, Mougenot J, Bach J, Caillat-Zucman S-. CTLA-4 gene polymorphism is associated with predisposition to coeliac disease. *Gut*. 1998;43 (2): 187-189.

Dong W, Gong M, Shi Z, Xiao J, Zhang J, Peng J. Programmed cell death-1 polymorphisms decrease the cancer risk: a meta-analysis involving twelve case-control studies. *PloS one*. 2016;11 (3): e0152448.

Donner H, Rau H, Walfish PG, Braun J, Siegmund T, Finke R, et al. CTLA4 alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82 (1): 143-146.

Du W, Zhu J, Chen Y, Zeng Y, Shen D, Zhang N, et al. Variant SNPs at the microRNA complementary site in the B7-H1 3'-untranslated region increase the risk of non-small cell lung cancer. *Molecular medicine reports*. 2017;16 (3): 2682-2690.

Ekström-Smedby K. Epidemiology and etiology of non-Hodgkin lymphoma—a review. *Acta oncologica*. 2006;45 (3): 258-271.

Engelhard M, Brittinger Gn, Huhn D, Gerhartz HH, Meusers P, Siegert W, et al. Subclassification of diffuse large B-cell lymphomas according to the Kiel classification: distinction of centroblastic and immunoblastic lymphomas is a significant prognostic risk factor. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 1997;89 (7): 2291-2297.

Ennishi D, Mottok A, Ben-Neriah S, Shulha HP, Farinha P, Chan FC, et al. Genetic profiling of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma determines cell-of-origin-specific clinical impact. *Blood*. 2017;129 (20): 2760-2770.

Feng XY, Lu L, Wang KF, Zhu BY, Wen XZ, Peng RQ, et al. Low expression of CD80 predicts for poor prognosis in patients with gastric adenocarcinoma. *Future Oncol*. 2019;15 (5): 473-483.

Fife BT, Bluestone JA. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunological reviews*. 2008;224 (1): 166-182.

Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*. 2000;192 (7): 1027-1034.

Friedberg JW. Relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Hematology*. 2011;2011 (1): 498-505.

Fujiwara K, Higashi T, Nouse K, Nakatsukasa H, Kobayashi Y, Uemura M, et al. Decreased expression of B7 costimulatory molecules and major histocompatibility complex class-I in human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 2004;19 (10): 1121-1127.

Gao Q, Wang XY, Qiu SJ, Yamato I, Sho M, Nakajima Y, et al. Overexpression of PD-L1 significantly associates with tumor aggressiveness and postoperative recurrence in human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2009;15 (3): 971-979.

Georgiou K, Chen L, Berglund M, Ren W, De Miranda NF, Lisboa S, et al. Genetic basis of PD-L1 overexpression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2016;127 (24): 3026-3034.

Ghaderi A, Yeganeh F, Kalantari T, Talei AR, Pezeshki AM, Doroudchi M, et al. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2004;86 (1): 1-7.

Ghebeh H, Mohammed S, Al-Omair A, Qattan A, Lehe C, Al-Qudaihi G, et al. The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. *Neoplasia*. 2006;8 (3): 190-198.

Gonzalez H, Hagerling C, Werb Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes & development*. 2018;32 (19-20): 1267-1284.

Gough SC, Walker LS, Sansom DM. CTLA4 gene polymorphism and autoimmunity. *Immunol Rev*. 2005;204: 102-115.

Gravelle P, Burroni B, Péricart S, Rossi C, Bezombes C, Tosolini M, et al. Mechanisms of PD-1/PD-L1 expression and prognostic relevance in non-Hodgkin lymphoma: a summary of immunohistochemical studies. *Oncotarget*. 2017;8 (27): 44960.

Green JA, Cyster JG. S1PR2 links germinal center confinement and growth regulation. *Immunological reviews*. 2012;247 (1): 36-51.

Green TM, Young KH, Visco C, Xu-Monette ZY, Orazi A, Go RS, et al. Immunohistochemical double-hit score is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol*. 2012;30 (28): 3460-3467.

Griner LAM, Guha R, Shinn P, Young RM, Keller JM, Liu D, et al. High-throughput combinatorial screening identifies drugs that cooperate with ibrutinib to kill activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111 (6): 2349-2354.

Haghshenas MR, Naeimi S, Talei A, Ghaderi A, Erfani N. Program death 1 (PD1) haplotyping in patients with breast carcinoma. *Molecular biology reports*. 2011;38 (6): 4205-4210.

Hallack Neto AE, Siqueira SAC, Dulley FL, Chauobah A, Belesso M, Saboia R, et al. Bcl-2 protein frequency in patients with high-risk diffuse large B-cell lymphoma. *Sao Paulo Medical Journal*. 2010;128: 14-17.

Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8⁺ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104 (9): 3360-3365.

Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *American journal of cancer research*. 2020;10 (3): 727.

Handa T, Nagai S, Ito I, Tabuena R, Shigematsu M, Hamada K, et al. Polymorphisms of B7 (CD80 and CD86) genes do not affect disease susceptibility to sarcoidosis. *Respiration*. 2005;72 (3): 243-248.

Hashemi M, Karami S, Sarabandi S, Moazeni-Roodi A, Małeck A, Ghavami S, et al. Association between PD-1 and PD-L1 polymorphisms and the risk of cancer: A meta-analysis of case-control studies. *Cancers*. 2019;11 (8): 1150.

Hatem J, Bogusz AM. An unusual case of extranodal diffuse large B-cell lymphoma infiltrating skeletal muscle: a case report and review of the literature. *Case reports in pathology*. 2016;2016.

Hill ME, MacLennan KA, Cunningham DC, Vaughan Hudson B, Burke M, Clarke P, et al. Prognostic significance of BCL-2 expression and bcl-2 major breakpoint region

rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: a British National Lymphoma Investigation Study. 1996.

Hirata E, Sahai E. Tumor microenvironment and differential responses to therapy. Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2017;7 (7): a026781.

Hockenbery D, Nuñez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. Nature. 1990;348 (6299): 334-336.

Hoseini H, Yaghmaei P, Bahari G, Aminzadeh S. Correlations of PD-1/PD-L1 Gene Polymorphisms With Susceptibility and Prognosis in Non-Hodgkin Lymphoma in Iranian Population. 2020.

Hsieh JCH, Wang HM, Wu MH, Chang KP, Chang PH, Liao CT, et al. Review of emerging biomarkers in head and neck squamous cell carcinoma in the era of immunotherapy and targeted therapy. Head & neck. 2019;41: 19-45.

Hua Z, Li D, Xiang G, Xu F, Jie G, Fu Z, et al. PD-1 polymorphisms are associated with sporadic breast cancer in Chinese Han population of Northeast China. Breast Cancer Res Treat. 2011;129 (1): 195-201.

Huang S, Nong L, Wang W, Liang L, Zheng Y, Liu J, et al. Prognostic impact of diffuse large B-cell lymphoma with extra copies of MYC, BCL2 and/or BCL6: comparison with double/triple hit lymphoma and double expressor lymphoma. Diagnostic pathology. 2019;14 (1): 1-12.

Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. EMBO J. 1992;11 (11): 3887-3895.

Ivansson EL, Juko-Pecirep I, Gyllensten UB. Interaction of immunological genes on chromosome 2q33 and IFNG in susceptibility to cervical cancer. Gynecologic oncology. 2010;116 (3): 544-548.

Jamil A, Mukkamalla SKR. Lymphoma. StatPearls [Internet]. 2021.

Janeway CA. The immune system in health and disease.

Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, Connors JM, Ben-Neriah S, Rogic S, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. Journal of clinical oncology. 2012;30 (28): 3452.

Karube K, Campo E, editors. MYC alterations in diffuse large B-cell lymphomas. Seminars in hematology; 2015: Elsevier.

Kato M, Sanada M, Kato I, Sato Y, Takita J, Takeuchi K, et al. Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature*. 2009;459 (7247): 712-716.

Kim J, Chen DS. Immune escape to PD-L1/PD-1 blockade: seven steps to success (or failure). *Annals of Oncology*. 2016;27 (8): 1492-1504.

Kiyasu J, Miyoshi H, Hirata A, Arakawa F, Ichikawa A, Niino D, et al. Expression of programmed cell death ligand 1 is associated with poor overall survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2015a;126 (19): 2193-2201.

Kiyasu J, Miyoshi H, Hirata A, Arakawa F, Ichikawa A, Niino D, et al. Expression of programmed cell death ligand 1 is associated with poor overall survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2015b;126 (19): 2193-2201.

Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nature Reviews Immunology*. 2008;8 (1): 22-33.

Kotsakis A, Kallergi G, Aggouraki D, Lyristi Z, Koinis F, Lagoudaki E, et al. CD8(+) PD-1(+) T-cells and PD-L1(+) circulating tumor cells in chemotherapy-naïve non-small cell lung cancer: towards their clinical relevance? *Ther Adv Med Oncol*. 2019;11: 1758835919853193.

Kotsakis A, Koinis F, Katsarou A, Gioulbasani M, Aggouraki D, Kentepozidis N, et al. Prognostic value of circulating regulatory T cell subsets in untreated non-small cell lung cancer patients. *Sci Rep*. 2016;6: 39247.

Kramer M, Hermans J, Wijburg E, Philipppo K, Geelen E, Van Krieken J, et al. Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 1998;92 (9): 3152-3162.

Kwon D, Kim S, Kim PJ, Go H, Nam SJ, Paik JH, et al. Clinicopathological analysis of programmed cell death 1 and programmed cell death ligand 1 expression in the tumour microenvironments of diffuse large B cell lymphomas. *Histopathology*. 2016;68 (7): 1079-1089.

Laurent C, Charmpi K, Gravelle P, Tosolini M, Franchet C, Ysebaert L, et al. Several immune escape patterns in non-Hodgkin's lymphomas. *Oncoimmunology*. 2015;4 (8): e1026530.

Li D, Zhang Q, Xu F, Fu Z, Yuan W, Li D, et al. Association of CTLA-4 gene polymorphisms with sporadic breast cancer risk and clinical features in Han women of northeast China. *Molecular and cellular biochemistry*. 2012;364 (1): 283-290.

Li S, Seegmiller AC, Lin P, Wang XJ, Miranda RN, Bhagavathi S, et al. B-cell lymphomas with concurrent MYC and BCL2 abnormalities other than translocations

behave similarly to MYC/BCL2 double-hit lymphomas. *Modern pathology*. 2015;28 (2): 208-217.

Li S, Young KH, Medeiros LJ. Diffuse large B-cell lymphoma. *Pathology*. 2018;50 (1): 74-87.

Li XF, Jiang XQ, Zhang JW, Jia YJ. Association of the programmed cell death-1 PD1.5 C>T polymorphism with cervical cancer risk in a Chinese population. *Genet Mol Res*. 2016;15 (1).

Liu C, Jiang J, Gao L, Hu X, Wang F, Shen Y, et al. A Promoter Region Polymorphism in PDCD-1 Gene Is Associated with Risk of Rheumatoid Arthritis in the Han Chinese Population of Southeastern China. *Int J Genomics*. 2014;2014: 247637.

Liu Y, Barta SK. Diffuse large B-cell lymphoma: 2019 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *American journal of hematology*. 2019;94 (5): 604-616.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *methods*. 2001;25 (4): 402-408.

Longerich S, Basu U, Alt F, Storb U. AID in somatic hypermutation and class switch recombination. *Current opinion in immunology*. 2006;18 (2): 164-174.

Lossos I, Akasaka T, Martinez-Climent J, Siebert R, Levy R. The BCL6 gene in B-cell lymphomas with 3q27 translocations is expressed mainly from the rearranged allele irrespective of the partner gene. *Leukemia*. 2003;17 (7): 1390-1397.

Lu Z, Tsai AG, Akasaka T, Ohno H, Jiang Y, Melnick AM, et al. BCL6 breaks occur at different AID sequence motifs in Ig–BCL6 and non-Ig–BCL6 rearrangements. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2013;121 (22): 4551-4554.

Luczynski W, Stasiak-Barmuta A, Ilendo E, Kovalchuk O, Krawczuk-Rybak M, Malinowska I, et al. Low expression of costimulatory molecules and mRNA for cytokines are important mechanisms of immunosuppression in acute lymphoblastic leukemia in children? *Neoplasma*. 2006;53 (4): 301-304.

Manson G, Houot R. Next-generation immunotherapies for lymphoma: one foot in the future. *Ann Oncol*. 2018;29 (3): 588-601.

Mao H, Zhang L, Yang Y, Zuo W, Bi Y, Gao W, et al. New insights of CTLA-4 into its biological function in breast cancer. *Current cancer drug targets*. 2010;10 (7): 728-736.

Matsushita M, Tsuchiya N, Oka T, Yamane A, Tokunaga K. New polymorphisms of human CD80 and CD86: lack of association with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Genes & Immunity*. 2000a;1 (7): 428-434.

Matsushita M, Tsuchiya N, Oka T, Yamane A, Tokunaga K. New polymorphisms of human CD80 and CD86: lack of association with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Genes Immun.* 2000b;1 (7): 428-434.

McCarthy EF. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop J.* 2006;26: 154-158.

Migliazza A, Martinotti S, Chen W, Fusco C, Ye BH, Knowles DM, et al. Frequent somatic hypermutation of the 5'noncoding region of the BCL6 gene in B-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1995;92 (26): 12520-12524.

Mir MA. Developing costimulatory molecules for immunotherapy of diseases: Academic Press; 2015.

Mo X, Zhang H, Preston S, Martin K, Zhou B, Vadalia N, et al. Interferon-gamma Signaling in Melanocytes and Melanoma Cells Regulates Expression of CTLA-4. *Cancer Res.* 2018;78 (2): 436-450.

Mojtahedi Z, Mohmedi M, Rahimifar S, Erfani N, Hosseini SV, Ghaderi A. Programmed death-1 gene polymorphism (PD-1.5 C/T) is associated with colon cancer. *Gene.* 2012a;508 (2): 229-232.

Mojtahedi Z, Mohmedi M, Rahimifar S, Erfani N, Hosseini SV, Ghaderi A. Programmed death-1 gene polymorphism (PD-1.5 C/T) is associated with colon cancer. *Gene.* 2012b;508 (2): 229-232.

Monis PT, Giglio S, Saint CP. Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis. *Analytical biochemistry.* 2005;340 (1): 24-34.

Monne M, Piras G, Palmas A, Arru L, Murineddu M, Latte G, et al. Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphism and susceptibility to non-Hodgkin's lymphoma. *American journal of hematology.* 2004;76 (1): 14-18.

Mora B, Bonamico M, Indovina P, Megiorni F, Ferri M, Carbone MC, et al. CTLA-4 +49 A/G dimorphism in Italian patients with celiac disease. *Hum Immunol.* 2003;64 (2): 297-301.

Morgan G, Vornanen M, Puitinen J, Naukkarinen A, Brincker H, Olsen J, et al. Changing trends in the incidence of non-Hodgkin's lymphoma in Europe. *Annals of oncology.* 1997;8: S49-S54.

Muenst S, Hoeller S, Willi N, Dirnhofer S, Tzankov A. Diagnostic and prognostic utility of PD-1 in B cell lymphomas. *Disease markers.* 2010;29 (1): 47-53.

Nagasaki J, Togashi Y, Sugawara T, Itami M, Yamauchi N, Yuda J, et al. The critical role of CD4+ T cells in PD-1 blockade against MHC-II-expressing tumors such as classic Hodgkin lymphoma. *Blood Adv.* 2020;4 (17): 4069-4082.

Ngo VN, Young RM, Schmitz R, Jhavar S, Xiao W, Lim K-H, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature.* 2011;470 (7332): 115-119.

Nguyen L, Papenhausen P, Shao H. The role of c-MYC in B-cell lymphomas: diagnostic and molecular aspects. *Genes.* 2017;8 (4): 116.

Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, Nakatani K, Hara M, Matsumori A, et al. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science.* 2001;291 (5502): 319-322.

Nogai H, Dörken B, Lenz G. Pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of Clinical Oncology.* 2011;29 (14): 1803-1811.

Nomi T, Sho M, Akahori T, Hamada K, Kubo A, Kanehiro H, et al. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13 (7): 2151-2157.

Nowakowski G, LaPlant B, Habermann T, Rivera C, Macon W, Inwards D, et al. Lenalidomide can be safely combined with R-CHOP (R2CHOP) in the initial chemotherapy for aggressive B-cell lymphomas: phase I study. *Leukemia.* 2011;25 (12): 1877-1881.

Ohigashi Y, Sho M, Yamada Y, Tsurui Y, Hamada K, Ikeda N, et al. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11 (8): 2947-2953.

Orabona C, Grohmann U, Belladonna ML, Fallarino F, Vacca C, Bianchi R, et al. CD28 induces immunostimulatory signals in dendritic cells via CD80 and CD86. *Nature immunology.* 2004;5 (11): 1134-1142.

Orazi A, Foucar K, Knowles D, Weiss LM. Knowles neoplastic hematopathology: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.

Öztürk E, Özbalak M, Berk S, Erdoğan I, Avşar E, Dolgun A, et al. Comparison of International Prognostic Index and NCCN-IPI in 324 patients with de novo diffuse large B-cell lymphoma: a multi-center retrospective analysis. *Leukemia & lymphoma.* 2016;57 (5): 1211-1214.

Pasqualucci L, Compagno M, Houldsworth J, Monti S, Grunn A, Nandula SV, et al. Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. *The Journal of experimental medicine.* 2006;203 (2): 311-317.

Pasqualucci L, Dalla-Favera R. Genetics of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2018;131 (21): 2307-2319.

Pasqualucci L, Dominguez-Sola D, Chiarenza A, Fabbri G, Grunn A, Trifonov V, et al. Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature*. 2011;471 (7337): 189-195.

Peng H-Z, Du M-Q, Koulis A, Aiello A, Dogan A, Pan L-X, et al. Nonimmunoglobulin gene hypermutation in germinal center B cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 1999;93 (7): 2167-2172.

Qiu H, Zheng L, Tang W, Yin P, Cheng F, Wang L. Programmed death-1 (PD-1) polymorphisms in Chinese patients with esophageal cancer. *Clin Biochem*. 2014;47 (7-8): 612-617.

Ramgopal S, Rathika C, Padma MR, Murali V, Arun K, Kamaludeen MN, et al. Interaction of HLA-DRB1* alleles and CTLA4 (+49 AG) gene polymorphism in Autoimmune Thyroid Disease. *Gene*. 2018;642: 430-438.

Rau FC, Dieter J, Luo Z, Priest SO, Baumgarth N. B7-1/2 (CD80/CD86) direct signaling to B cells enhances IgG secretion. *The Journal of Immunology*. 2009;183 (12): 7661-7671.

Reed DM. On the pathological changes in Hodgkin's disease with special reference to its relation to tuberculosis. *Johns Hopkins Hosp Rep*. 1902;10: 133-198.

Rocha MC, Santos LM, Bagatin E, Tervaert JWC, Damoiseaux JG, Lido AV, et al. Genetic polymorphisms and surface expression of CTLA-4 and PD-1 on T cells of silica-exposed workers. *International journal of hygiene and environmental health*. 2012;215 (6): 562-569.

Rosai RJ. Ackerman'in Cerrahi patolojisi. 10. Baskı İstanbul. 2015: 1118-1121.

Rosenwald A, Wright G, Leroy K, Yu X, Gaulard P, Gascoyne RD, et al. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med*. 2003;198 (6): 851-862.

Rowshanravan B, Halliday N, Sansom DM. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood*. 2018;131 (1): 58-67.

Rudd CE, Taylor A, Schneider H. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunological reviews*. 2009;229 (1): 12-26.

Runte F, Renner IV P, Hoppe M. *Kuby immunology*. 2019.

Sağlam A, Esin E, Hayran M, BOYRAZ B, Üner A. Distribution of lymphomas in Turkey: data of 4239 cases from a single institution using the WHO classification. *Turkish journal of medical sciences*. 2018;48 (5): 1013-1023.

Salmaninejad A, Khoramshahi V, Azani A, Soltaninejad E, Aslani S, Zamani MR, et al. PD-1 and cancer: molecular mechanisms and polymorphisms. *Immunogenetics*. 2018;70 (2): 73-86.

Salmaninejad A, Valilou SF, Shabgah AG, Aslani S, Alimardani M, Pasdar A, et al. PD-1/PD-L1 pathway: Basic biology and role in cancer immunotherapy. *Journal of cellular physiology*. 2019;234 (10): 16824-16837.

Sasaki H, Tatemaysu T, Okuda K, Moriyama S, Yano M, Fujii Y. PD-1 gene promoter polymorphisms correlate with a poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Molecular and clinical oncology*. 2014;2 (6): 1035-1042.

Saudemont A, Quesnel B. In a model of tumor dormancy, long-term persistent leukemic cells have increased B7-H1 and B7. 1 expression and resist CTL-mediated lysis. *Blood*. 2004;104 (7): 2124-2133.

Savabkar S, Azimzadeh P, Chaleshi V, Nazemalhosseini Mojarad E, Aghdaei HA. Programmed death-1 gene polymorphism (PD-1.5 C/T) is associated with gastric cancer. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2013;6 (4): 178-182.

Scarpa M, Scarpa M, Castagliuolo I, Erroi F, Basato S, Brun P, et al. CD80 down-regulation is associated to aberrant DNA methylation in non-inflammatory colon carcinogenesis. *BMC Cancer*. 2016;16: 388.

Scott DW, Mottok A, Ennishi D, Wright GW, Farinha P, Ben-Neriah S, et al. Prognostic significance of diffuse large B-cell lymphoma cell of origin determined by digital gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue biopsies. *Journal of clinical oncology*. 2015;33 (26): 2848.

Sharpe AH, Freeman GJ. The B7–CD28 superfamily. *Nature Reviews Immunology*. 2002;2 (2): 116-126.

Shen HM, Peters A, Baron B, Zhu X, Storb U. Mutation of BCL-6 gene in normal B cells by the process of somatic hypermutation of Ig genes. *Science*. 1998;280 (5370): 1750-1752.

Shi X-L, Mancham S, Hansen BE, de Knecht RJ, de Jonge J, van der Laan LJ, et al. Counter-regulation of rejection activity against human liver grafts by donor PD-L1 and recipient PD-1 interaction. *Journal of hepatology*. 2016;64 (6): 1274-1282.

Shipp M. International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Eng J Med*. 1993;329: 987-994.

Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. CA: a Cancer Journal for Clinicians. 2021;71 (1): 7-33.

Singh R, Dubey A, Rathore A, Kapoor R, Sharma D, Singh NK, et al. Diffuse large B-Cell lymphoma-review. Journal of Medical Sciences. 2018;38 (4): 137.

Song B, Liu Y, Liu J, Song X, Wang Z, Wang M, et al. CTLA-4+ 49A> G polymorphism is associated with advanced non-small cell lung cancer prognosis. Respiration. 2011;82 (5): 439-444.

Song M-K, Park B-B, Uhm J. Understanding immune evasion and therapeutic targeting associated with PD-1/PD-L1 pathway in diffuse large B-cell lymphoma. International journal of molecular sciences. 2019;20 (6): 1326.

Sukswai N, Lyapichev K, Khoury JD, Medeiros LJ. Diffuse large B-cell lymphoma variants: an update. Pathology. 2020;52 (1): 53-67.

Sun T, Zhou Y, Yang M, Hu Z, Tan W, Han X, et al. Functional genetic variations in cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 and susceptibility to multiple types of cancer. Cancer research. 2008;68 (17): 7025-7034.

Susanibar-Adaniya S, Barta SK. 2021 Update on Diffuse large B cell lymphoma: A review of current data and potential applications on risk stratification and management. American Journal of Hematology. 2021;96 (5): 617-629.

Swerdlow S, Campo E, Harris NL, Jaffe E, Pileri S, Stein H, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (Revised 4th edition). IARC: Lyon. 2017;421.

Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. Blood. 2016;127 (20): 2375-2390.

Tan D, Sheng L, Yi Q-H. Correlation of PD-1/PD-L1 polymorphisms and expressions with clinicopathologic features and prognosis of ovarian cancer. Cancer Biomarkers. 2018;21 (2): 287-297.

Tang W, Chen Y, Chen S, Sun B, Gu H, Kang M. Programmed death-1 (PD-1) polymorphism is associated with gastric cardia adenocarcinoma. Int J Clin Exp Med. 2015;8 (5): 8086-8093.

Tao L-H, Zhou X-R, Li F-C, Chen Q, Meng F-Y, Mao Y, et al. A polymorphism in the promoter region of PD-L1 serves as a binding-site for SP1 and is associated with PD-L1 overexpression and increased occurrence of gastric cancer. Cancer Immunology, Immunotherapy. 2017;66 (3): 309-318.

Teft WA, Kirchhof MG, Madrenas J. A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu Rev Immunol.* 2006;24: 65-97.

Teutsch SM, Booth DR, Bennetts BH, Heard RN, Stewart GJ. Association of common T cell activation gene polymorphisms with multiple sclerosis in Australian patients. *J Neuroimmunol.* 2004;148 (1-2): 218-230.

Thompson RH, Dong H, Kwon ED. Implications of B7-H1 expression in clear cell carcinoma of the kidney for prognostication and therapy. *Clin Cancer Res.* 2007;13 (2 Pt 2): 709s-715s.

Tirapu I, Huarte E, Guiducci C, Arina A, Zaratiegui M, Murillo O, et al. Low surface expression of B7-1 (CD80) is an immunoescape mechanism of colon carcinoma. *Cancer Res.* 2006;66 (4): 2442-2450.

Torinsson Naluai Å, Nilsson S, Samuelsson L, Gudjonsdottir A, Ascher H, Ek J, et al. The CTLA4/CD28 gene region on chromosome 2q33 confers susceptibility to celiac disease in a way possibly distinct from that of type 1 diabetes and other chronic inflammatory disorders. *Tissue Antigens.* 2000;56 (4): 350-355.

Trinh DL, Scott DW, Morin RD, Mendez-Lago M, An J, Jones SJ, et al. Analysis of FOXO1 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology.* 2013;121 (18): 3666-3674.

Twomey JD, Zhang B. Cancer Immunotherapy Update: FDA-Approved Checkpoint Inhibitors and Companion Diagnostics. *The AAPS Journal.* 2021;23 (2): 1-11.

Vackova J, Polakova I, Johari SD, Smahel M. CD80 Expression on Tumor Cells Alters Tumor Microenvironment and Efficacy of Cancer Immunotherapy by CTLA-4 Blockade. *Cancers.* 2021;13 (8): 1935.

Vaddepally RK, Kharel P, Pandey R, Garje R, Chandra AB. Review of indications of FDA-approved immune checkpoint inhibitors per NCCN guidelines with the level of evidence. *Cancers.* 2020;12 (3): 738.

Van Heertum RL, Scarimbolo R, Wolodzko JG, Klencke B, Messmann R, Tunc F, et al. Lugano 2014 criteria for assessing FDG-PET/CT in lymphoma: an operational approach for clinical trials. *Drug design, development and therapy.* 2017;11: 1719.

Vellenga SJ. Longing for health. A practice of religious healing and biomedicine compared. *Journal of religion and health.* 2008;47 (3): 326-337.

Vetsika KE, Aggouraki D, Lyrusti Z, Koinis F, Georgoulas V, Kotsakis A. Prognostic value of PD-L1+CD4+ T cells in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients treated with a PD-1 inhibitor. *Journal of Clinical Oncology.* 2017;35 (7_suppl): 58-58.

Wang L, Li D, Fu Z, Li H, Jiang W, Li D. Association of CTLA-4 gene polymorphisms with sporadic breast cancer in Chinese Han population. *BMC cancer*. 2007;7 (1): 1-7.

Wang Q-M, Lian G-Y, Song Y, Huang Y-F, Gong Y. LncRNA MALAT1 promotes tumorigenesis and immune escape of diffuse large B cell lymphoma by sponging miR-195. *Life sciences*. 2019;231: 116335.

Wang W, Li F, Mao Y, Zhou H, Sun J, Li R, et al. A miR-570 binding site polymorphism in the B7-H1 gene is associated with the risk of gastric adenocarcinoma. *Human genetics*. 2013;132 (6): 641-648.

Wang W, Shen G, Wu S, Song S, Ni Y, Suo Z, et al. PD-1 mRNA expression in peripheral blood cells and its modulation characteristics in cancer patients. *Oncotarget*. 2017;8 (31): 50782-50791.

Wang X, Zhao X, Giscombe R, Lefvert A. A CTLA-4 gene polymorphism at position-318 in the promoter region affects the expression of protein. *Genes & Immunity*. 2002;3 (4): 233-234.

Watanabe A, Inoue N, Watanabe M, Yamamoto M, Ozaki H, Hidaka Y, et al. Increases of CD80 and CD86 Expression on Peripheral Blood Cells and their Gene Polymorphisms in Autoimmune Thyroid Disease. *Immunol Invest*. 2020;49 (1-2): 191-203.

Weinshenker BG, Hebrink DD, Klein C, Atkinson EJ, O'Brien PC, McMurray CT. Genetic variation in the B7-1 gene in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2000;105 (2): 184-188.

Wilson WH, Young RM, Schmitz R, Yang Y, Pittaluga S, Wright G, et al. Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nature medicine*. 2015;21 (8): 922-926.

Wu C, Zhu Y, Jiang J, Zhao J, Zhang XG, Xu N. Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance. *Acta Histochem*. 2006;108 (1): 19-24.

Wu D, Tang R, Qi Q, Zhou X, Zhou H, Mao Y, et al. Five functional polymorphisms of B7/CD28 co-signaling molecules alter susceptibility to colorectal cancer. *Cell Immunol*. 2015;293 (1): 41-48.

Wu R, Li F, Zhu J, Tang R, Qi Q, Zhou X, et al. A functional variant at miR-132-3p, miR-212-3p, and miR-361-5p binding site in CD80 gene alters susceptibility to gastric cancer in a Chinese Han population. *Medical Oncology*. 2014;31 (8): 60.

Xie Q, Chen Z, Xia L, Zhao Q, Yu H, Yang Z. Correlations of PD-L1 gene polymorphisms with susceptibility and prognosis in hepatocellular carcinoma in a Chinese Han population. *Gene*. 2018;674: 188-194.

Xu Y, Kroft SH, McKenna RW, Aquino DB. Prognostic significance of tumour-infiltrating T lymphocytes and T-cell subsets in de novo diffuse large B-cell lymphoma: a multiparameter flow cytometry study. *Br J Haematol*. 2001;112 (4): 945-949.

Yan Q, Chen P, Lu A, Zhao P, Gu A. Association between CTLA-4 60G/A and -1661A/G polymorphisms and the risk of cancers: a meta-analysis. *PLoS One*. 2013;8 (12): e83710.

Yang J, Liu J, Chen Y, Tang W, Bo K, Sun Y, et al. Investigation of ICOS, CD28 and CD80 polymorphisms with the risk of hepatocellular carcinoma: a case-control study in eastern Chinese population. *Biosci Rep*. 2019;39 (7).

Yang Q, Liu Y, Liu D, Zhang Y, Mu K. Association of polymorphisms in the programmed cell death 1 (PD-1) and PD-1 ligand genes with ankylosing spondylitis in a Chinese population. *Clinical and Experimental Rheumatology-Incl Supplements*. 2011;29 (1): 13.

Yeo M-K, Choi S-Y, Seong I-O, Suh K-S, Kim JM, Kim K-H. Association of PD-L1 expression and PD-L1 gene polymorphism with poor prognosis in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Human pathology*. 2017;68: 103-111.

Yiallourous M. Non-Hodgkin Lenfoması (NHL) – Kısa Bilgiler: Maria Yiallourous; 2018

Yin L, Guo H, Zhao L, Wang J. The programmed death-1 gene polymorphism (PD-1.5 C/T) is associated with non-small cell lung cancer risk in a Chinese Han population. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2014;7 (12): 5832.

Zhang C, Hou WH, Ding XX, Wang X, Zhao H, Han XW, et al. Association of Cytotoxic T-lymphocyte Antigen-4 Polymorphisms with Malignant Bone Tumor Risk: A Meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016a;17 (8): 3785-3791.

Zhang J, Medeiros LJ, Young KH. Cancer immunotherapy in diffuse large B-cell lymphoma. *Frontiers in oncology*. 2018;8: 351.

Zhang Y, Wang H, Ren C, Yu H, Fang W, Zhang N, et al. Correlation between C-MYC, BCL-2, and BCL-6 protein expression and gene translocation as biomarkers in diagnosis and prognosis of diffuse large B-cell lymphoma. *Frontiers in pharmacology*. 2019;9: 1497.

Zhang Y, Yang J, Zhang J, Sun L, Hirankarn N, Pan H-F, et al. Genome-wide search followed by replication reveals genetic interaction of CD80 and ALOX5AP associated with systemic lupus erythematosus in Asian populations. *Annals of the rheumatic diseases*. 2016b;75 (5): 891-898.

Zhao Y, Yang W, Huang Y, Cui R, Li X, Li B. Evolving roles for targeting CTLA-4 in cancer immunotherapy. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018;47 (2): 721-734.

Zheng Y, Fang YC, Li J. PD-L1 expression levels on tumor cells affect their immunosuppressive activity. *Oncology letters*. 2019a;18 (5): 5399-5407.

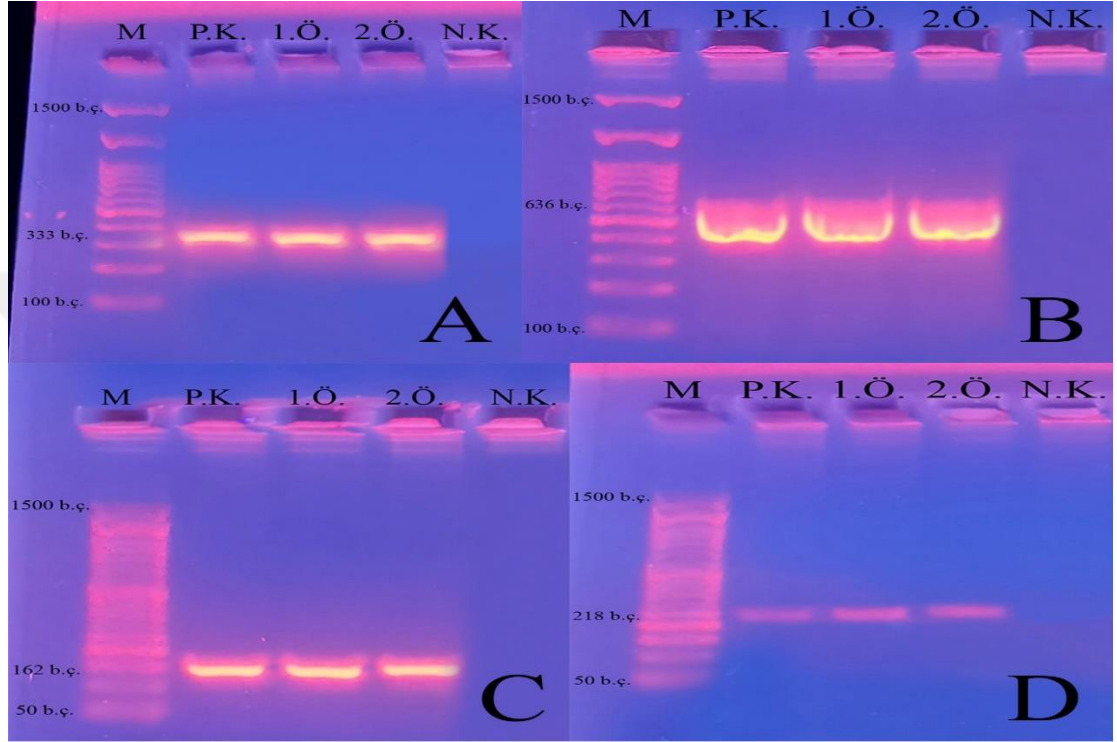
Zheng Z, Sun R, Zhao H-J, Fu D, Zhong H-J, Weng X-Q, et al. MiR155 sensitized B-lymphoma cells to anti-PD-L1 antibody via PD-1/PD-L1-mediated lymphoma cell interaction with CD8⁺ T cells. *Molecular cancer*. 2019b;18 (1): 1-13.

Zhou RM, Li Y, Wang N, Huang X, Cao SR, Shan BE. Association of programmed death-1 polymorphisms with the risk and prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Genet*. 2016;209 (9): 365-375.

Zhou Z, Sehn LH, Rademaker AW, Gordon LI, LaCasce AS, Crosby-Thompson A, et al. An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era. *Blood*. 2014;123 (6): 837-842.

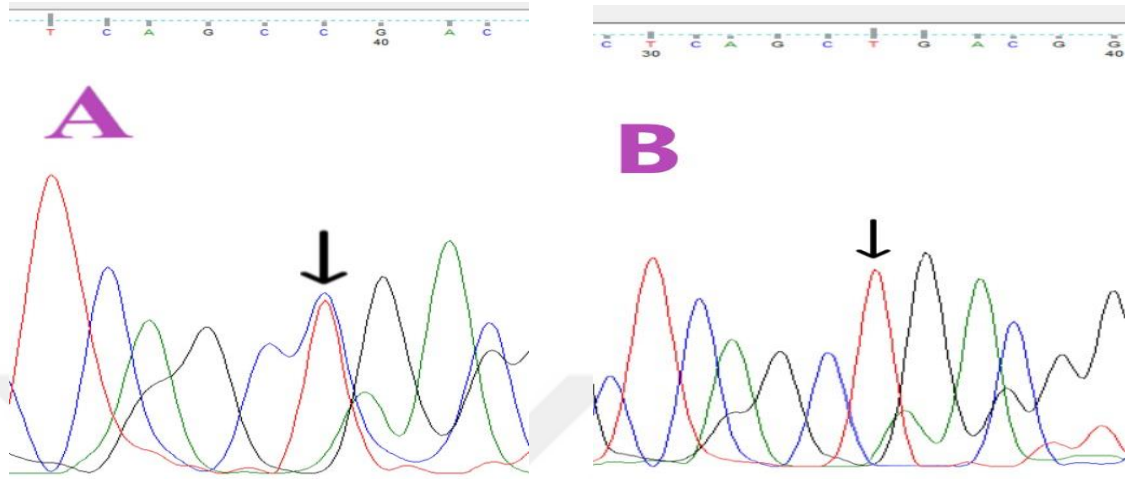
EKLER

Ek 1. *PD-1*, *PD-L1*, *CTLA-4* ve *CD80* Gen Amplifikasyonlarına Ait Örnek Agaroz Jel Görüntüleri



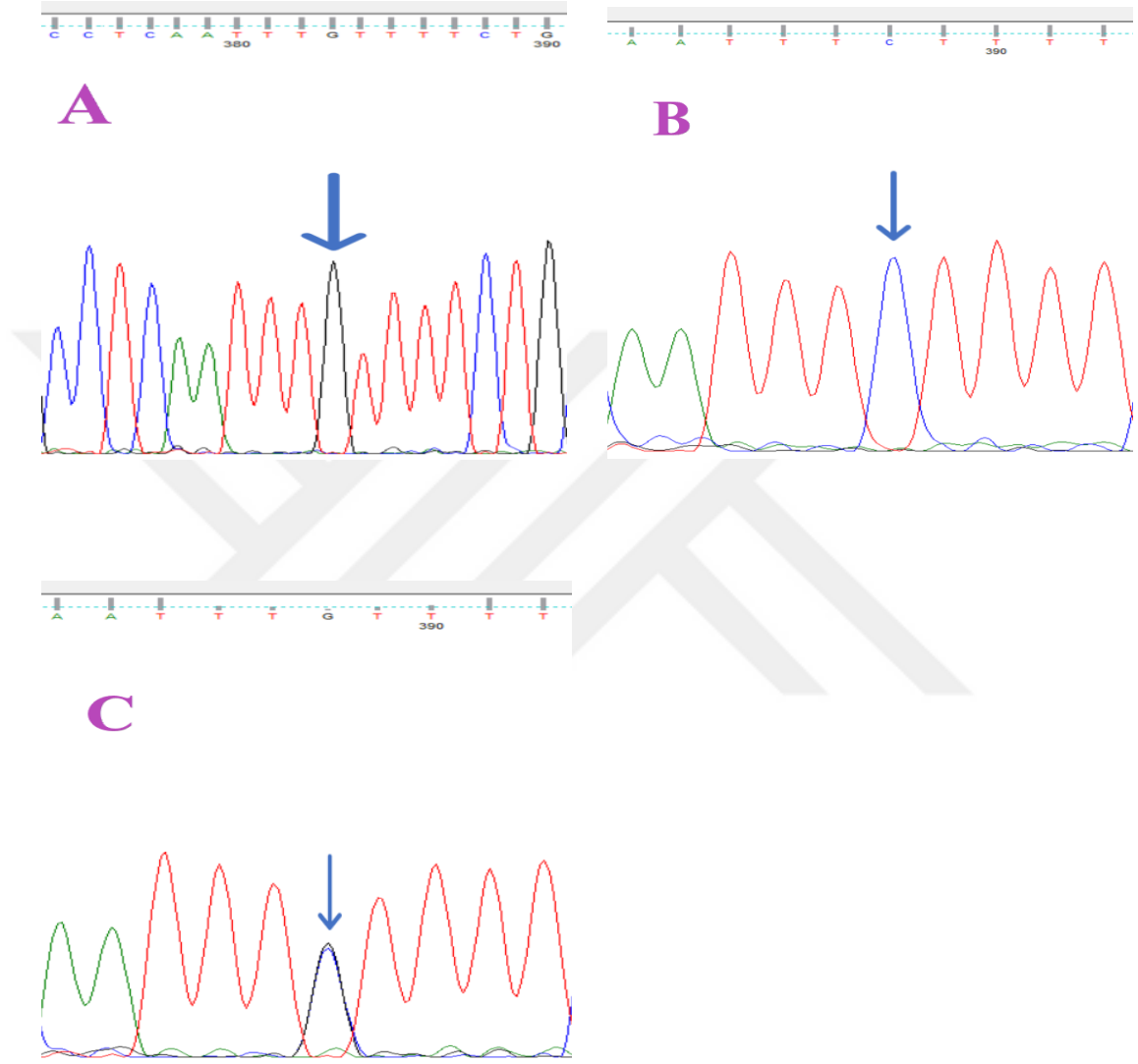
M: Markır, **P.K.:** Pozitif Kontrol, **1.Ö.:** Örnek 1, **2.Ö.:** Örnek 2, **N.K.:** Negatif Kontrol, **A)** *PD-1* (rs2227981, +7785 C/T) gen polimorfizmine ait 333 bç'lik, **B)** *PD-L1* (rs4143815, C/G) gen polimorfizmine ait 636 bç'lik, **C)** *CTLA-4* (rs231775, +49 A/G) gen polimorfizmine ait 162 bç'lik, **D)** *CD80* (rs2228017, 452G/A) gen polimorfizmine ait 218 bç'lik fragmanlar

Ek 2. *PD-1* (rs2227981, +7785 C/T) Gen Polimorfizmine Ait DNA Dizi Analizi Örnek Görüntüleri



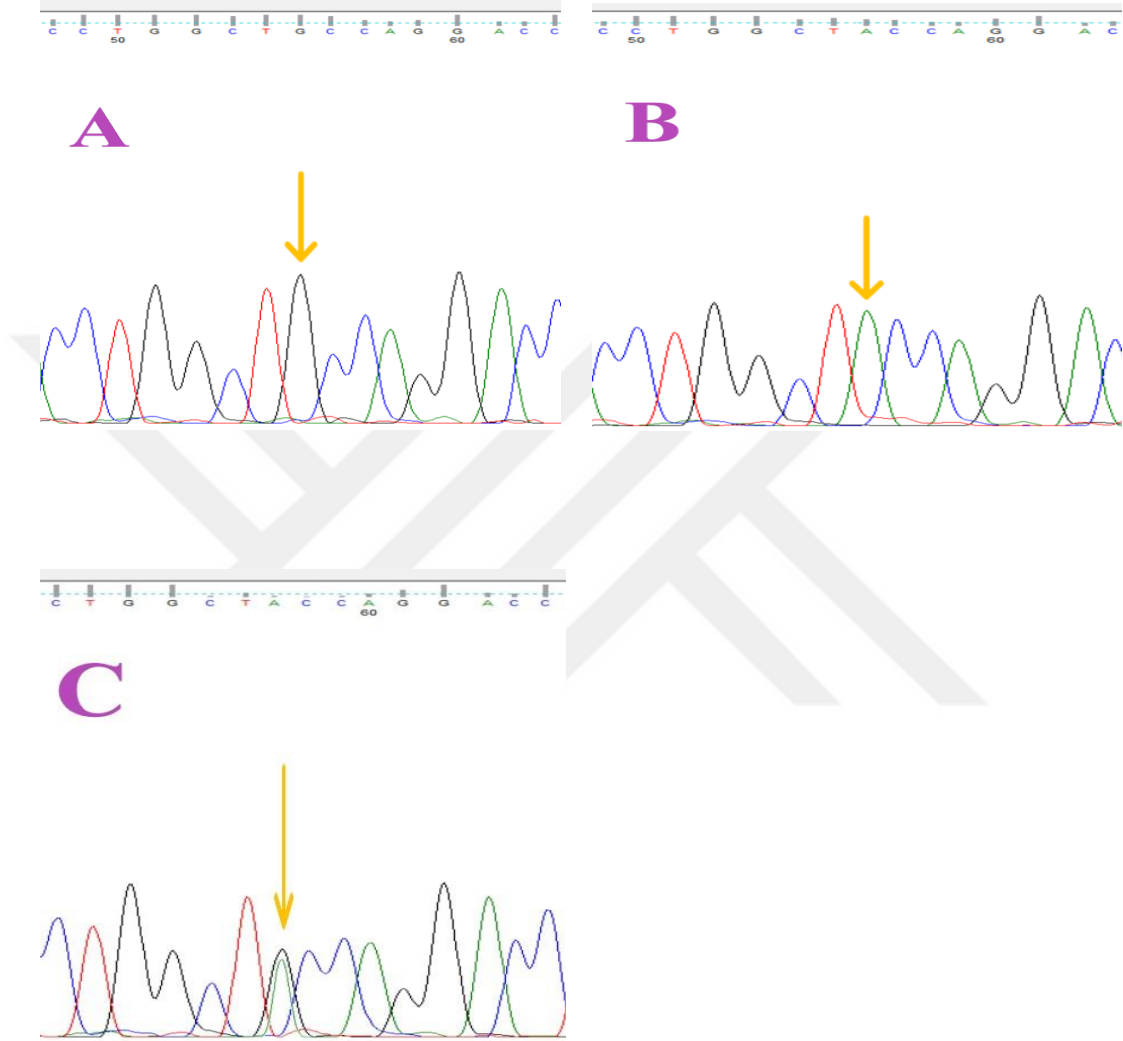
A) *PD-1* gen polimorfizmine ait C/T genotipi, **B)** T/T genotipi

Ek 3. *PD-L1* (rs4143815, C/G) Gen Polimorfizmine Ait DNA Dizi Analizi Örnek Görüntüleri



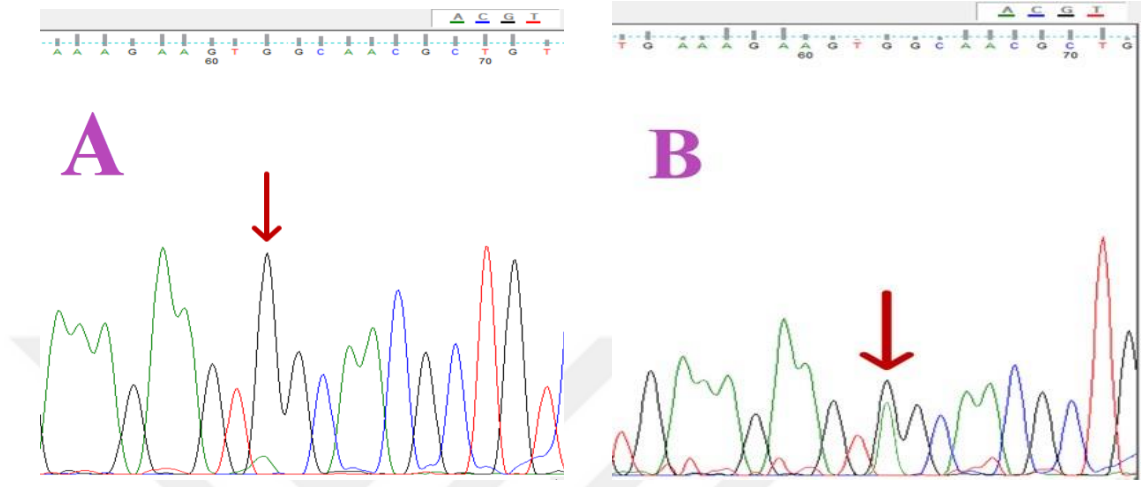
A) *PD-L1* gen polimorfizmine ait G/G genotipi, B) C/C genotipi, C) C/G genotipi

Ek 4. CTLA-4 (rs231775, +49 A/G) Gen Polimorfizmine Ait DNA Dizi Analizi Örnek Görüntüleri



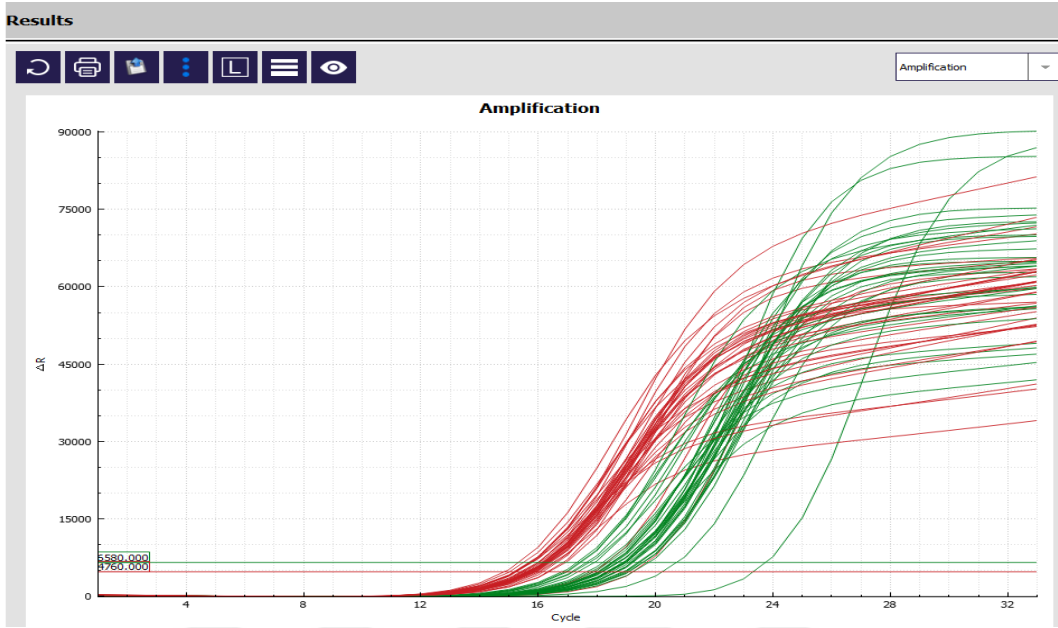
A) CTLA-4 gen polimorfizmine ait G/G genotipi, B) A/A genotipi C) A/G genotipi

Ek 5. *CD80* (rs2228017, 452G/A) Gen Polimorfizmine Ait DNA Dizi Analizi Örnek Görüntüleri



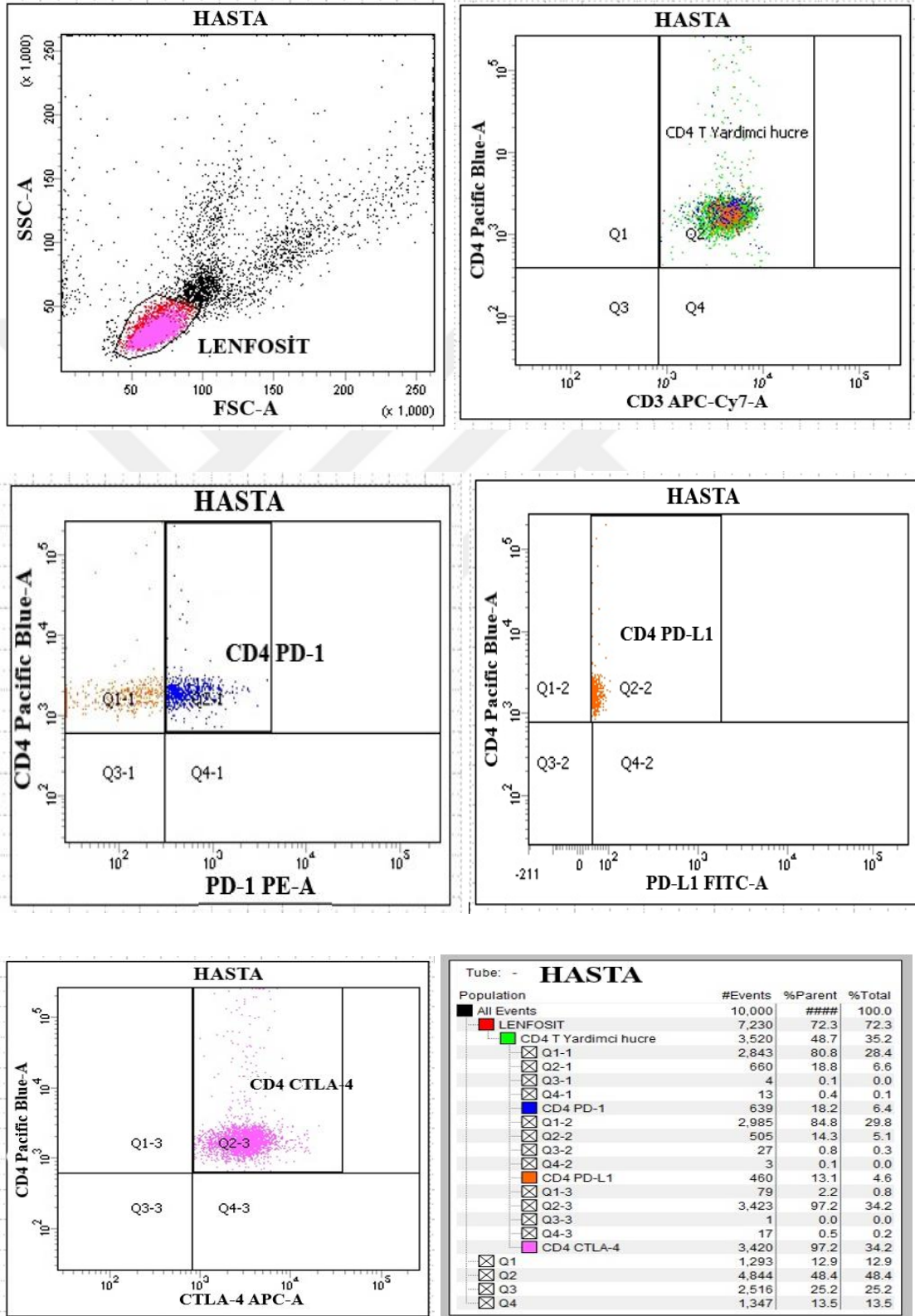
A) *CD80* gen polimorfizmine ait G/G genotipi, **B)** G/A genotipi

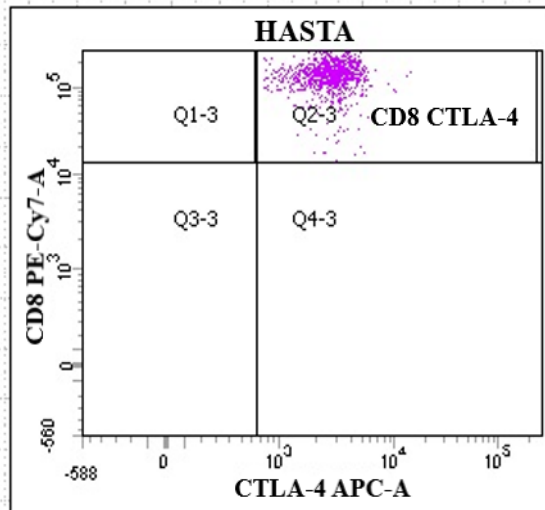
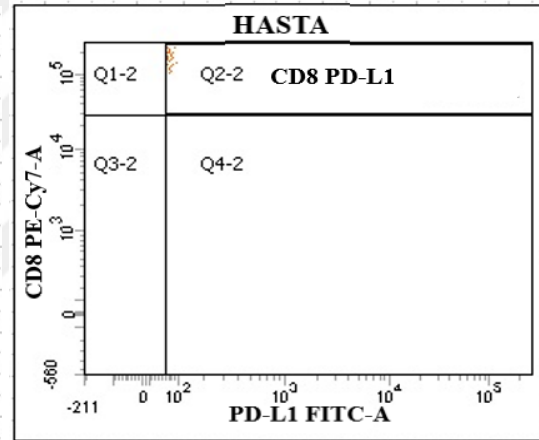
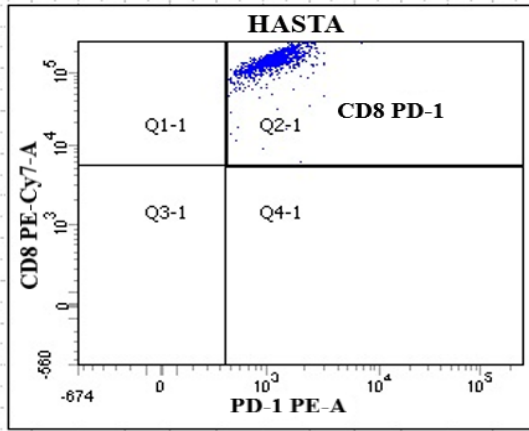
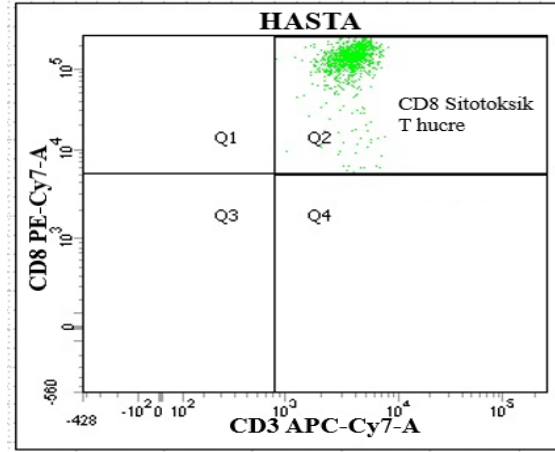
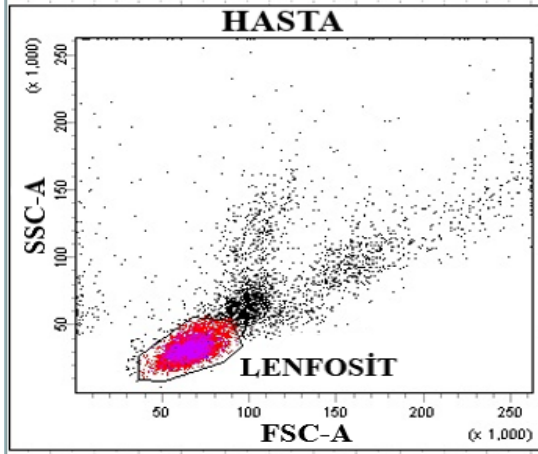
Ek 6. Olguların Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR Analizinden Örnek Görüntü



Olguların ışıma eğrileri (yeşil renk), referans genin ışıma eğrileri (kırmızı renk)

Ek 7. Hasta Grubunun Akış Sitometri Analizi Örnek Görüntüleri

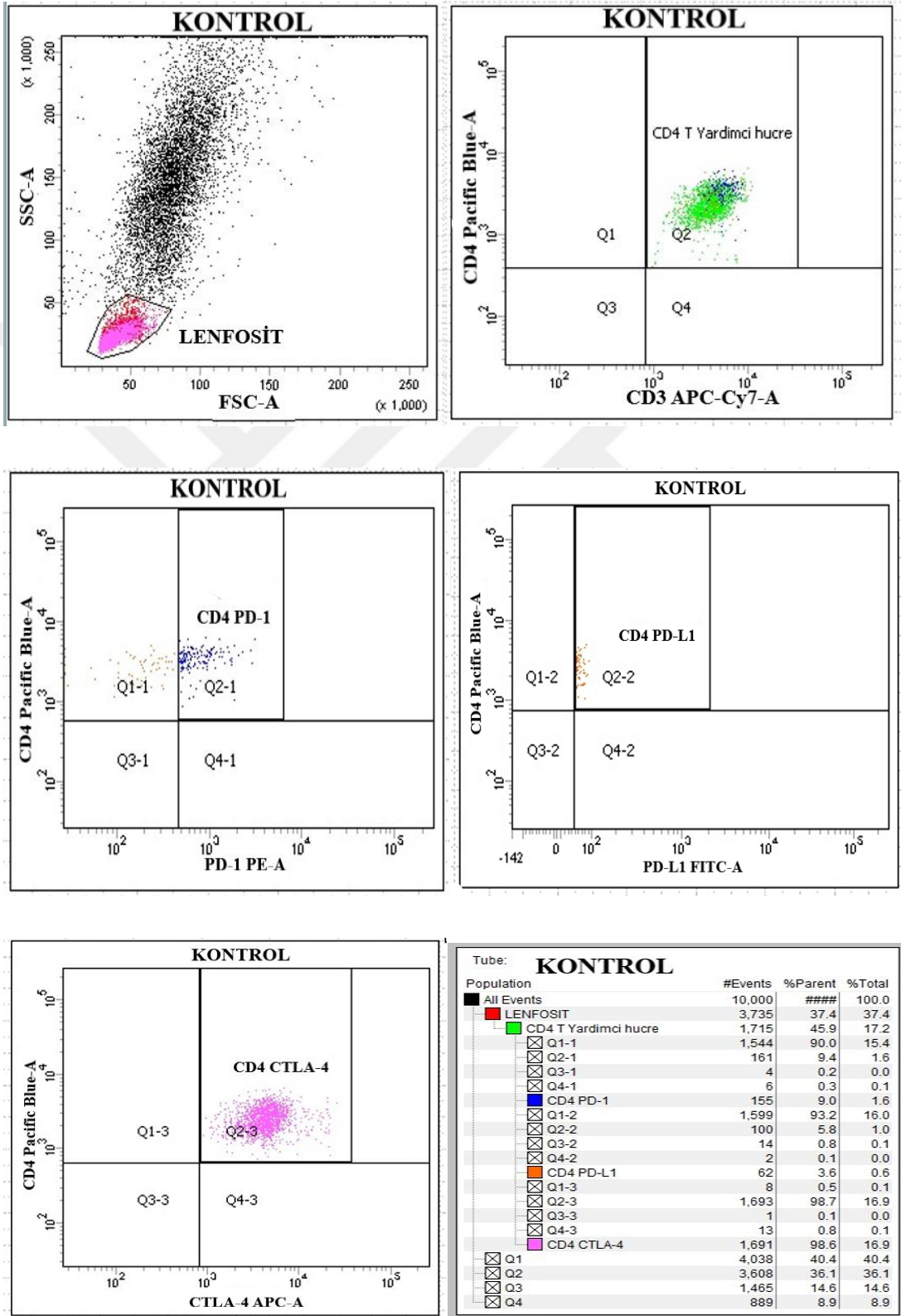


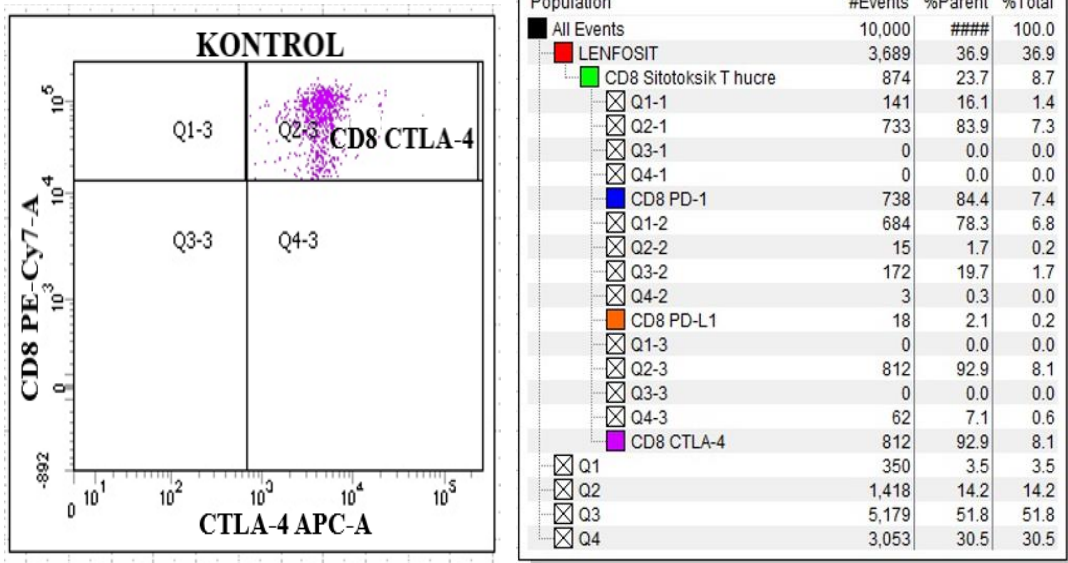
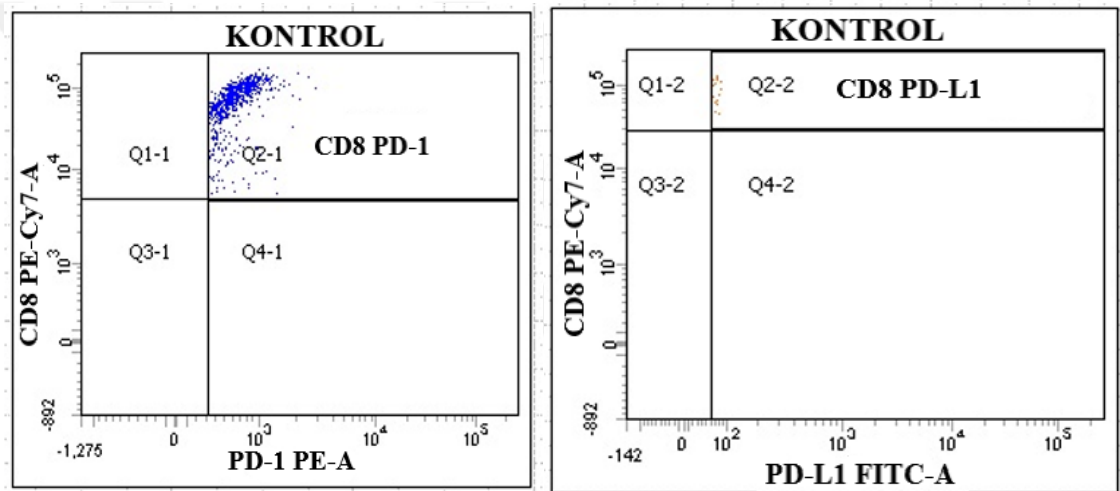
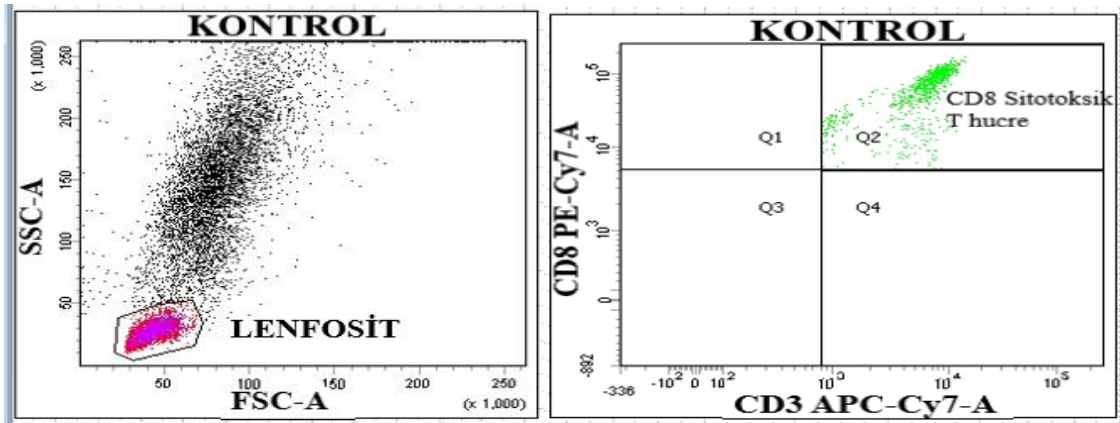


Tube: - **HASTA**

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	####	100.0
LENFOSİT	7,224	72.2	72.2
CD8 Sitotoksik T hucre	1,068	14.8	10.7
Q1-1	47	4.4	0.5
Q2-1	1,020	95.5	10.2
Q3-1	0	0.0	0.0
Q4-1	1	0.1	0.0
CD8 PD-1	1,015	95.0	10.2
Q1-2	1,010	94.6	10.1
Q2-2	24	2.2	0.2
Q3-2	34	3.2	0.3
Q4-2	0	0.0	0.0
CD8 PD-L1	41	3.8	0.4
Q1-3	35	3.3	0.4
Q2-3	1,013	94.9	10.1
Q3-3	0	0.0	0.0
Q4-3	20	1.9	0.2
CD8 CTLA-4	1,015	95.0	10.2
Q1	268	2.7	2.7
Q2	1,652	16.5	16.5
Q3	3,724	37.2	37.2
Q4	4,356	43.6	43.6

Ek 8. Kontrol Grubunun Akış Sitmetri Analiz Örnek Görüntüleri





ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Habibe Sema	Uyruğu	T.C.
Soyadı	ARSLAN	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	Amasya Macit Zeren Fen Lisesi	2007
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi/Fen Fak. Biyoloji	2012
Yüksek Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi/SABE Tıbbi Biyoloji	2014
Doktora	Akdeniz Üniversitesi/ SABE Tıbbi Genetik	2021

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Araş. Gör.	Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi	2015-2017
Araş. Gör.	Akdeniz Üniversitesi	2017-2021

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce		

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Akdeniz Bölgesinde Yetiştirilen Ana Arıların Kalite Kriterleri Bakımından İncelenmesi	Akdeniz Üniversitesi	2018-2019
Bilimsel Araştırmalarda Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalının Yeri ve Önemi	Akdeniz Üniversitesi	2019-2020
Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma Hastalarında PD-1 ve CTLA-4 Gen Varyasyonları ile Ekspresyon Seviyelerinin İlişkisi	Akdeniz Üniversitesi	2018-2021

Yayınlar ve Bildiriler:

1. Relationship of HLA-B alleles on susceptibility to and protection from HIV infection in Turkish population

Darbas S., Inan D., Kilinc Y., Arslan H.S., Ucar F., Boylubay O., Koksoy S., Mutlu E., Yucel B., Ekinci N.

North Clin Istanbul. Ahead of Print: NCI-00018 | DOI: 10.14744/nci.2021.00018

2. Influence of ESR1 Variants on Clinical Characteristics and Fibromyalgia Syndrome in Turkish Women

ARSLAN H. S. , NURSAL A. F. , Inanir A., KARAKUŞ N., YİĞİT S.
ENDOCRINE METABOLIC & IMMUNE DISORDERS-DRUG TARGETS, cilt.21,
sa.7, ss.1326-1332, 2021 (DOI : 10.2174/1871530320666200910110915)

3. New markers for predictions of acute and chronic rejection and graft outcomes in kidney transplant recipients; HLA-G gene 3'-UTR 14 bp polymorphism and sHLA-G

Darbas S., YILMAZ V. T., KOÇAK H., KISAOĞLU A., DEMİRYILMAZ İ., AYDINLI B., ARSLAN H. S., UÇAR F.
GENE, cilt.790, 2021

4. Determination Of The Quality Criteria Of Queen Bees Produced In Different Provinces Of Turkey In Autumn

ARSLAN S., Karkacier O., CENGİZ M. M., Arslan H. S.
5th INTERNATIONAL CONGRESS ON VOCATIONAL AND TECHNICAL SCIENCES, Kahire, Mısır, 24 - 27 Ocak 2019, ss.149-157

5. Türkiye’de Arıcılığın Genel Görünümü ve Pazarlama Sorunları

ARSLAN S., Karkacier O., CENGİZ M. M., Arslan H. S.
5th INTERNATIONAL CONGRESS ON VOCATIONAL AND TECHNICAL SCIENCES, Kahire, Mısır, 24 - 27 Ocak 2019, ss.157-164

6. Akdeniz Bölgesinde Erken Dönemde Yetiştirilen Ana Arıların Kalite Kriterlerinin Standartlara Uygunluklarının Belirlenmesi

ARSLAN S. , ARSLAN H. S. , CENGİZ M. M. , KARAKUŞ B.
6.Uluslararası Arıcılık ve Çam Balı Kongresi, Muğla, Türkiye, 15 - 19 Ekim 2018, ss.42-48

7. Antibacterial Activity of Propolis From Different Locality of Turkey

ARSLAN S. , YANAR D., YANAR Y., ARSLAN H. S.

IASTEM International Conferance, Pattaya, Tayland, 10 - 11 Aralık 2017, cilt.1, ss.1-3
Antibacterial Activity of Propolis From Different Locality of Turkey

8. Fibromiyalji Kadın Hastalarda Östrojen Reseptör Alfa 1 Gen Polimorfizmi

ARSLAN H. S. , YİĞİT S.

15. ULUSAL TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK, Muğla, Türkiye, 26 - 29 Ekim 2017,
ss.1

9. Comparison of Quality Characteristics of Some Honeys Produced in Different Regions of Turkey

ARSLAN S. , ARSLAN H. S.

ECBA May 28-29, 2016 (ENGINEERING & TECHNOLOGY, COMPUTER, BASIC & APPLIED SCIENCES), Bangkok, Tayland, 28 - 29 Mayıs 2016

10. Quality Criteria and Standards Compliance With Grown Queen Bee at Mediterranean Region in Turkey

ARSLAN S. , GÜLER A., ARSLAN H. S.

ICENS 2015 (International Conferenceon Engineering and Natural Science), Bangkok, Tayland, 21 - 23 Ocak 2015, ss.211-220